



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120909** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 39/29** (2006.01) **C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01) **C12R 1/93** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01) **C07K 14/005** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01) **A61K 39/12** (2006.01)  
**C07K 14/02** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2015 03644**  
(22) Дата подання заявки: **19.09.2013**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.03.2020**  
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **13/622,965**  
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **19.09.2012**  
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.08.2015, Бюл.№ 16**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.03.2020, Бюл.№ 5**  
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2013/060618, 19.09.2013**

(72) Винахідник(и):  
**Уейнер Девід Б (US),  
Янь Цзянь (US),  
Обенг-Аджей Ніямекіс (US)**

(73) Власник(и):  
**ДЗЕ ТРАСТІЗ ОФ ДЗЕ ЮНІВЕРСІТІ ОФ  
ПЕНСИЛЬВАНІЯ,  
3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia,  
Pennsylvania 19104-6283, United States of  
America (US)**

(74) Представник:  
**Бочаров Максим Анатолійович, реєстр.  
№367**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
WO 2008103380 A2, 28.08.2008  
WO 2012109404 A1, 16.08.2012  
WO 2009036228 A2, 19.03.2009  
Araujo N M et al, "Expression of Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) from genotypes A, D and F and influence of amino acid variations related or not to genotypes on HBsAg detection", Brazilian journal of infectious diseases, (20090101), vol. 13, no. 4, P. 266-271  
WO 2012109668 A1, 16.08.2011  
Kutzler M et al, "DNA vaccines: ready for prime time?", Nature reviews: genetics, Nature publishing group, United Kingdom, vol. 9, no. 10, (20081001), P. 776-788  
Q6VBP1, UniProtKB/TrEMBL entry Q6VBP-1HBV. [Інтернет-публікація], URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6VBP1.txt?version=54>, (знайдено 03.04.2018)  
US 20120034256 A1, 09.02.2012  
US 20040146529 A1, 29.07.2004  
CN 101502650 A1, 12.08.2009  
JF439753, GenBank Accession No.  
JF439753, Hepatitis B virus isolate MAU95A2 polymerase (p) gene, complete cds. [Інтернет-публікація], URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF439753>, (знайдено 03.04.2018)  
WO 2010016073 A2, 11.02.2010  
US 20100291144 A1, 18.11.2010

UA 120909 C2

**(54) КОРОВИЙ БІЛОК ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В І ПОВЕРХНЕВИЙ АНТИГЕННИЙ БІЛОК ТА ВАКЦИНА, ЩО ЇХ МІСТИТЬ****(57) Реферат:**

Винахід стосується вакцини для генерації імунної відповіді проти HBV у суб'єкта, яка містить послідовності нуклеїнових кислот, що кодують корові білки вірусу гепатиту В (HBV), поверхневі антигенні білки, їх фрагменти і комбінації, а також генетичні конструкти/вектори і вакцини, які експресують зазначені білкові послідовності. Також стосується способу застосування заявленої вакцини.



## Галузь техніки

[0001] Цей винахід відноситься до послідовностей нуклеїнових кислот, що кодують корові білки вірусу гепатиту В (HBV), поверхневі антигенні білки, їх фрагменти та комбінації, до корових білків вірусу гепатиту В (HBV), поверхневих антигенних білків, їх фрагментів і комбінацій, до поліпшених HBV-вакцин, до поліпшених способів індукції імунної відповіді на HBV і до поліпшених способів профілактичної та/або терапевтичної імунізації індивідуумів проти HBV.

## Рівень техніки

[0002] Гепатит В є глобальною інфекцією, поширеною по всій земній кулі, яка призводить до розвитку цирозу, печінкової недостатності і гепатоцелюлярної карциноми. Значна кількість випадків гепатиту не повідомляється через безсимптомний характер захворювання. Тим не менше, повідомляється про близько 350 мільйонів хронічних випадків гепатиту В щороку. Більша частина зараженого гепатитом населення перебуває в слаборозвинутих країнах і тих, що розвиваються.

[0003] Вірус складається з чотирьох основних серотипів (adr, adw, ayr, ayw), виходячи з антигенних епітопів, присутніх на його білкових оболонках. Виходячи з мінливості геномних послідовностей існує принаймні вісім генотипів (A-H) вірусу гепатиту. Альтернативні генотипи HBV мають переважаючий географічний розподіл.

[0004] У Таблиці 1 показаний географічний розподіл генотипів HBV.

Таблиця 1

Географічний розподіл генотипів HBV

| HBV генотип                    | HBV геносубтип | HBsAg субтип | частота | основний географічний розподіл                   |
|--------------------------------|----------------|--------------|---------|--------------------------------------------------|
| A                              | A2             | adw2         | висока  | Європа, Північна Америка, Австралія              |
|                                | A1             | ayw1, adw2   | висока  | Африка                                           |
| B                              | B1 B2, B3      | adw2         | висока  | Далекий Схід                                     |
|                                | B4             | ayw1         | висока  | Далекий Схід                                     |
|                                | B2             | adw3         | висока  | Далекий Схід                                     |
| C                              | C1, C2, C4     | adr          | висока  | Далекий Схід                                     |
|                                | C3             | adrq-        | висока  | Нова Гвінея, Тихоокеанський регіон               |
|                                | C1, C2         | ayr          | висока  | Далекий Схід                                     |
|                                | C1, C3         | adw2         | низька  | Далекий Схід                                     |
|                                | C4             | ayw3         | низька  | Далекий Схід, Тихоокеанський регіон              |
| D                              | D1, D3, D4     | ayw2         | висока  | Західна Азія, Східна Європа, Середземномор'я     |
|                                | D2, D3         | ayw3         | висока  | по всьому світу                                  |
|                                | Не визначено   | adw3         | низька  | Східна Європа, Іспанія                           |
|                                | D2             | ayw4         | низька  | Східна Європа, Іспанія, США                      |
| E                              | -              | ayw4         | висока  | Африка                                           |
| F                              | F1, F2         | adw4q-       | висока  | Латинська Америка, Аляска, Тихоокеанський регіон |
|                                |                |              |         |                                                  |
|                                | F1, F2         | ayw4         | низька  | Латинська Америка                                |
| G                              | -              | adw2         | низька  | Європа, Північна Америка                         |
| H                              | -              | ayw4         | низька  | Центральна Америка                               |
| J. Med. Virol, DOI 10.1002/jmv |                |              |         |                                                  |
|                                |                |              |         |                                                  |

[0005] Геном HBV представлений кільцевою, в основному, дволанцюговою молекулою ДНК, один із ланцюгів якої довший, ніж інший... Дволанцюгова ділянка виникає внаслідок гібридизації короткого ланцюга, що складається приблизно з 3020 нуклеотидів, з більш довгим ланцюгом, що складається приблизно з 3320 нуклеотидів. Одноланцюгова ділянка на негібридизованих нуклеотидах більш довгого ланцюгу зв'язана з ДНК-полімеразою HBV. Геномна ДНК HBV і ДНК-полімераза HBV містяться в нуклеокапсиді, утвореному численними молекулами корового білку HBV (HBsAg). Коровий білок HBV огорнутий HBV-поверхневим білком або антигеном (HBsAg) і ліпідними молекулами.

[0006] Геном HBV містить чотири відкриті рамки зчитування (ORF), які кодують сім різних

білків: 1) ORF, яка кодує ДНК-полімеразу HBV, 2) ORF, яка має два стартових кодони, причому послідовність, приєднана до другого стартового кодону, кодує коровий білок, а послідовність, яка містить додатковий upstream стартовий кодон, кодує послідовність, названу pre-C; 3) ORF, яка має три стартові кодони, причому один кодує поверхневий білок (S-білок; gp27), один включає upstream стартовий кодон, який кодує послідовність, названу pre-S2 (gp36), а інший, який включає додатковий upstream стартовий кодон, який кодує послідовність, названу pre-S1 (gp42); і 4) ORF, яка кодує HBxAg, білок, функція якого менш зрозуміла (Фігура 1). Ці білки включають 3 поверхневі білки або антигени (HBsAg): preS1, preS2 і основний S.

[0007] Особливості HBsAgs проілюстровані на Фігурі 2. Епітопи HBsAgs, що беруть участь в експресії субтипів специфічності, розташовані в ділянці, яка включає дві зовнішні петлі молекул поверхневого антигену HBV (тобто амінокислоти 110-180 S-білку), і зумовлюють антигенну різноманітність штамів HBV. Ця ж ділянка містить невідому кількість епітопів, які визначають детермінанту "а" HBsAg, яка є спільною для всіх відомих штамів HBV дикого типу.

[0008] Профілактичні вакцини та методи лікування HBV-інфекції включають введення субвірусних частинок, виділених з плазми хронічних носіїв, або субвірусних частинок, що продукуються у вигляді рекомбінантних білків у стабільно трансфікованих еукаріотичних клітинних лініях. Субвірусні частинки являють собою вірусні білки і такі вакцини часто називають субодиничними вакцинами. Білки HBV вводять індивідууму і вони стають мішенями для імунної системи індивідуума. У неінфікованих індивідуумів імунна відповідь на субодиничну вакцину захищає неінфікованого індивідуума від HBV-інфекції. У інфікованих індивідуумів імунна відповідь, індукована вакциною, може мати терапевтичний ефект.

[0009] Chisari F.V., Am J Pathol., 2000. 156:1117-1132 і Pompeus P. et al. Intervirology 2001. 44:98-114 розкрили геномну організацію HBV. Deny P. і F. Zoulim, Pathologie Biologie 2010, Aug, 58(4):245 53 обговорили діагностику і лікування вірусу гепатиту В. Michel M.L. і P. Tiollais, Pathologie Biologie 2010, Aug, 58(4):288 95 обговорили вакцини гепатиту В та їх захисну ефективність і терапевтичний потенціал. Публікація PCT WO2004026899 розкриває використання імуногену, що містить поліпептидну послідовність з амінокислотними послідовностями HBV. Опублікована заявка PCT WO2008093976 розкриває HBV-кодуючі послідовності, білки і вакцини, включаючи вакцину, яка містить рекомбінантний повнорозмірний поверхневий антиген HBV і коровий антиген HBV. Весь поверхневий антиген HBV складається з трьох типів поверхневого білку (L білку, M білку і S білку). Опублікована заявка PCT WO2009130588 розкриває HBV-кодуючі послідовності, білки та вакцини, включаючи нуклеїнову кислоту, що кодує коровий антиген вірусу гепатиту В, кодон-оптимізований для експресії в організмі людини. Публікація PCT WO2010127115 розкриває доставку послідовностей HBV з використанням рекомбінантних векторів.

[0010] Доступні вакцини HBV демонструють деяку ефективність, але є дорогими у виробництві. Крім того, отримані з плазми субодиничні вакцини мають сумнівний профіль безпеки. Було вивчено кілька вакцинних підходів, в тому числі заснованих на застосуванні рекомбінантних живих векторів, синтетичних пептидів і ДНК-вакцин, які містять кодон-оптимізовані кодуючі послідовності білків HBV. Ці підходи на сьогодні мають змінну обмежену ефективність. Крім того, через геномні відмінності деякі вакцини HBV демонстрували позитивну ефективність у деяких географічних регіонах і обмежену ефективність в інших регіонах.

[0011] Наявні в даний час вакцини на основі HBsAg, отримані з дріжджів, трансфікованих ДНК, що кодує S-білок (наприклад, ENGERIX-B, доступна від SmithKline Biologicals, що знаходиться в Бельгії, і RECOMBIVAX/HB-VAX II, доступна від Merck & Co., що знаходиться в США) не викликають реакцію у приблизно 5 % -10 % пацієнтів (C. Belloni, Immunogenicity of hepatitis B vaccine in term and preterm infants. Acta Paediatrica, 1998. 87: p. 336-338). Крім того, рівень резистентності до вакцинації зростає до 30 % у літніх осіб, а імунітет проти HBV може знизитися через кілька років після вакцинації. Також для досягнення повного захисту використовують багатократні дози. Для HBsAg-вакцини ENGERIX-B існує проблема безпечності, оскільки ENGERIX-B у три рази збільшує ризик запальної демієлінізації центральної нервової системи (ЦНС).

[0012] Решта HBsAg-вакцин, отриманих з клітин ссавців, використовують pre-S1 та pre-S2 додатково до S-білку. Антигени pre-S1 і pre-S2 експресують високоімуногенні Т- і В-клітинні епітопи, і одна така вакцина викликає імунну реакцію у приблизно 80 % індивідуумів, що не відповідають або слабо відповідають на вакцинацію (Rendi-Wagner, P. et al., Comparative immunogenicity of PreS/S hepatitis B vaccine in non-and low responders to conventional vaccine. Vaccine, 2006. 24: p. 2781-9.).

[0013] Було вивчено безпосереднє введення послідовностей нуклеїнових кислот для вакцинації проти захворювань тварин і людини і багато зусиль було зосереджено на



ефективних і дієвих засобах доставки нуклеїнової кислоти з метою отримання необхідної експресії бажаних антигенів, що призводять до імунної відповіді, і, в кінцевому рахунку, до успіху цього способу.

[0014] ДНК-вакцини роблять можливим ендogenous антигенний синтез, який індукує CD8+ гістосумісний комплекс, цитотоксичні Т-лімфоцити, рестриковані І класом комплексу гістосумісності, які рідко отримують з субодиночними вакцинами. Крім того, антигенний синтез, який відбувається протягом тривалого періоду, може допомогти подолати низьку чутливість і усунути або зменшити потребу в бустер-ін'єкціях. Крім того, ДНК-вакцини, вочевидь, дуже стабільні і прості у виготовленні.

[0015] ДНК-вакцини є безпечними, стабільними, простими для виготовлення і такими, що добре переносяться пацієнтами в доклінічних випробуваннях, що вказує на відсутність ознак інтеграції плазмиди [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]. Крім того, ДНК-вакцини добре підходять для повторного введення в зв'язку з тим, що ефективність вакцини не залежить від наявних попередньо титрів антитіл до вектора [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]. Однак однією з основних перешкод для клінічного прийняття ДНК-вакцин було зниження імуногенності при переході до більш великих тварин [Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet*, 2005. 55: p. 25-40].

[0016] Останні технологічні досягнення в розробці ДНК-вакцинного імуногену поліпшили експресію та імуногенність ДНК-вакцин шляхом кодон-оптимізації, РНК-оптимізації та додавання імуноглобулінових лідерних послідовностей [Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, 1998. 72(2): p. 1497-503; Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10991-1001; Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. *Vaccine*, 2007. 25(16): p. 2984-9; Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. *Gene Ther*, 2004. 11(6): p. 522-33], а також розробленої останнім часом технології систем доставки плазмід, такої як електропорація [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 2008. 26(3): p. 440-8; Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol*, 2007. 81(10): p. 5257-69; Ahlen, G., et al., in vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3+T cells. *J Immunol*, 2007. 179(7): p. 4741-53]. Технологію електропорації in vivo використовували у клінічних випробуваннях на людях для доставки протиракових препаратів, таких як блеоміцин, і в багатьох доклінічних дослідженнях на великій кількості видів тварин. Крім того, дослідження показали, що використання консенсусних імуногенів може значно розширити клітинну імунну відповідь порівняно з тільки нативними антигенами [Yan, J., et al., Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine. *Mol Ther*, 2007. 15(2): p. 411-21; Rolland, M., et al., Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol*, 2007. 81(16): p. 8507-14].

[0017] Антитіла та цитотоксичні Т-клітини (CTL) до різних антигенів HBV можуть брати участь у зниженні вірусного навантаження та очистки HBV-інфікованих клітин з печінки. Основне завдання для сучасних вакцин-кандидатів полягає в індукції як гуморального, так і клітинного імунітету до множинних HBV-антигенів-мішеней і проти основних генотипів HBV. Зберігається потреба в конструктах нуклеїнових кислот, які кодують білок HBV, і композиціях, придатних для індукції імунної відповіді проти HBV. Зберігається потреба в ефективних вакцинах проти HBV, які є економічно вигідними та ефективними. Зберігається потреба в ефективних вакцинах, які збільшують нейтралізуючі титри антитіл і викликають Т-клітинний компонент. Зберігається потреба в ефективних вакцинах проти HBV, у тому числі тих, які ефективні проти штамів HBV, що мають широкий спектр генотипів, і переважно в універсальній вакцині, яка буде ефективною глобально.

Суть винаходу

[0018] Цей винахід стосується вакцини, що містить: (а) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує один або більше білків, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6; (b) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує один або більше білків, вибраних з

групи, що складається з: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:14, білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:14; і (с) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує один або більше білків, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:16, білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, і білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:16. Молекули нуклеїнових кислот можуть містити одну або більше нуклеотидних послідовностей, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 і SEQ ID NO:15.

[0019] Даний винахід також може поширюватись на вакцину, яка містить (а) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує один або більше білків, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6; (b) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує один або більше білків, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:14, білку, який на 95 % ідентичний по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, білку, який на 95 % ідентичний по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:14; і (с) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує один або більше білків, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:16, білку, який на 95 % ідентичний по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, і білку, який на 95 % ідентичний по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:16.

[0020] Вакцина може бути плазмідною, яка містить нуклеїнові кислоти, описані вище. Молекули нуклеїнових кислот можуть бути включеними у вірусні частинки. Вакцина може додатково містити ад'ювантну молекулу. Ад'ювантом може бути IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, тромбоцитарний фактор росту (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, епідермальний фактор росту (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-21, IL-31, IL-33 або їх комбінація; і в деяких варіантах здійснення IL-12, IL-15, IL-28 або RANTES.

[0021] Даний винахід також стосується способу індукції імунної відповіді проти антигену HBV, що включає введення вакцини згідно з даним винаходом суб'єкту.

[0022] Даний винахід також стосується способу захисту суб'єкта від HBV-інфекції, що включає введення вакцини згідно з даним винаходом суб'єкту.

[0023] Даний винахід додатково стосується способу захисту суб'єкта, у якого діагностовано HBV-інфекцію, що включає введення вакцини згідно з даним винаходом суб'єкту.

[0024] Даний винахід додатково включає вакцини, корисні для індукції імунної відповіді проти HBV. Розробка імунотерапевтичної вакцини HBV широкого спектру дії проти багатьох генотипів може бути забезпечена з допомогою терапевтичної ДНК-вакцини HBV, яка базується на цілеспрямованій дії на універсальні консервативні кор-специфічні антигени HBV. Використання консенсусних HBV-імуногенів індуктує більш широкі клітинні відповіді та може бути корисним, щоб звести до мінімуму ступінь розбіжності послідовностей між різними штамми вірусу.

[0025] Передбаченими в даному документі є білки, вибрані з групи, що складається з: білків, які містять SEQ ID NO:2, білків, які на 95 % ідентичні по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:2; фрагментів SEQ ID NO:2; білків, які на 95 % ідентичні фрагментам SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:4, білків, які на 95 % ідентичні по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:4; фрагментів SEQ ID NO:4; білків, які на 95 % ідентичні фрагментам SEQ ID NO:4 SEQ ID NO:6, білків, які на 95 % ідентичні по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:6; фрагментів SEQ ID NO:6; і білків, які на 95 % ідентичні фрагментам SEQ ID NO:6.

[0026] Передбаченим в даному документі є білок, вибраний з групи, яка складається з (а) SEQ ID NO:2; (b) білку, що на 95 % ідентичний по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірній послідовності, вказаній в SEQ ID NO:2; (с) імуногенного фрагмента SEQ ID NO:2, який містить 20 або більше амінокислот SEQ ID NO:2; і (d) імуногенного фрагмента білку, який на 95 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:2, який містить 20 або більше амінокислот.

[0027] Також передбачені молекули нуклеїнових кислот, які містять послідовності, що кодують одну або більше молекул білку, вказаних вище. В деяких варіантах здійснення, молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO:1; послідовності нуклеїнової кислоти, яка на 95 % ідентична по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:1; фрагмента SEQ ID NO:1; послідовності нуклеїнової кислоти, яка на 95 % ідентична фрагменту SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3; послідовності нуклеїнової кислоти, яка

на 95 % ідентична по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:3; фрагмента SEQ ID NO:3; послідовності нуклеїнової кислоти, яка на 95 % ідентична фрагменту SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; послідовності нуклеїнової кислоти, яка на 95 % ідентична по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:5; фрагмента SEQ ID NO:5; і послідовності нуклеїнової

кислоти, яка на 95 % ідентична фрагменту SEQ ID NO:5.

[0028] Деякі аспекти винаходу передбачають способи індукування імунної реакції HBV, що включають етап введення індивідууму молекул корового антигену HBV та/або поверхневого антигену HBV та/або композицій.

[0029] Додаткові аспекти винаходу передбачають способи захисту індивідуума проти HBV-інфекції. Способи включають етап введення вказаному індивідууму профілактично ефективної кількості молекул нуклеїнової кислоти, яка містить таку послідовність нуклеїнової кислоти, або композицій, причому послідовність нуклеїнової кислоти експресується в клітинах вказаного індивідуума та індукується захисна імунна реакція проти білку, який кодується вказаною послідовністю нуклеїнової кислоти.

[0030] В деяких аспектах винаходу передбачені способи лікування індивідуума, інфікованого HBV. Спосіб включає етап введення вказаному індивідууму терапевтично ефективної кількості таких молекул нуклеїнових кислот та/або композицій.

[0031] Даний винахід передбачає в іншому аспекті молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить кодуєчу послідовність, що кодує один або більше білків, вибраних з групи, яка складається з: (a) білку, що містить SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16; (b) білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16; (c) імуногенного фрагмента білку, що містить SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16, який складається з принаймні 20 амінокислот; і (d) імуногенного фрагмента білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16, який складається з принаймні 20 амінокислот.

[0032] Молекула нуклеїнової кислоти може містити одну або більше послідовностей, вибраних з групи, що складається з: (a) послідовності нуклеїнової кислоти, яка містить SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:15; (b) послідовності нуклеїнової кислоти, яка на 98 % ідентична по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:15; (c) їх фрагментів, які містять послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує імуногенні фрагменти, які містять принаймні 20 амінокислот, що кодується послідовністю SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:15; і (d) їх фрагментів, які містять послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує імуногенні фрагменти, які містять принаймні 20 амінокислот білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності білку, що кодується послідовністю SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:15. Молекула нуклеїнової кислоти може бути плазмідною. Молекула нуклеїнової кислоти може бути вектором експресії та послідовностями, які кодують вказаний один або більше білків, функціонально зв'язаними з регуляторними елементами. Молекула нуклеїнової кислоти може бути вкоюченою у вірусну частинку.

[0033] Деякі аспекти винаходу передбачають спосіб індукції імунної відповіді проти антигену HBV, що включає введення молекули нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом суб'єкту.

[0034] Деякі аспекти винаходу передбачають спосіб захисту суб'єкта від HBV-інфекції, що включає введення молекули нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом суб'єкту.

[0035] Деякі аспекти винаходу передбачають спосіб захисту суб'єкта, у якого діагностовано HBV-інфекцію, що включає введення молекули нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом суб'єкту.

[0036] Даний винахід передбачає ще в іншому аспекті білок, вибраний з групи, що складається з: (a) SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16; (b) білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16; (c) імуногенного фрагмента послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16, який містить 20 або більше амінокислот; і (d) імуногенного фрагмента білку, який на 98 % ідентичний по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16, який містить 20 або більше амінокислот.

[0037] Деякі аспекти винаходу передбачають вакцину, корисну для генерації імунної відповіді проти HBV у суб'єкта, що містить: молекулу нуклеїнової кислоти згідно з даним винаходом і ад'ювантну молекулу. Ад'ювантом може бути IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, тромбоцитарний фактор росту (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, епідермальний фактор росту (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-21, IL-31, IL-33 або їх комбінація; і в деяких

варіантах здійснення, IL-12, IL-15, IL-28 або RANTES.

Короткий опис графічних матеріалів

[0038] Фігура 1 являє собою карту, яка показує організацію геному HBV, що складається з чотирьох ORF, які перекриваються.

5 [0039] Фігура 2 ілюструє організацію і особливості поверхневих антигенів HBV.

[0040] Фігура 3 ілюструє IgELS і ендопроотеолітичний сайт розщеплення в консенсусному поверхневому антигені HBV.

[0041] Фігура 4 ілюструє довгий консенсусний поверхневий антиген HBV (LHBs) і малий консенсусний поверхневий антиген HBV (SHBs).

10 [0042] Фігура 5 являє собою карту вектора рGX1801 HepB – Mcore (SEQ ID NO:17).

[0043] Фігура 6 являє собою карту вектора рGX1802 HepB рLHBs-A (SEQ ID NO:18).

[0044] Фігура 7 являє собою карту вектора рGX1803 HepB рLHBs-C (SEQ ID NO:19).

[0045] Фігура 8 являє собою карту вектора рGX1804 HepB рSHBs-A (SEQ ID NO:20).

[0046] Фігура 9 являє собою карту вектора рGX1805 HepB SHBs-C (SEQ ID NO:21).

15 [0047] Фігура 10 ілюструє філогенетичний аналіз консенсусної послідовності в порівнянні з індивідуальними генотипами A, B, C, D і E.

[0048] Фігури 11A і 11B демонструють результати експериментів з приводу експресії рMCore. Фігура 11A ілюструє результати протоколу трансляції *in vitro*. Фігура 11B ілюструє результати вестерн-блотингу.

20 [0049] Фігура 12 являє собою графік, який ілюструє плазмідну карту і послідовність рMCore.

[0050] Фігура 13 ілюструє реакцію транскрипції/трансляції з використанням плазміди рMCore, в якій отриманий білок MCore імунно осаджувався з анти-НА моноклональним антитілом і був розігнаний в гелі SDS-PAGE.

25 [0051] Фігура 14 ілюструє виявлення білку MCore в тимчасово трансфікованих клітинах з використанням первинного моноклонального антитіла до НА-мітки з подальшим виявленням за допомогою -міченого анти-кролячого вторинного антитіла DyLight 594. Також використовували Hoechst-фарбування для флуоресцентного мічення клітинного ядра. Експресія MCore здебільшого локалізувалась в цитоплазмі, як показано шляхом фарбування поза ядром.

30 [0052] Фігура 15 ілюструє схему імунізації. Чотирьох мишей імунізували внутрішньом'язово 30 мкг рMCore.

[0053] Фігура 16 ілюструє збільшену амплітуду секреції IFN- $\gamma$  у CD8+ і CD4+T-клітинах з селезінок мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

[0054] Фігура 17 ілюструє збільшену амплітуду секреції IFN- $\gamma$  в CD8+ і CD4+T-клітинах з селезінок мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

35 [0055] Фігура 18 ілюструє збільшену амплітуду секреції TNF- $\alpha$  в CD8+ і CD4+T-клітинах з селезінок мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

[0056] Фігура 19 ілюструє збільшену амплітуду секреції TNF- $\alpha$  в CD8+ і CD4+T-клітинах з селезінок мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

40 [0057] Фігура 20 ілюструє збільшену амплітуду секреції CD 107a в CD8+ і CD4+T-клітинах з селезінок мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

[0058] Фігура 21 ілюструє збільшену амплітуду секреції f CD 107a в CD8+ і CD4+T-клітинах з селезінок мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

45 [0059] Фігура 22 ілюструє середній відсоток HBsAg-специфічних CD4 або CD8 IFN- $\gamma$ +, TNF- $\alpha$ + секретуючих клітин від мишей Balb/c, імунізованих контролем рVAX або консенсусним коровим антигеном рMCore.

[0060] Фігура 23 ілюструє середній відсоток HBsAg-специфічних CD4 або CD8 двічі позитивних продукуючих клітин від мишей Balb/c, імунізованих контролем рVAX або консенсусним коровим антигеном рMCore.

50 [0061] Фігура 24 ілюструє інтерферон-гамма Т-клітинну відповідь у печінці мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

[0062] Фігура 25 ілюструє інтерферон-гамма Т-клітинну відповідь у печінці мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

[0063] Фігура 26 ілюструє Т-клітинну відповідь фактора- $\alpha$  некрозу пухлини у печінці мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

55 [0064] Фігура 27 ілюструє Т-клітинну відповідь фактора- $\alpha$  некрозу пухлини у печінці мишей Balb/C, вакцинованих рM-Core.

[0065] Фігура 28 ілюструє відсоток HBsAg-специфічних CD4 і CD8 IFN- $\gamma$ +, TNF- $\alpha$ + продукуючих клітин у печінці мишей Balb/c, імунізованих контролем рVAX або консенсусним коровим антигеном рMCore.

60 [0066] Фігура 29 ілюструє середній відсоток HBsAg-специфічних CD4 або CD8 двічі

позитивних продукуючих клітин у печінці мишей Balb/c, імунізованих контролем pVAX або консенсусним коровим антигеном pMCore.

5 [0067] Фігура 30 ілюструє продукцію антиген-специфічних антитіл у спленоцитах. Значення являють собою середнє  $\pm$  стандартну помилку середнього. Значущість визначали згідно з t-тестом Ст'юдента.

[0068] Фігура 31 ілюструє дані аналізу ELISPOT.

[0069] Фігура 32 ілюструє частоту HBcAg-специфічних IFN- $\gamma$  прямоутворюючих одиниць (SFU) на мільйон спленоцитів після стимуляції клітин селезінки імунізованих мишей.

10 [0070] Фігура 33 ілюструє дані експериментів з використанням CFSE-мічених клітин для порівняння елімінації оброблених пептидом клітин-мішеней in vivo з допомогою CD8 T-клітин у вакцинованих і невакцинованих тварин.

15 [0071] Фігура 34 ілюструє специфічний цитоліз in vivo. Дві групи мишей, імунізованих pVax (контроль) або pMCore, отримували CFSE-мічені клітини-мішені (CFSEhi пульсували з нерелевантним пептидом або CFSEhi пульсували з епітоп-специфічним пептидом) через хвостову вену. CFSE-мічені клітини, відновлені та проаналізовані з допомогою FACS, використовували для визначення відсотка цитолізу.

[0072] Фігура 35 ілюструє порівняння відсотка проліферації CD3+CD4+ клітин і CD3+CD8+, оброблених вектором pVax (контроль) або плазмідною pMCore, яка експресує MCore HBV.

[0073] Фігура 36 ілюструє відсоток проліферації CD4 і CD8 T-клітин.

20 [0074] Фігури 37A і 37B ілюструють порівняння анти-HBV кору IgG і IgA в серійному розведенні сироватки від тварин, оброблених вектором pVax (контроль) або плазмідною pMCore, яка експресує MCore HBV.

25 [0075] Фігура 38 ілюструє HBcAg-специфічну гуморальну імунну відповідь, викликану pMCore, в сироватці та спленоцитах. Значення являють собою середнє  $\pm$  стандартну помилку середнього. Значущість визначали згідно з t-тестом Ст'юдента.

[0076] Фігура 39 ілюструє HBcAg-специфічну гуморальну імунну відповідь, викликану pMCore, в сироватці та спленоцитах. Значення являють собою середнє  $\pm$  стандартну помилку середнього. Значущість визначали згідно з t-тестом Ст'юдента.

[0077] Фігура 40 ілюструє відсоток TNF- $\alpha$  і IFN- $\gamma$  з CD4+ і CD8+ клітин селезінки і печінки.

30 [0078] Фігура 41 ілюструє дані експериментів з визначення того, чи впливає кліренс, індукований імунізованими мишами, на печінку, шляхом вимірювання рівнів ALT в сироватці.

35 [0079] Фігура 42 ілюструє імунофарбування відділів печінки, взятих через три дні після гідродинамічної ін'єкції PBS, pMCore (HBcAg) або pNS3/4A (HCV NS3-4A) від наївних мишей і мишей, які були імунізовані pMCore. Кліренс набагато вищий для pMCore-імунізованої печінки порівняно з NS3/4a-трансфікованою контрольною печінкою. Експресію pMCore або NS3/4a виявляли з допомогою антитіла до HA (білі/світло-сірі клітини).

[0080] Фігура 43 ілюструє результати через 3 дні після трансфекції, в які клітини було проаналізовано з приводу експресії маркера деградуляції, експресії CD107a та IFN- $\gamma$  після стимуляції пептидами HBcAg.

40 [0081] Фігура 44 ілюструє рівні ALT в сироватці в день 3, 6 і 12 після трансфекції, рівні були виміряні і не довели підвищення у релевантних вакцинованих тварин.

[0082] Фігура 45 ілюструє загальні клітинні імунні відповіді у мавп, імунізованих малою (тобто pMCore, pSHb A і pSHb C), довгою (тобто pMCore, pLHb A і pLHb C) і довгою + IL-12 (тобто pMCore, pLHb A, pLHb C і prIL-12) вакцинами.

45 [0083] Фігура 46 ілюструє кор-специфічні клітинні імунні відповіді у мавп, імунізованих малою (тобто pMCore, pSHb A і pSHb C), довгою (тобто pMCore, pLHb A і pLHb C) і довгою + IL-12 (тобто pMCore, pLHb A, pLHb C і prIL-12) вакцинами.

50 [0084] Фігура 47 ілюструє клітинні імунні відповіді, специфічні до поверхневого антигену A, у мавп, імунізованих малою (тобто pMCore, pSHb A і pSHb C), довгою (тобто pMCore, pLHb A і pLHb C) і довгою + IL-12 (тобто pMCore, pLHb A, pLHb C і prIL-12) вакцинами.

[0085] Фігура 48 ілюструє дані аналізу ELISPOT клітинних імунних відповідей, специфічних до поверхневого антигену C, у мавп, імунізованих малою (тобто pMCore, pSHb A і pSHb C), довгою (тобто pMCore, pLHb A і pLHb C) і довгою + IL-12 (тобто pMCore, pLHb A, pLHb C і prIL-12) вакцинами.

55 [0086] Фігура 49 ілюструє загальні клітинні імунні відповіді у мавп, імунізованих малою (тобто pMCore, pSHb A і pSHb C), довгою (тобто pMCore, pLHb A і pLHb C) і довгою + IL-12 (тобто pMCore, pLHb A, pLHb C і prIL-12) вакцинами.

60 [0087] Фігура 50 ілюструє порівняння рівнів анти-HBV антитіл у серійному розведенні сироватки від мавп, імунізованих малою (тобто pMCore, pSHb A і pSHb C), довгою (тобто pMCore, pLHb A і pLHb C) і довгою + IL-12 (тобто pMCore, pLHb A, pLHb C і prIL-12) вакцинами.

[0088] Фігура 51 ілюструє порівняння рівнів анти-HBV антитіл в серійному розведенні сироватки від тварин, імунізованих довгою +IL-12 (тобто pMcore, pLHb A, pLHb C і prIL-12) вакциною.

5 [0089] Фігура 52 ілюструє ДНК-конструкт поверхневого антигену HBV і його експресію. (A) Філогенетичний аналіз консенсусних послідовностей HBs генотипів A і C порівняно з природним HBs. Консенсусні послідовності вказані зірочками. (B) Схематична діаграма HBs-генних вставок в ДНК-плазмиди. pLHBs і pSHBs являють собою великі і малі білкові антигени HBs. Білки preS1, preS2 і основний S-білок приєднані до ендопроотеолітичних сайтів розщеплення. (C) Виявлення pLHBs і pSHBs з допомогою внутрішньоклітинного фарбування трансфікованих клітин RD моноклональним антитілом і поліклональною мишачою сироваткою.

10 [0090] Фігура 53 ілюструє, що pLHBs і SHBs викликають потужні гуморальні та Т-клітинні відповіді у BALB/c. По п'ять мишей лінії Balb/c на групу імунізували в трьох різних експериментах і проаналізували їх з приводу індукції як гуморальної, так і клітинної відповіді. (A) HBs-специфічні IgG реакції, виміряні через один тиждень після кожної імунізації. Стрілка вказує на час імунізації. (B) Загальні реакції IFN- $\gamma$ , викликані кожним конструктом до синтетичних preS1/S2 та основного S пептидів. (C) Характеристика HBs-специфічних імуногенних детермінант з допомогою використання окремих пептидів HBs в 16 і 12-матричних пулах LHBs і SHBs відповідно. Це вказує на розширення клітинно-опосередкованої імунної відповіді.

20 [0091] Фігура 54 ілюструє специфічний цитоліз in vivo. Різні групи мишей, імунізовані або pVax (контроль), або будь-яким з чотирьох конструктів HBs, отримали CFSE-мічені клітини-мішені (CFSElo, пульсуючі з нерелевантним пептидом, або CFSEhi, пульсуючі з епітоп-специфічним пептидом) через хвостову вену. Брали CFSE-мічені клітини, а аналізували з допомогою FACS (флуоресцентно-активованій клітинний сортинг) використовували для кількісної оцінки відсотка цитолізу.

25 [0092] Фігура 55 ілюструє, що вакцинний коктейль HBc/HBs викликає стійкі імунні реакції. (A) HBs-специфічні реакції антитіл з сироваток від мишей, імунізованих вакцинним коктейлем HBs/HBc в різні моменти часу імунізації (стрілка). (B) Відповіді IFN- $\gamma$  після стимуляції спленоцитів ex vivo від мишей, імунізованих коктейлем HBs/HBc. Імунізовані миші відповідали як на корові, так і поверхневі антигенні пептиди.

30 [0093] Фігура 56 ілюструє, що антиген-специфічні CD8 Т-клітини викликають продукцію противірусних цитокінів. Внутрішньоклітинне фарбування анти-вірусних цитокінів після ex-vivo стимуляції спленоцитів від мишей BALB/c з різних імунізованих груп (Таблиця 3). Лімфоцити фарбували антитілами до CD3, CD4, CD8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 і CD107a. Ці дані представлені 4 мишами з кожної групи в 3 різних експериментах.

35 [0094] Фігура 57 ілюструє імуногенність у приматів крім людини. П'ять макак-резусів імунізували внутрішньом'язово pSHBs/pMCore, pLHBs/pMCore або pLHBs/pMCore+prIL-12 (Таблиця 4), а потім з допомогою електропорації. Мавпи отримали три щеплення. (A) Високі титри антитіл до HBs спостерігалися тільки після 2 щеплення. (B) Відповіді IFN- $\gamma$  вимірювали один раз перед першою імунізацією і через 2 тижні після кожної імунізації. (C) Багато позитивних HBs матричних пептидних пулів спостерігалось у більшості мавп з різних груп, підтверджуючи широкі Т-клітинні відповіді у імунізованих макаках. (D) Внутрішньоклітинне фарбування (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2) PBMCs після останньої імунізації показує продукування HBs і HBs-специфічних антивірусних цитокінів як в CD4, так і в CD8.

45 [0095] Фігури 58A-58D ілюструють безпеку терапевтичної HBV-вакцини у макак-резусів. Зразки аналізували перед вакцинацією (pre), після третьої вакцинації (3rd), перед четвертою вакцинацією (pre4th), після четвертої вакцинації (4th). Була помилка аналізу на лужну фосфатазу після третьої вакцинації. Нормальний діапазон для всіх вимірювань зображений пунктирними лініями. (A) Лужна фосфатаза в сироватці. (B) Рівні аланінамінотрансферази (ALT) в сироватці. (C) Рівні аспартатамінотрансферази (AST) в сироватці. (D) Рівні загального білірубину в сироватці. (E) Рівні креатиніну в сироватці. (F) Рівні азоту сечовини в сироватці крові.

50 [0096] Фігури 59A-59D ілюструють анотацію послідовностей для чотирьох плазмід HBs. Послідовності лідера IgE, ендопроотеолітичного сайту розщеплення і С-кінцевої НА-мітки підкреслені. Чотири HBs плазмиди: великий поверхневий білок генотипу А (pLHBs-A) (A) і малий поверхневий білок (pSHBs-A) (B) і великий поверхневий білок генотипу С (pLHBs-C) (C) і малий поверхневий білок (pSHBs-C) (D).

Докладний опис

60 [0097] Винахід стосується високооптимізованих полівалентних синтетичних імуногенів вірусу гепатиту В (HBV), що викликають утворення антитіл і клітинно-опосередкований імунітет проти HBV-поверхневих (HBs) і HBV-корових (HBc) антигенів. Ці плазмиди, які кодують найбільш

поширені генотипи вірусу, індують зв'язуючі антитіла до HBs-антигенів і збуджують надійний клітинний імунітет (CMI) до обох HBs і HBs антигенів. Плазмідні незалежно викликають широкі крос-реактивні Т-клітинні відповіді і відповіді з високим титром антитіл, а також вакциноіндуковану цитотоксичну активність. Плазмідні коктейлі, що містять обидва поверхневі антигени, індують сильну і широку клітинну імунну відповідь з кількох антигенних епітопів, зокрема, широку перехресну реактивність між генотипами А і С вірусу. Оптимізовані плазмідні коктейлі, що кодують антигени HBs і HBc, індуювали сильну гуморальну і клітинну відповідь, націлену на S-антиген, і спричиняли різні мультиепітопні реакції, пов'язані з очищенням інфікованих гепатоцитів.

[0098] Зокрема, даний винахід належить до вакцин проти вірусу гепатиту В (HBV), які можуть бути використані для захисту людини від HBV-інфекції і забезпечити терапевтичні переваги індивідууму з діагнозом HBV-інфекції. Такі вакцини також можуть бути використані для індукції імунної відповіді проти антигену HBV. HBV-вакцини згідно з даним винаходом містять одну або кілька молекул нуклеїнових кислот. Зокрема, молекула нуклеїнової кислоти кодує один або кілька консенсусних корових білків HBV. Консенсусні корові білки HBV отримують з послідовностей корових білків генотипів А, В, С, D і Е HBV, і, отже, консенсусні корові білки HBV є унікальними. Молекули нуклеїнових кислот можуть також кодувати один або більше імуногенних фрагментів консенсусних корових білків HBV.

[0099] Крім того, молекули нуклеїнових кислот можуть кодувати один або більше консенсусних поверхневих антигенів HBV. Консенсусні поверхневі антигени HBV отримують з послідовностей поверхневих антигенів з ізолятів генотипу А HBV, і, отже, консенсусні поверхневі антигени HBV є унікальними. Консенсусні поверхневі антигени HBV також можуть бути отримані з послідовностей поверхневих антигенів з ізолятів генотипу С HBV, даючи унікальні поверхневі антигени HBV. Молекули нуклеїнової кислоти можуть також кодувати один або більше імуногенних фрагментів консенсусних поверхневих антигенів HBV.

[00100] Вакцина згідно з даним винаходом може включати будь-яку комбінацію молекул нуклеїнових кислот, що кодують консенсусний коровий білок HBV, та/або молекули нуклеїнових кислот, що кодують консенсусний поверхневий антиген HBV. Вакцина також може включати будь-яку комбінацію молекул нуклеїнових кислот, що кодують імуногенні фрагменти консенсусного корового білку HBV, та/або молекул нуклеїнових кислот, що кодують імуногенні фрагменти консенсусного поверхневого антигену HBV.

[00101] Ці комбінації корового білку HBV і поверхневого антигену HBV дивно і неочікувано індують виражену диференційну імунну відповідь на коровий білок HBV і поверхневий антиген HBV. Іншими словами, сила імунної відповіді на коровий білок HBV і поверхневий антиген HBV відрізняється в залежності від конкретної комбінації, що вводиться суб'єкту. Відповідно, будь-який користувач вакцини згідно з даним винаходом може створити вакцину, яка містить певну комбінацію, щоб викликати бажану імунну відповідь у суб'єкта, якому вводять таку розроблену вакцину. Таким чином, будь-який користувач може адаптувати вакцину згідно з даним винаходом, щоб контролювати рівень імунної відповіді у суб'єкта.

[00102] Вакцина згідно з даним винаходом широко застосовується для різних типів HBV завдяки унікальним послідовностям консенсусного корового білку HBV і поверхневого антигену HBV.

[00103] Вакцина згідно з даним винаходом може додатково включати одну або кілька молекул нуклеїнових кислот, як описано вище, і один або кілька білків, що кодуються такими молекулами нуклеїнових кислот.

#### 1. Визначення

[00104] Термінологія, використана в цьому документі з метою опису конкретних варіантів здійснення, не призначена для обмеження. Як використовується в даному описі і прикладений формулі винаходу, форми однини включають посилання на множину, якщо з контексту явно не випливає інше.

[00105] Для читання числових діапазонів в даному документі, кожне проміжне число між ними з тим самим ступенем точності явно передбачене. Наприклад, для діапазону 6-9, числа 7 і 8 розглядаються на додаток до 6 і 9, а для діапазону 6,0-7,0, числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6, 4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 6,9 і 7,0 явно чином передбачені.

[00106] "Ад'ювант", як використовується в даному документі, означає будь-яку молекулу, додану до ДНК-плазмідних вакцин, описаних у цьому документі, для підвищення імуногенності антигенів, кодованих ДНК-плазмідами і кодуючими послідовностями нуклеїнових кислот, описаними в цьому документі нижче.

[00107] "Антитіло", як використовується в даному документі, означає антитіло класів IgG, IgM, IgA, IgD або IgE, або фрагменти, або їх фрагменти або похідні, включаючи Fab, F (ab')<sub>2</sub>,

FD і одноланцюгові антитіла, діатіла, біспецифічні антитіла, біфункціональні антитіла і їх похідні. Антитіло може являти собою антитіло, виділене зі зразка сироватки ссавця, поліклональне антитіло, афінно очищене антитіло або їх суміші, які мають достатню специфічність зв'язування з потрібним епітопом або послідовністю, отриманою з нього.

5 [00108] "Кодуюча послідовність" або "кодуюча нуклеїнова кислота", як використовується в даному документі, означає нуклеїнові кислоти (РНК або ДНК-молекули), які містять нуклеотидну послідовність, що кодує білок. Кодуюча послідовність може додатково включати сигнали ініціації і термінації, функціонально пов'язані з регуляторними елементами, в тому числі з промотором і сигналом поліаденилювання, здатними контролювати експресію в клітинах людини або ссавців, яким вводять нуклеїнову кислоту.

10 [00109] "Комплемент" або "комплементарний", як використовується в даному документі, означає нуклеїнову кислоту, може означати спарювання основ між нуклеотидами або нуклеотидними аналогами молекул нуклеїнових кислот за Уотсоном-Кріком (наприклад, А-Т/У і С-Г) або Хугстеном.

15 [00110] "Консенсус" або "консенсусна послідовність", як використовується в даному документі, означає поліпептидну послідовність, засновану на аналізі вирівнювання декількох субтипів конкретного HBV-антигену, такого як коровий або поверхневий антиген HBV. Можуть бути отримані послідовності нуклеїнових кислот, які кодують консенсусну поліпептидну послідовність. Вакцини, що містять білки, які містять консенсусні послідовності та/або молекули нуклеїнових кислот, які кодують такі білки, можуть бути використані для індукування імунітету проти широкого спектру субтипів або серотипів конкретного антигену HBV.

20 [00111] "Електропорація", "електропермеабілізація" або "електро-кінетичний енхансмент" ("EP"), як використовується в даному документі взаємозамінно, означає використання імпульсу трансмембранного електричного поля для утворення мікроскопічних пор в біомембранах, внаслідок чого біомолекули, такі як плазмідні, олігонуклеотиди, міРНК, ліки, іони і вода, можуть проникати через клітинну мембрану.

25 [00112] "Фрагмент", як використовується в даному документі щодо послідовності нуклеїнової кислоти, означає послідовність нуклеїнової кислоти, або її частину, яка кодує поліпептид, здатний викликати імунну відповідь у ссавця та, перехресно реагувати з повнорозмірним антигеном штаму HBV дикого типу. Фрагменти можуть бути фрагментами ДНК, вибраними з принаймні однієї з різних нуклеотидних послідовностей, які кодують білкові фрагменти, викладені нижче.

30 [00113] "Фрагмент" або "імуногенний фрагмент" щодо поліпептидних послідовностей означає поліпептид, здатний викликати імунну відповідь у ссавця, який перехресно реагує з повнорозмірним антигеном штаму HBV дикого типу. Фрагменти консенсусних білків можуть містити принаймні 10 % принаймні 20 % принаймні 30 % принаймні 40 % принаймні 50 % принаймні 60 % принаймні 70 % принаймні 80 % принаймні 90 % або принаймні 95 % консенсусного білку. В деяких варіантах здійснення, фрагменти консенсусних білків можуть містити принаймні, 20 амінокислот або більше принаймні 30 амінокислот або більше, принаймні, 40 амінокислот або більше принаймні 50 амінокислот або більше принаймні 60 амінокислот або більше принаймні 70 амінокислот або більше принаймні 80 амінокислот або більше принаймні 90 амінокислот або більше принаймні 100 амінокислот або більше принаймні 110 амінокислот або більше принаймні 120 амінокислот або більше принаймні 130 амінокислот або більше принаймні 140 амінокислот або більше принаймні 150 амінокислот або більше принаймні 160 амінокислот або більше принаймні 170 амінокислот або більше принаймні 180 амінокислот або більше принаймні 190 амінокислот або більше принаймні 200 амінокислот або більше принаймні 210 амінокислот або більше принаймні 220 амінокислот або більше принаймні 230 амінокислот або більше, або принаймні 240 амінокислот або більше консенсусного білку.

40 [00114] Як використовується в даному документі, термін "генетичний конструкт" належить до молекул ДНК або РНК, які містять нуклеотидну послідовність, що кодує білок. Кодуюча послідовність включає сигнали ініціації і термінації, функціонально зв'язані з регуляторними елементами, включаючи промотор і сигнал поліаденилювання, здатні контролювати експресію в клітинах індивідуума, якому вводять молекулу нуклеїнової кислоти. Як використовується в даному документі, термін "експресуюча форма" відноситься до генних конструктів, що містять необхідні регуляторні елементи, функціонально зв'язані з кодуючою послідовністю, яка кодує білок, і забезпечують експресію кодуючої послідовності в клітині індивідуума.

50 [00115] Термін "гомологія", як використовується в даному документі, стосується ступеня комплементарності. Може бути часткова гомологія або повна гомологія (тобто ідентичність). Частково комплементарну послідовність, яка принаймні частково інгібує гібридизацію повністю комплементарної послідовності з нуклеїною кислотою-мішенню, називають з допомогою



функціонального терміну "по суті гомологічна". При використанні щодо послідовності дволанцюгової нуклеїнової кислоти, такої як кДНК або геномний клон, термін "по суті гомологічні", як використовується в даному документі, відноситься до зонду, який може гібридизувати з ланцюгом послідовності дволанцюгової нуклеїнової кислоти в умовах пониженої жорсткості. При використанні щодо послідовності одноланцюгової нуклеїнової кислоти термін "по суті гомологічні", як використовується в даному документі, стосується зонду, який може гібридизувати з (тобто є комплементом) матричною послідовністю одноланцюгової нуклеїнової кислоти в умовах пониженої жорсткості.

[00116] "Ідентичні" або "ідентичність", як використовується в даному документі в контексті двох або більше нуклеїнових кислот або поліпептидних послідовностей, означає, що послідовності мають певний відсоток залишків, які є однаковими в межах певної ділянки. Відсоток може бути розрахований шляхом оптимального вирівнювання двох послідовностей, порівняння двох послідовностей у зазначеній ділянці, визначення числа положень, в яких ідентичні залишки присутні в обох послідовностях з отриманням числа співпадаючих положень, ділення числа співпадаючих положень на загальну кількість положень в зазначеній ділянці, і множення результату на 100 для отримання відсотка ідентичності послідовностей. У тих випадках, коли ці дві послідовності мають різну довжину або в результаті вирівнювання отримують один або кілька розташованих у шаховому порядку кінців і певна ділянка порівняння включає тільки одну послідовність, залишки однієї послідовності включені в знаменник, але не у чисельник розрахунку. При порівнянні ДНК і РНК, тимін (Т) і урацил (U) можна вважати еквівалентними. Ідентичність може бути розраховано вручну або з допомогою комп'ютерного алгоритму послідовностей, такого як BLAST або BLAST 2.0.

[00117] "Імунна відповідь", як використовується в даному документі, означає активацію імунної системи хазяїна, наприклад, ссавця, у відповідь на введення антигену, такого як консенсусний антиген HBV. Імунна відповідь може бути у вигляді клітинної або гуморальної відповіді, або того й іншого.

[00118] "Нуклеїнова кислота" або "олігонуклеотид" або "полінуклеотид", як використовується в даному документі означає принаймні два нуклеотиди, ковалентно зв'язані один з одним. Опис одного ланцюга також визначає послідовність комплементарного ланцюга. Таким чином, нуклеїнова кислота включає також ланцюг, комплементарний до описаного одного ланцюга. Багато варіантів нуклеїнової кислоти можуть бути використані з тією ж метою як і певна нуклеїнова кислота. Таким чином, нуклеїнова кислота включає також по суті ідентичні нуклеїнові кислоти і їх комплементи. Один ланцюг забезпечує зонд, який може гібридизуватись з послідовністю-мішенню в жорстких умовах гібридизації. Таким чином, нуклеїнова кислота також включає зонд, який гібридизується в жорстких умовах гібридизації.

[00119] Нуклеїнові кислоти можуть бути одноланцюговими або дволанцюговими, або можуть містити ділянки як дволанцюгової, так і одноланцюгової послідовності. Нуклеїнова кислота може являти собою ДНК, як геномні, так і кДНК, РНК або гібрид, у якому нуклеїнова кислота може містити комбінації дезоксирибо- і рибонуклеотидів, і комбінації основ, включаючи урацил, аденін, тимін, цитозин, гуанін, інозин, ксантин гіпоксантин, ізоцитозин та ізогуанін. Нуклеїнові кислоти можуть бути отримані методами хімічного синтезу або рекомбінантними способами.

[00120] Термін "функціонально зв'язаний", як використовується в даному документі, означає, що експресія гену знаходиться під контролем промотора, з яким він просторово зв'язаний. Промотор можна розташувати в положенні 5' (upstream) або 3' (downstream) гену під його контролем. Відстань між промотором і геном може бути, приблизно такою ж, як відстань між цим промотором і підконтрольним йому геном, в гені, з якого походить промотор. Як відомо в даній галузі техніки, зміна цієї відстані може забезпечуватися без втрати функції промотора.

[00121] "Промотор", як використовується в даному документі, означає синтетичну або природну молекулу, яка здатна надавати, активувати або посилювати експресію нуклеїнової кислоти в клітині. Промотор може включати одну або більше конкретних послідовностей, що регулюють транскрипцію, щоб додатково підсилити експресію та/або змінити просторову експресію та/або тимчасову експресію нуклеїнової кислоти. Промотор може також містити дистальні енхансерні або репресорні елементи, які можуть розміщуватися на відстані до кількох тисяч пар основ від стартового сайту транскрипції. Промотор може бути отриманий, зокрема, з таких джерел як, вірусні, бактеріальні, грибові, з рослин, комах і тварин. Промотор може регулювати експресію генного компонента конститутивно, або диференційовано щодо клітини, тканини або органу, в якому відбувається експресія або щодо стадії розвитку, при якій відбувається експресія, або у відповідь на зовнішні подразники, такі як фізіологічні стреси, патогенні мікроорганізми, іони металів або індукуючі агенти. Репрезентативні приклади промоторів включають промотор бактеріофагу T7, промотор бактеріофагу T3, промотор SP6,

LAC, промотор lac-оператора, tac-промотор, пізній промотор SV40, ранній промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор CMV IE, ранній промотор SV40 або пізній промотор SV40 і промотор CMV IE.

[00122] "Сигнальний пептид" і "лідерна послідовність" використовуються в даному документі взаємозамінно і відносяться до амінокислотної послідовності, яка може зв'язуватися з амінокінцем білку HBV, описаного в даному документі. Сигнальні пептиди/лідерні послідовності, як правило, направляють локалізацію білка. Сигнальні пептиди/лідерні послідовності, що використовуються в цьому описі, переважно сприяють секреції білку з клітини, в якій він продукується. Сигнальні пептиди/лідерні послідовності часто відщеплюються від іншої частини білку, часто згадуваного як зрілий білок, при секреції з клітини. Сигнальні пептиди/лідерні послідовності приєднуються до N-кінця білку.

[00123] "Жорсткі умови гібридизації", як використовується в даному документі, означають умови, за яких перша послідовність нуклеїнової кислоти (наприклад, зонд) гібридизується з другою послідовністю нуклеїнової кислоти (наприклад, мішенню), такою як у складній суміші нуклеїнових кислот. Жорсткі умови залежать від послідовності і відрізнятимуться за різних обставин. Жорсткі умови можуть означати температуру для конкретної послідовності, нижчу за точку плавлення ( $T_m$ ) приблизно на 5-10 °C при певних іонній силі і pH.  $T_m$  може бути температурою (при певних іонній силі, pH і концентрації нуклеїнової кислоти), за якої 50 % зондів, комплементарних мішені, гібридизуються з послідовністю-мішенню в рівновазі (так як послідовності-мішені присутні в надлишку, при  $T_m$ , 50 % зондів зайняті в рівновазі). Жорсткі умови можуть бути такими, при яких концентрація солі становить менше ніж приблизно 1,0 M іона натрію, наприклад, приблизно 0,01-1,0 M концентрація іона натрію (або інших солей) при pH від 7,0 до 8,3, а температура становить принаймні приблизно 30 °C для коротких зондів (наприклад, приблизно 10-50 нуклеотидів) і принаймні приблизно 60 °C для довгих зондів (наприклад, більше ніж приблизно 50 нуклеотидів). Жорсткі умови можуть бути також досягнуті при додаванні дестабілізуючих агентів, таких як формамід. Для селективної або специфічної гібридизації, позитивний сигнал може становити принаймні від 2 до 10 разів фонові гібридизації. Приклади жорстких умов гібридизації включають наступне: 50 % формамід, 5-кратний SSC і 1 % SDS, інкубація при 42 °C, або, 5x SSC, 1 % SDS, інкубація при 65 °C, з промиванням в 0,2 x SSC і 0,1 % SDS при 65 °C.

[00124] "Практично комплементарні", як використовується в даному документі, означає, що перша послідовність принаймні на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична комплементу другої послідовності по ділянці з 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 або більше нуклеотидів або амінокислот, або що дві послідовності гібридизують в жорстких умовах гібридизації.

[00125] "Практично ідентичні", як використовується в даному документі, означає, що перша послідовність принаймні на 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична по ділянці з 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 або більше нуклеотидів або амінокислот або відносно нуклеїнових кислот, якщо перша послідовність, по суті, доповнює склад другої послідовності.

[00126] "Субтип" або "серотип": як використовується в даному документі, взаємозамінні, і щодо HBV означає генетичні варіанти HBV, при яких один субтип розпізнається імунною системою окремо від іншого субтипу.

[00127] "Варіант", використовуваний в даному документі у зв'язку з нуклеїновою кислотою, означає (I) частину або фрагмент зазначеної нуклеотидної послідовності; (II) комплемент зазначеної нуклеотидної послідовності або її частини; (III) нуклеїнову кислоту, яка по суті ідентична зазначеній нуклеїновій кислоті або її комплементу; або (IV) нуклеїнову кислоту, яка гібридизується в жорстких умовах з вказаною нуклеїновою кислотою, її комплементом, або послідовності, по суті, ідентичні їй.

[00128] "Варіант" щодо пептиду або поліпептиду, який відрізняється за амінокислотною послідовністю вставкою, делецією або консервативним заміщенням амінокислот, але зберігає принаймні одну біологічну активність. Варіант може також означати білок з амінокислотною послідовністю, яка по суті ідентична вказаному білку з амінокислотною послідовністю, яка зберігає принаймні одну біологічну активність. Консервативне заміщення амінокислоти, тобто заміна амінокислоти іншою амінокислотою з подібними властивостями (наприклад, гідрофільністю, ступенем і розподілом заряджених ділянок), визнається в рівні техніки, як правило, таким, що включає незначні зміни. Ці незначні зміни можуть бути визначені, зокрема, при розгляді індексу гідропатичних амінокислот, як відомо в даній галузі. Kyte et al., J. Mol. Biol.

157:105-132 (1982). Індекс гідропатичних амінокислот. Гідропатичний індекс амінокислоти визначається їїгідрофобністю і зарядом. Як відомо в даній галузі техніки, амінокислоти з подібними індексами гідропатичності можуть бути заміщеними і як раніше зберігати функцію білка. В одному аспекті, амінокислоти, що мають індекси гідропатичності  $\pm 2$  заміщуються.

- 5 Гідрофільність амінокислот може бути також використана для виявлення заміщень, які могли б дати білки, що зберігають біологічну функцію. Розгляд гідрофільності амінокислот в контексті пептиду дозволяє розрахувати найбільшу локальну середню гідрофільність цього пептиду, корисний вимір, який, як повідомлялося, добре корелює з антигенністю та імуногенністю. Патент США № 4554101, включений до даного документу у повному обсязі шляхом посилання.
- 10 Заміщення амінокислот, що мають аналогічні величини гідрофільності, може призвести до пептидів, що зберігають біологічну активність, наприклад, імуногенність, як відомо в даній галузі. Заміщення можуть бути виконані з амінокислотами, які мають значення гідрофільності в межах  $\pm 2$  відносно один одного. Як індекс гідрофобності, так і значення гідрофільності амінокислот залежать від конкретного бічного ланцюга цієї амінокислоти. Відповідно до цього
- 15 спостереження, амінокислотні заміщення, які сумісні з біологічною функцією, як мається на увазі, залежать від відносної подібності амінокислот і, зокрема, бічних ланцюгів цих амінокислот, як виявлено з допомогою гідрофобності, гідрофільності, заряду, розміру і інших властивостей.

- 20 [00129] "Вектор", як використовується в даному документі, означає послідовність нуклеїнової кислоти, яка містить точку початку реплікації. Вектор може бути вірусним вектором, бактеріофагом, бактеріальною штучною хромосою або штучною хромосою дріжджів. Вектор може бути ДНК- або РНК-вектором. Вектор може бути самовідтворюваним екстрахромосомним вектором, і переважно являє собою плазмідну ДНК.

## 2. Вакцини

- 25 [00130] Даний винахід стосується вакцини проти гепатиту В. Вакцина проти гепатиту В (HBV) може містити нуклеїнову кислоту, що кодує коровий антиген HBV, поверхневий антиген HBV або їх комбінацію; коровий антиген HBV, поверхневий антиген HBV або їх комбінації, або комбінацію (1) нуклеїнової кислоти, що кодує коровий антиген HBV та/або поверхневий антиген HBV, і (2) корового антигену HBV та/або поверхневого антигену HBV, або (3) їх комбінації. Коровий
- 30 антиген HBV може містити консенсусний білок, отриманий з амінокислотних послідовностей капсидних білків від різних генотипів HBV. Аналогічним чином, поверхневий антиген HBV може містити консенсусний білок, отриманий з амінокислотних послідовностей поверхневих антигенів від декількох генотипів HBV. Такий коровий білок HBV і консенсусні поверхневі антигени HBV є унікальними і мають схожість з коровими і поверхневими антигенами, відповідно, в цілому по
- 35 декільком генотипам HBV. Таким чином, вакцина згідно з даним винаходом застосовна до декількох типів HBV і підходить для поширених популяцій. Крім того, вакцина згідно з даним винаходом може бути пристосована до конкретних нуклеїнових кислот, що кодують консенсусний коровий білок HBV, консенсусний поверхневий білок HBV або їх комбінацію. Іншими словами, вакцина згідно з даним винаходом може бути призначена для контролю рівня
- 40 або сили імунної відповіді у суб'єкта проти одного або кількох серотипів HBV.

- [00131] Вакцина може бути ДНК-вакциною. ДНК-вакцини розкриті в патентах США № 5593972, 5739118, 5817637, 5830876, 5962428, 5981505, 5580859, 5703055 і 5676594, які включені до даного опису повністю шляхом посилання. ДНК-вакцина може додатково містити елементи або реагенти, які інгібують її інтеграцію в хромосому.

- 45 [00132] Вакцина може бути РНК капсидних білка HBV та/або білком поверхневого антигену HBV. РНК-вакцина може бути введена в клітину.

### а. Коровий антиген HBV

- [00133] Вакцина згідно з даним винаходом може містити коровий білок HBV. Коровий білок HBV є мішенню для імунно опосередкованого вірусного кліренсу, викликаючи 1) цитотоксичні Т-лімфоцитні (CTL) відповіді, 2) Т-хелперні відповіді та/або 3) відповіді В-клітин або, переважно всі вищевказані для перехресної презентації.

- [00134] Таблиця 2 показує схожість між генотипами корового антигену з генотипів HBV-A, HBV-B, HBV-C, HBV-D і HBV-E з консенсусним коровим білком HBV, названим в графі як "HBV-M-core". Для деяких варіантів здійснення конструкт M-Core HBV був розроблений для збільшення гомології для широкого кола корових мішеней HBV. Подібності генотипів для корового антигену з розробленим конструктом M-Core збільшили гомології для широкого кола корових мішеней HBV. Всі генотипи мають бути представлені в універсальній імунній терапевтичній вакцині для HBV.

Таблиця 2

## Відсоток ідентичності корових білків HBV

| відсоток ідентичності |   |     |      |      |      |      |      |                 |
|-----------------------|---|-----|------|------|------|------|------|-----------------|
| відхилення            |   | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |                 |
|                       | 1 |     | 96,2 | 96,2 | 97,8 | 95,6 | 98,4 | 1-HBV-A-ConCore |
|                       | 2 | 3,9 |      | 100  | 95,6 | 93,4 | 96,7 | 2-HBV-B-ConCore |
|                       | 3 | 3,9 | 0    |      | 95,6 | 93,4 | 96,7 | 3-HBV-C-ConCore |
|                       | 4 | 2,2 | 4,5  | 4,5  |      | 97,8 | 97,8 | 4-HBV-D-ConCore |
|                       | 5 | 4,5 | 6,9  | 6,9  | 2,2  |      | 95,6 | 5-HBV-E-ConCore |
|                       | 6 | 1,7 | 3,4  | 3,4  | 2,2  | 4,5  |      | 6-HBV-M-Core    |
|                       |   | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |                 |

[00135] Антиген може містити епітопи корового білку, які роблять їх ефективними, зокрема, як імуногенів, проти якого анти-HBV імунні відповіді можуть бути індуковані. Антиген HBV може містити непроцесований продукт, його варіант, його фрагмент або їх комбінацію.

[00136] Коровий антиген HBV може містити консенсусний білок. Консенсусний коровий антиген HBV індукує антиген-специфічну Т-клітину і високий титр антитіл як системно, так і в печінці. Таким чином, захисна імунна відповідь забезпечується в печінці з допомогою вакцин, що містять консенсусний коровий антиген HBV. Відповідно, будь-який користувач може створити вакцину згідно з даним винаходом, яка включає консенсусний коровий антиген HBV, щоб забезпечити імунну терапію та/або захист печінки.

[00137] Зокрема, в індукованій імунній реакції, консенсусний коровий антиген HBV стимулює спленоцити, зокрема CD4+ клітини і CD8+ клітини, секретувати або виробляти аналогічні кількості інтерферону-гамма (INF-γ), але різні кількості фактора некрозу пухлини-альфа (TNF-α). Цікаво, індукована імунна відповідь є різною в селезінці і печінки. В селезінці, CD8+ клітини продукують як INF-γ, так і TNF-α більше, ніж CD4+ клітини, проте в печінці відбувається зворотне. Іншими словами, CD4+ клітини продукують як INF-γ, так і TNF-α більше, ніж CD8+ клітини в печінці. Крім того, в печінці продукується більше антиген-специфічних IgA ніж IgG, а захисна імунна відповідь дивно та несподівано включає антиген-специфічну відповідь CTL, яка не викликає пошкодження печінки. Відповідно, вакцина згідно з даним винаходом, що містить консенсусний коровий антиген HBV, може бути доставлена на периферію, щоб налагодити антиген-специфічне націлювання в печінку для очищення або усунення HBV-інфікованих клітин без пошкодження або запалення печінки.

[00138] Послідовності нуклеїнових кислот, що кодують консенсусні корові білки HBV, являють собою SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:5. SEQ ID NO:1 кодує консенсусний коровий білок HBV. SEQ ID NO:3 кодує консенсусний коровий білок HBV, приєднаний до лідеру IgE. SEQ ID NO:5 кодує консенсусний коровий білок HBV, приєднаний до лідеру IgE і НА-мітки.

[00139] Деякі варіанти здійснення належать до послідовностей нуклеїнових кислот, кодуючих білки, ідентичні або гомологічні консенсусному білку HBV, імуногенному фрагменту з консенсусного білку HBV, та їх імуногенних фрагментів гомологічних білків. Такі молекули нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають до 95 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності в консенсусній послідовності, аж до 96 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності в консенсусній послідовності, до 96 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності в консенсусній послідовності, до 97 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності в консенсусній послідовності, до 98 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності в консенсусній послідовності і до 99 % можуть бути надані. Крім того, послідовності нуклеїнових кислот, кодуючі імуногенні фрагменти, вказані в даному документі, і імуногенні фрагменти білків, ідентичних білкам, вказаним в даному описі, також надаються.

[00140] Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 95 % гомологію з кодуючими послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 96 % гомологію з кодуючими послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 97 % гомологію з кодуючими послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення

належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 98 % гомологію з кодуючими послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 99 % гомологію з кодуючими послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. В деяких варіантах здійснення, молекули нуклеїнових кислот з кодуючими послідовностями, описані в даному документі, які гомологічні кодуючій послідовності консенсусного білку, розкритого в даному документі, включають послідовності, кодуючі послідовність IgE, приєднану до 5'-кінця кодуючої послідовності, яка кодує гомологічні білкові послідовності, описані в цьому документі.

[00141] Деякі варіанти здійснення належать до послідовностей нуклеїнових кислот, кодуючих білки з визначеним відсотком ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності непротиснутого корового консенсусного білку HBV, імуногенний фрагмент з корового консенсусного білку HBV і імуногенні фрагменти корових консенсусних білків HBV. Такі молекули нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають до 80 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 85 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 90 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 91 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 92 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 93 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 94 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 95 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 96 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 97 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 98 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV, до 99 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірної корової консенсусної послідовності HBV можуть бути надані. Крім того, послідовності нуклеїнових кислот, кодуючі імуногенні фрагменти, вказані в цьому документі, і імуногенні фрагменти білків з аналогічним відсотком ідентичності, як вказано вище, з коровими білками HBV, викладеними в даному документі, також передбачені.

[illegible]

амінокислотної послідовності непроцесованого корового білку HBV, що кодується послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенний білок, який має 96 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності непроцесованого корового білку HBV, що кодується послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенний білок, який має 97 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності непроцесованого корового білку HBV, що кодується послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенний білок, який має 98 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності непроцесованого корового білку HBV, що кодується послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенний білок, який має 99 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності непроцесованого корового білку HBV, що кодується послідовностями нуклеїнових кислот згідно з даним документом. В деяких варіантах здійснення, молекули нуклеїнових кислот з кодуючими послідовностями, описаними в даному документі, які гомологічні кодуючій послідовності консенсусного корового білку HBV, розкритого в даному документі, включають послідовності, кодуючі послідовність IgE, приєднану до 5'-кінця кодуючої послідовності, яка кодує гомологічні білкові послідовності, описані в цьому документі.

[00143] В деяких варіантах здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти вільна від кодуючої послідовності, яка кодує лідерну послідовність. В деяких варіантах здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти вільна від кодуючої послідовності, яка кодує лідер IgE.

[00144] Деякі варіанти здійснення належать до фрагментів SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:5. Фрагменти можуть складати принаймні 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % від послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:5. Фрагменти можуть бути принаймні на 95 % принаймні 96 % принаймні 97 %, принаймні%, принаймні, 98 % або принаймні 99 % ідентичними фрагментам послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:5. Фрагменти можуть бути принаймні на 80 % принаймні 85 % принаймні 90 %, принаймні%, принаймні, 91 % принаймні 92 % принаймні 93 % принаймні 94 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % ідентичними фрагментам послідовностей SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:5. В деяких варіантах здійснення, фрагменти включають послідовності, які кодують лідерну послідовність, таку як, наприклад, імуноглобуліновий лідер, такий як лідер IgE. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від кодуючих послідовностей, які кодують лідерну послідовність. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від кодуючих послідовностей, які кодують лідерну послідовність, таку як, наприклад, лідер IgE.

[00145] Крім того, амінокислотна послідовність консенсусного корового білку HBV являє собою SEQ ID NO:2. Амінокислотна послідовність консенсусного корового білку HBV, приєднана до лідера IgE, являє собою SEQ ID NO:4. Зокрема, в SEQ ID NO:4, лідер IgE приєднаний до аміно-кінця консенсусного корового білку HBV. Амінокислотна послідовність консенсусного корового білку HBV, приєднана до лідера IgE і HA-мітки, являє собою SEQ ID NO:6. Bn SEQ ID NO:6, лідер IgE і HA-мітка приєднані до аміно-кінця і карбокси-кінця, відповідно, консенсусного корового білку HBV.

[00146] Деякі варіанти здійснення належать до білків, які гомологічні SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 95 % гомологію з консенсусними білковими послідовностями, як вказано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 96 % гомологію з консенсусними білковими послідовностями, як вказано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 97 % гомологію з консенсусними білковими послідовностями, як вказано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 98 % гомологію з консенсусними білковими послідовностями, як вказано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 99 % гомологію з консенсусними білковими послідовностями, як вказано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6.

[00147] Деякі варіанти здійснення належать до білків, які ідентичні SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають

[illegible]

[00148] В деяких варіантах здійснення, білок вільний від лідерної послідовності. В деяких варіантах здійснення, білок вільний від лідера IgE. Фрагменти консенсусних білків можуть містити принаймні 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % консенсусного білку. Імуногенні фрагменти послідовностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6 можуть бути надані. Імуногенні фрагменти можуть містити принаймні 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % послідовності SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. В деяких варіантах здійснення, фрагменти включають лідерну послідовність, таку як, наприклад, імуноглобуліновий лідер, такий як лідер IgE. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від лідерної послідовності. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від лідерної послідовності, такої як, наприклад, лідер IgE.

[00149] Імуногенні фрагменти білків з амінокислотними послідовностями, гомологічними імуногенним фрагментам послідовностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6 можуть бути надані. Такі імуногенні фрагменти можуть містити принаймні 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % білків, які на 95 %

гомологічні послідовностям SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних фрагментів, які мають 96 % гомологію з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних фрагментів, які мають 97 % гомологію з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних фрагментів, які мають 98 % гомологію з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних фрагментів, які мають 99 % гомологію з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. В деяких варіантах здійснення, фрагменти включають лідерну послідовність, таку як, наприклад, імуноглобуліновий лідер, такий як лідер IgE. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від лідерної послідовності. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від лідерної послідовності, такої як, наприклад, лідер IgE.

[00150] Імуногенні фрагменти білків з амінокислотними послідовностями, ідентичними імуногенним фрагментам послідовностей SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6 можуть бути надані. Такі імуногенні фрагменти можуть містити принаймні 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % білків, які на 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ідентичні по всій довжині амінокислотним послідовностям, вказаним в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 або SEQ ID NO:6. В деяких варіантах здійснення, фрагменти включають лідерну послідовність, таку як, наприклад, імуноглобуліновий лідер, такий як лідер IgE. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від лідерної послідовності. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від лідерної послідовності, такої як, наприклад, лідер IgE.

[00151] Як вказано в даному описі відносно приєднання сигнального пептиду або лідерної послідовності до N-кінця білку, сигнальний пептид/лідерна послідовність заміняють N-кінцевий метионін білку, який кодується старт-кодоном послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує білок, без кодуючих послідовностей сигнального пептиду. Таким чином, наприклад, SEQ ID NO:4 являє собою SEQ ID NO:2 з сигнальним пептидом/лідерною послідовністю, приєднаними до N-кінця послідовності SEQ ID NO:2, тобто SEQ ID NO:4 є білком, що містить сигнальний пептид, приєднаний до N-кінця послідовності SEQ ID NO:2. Перший залишок у SEQ ID NO: 2, "Хаа", як правило, є метионіном за відсутності сигнального пептиду. Однак, білки, які містять сигнальні пептиди, приєднані до SEQ ID NO: 2, такі як SEQ ID NO: 4, замінюють залишок 1 метионіну в Хаа залишком, який приєднує сигнальний пептид до білку. Відповідно, N-кінцевий залишок послідовності SEQ ID NO: 2 може бути будь-яким, але якщо він кодується послідовністю ініціації, то це метионін. Зв'язок сигнального пептиду/лідерної послідовності з N-кінцем на SEQ ID NO: 2, як правило, виключає N-кінцевий метионін. Як використовується в даному документі, передбачається, що SEQ ID NO: 4 містить SEQ ID NO: 2 з сигнальним пептидом/лідерною послідовністю, зв'язаною з N-кінцем на SEQ ID NO: 2, незважаючи на усунення N-кінцевого Хаа-залишку послідовності SEQ ID NO: 2. Аналогічним чином, кодуючі послідовності для SEQ ID NO: 4 містять послідовності, що кодують SEQ ID NO: 2 з послідовностями, що кодують сигнальний пептид/лідерну послідовність, що приєднуються до 5'-кінця послідовностей, які кодують SEQ ID NO: 2. Ініціюючий кодон може бути "ппп" в кодуючих послідовностях для SEQ ID NO: 2, але він елімінується, коли кодують послідовності сигнального пептиду/лідерної послідовності, зв'язаних з 5'-кінцем кодуючих послідовностей, які кодують SEQ ID NO: 2. Як використовується в даному документі, передбачається, що кодуючі послідовності для SEQ ID NO: 4 містять кодуючі послідовності для SEQ ID NO: 2 з кодуючими послідовностями для сигнального пептиду/лідерної послідовності, приєднаної до 5'-кінця кодуючої послідовності SEQ ID NO: 2, де зустрічається ппп. Таким чином, наприклад, передбачається, що SEQ ID NO: 3 містить SEQ ID NO: 1 з кодуючими послідовностями для сигнального пептиду/лідерної послідовності, приєднаної до 5'-кінця послідовності SEQ ID NO: 1 замість ппп. В деяких варіантах здійснення, ппп є кодоном ініціації на 5'-кінці послідовності SEQ ID NO: 1.

#### b. Поверхневий антиген HBV

[00152] Вакцина може містити поверхневий антиген HBV. У цьому документі передбачені поверхневі антигени HBV, здатні викликати імунну реакцію у свавців проти одного або більше серотипів HBV. Поверхневі антигени можуть містити епітопи поверхневих білків, які роблять їх ефективними, зокрема, в ролі імуногенів, проти яких анти-HBV імунна реакція може бути викликана. Поверхневий антиген HBV може містити непроцесований трансляційний продукт,



його варіант, його фрагмент або їх комбінацію.

[00153] Поверхневий антиген HBV може містити консенсусний білок. Консенсусні поверхневі антигени HBV отримують з послідовностей поверхневих антигенів первинних ізолятів генотипу А або В HBV. Зокрема, консенсусні поверхневі антигени HBV включають S-білок або комбінацію S-білку, pre-S2 і pre-S1 (Фігури 3 і 4). Ендопротеолітичні сайти розщеплення вводяться в консенсусні поверхневі антигени HBV для забезпечення правильного білкового фолдингу і кращого CTL-процесування. Використання кодонів в консенсусних поверхневих антигенах HBV було модифіковане, щоб усунути кодонне зміщення людських генів. Крім того, вдалося уникнути ділянок з дуже високим (наприклад, більше, ніж 80 відсотків) або дуже низьким (наприклад, менше, ніж 30 відсотків) вмістом GC, де знаходилися цис-діючі мотиви, такі як внутрішні TATA-бокси, повторні послідовності і структуровані послідовності. Послідовність Козак ввели в консенсусні поверхневі антигени HBV для підвищення ініціації трансляції.

[00154] Послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує консенсусні поверхневі антигени HBV, являє собою SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, і SEQ ID NO:15. SEQ ID NO:9 кодує білок довгого консенсусного поверхневого антигену HBV, отриманий з генотипу А, і включає S-білок, pre-S2 і pre-S1 (LHBs-A). SEQ ID NO:11 кодує білок довгого консенсусного поверхневого антигену HBV, отриманий з генотипу С, і включає S-білок, pre-S2 і pre-S1 (LHBs-C). SEQ ID NO:13 кодує білок короткого консенсусного поверхневого антигену HBV, отриманий з генотипу А, і включає S-білок (SHBs-A). SEQ ID NO:15 кодує білок короткого консенсусного поверхневого антигену HBV, отриманий з генотипу С, і включає S-білок (SHBs-C).

[00155] Деякі варіанти здійснення належать до послідовностей нуклеїнових кислот, кодує білки, ідентичні по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусних поверхневих антигенів HBV, імуногенним фрагментам консенсусних поверхневих антигенів HBV та імуногенним фрагментам ідентичних білків. Таким чином, молекули нуклеїнових кислот, що кодують білки, які мають до 95 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності з послідовністю поверхневого консенсусного антигену HBV, до 96 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності з послідовністю поверхневого консенсусного антигену HBV, до 96 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності з послідовністю поверхневого консенсусного антигену HBV, до 97 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності з послідовністю поверхневого консенсусного антигену HBV, до 98 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності з послідовністю поверхневого консенсусного антигену HBV і до 99 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності з послідовністю поверхневого консенсусного антигену HBV можуть бути надані. Крім того, послідовності нуклеїнових кислот, кодує імуногенні фрагменти, викладені в даному описі, і імуногенні фрагменти білків, ідентичних по всій довжині амінокислотної послідовності білкам поверхневого антигену HBV, викладеним в даному документі, також передбачені.

[00156] Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 95 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності з кодуєчими послідовностями нуклеїнових кислот поверхневих антигенів HBV згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 96 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності з кодуєчими послідовностями нуклеїнових кислот поверхневих антигенів HBV згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 97 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності з кодуєчими послідовностями нуклеїнових кислот поверхневих антигенів HBV згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 98 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності з кодуєчими послідовностями нуклеїнових кислот поверхневих антигенів HBV згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до молекул нуклеїнових кислот, які кодують імуногенні білки, які мають 99 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності з кодуєчими послідовностями нуклеїнових кислот поверхневих антигенів HBV згідно з даним документом. В деяких варіантах здійснення, молекули нуклеїнових кислот з кодуєчими послідовностями, розкритими в цьому документі, які ідентичні по всій довжині амінокислотної послідовності кодуєчої послідовності білку консенсусного поверхневого антигену HBV, розкритого в даному документі, включає послідовності, кодуєчі послідовність IgE, приєднану до 5'-кінця кодуєчої послідовності, яка кодує ідентичні білкові послідовності, розкриті в цьому документі.

[00157] Деякі варіанти здійснення належать до послідовностей нуклеїнових кислот, кодуєчі білки з певним відсотком ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності непроцесованого консенсусного білку поверхневого антигену HBV та імуногенних фрагментів

консенсусних білків поверхневого антигену HBV. Такі молекули нуклеїнових кислот, що кодують білки, які мають до 80 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 85 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 90 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 91 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 92 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 93 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 94 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 95 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 96 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 97 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 98 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV, до 99 % ідентичності по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусної послідовності непротесованого поверхневого антигену HBV можуть бути надані. Крім того, послідовності нуклеїнових кислот, кодуючі імуногенні фрагменти, викладені в цьому описі, та імуногенні фрагменти білків зі схожим відсотком ідентичності, як вказано вище, з білками поверхневих антигенів HBV, викладеними в цьому описі, також передбачаються.

[illegible]

ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності кодуючих послідовностей непроцесованих поверхневих антигенів HBV згідно з цим документом. В деяких варіантах здійснення, молекули нуклеїнових кислот з кодуючими послідовностями поверхневих антигенів HBV, розкритих в цьому документі, ідентичні по всій довжині амінокислотної послідовності кодуючої послідовності білку консенсусного поверхневого антигену HBV, розкритого в цьому документі, включають послідовності, кодуючі послідовність IgE, приєднану до 5'-кінця кодуючої послідовності, яка кодує ідентичні білкові послідовності, рокупіт в цьому документі.

[00159] В деяких варіантах здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти вільна від кодуючої послідовності, яка кодує лідерну послідовність. В деяких варіантах здійснення, послідовність нуклеїнової кислоти вільна від кодуючої послідовності, яка кодує лідер IgE.

[00160] Деякі варіанти здійснення належать до фрагментів послідовностей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:13 і SEQ ID NO:15. Фрагменти можуть складати принаймні 10 принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % послідовності SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:15. Фрагменти можуть бути принаймні на 95 % принаймні 96 % принаймні 97 %, принаймні%, принаймні, 98 % або принаймні 99 % ідентичними фрагментам послідовностей EQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13 або SEQ ID NO:15. Фрагменти можуть бути принаймні на 80 % принаймні 85 % принаймні 90 %, принаймні%, принаймні, 91 % принаймні 92 % принаймні 93 % принаймні 94 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % ідентичними фрагментам послідовностей SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 13 або SEQ ID NO:15. В деяких варіантах здійснення, фрагменти включають послідовності, які кодують лідерну послідовність, таку як, наприклад, імуноглобулінів лідер, такий як лідер IgE. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від кодуючих послідовностей, які кодують лідерну послідовність. В деяких варіантах здійснення, фрагменти вільні від кодуючих послідовностей, які кодують лідерну послідовність, таку як лідер IgE.

[00161] Крім того, амінокислотні послідовності консенсусних поверхневих антигенів HBV, LHBs-A, LHBs-C, SHBs-A і SHBs-C являють собою SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:16, відповідно.

[00162] Білки можуть бути ідентичними послідовностям SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 95 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 96 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 97 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 98 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають 99 % ідентичність по всій довжині амінокислотної послідовності консенсусних білкових послідовностей згідно з даним документом.

[00163] Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які ідентичні послідовностям SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 або SEQ ID NO:16. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають амінокислотну послідовність, яка на 80 % ідентична по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірним консенсусним амінокислотним послідовностям, вказаним в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 або SEQ ID NO:16. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають амінокислотну послідовність, яка на 85 % ідентична по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірним консенсусним амінокислотним послідовностям, вказаним в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 або SEQ ID NO:16. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають амінокислотну послідовність, яка на 90 % ідентична по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірним консенсусним амінокислотним послідовностям, вказаним в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 або SEQ ID NO:16. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають амінокислотну послідовність, яка на 91 % ідентична по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірним консенсусним амінокислотним послідовностям, вказаним в SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 14 або SEQ ID NO:16. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних білків, які мають амінокислотну послідовність, яка на 92 % ідентична по всій довжині

[illegible]

[00164] Фрагменти консенсусних білків можуть містити принаймні, 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % консенсусного білку. Можуть бути забезпечені імуногенні фрагменти послідовностей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 і SEQ ID NO:16. Імуногенні фрагменти можуть містити принаймні, 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16.

[00165] Можуть бути забезпечені імуногенні фрагменти білків з амінокислотними послідовностями, ідентичними імуногенним фрагментам послідовностей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16. Такі імуногенні фрагменти можуть містити принаймні 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % білків, які на 98 % ідентичні по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16.

[00166] Можуть бути забезпечені імуногенні фрагменти білків з амінокислотними послідовностями, ідентичними імуногенним фрагментам послідовностей SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16. Такі імуногенні фрагменти можуть містити принаймні 10 % принаймні 15 % принаймні 20 % принаймні 25 % принаймні 30 % принаймні 35 % принаймні 40 % принаймні 45 % принаймні 50 % або принаймні 55 %, принаймні%, принаймні, 60 % принаймні 65 % принаймні 70 % принаймні 75 % принаймні 80 % принаймні 85 % принаймні 90 % принаймні 95 % принаймні 96 % принаймні 97 % принаймні 98 % або принаймні 99 % білків, які на 98 % ідентичні по всій довжині амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14 або SEQ ID NO:16. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних фрагментів, які мають 96 % ідентичність з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним винаходом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних фрагментів, які мають 97 % ідентичність з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним винаходом. Деякі варіанти здійснення

належать до імуногенних фрагментів, які мають 98 % ідентичність з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним винаходом. Деякі варіанти здійснення належать до імуногенних фрагментів, які мають 99 % ідентичність з імуногенними фрагментами консенсусних білкових послідовностей згідно з даним винаходом.

5 с. Комбінація корових і поверхневих антигенів HBV

[00167] Вакцина може містити комбінацію корових і поверхневих антигенів HBV, як описано вище. Ця комбінація антигенів HBV здатна викликати імунну відповідь у ссавця на один або більше серотипів HBV. Вакцина може бути розроблена з урахуванням або мати певну комбінацію антигенів HBV, які, в свою чергу, забезпечують можливість контролювати рівень або

10 силу імунної відповіді у ссавця.  
[00168] Комбінації можуть містити одну або більше нуклеїнових кислот, що кодують (1) HBV-M-Core, LHBs-A, SHBs-A, LHBs-C, і SHBs-C; (2) HBV-M-Core, LHBs-A, SHBs-A і LHBs-C; (3) HBV-M-Core, LHBs-A, і SHBs-A; (4) HBV-M-Core і LHBs-A; (5) HBV-M-Core, SHBs-A, LHBs-C, і SHBs-C; (6) HBV-M-Core, LHBs-C, і SHBs-C; (7) HBV-M-Core і SHBs-C; (8) HBV-M-Core, LHBs-A, LHBs-C, і SHBs-C; (9) HBV-M-core, LHBs-A, і SHBs-C; (10) HBV-M-Core і SHBs-C; (11) HBV-M-Core, LHBs-A, SHBs-A, і SHBs-C; (12) HBV-M-Core, LHBs-A, і SHBs-C; (13) HBV-M-Core, SHBs-A, і SHBs-C; (14) LHBs-A, SHBs-A, LHBs-C, і SHBs-C; (15) LHBs-A, SHBs-A, і LHBs-C; (16) LHBs-A і SHBs-A; (17) SHBs-A, LHBs-C, і SHBs-C; (18) LHBs-C і SHBs-C; (19) LHBs-A, LHBs-C, і SHBs-C; (20) LHBs-A і SHBs-C; (21) LHBs-A, SHBs-A, і SHBs-C; (22) LHBs-A і SHBs-C; (23) SHBs-A і SHBs-C; (24) HBV-M-Core і SHBs-A; (25) HBV-M-Core, LHBs-A і LHBs-C; або (26) LHBs-A і LHBs-C.

20 [00169] Приклади реалізації винаходу належить до вакцини, включаючи одну або більше нуклеїнових кислот, що кодують HBV-M-Core, LHBs-A і LHBs-C. Інший ілюстративний варіант здійснення належить до вакцини, включаючи одну або більше нуклеїнових кислот, що кодують HBV-M-Core, SHBs-A і SHBs-C. Ще один варіант здійснення належить до вакцини, включаючи  
25 одну або більше нуклеїнових кислот, що кодують HBV-M-Core, LHBs-A і LHBs-C і ад'ювант, такий як IL-12.

[00170] Комбінаційна вакцина також містить один або більше консенсусних корових білків HBV та/або білок поверхневого антигену HBV у вигляді однієї або декількох білкових субодиниць, одну або більше убитих вірусних частинок, що містять один або більше  
30 консенсусних корових білків HBV та/або білок консенсусного поверхневого антигену HBV, або одну або більше ослаблених вірусних частинок, що містять один або більше консенсусних корових білків HBV та/або білок поверхневого антигену HBV. Ослаблена вакцина може бути ослабленою живою вакциною, убитою вакциною і вакцинами, які використовують рекомбінантні вектори для доставки чужорідних генів, які кодують один або кілька консенсусних корових білків HBV та/або білок поверхневого антигену HBV, а також субодиниці і глікопротеїнові вакцини.  
35 Приклади ослаблених живих вакцин, тих, які використовують рекомбінантні вектори для доставки чужорідних антигенів, субодиничних вакцин і вакцин глікопротеїнів, описані в патентах США №: 4510245; 4797368; 4722848; 4790987; 4920209; 5017487; 5077044; 5110587; 5112749; 5174993; 5223424; 5225336; 5240703; 5242829; 5294441; 5294548; 5310 668; 5387744; 5389368;  
40 5424065; 5451499; 5453364; 5462734; 5470734; 5474935; 5482713; 5591439; 5643579; 5650309; 5698202; 5955088; 6034298; 6042836; 6156319, 6589529, кожен з яких включений до даного опису шляхом посилання.

d. Вакцинні продукти і плазмиди

[00171] Вакцина може містити конструкти нуклеїнової кислоти або плазмиди, які кодують корові білки HBV, поверхневі антигени HBV, і комбінації корові білки HBV/поверхневі антигени. Передбаченими в цьому документі є генетичні конструкти, які можуть містити послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує коровий антиген HBV, описаний в цьому документі, включаючи консенсусні білкові послідовності, послідовності, гомологічні консенсусним білковим послідовностям, фрагменти консенсусних білкових послідовностей і послідовності, гомологічні  
50 фрагментам консенсусних білкових послідовностей. Крім того, передбаченими в цьому документі є генетичні конструкти, які можуть містити послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує поверхневий антиген HBV, описаний в цьому документі, послідовності, гомологічні консенсусним білковим послідовностям, фрагменти консенсусних білкових послідовностей і послідовності, гомологічні фрагментам консенсусних білкових послідовностей. Генетичний  
55 конструкт може бути присутнім в клітині у вигляді функціонуючої екстрахромосомальної молекули. Генетичний конструкт може бути лінійною мініхромосомою, включаючи центромери, теломери або плазмиди, або косміди.

[00172] Генетичний конструкт може також бути частиною геному рекомбінантного вірусного вектора, включаючи рекомбінантний аденовірус, рекомбінантний аденовірус асоційований вірус  
60 і рекомбінантний вірус осповакцини. Генетичний конструкт може бути частиною генетичного

матеріалу в ослаблених живих мікроорганізмах або рекомбінантних мікробних векторів, які живуть в клітинах.

5 [00173] Генетичні конструкти можуть містити регуляторні елементи для експресії генів, що кодують послідовності нуклеїнової кислоти. Регулюючі елементи можуть бути промотором, енхансерним ініціюючим кодоном, стоп-кодоном або сигналом поліаденилювання.

10 [00174] Послідовності нуклеїнових кислот можуть скласти генетичний конструкт, який може бути вектором. Вектор може бути здатним експресувати антиген в клітині ссавця в кількості, ефективній для індукції імунної відповіді у ссавця. Вектор може бути рекомбінантним. Вектор може містити гетерологічну нуклеїнову кислоту, що кодує антиген. Вектор може бути плазмідом. Вектор може бути корисним для трансфекції клітин нуклеїнової кислоти, що кодує антиген, який культивують з трансформованою клітиною-господарем і витримують в умовах, в яких експресія антигену має місце.

15 [00175] Кодуючі послідовності можна оптимізувати для стабільності і високих рівнів експресії. У деяких випадках, кодони вибирають так, щоб зменшити утворення вторинної структури РНК, такої як та, що формується за рахунок внутрішньомолекулярного зв'язку.

20 [00176] Вектор може містити гетерологічну нуклеїнову кислоту, що кодує антиген, і може додатково містити ініціюючий кодон, який може розташовуватися по ходу транскрипції антигенкодуючої послідовності, і стоп-кодон, який може розташовуватися проти ходу транскрипції антигенкодуючої послідовності. Кодон ініціації і стоп-кодон може розташовуватися в рамці з антигенкодуючою послідовністю. Вектор може також містити промотор, який функціонально зв'язаний з антигенкодуючою послідовністю. Промотор, функціонально зв'язаний з послідовністю, що кодує антиген, може бути промотором з вірусу мавп 40 (SV40), вірусу пухлини молочної залози миші (MMTV), промотором вірусу імунодефіциту людини (HIV), промотором, таким як промотор довгого кінцевого повтору (LTR) вірусу бичачого імунодефіциту (BIV), промотором вірусу Молоні, промотором вірусу пташиного лейкозу (ALV), промотором цитомегаловірусу (CMV), промотором, таким як безпосередньо ранній промотор CMV, промотором вірусу Епштейна-Барра (EBV) або промотором вірусу саркоми Рауса (RSV). Промотор може бути також промотором людського гену, такого як людський актин, міозин людини, гемоглобін людини, людський м'язовий креатин або металотіонеїн. Промотор може бути також тканиноспецифічним промотором, таким як м'язово або шкірно специфічним промотором, природним або штучним. Ці або шкіри конкретного промотора, природні або синтетичні. Приклади таких промоторів описані в публікації патентної заявки США № US20040175727, зміст якої включений до даного опису у всій своїй повноті.

35 [00177] Вектор може також містити сигнал поліаденилювання, який може розташовуватися проти ходу транскрипції послідовності, що кодує коровий білок HBV. Сигнал поліаденилювання може бути сигналом поліаденилювання SV40, сигналом поліаденилювання LTR, сигналом поліаденилювання бичачого гормону росту (bGH), сигналом поліаденилювання людського гормону росту (hGH) або сигналом поліаденилювання  $\beta$ -глобіну. Сигнал поліаденилювання SV40 може бути сигналом поліаденилювання з вектору pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA).

40 [00178] Вектор може також містити енхансер, розташований проти ходу транскрипції послідовності, що кодує консенсусний коровий білок HBV, або послідовності, що кодує білок консенсусного поверхневого антигену HBV. Енхансер може бути необхідним для експресії ДНК. Енхансер може бути людським актином, людським міозином, людським гемоглобіном, людським м'язовим креатином або вірусним енхансером, таким як енхансер з CMV, HA, RSV або EBV. Енхансери функції полінуклеотиду описані в патентах США № 5593972, 5962428, а також WO 94/016737, зміст кожного з них у повному обсязі включено шляхом посилання.

50 [00179] Вектор може також містити точку початку реплікації від ссавців, щоб підтримувати вектор екстрахромосомально і продукувати кілька копій вектора в клітині. Вектор може бути pVAX1, pCEP4 або pREP4 від Invitrogen (San Diego, CA), який може містити точку початку реплікації вірусу Епштейн-Барра і кодує ділянку ядерного антигену EBNA-1, які можуть продукувати високого копіювання епісомну реплікацію без інтеграції. Вектор може бути pVAX1 або варіантом pVax1 із змінами, таким як варіантна плазміда, описана в даному документі. Варіантною плазмідом pVax1 є варіант з 2998 пар основ скелетної векторної плазміді pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad CA). Промотор CMV розташований біля основ 137-724. Промотор/сайт примування T7 розташований біля основ 664-683. Кілька сайтів клонування розташовані біля основ 696-811. Сигнал поліаденилювання бичачого гормону росту розташований біля основ 829-1053. Ген стійкості до канаміцину знаходиться біля основ 1226-2020. Точка початку реплікації pUC розташована біля основ 2320-2993.

60 [00180] Виходячи з послідовності pVAX1, доступної від Invitrogen, наступні мутації можуть бути виявлені в послідовності pVAX1, яка використовується як скелет для плазмід 1-6,

зазначених у цьому документі:

[00181] C>G241

[00182] C>T

[00183] A> -

5 [00184] C>T

[00185] G>C

[00186] Пари основ 2, 3 і 4 змінюються від АСТ до СТГ в скелеті, проти ходу транскрипції промотора CMV.

10 [00187] Скелетом вектора може бути pAV0242. Вектор може бути типом 5 вектора аденовірусу, дефектного по реплікації (Ad5).

[00188] Вектор може також містити регуляторну послідовність, яка може добре підходити для експресії генів в клітинах ссавців або людини, в які вводять вектор. Консенсусна кодуєча послідовність HBV може містити кодон, який може дозволити більш ефективну транскрипцію кодуєчої послідовності в клітині-хазяїні.

15 [00189] Вектором може бути pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.), яка може бути використана для продукування білку в Escherichia coli (E. coli). Вектором також може бути pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.), яка може бути використана для продукування білку в штаммах дріжджів Saccharomyces cerevisiae. Вектором також може бути повна бакуловірусна експресійна система MAXBAC™ (Invitrogen, San Diego, Calif.), яка може бути використана для  
20 продукування білку в клітинах комах. Вектором також може бути pcDNA 1 або pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.), які можуть бути використані для продукування білку в клітинах ссавців, таких як оваріальні клітини китайського хом'яка (CHO). Вектором можуть бути вектори експресії або системи для продукування білку з допомогою рутинних технологій і легко доступних вихідних матеріалів, включаючи Sambrook et al., Molecular Cloning i Laboratory  
25 Manual, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989), які включені в повному обсязі у вигляді посилання.

[00190] В деяких варіантах здійснення вектор може містити послідовність нуклеїнової кислоти SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 або SEQ ID NO:21. SEQ ID NO:17 кодує консенсусний коровий білок HBV, а SEQ ID NOS:18-21 кодує консенсусний  
30 поверхневий антиген HBV. Карти векторів SEQ ID NOS:17-21 показані на Фігурах 5-9, відповідно.

е. Фармацевтичні композиції вакцини

[00191] Вакцина може бути у вигляді фармацевтичної композиції. Фармацевтична композиція може містити вакцину.

35 [00192] Фармацевтичні композиції можуть містити приблизно від 5 нанограмів до приблизно 10 мг вакцинної ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції згідно цьому винаходу містять приблизно від 25 нанограмів до приблизно 5 мг вакцинної ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 50 нанограмів до приблизно 1 мг ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять  
40 приблизно від 0,1 до приблизно 500 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 1 до приблизно 350 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 5 до приблизно 250 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 10 до приблизно 200 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 15 до приблизно 150 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 20 до до приблизно 100 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 25 до приблизно 75 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 30 до приблизно 50 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах  
50 здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 35 до приблизно 40 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції містять приблизно від 100 до приблизно 200 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція містить приблизно від 10 мікрограмів до приблизно 100 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція містить приблизно від 20 мікрограмів до приблизно 80 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція містить приблизно від 25 мікрограмів до приблизно 60 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція містить приблизно від 30 нанограмів до приблизно 50 мікрограмів ДНК. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція містить приблизно від 35 нанограмів до приблизно 45 мікрограмів ДНК. В деяких переважних варіантах здійснення  
60 фармацевтична композиція містить приблизно від 0,1 до приблизно 500 мікрограмів ДНК. В

деяких переважних варіантах здійснення фармацевтична композиція містить приблизно від 1 до приблизно 350 мікрограмів ДНК. В деяких переважних варіантах здійснення фармацевтична композиція містить приблизно від 25 до приблизно 250 мікрограмів ДНК. В деяких переважних варіантах здійснення фармацевтична композиція містить приблизно від 100 до приблизно 200 мікрограмів ДНК.

[00193] В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом містять принаймні 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 нанограмів ДНК-вакцини. В деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції можуть містити принаймні 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 або 1000 мікрограмів ДНК-вакцини. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція може містити принаймні 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 або 10 мг або більше ДНК-вакцини.

[00194] В інших варіантах здійснення фармацевтична композиція може містити аж до і включно 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 100 нанограмів ДНК-вакцини. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція може містити аж до і включно 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 або 1000 мікрограмів ДНК-вакцини. В деяких варіантах здійснення, фармацевтична композиція може містити аж до і включно 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 або 10 мг ДНК-вакцини.

[00195] Фармацевтична композиція може додатково містити інші агенти для цілей розробки відповідно до режиму введення, який буде використовуватися. У тих випадках, коли фармацевтичні композиції являють собою ін'єкційні фармацевтичні композиції, вони є стерильними, пірогенними і вільними від частинок. Переважно використовують ізотонічний препарат. Як правило, добавки для ізотонічності можуть включати хлорид натрію, декстрозу, маніт, сорбіт і лактозу. У деяких випадках, кращими є ізотонічні розчини, такі як фосфатно-буферний розчин. Стабілізатори включають желатин і альбумін. У деяких варіантах здійснення в композицію додають агент для звуження судин.

[00196] Вакцина може додатково містити фармацевтично прийнятний наповнювач. Фармацевтично прийнятний наповнювач може бути функціональними молекулами як наповнювачами, ад'ювантами, носіями або розріджувачами. Фармацевтично прийнятний ексципієнт може бути агентом для полегшення трансфекції, який може включати поверхнево-активні речовини, такі як імуностимулюючі комплекси (ISCOMS), неповний ад'ювант Фрейнда, аналог LPS, включаючи монофосфорилліпід А, мурамілпептиди, аналоги хінону, везикули, такі як сквален, і сквален, гіалуронова кислота, ліпіди, ліпосоми, іони кальцію, вірусні білки, поліаніони, полікатіони або наночастинки, або інші відомі агенти для полегшення трансфекції.

[00197] Полегшуючим трансфекцію агентом є поліаніон, полікатіон, в тому числі полі-L-глутамат LGS), або ліпід. Полегшуючим трансфекцію агентом є полі-L-глутамат, і більш переважно полі-L-глутамат присутній у вакцині в концентрації менше 6 мг/мл. Полегшуючий трансфекцію агент може також включати поверхнево-активні речовини, такі як імуностимулюючі комплекси (ISCOMS), неповний ад'ювант Фрейнда, аналог LPS, включаючи монофосфорилліпід А, мурамілпептиди, аналоги хінону і везикули, такі як сквален, і сквален і гіалуронова кислота також можуть вводитися в поєднанні з генетичним конструктом. В деяких варіантах здійснення, ДНК-векторні вакцини можуть також включати полегшуючі трансфекцію агенти, такі як ліпіди, ліпосоми, в тому числі лецитин, ліпосоми або інші ліпосоми, відомі в даній галузі техніки, як ДНК-ліпосомні суміші (див. наприклад, W09324640), іони кальцію, вірусні білки, поліаніони,



полікатіони або наночастинки або інші відомі агенти для полегшення трансфекції. Переважно полегшуючим трансфекцію агентом є поліаніон, полікатіон, включаючи полі-L-глутамат (LGS), або ліпід. Концентрація агента трансфекції у вакцині становить менше 4 мг/мл, менше 2 мг/мл, менше 1 мг/мл, менше 0,750 мг/мл, менше 0,500 мг/мл, менше 0,250 мг/мл, менше 0,100 мг/мл, менше 0,050 мг/мл або менше 0,010 мг/мл.

[00198] Фармацевтично прийнятний наповнювач може бути ад'ювантом. Ад'ювантом можуть бути інші гени, які експресуються в альтернативній плазміді або доставляються як білки в комбінації з вказаною вище плазмідною у вакцині. Ад'ювант може бути вибраним з групи, що містить:  $\alpha$ -інтерферон (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -інтерферон (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -інтерферон, фактор росту тромбоцитів (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, епідермальний фактор росту (EGF), шкірний Т-клітинний провідниковий хемокін (STACK), епітеліальний тимус-експресований хемокін (TECK), мукозо-асоційований епітеліальний хемокін (MEC), IL-12, IL-15, MHC, CD80, CD86, включаючи IL-15, що має віддалену сигнальну послідовність і необов'язково включає сигнальний пептид від IgE. Ад'ювантом може бути IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK, фактор росту тромбоцитів (PDGF), TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, епідермальний фактор росту (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-18, IL-21, IL-31, IL-33 або їх комбінації. Прикладом здійснення ад'юванта є IL-12.

[00199] Інші гени, які можуть бути корисними ад'ювантами, включають ті, що кодують: 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, мутантні форми IL-18, CD40, CD40L, васкулярний фактор росту, фібробластний фактор росту, IL-7, фактор росту нервів, васкулярний ендотеліальний фактор росту, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, Inactive NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гени відповіді інтерферону, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O $\chi$ 40, O $\chi$ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 та їх функціональні фрагменти.

#### f. Способи доставки вакцини

[00200] Передбаченим у цьому документі є спосіб доставки фармацевтичної композиції для забезпечення генетичного конструкту і білків корового білку HBV та/або поверхневого антигену HBV, які містять епітопи, які роблять їх особливо ефективними імуногенами, проти яких імунна відповідь на вірусні HBV-інфекції може бути викликана. Спосіб доставки вакцини, або вакцинація, може бути передбачений, щоб викликати терапевтичну та/або профілактичну імунну відповідь. Процес вакцинації може генерувати у ссавця імунну відповідь проти множини генотипів HBV. Вакцина може бути доставлена індивідууму, щоб модулювати активність імунної системи ссавця і підсилити імунну відповідь. Доставка вакцини може бути трансфекцією антигеном НА як молекули нуклеїнової кислоти, яка експресується в клітині і доставляється на поверхню клітини, на якій імунна система розпізнає і індукує клітинну, гуморальну або клітинну і гуморальну відповідь. Доставка вакцини може бути використана, щоб індукувати або викликати імунну відповідь у ссавця проти множини вірусів HBV шляхом введення ссавцю вакцини, як описано в даному документі.

[00201] При доставці вакцини ссавцю, і слідом за цим вектора в клітини ссавця, трансфіковані клітини будуть експресувати і секретувати консенсусний коровий білок HBV і консенсусний поверхневий антиген HBV. Ці секретовані білки або штучні антигени, будуть визнані як чужорідні імунною системою, яка буде піднімати імунну відповідь, яка може включати: антитіла, отримані проти антигенів, і Т-клітинна відповідь саме проти антигену. У деяких прикладах, ссавець, щеплений вакцинами, обговорюваними в даному документі, матиме примовану імунну систему і при зараженні вірусним штамом HBV примована імунна система дозволяє швидко очистити наступні віруси HBV, будь то через гуморальну, або клітинну, або обидві системи. Вакцина може бути доставлена індивідууму, щоб модулювати активність імунної системи індивідуума, тим самим підвищуючи імунну відповідь.

[00202] Способи доставки ДНК-вакцини описані в патентах США № 4945050 і 5036006, які включені до даного опису у всій своїй повноті шляхом посилання.

[00203] Вакцина може бути введена в організм ссавця, щоб викликати імунну відповідь у ссавця. Ссавець може бути людиною, приматом крім людини, коровою, свинею, вівцею, козою, антилопою, бізоном, буйволом, пусторогим, оленем, їжаком, слоном, ламою, альпака, мишами, щурами або куркою, і, переважно людиною, коровою, свинею або куркою.

#### g. Доставка вакцини з ад'ювантами

[00204] Фармацевтичні композиції, переважно вакцини, описані в даному документі, можуть бути введені в комбінації з білками або генами, що кодують ад'юванти, які можуть включати:  $\alpha$ -інтерферон (IFN- $\alpha$ ),  $\beta$ -інтерферон (IFN- $\beta$ ),  $\gamma$ -інтерферон, IL-12, IL-15, IL-28, STACK, TECK,

фактор росту тромбоцитів (PDGF),  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ , GM-CSF, епідермальний фактор росту (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, мутантні форми IL-18, CD40, CD40L, васкулярний фактор росту, фібробластний фактор росту, IL-7, фактор росту нервів, васкулярний ендотеліальний фактор росту, Fas, рецептор TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspase ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I $\kappa$ B, неактивний NIK, SAP K, SAP-1, JNK, гени відповіді інтерферону, NF $\kappa$ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, O $\chi$ 40, O $\chi$ 40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1 або TAP2 або їх функціональні фрагменти. В прикладах здійснення ад'ювантом є IL-12.

h. Спосіб генерації імунної відповіді на вакцину

[00205] Вакцина може бути використана для генерації імунної відповіді у ссавця, у тому числі терапевтичної або профілактичної імунної відповіді. Імунна відповідь може генерувати антитіла та/або клітини Т-клітини, які спрямовані на коровий антиген HBV, поверхневий антиген HBV або їх комбінації. Такі антитіла і Т-клітини можуть бути виділеними.

[00206] Деякі варіанти здійснення забезпечують способи генерації імунних реакцій проти корових білків HBV, поверхневих антигенних білків HBVта їх комбінації, які включають введення індивідууму вакцини. Деякі варіанти здійснення забезпечують способи профілактичної вакцинації індивідуума проти HBV-інфекції, які включають введення вакцини. Деякі варіанти здійснення забезпечують способи терапевтичної вакцинації індивідуума, який був заражений HBV, які включають введення вакцини. Діагностика HBV-інфекції до введення вакцини може бути здійснена у встановленому порядку.

i. Спосіб лікування вакциною

[00207] Вакцина може бути використана для отримання імунної відповіді у ссавця, яка захищає печінку. Імунна відповідь може створювати антиген-специфічну CTL відповідь, яка не викликає ушкодження або запалення печінки. У деяких варіантах здійснення, вакцина може бути доставлена до периферії для виклику антиген-специфічної імунної відповіді, націленої на печінку, щоб очистити або усунути HBV-інфіковані клітини, не пошкоджуючи і не викликаючи запалення печінки. В деяких варіантах здійснення, лікування може включати доставку вакцини, що містить консенсусний коровий антиген HBV, до периферії для створення антиген-специфічної імунної відповіді, націленої на печінку, щоб очистити або усунути HBV-інфіковані клітини, не завдаючи шкоди або не викликаючи запалення печінки.

3. Шляхи введення

[00208] Вакцину або фармацевтичну композицію можна вводити різними способами, в тому числі перорально, парентерально, під'язиково, черезшкірно, ректально, через слизову, місцево, шляхом інгаляції, за допомогою трансбуккального введення, внутрішньоплеврально, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, внутрішньоочеревинно, підшкірно, внутрішньом'язово, інтраназально, інтратекально і внутрішньосуглобовим способом або їх комбінаціями. Для застосування у ветеринарії, композиція може бути введена у вигляді відповідним чином прийнятої композиції відповідно до звичайної ветеринарної практики. Ветеринар може легко визначити схему дозування і спосіб введення, який є найбільш підходящим для конкретної тварини. Вакцина може бути введена з допомогою традиційних шприців, безголкових ін'єкційних пристроїв, "пістолетів для бомбардування мікрочастинками" або іншими фізичними методами, такими як електропорація ("EP"), "гідродинамічний метод" або ультразвук.

[00209] Вектор вакцини може бути доставлений ссавцю з допомогою декількох добре відомих технологій, включаючи ін'єкції ДНК (такоже згадується як ДНК-вакцинація) з і без електропорації in vivo, ліпосомально опосередковані, наночастинки, рекомбінантні вектори, такі як рекомбінантний аденовірус, рекомбінантний аденовірус асоційований вірус і рекомбінантний вірус коров'ячої віспи. Антиген HBV може бути доставлений за допомогою ін'єкції ДНК і разом з електропорацією in vivo.

a. Електропорація

[00210] Вакцина або фармацевтична композиція можуть бути введені шляхом електропорації. Введення вакцини за допомогою електропорації плазмідями вакцини може бути здійснене з допомогою електропораційних пристроїв, які можуть бути сформовані для доставки до цільової тканини ссавця імпульсу енергії, ефективного для створення зворотних пор, що утворюються в клітинних мембранах, а кращим імпульсом енергії є постійний струм, подібний заданому струму, введеному користувачем. Пристрій для електропорації може містити

компонент електропорації і електродний вузол або вузол ручки. Компонент електропорації може включати і містити один або більше різних елементів електропораційного пристроїв, включаючи: контролер, генератор імпульсів струму заданої форми, тестер імпедансу, реєстратор сигналу, вхідний елемент, елемент створення звітів про стан, порт зв'язку, компоненти пам'яті, джерело живлення і вимикач живлення. Електропорація може бути здійснена з використанням *in vivo* електропораційного пристрою, наприклад, системи CELLECTRA® EP (Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA) або електропоратора Elgen (Inovio Pharmaceuticals, Inc.) для сприяння трансфекції клітин плазмідом.

[00211] Приклади електропораційних пристроїв і способів електропорації, які можуть сприяти в отриманні ДНК-вакцин згідно з даним винаходом, включають ті, які описані в патенті США № 7245963, представленою Draghia-Akli, et al., патентній публікації США 2005/0052630, представленій Smith, , et al., зміст яких включено до даного опису шляхом посилання у всій їхній повноті. Інші пристрої для електропорації і методи електропорації, які можуть бути використані для полегшення доставки вакцин ДНК, включають ті, що передбачені в одночасно розглянутій і спільно належачій заявці на патент США, серійний номер 11/874072, поданій 17 жовтня 2007, яка претендує на пріоритет відповідно до 35 USC 119 (e) попередніх заявок США № 60/852149, поданої 17 жовтня 2006, і 60/978982, поданої 10 жовтня 2007, всі з них включені до даного опису у всій своїй повноті.

[00212] Патент США № 7245963 від Draghia-Akli та інш. описує модульні електродні системи і їх застосування для полегшення введення біомолекули в клітини вибраної тканини в тілі або рослині. Модульні електродні системи можуть містити множину голчастих електродів; гіпотермічну голку; електричний з'єднувач, який забезпечує зв'язок від програмованого контролером імпульсу постійного струму до множини голчастих електродів; і джерело живлення. Оператор може захопити множину голчастих електродів, які розміщені на опорній конструкції, і міцно вставити їх в вибрану тканину в тілі або рослині. Біомолекули потім доставляються з допомогою підшкірної голки в вибрану тканину. Контролер програмованого імпульсу постійного струму активується і електричний імпульс постійного струму подається на множину голчастих електродів. Застосовуваний електричний імпульс постійного струму полегшує введення біомолекули в клітину між множиною електродів. Весь зміст патенту США N 7245963 включено до даного документу шляхом посилання.

[00213] Патентна публікація США 2005/0052630, представлена Сміт та інш., описує електропораційний пристрій, який може бути використаний, щоб ефективно полегшити введення біомолекули в клітини вибраної тканини в тілі або рослині. Електропораційний пристрій містить електрокінетичний пристрій ("EKD пристрій"), робота якого визначається програмним забезпеченням або прошивкою. Пристрій EKD випускає серію модулів програмованих імпульсів постійного струму між електродами в масиві на основі елементу управління користувача і введення параметрів імпульсу, і дозволяє зберігати і отримувати дані заданої форми сигналу. Електропораційний пристрій також містить змінний електродний диск, що має множину голчастих електродів, центральний канал вприскування для ін'єкційної голки і знімний направляючий диск. Весь зміст патентної публікації США 2005/0052630 включено до даного опису шляхом посилання.

[00214] Електродні масиви і способи, описані в патенті США № 7245963 і патентній публікації США 2005/0052630, можуть бути адаптовані для глибокого проникнення не тільки в тканини, такі як м'язи, але й в інші тканини або органи. Через конфігурацію матриці електродів ін'єкційна голка (для доставки вибраної біомолекули) також вставляється до упору в організм і ін'єкцію вводять перпендикулярно до цільової проблеми в ділянку, яка попередньо окреслюється електродами. Електроди, описані в патенті США № 7245963 і патентній публікації США 2005/005263, переважно мають довжину 20 мм і 21 калібр.

[00215] Крім того, передбаченими в деяких варіантах здійснення, які включають електропораційні пристрої та використовують їх, є електропораційні пристрої, які є тими, що описані в наступних патентах: патент США № 5273525, виданий 28 грудня 1993, патент США № 6110161, виданий 29 серпня 2000, передбаченими в деяких варіантах здійснення, які включають електропораційні пристрої та використовують їх, є електропораційні пристрої, які є тими, що описані в наступних патентах: патент США № 5273525, виданий 28 грудня 1993, патент США № 6110161, виданий 29 серпня 2000, патент США № 6 261 281, виданий 17 липня 2001, і патент США № 6958060, виданий 25 жовтня 2005, і патент США 6939862, виданий 6 вересня 2005. Крім того, патенти, що стосуються предмета, представленого в патенті США 6697669, виданому 24 лютого 2004, який стосується доставки ДНК з використанням будь-якого з множини пристроїв, і в патенті США 7328064, виданому 5 лютого 2008, який стосується методу ін'єкування ДНК, розглядаються в даному документі. Вказані вище патенти включені шляхом посилання у всій

їхній повноті до даного документа.

#### 4. Спосіб виготовлення вакцини

[00216] Передбаченими в даному документі є способи одержання ДНК-плазмід, які містять вакцини, описані в даному документі. Плазмідни ДНК після фінальної стадії субклонування в плазміді експресії ссавця можуть бути використані для інокуляції клітин культури в великомасштабному ферментаційному чані з використанням відомих методів в даній галузі техніки.

[00217] ДНК-плазмідни для використання з ЕР-пристроями згідно з даним винаходом можуть бути приготовані або виготовлені з використанням комбінації відомих пристроїв і методів, але, переважно вони виготовляються з використанням оптимізованої технології виробництва плазмід, описаної в опублікованій заявці США № 20090004716, яка була подана 23 травня 2007. В деяких прикладах ДНК-плазмідни, використані в цих дослідженнях, можуть бути отримані в концентраціях, що перевищують або дорівнюють 10 мг/мл. Технології виготовлення також включають або містять різні пристрої і протоколи, які, як правило, відомі фахівцям у даній галузі техніки, на додаток до тих, які описані в патенті США з серійним номером 60/939792, у тому числі ті, які описані в ліцензованому патенті, патент США № 7238522, який був виданий 3 липня 2007. Зазначені вище заявка і патент США з серійним номером 60/939792 і патент США № 7238522, відповідно, включені до даного опису у всій своїй повноті.

#### Приклади

[00218] Цей винахід далі ілюструється наступними прикладами. Слід розуміти, що ці приклади, які показують кращі варіанти здійснення даного винаходу, надані тільки для ілюстрації. Виходячи з наведеного вище обговорення та прикладів, фахівець у даній галузі може встановити суттєві характеристики цього винаходу і, не відступаючи від сутності й обсягу винаходу, може здійснити різні зміни й модифікації винаходу, щоб пристосувати його до різних застосувань та умов. Таким чином, різні модифікації винаходу на додаток до тих, які показані й описані в даному документі, будуть очевидні фахівцям в даній галузі з вищенаведеного опису. Такі модифікації також підпадають під обсяг прикладеної формули винаходу.

#### Приклад 1

##### Коровий білок HBV

[00219] Консенсусний коровий білок HBV, також іменований як HBV модифікований, MCore або конструкт M-Core, був сконструйований з епітопних послідовностей від генотипів A, B, C, D і E HBV. Послідовності капсидних білків HBV від цих генотипів були відібрані для включення в конструкцію консенсусного кору, який може індукувати імунітет проти широкого спектру генотипів, тим самим забезпечуючи універсальну вакцину для HBV. В деяких варіантах здійснення, модифікації конструкту M-Core включали додавання лідерної послідовності IgE. В деяких варіантах здійснення, білок M-Core кодується з використанням кодової оптимізації I РНК-оптимізації для підвищеної експресії.

##### 1. Конструювання і експресія консенсусного корового антигену

[00220] Корові консенсусні нуклеотидні послідовності генотипу A, B, C, D і E HBV були сконструйовані шляхом отримання консенсусних послідовностей корових генів кожного генотипу, а потім шляхом отримання консенсусної послідовності консенсусів всіх п'яти генотипів, таким чином уникнувши зміщення до сильно секвенованих генотипів. Крім того, послідовності були зібрані з різних країн, щоб уникнути відбору зразків сильно секвенованих генотипів. Послідовності вирівнювали, використовуючи програмне забезпечення CLUSTAL X для складання остаточної консенсусної послідовності HBsAg. Як показано на Фігурі 10, спостерігалась відносна близькість мультигенотипової консенсусної HBsAg-послідовності для всіх вибраних послідовностей з різних генотипів.

[00221] Після отримання консенсусної послідовності було здійснено кілька модифікацій для збільшення рівнів експресії антигену з плазмід. Зокрема, було додано високоефективну лідерну послідовність IgE і С-кінцеву НА-мітку, а конструкт було оптимізовано відносно РНК і кодону. Це привело до утворення послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність M-core з IgE-лідером і НА-міткою (SEQ ID NO:5), яка розщеплюється EcoRI і NotI, і клонується у вектор експресії pVAX (Invitrogen) під контролем проміжного цитомегаловірусного промотора. Отриманий конструкт було названо pMCore (SEQ ID NO:17).

[00222] Випробування експресії in vitro були здійснені з використанням конструкту pMCore і pVAX, який використовували як контроль. Результати, що демонструють позитивну експресію, вказані на зображеннях гелів, показаних на фігурах 11A і 11B.

[00223] Крім того, білок HBsAg експресувався ДНК-плазмідною, трансфектованою pMCore, що містить коровий ген гепатиту В (Фігура 12). Експресію pMCore виявляли, використовуючи TNT® Quick Coupled Expression of Transcription / Translation System, яка містить 35S-метіонін

(Promega, Madison, WI). Синтезований генний продукт осаджували, використовуючи моноклональне антитіло до HA, направлене на закодований епітоп HA, клон HA-7 (Sigma-Aldrich). Імунно осаджений білок піддали електрофорезу на 12 % гелі SDS-PAGE, а потім зафіксували і висушили. Синтезований білок зі вставкою радіоактивної 35S виявляли за допомогою авторадіографії. Цей аналіз трансляції *in vitro* на лізаті показав виявлюваний HBcAg при очікуваній молекулярній масі 28 кДа (Фігура 13).

[00224] Експресію було додатково підтверджено з використанням анти-HA міченого моноклонального антитіла за допомогою імуофлюоресцентного аналізу. Рабдоміосаркомні (RD) клітинні лінії трансфікували рMCore, використовуючи TURBOFECT (Thermo Scientific) згідно з інструкціями виробника. Спочатку клітини фіксували 2 % формальдегідом, а потім аналізували з приводу експресії білка. Зафіксовані клітини інкубували з кролячою моноклональною HA-міткою (Invitrogen), розведеною "первинним стандартним розчином" (0,1 % BSA, 0,2 % сапоніну, 0,02 % азиду натрію) протягом однієї години при кімнатній температурі. Потім клітини інкубували з 594-міченим анти-кролячим вторинним антитілом DyLight (Thermo Scientific) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Конфокальні зображення використовували для візуалізації HBcAg в цитоплазмі і навколо ядра трансфікованих RD-клітин, як показано на Фігурі 14. Профіль експресії підтвердив, що ДНК-плазміда, яка несе консенсусний коровий ген, може високо експресуватися в різних клітинах *in vitro*. Зокрема, зображення були отримані з використанням інвертованого конфокального мікроскопа Zeiss Axiovert 100. Аналіз і кількісна оцінка інтенсивності флюоресценції проводилися з використанням програмного забезпечення Image J (NIH, Rockville, MD).

## 2. Імунізація мишей

[00225] Трансгенні миші C57BL/6 були розділені на дві групи по чотири миші в кожній і тричі імунізовані 20 мкг ДНК за допомогою електропорації з двотижневими інтервалами (група 1 – контрольний вектор рVAX; група 2 – рM-Core). Мишей імунізували в день 0, день 14, день 28 та умертвляли в день 35. Селезінку, печінку і сироватку з вбитих тварин брали для дослідження.

[00226] Крім того, щоб оцінити отримання Т і В-клітинних імунних відповідей, мишей Balb/c імунізували і вимірювали з приводу обох відповідей в різних периферичних тканинах. Миші отримали три внутрішньом'язові імунізації по 30 мкг рMCore або рVax з подальшою електропорацією, як зазначено на імунізаційній схемі (Фігура 15). Зокрема, шести-восьми тижневі самки мишей Balb/c були придбані у Jackson Laboratories. Тварин утримували відповідно до норм National Institutes of Health and the University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee (IACUC). Для дослідження ДНК-імунізації вісім тварин розділили на дві групи. Кожна тварина в групі імунізації отримала в цілому по три імунізації 30 мкг рMCore з інтервалом у два тижні у великогомілковий (TA) м'яз. Кожна імунізація супроводжувалася електропорацією *in vivo* з пристроєм CELLECTRA для адаптивної постійнострумної електропорації (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). По два 0,2 амперних постійнострумових прямокутних імпульси були доставлені через трикутну 3-електродну решітку, що складається з 26-каліберних твердих електродів з нержавіючої сталі, повністю занурених у м'яз. Кожен імпульс тривав 52 мілісекунди з 1-секундною затримкою між імпульсами.

[00227] Дослідження мишей Balb/c *in vivo* показало підвищення амплітуди секреції фактора некрозу пухлини (TNF $\alpha$ ), інтерферону гамма Т-клітин (IFN $\gamma$ ) і CD107a в CD8 та CD4 Т клітинах, вилучених з селезінки. Фігури 16 і 17 демонструють, що вакцинація мишей Balb/c рM-Core підвищувала амплітуду секреції IFN $\gamma$  в CD8+ і CD4+Т-клітинах селезінки. Фігури 18 і 19 демонструють, що вакцинація мишей Balb/c рM-Core підвищувала амплітуду секреції TNF $\alpha$  в CD8+ і CD4+Т-клітинах селезінки. Фігури 20 і 21 демонструють, що вакцинація мишей Balb/c рM-Core підвищувала амплітуду секреції CD 107a в CD8+ і CD4+Т-клітинах селезінки.

[00228] У додаткових експериментах, секрецію IFN- $\gamma$  і TNF- $\alpha$  перевіряли в Т-клітинах. Для отримання спленоцитів для цих додаткових експериментів, мишей умертвляли через тиждень після останньої імунізації, а селезінки вилучали і поміщали в середовище R10 (середовище RPMI, збагачене 10 % FBS і 1x антибіотиком-антимікотиком). Селезінки подрібнювали індивідуально, проціджували через 40 мкМ клітинний фільтр та обробляли 1 мл лізисного буферу АСК протягом 5 хвилин для лізису еритроцитів. Спленоцити ресуспендували в повному середовищі R10 і використовували для додаткових імунологічних аналізів.

[00229] Субпопуляцію спленоцитів ресуспендували в середовищі R10 в концентрації 107 на мл і по 100 мкл висівали на 96-лункову круглодонну планшету. 100 мкл середовища, що містить об'єднані пептиди рMCore або 10 нг/мл PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA), і 500 нг/мл іономіцину (Calbiochem, Novabiochem, La Jolla, CA, USA) змішали як позитивний контроль або 0,1 % диметилсульфоксид (Sigma, St. Louis, MO, USA) як негативний контроль. Всі лунки містили по 5 мкл/мл двох інгібіторів транспорту білків, брефелдин А (GolgiPlug) і моненсин (GolgiStop) (All

from BD Bioscience). Клітини інкубували при 37 °C в 5 % CO<sub>2</sub> протягом 5 годин і фарбували LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen) протягом 10 хвилин при 37 °C. Позаклітинне фарбування проводили, використовуючи антитіла, специфічні до мишачих CD3, CD4 і CD8. Спленоцити потім пермеабілізували і промивали, використовуючи BD CYTOFIX/CYTOPERM™ і PERM/WASH™ (BD Bioscience), відповідно.

[00230] Внутрішньоклітинне фарбування цитокінів.

[00231] Внутрішньоклітинні цитокіни потім фарбували антитілами до мишачого інтерферону-гамма і фактору-альфа некрозу пухлини. Субпопуляцію лімфоцитів ресуспендували в середовищі R10 в концентрації 107 на мл і по 100 мкл висівали на 96-лункову круглодонную планшету. 100 мкл середовища, що містить об'єднані пептиди рMCore, або 10 нг/мл PMA (Sigma, St. Louis, MO, USA) і 500 нг/мл іономіцину (Calbiochem, Novabiochem, La Jolla, CA, USA) змішали як позитивний контроль або 0,1 % диметилсульфоксид (Sigma, St. Louis, MO, USA) як негативний контроль. Всі лунки містили по 5 мкл/мл двох інгібіторів транспорту білків, брегелдин А (GolgiPlug) і моненсин (GolgiStop) (всі від BD Bioscience). Клітини інкубували при 37 °C в 5 % CO<sub>2</sub> протягом 5 годин і фарбували LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen) протягом 10 хвилин при 37 °C. Позаклітинне фарбування проводили, використовуючи антитіла, специфічні до мишачих CD3, CD4 і CD8. Спленоцити потім пермеабілізували і промивали, використовуючи BD Cytofix/Cytoperm™ і Perm/Wash™ (BD Bioscience), відповідно. Клітини потім фарбували внутрішньоклітинно антитілами до інтерферону-гамма, фактору-альфа некрозу пухлини, інтрелейкіну-2 і лізосомно-асоційованого мембранного білку 1.

[00232] Кон'юговані анти-мишачі антитіла використовували під час позаклітинного і внутрішньоклітинного фарбування, включаючи: CD3-фікоеритрин/Сy7 (PE/Сy7), CD4-перідинінхлорофіловий білок (PerCP), CD8-аллофікоціанін (APC), IFN-γ-Alexa Fluor 700, TNF-α-флюоросцеїну ізотіоціанат (FITC) і IL-2-фікоеритриноціанін (PE) (всі від BD Biosciences, San Jose, CA).

[00233] Середня індукована HBcAg-специфічна IFN-γ Т-коїтинна відповідь була сильною при 2000 (± 210) SFU на мільйон спленоцитів. Цікаво, що внутрішньоклітинне фарбування стимульованих спленоцитів показало, що клітини CD4+ і CD8+ продукують майже подібну кількість антигенспецифічного IFN-γ, 0,74 і 0,94, відповідно, але різні рівні TNF-α з приблизно 0,3 % і 1,5 % клітин CD4+ і CD8+, відповідно (Фігура 22). Аналогічна тенденція спостерігалася з клітинами, які були двічі позитивними для обох цитокінів. Спостерігалася менше двічі позитивних клітин CD4+, приблизно 0,2 %, в селезінці, ніж двічі позитивних клітин CD8+, які складають 0,7 % (Фігура 23).

[00234] Міграція HBV специфічних Т клітин у печінку також була продемонстрована у тварин, яким вводили ДНК-вакцину рMCore. Націлювання Т-клітин, специфічних до корового антигену HBV, з високою частотою і ефекторною функцією до печінки є метою для розвитку HBV-імунної терапії. Після імунізації тварин умертвляли, а їх печінку видаляли і визначали міграцію HBV-специфічних ефекторних Т-клітин в печінку. Результати показали, що вакцина рMCore приводить ефекторні Т-клітини в печінку in vivo. Фігури 24 і 25 демонструють інтерферон-γ Т-клітинну відповідь у печінці, а Фігури 26 і 27 демонструють імунну відповідь фактора α некрозу пухлини в печінці і підвищену реакцію, яка виникає в результаті вакцинації рMCore.

[00235] Консенсусний імуноген M-Core, який кодується ДНК-конструктом рMCore, приводить до строго врівноважених CD4+/CD8+Т-клітинних імунних відповідей. Індуковані Т-клітини рухаються до печінки з високою частотою і демонструють коректний ефекторний фенотип імунного кліренсу після HBV-інфекції, підтримуючи подальший розвиток цієї імунної терапевтичної вакцини.

[00236] Також досліджували здатність внутрішньопечінкових антиген-специфічних Т-клітин продукувати цитокіни після ДНК-імунізації. У кожну печінку шляхом безпосередньої ін'єкції вводили 1 мл PBS в печінкову вену кожної миші. Зокрема, вилучали печінку, подрібнювали і ресуспендували в 5 мл 44 % ізотонічного Percoll. Суміші заливали 3 мл 66 % ізотонічного Percoll і центрифугували протягом 20 хвилин при 2000 оборотів в хвилину для градієнтного поділу. Лімфоцити збирали і промивали 10 мл R10 і обробляли лізисним буфером ACK в міру необхідності. Як CD4, так і CD8 Т-клітини, виділені з печінки, продукували IFN-γ і TNF-α, коли стимулювалися пептидом HBcAg in vitro (Фігури 28 і 29). У той час як CD4 Т-клітини демонстрували високий відсоток подвійних продуцентів, CD8 демонстрували незначну кількість або відсутність IFN-γ+TNF-α+ продукуючих клітин. Зате, більшість CD8 Т-клітин продукували або тільки IFN-γ або TNF-α. У печінці спостерігалася накопичення HBcAg-специфічних Т-клітин на протигагу селезінці. Відсоток HBcAg-специфічних CD4 двічі позитивних Т-клітин печінки в стані спокою був порівняним з клітинами, які спостерігаються в селезінці. Більш того, периферичні CD8 Т-клітини були переконливо кращими подвійними продуцентами, ніж

резидентні CD8 Т-клітини печінки. Також спостерігалась антитіло-продукуюча здатність резидентних В-клітин печінки імунізованих мишей. Цікаво, що печінка як слизовий орган продукувала більше антиген-специфічних IgA, ніж IgG (Фігура 30), спостереження, яке раніше не досліджувалось.

[00237] На Фігурі 31 показані клітинні імунні реакції, викликані рМ-Core з використанням твердофазового імуноферментного аналізу (ELISPOT). Спленоцити стимулювали двома пулами 15-мірних пептидів, що охоплюють повну довжину рМCore і перекриваються 8 амінокислотами. 200000 спленоцитами в середовищі R10 засівали 96-лункову планшету, покриту IFN- $\gamma$ -захоплюючим антитілом (система R & D), стимулювали протягом ночі в присутності специфічного пептидного пулу при 37 °C в 5 % CO<sub>2</sub>. Клітини змили, а планшети інкубували протягом ночі з біотинильованим анти-мишачим IFN- $\gamma$ -виявляючим антитілом (система R&D). Стрептавідин-лужну фосфатазу й 5-бром-4-хлор-3'-індолілфосфат р-толуїдинову сіль та нітросиній тетразолію хлорид використовували для виявлення плям. Плями підраховували, використовуючи автоматизований ELISPOT-рідер (CTL Limited). Як показано на Фігурі 31, імунізація рМCore викликає сильні клітинні імунні реакції. Середнє HBcAg-специфічних IFN- $\gamma$  Т-клітинних реакцій становило приблизно 2000 ( $\pm$  210) SFU на мільйон спленоцитів.

[00238] Аналіз ELISPOT використовували для подальшого дослідження IFN- $\gamma$ . Зокрема, спленоцити стимулювали двома пулами 15-мірних пептидів, що охоплюють повну довжину рМCore та перекриваються 8 амінокислотами. Всього було 33 індивідуальних пептиди, які були об'єднані випадковим чином з першими 17 пептидами в пул 1 і останніми 16 в пул 2. IgEL і HA-мітка виключалися, щоб зробити пептид як можна більш ближчим до природного антигену. 200000 спленоцитами в середовищі R10 засівали на 96-лунковий планшет, покритий антитілами проти IFN- $\gamma$ -захоплюючим антитілом (система R & D), стимулювали протягом ночі в присутності специфічного пептидного пулу при 37 °C в 5 % CO<sub>2</sub>. Клітини змили, а планшети інкубували протягом ночі з біотинильованим анти-мишачим IFN- $\gamma$ -виявляючим антитілом (система R&D). Стрептавідин-лужну фосфатазу й 5-бром-4-хлор-3'-індолілфосфат р-толуїдинову сіль та нітросиній тетразолію хлорид використовували для виявлення плям. Плями підраховували, використовуючи автоматизований ELISPOT-рідер (CTL Limited). Спостерігалось, що через один тиждень після фінальної імунізації рМCore-імунізовані миші демонстрували ознаки сильних HBcAg Т-клітинних реакцій, як було визначено за допомогою IFN- $\gamma$  ELISPOT-аналізу після стимуляції *ex vivo*. На Фігурі 32 показано, що домінантні епітопи зміщені в бік пептидного пулу 2.

[00239] Дослідження цитотоксичності *in vivo* проводили, використовуючи мічення карбоксифлюоросцеїндіацетатсукцинімідним ефіром (CFSE) у поєднанні з проточною цитометрією. Спленоцити отримували у мишей, які не використовувалися раніше в досліді, і розподілили у дві популяції. Одна популяція, CFSE-сильно мічені, пульсувала з релевантним пептидом (наприклад, капсидними пептидами HBV). Інша популяція, CFSE-слабо мічені, пульсувала з нерелевантним пептидом (наприклад, NS3-пептидами HCV). Об'єднували мічені, оброблені пептидом клітини і використовували в експериментах адаптивних пересадок, в яких проводили проточний аналіз. Об'єднані популяції оброблених, мічених клітин-мішеней вводили двом групам мишей, контрольній групі та імунізованій групі. Спленоцити виділяли від кожної групи мишей, а зразки аналізували на проточному цитометрі. Вимірювали кількість CFSE. Як правило, в таких експериментах утворюється два піки, перший відповідає нерелевантному пептиду; другий відповідає імунізуючому пептиду на піці, що вказує більший CFSE.

[00240] Фігура 33 демонструє, що CD8 Т-клітина, індукована вакцинацією, може специфічно елімінувати клітини-мішені *in vivo*. Результати демонструють, що зразки селезінки й печінки від мишей, що раніше не використовувалися в досліді, містили майже рівні кількості клітин, які були на піках нерелевантного і релевантного пептидів, між тим, як результати показали, що серед імунізованих груп піки клітин, отриманих з селезінки й печінки, пульсуючі з релевантним пептидом, були значно меншими, ніж з нерелевантним пептидом. Ці дані демонструють, що клітини-мішені, оброблені HBV-пептидом, специфічно елімінувались у мишей, імунізованих HBV-вакциною, але не у неімунізованих мишей. Будь-яка елімінація клітин-мішеней, оброблених нерелевантним пептидом, якщо взагалі відбувалася, була такою ж у мишей, імунізованих HBV-вакциною, та неімунізованих мишей і значно нижчою, ніж елімінація клітин-мішеней, оброблених HBV-пептидом.

[00241] Здатність HBV-специфічних CD8 Т-клітин, індукованих після ДНК-імунізації, специфічно елімінувати клітини-мішені *in vivo* досліджувалася додатково. Людські CTL, які мають мішенню коровий антиген, є важливими в сильному кліренсі HBV в порівнянні з хронічною інфекцією. Через один тиждень після фінальної імунізації 4 мишам з кожної групи, імунізованим рVax або рМCore, адапційно пересаджували спленоцити-мішені, які пульсують з HBcAg (релевантний) або HCV-NS3/4A (нерелевантний) пептидами. Коротко, спленоцити від

мишей, що раніше не використовувалися в дослідях (наївні), фарбували або 1 мкМ, або 1 нМ CFDA SE (Invitrogen). Потім мічені спленоцити покривали індикаторними пептидами (1 мкМ) і по 107 клітин з кожної популяції внутрішньовенно вводили наївним або імунізованим мишам. Через 24 або 90 годин, клітини з селезінки і печінки виділяли й аналізували за допомогою проточної цитометрії. Відсоток лізису клітин підраховували наступним чином:  $100 - \left( \frac{(\% \text{ релевантного пептиду, що пульсує в інфікованих клітинах}}{(\% \text{ релевантного пептиду, що пульсує в неінфікованих клітинах}} + \frac{(\% \text{ нерелевантного пептиду, що пульсує в інфікованих клітинах}}{(\% \text{ нерелевантного пептиду, що пульсує в неінфікованих клітинах}}) \times 100 \right)$ . За допомогою селекції на CFSE-мічених спленоцитах, щоб простежити лізис клітин, спостерігалось, що рМCore-вакциновані миші здатні індукувати сильний специфічний лізис антиген-пульсуючих клітин-мішеней, як показано на Фігурі 34. Середній відсоток лізису клітин, що спостерігається в селезінці, склав приблизно 83 %, тим часом, як середній відсоток лізису клітин в печінці склав 76 %, демонструючи, що індуковані вакцинацією CTL, які мігрують і утримуються в печінці, здатні викликати лізис HBV-пептид-пульсуючих клітин-мішеней. Це було перше дослідження для демонстрації індукування HBcAg-специфічних CTL реакцій в печінці за допомогою будь-якого методу і, зокрема, за допомогою системної імунізації. Ці дані свідчать про те, що периферична імунізація може індукувати ефекторні клітини, які можуть мігрувати в печінку і викликати лізис клітини-мішені.

[00242] Фігура 35 показує результати, отримані шляхом аналізу Т-клітинної проліферації з використанням CFSE-мічення. Порівнювали відсоток проліферації клітин CD3+CD4+ і клітин CD3+CD8+, оброблених вектором рVax (контроль) або плазмідною рМCore, яка експресує МCore HBV. Стисло, виділені спленоцити фарбували карбоксифлюоросцеїндіацетатом, сукциніміділовим ефіром (CFDA-SE) Cell Tracer Kit (Invitrogen) згідно з інструкціями виробника. Пофарбовані клітини тричі промивали сольовим розчином і стимулювали рМCore-специфічними пептидами, що перекриваються. Клітини інкубували при 37 °C протягом 96 годин. Через 48 годин, 50 % культурального середовища видаляли й поміщали в свіже R10. На 4 день, клітини збирали і фарбували CD3, CD4 і CD8-специфічними моноклональними антитілами (BD Pharmingen). Клітини фіксували PBS з 1 % параформальдегідом (PFA) і придбаним FACScalibur Becton Dickinson). Дані аналізували, використовуючи програму FlowJo. CFSE низька та CFSE середня популяція були визнані як проліферуючі клітини. Як показано на Фігурі 35, CD3+CD8+Т-клітини, виділені з селезінки, проліферували більше порівняно з CD3+CD8+Т-клітинами.

[00243] Подальші експерименти з аналізом Т-клітинної проліферації також використовували CFSE-мічення. Зокрема, виділені спленоцити фарбували карбоксифлюоросцеїндіацетатом, сукциніміділовим ефіром (CFDA-SE) Cell Tracer Kit (Invitrogen) згідно з інструкціями виробника. Пофарбовані клітини тричі промивали сольовим розчином і засівали в 96-лунковий U-донний планшет в загальному обсязі 200 мкл середовища, що містило HBcAg об'єднаних пептидів в концентрації 1 мкг/мл. Клітини інкубували при 37 °C протягом 96 годин. Через 48 годин, 50 % культурального середовища відбирали й переносили в свіже R10. Різниця в продукуванні цитокінів між CD4 і CD8 Т-клітинами, як описано вище, була порівнянна з їх максимальною проліферативною здатністю. Після 4 днів стимуляції антиген-специфічними пептидами CD8+ Т-клітини, проліферували більше ніж в 2 рази вище, ніж CD4+ клітини (Фігура 36), демонструючи чітке CD8 Т-клітинне зміщення у відповідь.

[00244] На Фігурах 37A і 37B представлені дані ELISA, що демонструють порівняння антитіла до кору HBV в серійному розведенні сироватки від тварин, оброблених вектором рVax (контроль) або плазмідною рМCore, яка експресує МCore HBV. Коротко, високозв'язуючі планшети ELISA (Costar, Corning, NY) покривали 1 мкг/мл білку HBcAg в PBS при 4 °C протягом 24 годин, а потім промивали PBS-Tween і блокували PBS, що містить 1 % BSA, протягом 2 годин при кімнатній температурі. Серійно розведені зразки сироватки додали в лунки та інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання зв'язане антитіло сироватки було виявлене за допомогою HRP-міченого козячого анти-мишачого IgG (Фігура 37A) або IgA (Фігура 37B). Кон'юговані з пероксидазою анттіла були виявлені з використанням тетраметилбензидину (Sigma-Aldrich) як субстрату, а OD при 450 нм була виміряна за допомогою Multiscan ELISA планшет-рідера. Спостерігали антиген-специфічну гуморальну відповідь у сироватках імунізованих мишей.

[00245] Для подальшого вивчення імунної відповіді, індукованої у рМCore-імунізованих мишей, антиген-специфічні IgG та IgA реакції аналізували за допомогою В-клітинного ELISpot, а також в ELISA з використанням спленоцитів і сироваток, відповідно, зібраних після вакцинації. Спленоцити виділяли й очищали, як описано вище. Для ELISA, високозв'язуючі планшети ELISA (Costar, Corning, NY) покривали 1 мкг/мл білку HBcAg в PBS при 4 °C протягом 24 год., а потім промивали 0,1 % PBS-Tween, а потім блокували PBS, що містить 1 % BSA, протягом 2 годин



при кімнатній температурі. Серійно розведені зразки сироватки додали в лунки і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання зв'язане антитіло сироватки було виявлене за допомогою HRP-міченого козячого анти-мишачого IgG або IgA. Кон'юговані з пероксидазою антитіла були виявлені з використанням тетраметилбензидину (Sigma-Aldrich) як субстрату, а OD при 450 нм була виміряна за допомогою Multiscan ELISA планшет-рідера. Високий титр IgG і IgA спостерігався в сироватці імунізованих мишей порівняно з контрольними тваринами (Фігура 38). В-клітинну відповідь, визначену за допомогою ELISpot в імунізованих мишей (Фігура 39) демонструє HBcAg-специфічні IgG і IgA приблизно в 200 SFU і 100 SFU на мільйон клітин, відповідно. Це ілюструє активацію В-клітинного компартменту імунізацією рMCore. Штучна плазмідна HBcAg ефективно індукувала антиген-специфічні клітинні і гуморальні реакції після 3 імунізацій.

[00246] Фігура 40 демонструє відсоток TNF- $\alpha$  і IFN- $\gamma$  з CD4+ і CD8+ клітин селезінки і печінки.

[00247] За відсутності невеликих модельних тварин для HBV HBcAg був використаний для тимчасової трансфекції печінки мишей шляхом гідродинамічної ін'єкції. Печінки імунізованих мишей трансфekteвали рMCore або HCV NS3/4A. Імуногістохімічне фарбування через три дні після трансфекції показало кліренс HBcAg-трансфетованих гепатоцитів порівняно з NS3/4A-трансфетованими гепатоцитами. Рівні ALT в сироватці вимірювали для того, щоб гарантувати, що кліренс, індукований імунізованими мишами, не викликав пошкодження печінки. Результати на Фігурі 41 показали, що кліренс, індукований у імунізованих мишей, не викликав пошкодження печінки.

[00248] Прямка гідродинамічна ін'єкція була також застосована для тимчасової трансфекції печінки мишей. Тут печінки імунізованих або наївних мишей трансфekteвали або рMCore, або нерелевантною плазмідною, що кодує антигени гепатиту С (HCV NS3/4A). Стисло, імунізованим мишам внутрішньовенно вводили 100 мкг плазмід в 2 мл (близько 10 % об'єму ваги миші) розчину Рінгера протягом 7 секунд для тимчасової трансфекції печінки. Експресію або кліренс плазмід визначали шляхом фарбування печінки моноклональними антитілами до НА. Імуногістохімічне фарбування через три дні після трансфекції (Фігура 42) показало кліренс HBcAg-трансфетованих гепатоцитів порівняно з NS3/4A-трансфетованими печінками тварин. CD8 Т-клітини, виділені у мишей, яким гідродинамічно вводився рMCore, показали більш високу частоту IFN- $\gamma$ + CD107a+, маркера дегрануляції, порівняно з імунізованими печінками тварин, трансфетованих нерелевантною плазмідною (Фігура 43).

[00249] Так як кліренс рMCore-трансфетованих гепатоцитів, здається, включає дегрануляцію, вважалось, що лізис клітин може призвести до пошкодження печінки. Щоб дослідити, чи здатні імунізовані миші очищатися від трансфетованих гепатоцитів, не викликаючи значного пошкодження печінки, був використаний аналіз вимірювання активності ферменту аланінамінотрансферази (ALT), щоб вказати на наявність пошкоджень печінки при підвищених рівнях ферменту в сироватці (Фігура 44). Зокрема, активність аланінамінотрансферази (ALT) в сироватці вимірювали з використанням оптичної спектрофотометрії (Stanbio Laboratory), на BioTek Synergy 2 мікропланшет-рідері. Результати представлені у вигляді одиниць на літр (Од./л) і являють собою кількість ферменту, який окислює один мкмоль/л NADH в хвилину. Ці дослідження показали, що питомий кліренс HBcAg-трансфетованих гепатоцитів не підвищує рівні ALT у трансфетованих імунізованих тварин за межі нормального діапазону 5-30 Од./л (Фігура 44).

#### Приклад 2

#### Поверхневі білки HBV

##### 1. Конструювання HBsAg ДНК-вакцини

[00250] Використання консенсусних імуногенів в контексті варіабельних патогенів з сильно мінливими антигенними послідовностями може бути ефективним в індукції більш прямої імунної відповіді на боротьбу з природною вірусною різноманітністю в порівнянні з імунізацією одним природним імуногеном. Вісімдесят дві послідовності великих поверхневих антигенів генотипу А гепатиту і сімдесят послідовностей великих поверхневих антигенів генотипу С гепатиту були зібрані з GenBank, а консенсусні послідовності генотип-специфічних поверхневих антигенів і малих поверхневих антигенів були отримані після виконання кількох вирівнювань. Програмне забезпечення Clustal X (версія 1.8), що використовується для створення декількох вирівнювань, використовували для створення консенсусної послідовності.

[00251] Були одержані ДНК-конструкти, які кодують тільки основний S або preS1/S2 плюс основний S поверхневий білок оболонки HBV з використанням консенсусних послідовностей, що кодують генотипи А або С, які є найбільш поширеними генотипами у світі (Фігура 52A, Фігури 59A-59D). Відмінність між імунними відповідями, викликаними конструктами, які кодують непроцесовані HB або тільки основний S, досліджували з приводу того, як амінокінцевий домен

в preS1 може сприяти вірусному прикріпленню і входженню, тоді як карбоксильнокінцевий preS2 може бути пов'язаний з інфекційністю. Конструкти тільки основного S були названі малими HB (SHB), тоді як плазміди, що містили preS1/S2 були названі великими HB (LHB).

[00252] Консенсусні поверхневі білки HBV були розроблені з епітопними послідовностями з первинних ізолятів генотипу A HBV, так що одержаний консенсусний білок мав ідентичність послідовності, що складала від 94,2 відсотків до 99,8 відсотків, з поверхневими білками первинних ізолятів генотипу A HBV. Зокрема, були розроблені дві версії такого консенсусного білку (Фігура 4 і Фігура 52B). Один включав білок S, також згадується як SHBs-A, в якому послідовність SEQ ID NO: 13 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, а EQ ID NO: 14 являє собою амінокислотну послідовність. Другий включав білок S, pre-S2 і pre-S1, також згадується як LHBs-A, в якому послідовність SEQ ID NO: 9 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, а SEQ ID NO: 10 являє собою амінокислотну послідовність.

[00253] Консенсусні поверхневі білки HBV також були розроблені з епітопних послідовностей первинних ізолятів генотипу C HBV, так що одержаний консенсусний білок мав ідентичність послідовності, що складала від 96,5 відсотків до 99,8 відсотків, з поверхневими білками первинних ізолятів генотипу C HBV. Зокрема, були розроблені дві версії такого консенсусного білку (Фігура 4). Один включав білок S, також згадується як SHBs-C, в якому SEQ ID NO:15 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, а SEQ ID NO:16 10 являє собою амінокислотну послідовність. Другий включав білок S, pre-S2 і pre-S1, також згадується як LHBs-C, в якому SEQ ID NO:11 являє собою послідовність нуклеїнової кислоти, а SEQ ID NO:12 являє собою амінокислотну послідовність.

[00254] Після одержання консенсусних послідовностей великих і малих поверхневих антигенів консенсусних генотипів A або C проводили кодон-оптимізацію і РНК-оптимізацію. Для вказаних вище консенсусних поверхневих антигенів HBV, ендпротеолітичні сайти розщеплення були введені в консенсусні поверхневі антигени HBV для забезпечення належного холдингу білку та кращого процесування антигена (Фігура 3). Використання кодонів в консенсусних поверхневих антигенах HBV було модифіковане для того, щоб усунути кодонне зміщення генів людини. Крім того, вдалось уникнути ділянок з дуже високим (наприклад, більше, ніж 80 відсотків) або дуже низьким (наприклад, менше, ніж 30 відсотків) вмістом GC, де розміщались цис-діючі мотиви, такі як внутрішні ТАТА-боксы, повторні послідовності та структуровані послідовності. Послідовність Козак ввели в консенсусні поверхневі антигени HBV для підвищення ініціації трансляції. Високоєфективну лідерну послідовність IgE додали проти ходу транскрипції стартового кодону для підвищення та збільшення білкової експресії, як описано раніше (Yan et al., Vaccine (2008) 26:5210-5215) (дивись Фігури 3 і 52B). Були синтезовані оптимізовані гени і підтверджені послідовності.

[00255] Консенсусні HBV-поверхневі антигени SHBs-A, LHBs-A, SHBs-C і LHBs-C були клоновані в вектор експресії для одержання конструктів pSHb A (також згадується як pSHb-A), pLHb A (також згадується як pLHb-A), pSHb C (також згадується як pSHb-C) і pLHb C (також згадується як pLHb-C), відповідно (Фігура 4). Синтезовані гени великих і малих поверхневих антигенів генотипу A субклонували у вектор експресії pGX0001 в сайти BamHI і XhoI, тоді як синтезовані гени великих і малих поверхневих антигенів генотипу C субклонували у pGX0001 в сайти EcoRI і NotI. Одержання плазміди HBcAg (pMCore) описане в Прикладі 1.

## 2. Експресія комбінованих ДНК-вакцин HBsAg in vitro

[00256] Клітинні лінії рабдосаркоми (RD) і карциноми печінки людини (Hep G2) трансфікували pLHBs-A, pLHBs-C, pSHBs-A і pSHBs-C, використовуючи TurboFect™ (Thermo Scientific) згідно з інструкціями виробника. Для внутрішньоклітинного аналізу клітини промивали і фіксували, використовуючи Cytofix/Cytoperm kit (BD PharMingen, San Diego, CA) згідно з інструкціями виробника. Після фіксації клітини фарбували сироваткою від імунізованих мишей або мишачим моноклональним антитілом до поверхні вірусу гепатиту B (Abcam, Cambridge, MA). Потім клітини фарбували вторинним анти-мишачим антитілом, кон'югованим з ізотіоціанатом флуоресцеїну (BD Biosciences, San Jose, CA). Клітини промивали і фіксували 2 % параформальдегідом. Пофарбовані і зафіксовані клітини були одержані на пристрої LSR з використанням програмного забезпечення CellQuest (BD Biosciences) і проаналізовані з використанням програмного забезпечення FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

[00257] Після конструювання та оптимізації чотирьох конструктів експресія білку з кожної плазміди була підтверджена внутрішньоклітинним фарбуванням. Клітини RD або Hep G2 тимчасово трансфікували окремими конструктами або пустим вектором pGX0001 як контролем. Клітини фарбували внутрішньоклітинно через 48 годин з допомогою анти-HBsAg поліклональної мишачої виворотки або комерційно придбаного мишачого моноклонального антитіла. Експресія була підтверджена з допомогою проточної цитометрії (Фігура 52C). Підвищені рівні експресії

білку HBs спостерігались в клітинах, трансфектованих кожним конструктом, порівняно з клітинами, трансфектованими пустими векторами (pGX0001).

### Приклад 3

Імуногенність окремих штучних HBsAg ДНК-плазмід в моделях на малих тваринах

[00258] Після дослідження експресії оцінювали здатність окремих плазмід індукувати антиген-специфічні гуморальні і клітинні реакції *in vivo*. Самки мишей Balb/c віком шість – вісім тижнів було придбано у Jackson Laboratories. Тварин утримували згідно з нормами National Institutes of Health and the University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee (IACUC). Мишей Balb/c тричі імунізували внутрішньом'язово (IM) 15 мкг плазмід, які експресують малий або великий S-антиген, або контрольною pGX0001 з 2-тижневим інтервалом в тижні на 0, 2 і 4 тижні. Кожна вакцинація відбувалась одразу після електропорації в ділянці інфекції, як описано вище (Hirao et al., Vaccine (2008) 26:440-448).

[00259] Для імунізації всі ДНК розводили водою без нуклеази (Qiagen, Valencia, CA 91355). Кожна тварина в групі імунізації в цілому отримувала по три внутрішньом'язові імунізації 15 мкг відповідної плазмиди. Для комплексного вивчення кожна тварина отримала в цілому по 45 мкг ДНК в обидва передні великогомілкові (TA) м'язи. Кожна імунізація супроводжувалась електропорацією *in vivo* пристроєм CELLECTRA для адаптивної електропорації постійним струмом (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA). Імпульс постійного струму 0,2 ампер а генерувався через трикутну 3-електродну решітку з електродами з нержавіючої сталі 26 калібру, повністю зануреними у м'яз. Кожен імпульс тривав 52 мілісекунди з 1-секундною затримкою між імпульсами. Індуковані вакциною гуморальні відповіді були розглянуті вперше, оскільки попередні ДНК-вакцини не були здатними викликати виражені гуморальні імунні реакції.

#### 1. Аналіз антитіл з допомогою ELISA

[00260] ELISA проводили з метою аналізу антиген-специфічних реакцій IgG в сироватці, отриманій від мишей через 7 днів після кожної імунізації непроцесованим білком HBsAg в ролі антигена-мішені. Високосв'язуючі планшети ELISA (Costar, Corning, NY) покривали 1 мкг/мл рекомбінантного білку в PBS при 4 °C протягом 24 годин, а потім промивали 0,1 % PBS-Tween і блокували PBS, що містив 1 % BSA, протягом 2 годин при кімнатній температурі. Стерильно розведені зразки виворотки додавали в лунки та інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання зв'язаний IgG виявляли з допомогою HRP-міченого козячого анти-мишачого IgG. Кон'юговані з пероксидазою антитіла виявляли, використовуючи татраметилбензидин (Sigma-Aldrich) як субстрат, а значення OD при 450 нм вимірювали за допомогою Multiscan ELISA планшет-рідера.

[00261] Обидва pLHBs і pSHBs з будь-якого генотипу були високо імуногенними. Додаткова імунізація підвищила ці реакції з реакціями антитіл, демонструючи найбільше підвищення через два тижні після третьої імунізації (Фігура 53A). На противагу цьому, миші, імунізовані лише контрольною pGX0001, демонстрували фоновий рівень реакції IgG. Хоча деякі відмінності в амплітуді реакції IgG спостерігались в кожній групі, але поступове підвищення після кожної імунізації було постійним в межах груп.

#### 2. IFN- $\gamma$ ELISPOT

[00262] Здатність конструктів pLHBs-A, pLHBs-C, pSHBs-A і pSHBs-C індукувати клітинні імунні реакції досліджувалась з допомогою IFN- $\gamma$  ELISPOT. Підбираючи консенсусний кор НерВ, 15-мірні пептиди поверхневого антигену А і поверхневого антигену С синтезували з допомогою Genescript (Piscataway, NJ) і ресуспендували в DMSO та об'єднували в пул при приблизній кінцевій концентрації 1 мкг/мл кожного пептиду. Клітинні реакції вимірювали, використовуючи IFN- $\gamma$  ELISpot (MabTech, Sweden) згідно з інструкціями виробника. Зразки брались в трьох повторностях з R10 (RPMI 1640, що містило L-глутамін з 10 % інактивованої нагріванням фетальної бичачої виворотки і 1 % пеніциліну/стрептоміцину) і контролем PMA/IM (PMA 0,1 мкг/мл та іономіцином 0,5 мкг/мл, Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

[00263] HBsAg-специфічні IFN- $\gamma$  секретуючі клітини проаналізували у відповідь на два пули штучних пептидів, одержаних з консенсусного великого поверхневого білку HBV. Перший пептидний пул містив пептиди, що охоплювали preS1 і preS2 білки, тоді як другий пептидний пул складався з пептидів, які охоплювали основний S-білок. Всі чотири консенсусних конструкти були здатні індукувати сильні реакції Т-клітин, а перехресна імунна реактивність спостерігалась в межах двох генотипів (Фігура 53B). Хоча, разом preS білки майже однакові за розміром з основним S-білком, спостерігалось епітопне зміщення в клітинноопосередкованих імунітетних (CMI) реакціях відносно основного S-білку. Ці результати вказують на те, що штучні ДНК-імуногени, які кодують непроцесований поверхневий антиген або лише основну S-частину поверхневого антигена HBV, демонструють імуногенність, яка є достатньо різноманітною, щоб

націлюватись на основні генотипи HBV. Непроцесовані конструкти не продемонстрували суттєвих відмінностей в індуванні IgG до природного білку HBV порівняно з більш короткими конструктами.

### 3. Картування поверхневих антигенних (15-мірних) пептидів HBV

[00264] Після підтвердження амплітуди СМІ було досліджено рівень клітинних реакцій на генотип- специфічні мішені. Відповідно, проводили серію аналізів інтерферон-гамма ELISPOT проти різних пулів матриксних пептидів два комплекти пептидів. Два набори пептидів, що охоплюють білок LHBs-A або LHBs-C, кожний з яких містить 15 амінокислотних залишків, які перекриваються 8 амінокислотами, були синтезовані з допомогою GenScript (Piscataway, NJ). Для того, щоб відобразити імуно-домінантні епітопи, два комплекти пептидів об'єднали в 16 або 12 пулів великих і малих груп HBsAg відповідно. IFN- $\gamma$  ELISpot аналіз здійснювали, як описано вище. Ці різні комплекти об'єднаних пептидів використовувались в матриксному аналізі для картування епітопів кожного конструкту. Реакції з більше, ніж 50 SFU на мільйон клітин вважались позитивними.

[00265] Ці дані показують, що різні епітопні реакції були викликані цими штучними плазмідами поверхневого антигену у мишей лінії BALB/c. Спостерігались в 12 з 16 позитивних LHBs матриксних пулів у рLHBs-A-імунізованих мишей і 8 з 16 позитивних LHBs-C матриксних пулів у рLHBs-C- імунізованих мишей. Малі плазмідні HBS показали більш високі кількості реакцій з рSHBs-A-імунізованими мишами, відповідаючи на 9 з 12 SHBs-A матриксних пептидів, в той час як рSHBs-C-імунізовані миші демонстрували відповіді на всі матричні пули SHBs-C (Фігура 53C). Ці дані вказують на високий рівень перехресно реактивних клітинних реакцій, викликаних цими 4 HBs-конструктами. В результаті, ці генотип-специфічні консенсусні вакцини можуть бути здатними індукувати перехресно реактивні клітинні реакції проти різних первинних поверхневих антигенних ізолятів, які до 8 % відрізняються від цих генотипів.

#### Приклад 4

Аналіз цитотоксичності і антиген-специфічних CTL, виявлених в печінці та селезінці вакцинованих мишей

[00266] Противірусні ефекторні CD8 Т-клітини індукують цитотоксичність, що являє собою клітинну активність для елімінування HBV-інфікованих гепатоцитів. Здатність конструктів генерувати HBs-специфічні CTL в периферії, що можуть також бути рідними для печінки імунізованих мишей, оцінювали з допомогою аналізу цитотоксичності in vivo. Спленоцити наївних мишей фарбували або 1 мкМ (висока), або 1 нМ (низька) CFDA SE (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Мічені спленоцити потім покривали вказаними пептидами (релевантними або нерелевантними пептидами) (1 мкМ) і по 107 клітинкожної популяції внутрішньовенно вводили наївним або імунізованим мишам. Через 90 годин, виділяли клітини з крові, селезінки або печінки та аналізували з допомогою проточної цитометрії. Відсоток лізису клітин розраховували наступним чином:  $100 - \left( \frac{(\% \text{ релевантного пептиду, який пульсує в інфікованих клітинах} / \% \text{ нерелевантного пептиду, який пульсує в інфікованих клітинах})}{(\% \text{ релевантного пептиду, який пульсує в неінфікованих клітинах} / \% \text{ нерелевантного пептиду, який пульсує в неінфікованих клітинах})} \times 100 \right)$ .

[00267] Міграція HBV-специфічних CTL в печінку має важливе значення для внутрішньо печінкового елімінування інфікованих клітин. Антиген-специфічна елімінація адаптивно пересаджених спленоцитів-мішеней, які пульсували з штучними пептидами HBsAg, не спостерігалась. Середній відсоток лізису клітин-мішеней в селезінці у мишей, імунізованих конструктами SHBs, складав 39 % і 48 % для генотипу А і С, відповідно. Середня елімінація клітин-мішеней для конструктів LHBs складала 35 % для генотипу А і 51 % для генотипу С. Кліренс був сильним, але не настільки потужним, як реакція, що спостерігалась у мишей, які були імунізовані тільки короною Ag-плазмідною, як описано в Прикладі 1, у яких 83 % і 76 % цільовий кліренс був відмічений в селезінці та печінці, відповідно. Демонстрація того, що CTL, генеровані проти HBs, можуть усувати антиген-мішень в печінці, сприяючи тому, щоб вона підтримувала комбінацію HBs і HBc для подальшого розширення клітинної сили та обмеження витоку. Відсоток елімінації клітин-мішеней в печінці склав 45 % і 66 % для SHBs-A і SHBs-C, і 60 % і 74 % в групах LHBs-A і LHBs-C (Фігура 54). Маючи вакциносpezifічний CTL-трафік в печінку, орган, як відомо, пригнічує Т-клітинну відповідь та індукує толерантність, підкреслює ефективність конструктів в стимулюванні функціонального СМІ.

#### Приклад 5

Імуногенність HBsAg-HBcAg ДНК-коктейлю

[00268] Оскільки імунізація кожною штучною HBsAg-плазмідною викликала широкі перехресно реактивні імунні відповіді, то відповіді були розширені за межі поверхневого антигену для подальшого підвищення імуногенності відносно різних антигенів в межах вірусу.

Плазмідні HBs об'єднали з плазмідною, яка кодує HBsAg (pMCore), для створення HBs-HBs ДНК-вакцинних коктейлів для імунізації з метою з'ясування того, чи підвищить коктейль клітинну реакцію шляхом збільшення кількості клітинних епітопів, які Т-клітина буде розпізнавати для елімінування, так як коровий антиген HBV бере участь у вірусному кліренсі через індукцію HBsAg-специфічних CTL реакцій.

[00269] П'ять груп мишей, імунізованих вакцинними коктейлями тільки антигенів HBs або об'єднаних антигенів HBs і HBs. Кожна миша одержала по дві ін'єкції з наступною електропорацією в обох ТА. Мишей імунізували або коктейлями, що містили тільки поверхневі антигени (обох генотипів), або коктейлями, що містили як поверхневі антигени, так і консенсусну плазмідну корового антигену (pMCore), описану в Прикладі 1 (дивись Таблицю 3). Миші, імунізовані тільки HBsAg, генерували високий титр IgG в своїх сироватках. Цікаво, схожі титри спостерігались в групі SHBs-pMCore, проте були менш сильними в групі коктейлів LHBs-pMCore (Фігура 55A). Збільшення антигену-мішені, можливо, викликало деяке інгібування антитіл.

Таблиця 3

Імунізаційні групи мишей для дослідження ДНК-коктейлів HBs-HBs.

| групи мишей | ДНК-коктейль           |
|-------------|------------------------|
| Група 1     | лише pGX0001           |
| Група 2     | pLHBs-A/pLHBs-C        |
| Група 3     | pSHBs-A/pSHBs-C        |
| Група 4     | pLHBs-A/pLHBs-C/pMCore |
| Група 5     | pSHBs-A/pSHBs-C/pMCore |

[00270] Для подальшого вивчення імунної відповіді, індукованої HBs-HBs-імунізованими мишами, оцінювали продукування IFN- $\gamma$  у кожній імунізованій групі. Середня кількість SFU на мільйон спленоцитів для груп, які не мали pMCore, склала 689 і 666 для генотипу A і 1160 і 1312 проти пептидів генотипу C, відповідно. Крім того, додавання pMCore в середньому збільшувало загальну кількість SFU на мільйон спленоцитів на 400 точок проти генотипу C і в два рази реакцію, коли спленоцити стимулювали пептидами генотипу A (Фігура 55B).

[00271] CD8 Т-клітини, як відомо, є основними ефекторними клітинами, відповідальними за кліренс HBV. Важливо визначити, який тип Т-клітин є причиною спостережуваного продукування IFN- $\gamma$  і вивчити, чи можуть ці Т-клітини індукувати декілька протівірусних функцій у відповідь на антигенне повторне зіткнення, вивільняючи інші протівірусні цитокіни, такі як TNF- $\alpha$  і IL-2 і маркери де грануляції, такі як CD107a. Здатність CD8 Т-клітин від імунізованих мишей індукувати ці цитокіни і маркери оцінювали після стимуляції ex vivo придатними пептидами. Проточний аналіз з різними барвниками показав, що значний відсоток CD8 Т-клітин з кожної групи були поліфункціональними (тобто продукувалось декілька цитокінів), активовані CD8 Т-клітини у всіх групах (Фігури 56A-F). Також спостерігалась антиген-специфічна індукція маркера лімфоцитної дегрануляції, CD107a, в цих CD8 Т-клітинах. CD8 Т-клітини з групи коктейлів HBs-HBs показали високу полі функціональну активність при стимуляції пептидом поверхневого антигену, що підтверджує синергійний ефект в CD8 Т-клітинних протівірусних цитокінах, таких як IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  і IL-2, і маркера дегрануляції, CD107a. Також спостерігалась індукція CTL через кліренс пересаджених антигенопульсуючих клітин. В той час як спостерігалось зменшення відповідей антитіл до HBs для коктейлів, включаючи конструкти LHBs, коктейлі вакцин SHBs-pMCore підтримували гуморальні відповіді, виявлені у тварин, імунізованих тільки SHBs.

#### Приклад 6

Імунізація макак-резус коктейлем, що індукує сильні клітинні HBs- і HBs-специфічні і гуморальні HBs-специфічні імунні реакції

[00272] Ефективність ДНК-вакцини попередніх ДНК-конструктів була послідовно слабкою у великих тварин і людей. Сильні відповіді антитіл і Т-клітинні відповіді, стимульовані комбінацією pLHBs або pSHBs і pMCore у мишей, приводять до оцінки імуногенності цих конструктів в моделі приматів крім людини (NHP), які більш точно імітують імунну відповідь людини. Ця перепона для імуногенності вакцини як більшого розміру та аутбредної МНС-популяції NHP, як правило, приводить до зниження або відсутності імуногенності порівняно з мишиними моделями. Для цих досліджень IL-12, Th-1-провідний цитокін, був доданий для аналізу. Було показано, що IL-12 приводить СМІ, сприяючи примірюванню та експансії CD8 Т-клітин, при додаванні до імунізації як ад'юванта для підсилення імунної відповіді проти різних антигенів з різних патогенів. Цей ад'ювант збільшує Т-клітинні відповіді ДНК-вакцини у мишей, макак та людини.

1. Вакцинація

[00273] П'ятнадцять індійських макак-резусів були поміщені в Bioqual (Rockville, MD) відповідно до стандартів Американської асоціації по акредитації в галузі лабораторних тварин. Резус-макаки були розділені на групи, причому кожна група складалась з 5 мавп. Дивись Таблицю 4.

Таблиця 4

Групи імунізації приматів крім людини

| групи мавп | ДНК-коктейль                 |
|------------|------------------------------|
| група А    | pSHBs-A/pSHBs-C/pMCore       |
| група В    | pLHBs-A/pLHBs-C/pMCore       |
| група С    | pLHBs-A/pLHBs-C/pMCore+IL-12 |

[00274] Одній групі шляхом внутрішньом'язової (IM) доставки (також відомої як електропорація in vivo) вводили вакцину, що містила 1,0 мг кожного з конструктів pMCore, pSHb A і pSHb C; цю групу назвали "малою" групою. Другій групі вводили шляхом IM доставки вакцину, яка містила 1,0 мг кожного з конструктів pMCore, pLHb A і pLHb C; цю групу назвали "довгою" групою. Третій групі вводили шляхом IM доставки вакцину, що містила по 1,0 мг кожного з конструктів pMCore, pLHb A і pLHb C і 0,4 мг prhIL-12 (плазмід, яка експресує оптимізований резус IL-12); цю групу назвали "довгою+IL-12" або "pLHBs+12" групою. Конструкт prhIL-12 кодує білок IL-12 макака-резус. ДНК була доставлена до одичного сайту в чотириголовому м'язі з наступною EP in vivo з допомогою пристрою постійного струму CELLECTRA® (Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA) 3 імпульсами при 0,5 А постійного струму, тривалість імпульсу 52 мс та 1 с відпочинку між імпульсами. Тварин вакцинували в тижні 0, 4, 12 і 30.

2. Вибір проб

[00275] Зразки брали у мавп перед імунізацією в тиждень 0, а також після кожної імунізації (тобто після тижнів 0, 4 і 12). У тварин брали кров через 2 тижні після кожної імунізації. Кров (20 мл в кожний момент часу) збирали в пробірки з EDTA, а PBMC виділяли із застосуванням стандартної процедури фіколл-гіпак з пробірками Accuspin (Sigma-Aldrich). Додаткові 5 мл крові збирали в пробірки для відділення плазми, а сироватку ділили на аліквоти для аналізу.

[00276] Реакції з високим титром антитіл проти HBsAg спостерігались після двох імунізацій pSHBs/pMCore, але не з pLHBs/pMCore. Ця відповідь була співставною з даними мишачого антитіла на Фігурі 55A. Відповідь на pLHBs/pMCore піднялась після третьої імунізації. Ад'ювант IL-12 підвищив титр антитіл імунізації коктейлем pLHBs/pMCore вже після всього лишень двох імунізацій (Фігура 57A).

[00277] Клітинні імунні реакції від PBMC показують практично повну відсутність HBs або HBC-специфічних відповідей після першої імунізації. Проте, відповіді спостерігались після другою імунізації та збільшувались після кожної наступної імунізації. Сильні відповіді вище 2000 SFU на мільйон PBMC спостерігались у всіх групах після третьої імунізації і в значній мірі були направлені проти корового антигену. Додавання ад'юванта IL-12 підсилювало амплітуду Т-клітинної відповіді 1000 SFU на мільйон PBMC у порівнянні з тільки коктейлем pLHBs/pMCore (Фігура 57B). Для подальшого визначення широти клітинної відповіді були створені матриксні пули консенсусних корових пептидів для визначення кількості можливих епітопів. Реакції Т-клітин охопили декілька пептидних пулів з середньою відповіддю на 12 пептидних епітопів (Фігура 57C). Ці відповіді співпадають з отриманими раніше, як показано на малих модельних тваринах. Ці результати дозволяють припустити, що коктейлі здатні індукувати клітинну відповідь з сильною амплітудою і шириною, і що амплітуда цих відповідей може бути розширена шляхом додавання IL-12.

[00278] На Фігурах 45-48 показані клітинні імунні реакції, викликані вакцинами, введеними введений в малій, довгій і довгій+IL-12 групах. Аналіз імуноферментних плям (ELISPOT) був використаний для визначення клітинної імунної відповіді, як описано вище в Прикладі 1. Як показано на Фігурах 45-48 Т-клітинна відповідь підвищувалась із кожною вакцинацією. Проте коровий антиген HBV був більш імуногенним, ніж HBV-поверхневий антиген А і HBV-поверхневий антиген С. Ці дані також показують, що більш довгий консенсусний поверхневий антиген HBV (тобто включає білок S, preS2 і preS1) є імуногенним як малий поверхневий антиген HBV (тобто включає білок S).

[00279] Подібно Фігурам 45-48, на Фігурі 49 показані клітинні імунні відповіді, викликані

вакцинами, введеними в малих, довгих і довга+IL-12 групах, як виміряно з допомогою аналізу ELISPOT, крім того були досліджені різні пули пептидів, що охоплюють коровий антиген, поверхневий антиген А і поверхневий антиген С. Знову ж таки, відповідь Т-клітин підвищувалась з кожною вакцинацією, додавання IL-12 посилювало клітинну імунну відповідь, а довгі і короткі консенсусні поверхневі антигени HBV були аналогічно імуногенними.

[00280] На Фігурі 50 показані дані ELISA, які порівнюють відповіді антитіл проти HBV для малих, довгих і довга +IL-12 груп. ELISA здійснювали як описано вище в Прикладі 1. Спостерігалися антиген-специфічні гуморальні реакції в сироватці, одержаній від імунізованих мавп. Зокрема, вакцини, що включають довгий консенсусний поверхневий антиген (тобто S-білок, preS2 і preS1) мають кращу реакцію антитіла, що може бути через додаткові епітопи, присутні у вакцині.

[00281] На Фігурі 51 показані дані ELISA, які порівнюють відповіді антитіл проти HBV для групи довга + IL-12 до імунізації (prevac) і після імунізації в тиждень 0, тиждень 4 і тиждень 12 (тобто після 1-ї, після 2-ї і після третьої імунізації, відповідно). ELISA проводили, як описано вище в Прикладі 1. Дані на Фігурі 51 показують, що дві імунізації або дози необхідні для вимірного продукування антитіл. Крім того, значне підвищення відповіді антитіла до HBV спостерігали після третьої імунізації або дози.

#### Приклад 7

[00282] Як і в експериментах з мишами в Прикладі 5, спленоцити, тобто CD8 і CD4 Т-клітини, були виділені від імунізованих макак резус в Прикладі 6 для дослідження рівнів INF- $\gamma$  і секреції TNF- $\alpha$  у відповідь на введення комбінації консенсусних корових і консенсусних поверхневих антигенів. CD8 і CD4 Т-клітини були вивчені за допомогою поліфункціонального і фенотипового проточного аналізу, щоб вивчити секрецію фактора некрозу пухлини, гамма-інтерферону і CD107a з цих CD8 і CD4 Т-клітин, щоб визначити, чи мають CD8 і CD4 Т-клітини імунізованих мавп з Прикладу 6 подібні характеристики з мишачими CD8 і CD4 Т-клітинами, вивченими в Прикладі 1.

[00283] Для подальшого визначення функції клітинної імунної відповіді, внутрішньоклітинне фарбування протівірусних цитокінів проводили після стимуляції корових і поверхневих антигенів з генотипів А і С. Внутрішньоклітинне фарбування антитілами до протівірусних цитокінів показало, що антиген-специфічне продукування протівірусних цитокінів (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  і IL-2) індукувалось в обох CD4 та CD8 Т-клітинах від імунізованих мавп. Фігура 57D показує, що після трьох імунізацій спостерігалися HBV-специфічні CD4 і CD8 Т-клітинні реакції. Подібно результатам, показаним в INF- $\gamma$  ELISpot, відповіді проти корового антигену домінували. Додавання IL-12 посилювало загальну амплітуду відгуку, однак, як очікувалось, цей ефект був більш вираженим для CD8 Т-клітин. Індукція як CD4, так і CD8 відповідей, яка становить у середньому 1 %, припускає індукцію широкої імунної відповіді, що складається з Th1 і Th2 імунітету і є сильною ознакою для просування цієї стратегії у випробуваннях на людях.

[00284] Антитіла і Т-клітинні відповіді на антигени HBs і HBc були аналогічні результатам, отриманим для мишей в Прикладі 5. Ці відповіді були ще більш вражаючими, коли IL-12, Th1 поляризаційний цитокіновий ад'ювант був доданий в коктейль rLHBs-rMCore. Схоже, що rLHBs-rMCore+IL-12 рецептура була досить ефективною як краща комбінація. Слід зазначити, що жоден вакцинний препарат не призвів до підвищення параметрів, пов'язаних з пошкодженням печінки.

#### Приклад 8

Аналіз функції печінки у нелюдиноподібних приматів після вакцинації з використанням панелей для хімічного аналізу крові з печінки

[00285] Оскільки клінічні дослідження пацієнтів, активно інфікованих HBV, припустили можливість того, що Т-клітинна відповідь може бути пов'язана з патологією печінки протягом хвороби, то проводили попередній аналіз загальної безпеки цих полівалентних вакцин відносно функції печінки. Для того щоб дослідити функцію печінки, були проаналізовані рівні лужної фосфатази, аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази і загального білірубину в сироватці вакцинованих тварин до імунізації, після третьої вакцинації і безпосередньо перед четвертою вакцинацією і після четвертої вакцинації. Панелі для хімічного аналізу крові постачались IDEXX Laboratories і містили лужну фосфатазу, аланінамінотрансферазу, аспартатамінотрансферазу та загальний білірубін. Результати цього аналізу показані на Фігурі 58. Відсутність підвищення лужної фосфатази, аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази і загального білірубину в тестах на функцію печінки до, під час і після завершення періоду імунізації припускає, що індукція HBV-специфічної імунної відповіді не викликала значної шкоди печінці вакцинованих тварин.

[00286] Взяті разом, ці дані підтверджують, що введення цього штучного ДНК-вакцинного

коктейлю, який кодує сконструйовані антигени HBV, в комбінації зі специфічною електропорацією призводить до сильних і різноманітних клітинних і гуморальних реакцій у мишей і NHP, уникаючи при цьому відчутної токсичності.

5 [00287] Зрозуміло, що наведений вище докладний опис і супроводжуючі приклади є тільки ілюстративними і не повинні розглядатися як обмежуючі обсяг винаходу, що визначений виключно доданою формулою винаходу і її еквівалентами.

10 [00288] Різні зміни і модифікації розкритих варіантів здійснення будуть очевидні фахівцям в даній галузі техніки. Такі зміни і модифікації, в тому числі, без обмеження, що стосуються хімічної структури, замісників, похідних, проміжних сполук, композицій, складів або способів використання винаходу, можуть бути зроблені без відступу від сутності і обсягу винаходу.



ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

<120> МОЛЕКУЛИ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ, ЩО КОДУЮТЬ КОРОВИЙ БІЛОК ВІРУСУ  
ГЕПАТИТУ В І ПОВЕРХНЕВИЙ АНТИГЕННИЙ БІЛОК, ТАК ВАКЦИНА, ЩО ЇХ МІСТИТЬ

<130> UPVG0037 WO2

<140> PCT/US13/60618  
<141> 2013-09-19

<150> US 13/622,965  
<151> 2012-09-19

<160> 21

<170> Патентна версія 3.5

<210> 1  
<211> 552  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність нуклеїнової кислоти M-core

<220>  
<221> інші характеристики  
<222> (1)..(3)  
<223> n являє собою a, c, g або t

<400> 1  
nnngacatcg acccctacaa agaattcggc gccaccgtgg aactgctgag ctctctgccc  
60  
agcgacttct tcccctccgt gcgggacctg ctggataccg ccagcgccct gtacagagag  
120  
gccctggaaa gccccgagca ctgcagccct caccacacag ccctgcggca ggccatcctg  
180  
tgctggggcg agctgatgac cctggccacc tgggtcggaa gcaacctgga agatcccgcc  
240  
agccgggacc tgggtggtgc ctacgtgaac accaacadgg gcctgaagat ccggcagctg  
300

ctgtggttcc acatctcctg cctgaccttc ggccgggaaa ccgtgctgga atacctggtg  
360

tccttcggcg tgtggatcag aacccccctt gcctacagac cccccaacgc ccctatcctg  
420

agcaccctgc ccgagacaac cgtgggtccgc agacggggca gaagccccag aagaagaacc  
480

cccagcccta gacggcggag atctcagagc cccaggcgga gaagatccca gagccgcgag  
540

agccagtget ga  
552

<210> 2

<211> 183

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність M-Core

<220>

<221> інші характеристики

<222> (1)..(1)

<223> Xaa може бути природною амінокислотою

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
180

<210> 3

<211> 603

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> послідовність нуклеїнової кислоти IgE лідера - M-Core

<400> 3

atggactgga cctggattct gttcctggtg gccgctgcc caagggtgca cagcgacatc  
60

gacccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttcctgcc cagcgacttc  
120

ttccccctcg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa  
180

agccccgagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctggggc  
240

gagctgatga ccctggccac ctgggtcgga agcaacctgg aagatcccgc cagccgggac  
300

ctgggtggtgt cctacgtgaa caccaacatg ggccctgaaga tccggcagct gctgtggttc  
360

cacatctcct gctgacctt cggccgggaa accgtgctgg aatacctggg gtccttcggc  
420

gtgtggatca gaaccccccc tgcctacaga ccccccaacg cccctatcct gagcaccctg  
480

cccagagaaa ccgtgggtccg cagacggggc agaagcccca gaagaagaac ccccagccct  
540

agacggcgga gatctcagag ccccaggcgg agaagatccc agagccgcga gagccagtgc  
600

tga  
603

<210> 4

<211> 200

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність IgE лідера - M-Core

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys  
195 200

<210> 5

<211> 630

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> послідовність нуклеїнової кислоти IgE лідера - M-Core + HA Tag

<400> 5

atggactgga cctggattct gttcctgggtg gcgctgcca caagggtgca cagcgacatc  
60

gaccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttctgcc cagcgacttc  
120

ttccctccg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa  
180

agccccgagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctggggc  
240

gagctgatga ccctggccac ctgggtcgga agcaacctgg aagatcccgc cagccgggac  
300

ctgggtggtg cctacgtgaa caccaacatg ggctgaaga tccggcagct gctgtggttc  
360

cacatctcct gcctgacctt cggccgggaa accgtgctgg aatacctggt gtccttcggc  
420

gtgtggatca gaaccccccc tgctacaga ccccccaacg cccctatcct gagcacctg  
480

cccagagacaa ccgtgggtccg cagacggggc agaagcccca gaagaagaac cccagccct  
540

agacggcgga gatctcagag cccagggcg agaagatccc agagccgcga gagccagtgc  
600

taccctacg acgtgccga ctacgcctga  
630

<210> 6

<211> 209

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> амінокислотна послідовність IgE лідера - M-Core + HA Tag

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala

<210> 7  
<211> 18  
<212> білок  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> IgE лідерна амінокислотна послідовність

<400> 7

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

His Ser

<210> 8  
<211> 9  
<212> білок  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> амінокислотна послідовність НА-мітки

<400> 8

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1

5

<210> 9  
 <211> 1317  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> штучна (LHBs-A)

<400> 9  
 ggatccgccca ccatggattg gacttggatt ctgttcctgg tcgccgctgc tacacgggtg  
 60

cattcagggg gctggtcttc aaaacctaga aaaggcatgg gcaccaacct gagcgtgccc  
 120

aatcctctgg ggttctttcc agaccaccag ctggaccccg ctttcggcgc aaactccaac  
 180

aatcctgact gggacttcaa cccaatcaaa gaccactggc cagcagctaa ccaagtggga  
 240

gtcggagctt tcggaccagg actgactccc cctcatggcg ggattctggg ctggtctccc  
 300

caggctcagg gcatcctgac cacagtgagc actattccac cccctgcaag caccaacagg  
 360

cagtccggac gccagccaac cccaatctca ccacccctgc gagacagcca cctcagggc  
 420

agaggcagga aacggagatc tatgcagtgg aatagtacag ccttccatca ggctctgcag  
 480

gacccccggg tgcggggact gtactttcca gccggaggca gtcctctctg cactgtcaac  
 540

cctgcaccaa atatcgctc ccacatcagt tcaatttctg ctggaactgg agaccccgctg  
 600

accaaccggg gcagaaagag gcgcagtatg gagaatatta cctcagggtt cctgggacct  
 660

ctgctggtcc tgcaggcagg cttctttctg ctgaccogca toctgacaat toctcagtca  
 720

ctggatagct ggtggaccag cctgaacttc ctgggcggca gcccctgtg cctgggacag  
 780

aactctcaga gtcttacctc caatcattct ccaacaagtt gtctccaat ctgccaggc  
 840



tacagatgga tgtgcctgcg acggttcac acccttctgt ttatcctgct gctgtgcctg  
900

atctttctgc tgggtgctgt ggactatcag ggcattgctg cagtctgccc cctgattcct  
960

gggtccacta ccacatctac aggacctgt aagacttgca ctacctctgc ccagggggaac  
1020

agtatgtttc catcatgctg ttgcacaaaa cccactgatg gaaattgtac atgcatcccc  
1080

attcctagct cctgggcatt cgccaagtat ctgtgggaat gggcaagcgt gaggttttca  
1140

tggctgagcc tctgtgtgcc ctctgtccag tggtttgtgg gactgagccc taccgtctgg  
1200

ctgtccgcca tctggatgat gtggtactgg gggcccagcc tgtattcaat cgtgtctcca  
1260

ttcatcccc tgctgccaat cttcttttct ctgtgggtct acatttgata actcgag  
1317

<210> 10

<211> 431

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна (LHBS-A)

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Asn Ile Ala Ser His Ile Ser Ser Ile Ser Ala Arg Thr  
180 185 190

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

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

Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp  
225 230 235 240

Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln  
245 250 255

Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro  
260 265 270

Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe  
275 280 285

Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp

|                                                                 |     |     |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|---------|
| 290                                                             |     | 295 |     | 300     |
| Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr |     |     |     |         |
| 305                                                             |     | 310 |     | 315 320 |
| Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn |     |     |     |         |
|                                                                 | 325 |     | 330 | 335     |
| Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys |     |     |     |         |
|                                                                 | 340 |     | 345 | 350     |
| Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp |     |     |     |         |
|                                                                 | 355 |     | 360 | 365     |
| Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe |     |     |     |         |
|                                                                 | 370 |     | 375 | 380     |
| Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile |     |     |     |         |
|                                                                 | 385 |     | 390 | 395 400 |
| Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro |     |     |     |         |
|                                                                 | 405 |     | 410 | 415     |
| Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile     |     |     |     |         |
|                                                                 | 420 |     | 425 | 430     |

<210> 11  
 <211> 1319  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> штучна (LHBS-C)

<400> 11  
 gaattcgcca ccatggattg gacatggatt ctgtttctgg tcgccgccgc aaccgcgtg  
 60  
 cactcagggg gatggtcac aaaacctaga caggaatgg gcactaacct gagtgtgcc  
 120  
 aatcctctgg ggttctttcc cgaccaccag ctggatctg ccttcggcgc taactctaac  
 180

aatccagact gggacttcaa cccaataag gaccactggc ctgaggcaaa tcaagtggga  
240

gcaggagcct tcggaccagg ctttacaccc cctcatggcg gactgctggg atgggtcccct  
300

caggctcagg ggatcctgac cacagtccca gcagctccac ccctgcaag tactaacagg  
360

cagtcaggac gccagccaac cccattttct ccaccctga gggacagtca ccctcaggcc  
420

agaggcagga agcggagaag catgcagtgg aacagcacta cttccatca ggcactgctg  
480

gatccacgcg tgcgaggact gtactttcca gccggaggca gctcctctgg aaccgtgaac  
540

cctgtcccaa caactgctc cccaatcagt tcaattttct ctggacagg agaccccgct  
600

cctaatacggg gcagaaaaag gcgctcaatg gaaagcacca catccgggtt tctgggacca  
660

ctgctgggtgc tgcaggcagg cttctttctg ctgaccagaa toctgacaat tccccagctc  
720

ctggatagtt ggtggaccag cctgaacttc ctgggcggcg ccctacttg tccaggacag  
780

aactctcaga gtccaacatc aaatcatagc ccacttcct gtccccaat ctgccctggc  
840

taccgctgga tgtgcctgcg acggttcac cttttcctgt ttatcctgct gctgtgcctg  
900

atttttctgc tgggtgctgct ggactatcag ggaatgctgc ccgtctgcc tctgctgcca  
960

gggacttcta ctaccagtac cggaccttgt aagacatgca ctattccagc tcaggggacc  
1020

tccatgttcc cctcttgctg ttgcacaaa cctagcgatg gaaattgtac atgcatccca  
1080

attcccagct cctgggcttt cgcacgattt ctgtgggagt gggccagcgt gcgcttttca  
1140

tggctgagcc tgctgggtgcc cttcgtccag tggtttctcg gcctgtcacc taccgtgtgg  
1200

ctgagcgtca tctggatgat gtggtactgg gggcccagcc tgtataatat cctgtcacca  
1260

ttcctgccac tgctgccaat cttcttttgt ctgtgggtct acatttgata agcggccgc  
1319

<210> 12  
<211> 431  
<212> білок  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> штучна (LHBS-C)

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile  
385 390 395 400

Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro  
405 410 415

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

<210> 13  
<211> 753  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> штучна (SHBs-A)

<400> 13  
ggatccgcca ccatggactg gacctggatt ctgttctctg tggctgccgc tacacgggtg  
60

cattctgaaa atatcacatc tggattctctg ggacctctgc tggctgctgca ggctgggttc  
120

tttctgctga caagaatcct gactattccc cagtcactgg acagctgggtg gacatctctg  
180

aacttctctg gcgggagtcc tgtctgtctg ggacagaact ctcagagtcc tacttccaat  
240

cactctccaa ccagttgtcc cctatctctg ccaggctacc gctggatgtg cctgcggaga  
300

ttcatcattt tctgttttat cctgctgctg tgcttgattt ttctgctggt gctgctggac  
360

tatcagggca tgctgcctgt ctgcccactg attcccggca gcaccacaac ttctaccggc  
420

ccctgtaaga catgcaccac acctgcccag gggaacagta tgtttccatc atgctgttgc  
480

actaaaccca ccgatggaaa ttgtacatgc atcccaattc ccagctcctg ggccttcgct  
540

aagtacctgt gggagtgggc aagcgtgcga ttttcatggc tgagcctgct ggtgcctttc  
600

gtccagtggg ttgtgggcct gagcccaact gtctggctgt ccgccatctg gatgatgtgg  
660

tactgggggc ccagcctgta ttccatcgtg tcaccattca ttccctgtgt gccaatcttt  
720

ttctgcctgt gggctacat ctgataactc gag  
753

<210> 14

<211> 243

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна (SHBs-A)

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Val Tyr Ile

<210> 15  
<211> 755  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> штучна (SHBs-C)

<400> 15  
gaattcgcca ccatggattg gacatggatt ctgttctctgg tcgccgccgc aacacgagtg  
60

cattctgaaa gtacaacctc tggcttctctg ggccccctgc tgggtgctgca ggcagggttc  
120

tttctgctga cacgaatcct gactattcca cagtcactgg acagctggtg gaccagcctg  
180

aacttctctg gcggggcccc tacatgtcca ggacagaact ctcagagtcc cacttccaat  
240

cactctccta ccagttgtcc ccctatctgc cccggctaca gatggatgtg cctgcggaga  
300

ttcatcattt tctgtttat cctgctgctg tgctgattt ttctgctggt gctgctggac  
360

tatcagggaa tgctgcccgt ctgccctctg ctgccaggaa cctcaaccac aagcacaggc  
420

ccttgaaga cttgcaccat tccgctcag gggactagta tgttcccttc atgctgttgc  
480

acaaaacccat ctgatggaaa ttgtacttgc atcccaattc ccagctcctg ggccctcctc  
540

aggtttctgt gggagtgggc cagtgtgcgc ttttctggc tgtctctgct ggtgcccttc  
600

gtccagtggg ttgtcggcct gagccctaca gtgtggctgt ccgtcatctg gatgatgtgg  
660

tactgggggc ctgacctgta taatatctg tcaccatttc tgccactgct gccaatcttc  
720

ttttgcctgt gggctctacat ctgataagcg gccgc  
755

<210> 16

<211> 243

<212> білок

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна (SHBs-C)

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Ile

<210> 17  
<211> 3585  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

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

<400> 17

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta  
 60  
 atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata  
 120  
 acttacggta aatggcccg ctaggtgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat  
 180  
 aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga  
 240  
 ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc  
 300  
 ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcttgcat tatgccagt acatgacctt  
 360  
 atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat  
 420  
 gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag  
 480  
 tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc  
 540  
 aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga  
 600  
 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacco actgcttact ggcttatcga  
 660  
 aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggc  
 720  
 accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggatcc tgttcttggg ggccgctgcc  
 780  
 acaaggggtc acagcgacat cgacccctac aaagaattcg gcgccaccgt ggaactgctg  
 840  
 agcttctctg ccagcgactt cttccctctc gtgcgggacc tgctggatac cgccagcgcc  
 900  
 ctgtacagag aggccctgga aagccccgag cactgcagcc ctcaccacac agccctgcgg  
 960  
 caggccatcc tgtgctgggg cgagctgatg acctggcca cctgggtcgg aagcaacctg  
 1020  
 gaagatcccc ccagccggga cctggtggtg tctacgtga acaccaacat gggcctgaag  
 1080

atccggcagc tgetgtggtt ccacatctcc tgccctgacct tcggccggga aaccgtgctg  
1140

gaataacctgg tgtccctcgg cgtgtggatc agaaccccc ctgcctacag accccccaac  
1200

gcccctatcc tgagcacctt gcccagagaca accgtgggtc gcagacgggg cagaagcccc  
1260

agaagaagaa cccccagccc tagacggcgg agatctcaga gcccaggcg gagaagatcc  
1320

cagagccgcg agagccagtg ctaccctac gacgtgcccg actacgcctg actcgagtct  
1380

agagggcccg tttaaaccgg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct  
1440

gttgtttgcc cctccccgtt gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt  
1500

tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcac tgtctgagta ggtgtcatc tattctgggg  
1560

ggtggggtgg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg  
1620

gatgcggtgg gctctatggc ttctactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat  
1680

tgccagctgg ggcgcctctt ggtaagggtg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt  
1740

tctgcgcgcc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagctc tgatcaagag acaggatgag  
1800

gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg  
1860

agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt  
1920

tccggctgtc agcgcagggg cgcgcgggtt tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc  
1980

tgaatgaact gcaagacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt  
2040

gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag  
2100

tgccggggca ggatctcctg tcattctacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg  
2160

ctgatgcaat gcggcggtg catagcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag  
2220

cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg  
2280

atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcga  
2340

gcatgcccga cggcgaggat ctcgctgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca  
2400

tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc  
2460

gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg  
2520

ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttgcgagcgc atcgcttct  
2580

atcgcttct tgacgagttc ttctgaatta ttaacgtta caatttcctg atgcgggtatt  
2640

ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcataca ggtggcaact ttcggggaaa  
2700

tgtgcgcgga acccctatct gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat  
2760

gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atagcacgtg ctaaaacttc atttttaatt  
2820

taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga  
2880

gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc  
2940

ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt  
3000

ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc  
3060

gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc  
3120

tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg  
3180

cgataagtcg tgtcttaccg gggtggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg  
3240

gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga  
3300

actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc  
3360

ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg  
3420

gggaaacgcc tggatatctt atagtctctg cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg  
3480

atTTTTgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt  
3540

tttacgggtc ctgggctttt gctggccttt tgctcacatg ttctt  
3585

<210> 18

<211> 4254

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна (pGX1802 HepB pLHBs-A)

<400> 18

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta  
60

atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata  
120

acttacggta aatggcccg cttggctgacc gcccaacgac cccgcccatt tgacgtcaat  
180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga  
240

ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc  
300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt  
360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat  
420

gcgggttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag  
480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc  
540

aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacggtggga  
 600  
 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacct actgcttact ggcttatcga  
 660  
 aattaatacg actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttggt  
 720  
 accgagctcg gatccgccac catggattgg acttggaattc tgttcctggt cgccgctgct  
 780  
 acacgggtgc attcaggggg ctggtcttca aaacctagaa aaggcatggg caccaacctg  
 840  
 agcgtgcca atcctctggg gttctttcca gaccaccagc tggaccccg cttcggcgca  
 900  
 aactccaaca atcctgactg ggaattcaac ccaatcaaag accactggcc agcagctaac  
 960  
 caagtgggag tcggagcttt cggaccagga ctgactcccc ctcatggcgg gattctgggc  
 1020  
 tggctctccc aggctcaggg catcctgacc acagttagca ctattccacc ccctgcaagc  
 1080  
 accaacaggc agtccggacg ccagccaacc ccaatctcac caccctgcg agacagccac  
 1140  
 cctcaggcca gaggcaggaa acggagatct atgcagtgga atagtacagc cttccatcag  
 1200  
 gctctgcagg accccgggt ggggggactg tactttccag ccggaggcag ctctctggc  
 1260  
 actgtcaacc ctgcacaaa tatcgctcc cacatcagtt caatttctgc tcgaactgga  
 1320  
 gaccccgta ccaaccgggg cagaaagagg cgcagtatgg agaattattac ctgagggttc  
 1380  
 ctgggacctc tgctggctct gcaggcaggc ttctttctgc tgacccgcat cctgacaatt  
 1440  
 cctcagtcac tggatagctg gtggaccagc ctgaacttcc tgggcggcag ccccggtgac  
 1500  
 ctgggacaga actctcagag tcctacctcc aatcattctc caacaagttg tcctccaatc  
 1560  
 tgcccaggct acagatggat gtgcctgcga cggttcatca ttttctggt tctctgctg  
 1620



ctgtgcctga tttttctgct ggtgctgctg gactatcagg gcatgctgcc agtctgcccc  
1680

ctgattcctg ggtccactac cacatctaca ggaccctgta agacttgacac taccctgccc  
1740

caggggaaca gtatgtttcc atcatgctgt tgcacaaaac ccactgatgg aaattgtaca  
1800

tgcacccca ttctagctc ctgggcatte gccagtatc tgtgggaatg ggcaagcgtg  
1860

aggttttcat ggctgagcct gctggtgccc ttctgcccagt ggtttggtgg actgagccct  
1920

accgtctggc tgtccgccat ctggatgatg tggtagtggg ggcccagcct gtattcaatc  
1980

gtgtctccat tcatccccct gctgccaatc ttcttttctc tgtgggtcta catttgataa  
2040

ctcgagtcta gagggcccggt ttaaaccgcg tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc  
2100

cagccatctg ttgtttgccc ctcccccggt ccttccttga ccctggaagg tgccactccc  
2160

actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct  
2220

attctggggg gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg  
2280

catgctgggg atgcggtggg ctctatggct tctactgggc ggttttatgg acagcaagcg  
2340

aaccggaatt gccagctggg gcgcctctg gtaagggttg gaagccctgc aaagtaaact  
2400

ggatggcttt ctgcgccca aggatctgat ggcgagggg atcaagctct gatcaagaga  
2460

caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg  
2520

cttgggtgga gaggtattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg  
2580

ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt  
2640

ccggtgcctt gaatgaactg caagacgagg cagcgcggt atcggtggct gccacgacgg  
2700

gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc ggggaaggac tggctgctat  
 2760  
 tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcactt tgctcctgcc gagaaagtat  
 2820  
 ccatcatggc tgatgcaatg cggcggtctg atacgcttga tccggctacc tgcccattcg  
 2880  
 accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cactgactcg gatggaagcc ggtcttgtcg  
 2940  
 atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc  
 3000  
 tcaaggcgag catgcccgcg ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc  
 3060  
 cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg  
 3120  
 tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg  
 3180  
 gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgtcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca  
 3240  
 tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgaattat taacgcttac aatttctga  
 3300  
 tgcggtatct tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatacag gtggcacttt  
 3360  
 tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta  
 3420  
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tagcacgtgc taaaacttca  
 3480  
 tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc  
 3540  
 ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc  
 3600  
 ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc  
 3660  
 agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttcgaagg taactggctt  
 3720  
 cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt  
 3780

caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc  
3840

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa  
3900

ggcgacgcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac  
3960

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg  
4020

gagaaaggcg gacaggtatc cggtaacggc cagggtcggg acaggagagc gcacgagggg  
4080

gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact  
4140

tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa  
4200

cgcggccttt ttacggttcc tgggcttttg ctggcctttt gtcacatgt tctt  
4254

<210> 19

<211> 4284

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна (pGX1803 HepB pLHBs-C)

<400> 19

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta  
60

atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata  
120

acttacggta aatggcccg cttggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat  
180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga  
240

ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc  
300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgctggcat tatgcccagt acatgacctt  
360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat  
420

gcgggttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag  
480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc  
540

aaaatgtcgt aacaactcog cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga  
600

ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga  
660

aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggg  
720

accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaattcgc caccatggat tggacatgga  
780

ttctgtttct ggtcgccgcc gcaaccgcg tgcactcagg gggatggtca tcaaaaccta  
840

gacagggaat gggcactaac ctgagtgtgc ccaatcctct ggggttcttt cccgaccacc  
900

agctggatcc tgccttcggc gctaactcta acaatccaga ctgggacttc aacccaata  
960

aggaccactg gcttgaggca aatcaagtgg gagcaggagc cttcggacca ggctttacac  
1020

ccctcatgg cggactgctg ggatgggtccc ctgaggctca ggggatcctg accacagtcc  
1080

cagcagctcc accccctgca agtactaaca ggcagtcagg acgccagcca accccattt  
1140

ctccaccctt gagggacagt caccctcagg ccagaggcag gaagcggaga agcatgcagt  
1200

ggaacagcac taccttccat caggcaactgc tggatccacg cgtgcgagga ctgtactttc  
1260

cagccggagg cagctcctct ggaaccgtga accctgtccc aacaactgcc tccccaatca  
1320

gttcaatttt ctctcggaca ggagaccccg ctctaatcg gggcagaaaa aggcgctcaa  
1380

tggaaagcac cacatccggg tttctgggac cactgctggt gctgcaggca ggcttctttc  
1440

tgctgaccag aatcctgaca attccccagt ctctggatag ttggtggacc agcctgaact  
1500

tccctgggcgg cgcacctact tgtccaggac agaactctca gagtccaaca tcaaatacata  
1560

gccccacttc ctgtctccca atctgccttg gctaccgctg gatgtgcctg cgacgggttc  
1620

tcattttcct gtttatcctg ctgctgtgcc tgatttttct gctggtgctg ctggactatc  
1680

aggggaatgct gcccgctctgc cctctgctgc cagggaacttc tactaccagt accggacctt  
1740

gtaagacatg cactattcca gctcagggga cctccatgtt cccctcttgc tgttgacca  
1800

aacctagcga tggaaattgt acatgcatcc caattcccag ctccctgggct ttcgcacgat  
1860

ttctgtggga gtgggccagc gtgcgctttt catggctgag cctgctggtg ccttcctgac  
1920

agtggtttgt cggcctgtca cctaccgtgt ggctgagcgt catctggatg atgtggtact  
1980

gggggcccag cctgtataat atcctgtcac cattcctgcc actgctgcca atcttctttt  
2040

gtctgtgggt ctacatttga taagcgccgc ctcgagtcta gagggcccgt ttaaaccgcg  
2100

tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg  
2160

ccttccttga ccttggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt  
2220

gcatcgcatc gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc  
2280

aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggct  
2340

tctactgggc gggttttatgg acagcaagcg aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg  
2400

gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaact ggatggcttt ctgccgccca aggatctgat  
2460

ggcgcagggg atcaagctct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac  
2520

aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga gaggtattc ggctatgact  
2580  
gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt cgggtgtca gcgcaggggc  
2640  
gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caagacgagg  
2700  
cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcacgttg  
2760  
tcactgaagc gggaagggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt  
2820  
catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc  
2880  
atacgcttga tccggtacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcg atcgagcgag  
2940  
cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg  
3000  
ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgag catgcccgcac ggcgaggatc  
3060  
tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt  
3120  
ctggattcat cgactgtggc cggtcgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg  
3180  
ctacccgtga tattgotgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt  
3240  
acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct  
3300  
tctgaattat taacgcttac aatttctga tgcggtattt tctccttac catctgtgcg  
3360  
gtatttcaca ccgcatacag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg  
3420  
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat  
3480  
gcttcaataa tagcacgtgc taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat  
3540  
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc  
3600

agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg  
3660

ctgcttgcaa acaaaaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct  
3720

accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct  
3780

tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct  
3840

cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg  
3900

gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc  
3960

gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga  
4020

gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg  
4080

cagggtcggg acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta  
4140

tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg  
4200

ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tgggcttttg  
4260

ctggcctttt gctcacatgt tctt  
4284

<210> 20

<211> 3690

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна (pGX1804 НерВ pSHBs-A)

<400> 20

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta  
60

atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata  
120

acttacggta aatggcccg ctaggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat  
180

aatgaegtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga  
240

ctatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc  
300

ccctattgac gtcaatgacg gtaaattggcc cgcttggcat tatgcccagt acatgacctt  
360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat  
420

gcggtttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag  
480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc  
540

aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga  
600

ggcttatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact ggcttatcga  
660

aattaatacg actcactata gggagaccca agctggctag cgtttaaact taagcttggg  
720

accgagctcg gatccgccac catggactgg acctggattc tgttcctggg ggctgccgct  
780

acacgggtgc attctgaaaa tatcacatct ggattcctgg gacctctgct ggtgctgcag  
840

gctgggttct ttctgctgac aagaatcctg actattcccc agtcaactga cagctgggtg  
900

acatctctga acttctggg cgggagtcct gtctgtctgg gacagaactc tcagagtcct  
960

acttccaatc actctccaac cagttgtccc cctatctgcc caggctaccg ctggatgtgc  
1020

ctgcggagat tcatcatttt cctgtttatc ctgctgctgt gcctgatttt tctgctgggtg  
1080

ctgctggact atcagggcat gctgcctgtc tgcccactga ttcccggcag caccacaact  
1140

tctaccggcc cctgtaagac atgcaccaca cctgcccagg ggaacagtat gtttccatca  
1200

tgctgttgca ctaaaccac cgatggaaat tgtacatgca tcccaattcc cagctcctgg  
1260



gccttcgcta agtacctgtg ggagtgggca agcgtgcatg tttcatggct gagcctgctg  
1320

gtgccttttcg tccagtgggt tgtgggcctg agcccaactg tctggctgtc cgccatctgg  
1380

atgatgtggt actggggggc cagcctgtat tccatcgtgt caccattcat tcccctgctg  
1440

ccaatctttt tctgcctgtg ggtctacatc tgataactcg agtctagagg gcccgtttaa  
1500

acccgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccccctc  
1560

cccgctgctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag  
1620

gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtg ggtggggcag  
1680

gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct  
1740

atggcttcta ctgggcgggt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc  
1800

cctctggtaa ggttgggaag cctgcaaag taaactggat ggctttctcg ccgccaagga  
1860

tctgatggcg caggggatca agctctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga  
1920

ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct  
1980

atgactgggc acaacagaca atcggtgct ctgatgccgc cgtgttcggt ctgtcagcgc  
2040

aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcaag  
2100

acgaggcagc gcggtatcg tggtggcca cgaaggcggt tccttgcgca gctgtgctcg  
2160

acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc  
2220

tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga aagtatccat catggtgat gcaatgcggc  
2280

ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaat catcgcatcg  
2340

agcgagcaog tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc  
2400

atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg  
2460

aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc  
2520

gctttttctg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag  
2580

cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg  
2640

tgttttacgg tatcgccgt cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg  
2700

agttcttctg aattattaac gcttacaatt tcctgatgcg gtattttctc cttacgcac  
2760

tgtgcggtat ttcacaccgc atacagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc  
2820

tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg  
2880

ataaatgctt caataatagc acgtgctaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt  
2940

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg  
3000

agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt  
3060

aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca  
3120

agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac  
3180

tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac  
3240

atacctcgt ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct  
3300

taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg  
3360

gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca  
3420

gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccgg  
3480

aagcggcagg gtcggaacag gagagcgac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta  
3540

tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc  
3600

gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggg  
3660

cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt  
3690

<210> 21

<211> 3720

<212> ДНК

<213> штучна послідовність

<220>

<223> штучна (pGX1805 HepB SHBs-C)

<400> 21

gactcttcgc gatgtacggg ccagatatac gcgttgacat tgattattga ctagttatta  
60

atagtaatca attacggggg cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata  
120

acttacggta aatggcccg ctaggtgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat  
180

aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga  
240

ctatttacgg taaactgcc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc caagtacgcc  
300

ccctattgac gtcaatgac gtaaattggc cgcttgcat tatgccagt acatgacctt  
360

atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatgggtgat  
420

gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag  
480

tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc  
540

aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga  
 600  
 ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgottact ggcttatcga  
 660  
 aattaatacg actcactata gggagacca agctggctag cgtttaaact taagcttggg  
 720  
 accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaaattcg caccatggat tggacatgga  
 780  
 ttctgttctt ggtcgccgcc gcaacacgag tgcattctga aagtacaacc tctggcttcc  
 840  
 tgggccccct gctgggtgctg caggcagggt tctttctgct gacacgaatc ctgactatto  
 900  
 cacagtcact ggacagctgg tggaccagcc tgaacttctt gggcggggcc cctacatgtc  
 960  
 caggacagaa ctctcagagt cccacttcca atcactctcc taccagttgt cccctatct  
 1020  
 gccccggcta cagatggatg tgcctgcgga gattcatcat tttctgttt atcctgetgc  
 1080  
 tgtgctgat ttttctgctg gtgctgctgg actatcaggg aatgetgccc gtctgccctc  
 1140  
 tgctgccagg aacctcaacc acaagcacag gcccttgtaa gacttgcacc attcccgtc  
 1200  
 aggggactag tatgttccct tcatgctgtt gcacaaaacc atctgatgga aattgtactt  
 1260  
 gcatcccaat tcccagctcc tgggccttcg ctaggtttct gtgggagtgg gccagtgtgc  
 1320  
 gcttttctct gctgtctctg ctggtgccct tcgtccagtg gtttgcggc ctgagcccta  
 1380  
 cagtgtggct gtccgtcacc tggatgatgt ggtactgggg gcctagcctg tataatatcc  
 1440  
 tgtcaccatt tctgccactg ctgccaatct tcttttgctt gtgggtctac atctgataag  
 1500  
 cgcccgctcg agtctagagg gcccgtttaa acccgctgat cagcctcgac tgtgccttct  
 1560  
 agttgccagc catctgttgt ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaagggtgcc  
 1620

actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt  
1680

cattctattc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat  
1740

agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggcttcta ctgggcggtt ttatggacag  
1800

caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag cctgcaaag  
1860

taaactggat ggctttctcg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agctctgatc  
1920

aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc  
1980

cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct  
2040

ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg  
2100

acctgtccgg tgccctgaat gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca  
2160

cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc  
2220

tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga  
2280

aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc  
2340

cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc  
2400

ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg  
2460

ccaggctcaa ggcgagcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct  
2520

gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc  
2580

tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc  
2640

ttggcggcga atgggctgac cgcttctctg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc  
2700

```

agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg aattattaac gcttacaatt
2760
tcttgatgcg gtattttctc cttacgcacg tgtgcggtat ttcacaccgc atacagggtgg
2820
cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttggtta tttttctaaa tacattcaaa
2880
tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatagc acgtgctaaa
2940
acttcatttt taatttataa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa
3000
aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg
3060
atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaca aaaaaccacc
3120
gtaccagcgc gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac
3180
tggtttcagc agagcgcaga taccaaatac tgccttcta gtgtagccgt agttaggcca
3240
ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaatac tgttaccagt
3300
ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc
3360
ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg
3420
aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc
3480
cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac
3540
gagggagctt ccagggggaa acgcttggtg tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct
3600
ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc
3660
cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggg cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt
3720

```

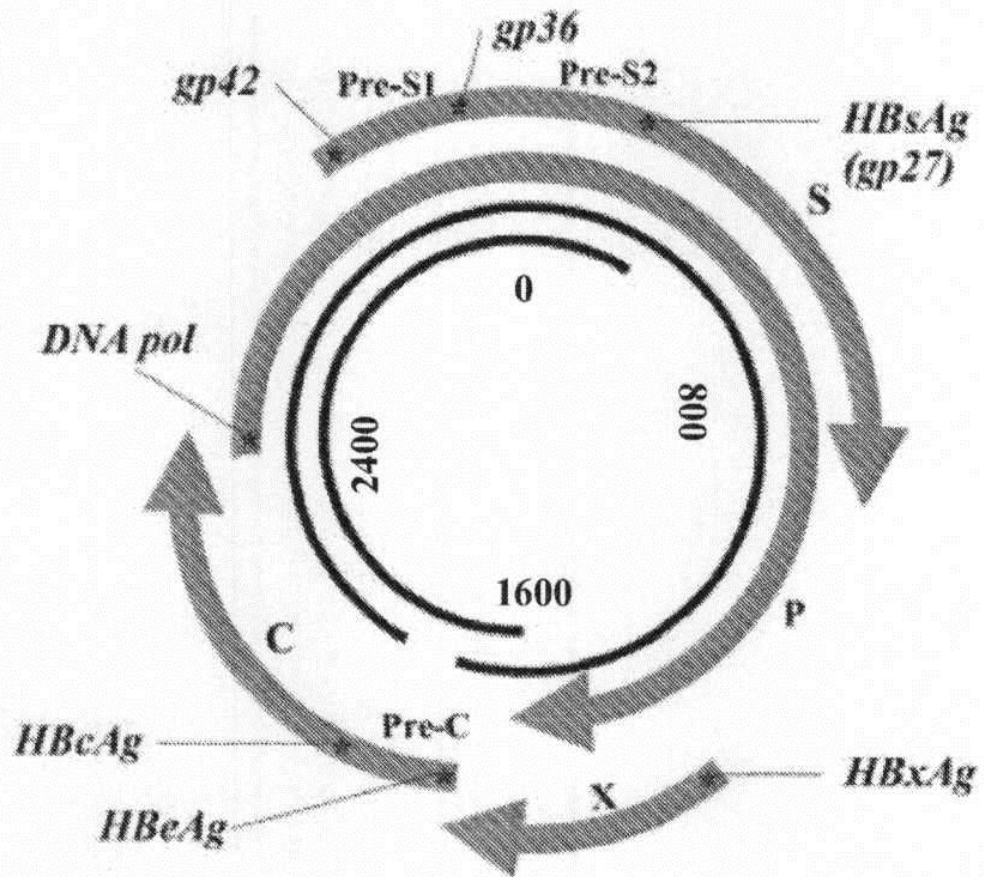
#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Вакцина, призначена для генерації імунної відповіді проти HBV у суб'єкта, яка містить:
  - (а) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:10, амінокислотної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10, і амінокислотної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10; або
- 10

- (b) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:12, і амінокислотної послідовності, яка на 95 % ідентична по всій довжині амінокислотної послідовності повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, амінокислотної послідовності, яка на 96 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, амінокислотної послідовності, яка на 97 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, амінокислотної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, і амінокислотної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12.
2. Вакцина за п. 1, яка додатково містить:
- (c) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6.
3. Вакцина за п. 2, яка містить:
- 15 (a) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:10, і амінокислотної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині амінокислотної послідовності SEQ ID NO:10, і амінокислотної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:10;
- 20 (b) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:12 і амінокислотної послідовності, яка на 95 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, і амінокислотної послідовності, яка на 96 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, амінокислотної послідовності, яка на 97 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, амінокислотної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, і амінокислотної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині повнорозмірній амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12, і
- 25 (c) молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, що складається з: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, і SEQ ID NO:6.
- 30 4. Вакцина за п. 3, яка **відрізняється** тим, що молекули нуклеїнової кислоти містять одну або більше нуклеотидних послідовностей, вибраних з групи, що складається з:
- (a) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:10, яка містить нуклеотидну послідовність як зазначено в SEQ ID NO:9;
- 35 (b) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12, яка містить нуклеотидну послідовність як зазначено в SEQ ID NO:11; і
- (c) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, що складається з SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 і SEQ ID NO:6, яка містить нуклеотидну послідовність як зазначено в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 і SEQ ID NO:5 відповідно.
- 40 5. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що молекулою нуклеїнової кислоти є плазміда.
6. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що молекула нуклеїнової кислоти включена у вірусну частинку.
7. Вакцина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що додатково містить ад'ювант.
8. Вакцина за п. 7, яка **відрізняється** тим, що ад'ювантом є IL-12, IL-15, IL-28 або RANTES.
- 45 9. Спосіб індукції імунної відповіді проти антигену HBV, що включає введення вакцини за п. 1 суб'єкту.
10. Спосіб захисту суб'єкта від HBV-інфекції, що включає введення вакцини за п. 1 суб'єкту.
11. Спосіб лікування суб'єкта, у якого діагностовано HBV-інфекцію, що включає введення вакцини за п. 1 суб'єкту.
- 50 12. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність, яка кодує одну або більше амінокислотних послідовностей, вибраних з групи, яка складається з:
- (a) амінокислотної послідовності, що містить SEQ ID NO:10;
- (b) амінокислотної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:10;
- (c) амінокислотної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:10;
- 55 (d) амінокислотної послідовності, яка містить SEQ ID NO:12;
- (e) амінокислотної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:12; і
- (f) амінокислотної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:12.
13. Молекула нуклеїнової кислоти за п. 12, що містить одну або більше послідовностей, вибраних з групи, що складається з:
- 60 (a) нуклеотидної послідовності, що містить SEQ ID NO:9;

- (b) нуклеотидної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:9;  
 (c) нуклеотидної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:9;  
 (d) нуклеотидної послідовності, яка містить SEQ ID NO:11;  
 (e) нуклеотидної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:11, і  
 5 (f) нуклеотидної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:11.
14. Молекула нуклеїнової кислоти за п. 12, яка **відрізняється** тим, що молекулою нуклеїнової кислоти є плазмід.
15. Молекула нуклеїнової кислоти за п. 12, яка **відрізняється** тим, що молекулою нуклеїнової кислоти є вектор експресії і нуклеотидна послідовність, що кодує одну або більше  
 10 амінокислотних послідовностей, функціонально зв'язана з регуляторним елементом.
16. Молекула нуклеїнової кислоти за п. 12, яка **відрізняється** тим, що молекула нуклеїнової кислоти включена у вірусну частинку.
17. Спосіб індукції імунної відповіді проти антигену HBV, що включає введення молекули нуклеїнової кислоти за п. 12 суб'єкту.
- 15 18. Спосіб захисту суб'єкта від HBV-інфекції, що включає введення молекули нуклеїнової кислоти за п. 12 суб'єкту.
19. Спосіб лікування суб'єкта, у якого діагностовано HBV-інфекцію, що включає введення молекули нуклеїнової кислоти за п. 12 суб'єкту.
20. Білок, який містить амінокислотну послідовність, вибраний з групи, що складається з:  
 20 (a) SEQ ID NO:10 або SEQ ID NO:12; і  
 (b) амінокислотної послідовності, яка на 98 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:10 або SEQ ID NO:12; і  
 (c) амінокислотної послідовності, яка на 99 % ідентична по всій довжині SEQ ID NO:10 або SEQ ID NO:12.
- 25 21. Вакцина для індукції імунної відповіді проти HBV у суб'єкта, що містить:  
 молекулу нуклеїнової кислоти за п. 12 і ад'ювант.
22. Вакцина за п. 21, яка **відрізняється** тим, що вказаним ад'ювантом є IL-12, IL-15, IL-28 або RANTES.

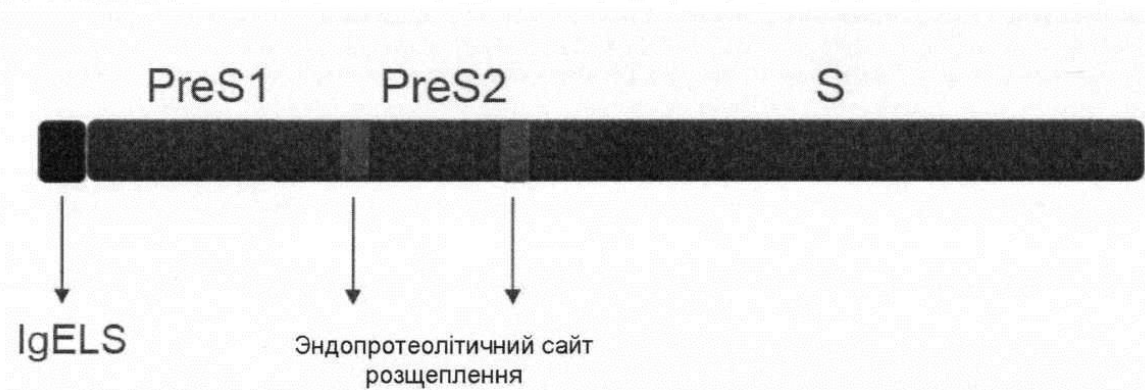




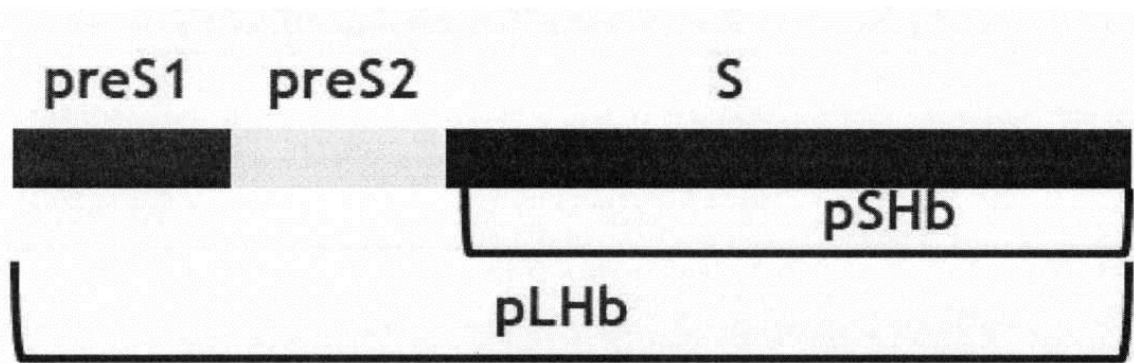
### Фігура 1



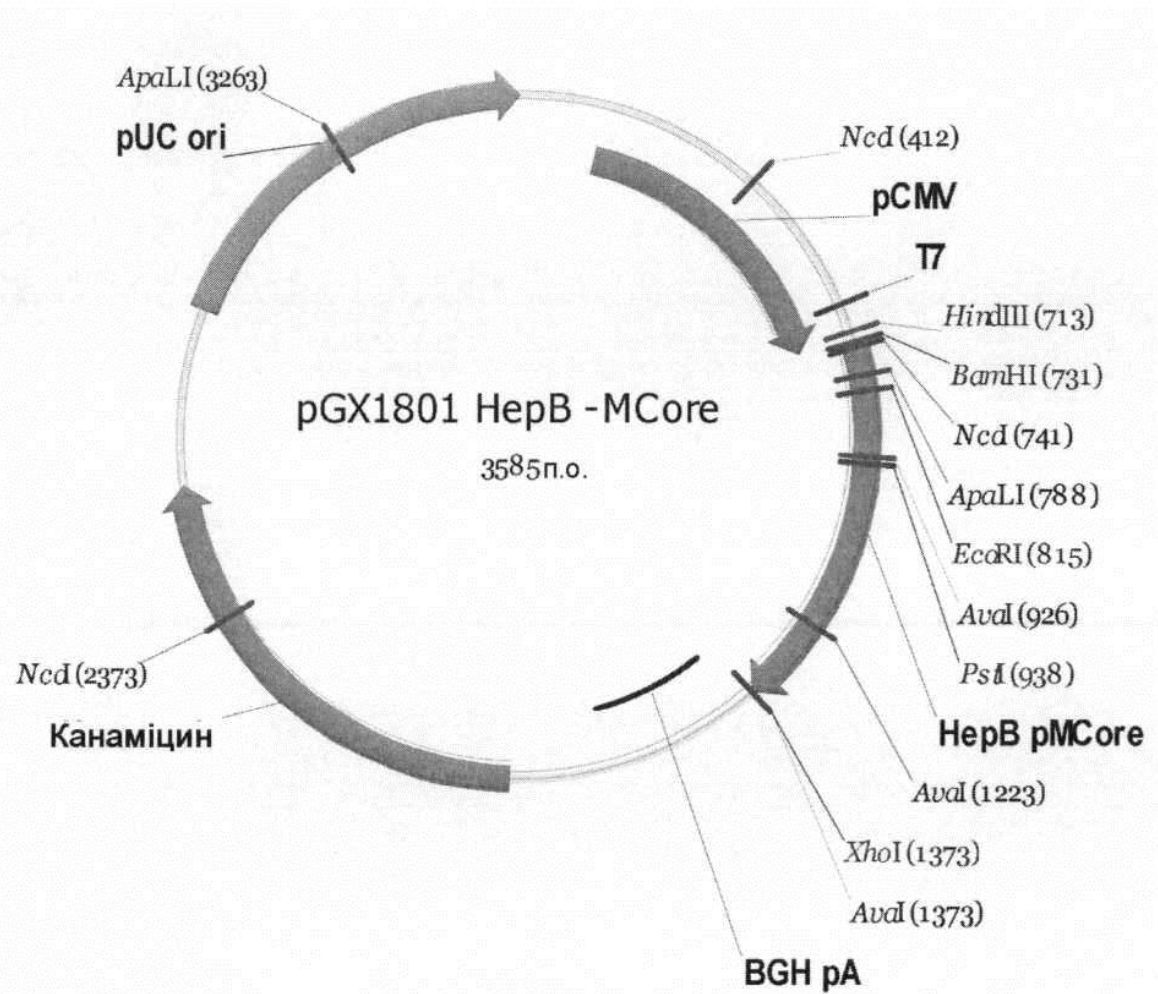
Фігура 2



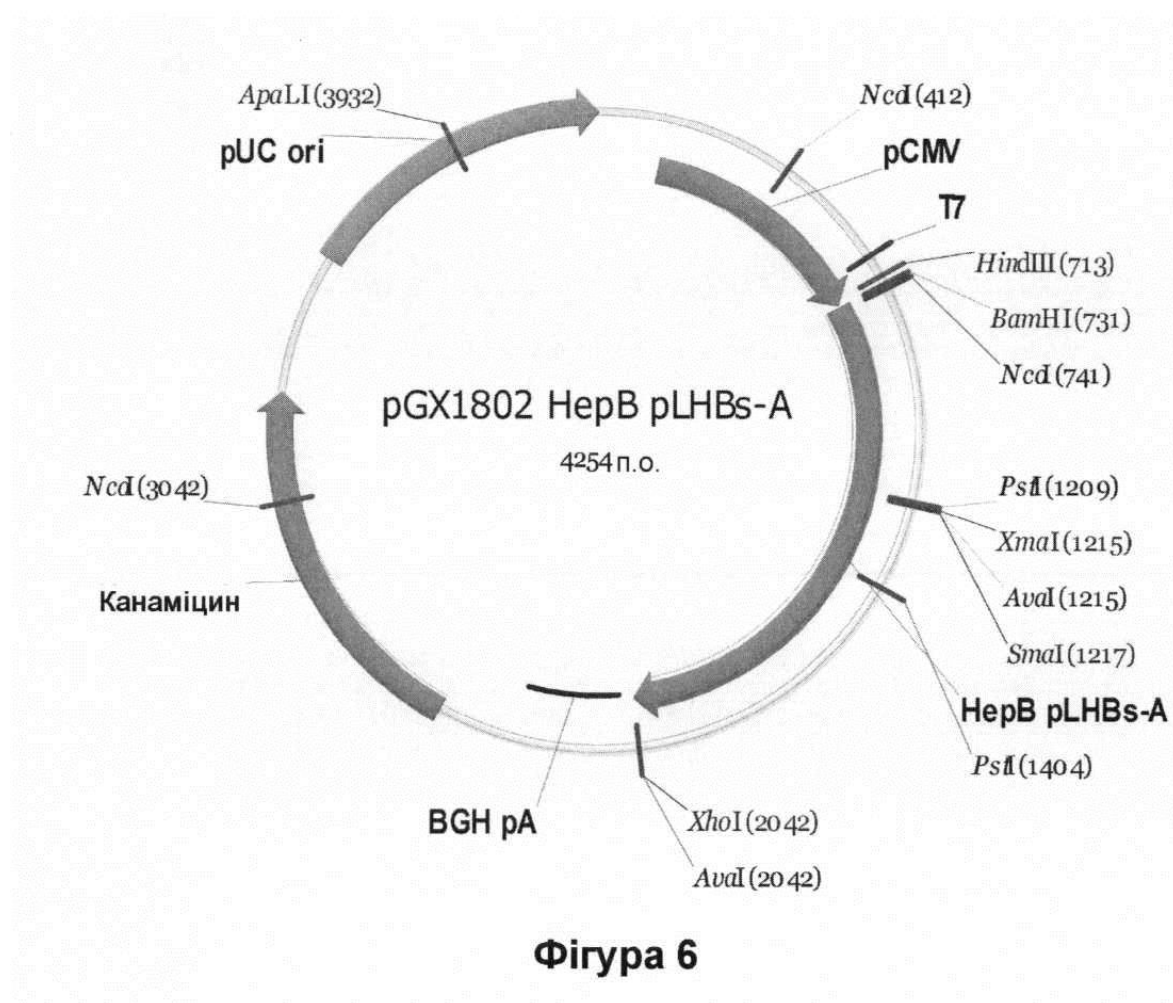
Фігура 3

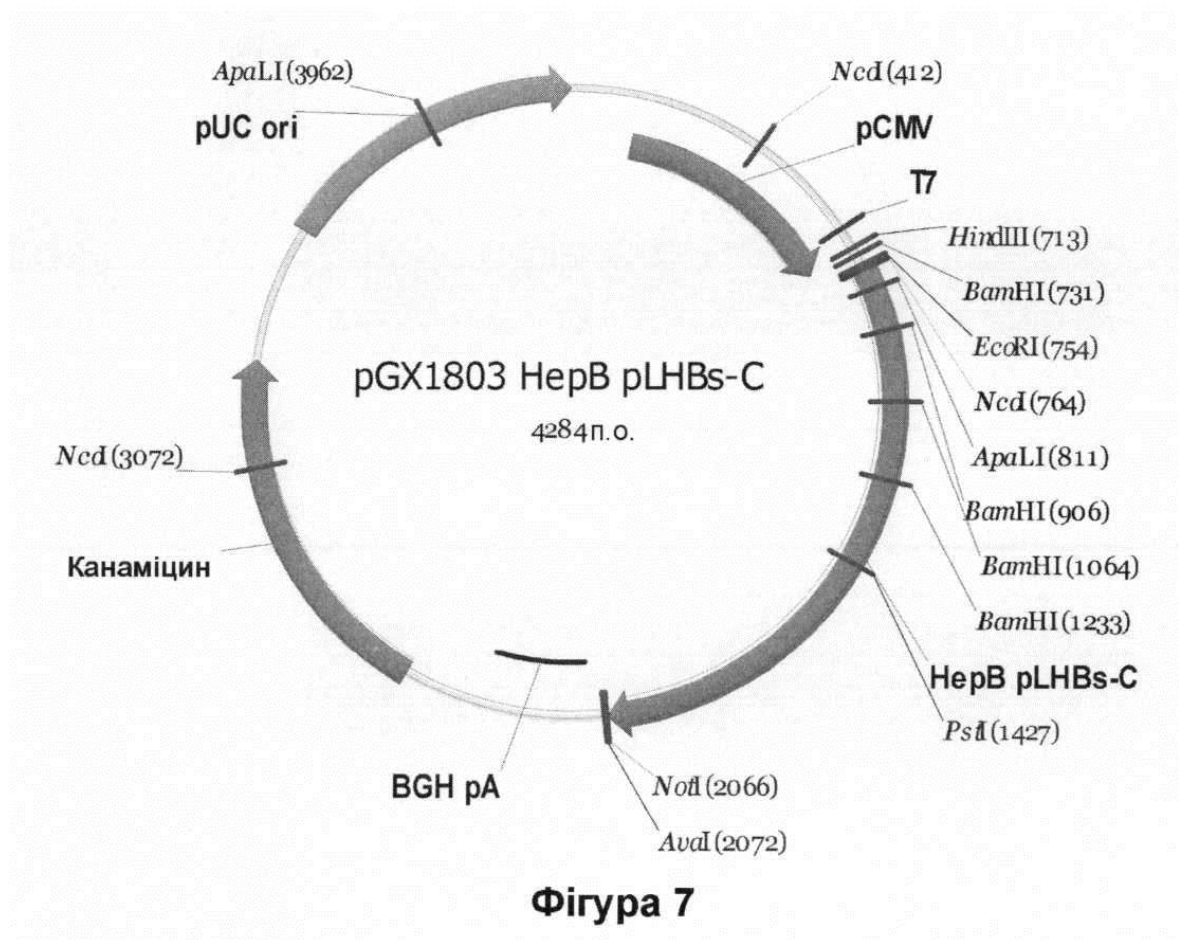


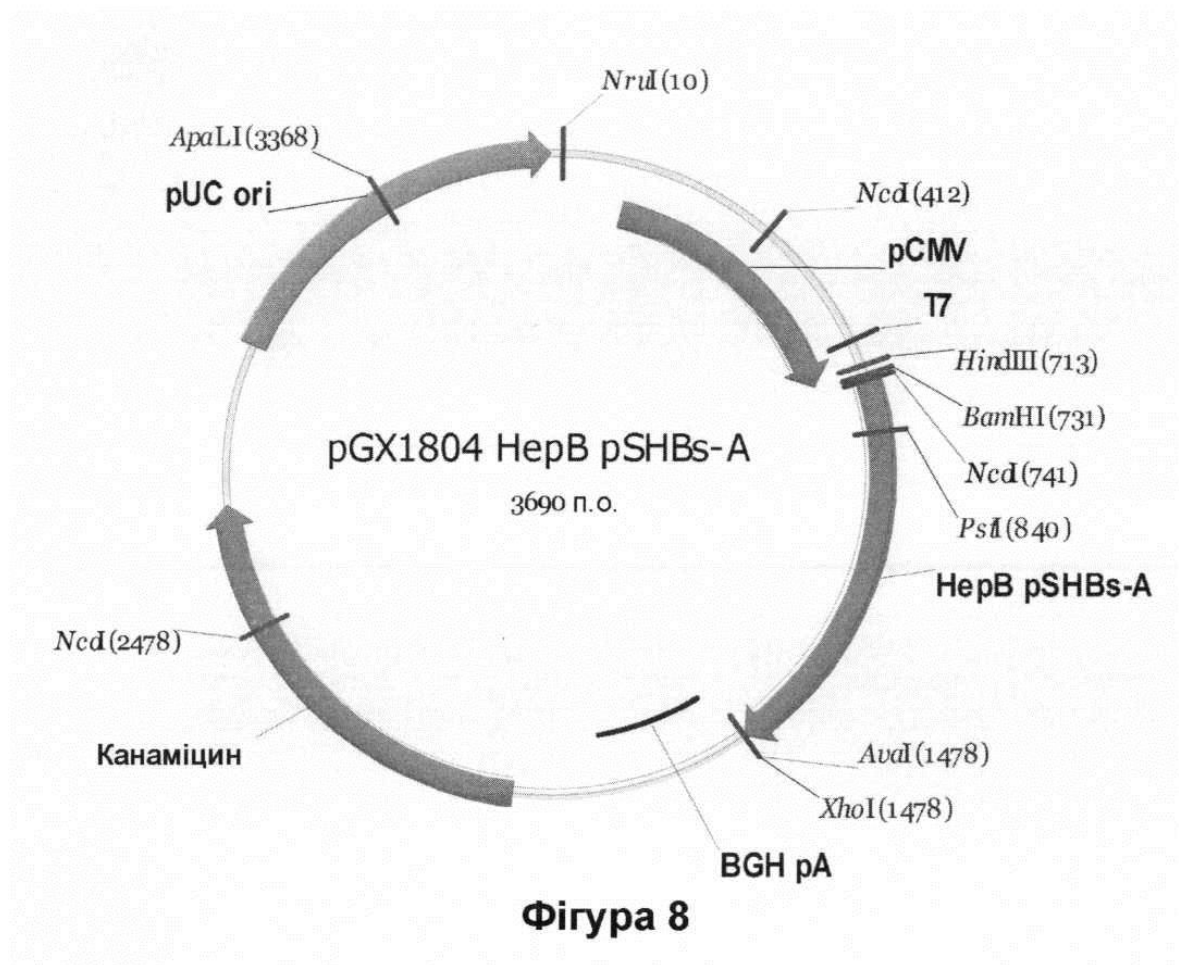
Фігура 4

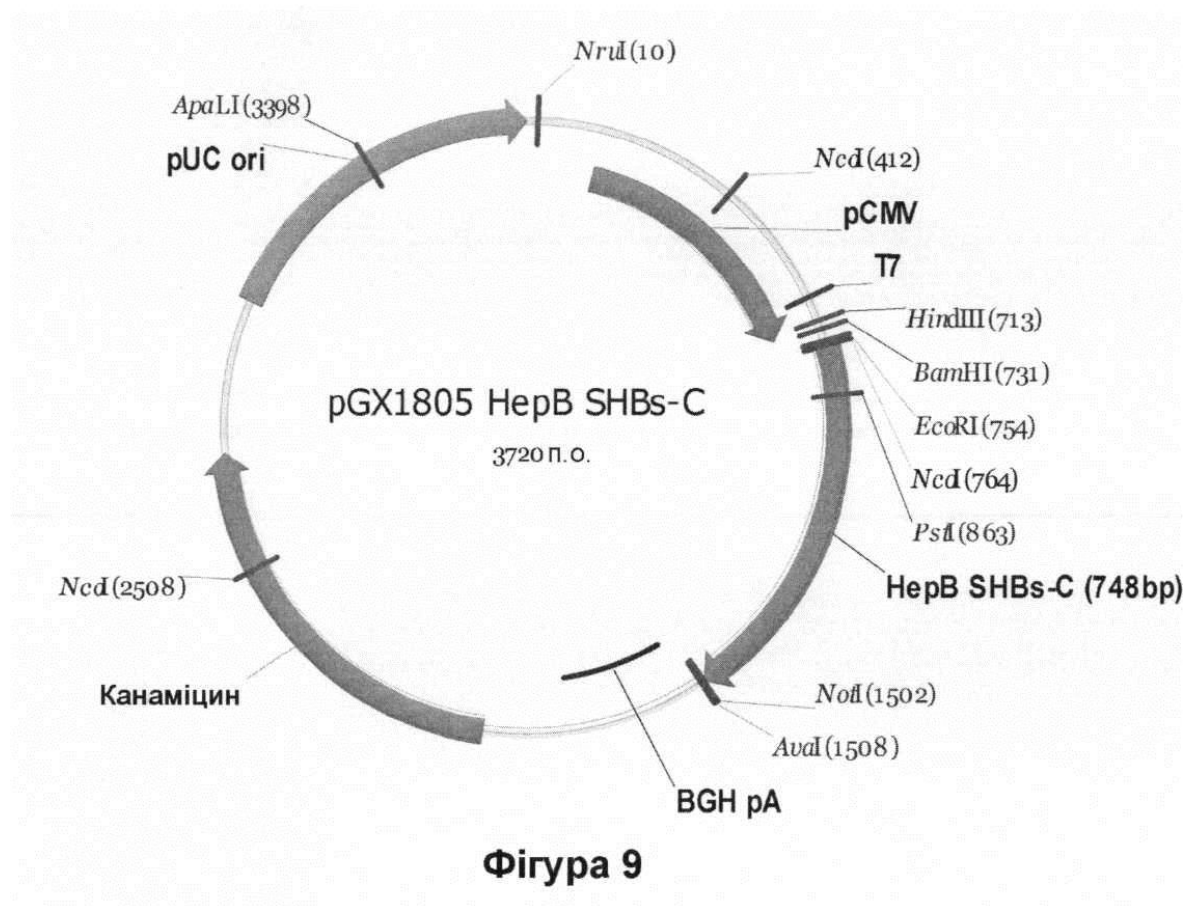


Фігура 5

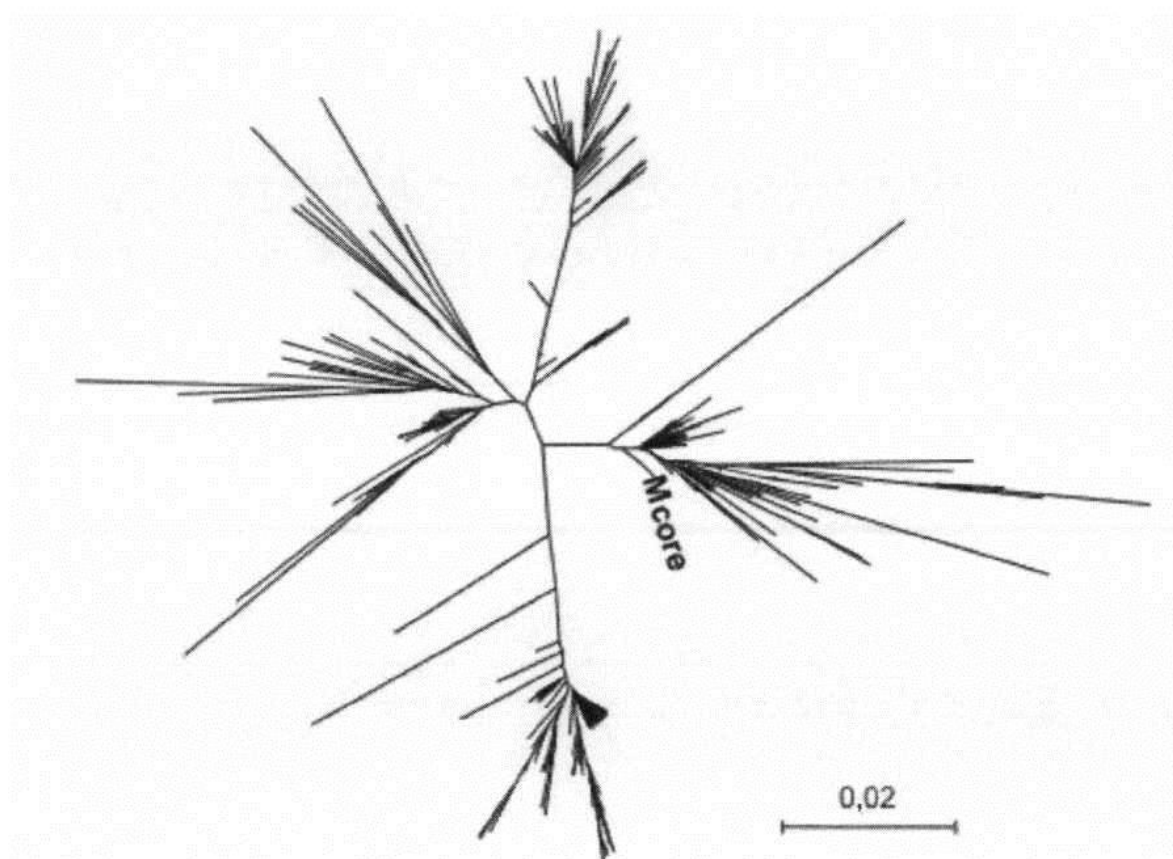




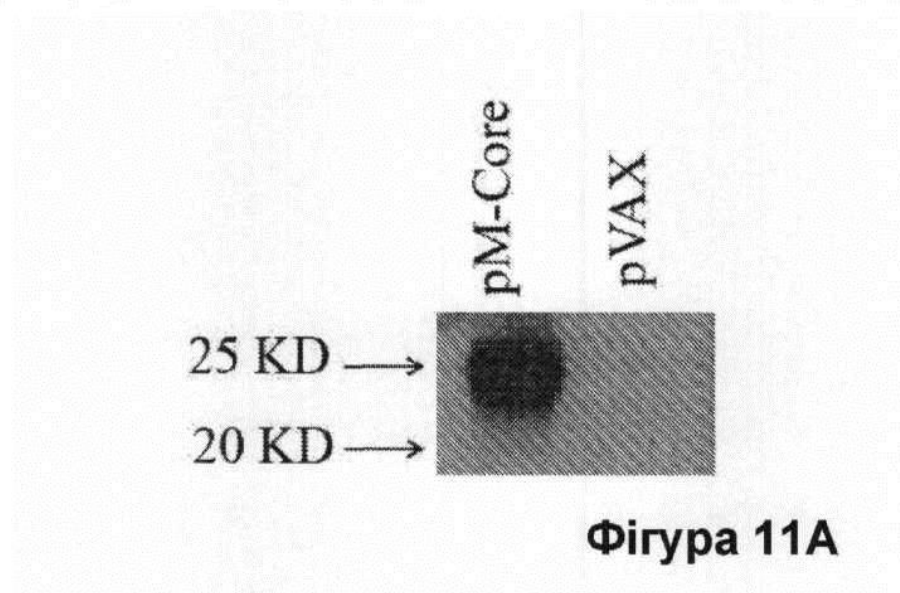






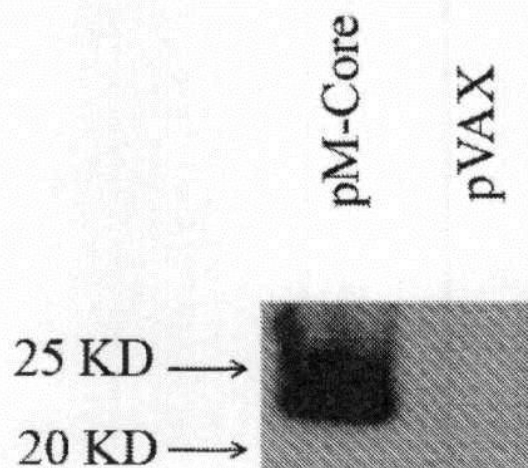


Фігура 10

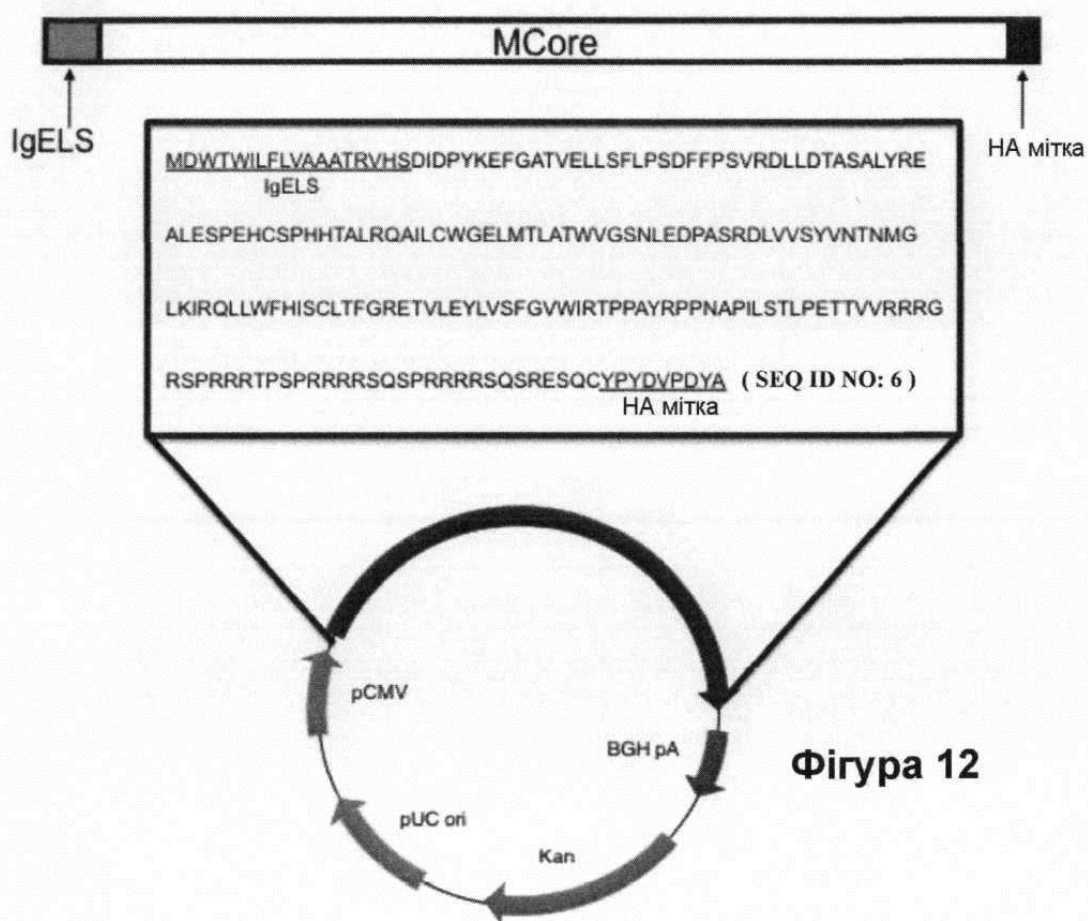


Фігура 11А

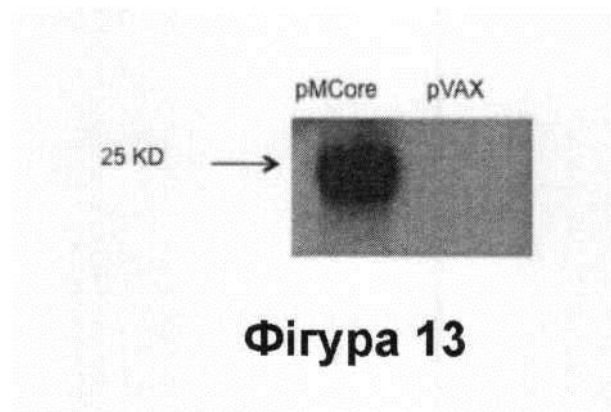




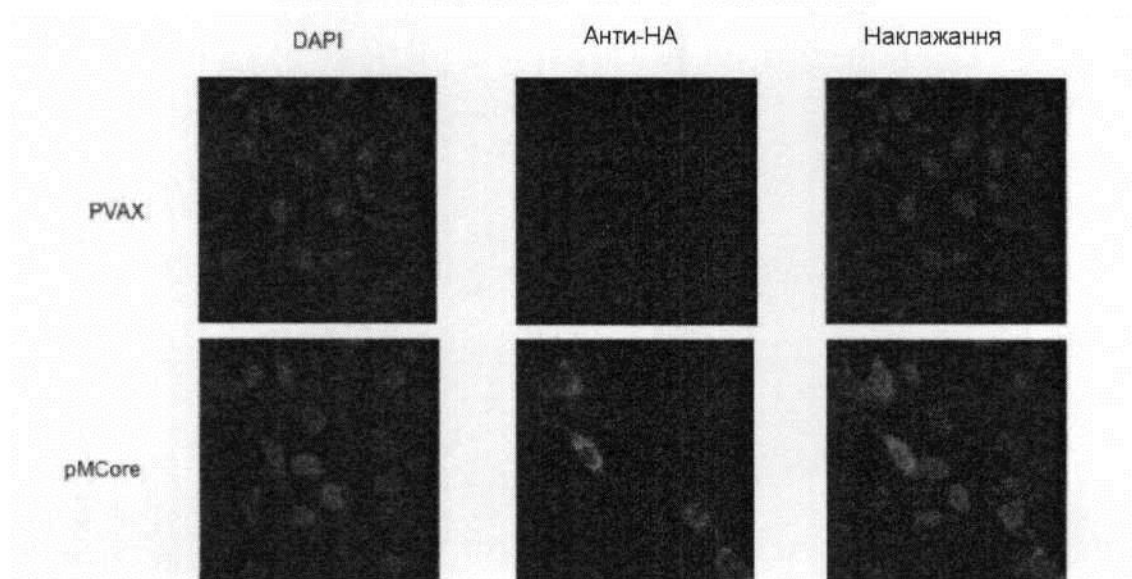
Фігура 11В



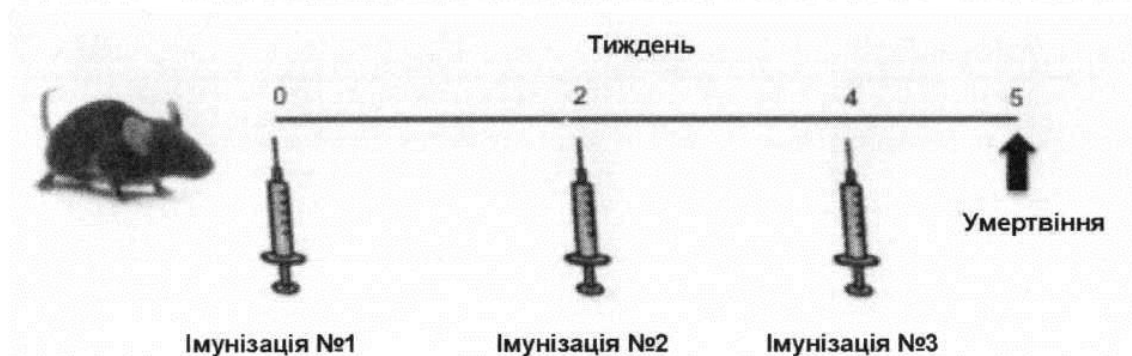
Фігура 12



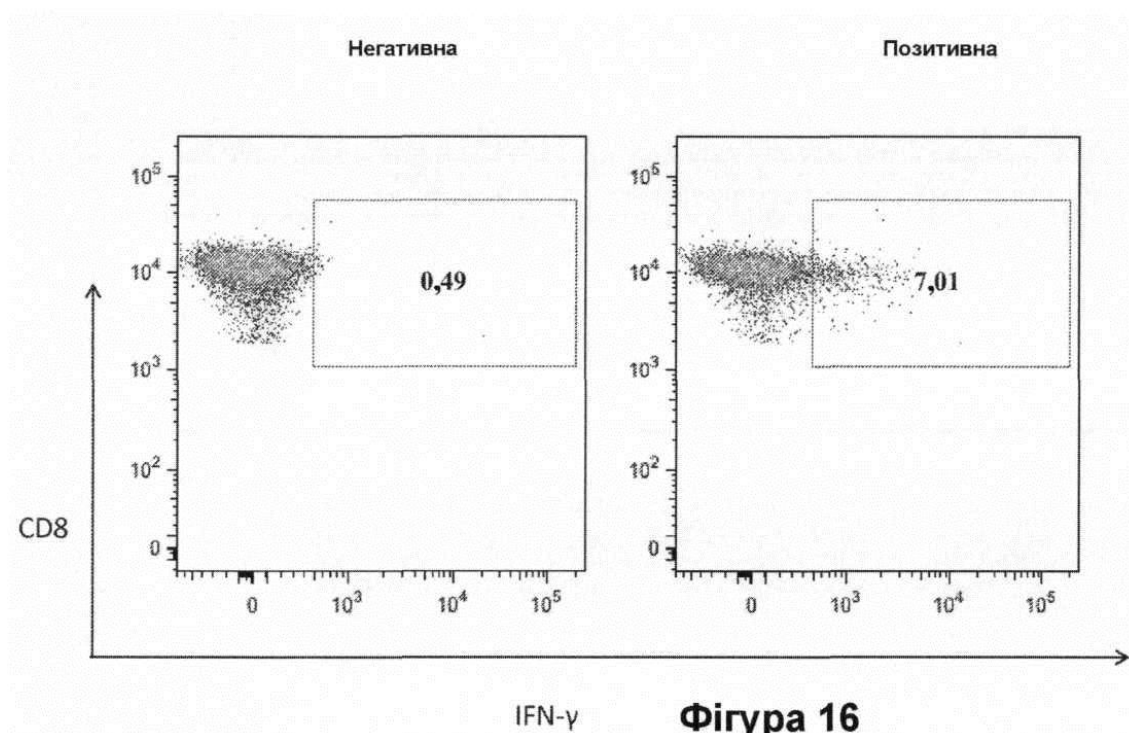
**Фігура 13**



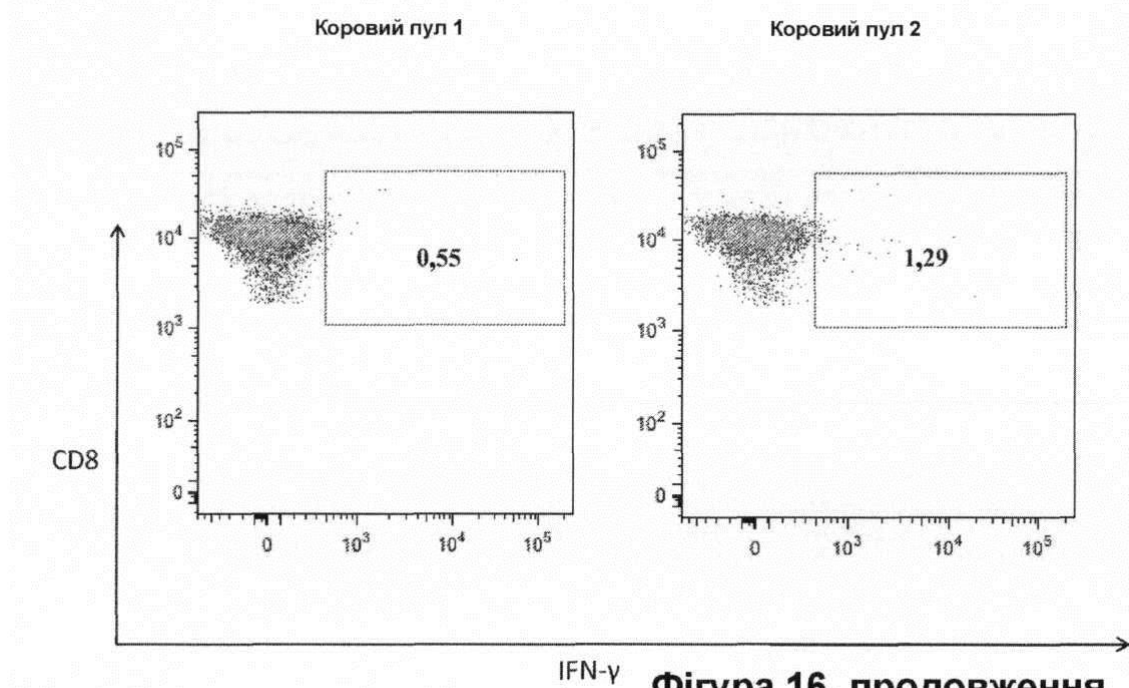
**Фігура 14**



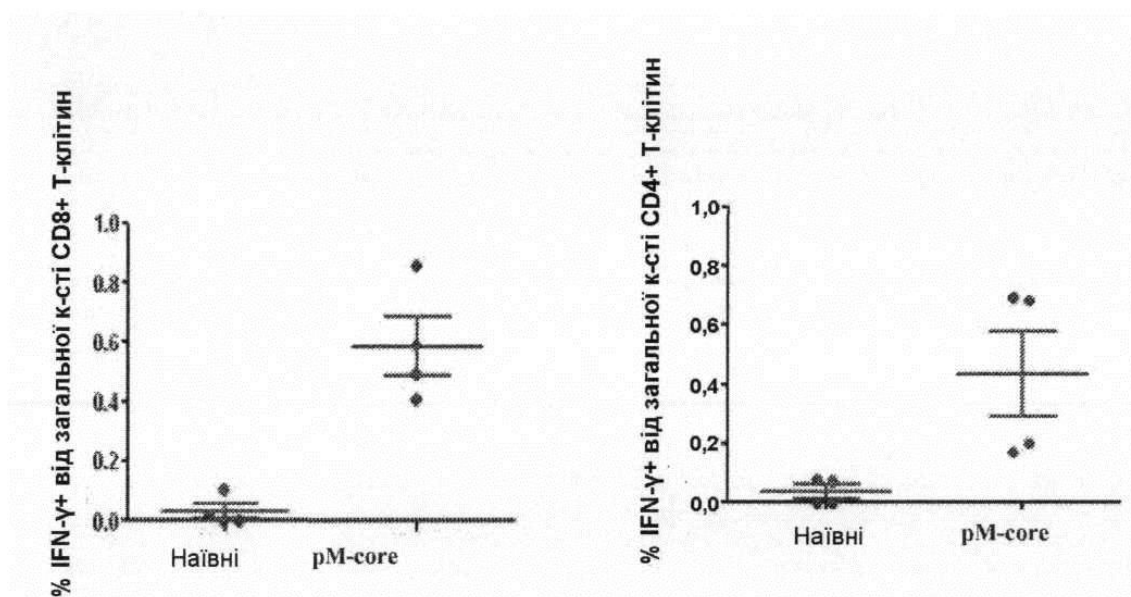
**Фігура 15**



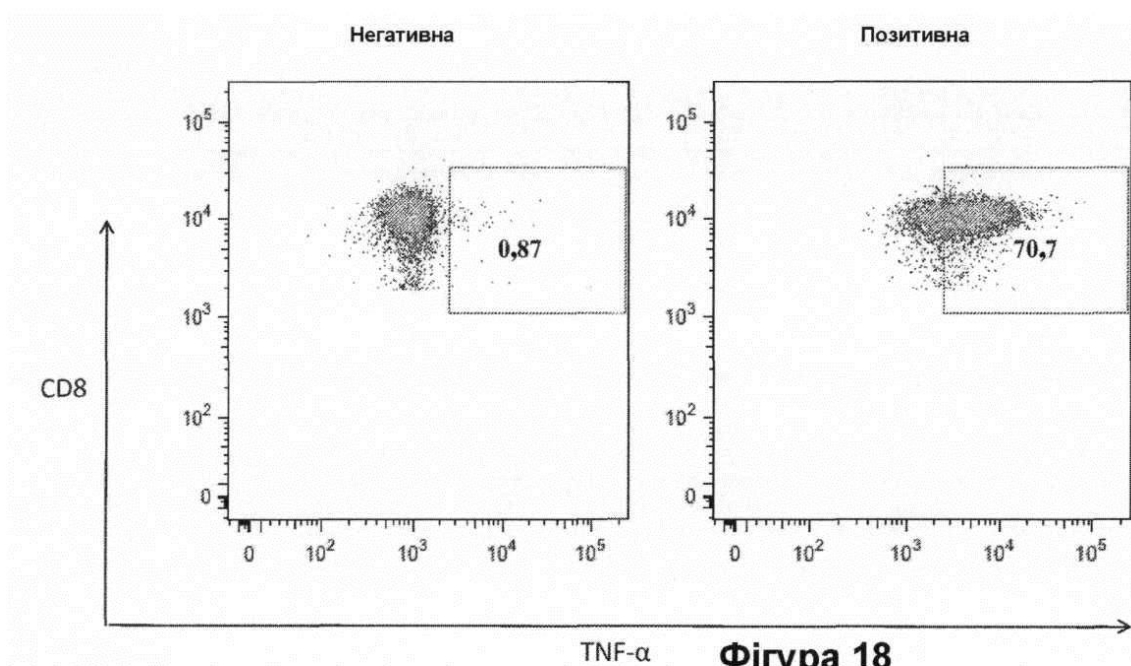
**Фігура 16**  
(Сторінка 1 з 2)



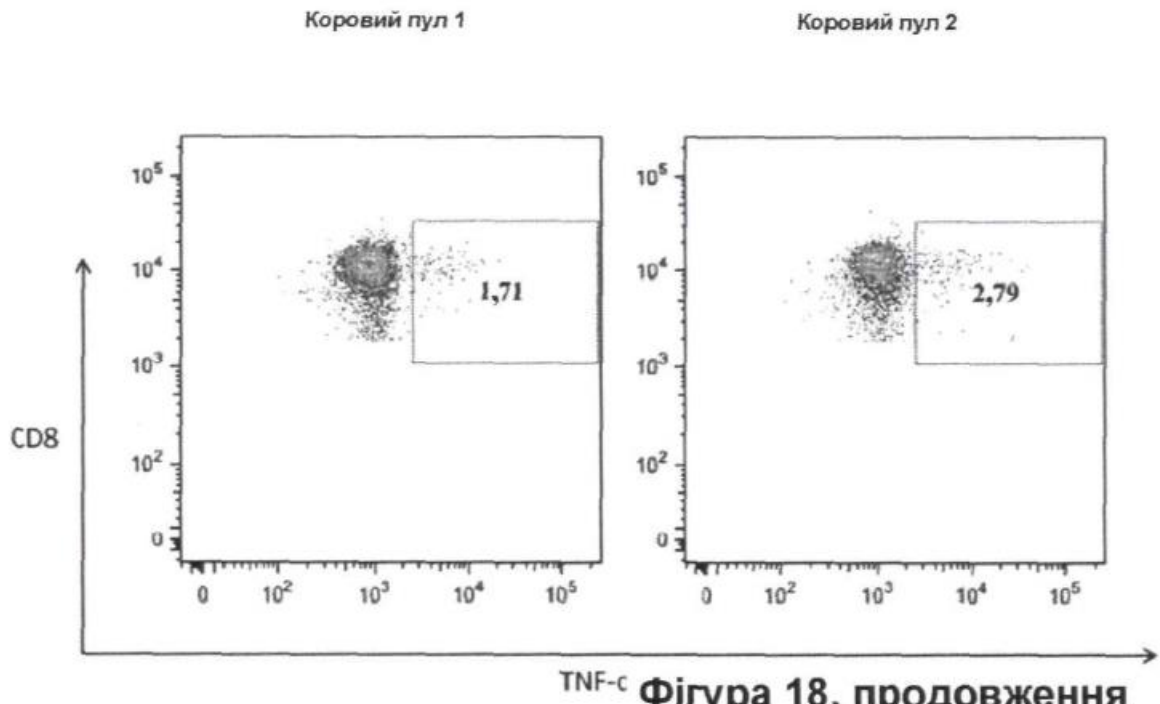
**Фігура 16, продовження**  
(Сторінка 2 з 2)



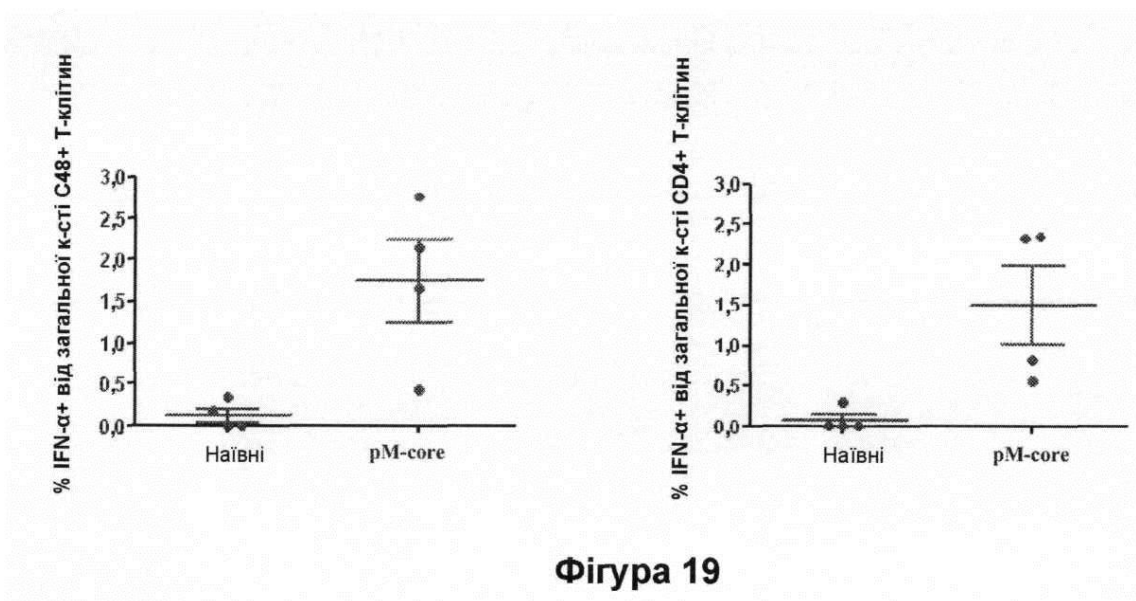
**Фігура 17**



**Фігура 18**  
(Сторінка 1 з 2)

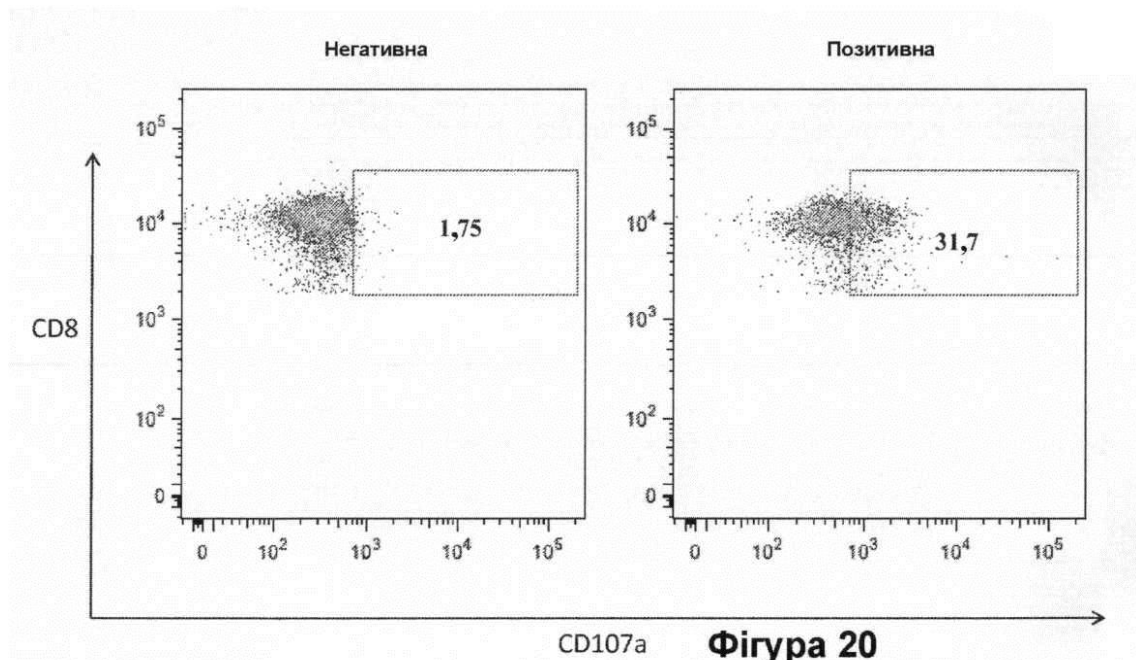


**Фігура 18, продовження**  
(Сторінка 2 з 2)

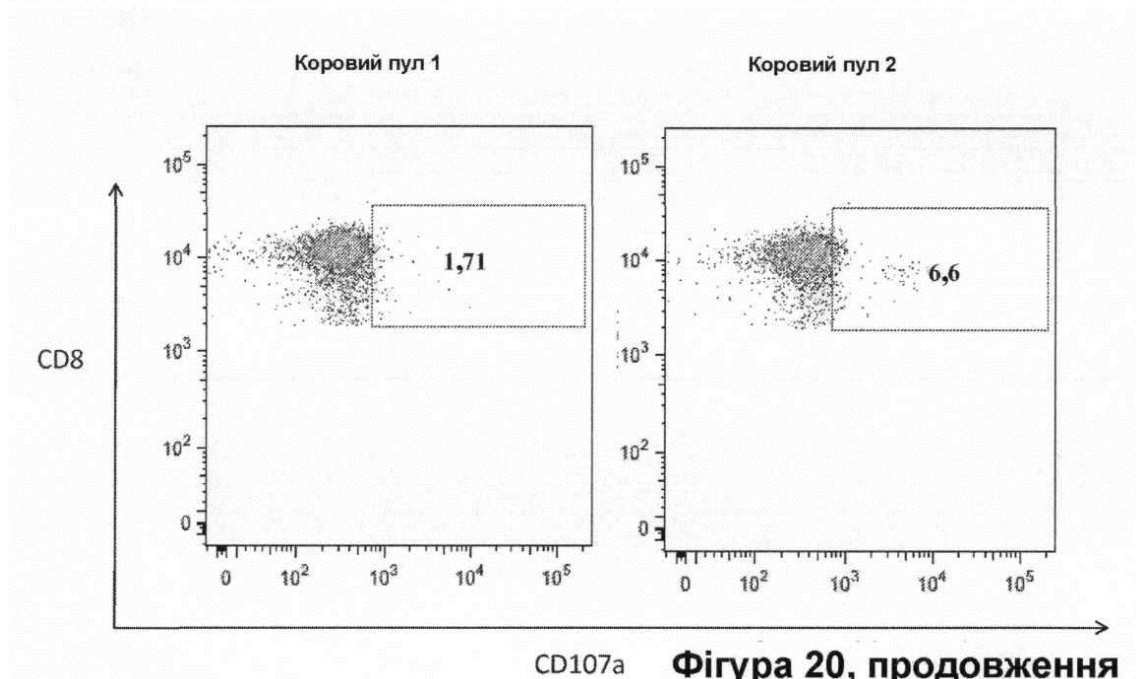


**Фігура 19**

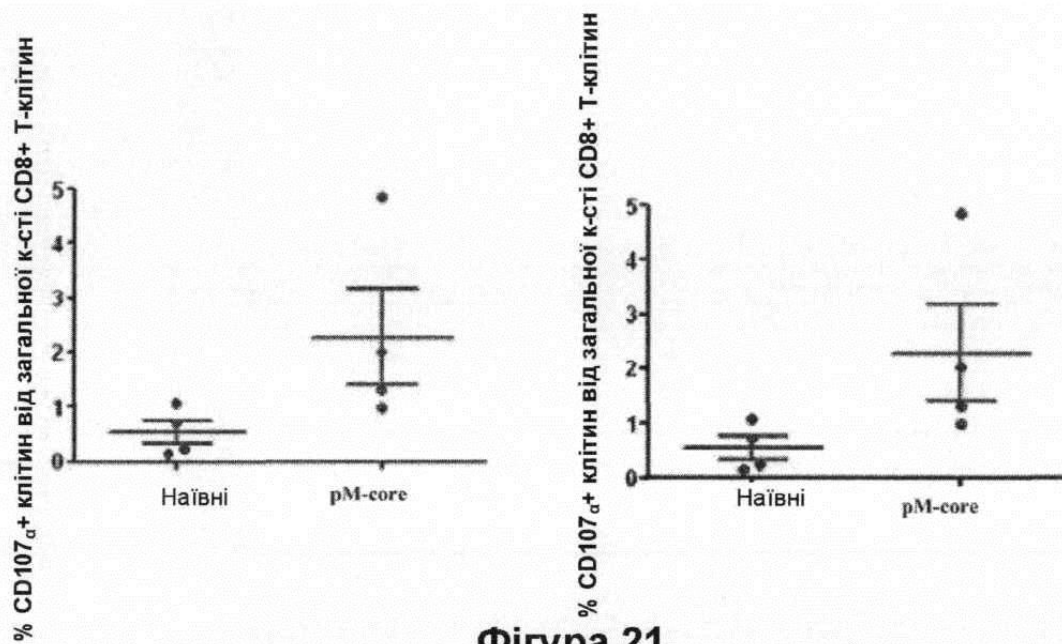




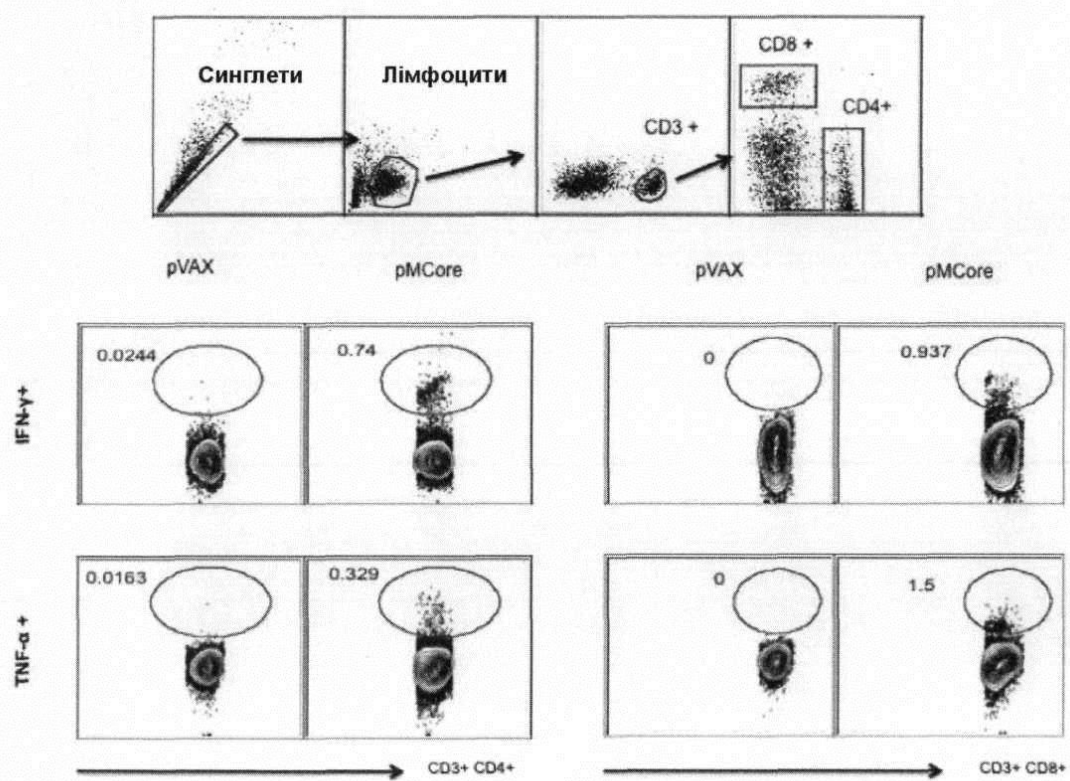
**Фігура 20**  
(Сторінка 1 з 2)



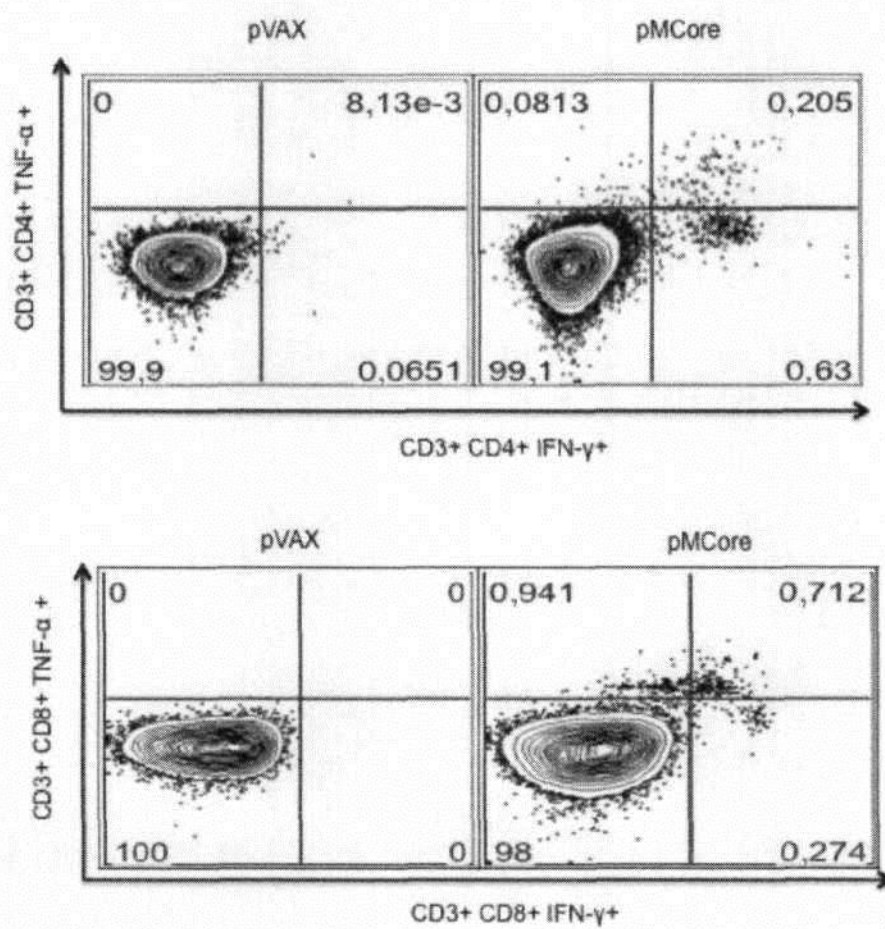
**Фігура 20, продовження**  
(Сторінка 2 з 2)



Фігура 21

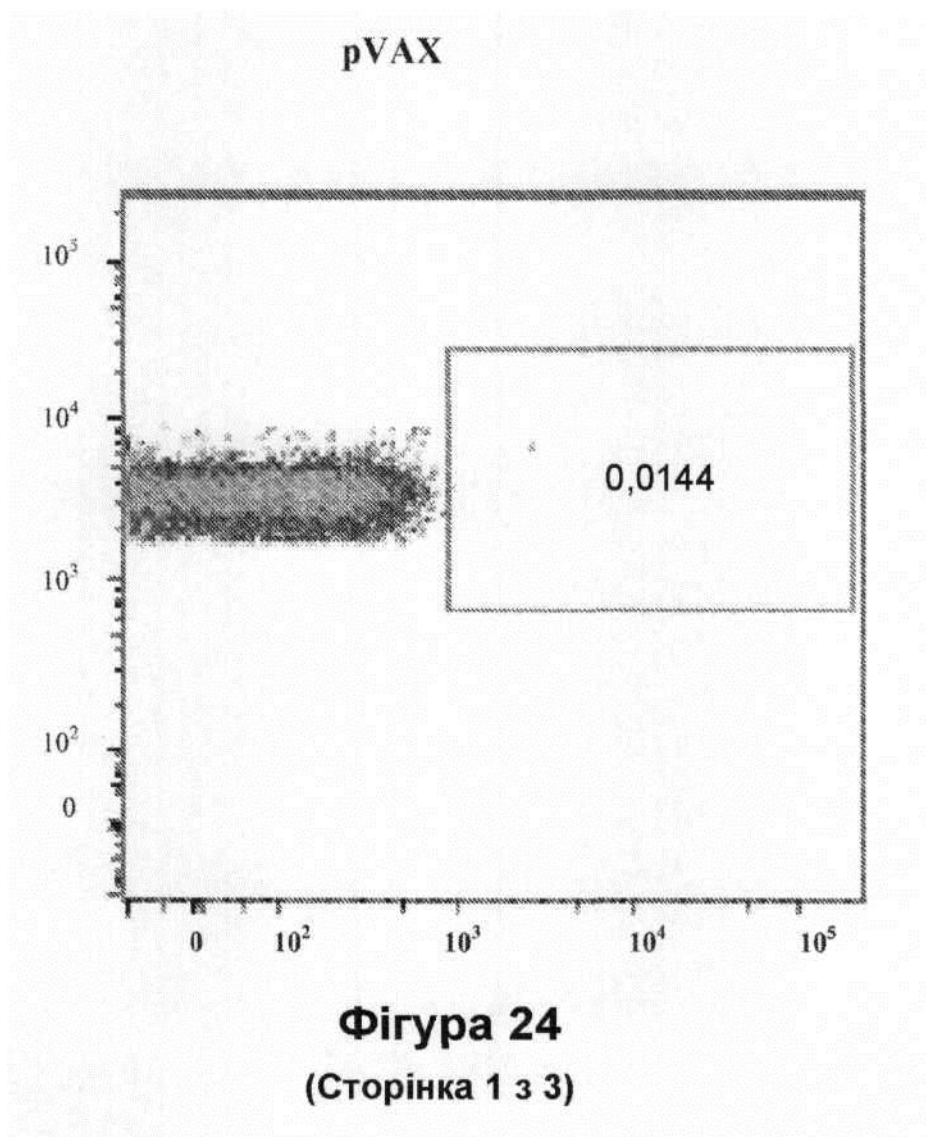


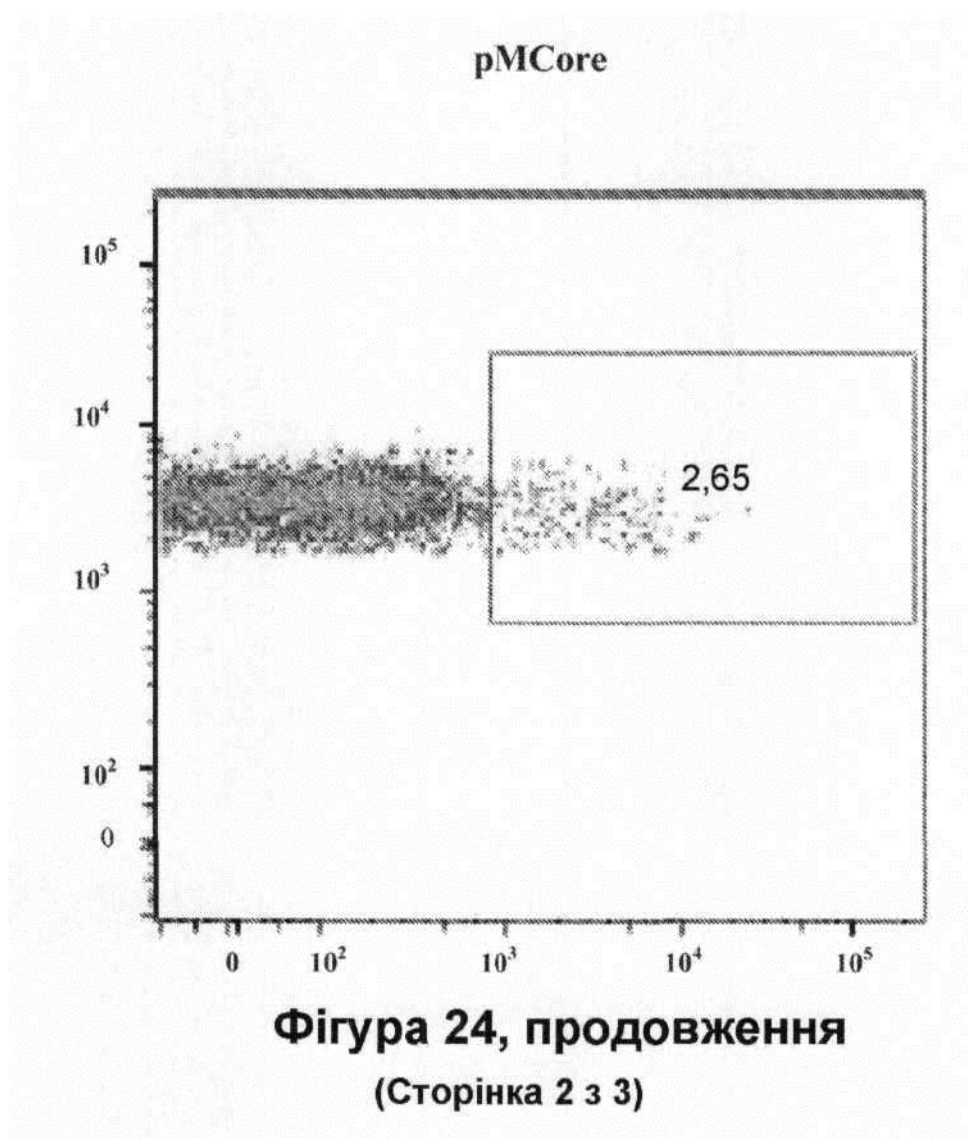
Фігура 22



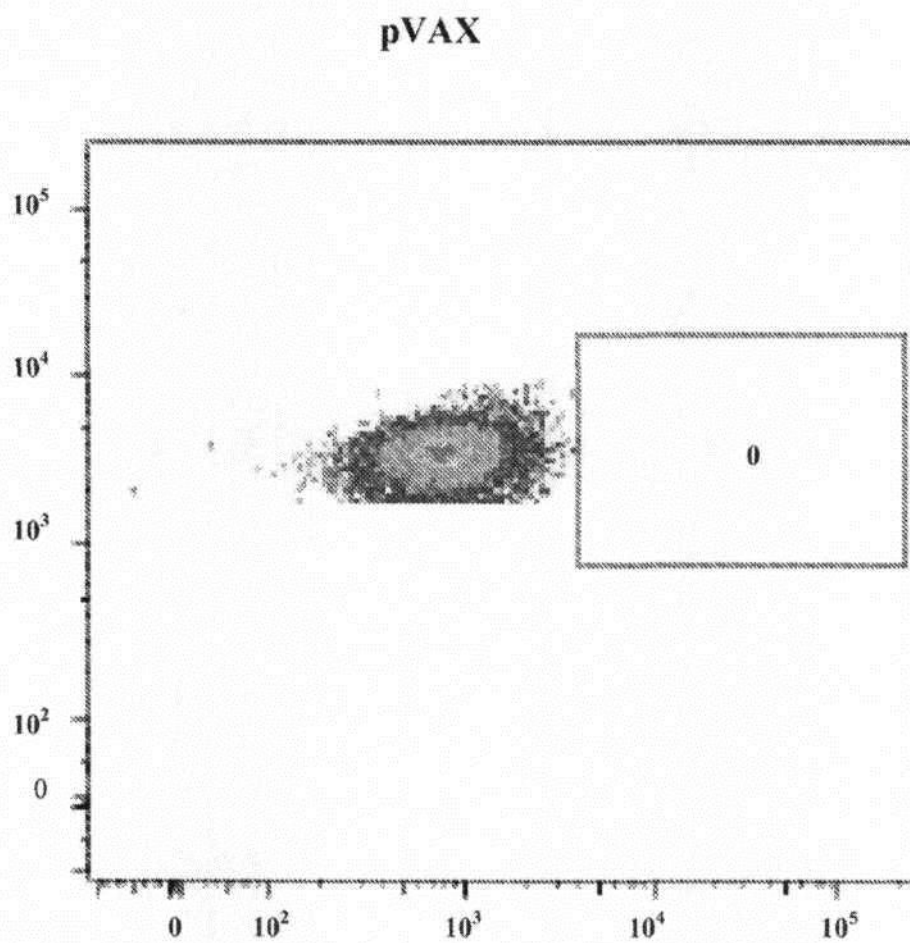
**Фігура 23**



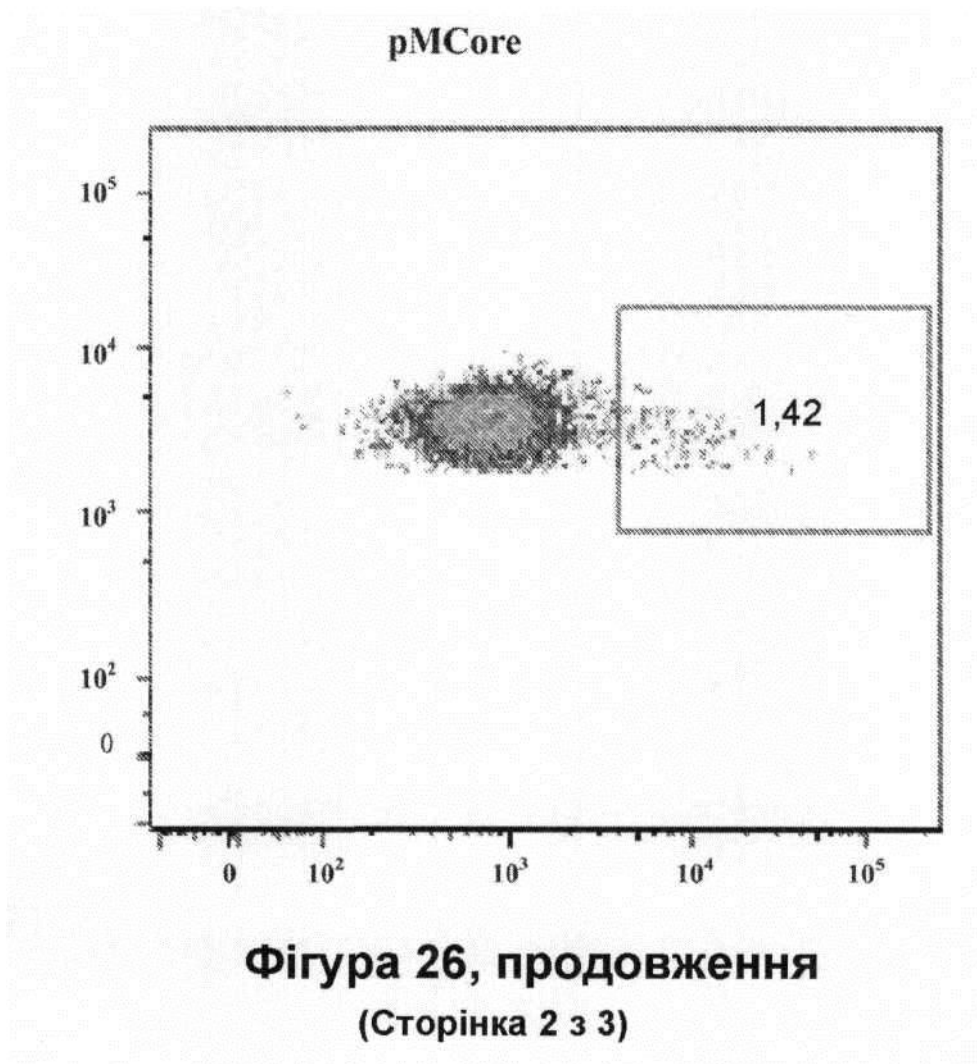


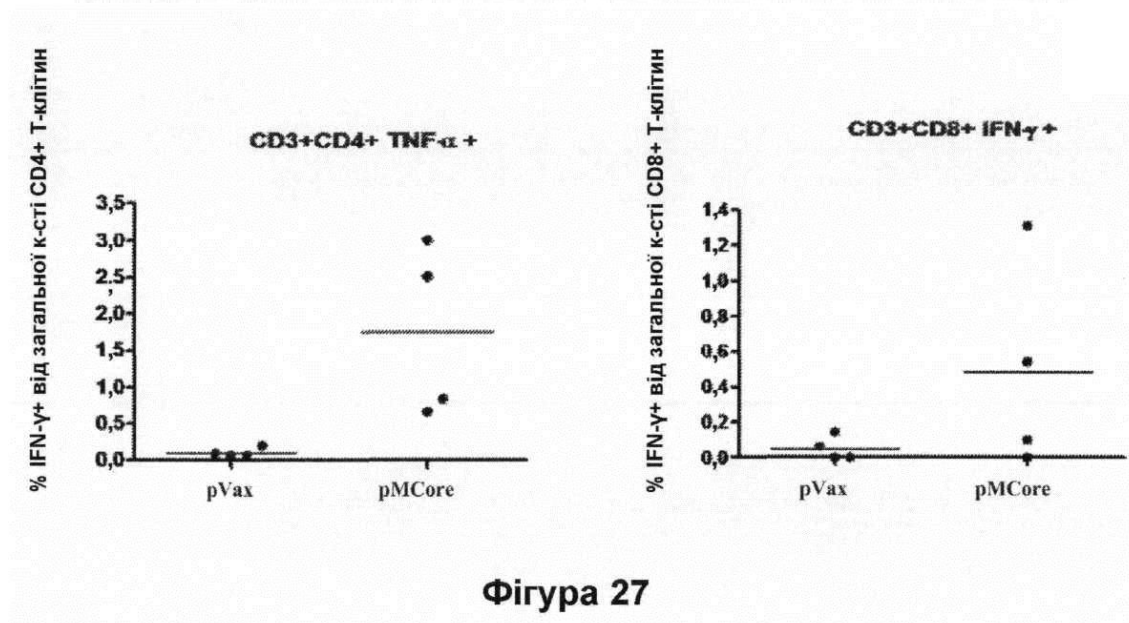
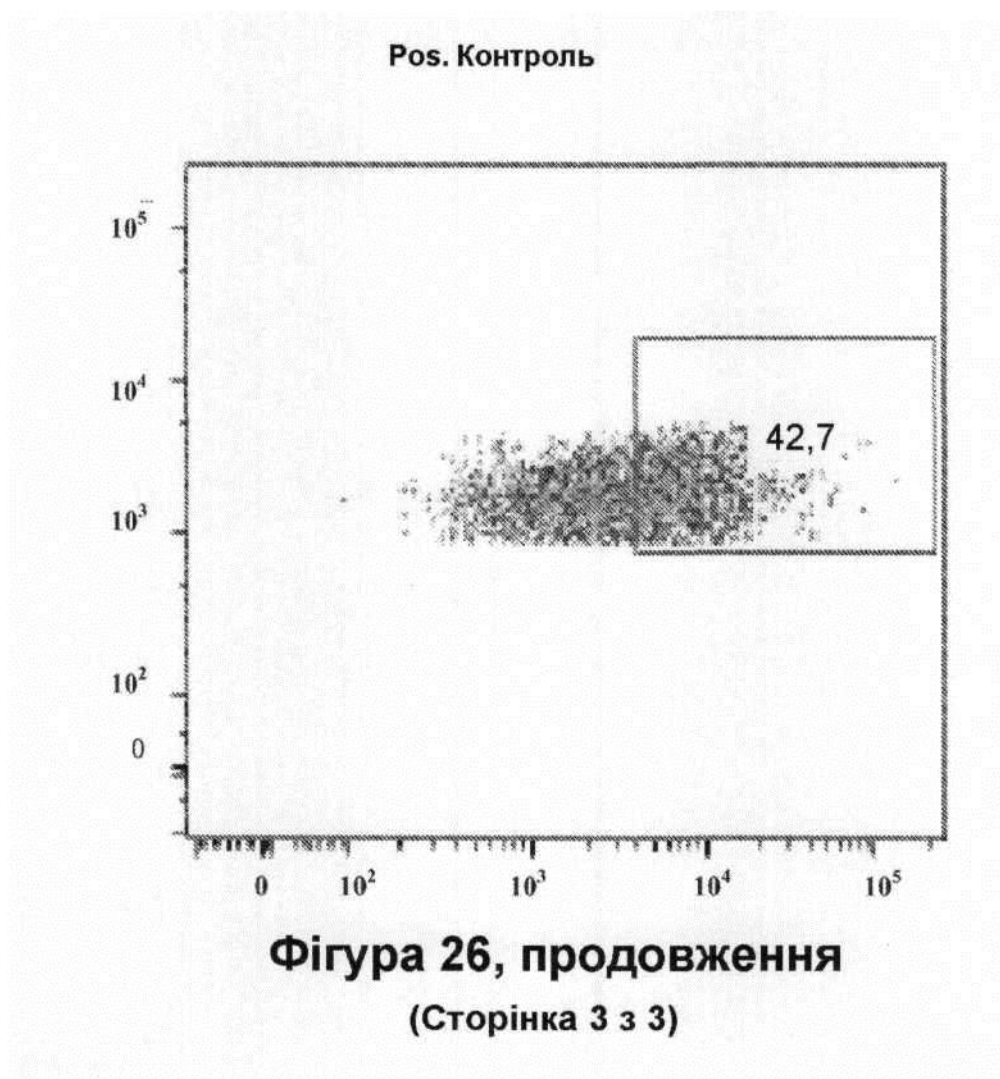


## Pos. Контроль

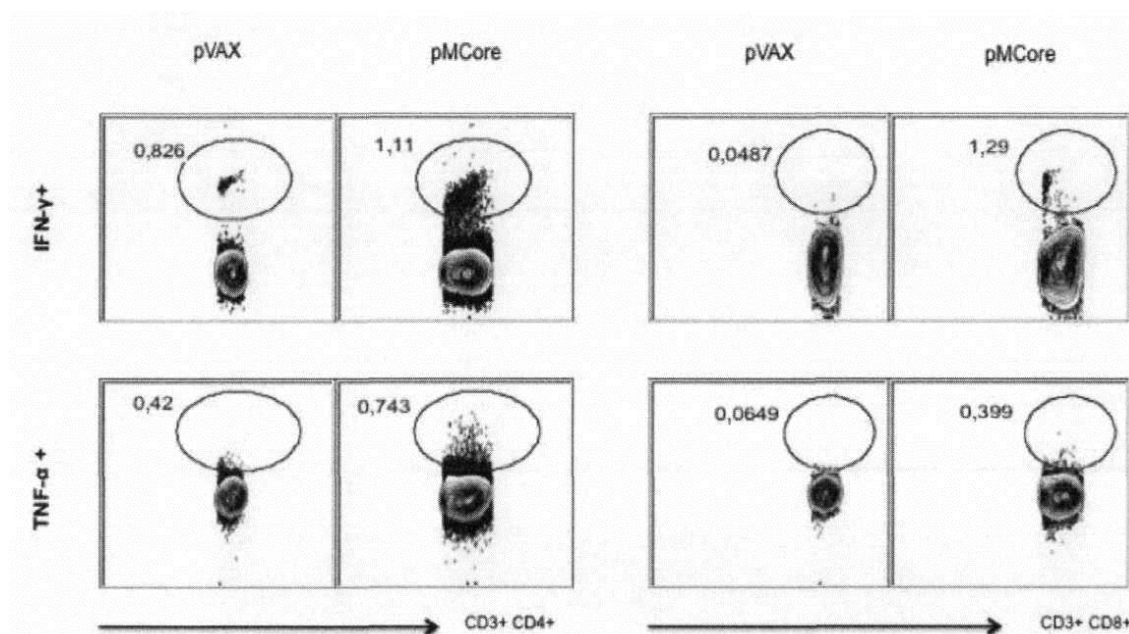


**Фігура 26**  
(Сторінка 1 з 3)

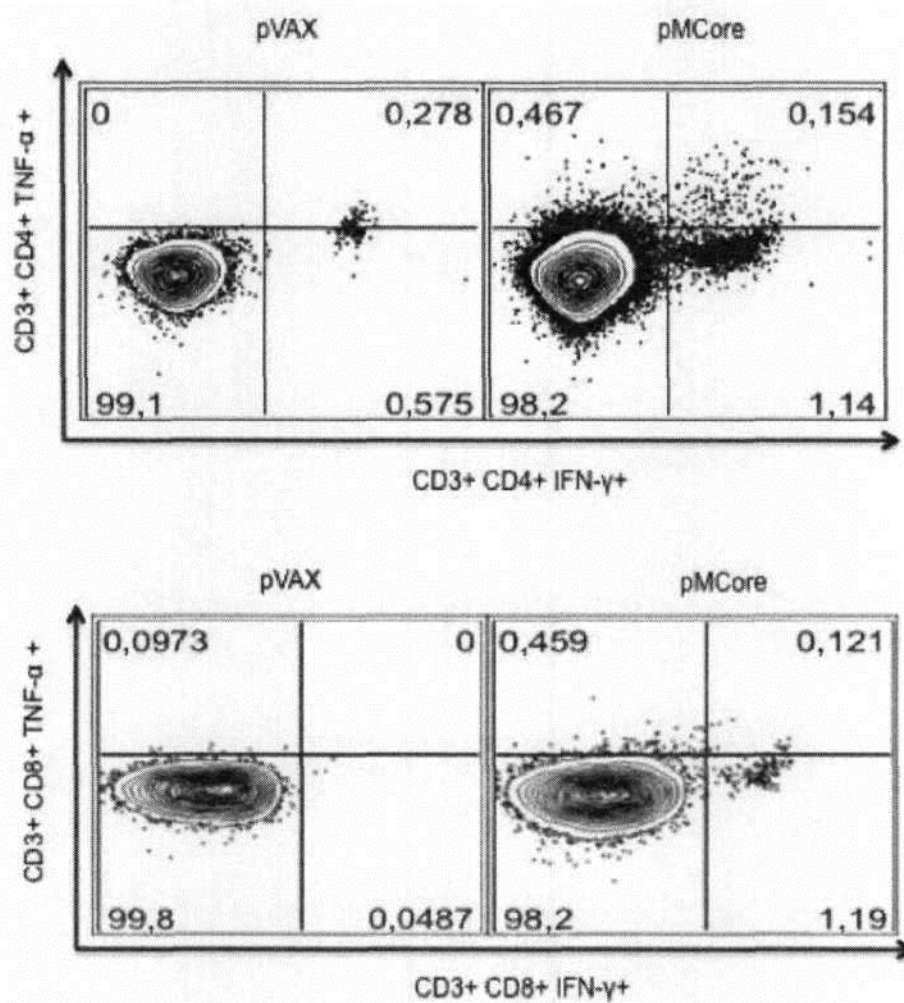




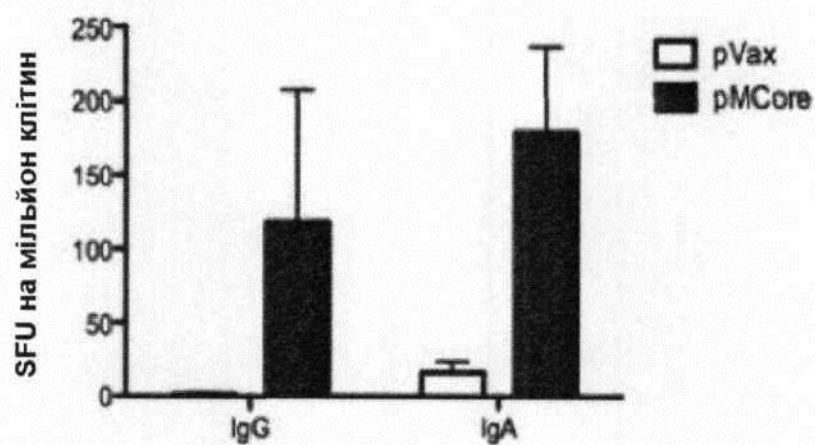




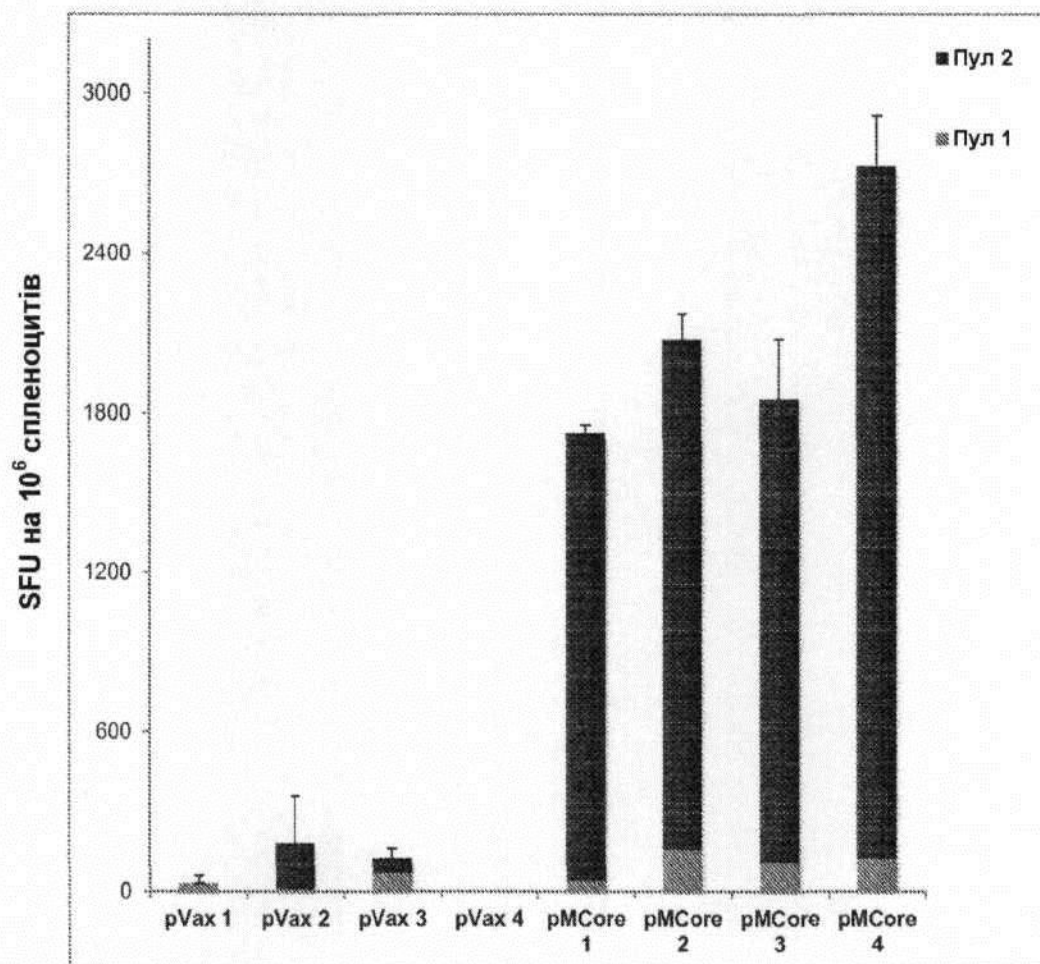
Φίγυρα 28



Φίγυρα 29

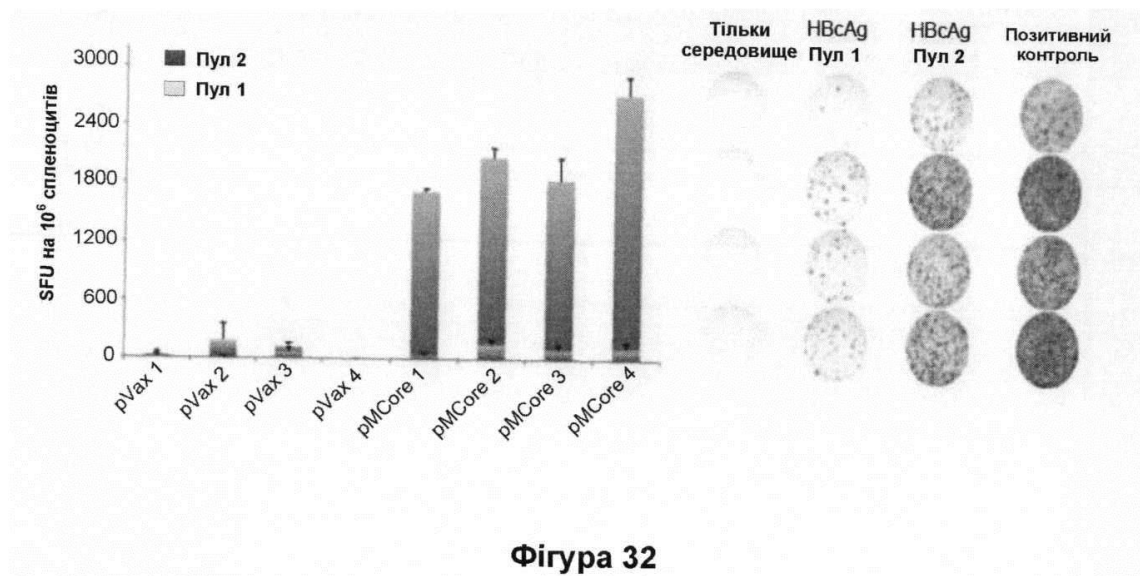


Фігура 30

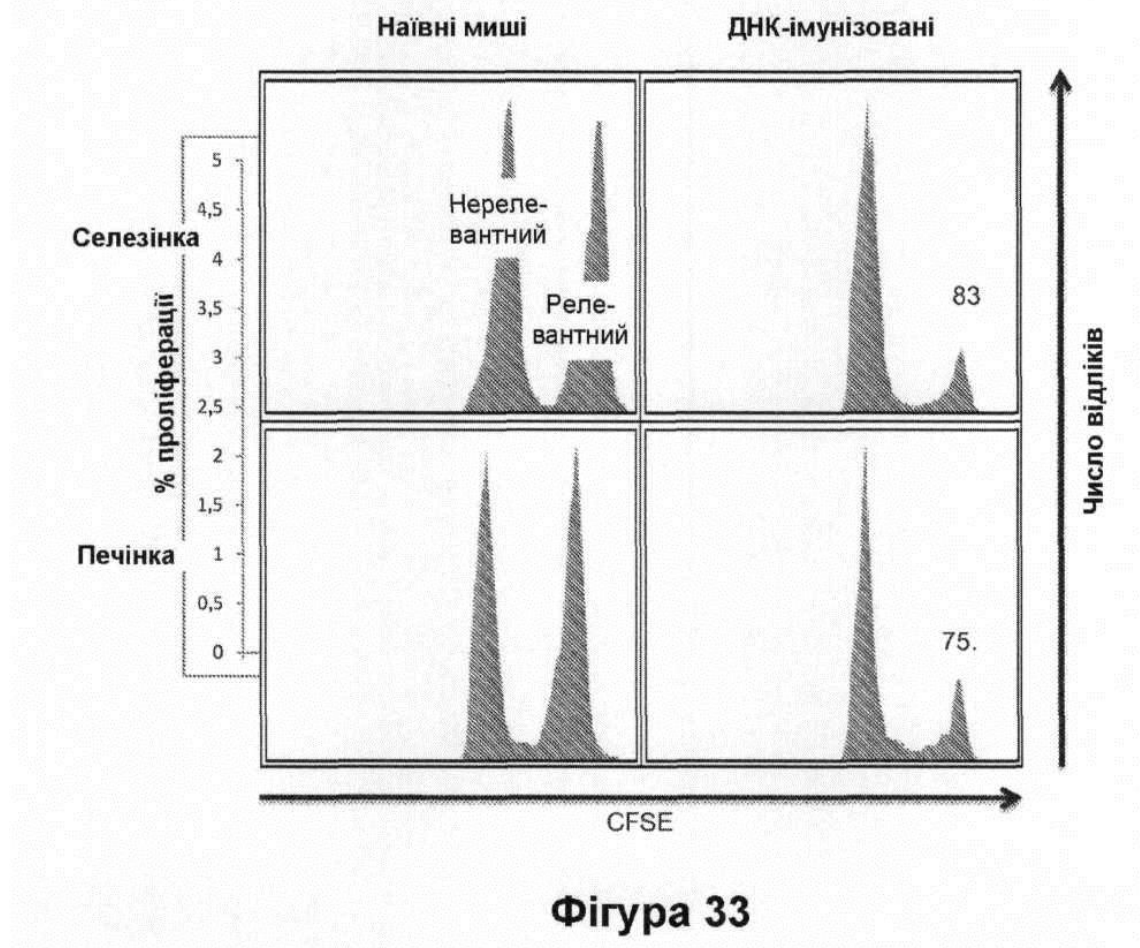


Фігура 31

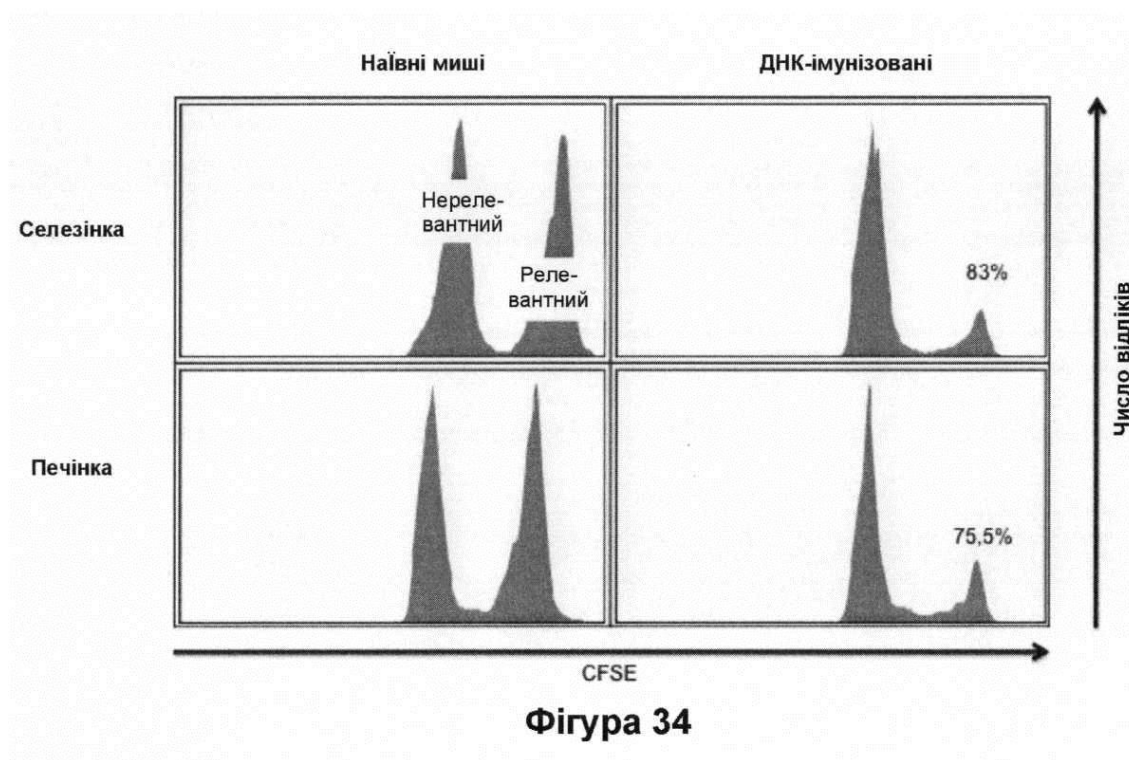


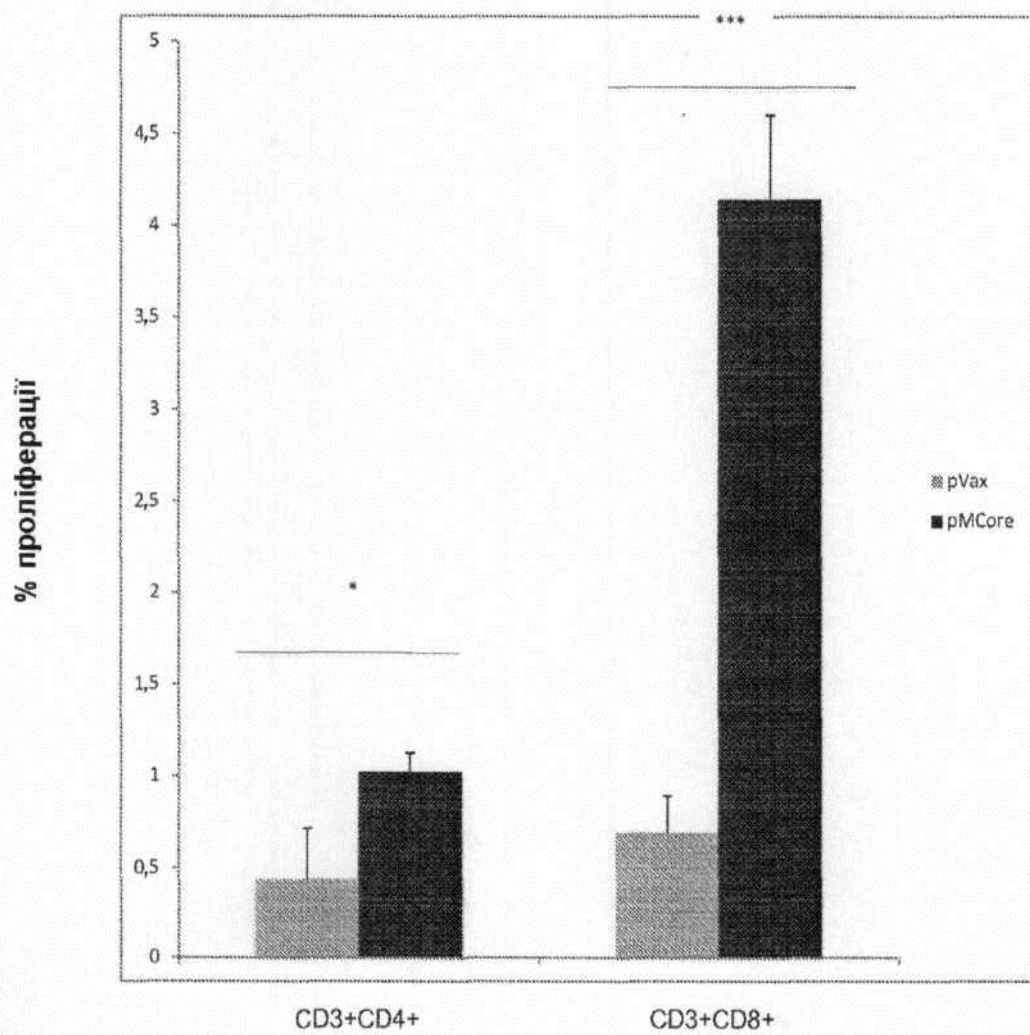


Фігура 32

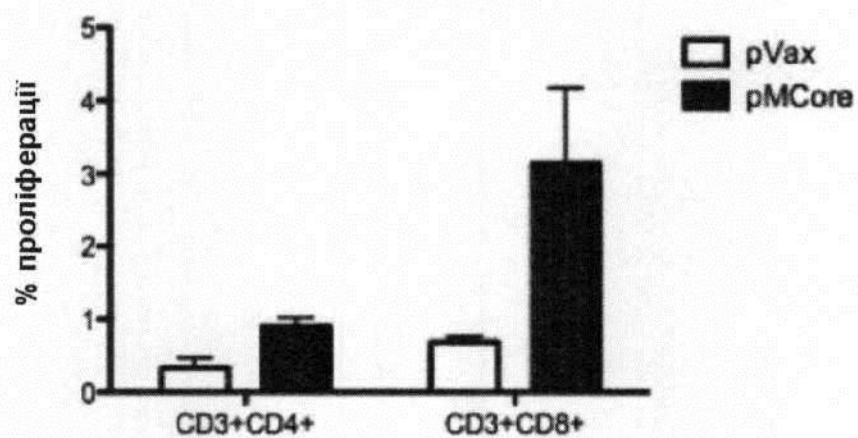


Фігура 33

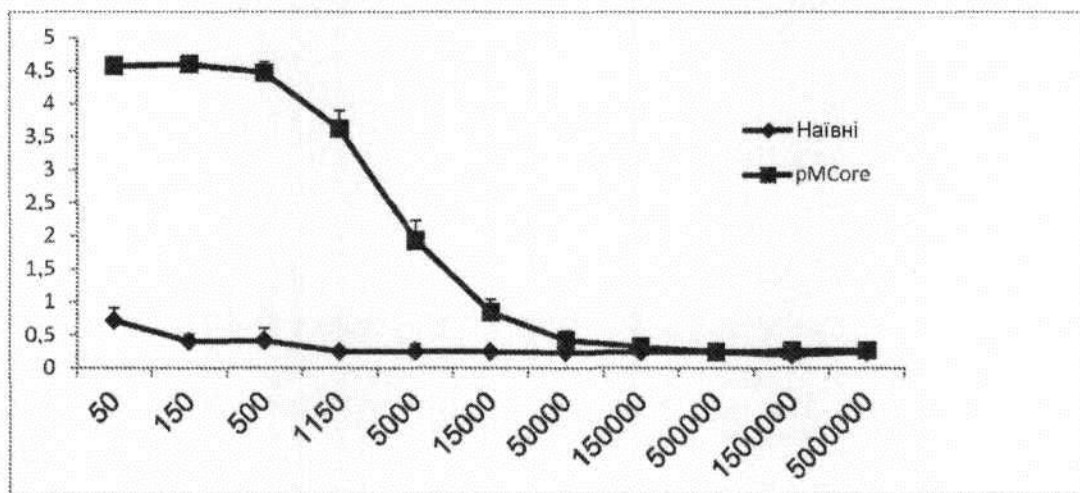




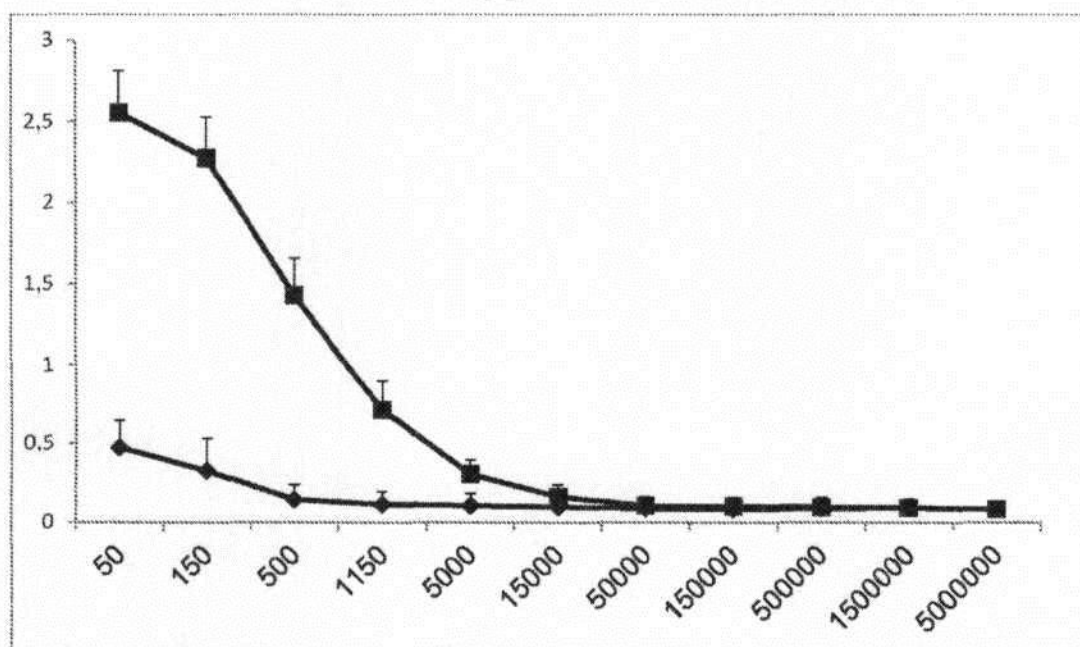
**Фігура 35**



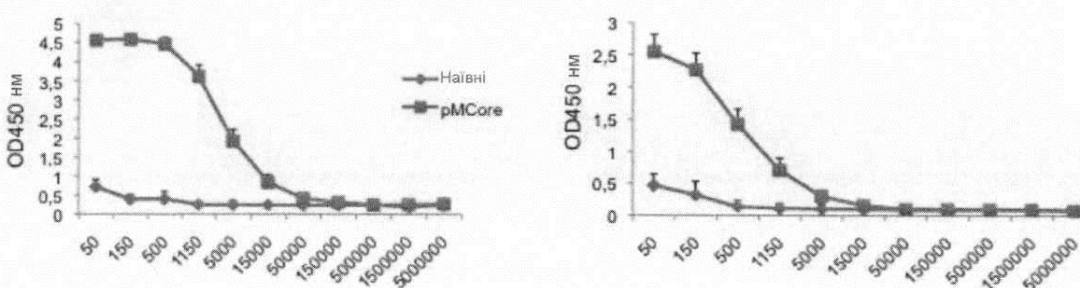
**Фігура 36**



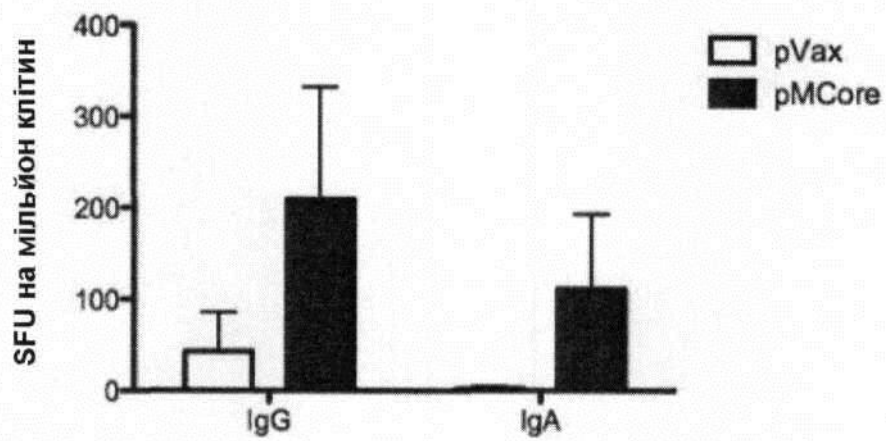
Фігура 37А



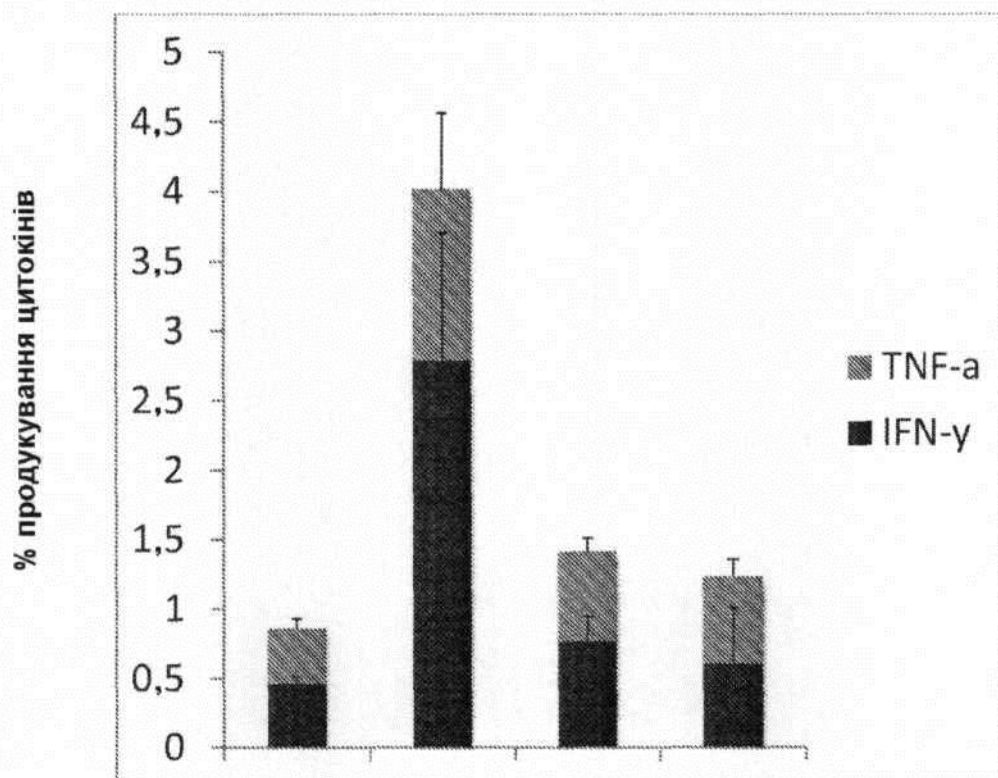
Фігура 37В



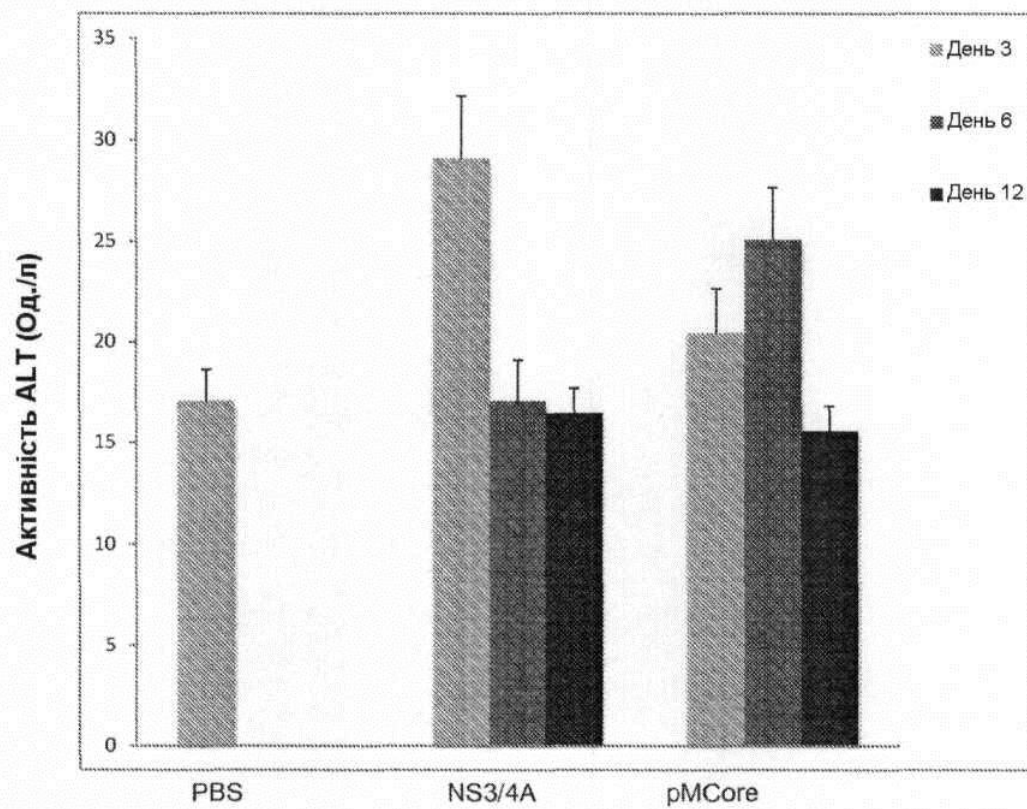
Фігура 38



Фігура 39

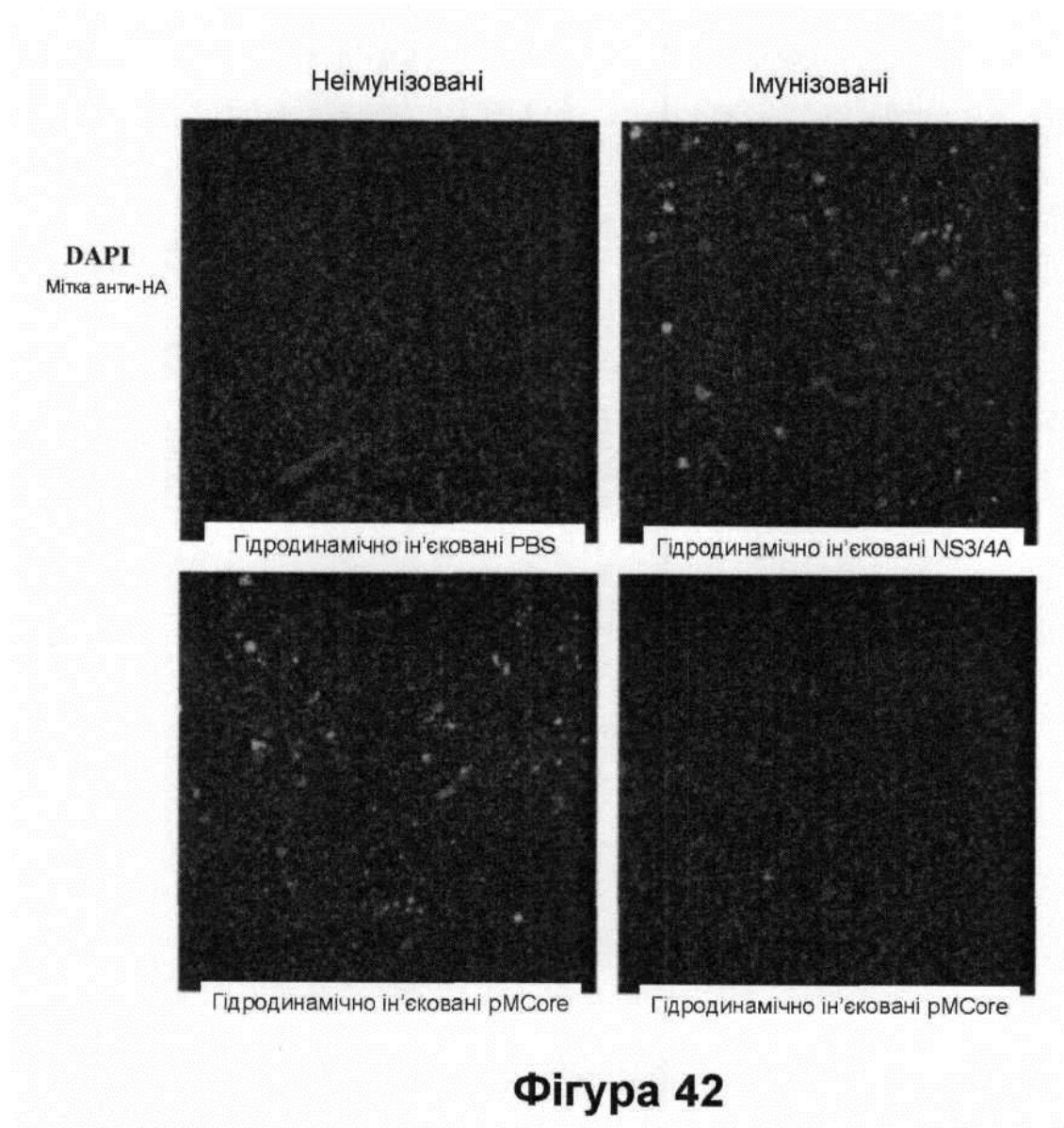


Фігура 40

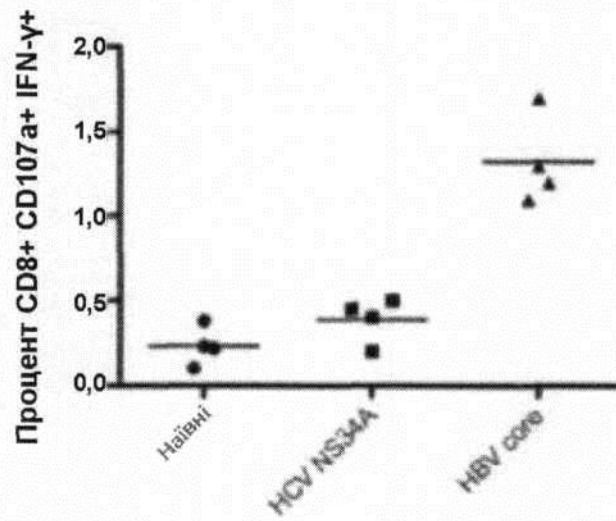


Фігура 41

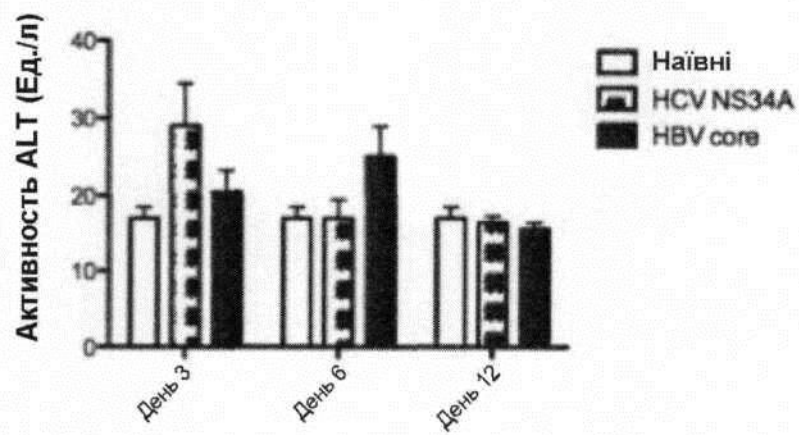




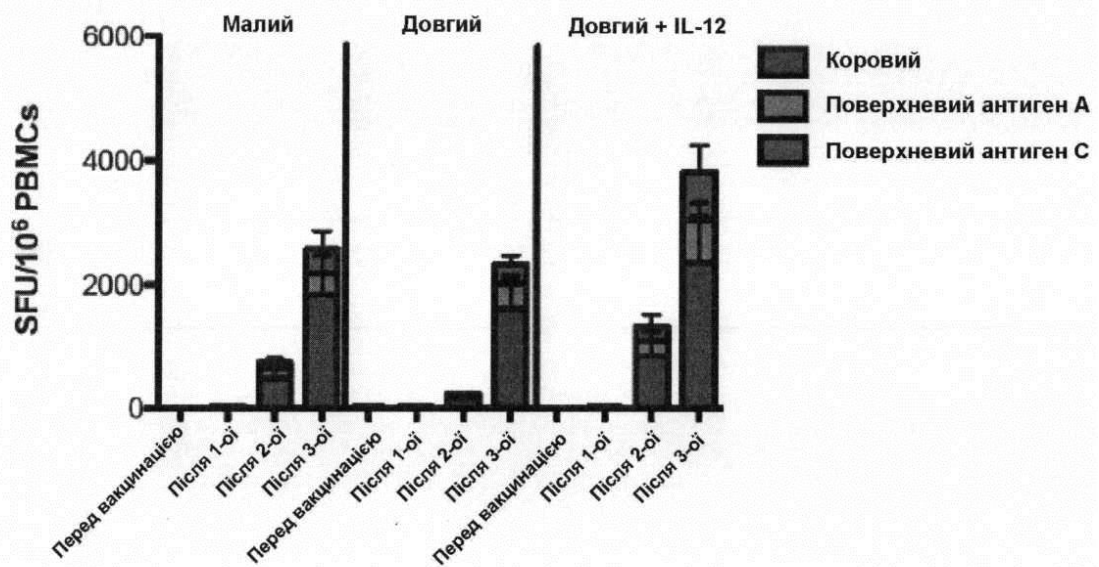




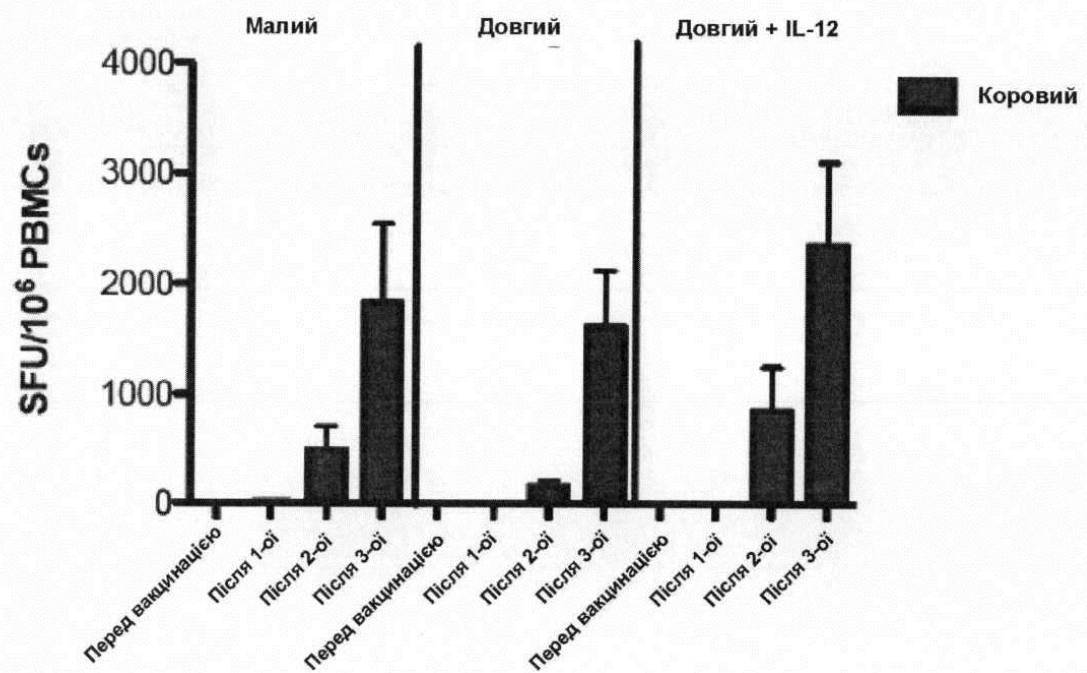
Фігура 43



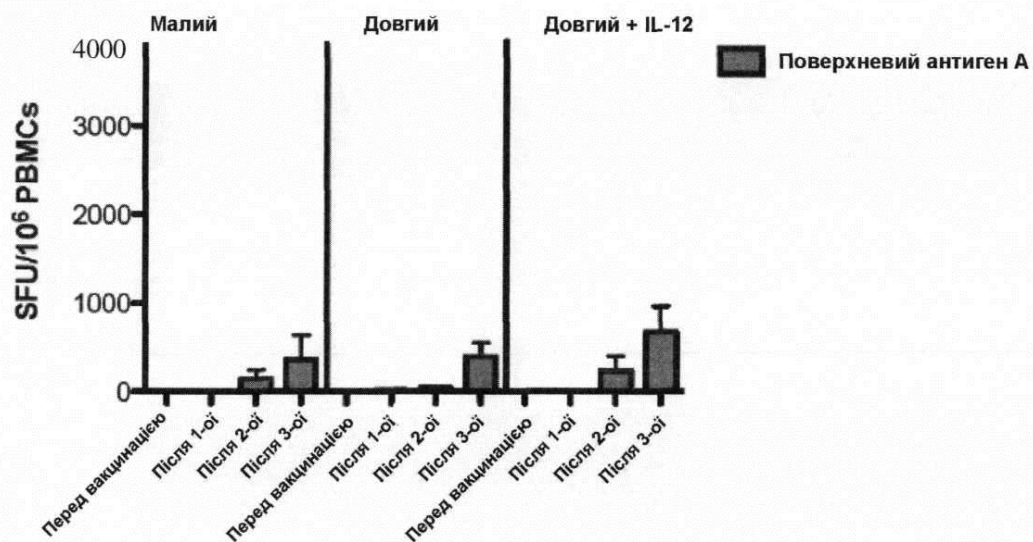
Фігура 44



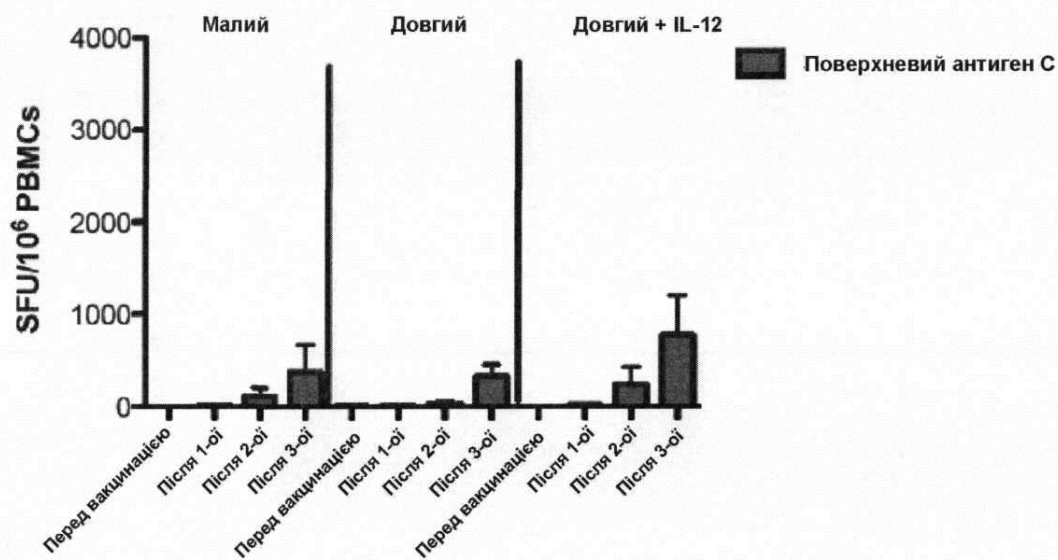
Фігура 45



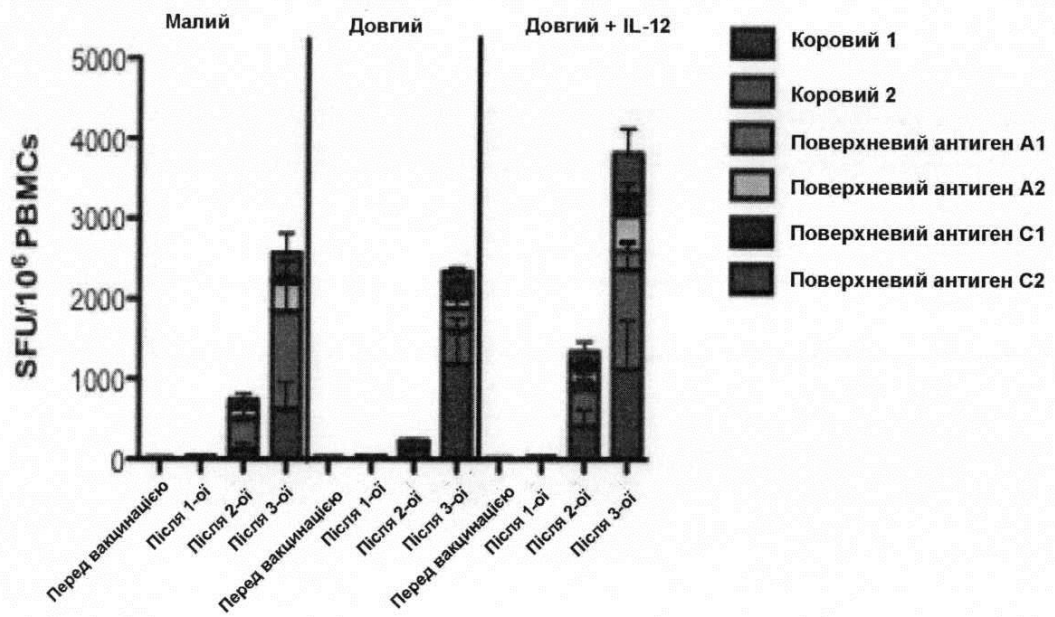
Фігура 46



Фігура 47

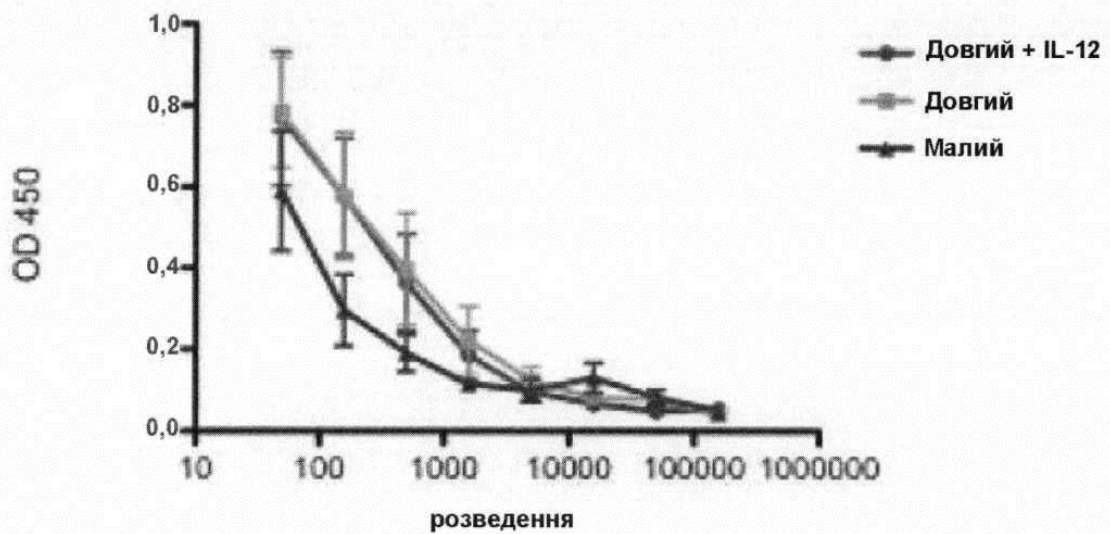


Фігура 48

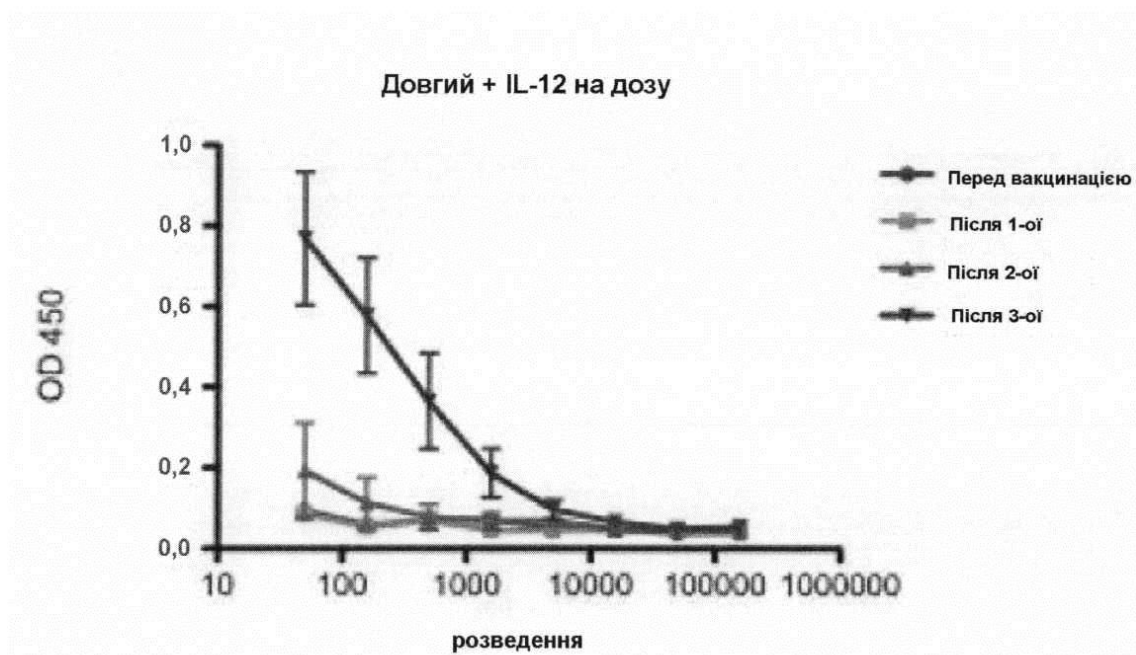


Фігура 49

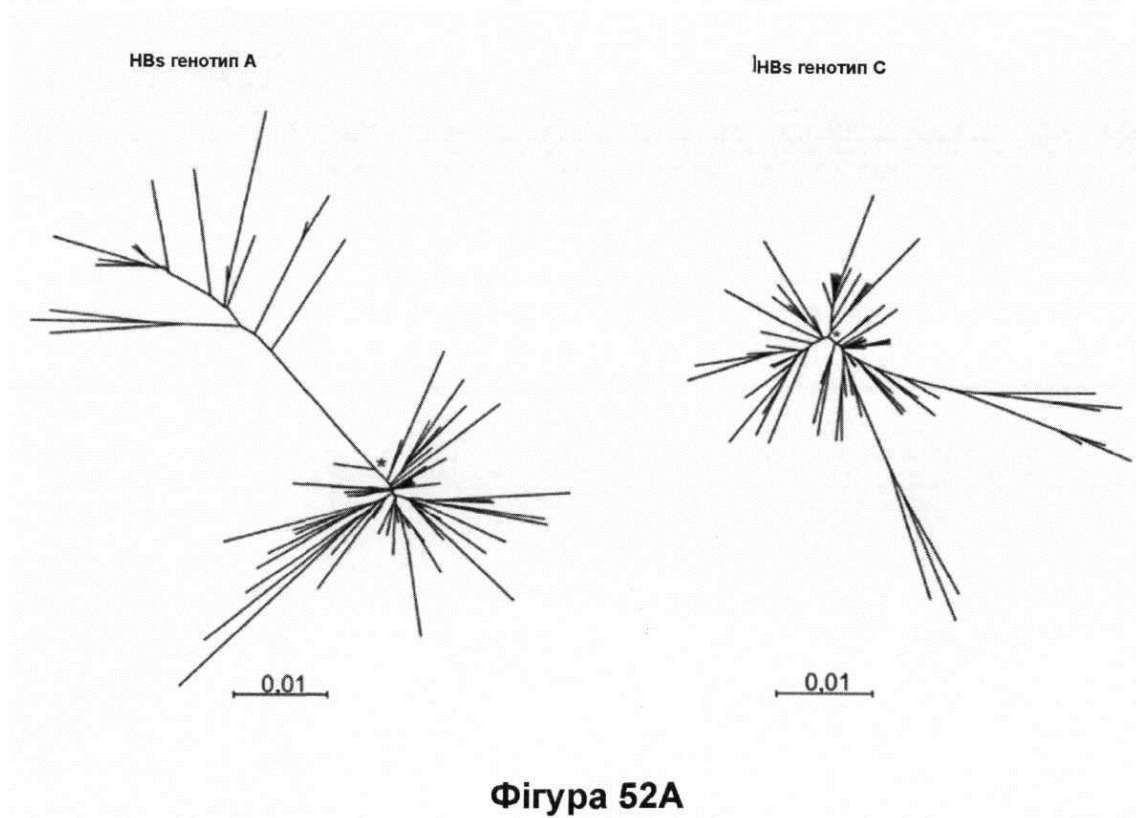
після 3-ої OD



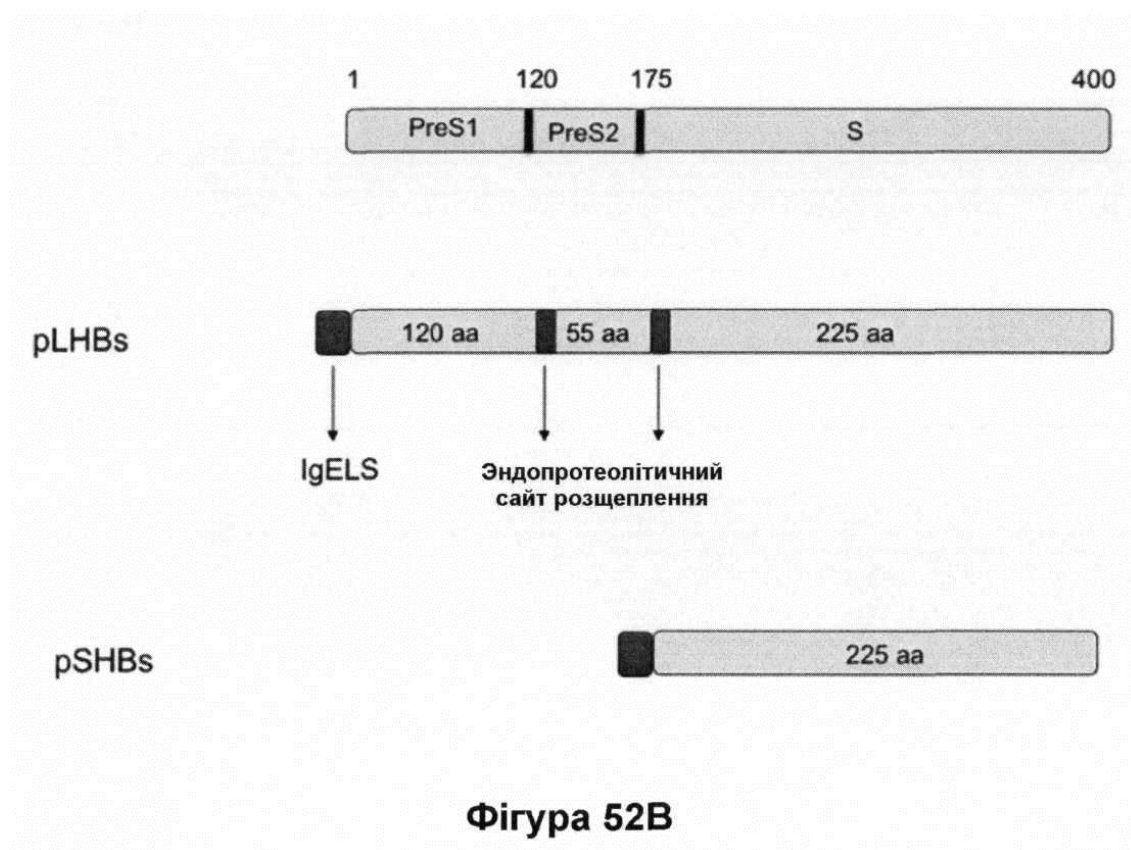
Фігура 50

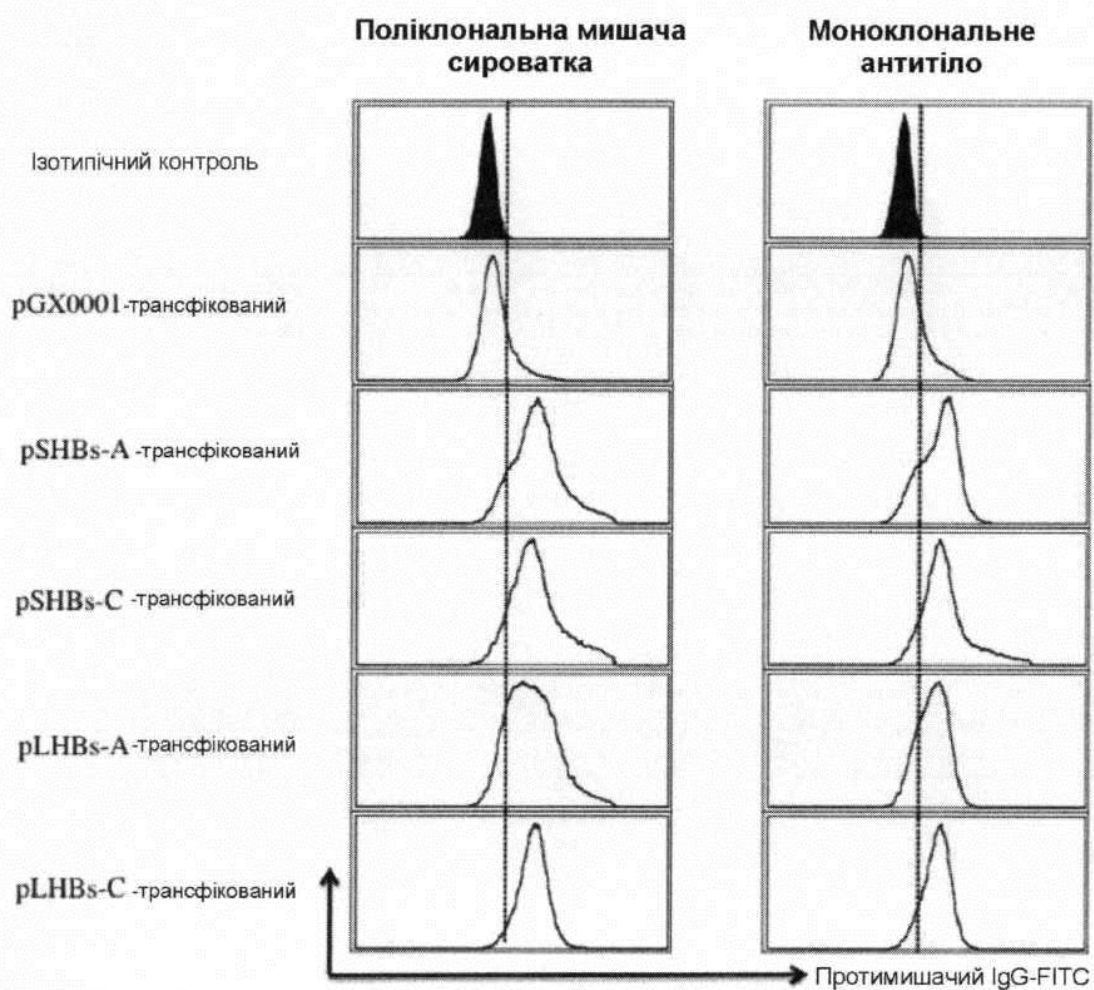


**Фігура 51**



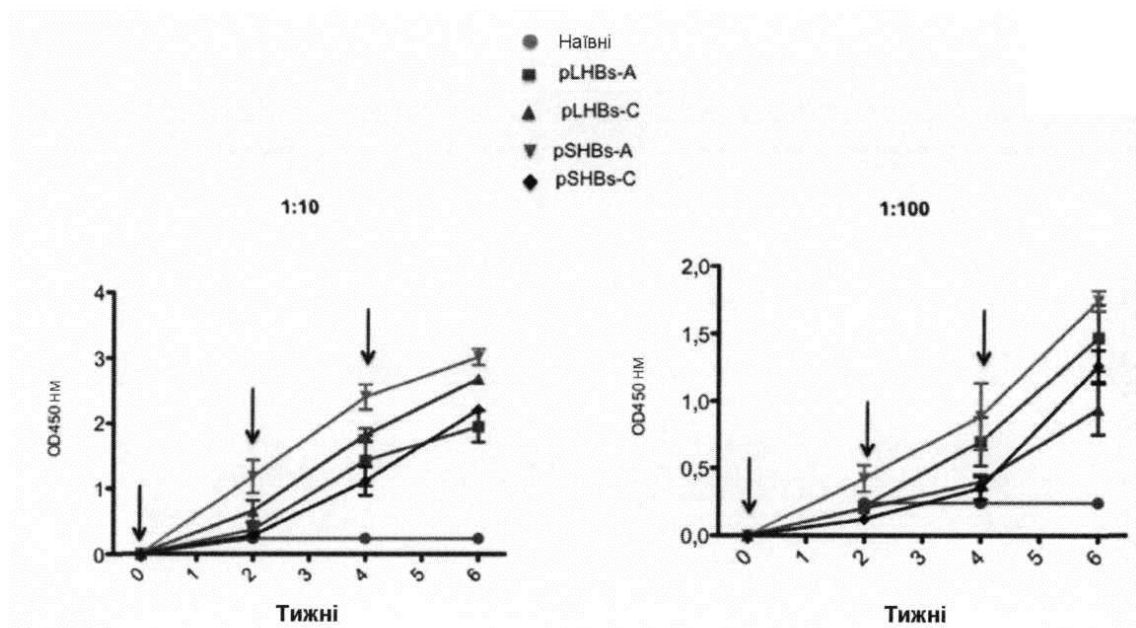
**Фігура 52A**



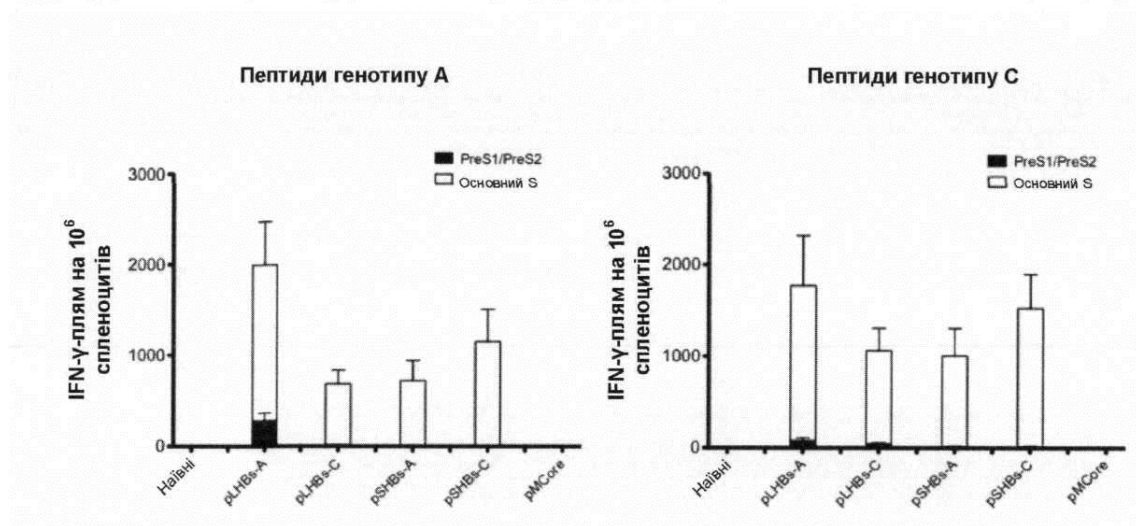


**Фігура 52С**



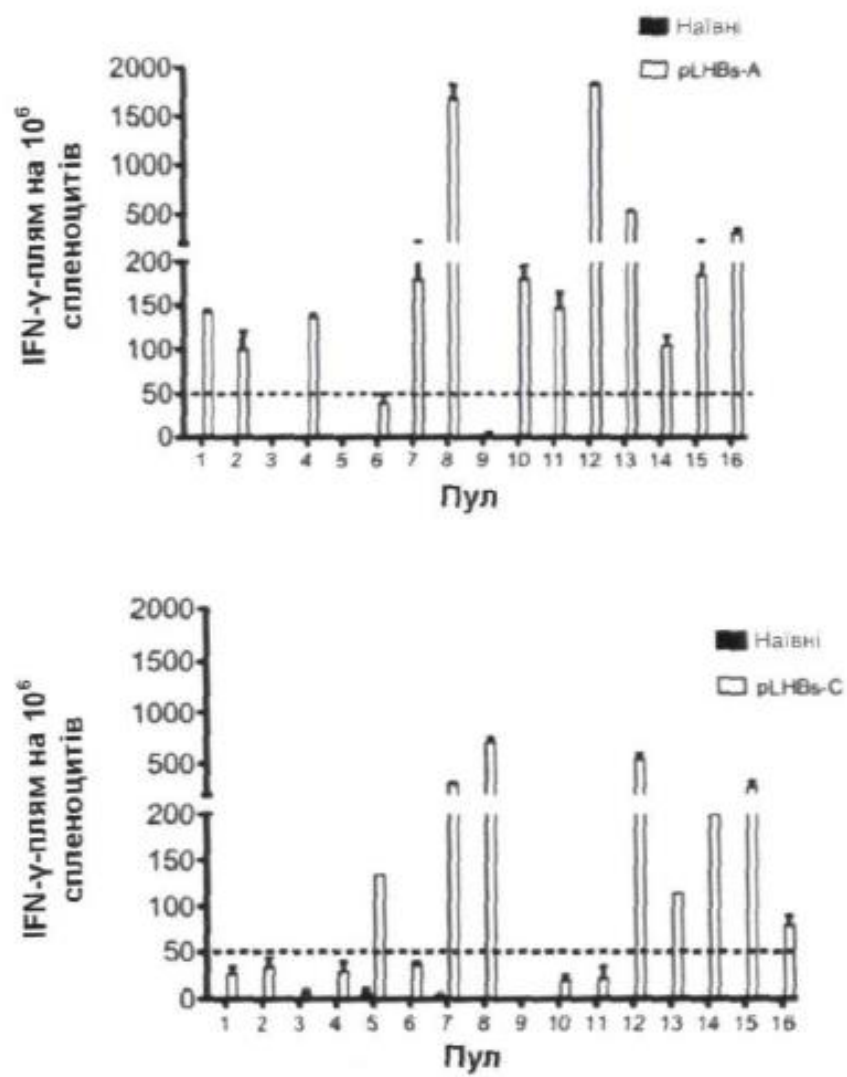


Фігура 53А

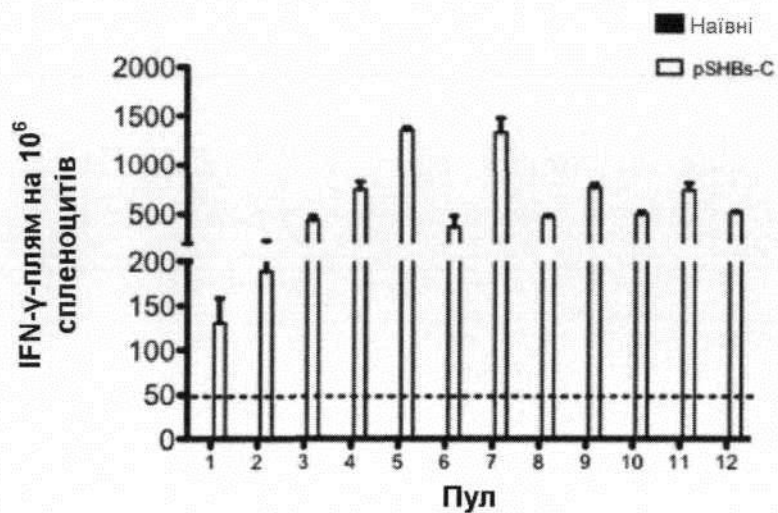
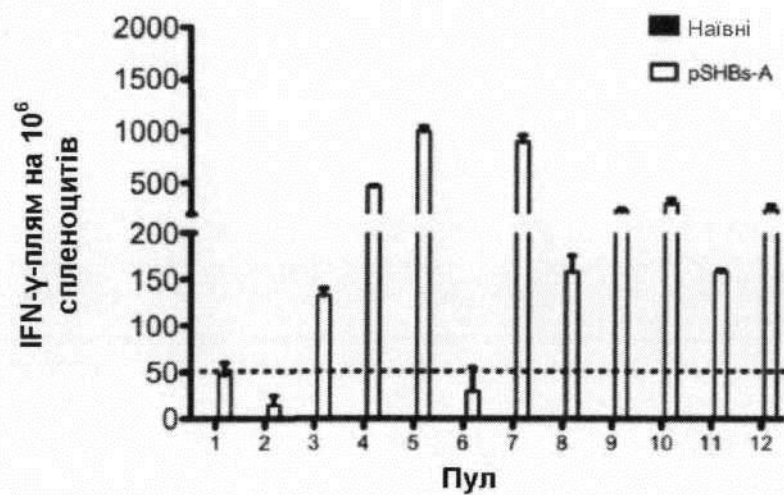


Фігура 53В

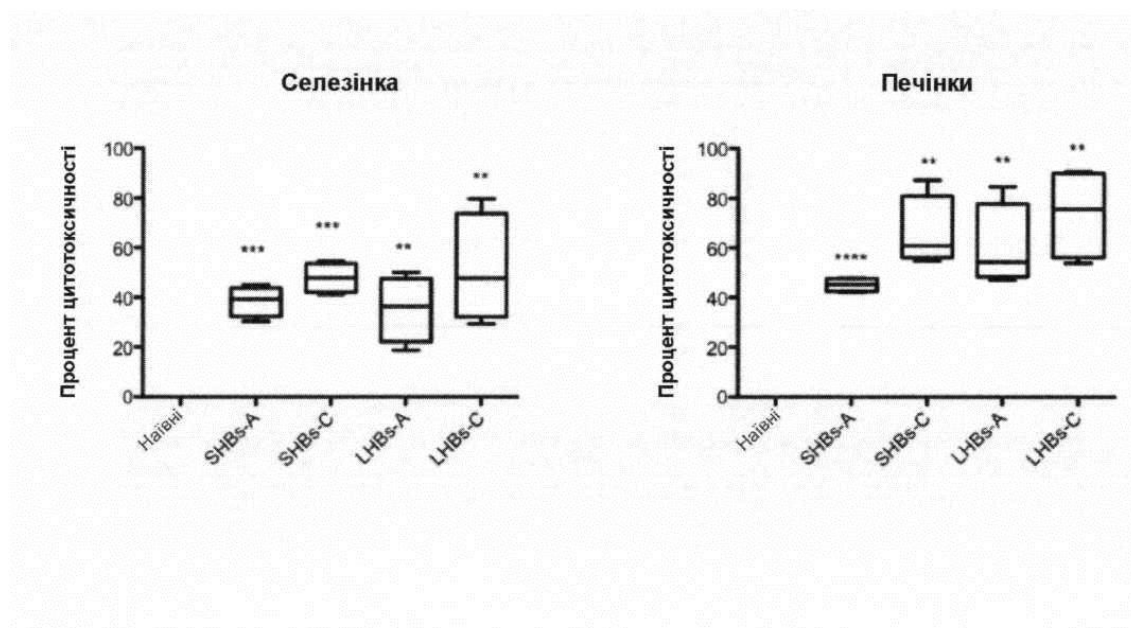




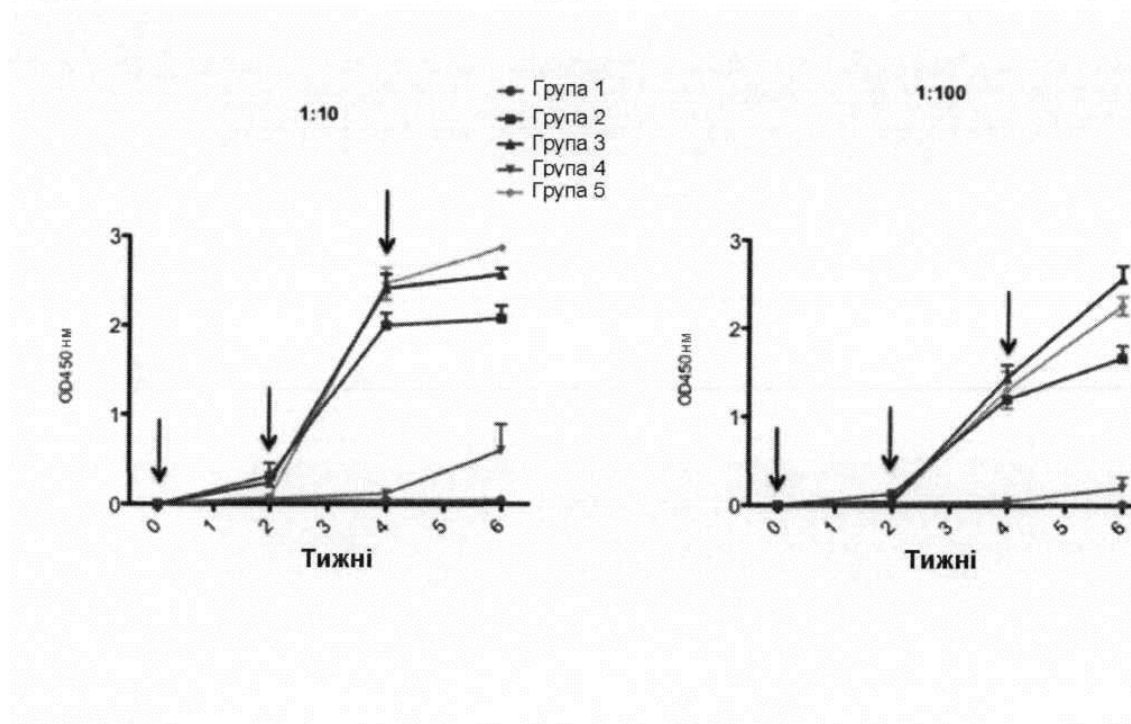
**Фігура 53С**



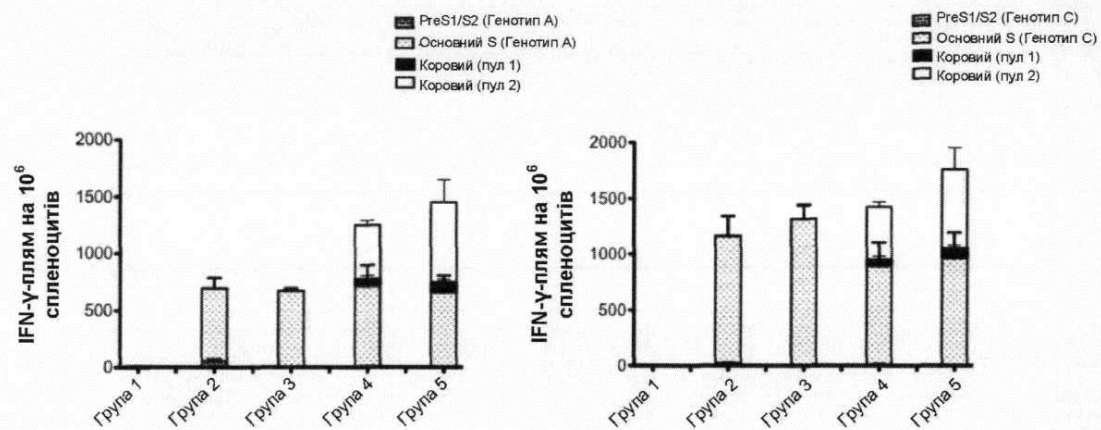
Фігура 53С (прод.)



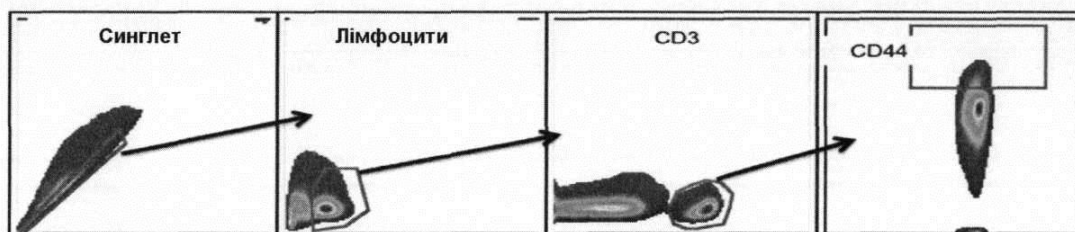
Фігура 54



Фігура 55А

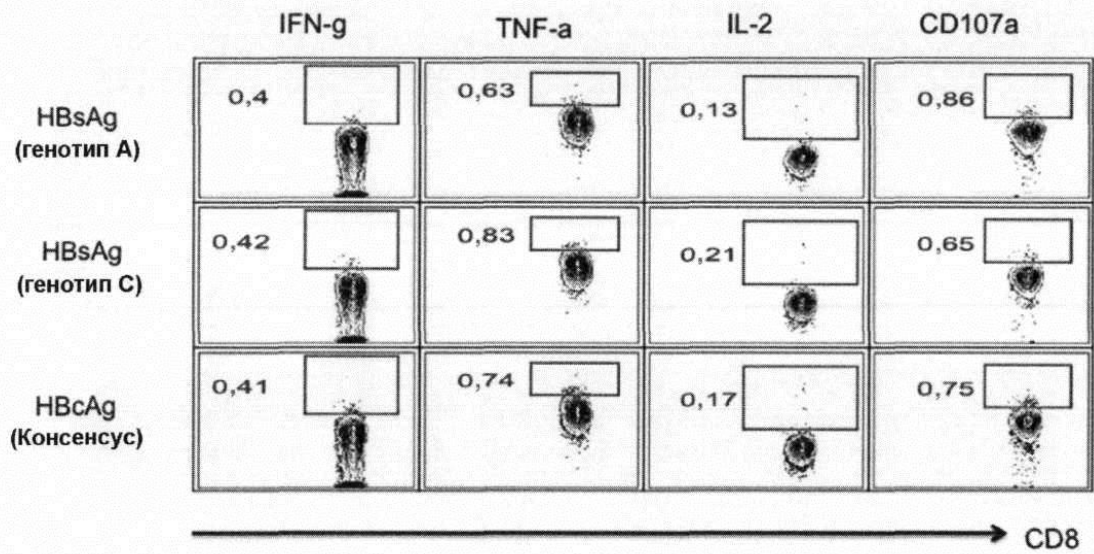


Фігура 55B



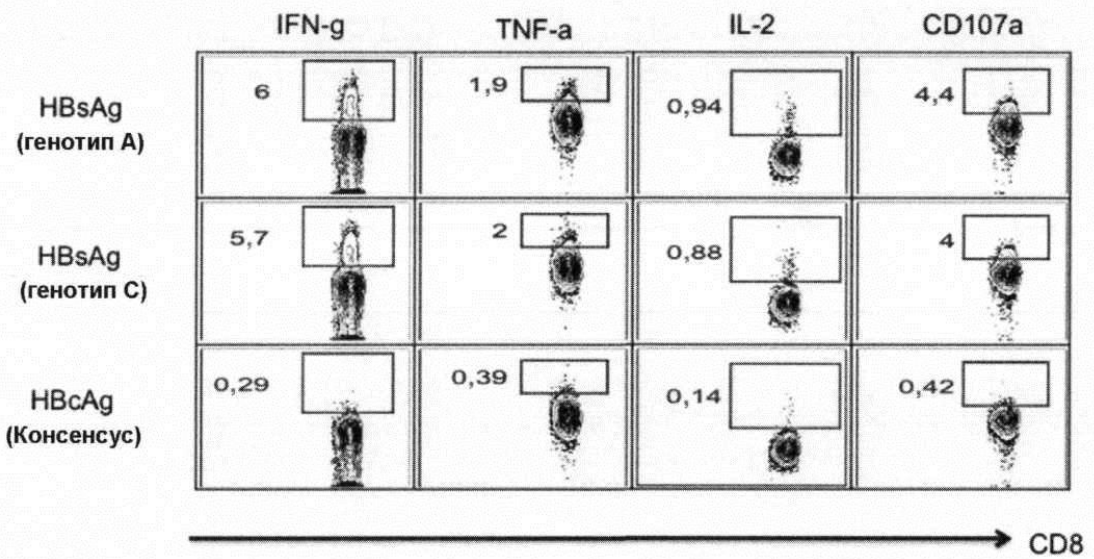
Фігура 56A

Група 1 – тільки рGX0001

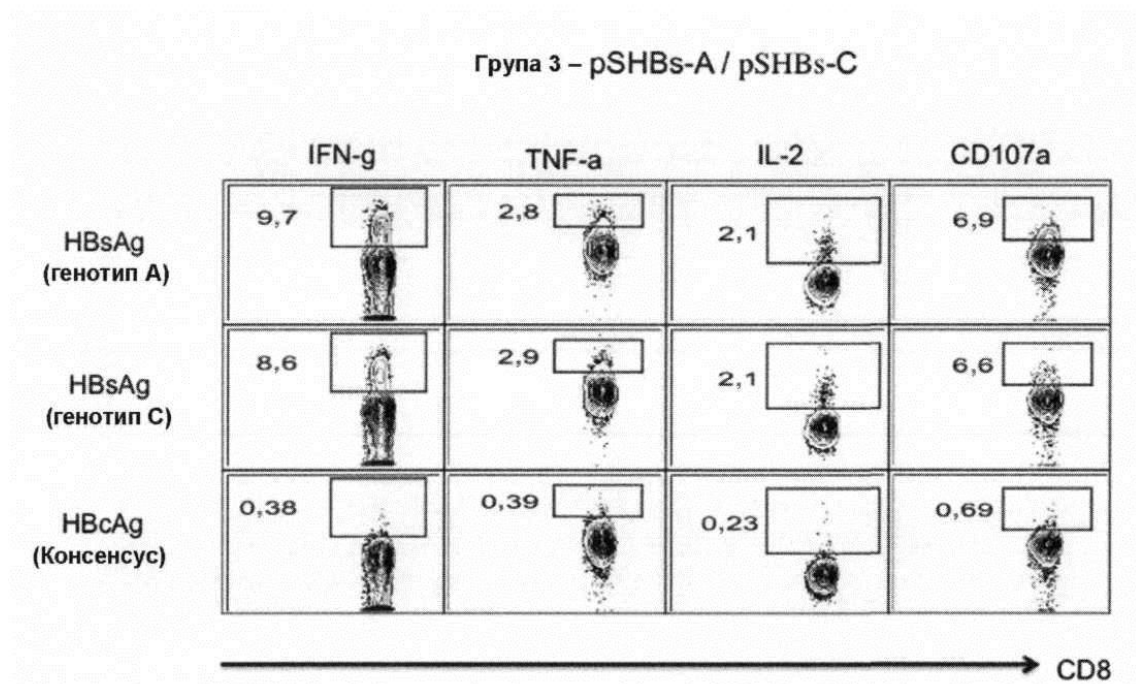


Фігура 56В

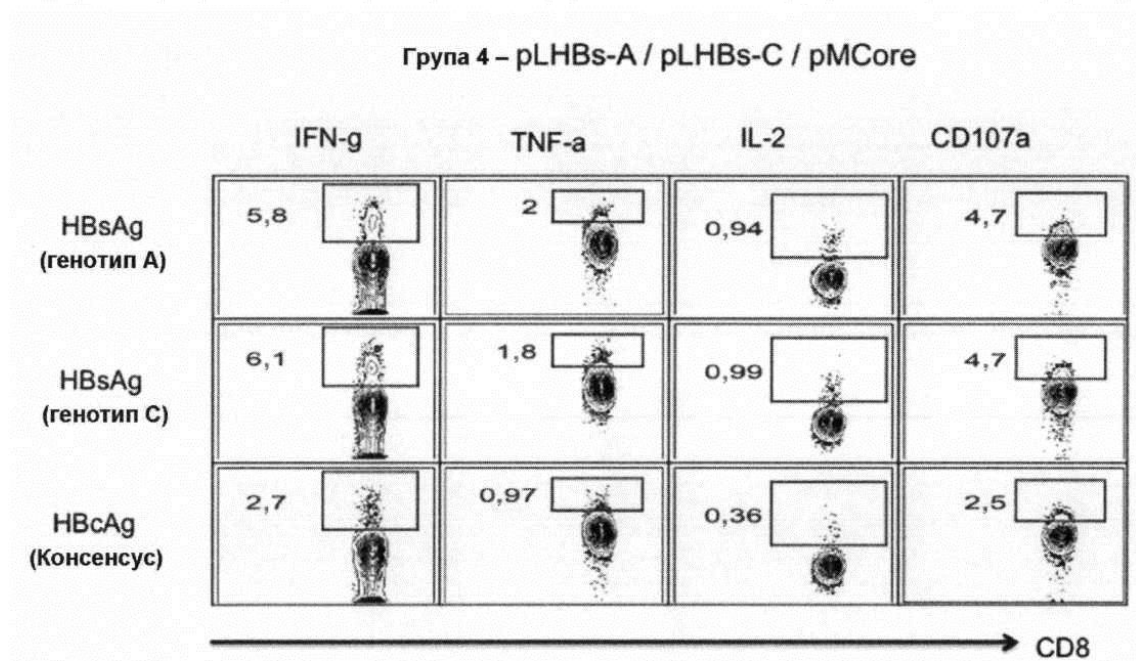
Група 2 – рLHBs-A / рLHBs-C



Фігура 56С

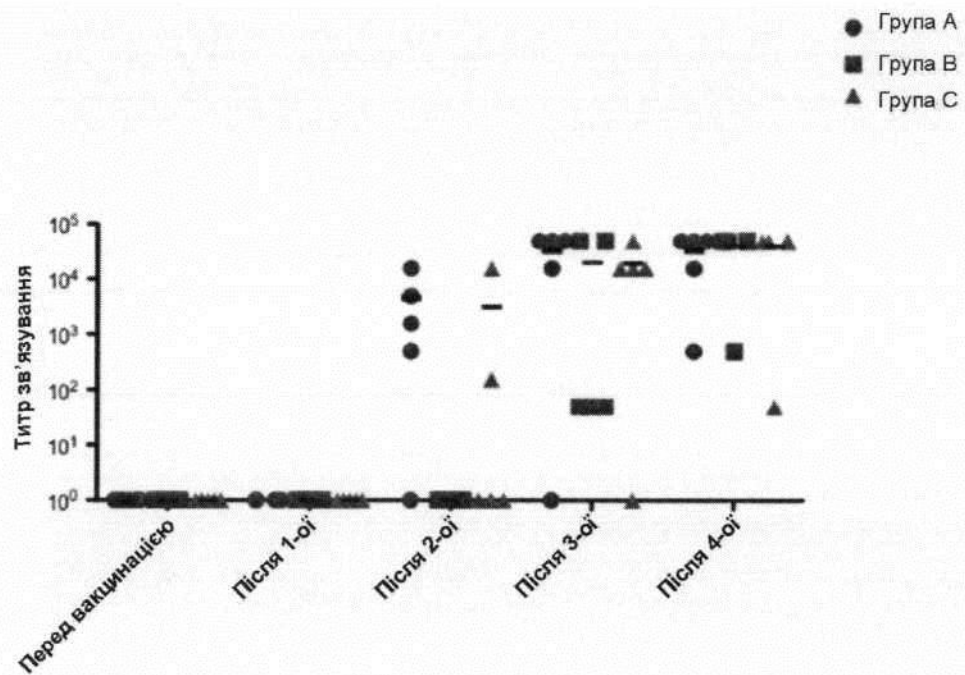
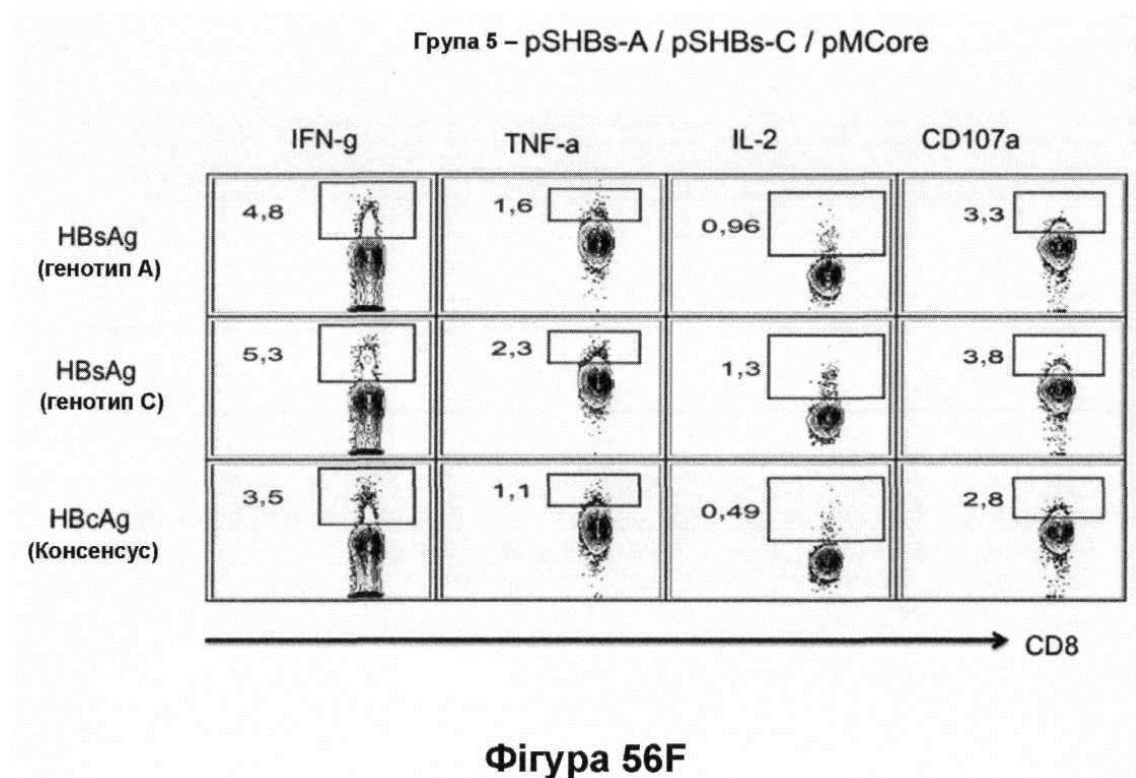


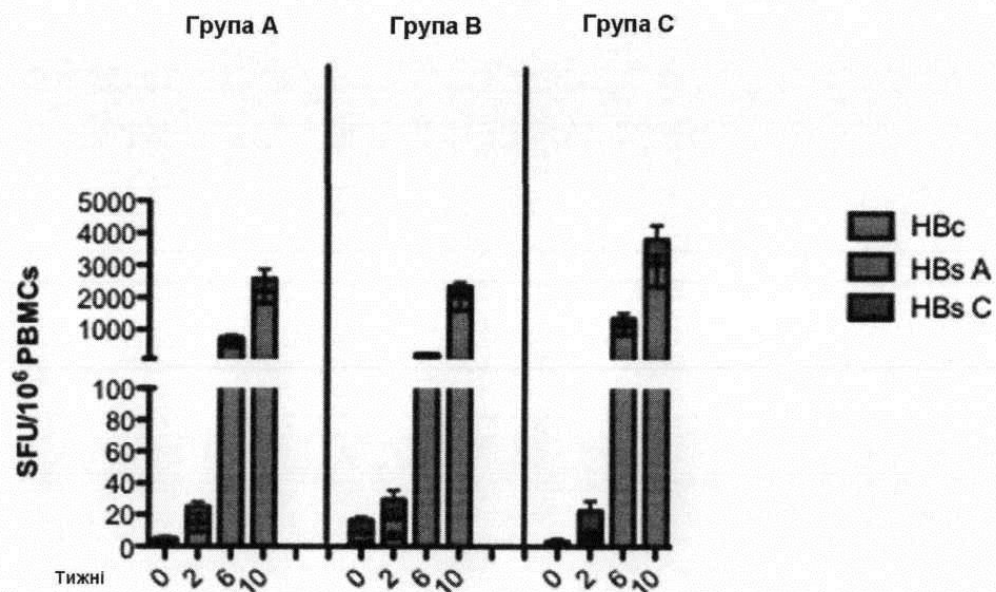
**Фігура 56D**



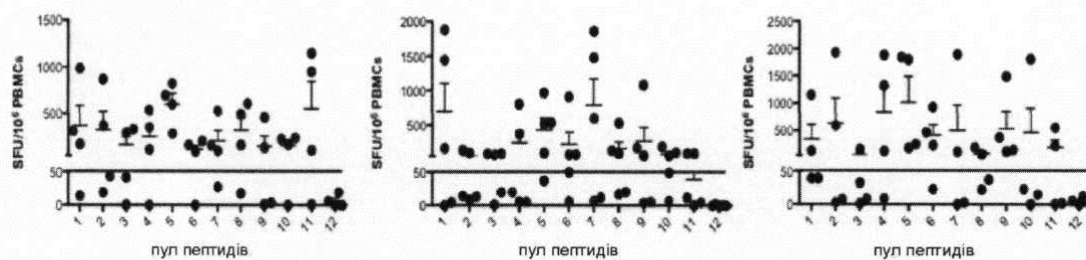
**Фігура 56E**







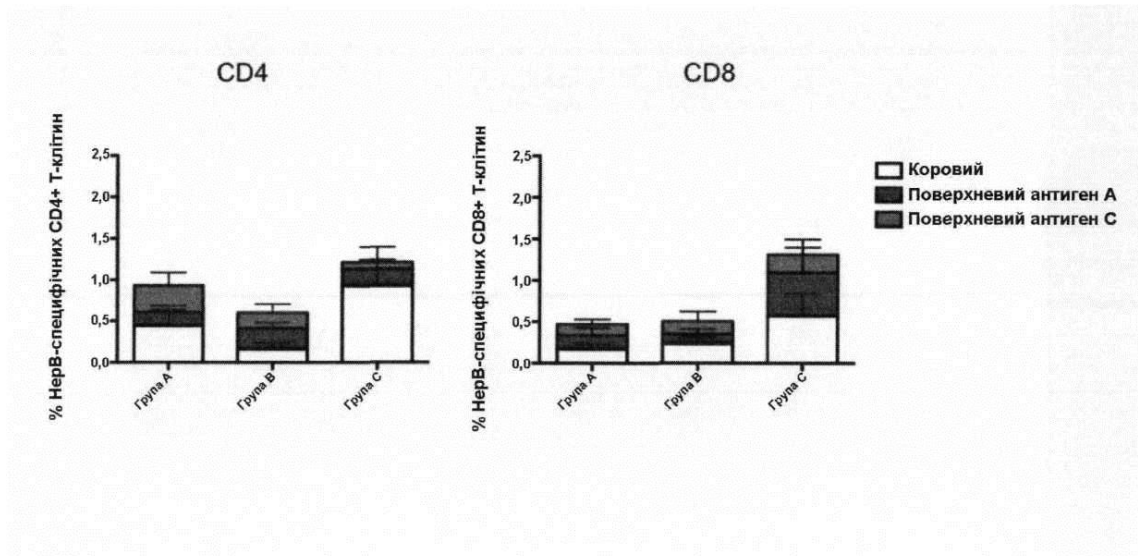
Фігура 57В



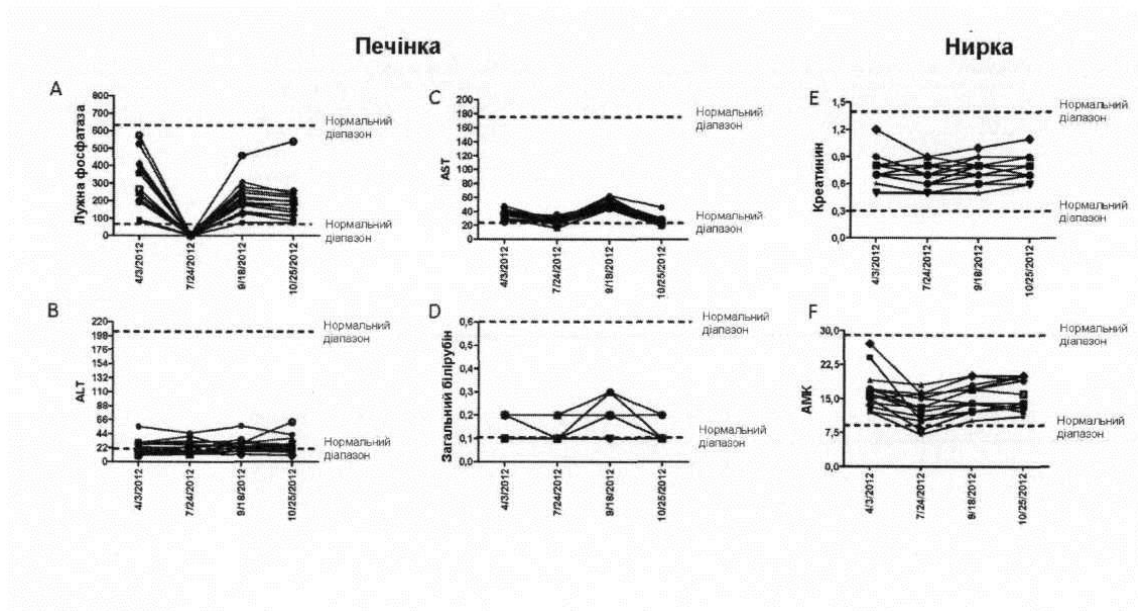
| Група   | ID мавпи | Позитивні матричні пули           | Позитивні пептидні епітопи |
|---------|----------|-----------------------------------|----------------------------|
| Група А | 4634     | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 | 30                         |
|         | 5022     | 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10           | 16                         |
|         | 4943     | 1, 2, 5, 6, 7, 8, 11              | 12                         |
|         | 4942     | 1, 2, 4, 5, 10, 11                | 10                         |
|         | 4954     | 2, 5, 10                          | 2                          |
| Група В | 4628     | 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11       | 20                         |
|         | 5018     | 1, 2, 3, 7, 10                    | 6                          |
|         | 4941     | 5, 6, 8, 11                       | 4                          |
|         | 4938     | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11           | 12                         |
|         | 4939     | 5, 6, 9                           | 2                          |
| Група С | 4639     | 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11          | 16                         |
|         | 4945     | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11       | 18                         |
|         | 4946     | 5, 6, 7, 8, 9                     | 6                          |
|         | 5015     | 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11        | 20                         |
|         | 5019     | 4, 5, 9                           | 3                          |

Фігура 57С

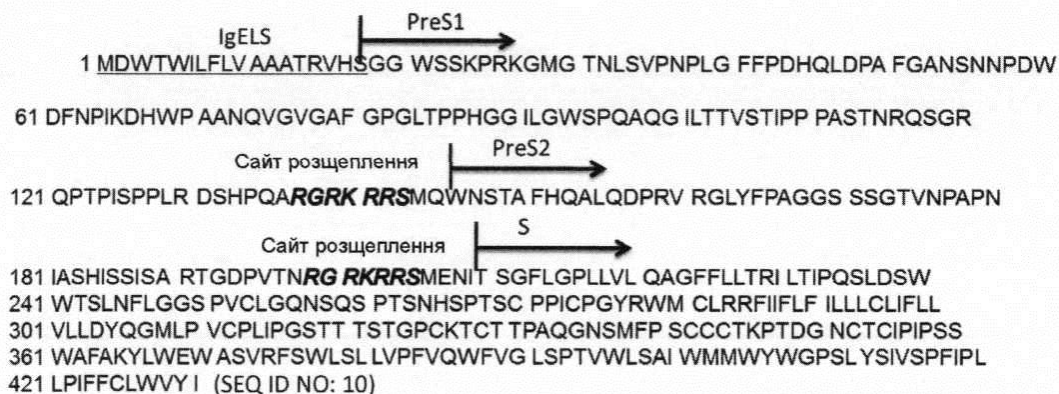




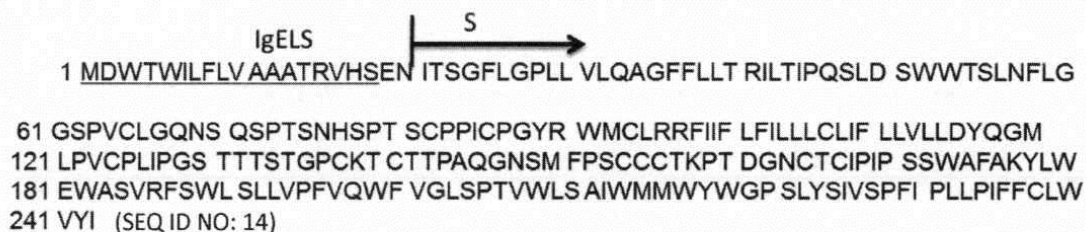
Фігура 57D



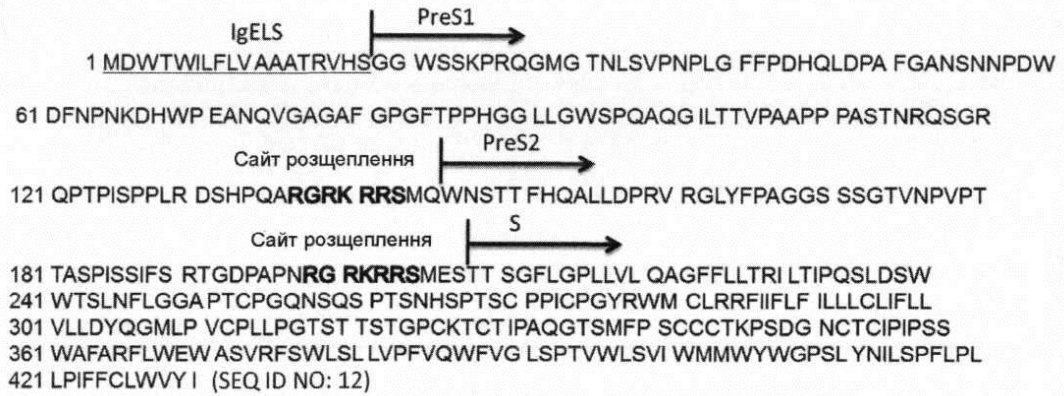
Фігура 58



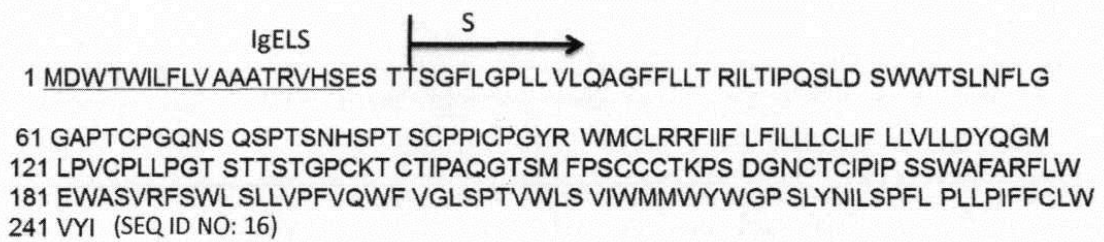
### Фігура 59A



### Фігура 59B


  
 1 MDWTWILFLVAAATRVHSGG WSSKPRQGMG TNLSVPNPLG FFDHQLDPA FGANSNNPDW
   
 61 DFNPNDHWP EANQVGAGAF GPGFTPPHGG LLGWSPQAQG ILTTVPAAPP PASTNRQSGR
   
 121 QPTPISPPLR DSHPQARGRK RRSMQWNSTT FHQALLDPRV RGLYFPAGGS SSGTVNPVPT
   
 181 TASPISIFS RTGDPAPNRG RKRRSMESTT SGFLGPLLVL QAGFFLLTRI LTIPQSLDSW
   
 241 WTSNLFLGGAPTCPGQNSQS PTSNHSPTSC PPICPGYRWM CLRRFIIFL ILLCLIFLL
   
 301 VLLDYQGMLP VCPLLPSTST TSTGPCKTCT IPAQGTSMFP SCCCTKPSDG NCTCIPISS
   
 361 WAFARFLWEW ASVRFSWLSL LVPFVQWFGV LSPTVWLSVI WMMWYWGPSL YNILSPFLPL
   
 421 LPIFFCLWVYI (SEQ ID NO: 12)

Фігура 59C


  
 1 MDWTWILFLVAAATRVHSES TTSGLGPLLVLQAGFFLLT RILTIPQSLD SWWTSNLFLG
   
 61 GAPTCPGQNS QSPTSNHSPT SCPPICPGYR WMCLRRFIIF LFILLCLIF LLVLLDYQGM
   
 121 LPVCPLLPST STTSTGPCKT CTIPAQGTSM FPSCCCTKPS DGNCTCIPI SSWAFARFLW
   
 181 EWASVRFSWL SLLVPFVQWF VGLSPTVWLS VIWMMWYWGP SLYNILSPFL PLLPIFFCLW
   
 241 VYI (SEQ ID NO: 16)

Фігура 59D

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601