



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本 (11) 公開編號：TW 201928061 A

(43) 公開日：中華民國 108 (2019) 年 07 月 16 日

(21) 申請案號：107145766

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 12 月 18 日

(51) Int. Cl. : C12N15/863 (2006.01)

A61K35/76 (2015.01)

A61P37/04 (2006.01)

(30) 優先權：2017/12/19 中華民國

106144636

(71) 申請人：愛爾蘭商健生科學愛爾蘭無限公司 (愛爾蘭) JANSSEN SCIENCES IRELAND

UNLIMITED COMPANY (IE)

愛爾蘭

丹麥商北歐巴伐利亞公司 (丹麥) BAVARIAN NORDIC A/S (DK)

丹麥

(72) 發明人：包登 丹尼爾 BODEN, DANIEL (BE)；荷頓 海倫 HORTON, HELEN (BE)；尼夫斯 簡 馬克 艾德蒙 弗內德 馬利 NEEFS, JEAN-MARC EDMOND FERNAND MARIE (BE)；羅伊 蘇米特拉 ROY, SOUMITRA (NL)；卡司特斯 傑洛米 胡貝蒂娜 亨里克斯 維多 CUSTERS, JEROME HUBERTINA HENRICUS VICTOR (NL)；薩恩 羅蘭 克里斯蒂娜 ZAHN, ROLAND CHRISTIAN (DE)；卡拉 馬可仕 KALLA, MARKUS (DE)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：49 項 圖式數：7 共 141 頁

(54) 名稱

誘發抗 B 型肝炎病毒(HBV)免疫反應之方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE AGAINST HEPATITIS B VIRUS (HBV)

(57) 摘要

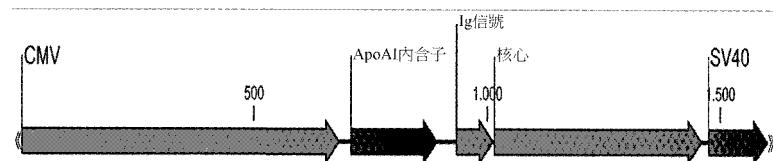
本文中提供編碼 HBV 抗原之改良型安卡拉牛痘病毒(Modified Vaccinia Ankara)(MVA)載體及腺病毒載體。亦提供增強人類個體之免疫反應的方法，該等方法係藉由在初打/加打療程中，利用該等編碼 HBV 抗原之 MVA 及腺病毒載體增強該人類個體之免疫反應。

Provided herein are Modified Vaccinia Ankara (MVA) vectors and adenovirus vectors encoding HBV antigens. Also provided are methods of enhancing an immune response in a human subject by utilizing the MVA and adenovirus vectors encoding HBV antigens in a prime/boost regimen to the enhance the immune response in the human subject.

指定代表圖：

201928061

TW 201928061 A



【圖2A】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

誘發抗B型肝炎病毒(HBV)免疫反應之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE AGAINST HEPATITIS B VIRUS (HBV)

【技術領域】

【0001】 本發明係關於生物技術。更特定言之，本發明係關於用於增強針對有需要之個體中之B型肝炎病毒(HBV)之免疫反應的方法及組合物。

【先前技術】

【0002】 B型肝炎病毒(HBV)係編碼四個開放閱讀框架及七種蛋白質的3.2 kb親肝性小DNA病毒。有約二十億人感染HBV，且有約兩億四千萬人患有慢性B型肝炎感染(慢性HBV)，該病以病毒及亞病毒粒子持久存在於血液中超過6個月為特徵(1)。持久的HBV感染經由病毒肽及循環抗原長期刺激HBV特異性T細胞受體而導致循環及肝內HBV特異性CD4+及CD8+ T細胞的T細胞耗盡。因此，T細胞多功能性減弱(亦即，IL-2、腫瘤壞死因子(TNF)- α 、IFN- γ 含量降低，及增殖缺乏)。

【0003】 自1980年代起，已有可用的針對HBV感染之安全且有效的預防性疫苗，且成為B型肝炎預防之主要手段(3)。世界衛生組織(World Health Organization)建議所有嬰兒接受疫苗接種，且在存在較低或中等B型肝炎地方性流行的國家中，建議所有兒童及青少年(<18歲)以及處於風險群體類別的某些人接受疫苗接種。由於接受疫苗接種，使得全世界感染

率大幅下降。不過，預防性疫苗不能治癒已確定之HBV感染。

【0004】慢性HBV當前係用IFN- α 及核昔或核昔酸類似物進行治療，但由於在感染之肝細胞中存留有作為病毒RNA之模板起重要作用的稱為共價閉合環狀DNA(cccDNA)之細胞內病毒複製中間物且因此存留有新病毒粒子而最終無法治癒。普遍認為，誘發病毒特異性T細胞及B細胞反應可以有效地除去載有cccDNA之肝細胞。當前靶向HBV聚合酶之療法抑制病毒血症，但對存在於核中之cccDNA及相關之循環抗原產生的作用有限。最嚴格的治癒形式可以除去生物體中之HBV cccDNA，此既不為觀察到的自然發生之結果，亦非任何治療性干預之結果。然而，HBV表面抗原(HBsAg)之喪失係臨床上可信的治癒等效結果，因為疾病復發僅在嚴重免疫抑制情況下才會發生，而此可接著藉由預防性治療加以預防。因此，至少自臨床觀點看，HBsAg之喪失與針對HBV的最嚴格免疫重建形式相關。

【0005】舉例而言，經證實，利用聚乙二醇化干擾素(pegIFN)- α 進行之免疫調節在維持有限治療療程之治療結束後反應方面優於核昔或核昔酸療法。除直接抗病毒作用外，據報導，IFN- α 在細胞培養物及人類化小鼠中對cccDNA起到表觀遺傳抑制作用，使病毒粒子生產率及轉錄本減少(4)。然而，此療法仍伴隨副作用且部分由於IFN- α 對HBV特異性T細胞僅具有較弱的調節作用，總體反應相當低。詳言之，治癒率較低(<10%)且毒性較高。同樣，直接作用於HBV之抗病毒劑，即HBV聚合酶抑制劑恩替卡韋(entecavir)及替諾福韋(tenofovir)，作為單藥療法有效誘導病毒抑制作用且針對耐藥性突變體之出現具有較高基因屏障作用且由此預防肝病之進展。然而，利用此類HBV聚合酶抑制劑很少實現由HBsAg喪失或血

清轉化定義之慢性B型肝炎的治癒。因此，該等抗病毒劑理論上需要無限期投與以預防肝病之復發，與針對人類免疫缺陷病毒(HIV)之抗反轉錄病毒療法類似。

【0006】 治療性疫苗接種有可能除去長期感染患者之HBV(5)。已經研究許多策略，但迄今為止，尚未證實治療性疫苗接種之成功性。

【發明內容】

【0007】 因此，由於具有較高治癒率的良好耐受之治療方法有限，對於B型肝炎病毒(HBV)，特別是慢性HBV治療之醫療需求尚未得到滿足。本申請案滿足此需求。提供改良型安卡拉牛痘病毒(Modified Vaccinia Ankara，MVA)載體。本申請案之MVA載體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列。MVA載體之HBV聚合酶抗原例如能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應。較佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應。更佳地，HBV聚合酶抗原能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。在本申請案之一個實施例中，HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。在本申請案之一個實施例中，第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 3至少90%一致。在本申請案之一個實施例中，第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 3之聚核苷酸序列。

【0008】 在本申請案之一個實施例中，MVA載體可以進一步包含編碼可操作地連接至該HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。該信號序列可以例如包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。較

佳地，該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO:10之聚核苷酸序列編碼。

【0009】 在本申請案之一個實施例中，MVA載體進一步包含編碼截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列，該截短之HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成。在本申請案之一個實施例中，該第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 1至少90%一致。在本申請案之一個實施例中，該第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1之聚核苷酸序列。

【0010】 亦提供包含本申請案之MVA載體及醫藥學上可接受之載劑的組合物。

【0011】 亦提供增強有需要之人類個體中之免疫反應的方法。該等方法包含(a)向該人類個體投與包含免疫有效量之腺病毒載體的第一組合物，該腺病毒載體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；以及(b)向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之MVA載體之第二組合物；由此獲得針對該人類個體中HBV抗原的增強之免疫反應。在本申請案之一個實施例中，該HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H(RNase H)活性。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物係用於引發免疫反應，且該第二組合物係用於增強有需要之個體中之免疫反應。在本申請案之一個實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後1-12週進行。在本申請案之一個實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後2-12週進行。在本申請案之一個實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後至少1週進行。在本申請案之一個實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後至少2週進行。

【0012】在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0013】在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。該第一組合物之第一聚核苷酸序列可以例如與SEQ ID NO: 19至少90%一致。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 19之聚核苷酸序列。

【0014】在本申請案之一個實施例中，該第一組合物中該腺病毒載體之核酸分子進一步包含編碼截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列，該截短之HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成。該第一組合物之第二聚核苷酸序列可以例如與SEQ ID NO: 17至少90%一致。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 17之聚核苷酸序列。

【0015】在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第一聚核苷酸序列及第二聚核苷酸序列編碼包含該截短之HBV核心抗原可操作地連接至該HBV聚合酶抗原的融合蛋白。該第一組合物之融合蛋白可以例如包含該截短之HBV核心抗原經由連接子可操作地連接至該HBV聚合酶抗原。該第一組合物之連接子可以例如包含胺基酸序列(AlaGly)_n，其中n係2至5之整數。較佳該連接子係由包含SEQ ID NO: 14之聚核苷酸序列編碼。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之融合蛋白包含SEQ ID

NO: 12之胺基酸序列。

【0016】在本申請案之一個實施例中，該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原的抗體反應。該增強之免疫反應可以例如包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原的CD8+ T細胞反應。該增強之免疫反應可以例如包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原的CD4+ T細胞反應。

【0017】在本申請案之一個實施例中，該腺病毒載體係rAd26或rAd35載體。

【0018】在本申請案之一個實施例中，一種增強人類個體中之免疫反應的方法包含(a)向該人類個體投與第一組合物，該第一組合物包含免疫有效量之第一質體，該第一質體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的第一非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；及第二質體，該第二質體包括含編碼截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列的第二非天然存在之核酸分子，該截短之HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成；以及(b)向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之MVA載體的第二組合物；由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物係用於引發該免疫反應且該第二組合物係用於增強該免疫反應。在本申請案之一個實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後1-12週進行。在本申請案之一個實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後2-12週進行。在本申請案之一個實施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後至少1週進行。在本申請案之一個實

施例中，步驟(b)係在步驟(a)之後至少2週進行。

【0019】 在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0020】 在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。該第一組合物之第一聚核苷酸序列可以例如與SEQ ID NO: 19至少90%一致。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 19之聚核苷酸序列。

【0021】 在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 20至少90%一致。該第一組合物之第一聚核苷酸序列可以例如包含SEQ ID NO: 20。

【0022】 在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第一質體的核酸分子進一步包含編碼可操作地連接至該第一組合物之HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。該信號序列可以例如包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0023】 在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 18至少90%一致。該第一組合物之第二聚核苷酸序列可以例如包含SEQ ID NO: 18之聚核苷酸序列。

【0024】在本申請案之一個實施例中，該第一組合物之第一聚核苷酸序列及第二聚核苷酸序列進一步包含啟動子序列、視情況一或多個另外的調控序列，較佳該啟動子序列包含SEQ ID NO: 7之聚核苷酸序列，且該另外的調控序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 15之強化子序列，及SEQ ID NO: 16之聚腺苷酸化信號序列。

【0025】在本申請案之一個實施例中，該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原的抗體反應。該增強之免疫反應可以例如包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原的CD8+ T細胞反應。該增強之免疫反應可以例如包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原的CD4+ T細胞反應。

【0026】自以下揭示內容，包括本發明之詳細說明及其較佳實施例以及所附申請專利範圍，將易於瞭解本發明之其他態樣、特徵及優勢。

【圖式簡單說明】

【0027】當結合隨附圖式閱讀時，將更好地理解本發明之前述**發明**內容以及以下**實施方式**。應理解，本發明不限於附圖中顯示之確切實施例。

【0028】在附圖中：

【0029】**圖1A-1B**描繪B型肝炎病毒之基因組及病毒生命週期；**圖1A**係B型肝炎病毒(HBV)之基因組的圖式；在原生病毒中，聚合酶蛋白質(Pol)含有在不同開放閱讀框架中的包膜蛋白之編碼序列；該等包膜蛋白(前S1、前S2及S)係在同一開放閱讀框架中；**圖1B**顯示HBV之病毒生命週期；

【0030】**圖2A-2C**顯示根據本申請案之實施例的腺病毒及MVA載體

中之表現卡匣之示意性表示；**圖2A**顯示截短之HBV核心抗原的表現卡匣，其含有CMV啟動子、內含子(來源於人類ApoAI基因之片段-GenBank寄存編號X01038鹼基對295-523，帶有ApoAI第二內含子)、人類免疫球蛋白分泌信號，隨後為截短之HBV核心抗原的編碼序列及SV40聚腺苷酸化信號；**圖2B**顯示由截短之HBV核心抗原可操作地連接至HBV聚合酶抗原構成之融合蛋白的表現卡匣，除HBV抗原外，其在其他方面與截短之HBV核心抗原之表現卡匣相同；**圖2C**顯示包含HBV核心抗原可操作地連接至Pr13.5長啟動子之表現卡匣及包含HBV聚合酶抗原可操作地連接至PrHyb啟動子之表現卡匣；

【0031】 **圖3**顯示用不同的HBV腺病毒載體及HBV MVA之組合免疫接種之F1小鼠的ELISPOT反應之圖；用於刺激自各種經疫苗接種動物組分離之脾細胞的HBV核心或聚合酶肽池以黑色(核心)及灰色(聚合酶)指示。聚合酶1及聚合酶2反應相加；X軸顯示腺病毒載體劑量及存在或不存在MVA加打；y軸上指示的反應性T細胞之數量以每 10^6 個脾細胞的斑點形成細胞(SFC)數表示；

【0032】 **圖4**顯示用不同的HBV腺病毒載體及HBV MVA之組合免疫接種之F1小鼠的細胞內細胞介素染色(intracellular cytokine staining，ICS)反應之圖；用於刺激自各種經疫苗接種動物組分離之脾細胞的HBV核心及聚合酶肽池以黑色(核心)及灰色(聚合酶)指示；聚合酶1及聚合酶2反應相加；X軸顯示腺病毒載體劑量及存在或不存在MVA加打。y軸上顯示針對IFN γ 呈陽性的CD8(+)T細胞之百分比；

【0033】 **圖5**顯示用不同的HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合免疫接種之F1小鼠的ICS反應之圖；用於刺激自各種經疫苗接種動物組分

離之脾細胞的HBV核心及聚合酶肽池以黑色(核心)及灰色(聚合酶)指示；聚合酶1及聚合酶2反應相加；X軸顯示腺病毒載體劑量及存在或不存在MVA加打；y軸上顯示針對IFN γ 呈陽性的CD4(+)T細胞之百分比；

【0034】 圖6顯示用不同的HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合免疫接種之NHP的ELISPOT反應之圖；用於刺激自各種經疫苗接種動物組分離之PBMC的HBV核心或聚合酶肽池以正方形(核心)、圓形(聚合酶1)及三角形(聚合酶2)指示；X軸顯示不同實驗組及時間點。y軸上指示的反應性T細胞之數量以每 10^6 個脾細胞的斑點形成細胞(SFC)數表示；顯示出減去背景(培養基+DMSO刺激)之資料；且

【0035】 圖7A、7B及7C顯示用不同的HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合免疫接種之NHP的ICS反應之圖；用於刺激自各種經疫苗接種動物組分離之PBMC的HBV核心及聚合酶肽池以正方形(核心)、圓形(聚合酶1)及三角形(聚合酶2)指示；X軸顯示不同實驗組及時間點；y軸上顯示對IFN γ 呈陽性的CD4(+)及CD8(+) T細胞之百分比；顯示出減去背景(培養基+DMSO刺激)之資料。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0036】 本申請案主張2017年12月19日申請之臺灣專利申請案第106144636號之優先權且其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

對以電子方式提交之序列表之引用

【0037】 本申請案含有序列表，該序列表係以2018年12月14日創建的檔案名稱為「688097-413 Sequence Listing」且大小為49.6 KB之ASCII格式序列表經由EFS-Web以電子方式提交。此經由EFS-Web提交之

序列表係說明書之一部分且以全文引用的方式併入本文中。

【0038】 先前技術及本說明書通篇引用或描述各種出版物、文章及專利；該等參考文獻各自以全文引用的方式併入本文中。本說明書中所包括的文獻、操作、材料、器件、文章或類似物之論述係出於提供本發明之內容的目的。此類論述並非承認任何或所有該等內容形成關於所揭示或所要求的任何發明之現有技術的一部分。

【0039】 除非另外定義，否則本文所用的所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域的一般技術者通常所理解相同的含義。另外，本文中使用之某些術語具有如本說明書中所述之含義。

【0040】 必須注意的是，除非上下文另外明確指示，否則如本文及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一個(種)(a/an)」及「該(the)」包括複數個(種)指示物。

【0041】 除非另外規定，否則任何數值，諸如本文所描述之濃度或濃度範圍，應理解為在所有情況下均以術語「約」修飾。因此，一個數值通常包括所述值之 $\pm 10\%$ 。舉例而言，1 mg/mL濃度包括0.9 mg/mL至1.1 mg/mL。同樣，1%至10%(w/v)之濃度範圍包括0.9%(w/v)至11%(w/v)。除非上下文另外明確地指示，否則如本文所使用，使用的數字範圍明確地包括所有可能的子範圍、在該範圍內的所有個別數值，包括該等範圍內之整數及該等值之分數。

【0042】 除非另外指示，否則在一系列要素之前的術語「至少」應理解為指該系列中之每一要素。熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗即確定本文所描述的本發明之具體實施例的許多等效物。本發明意欲涵蓋此類等效物。

【0043】在本說明書通篇及隨後的申請專利範圍中，除非上下文另有要求，否則詞語「包含 (comprise)」及變化形式諸如「包含 (comprises)」及「包含 (comprising)」應理解為暗示包括一個所述整數或步驟或者一組整數或步驟，但不排除任何其他整數或步驟或者整數或步驟組。當在本文中使用時，術語「包含」可以用術語「含有」或「包括」取代，或有時當在本文中使用時，用術語「具有」取代。

【0044】當在本文中使用時，「由……組成」不包括所要求要素中未說明之任何要素、步驟或成分。當在本文中使用時，「基本上由……組成」不排除不會實質上影響技術方案之基本及新穎特徵之材料或步驟。每當本文中在本發明之態樣或實施例之上下文中使用時，前述術語「包含」、「含有」、「包括」及「具有」中之任一個可以用術語「由……組成」或「基本上由……組成」替代以改變本發明之範圍。

【0045】如本文所使用，在多個所述要素之間的連接性術語「及/或」係理解為涵蓋個別及組合選擇。舉例而言，當兩個要素藉由「及/或」連結時，第一個選擇係指第一要素之適用性，不含第二要素。第二個選擇係指第二要素之適用性，不含第一要素。第三個選擇係指第一要素與第二要素一起之適用性。此等選擇中之任一個應理解為在該含義之範圍內，且因此滿足如本文所使用之術語「及/或」之要求。該等選擇中多於一個之同時適用性亦應理解為在該含義之範圍內，且因此滿足術語「及/或」之要求。

【0046】如本文所使用，「個體」意謂將要或已經利用根據本申請案實施例之方法治療的任何動物，較佳為哺乳動物，最佳為人類。如本文所使用，術語「哺乳動物」涵蓋任何哺乳動物。哺乳動物之實例包括(但

不限於)牛、馬、綿羊、豬、貓、狗、小鼠、大鼠、兔、天竺鼠、非人類靈長類動物(NHP)諸如猴或猿、人類等，更佳為人類。

【0047】術語「佐劑」與「免疫刺激劑」在本文中可互換地使用，且定義為刺激免疫系統之一或多種物質。在此情形下，佐劑係用於增強針對本申請案之腺病毒及/或MVA載體的免疫反應。

【0048】亦應當理解，當提及較佳發明之組分的尺寸或特徵時，本文中使用之術語「約」、「近似地」、「大體上」、「基本上」及類似術語指示，所描述之尺寸/特徵並非嚴格的界限或參數且如一般熟習此項技術者所理解，不排除相對於其之功能上相同或類似之微小變化。在最低限度上，包括數字參數之此類指示物將包括使用此項技術中認可之數學及工業原理(例如捨入、量測值或其他系統誤差、製造公差等)不會改變最低有效數位之變化。

【0049】在兩個或兩個以上核酸或多肽序列(例如HBV抗原多肽及編碼其之聚核苷酸)的情形中，術語「一致」或「一致性」百分比係指當比較並對準達到最大對應性時，如使用以下序列比較演算法之一或藉由目視檢查所量測的相同或具有指定百分含量之胺基酸殘基或核苷酸相同的兩個或兩個以上序列或子序列。

【0050】就序列比較而言，通常一個序列充當參考序列，測試序列與其比較。當使用序列比較演算法時，將測試序列及參考序列輸入至電腦中，必要時指定子序列座標，且指定序列演算法程式參數。接著，序列比較演算法基於所指定之程式參數來計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。

【0051】供比較序列之最佳比對可以例如藉由以下方式進行：

Smith及Waterman, *Adv.Appl.Math.* 2:482 (1981)之局部同源性演算法；Needleman及Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)之同源性比對演算法；Pearson及Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)之相似性搜索方法；該等演算法之電腦化實施(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI中之GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA)；或目視檢查(大體上參見Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等人編, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.與John Wiley & Sons, Inc.聯合經營, (1995增刊) (Ausubel))。

【0052】適用於確定序列一致性百分比及序列相似性之演算法的實例係BLAST及BLAST 2.0演算法，其分別描述於Altschul等人(1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410及Altschul等人(1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402中。執行BLAST分析之軟體可經由國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)公開獲得。此演算法包括首先藉由鑑別查詢序列中之長度W之短字來鑑別高評分序列對(HSP)，該等短字當與資料庫序列中相同長度之字比對時匹配或滿足一些正值臨限值分數T。T稱為鄰域字分數臨限值(Altschul等人，同上)。此等初始鄰域字匹配(hit)充當用於起始搜索之種子以尋找含有其之較長HSP。接著，字匹配沿各序列在兩個方向上延伸，只要累積比對分數增加即可。

【0053】對於核苷酸序列，累積分數係使用參數M (一對匹配殘基之獎勵分數；始終 >0)及N (失配殘基之罰分；始終 <0)計算。就胺基酸序列而言，使用計分矩陣計算累積分數。當以下情況時，字匹配在各方向上之延伸中斷：累積比對分數自其達成之最大值降低量X；累積分數歸因於

一或多個負評分殘基比對之累積而變成0或0以下；或達到任一序列之末端。BLAST演算法參數W、T及X確定比對之靈敏度及速度。BLASTN程式(就核苷酸序列而言)使用如下預設值：字長(W)為11，期望值(E)為10，M=5，N=-4及兩股之比較。就胺基酸序列而言，BLASTP程式使用如下預設值：字長(W)為3，期望值(E)為10，及BLOSUM62計分矩陣(參見Henikoff及Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989))。

【0054】 除計算序列一致性百分比外，BLAST演算法亦執行兩個序列之間相似性之統計分析(參見例如，Karlin及Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993))。由BLAST演算法提供的一種相似性量測法係最小和概率(P(N))，其用於指示兩個核苷酸或胺基酸序列之間出現偶然匹配的概率。舉例而言，若測試核酸與參核酸比較時的最小和概率小於約0.1，更佳小於約0.01，且最佳小於約0.001，則認為核酸與參考序列相似。

【0055】 兩個核酸序列或多肽基本上一致之另一種指示係由第一核酸編碼之多肽與由第二核酸編碼之多肽發生免疫交叉反應，如下所述。由此，多肽通常與第二多肽基本上一致，例如，該兩個肽僅因保守取代而不同。兩個核酸序列基本上一致之另一指示係該兩個分子在嚴格條件下彼此雜交，如下所述。

【0056】 當關於免疫反應，諸如CD4+ T細胞反應、抗體反應或CD8+ T細胞反應使用時，如本文所使用的術語「增強」係指投與根據本申請案之MVA及腺病毒載體之初打-加打組合的個體中之免疫反應相對於自投與單獨本申請案之MVA載體或腺病毒之個體所觀察到的相應免疫反應增加。

【0057】如本文所使用，術語「CD4+或CD8+ T細胞反應」係指藉由在疫苗接種之後在總反應性T細胞群內觀察到較高比例之免疫原特異性CD4+ T細胞或CD8+ T細胞表徵的T細胞免疫反應。總免疫原特異性T細胞反應可以藉由IFN- γ ELISPOT分析法測定。免疫原特異性CD4+或CD8+ T細胞免疫反應可以藉由ICS分析法測定。

【0058】如本文所使用，術語「增強之抗體反應」係指投與根據本申請案之MVA及腺病毒載體之初打-加打組合的個體中之抗體反應相對於自投與單獨本申請案之MVA載體或腺病毒之個體觀察到的相應免疫反應增加。

【0059】術語「佐劑」定義為刺激免疫系統之一或多種物質。在此情形下，佐劑係用於增強針對本申請案之質體、腺病毒及/或MVA載體的免疫反應。

【0060】如本文所使用，術語「抗原性基因產物或其片段」或「抗原性蛋白質」可以包括細菌、病毒、寄生蟲或真菌蛋白質，或其片段。較佳地，抗原性蛋白質或抗原性基因產物能夠增加宿主中之保護性免疫反應，例如誘發針對疾病或感染(例如細菌、病毒、寄生蟲或真菌疾病或感染)之免疫反應，及/或在個體中(亦即，疫苗接種)產生針對疾病或感染之免疫，由此保護個體免受疾病或感染影響。

【0061】為了幫助本申請案之讀者，說明書分成各種段落或部分，或針對本申請案之各種實施例。該等分離不應認為一個段落或部分或實施例之物質與另一段或部分或實施例之物質無關聯。相反，熟習此項技術者應理解，本說明書具有廣闊應用且涵蓋可以涵蓋之各種部分、段落及語句之所有組合。任何實施例之論述僅意欲為例示性的，且並不意欲表明本發

明之範疇，包括申請專利範圍，侷限於此等實例。舉例而言，儘管本文所描述的本申請案之**HBV**載體(例如質體DNA或病毒載體)之實施例可以含有按特定次序佈置之特定組分，包括(但不限於)某些啟動子序列、強化子或調控序列、信號肽、**HBV**抗原編碼序列、聚腺昔酸化信號序列等，但一般熟習此項技術者應瞭解，本文所揭示之概念可以同等地應用於按可以在本申請案之**HBV**載體中使用的其他次序佈置之其他組分。本申請案涵蓋使用具有可以用於本申請案之**HBV**載體中之任何序列的呈任何組合形式之可應用組分中之任一種，無論是否明確地描述特定組合。

【0062】 B型肝炎病毒(**HBV**)

【0063】如本文所使用，「B型肝炎病毒」或「**HBV**」係指肝DNA病毒科之病毒。**HBV**係編碼四個開放閱讀框架及七種蛋白質的親肝性小(例如3.2 kb)DNA病毒。參見圖1A。**HBV**編碼之七種蛋白質包括小(S)、中等(M)及大(L)表面抗原(HBsAg)或包膜(Env)蛋白質、前核心蛋白、核心蛋白、病毒聚合酶(Pol)及HBx蛋白質。**HBV**表現三種表面抗原，或包膜蛋白，即L、M及S，其中S最小且L最大。M及L蛋白質中之額外結構域分別命名為前S2及前S1。核心蛋白係病毒核衣殼之次單元。Pol係合成病毒DNA(逆轉錄酶、核糖核酸酶H及引子)所需的，其出現在定位於受感染肝細胞之細胞質的核衣殼中。前核心蛋白係具有N末端信號肽之核心蛋白且在自受感染細胞分泌之前，在其N及C末端經歷蛋白水解加工為所謂的B型肝炎e抗原(HBeAg)。HBx蛋白質係共價閉合環狀DNA(cccDNA)高效轉錄所需的。HBx並非病毒結構蛋白。除核心及聚合酶共有mRNA外，**HBV**之所有病毒蛋白均具有其自身mRNA。除前核心蛋白之外，該等**HBV**病毒蛋白均不經歷轉譯後蛋白質水解加工。

【0064】 HBV病毒粒子含有病毒包膜、核衣殼，及部分呈雙股之DNA基因組的單一複本。核衣殼包含120個核心蛋白二聚體且經內嵌有S、M及L病毒包膜或表面抗原蛋白質之衣殼膜覆蓋。在進入細胞之後，病毒去殼且與病毒聚合酶共價結合的含衣殼之鬆環DNA(rcDNA)遷移至核中。在該過程期間，核心蛋白磷酸化誘導結構變化，暴露出核定位信號，使得衣殼能夠與所謂的輸入蛋白(importin)相互作用。該等輸入蛋白介導核心蛋白與核孔複合物之結合，在該結合後，衣殼解離且聚合酶/rcDNA複合物釋放至核中。在核內，rcDNA變得去蛋白化(移除聚合酶)且經宿主DNA修復機構轉變成共價閉合環狀DNA(cccDNA)基因組，自該基因組，重疊之轉錄本編碼HBeAg、HBsAg、核心蛋白、病毒聚合酶及HBx蛋白質。核心蛋白、病毒聚合酶及前基因組RNA(pgRNA)在細胞質中締合並自組裝成不成熟的含pgRNA之衣殼粒子，該等衣殼粒子進一步轉化成為成熟rcDNA-衣殼且充當共同中間物，經包覆且以感染病毒粒子形式分泌，或轉運回到核中以補充及維持穩定cccDNA池。參見圖1B。

【0065】 迄今為止，HBV基於包膜蛋白上存在之抗原性抗原決定基而分成四種血清型(adr、adw、ayr、ayw)，且基於病毒基因組之序列而分成八種基因型(A、B、C、D、E、F、G及H)。HBV基因型分佈於不同地理區域。舉例而言，亞洲最流行之基因型係基因型B及C。基因型D主要存在於非洲、中東及印度，而基因型A在北歐、撒哈拉沙漠以南非洲(sub-Saharan Africa)及西非較為普遍。

【0066】 HBV抗原

【0067】 如本文所使用，術語「HBV抗原」、「HBV之抗原性多肽」、「HBV抗原性多肽」、「HBV抗原蛋白質」、「HBV免疫原性多肽」及

「HBV免疫原」皆指能夠在個體中誘發針對HBV之免疫反應，例如體液及/或細胞介導之反應的多肽。HBV抗原可以為HBV多肽、其片段或抗原決定基，或多個HBV多肽、其部分或衍生物之組合。HBV抗原能夠在宿主中產生保護性免疫反應，例如誘發針對病毒性疾病或感染之免疫反應，及/或使個體針對病毒性疾病或感染產生免疫(亦即，接種疫苗)，由此保護個體免受病毒性疾病或感染影響。舉例而言，HBV抗原可以包含來自來源於任何HBV基因型，例如基因型A、B、C、D、E、F、G及/或H之任何HBV蛋白質，諸如HBeAg、前核心蛋白、HBsAg(S、M或L蛋白質)、核心蛋白、病毒聚合酶或HBx蛋白質，或其組合的多肽或其免疫原性片段。

【0068】(1)HBV核心抗原

【0069】如本文所使用，術語「HBV核心抗原」、「HBcAg」及「核心抗原」均係指能夠在個體中誘發針對HBV核心蛋白之免疫反應，例如體液及/或細胞介導之反應的HBV抗原。術語「核心」、「核心多肽」及「核心蛋白」均係指HBV病毒核心蛋白。全長核心抗原通常係183個胺基酸長度且包括組裝結構域(胺基酸1至149)及核酸結合結構域(胺基酸150至183)。該34個殘基之核酸結合結構域係前基因組RNA衣殼化所需的。此結構域亦用作核輸入信號。其包含17個精胺酸殘基且具有較高鹼性，與其功能相符。HBV核心蛋白在溶液中呈二聚體形式，且該等二聚體自組裝成二十面體衣殼。每個核心蛋白二聚體具有在任一側上側接一個 α -螺旋結構域的四個 α -螺旋束。不含該核酸結合結構域的截短之HBV核心蛋白亦能夠形成衣殼。

【0070】在本申請案之一個實施例中，HBV抗原係截短之HBV核心抗原。如本文所使用，「截短之HBV核心抗原」係指不含完整長度之HBV

核心蛋白但能夠在個體中誘發針對HBV核心蛋白之免疫反應的HBV抗原。舉例而言，HBV核心抗原可以經修飾成使核心抗原中通常含有十七個精胺酸(R)殘基的帶大量正電荷(富含精胺酸)之C末端核酸結合結構域的一或多個胺基酸缺失。在本申請案之些實施例中，HBV核心抗原係截短之HBV核心抗原。本申請案的截短之HBV核心抗原較佳為不包含HBV核心核輸入信號的C末端截短之HBV核心蛋白及/或已缺失C末端HBV核心核輸入信號的截短之HBV核心蛋白。在本申請案之一個實施例中，截短之HBV核心抗原包含在C末端核酸結合結構域中之缺失，諸如缺失該C末端核酸結合結構域之1至34個胺基酸殘基，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33或34個胺基酸殘基，較佳缺失全部34個胺基酸殘基。在一個較佳實施例中，截短之HBV核心抗原包含C末端核酸結合結構域中之缺失，較佳缺失全部34個胺基酸殘基。

【0071】根據本申請案之實施例，HBV核心抗原可以為來源於多種HBV基因型(例如基因型A、B、C、D、E、F、G及H)之共同序列。如本文所使用，「共同序列」意謂基於同源蛋白質之胺基酸序列比對，例如藉由比對(例如使用Clustal Omega)同源蛋白質之胺基酸序列所測定的人工胺基酸序列。其可以為基於來自至少100個天然HBV分離株之HBV抗原(例如核心、pol等)之序列計算的在序列比對中各位置處所發現的最常見胺基酸殘基之次序。共同序列可以為非天然存在的且不同於原生病毒序列。共同序列可以藉由使用多序列比對工具比對來自不同來源之多個HBV抗原序列，且在有變化之比對位置選擇最常見的胺基酸來設計。較佳地，HBV抗原之共同序列係來源於HBV基因型B、C及D。術語「共同

抗原」用以指具有共同序列之抗原。

【0072】根據本申請案之實施例的截短之HBV核心抗原不具有核酸結合功能，且能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應。較佳地，截短之HBV核心抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應。更佳地，截短之HBV核心抗原能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0073】在本申請案的一個較佳實施例中，HBV核心抗原係共同抗原，較佳為來源於HBV基因型B、C及D之共同抗原，更佳為來源於HBV基因型B、C及D的截短之共同抗原。根據本申請案的例示性截短之HBV核心共同抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 2至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致之胺基酸序列組成。SEQ ID NO: 2係來源於HBV基因型B、C及D之核心共同抗原。SEQ ID NO: 2缺失天然核心抗原中C末端帶大量正電(富含精胺酸)之核酸結合結構域的34個胺基酸。

【0074】在本申請案之一個特定實施例中，HBV核心抗原係由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV抗原。

【0075】 (2)HBV聚合酶抗原

【0076】如本文所使用，術語「HBV聚合酶抗原」、「HBV Pol抗原」或「HBV pol抗原」係指能夠在個體中誘發針對HBV聚合酶的免疫反應，例如體液及/或細胞介導之反應的HBV抗原。術語「聚合酶」、「聚合酶多肽」、「Pol」及「pol」均係指HBV病毒DNA聚合酶。HBV病毒DNA

聚合酶具有四個結構域，自N末端至C末端，包括充當負股DNA合成之引子的末端蛋白質(TP)結構域；對於聚合酶功能不重要的間隔子；用於轉錄之逆轉錄酶(RT)結構域；以及核糖核酸酶H結構域。

【0077】 在本申請案之一個實施例中，HBV抗原包含HBV Pol抗原，或其任何免疫原性片段或組合。HBV Pol抗原可以含有改善該抗原之免疫原性的其他修飾，諸如藉由將突變引入聚合酶及/或核糖核酸酶結構域之活性位點中以降低或基本上除去某些酶活性。

【0078】 較佳地，本申請案之HBV Pol抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性，且能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應。較佳地，HBV Pol抗原能夠在哺乳動物中發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應。更佳地，HBV Pol抗原能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0079】 因此，在本申請案之些實施例中，HBV Pol抗原係失活之Pol抗原。在本申請案之一個實施例中，失活之HBV Pol抗原在聚合酶結構域之活性位點中包含一或多個胺基酸突變。在另一個實施例中，失活之HBV Pol抗原在核糖核酸酶H結構域之活性位點中包含一或多個胺基酸突變。在一個較佳實施例中，失活之HBV pol抗原在聚合酶結構域及核糖核酸酶H結構域兩者之活性位點中包含一或多個胺基酸突變。舉例而言，藉由例如用天冬醯胺殘基(N)置換一或多個天冬胺酸殘基(D)，消除或降低金屬配位功能，由此降低或基本上消除逆轉錄酶功能來使HBV pol抗原之聚合酶結構域中核苷酸/金屬離子結合所需之「YXDD」基元突變。作為「YXDD」基元突變之替代或除該突變之外，可以例如藉由用天冬醯胺殘基(N)置換一或多個天冬胺酸殘基(D)及/或用麩醯胺酸(Q)置換麩胺酸殘基

(E)，由此降低或基本上消除核糖核酸酶H功能來使HBV pol抗原之核糖核酸酶H結構域中Mg²⁺配位所需之「DEDD」基元突變。在一個特定實施例中，HBV pol抗原係藉由以下方式修飾：(1)使聚合酶結構域之「YXDD」基元中的天冬胺酸殘基(D)突變成天冬醯胺殘基(N)；以及(2)使核糖核酸酶H結構域之「DEDD」基元中的第一個天冬胺酸殘基(D)突變成天冬醯胺殘基(N)及使第一個麩胺酸殘基(E)突變成麩醯胺酸殘基(N)，由此降低或基本上消除pol抗原之逆轉錄酶及核糖核酸酶H功能。

【0080】 在本申請案的一個較佳實施例中，HBV pol抗原係共同抗原，較佳為來源於HBV基因型B、C及D之共同抗原，更佳為來源於HBV基因型B、C及D的失活之共同抗原。根據本申請案的例示性HBV pol共同抗原包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 4至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳與SEQ ID NO: 4至少98%一致，諸如與SEQ ID NO: 4至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致的胺基酸序列。SEQ ID NO: 4係在聚合酶及核糖核酸酶H結構域之活性位點中包含四個突變的來源於HBV基因型B、C及D之pol共同抗原。詳言之，該四個突變包括聚合酶結構域之「YXDD」基元中的天冬胺酸殘基(D)突變成天冬醯胺殘基(N)；以及核糖核酸酶H結構域之「DEDD」基元中的第一個天冬胺酸殘基(D)突變成天冬醯胺殘基(N)及麩胺酸殘基(E)突變成麩醯胺酸殘基(Q)。

【0081】 在本申請案之一個特定實施例中，HBV pol抗原包含SEQ

ID NO: 4之胺基酸序列。在本申請案之其他實施例中，HBV pol抗原由SEQ ID NO: 4之胺基酸序列組成。

【0082】(3)HBV核心抗原與HBV聚合酶抗原之融合物

【0083】如本文所使用，術語「融合蛋白」或「融合物」係指具有至少兩個通常不存在於單一天然多肽中之多肽結構域的單一多肽鏈。

【0084】在本申請案之一個實施例中，HBV抗原包括包含截短之HBV核心抗原可操作地連接至HBV pol抗原或HBV pol抗原可操作地連接至截短之HBV核心抗原的融合蛋白，該連接較佳經由連接子進行。

【0085】如本文所使用，術語「連接子」係指充當分子橋以可操作地連接兩種不同分子的化合物或部分，其中該連接子之一部分可操作地連接至第一分子，且其中該連接子之另一部分可操作地連接至第二分子。舉例而言，在含有第一多肽及第二異源多肽之融合蛋白中，連接子主要用作該第一多肽與該第二多肽之間的間隔子。在一個實施例中，連接子係由經肽鍵連接在一起的胺基酸構成，較佳由經肽鍵連接的1至20個胺基酸構成，其中胺基酸係選自20種天然存在之胺基酸。在一個實施例中，該1至20個胺基酸係選自甘胺酸、丙胺酸、脯胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸及離胺酸。較佳地，連接子係由大量無空間位阻之胺基酸，諸如甘胺酸及丙胺酸構成。例示性連接子係聚甘胺酸，尤其是(Gly)₅、(Gly)₈；聚(Gly-Ala)及聚丙胺酸。如以下實例中所示的一種例示性適合連接子係(AlaGly)_n，其中n係2至5之整數。

【0086】較佳地，本申請案之融合蛋白能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之HBV核心及HBV Pol的免疫反應。較佳地，融合蛋白能夠在哺乳動物中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應。

更佳地，該融合蛋白能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0087】 在本申請案之一個實施例中，融合蛋白包含具有與SEQ ID NO: 2至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致之胺基酸序列的截短之HBV核心抗原；連接子；及具有與SEQ ID NO: 4至少90%一致，諸如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致之胺基酸序列的HBV pol抗原。

【0088】 在本申請案的一個較佳實施例中，融合蛋白包含由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成之截短之HBV核心抗原；包含(AlaGly)_n之連接子，其中n係2至5之整數；及具有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的HBV Pol抗原。更佳地，根據本申請案之一個實施例的融合蛋白包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。

【0089】 在本申請案之一個實施例中，融合蛋白進一步包含信號序列。較佳地，信號序列具有SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列。更佳地，融合蛋白包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列。

【0090】 聚核昔酸及載體

【0091】 在另一通用態樣中，本申請案提供編碼根據本申請案之一個實施例之HBV抗原的非天然存在之核酸分子，及包含該非天然存在之核酸的載體。非天然存在之核酸分子可以包含編碼本申請案之HBV抗原的

任何聚核苷酸序列，其可以根據本發明，使用此項技術中已知之方法製備。較佳地，聚核苷酸編碼本申請案之HBV核心抗原及HBV聚合酶抗原中的至少一種。聚核苷酸可以呈藉由重組技術(例如選殖)獲得或合成製造(例如化學合成)之RNA形式或DNA形式。DNA可以為單股或雙股的，或者可以含有雙股及單股序列之部分。DNA可以例如包含基因組DNA、cDNA或其組合。聚核苷酸亦可為DNA/RNA雜合體。本申請案之聚核苷酸及載體可以用於製造重組蛋白、在宿主細胞中表現蛋白質或製造病毒粒子。較佳地，聚核苷酸係DNA。

【0092】 在本申請案之一個實施例中，非天然存在之核酸分子包含編碼截短之HBV核心抗原的聚核苷酸，該截短之HBV核心抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 2至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 2至少98%、99%或100%一致的胺基酸序列組成。在本申請案之一個特定實施例中，非天然存在之核酸分子編碼包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的截短之HBV核心抗原。

【0093】 本申請案的編碼包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的截短之HBV核心抗原之聚核苷酸序列的實例包括(但不限於)與SEQ ID NO: 1至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 1至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 1至少98%、99%或100%一致

之聚核苷酸序列。在本申請案之特定實施例中，編碼截短之HBV核心抗原的例示性非天然存在之核酸分子包含SEQ ID NO:1、17或18之聚核苷酸序列。

【0094】 在本申請案之一個實施例中，非天然存在之核酸分子編碼HBV聚合酶抗原，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 4至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 4達100%一致的胺基酸序列。在本申請案之一個特定實施例中，非天然存在之核酸分子編碼包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的HBV聚合酶抗原。

【0095】 本申請案的編碼包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之HBV Pol抗原的聚核苷酸序列之實例包括(但不限於)與SEQ ID NO: 3至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 3至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 3至少98%、99%或100%一致的聚核苷酸序列。在本申請案之特定實施例中，編碼HBV pol抗原的例示性非天然存在之核酸分子包含SEQ ID NO:3、19或20之聚核苷酸序列。

【0096】 在本申請案之另一實施例中，非天然存在之核酸分子編碼包含截短之HBV核心抗原可操作地連接至HBV Pol抗原或HBV Pol抗原可操作地連接至截短之HBV核心抗原的融合蛋白，該連接較佳經由連接子進行。在一個特定實施例中，本申請案之非天然存在之核酸分子編碼：截

短之HBV核心抗原，該截短之HBV核心抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 2至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 2達100%一致的胺基酸序列組成；連接子；以及HBV聚合酶抗原，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 4至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 4至少98%、99%或100%一致的胺基酸序列。在本申請案之一個特定實施例中，非天然存在之核酸分子編碼融合蛋白，該融合蛋白包含由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原；包含(AlaGly) n 之連接子，其中 n 係2至5之整數；以及包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的HBV Pol抗原。在本申請案之一個特定實施例中，非天然存在之核酸分子編碼包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的融合蛋白。

【0097】 本申請案的編碼融合蛋白之聚核苷酸序列的實例包括(但不限於)與SEQ ID NO: 1至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 1至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 1至少98%、99%或100%一致的聚核苷酸序列可操作地連接至與SEQ ID NO: 14至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 14至少90%、91%、92%、93%、94%、

95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 14至少98%、99%或100%一致的連接子編碼序列，該連接子編碼序列進一步可操作地連接與SEQ ID NO: 3至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 3至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳地與SEQ ID NO: 3至少98%、99%或100%一致的聚核苷酸序列。在本申請案之特定實施例中，非天然存在之核酸分子編碼融合蛋白，該融合蛋白包含SEQ ID NO: 1可操作地連接至SEQ ID NO: 14，SEQ ID NO: 14進一步可操作地連接至SEQ ID NO: 3。

【0098】 在另一通用態樣中，本申請案係關於一種載體，其包含編碼HBV抗原的分離之聚核苷酸。如本文所使用，「載體」係用於將遺傳物質載運至另一細胞中的核酸分子，在該另一細胞中，其可以複製及/或表現。根據本發明，熟習此項技術者已知之任何載體均可以使用。載體之實例包括(但不限於)質體、病毒載體(噬菌體、動物病毒及植物病毒)、黏質體及人工染色體(例如YAC)。較佳地，載體係DNA質體。載體可以為DNA載體或RNA載體。熟習此項技術者可以根據本發明，經由標準重組技術構築本申請案之載體。

【0099】 根據本申請案之實施例，載體可以為表現載體。如本文所使用，術語「表現載體」係指包含編碼能夠轉錄之RNA之核酸的任何類型之基因構築體。表現載體包括(但不限於)用於重組蛋白表現之載體，諸

如DNA質體或病毒載體；及用於將核酸遞送至個體中以在該個體之組織中表現的載體，諸如DNA質體或病毒載體。熟習此項技術者應瞭解，表現載體之設計可取決於諸如待轉型宿主細胞之選擇、所需蛋白質之表現量等因素。

【0100】 根據本申請案之實施例的載體可以含有多種調控序列。如本文所使用，術語「調控序列」係指允許、促成或調節核酸分子之功能調控，包括宿主細胞或生物體中核酸或其一種衍生物(亦即，mRNA)之複製、重複、轉錄、剪接、轉譯、穩定性及/或轉運的任何序列。在本發明的上下文中，此術語涵蓋啟動子、強化子及其他表現控制元件(例如聚腺苷酸化信號及影響mRNA穩定性之元件)。

【0101】 在本申請案之些實施例中，載體係非病毒載體。非病毒載體之實例包括(但不限於)DNA質體、細菌人工染色體、酵母人工染色體、噬菌體等。較佳地，非病毒載體係DNA質體。「DNA質體」與「DNA質體載體」、「質體DNA」或「質體DNA載體」可互換使用，意思指能夠在適合宿主細胞中自主複製的大體上呈圓形的雙股DNA序列。用於表現編碼之聚核苷酸的DNA質體通常包含複製起點、多選殖位點及可選擇標記物，該可選擇標記物例如可以為抗生素抗性基因。適用於本申請案中的DNA質體之實例包括(但不限於)用於熟知表現系統(包括原核及真核系統兩種)中的可商購之表現載體，諸如pSE420(Invitrogen, San Diego, Calif.)，其可以用於在大腸桿菌中產生及/或表現蛋白質；pYES2(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)，其可以用於在酵母菌株釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中產生及/或表現；MAXBAC[®]完全桿狀病毒表現系統(Thermo Fisher Scientific)，其可以用於在昆蟲細胞中產

生及/或表現；pcDNATM或pcDNA3TM(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)，其可以用於在哺乳動物細胞中高程度組成性蛋白質表現；以及pVAX或pVAX-1(Life, Thermo Fisher Scientific)，其可以用於在大部分哺乳動物細胞中高程度短暫表現所關注蛋白質。任何可商購之DNA質體的主鏈均可藉由使用常規技術及容易得到的起始物質進行修飾以使宿主細胞中蛋白質之表現達到最佳，以便逆轉某些元件(例如複製起點及/或抗生素抗性卡匣)之取向，置換質體內源性啟動子(例如抗生素抗性卡匣中之啟動子)，及/或置換編碼轉錄蛋白質之聚核苷酸序列(例如抗生素抗性基因之編碼序列)。(參見例如，Sambrook等人，Molecular Cloning a Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Press (1989))。

【0102】 在本申請案的一個較佳實施例中，DNA質體係適於在哺乳動物宿主細胞中表現蛋白質的表現載體。適於在哺乳動物宿主細胞中表現蛋白質的表現載體包括(但不限於)pcDNATM、pcDNA3TM、pVAX、pVAX-1、ADVAX、NTC8454等。較佳地，表現載體係基於pVAX-1，其可以進一步經修飾以使哺乳動物細胞中蛋白質之表現達到最佳。pVAX-1係DNA疫苗中之常用質體，且含有較強的人即刻早期巨細胞病毒(CMV-IE)啟動子，隨後為牛生長激素(bGH)源性聚腺苷酸化序列(pA)。pVAX-1還含有pUC複製起點及由允許細菌質體繁殖之小原核生物啟動子驅動的卡那黴素抗性基因。

【0103】 在本申請案之一個實施例中，載體係病毒載體。一般而言，病毒載體係載運經修飾病毒DNA或RNA的經遺傳工程改造之病毒，該病毒DNA或RNA已呈現非感染性，但仍含有病毒啟動子及轉殖基因，由此允許經由病毒啟動子轉譯轉殖基因。由於病毒載體常常缺乏感染性序

列，故其需要輔助病毒或包裝株來進行大規模轉染。適用於本申請案的病毒載體之實例包括(但不限於)腺病毒載體、改良型安卡拉牛痘病毒(MVA)載體、腺相關病毒載體、痘病毒載體、腸病毒載體、委內瑞拉馬腦炎病毒(Venezuelan Equine Encephalitis virus)載體、勝利基森林病毒(Semliki Forest Virus)載體、菸草鑲嵌病毒載體、慢病毒載體等。

【0104】 根據本申請案之實施例，載體，例如DNA質體或病毒載體可以包含任何調控元件，以產生該載體之習知功能，包括(但不限於)由該載體之聚核苷酸序列編碼的**HBV**抗原之複製及表現。調控元件包括(但不限於)啟動子、強化子、聚腺苷酸化信號、轉譯終止密碼子、核糖體結合元件、轉錄終止子、選擇標記物、複製起點等。載體可以包含一或多個表現卡匣。「表現卡匣」係載體中引導細胞機構製備RNA及蛋白質的部分。表現卡匣通常包含三種組分：啟動子序列、開放閱讀框架，及視情況包含聚腺苷酸化信號之3'非轉譯區域(UTR)。開放閱讀框架(ORF)係含有所關注蛋白質(例如**HBV**抗原)的自起始密碼子至終止密碼子之編碼序列的閱讀框架。表現卡匣之調控元件可以可操作地連接至編碼所關注**HBV**抗原之聚核苷酸序列。如本文所使用，術語「可操作地連接」係以最廣泛合理的內容解釋，且指依功能關係連接聚核苷酸元件。當聚核苷酸之放置與另一聚核苷酸具有功能關係時，其係「可操作地連接」。舉例而言，若啟動子影響編碼序列之轉錄，則其係可操作地連接至該編碼序列。

【0105】 在一些實施例中，載體包含啟動子序列，較佳地在表現卡匣內包含啟動子序列，用以控制所關注**HBV**抗原之表現。術語「啟動子」係以習知意義使用，且指啟動該可操作地連接之核苷酸序列之轉錄的核苷酸序列。啟動子係與其轉錄之核苷酸序列位於相同股上，且鄰近該核

昔酸序列。啟動子可以為組成性、誘導性或阻遏性。啟動子可以為天然存在或合成性。啟動子可以來源於包括病毒、細菌、真菌、植物、昆蟲及動物之來源。啟動子可以為同源啟動子(亦即，來源於與載體相同之基因來源)或異源啟動子(亦即，來源於不同載體或基因來源)。舉例而言，若欲採用之載體係DNA質體，則啟動子可以對於質體為內源性(同源)或來源於其他來源(異源)。較佳地，該啟動子係位於表現卡匣內編碼HBV抗原之聚核昔酸的上游。

【0106】適用於本申請案中的啟動子之實例包括(但不限於)來自猴病毒40(SV40)之啟動子、小鼠乳癌病毒(MMTV)啟動子、人類免疫缺陷病毒(HIV)啟動子諸如牛免疫缺陷病毒(BIV)長末端重複序列(LTR)啟動子、莫洛尼病毒(Moloney virus)啟動子、禽類白血病病毒(ALV)啟動子、巨細胞病毒(CMV)啟動子諸如CMV即刻早期啟動子(CMV-IE)、埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus, EBV)啟動子，或勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV)啟動子。適用於本申請案中之另外的啟動子包括(但不限於)RSV啟動子、反轉錄病毒LTR、腺病毒主要晚期啟動子及各種痘病毒啟動子，包括(但不限於)以下牛痘病毒或MVA源性及FPV源性啟動子：30K啟動子、I3啟動子、PrS啟動子、PrHyb、PrS5E啟動子、Pr7.5K、Pr13.5長啟動子、40K啟動子、MVA-40K啟動子、FPV 40K啟動子、30k啟動子、PrSynIIm啟動子、PrLE1啟動子及PR1238啟動子。另外的啟動子進一步描述於WO 2010/060632、WO 2010/102822、WO 2013/189611及WO 2014/063832，及WO2017/021776中，其以完整地以引用的方式併入本文中。

【0107】啟動子亦可來自人類基因，諸如人類肌動蛋白、人類肌凝

蛋白、人類血紅蛋白、人類肌肉肌酸或人類金屬硫蛋白之啟動子。啟動子亦可為天然或合成的組織特異性啟動子，諸如肌肉或皮膚特異性啟動子。

【0108】 在本申請案的一個較佳實施例中，啟動子係強力真核啟動子，較佳地為巨細胞病毒即刻早期(CMV-IE)啟動子。例示性CMV-IE啟動子之核苷酸序列顯示於SEQ ID NO: 7中。

【0109】 在本申請案之另一較佳實施例中，啟動子係痘病毒啟動子，較佳為選自PrMVA 13.5長啟動子及/或PrHyb啟動子之啟動子。例示性Pr13.5長啟動子及PrHyb啟動子的核苷酸序列分別以SEQ ID NO:25及26顯示。

【0110】 在一些實施例中，載體包含使表現之轉錄物穩定，促進RNA轉錄物之核輸出及/或改善轉錄-轉譯偶聯之另外的聚核苷酸序列。此類序列之實例包括聚腺苷酸化信號及強化子序列。聚腺苷酸化信號通常位於載體之表現卡匣內所關注蛋白質(例如HBV抗原)之編碼序列的下游。強化子序列係當與轉錄因子結合時會促進相關聯之基因之轉錄的調控性DNA序列。強化子序列較佳在載體之表現卡匣內，位於編碼HBV抗原之聚核苷酸序列的上游，但在啟動子序列的下游。

【0111】 根據本發明，熟習此項技術者已知之任何聚腺苷酸化信號均可使用。舉例而言，聚腺苷酸化信號可以為SV40聚腺苷酸化信號(例如SEQ ID NO:16)、LTR聚腺苷酸化信號、牛生長激素(bGH)聚腺苷酸化信號、人生長激素(hGH)聚腺苷酸化信號或人類β-血球蛋白聚腺苷酸化信號。在本申請案的一個較佳實施例中，聚腺苷酸化信號係牛生長激素(bGH)聚腺苷酸化信號。例示性bGH聚腺苷酸化信號之核苷酸序列顯示於SEQ ID NO: 9中。

【0112】根據本發明，熟習此項技術者已知之任何強化子序列均可使用。舉例而言，強化子序列可以為人類肌動蛋白、人類肌凝蛋白、人類血紅蛋白、人類肌肉肌酸，或病毒強化子，諸如來自CMV、HA、RSV或EBV之強化子。特定強化子之實例包括(但不限於)土拔鼠(Woodchuck)HBV轉錄後調控元件(WPRE)、來源於人類載脂蛋白A1前驅體之內含子/外顯子序列、1型人類T細胞白血病病毒(HTLV-1)長末端重複序列(LTR)之非轉譯R-U5結構域、剪接強化子、合成兔β-血球蛋白內含子或其任何組合。在本申請案的一個較佳實施例中，強化子序列係HTLV-1 LTR之非轉譯R-U5結構域、兔β-血球蛋白內含子及剪接強化子三個連續元件構成的複合序列，在本文中稱作「三強化子序列」。例示性三強化子序列之核苷酸序列顯示於SEQ ID NO: 8中。另一例示性強化子序列係SEQ ID NO: 15中顯示之ApoAI基因片段。

【0113】在一些實施例中，載體包含編碼信號肽序列之聚核苷酸序列。較佳地，編碼信號肽序列之聚核苷酸序列係位於編碼HBV抗原之聚核苷酸序列的上游。信號肽通常引導蛋白質之定位，促進產生蛋白質之細胞分泌蛋白質，及/或改善抗原表現及交叉呈現至抗原呈現細胞。信號肽當自載體表現時可以存在於HBV抗原之N末端，但例如在自細胞分泌時，經信號肽酶裂解。信號肽已裂解的經表現蛋白質通常稱為「成熟蛋白」。根據本發明，此項技術中已知之任何信號肽均可使用。舉例而言，信號肽可以為胱抑素S信號肽；免疫球蛋白(Ig)分泌信號，諸如Ig重鏈γ信號肽SPIgG或Ig重鏈ε信號肽SPIgE。

【0114】在本申請案的一個較佳實施例中，信號肽序列係胱抑素S信號肽。胱抑素S信號肽之例示性核酸及胺基酸序列分別顯示於SEQ ID

NO: 5及6中。免疫球蛋白分泌信號之例示性核酸及胺基酸序列分別顯示於SEQ ID NO: 10及27以及SEQ ID NO: 11中。

【0115】 載體，諸如DNA質體亦可包括細菌複製起點及用於在細菌細胞，例如大腸桿菌中選擇及維持質體的抗生素抗性表現卡匣。細菌複製起點及抗生素抗性卡匣可以與編碼HBV抗原之表現卡匣相同之取向或以相反(逆向)取向定位於載體中。複製起點(ORI)係這樣一種序列，在該序列處，複製起始，使得質體能夠在細胞內複製及存活。適用於本申請案中之ORI的實例包括(但不限於)ColE1、pMB1、pUC、pSC101、R6K及15A，較佳為pUC。pUC ORI之例示性核苷酸序列顯示於SEQ ID NO: 21中。

【0116】 用於在細菌細胞中選擇及維持之表現卡匣通常包括可操作地連接至抗生素抗性基因之啟動子序列。較佳地，可操作地連接至抗生素抗性基因之啟動子序列不同於可操作地連接至編碼所關注蛋白質，例如HBV抗原之聚核苷酸序列的啟動子序列。抗生素抗性基因可以經密碼子優化，且抗生素抗性基因之序列組成通常針對細菌，例如大腸桿菌之密碼子使用進行調整。根據本發明，熟習此項技術者已知之任何抗生素抗性基因均可使用，包括(但不限於)卡那黴素抗性基因(Kan^r)、安比西林(ampicillin)抗性基因(Amp^r)及四環素抗性基因(Tet^r)，以及賦予對氯黴素(chloramphenicol)、博萊黴素(bleomycin)、大觀黴素(spectinomycin)、卡本西林(carbenicillin)等之抗性的基因。

【0117】 在本申請案之另一特定實施例中，載體係病毒載體，較佳為腺病毒載體，其包含表現卡匣，該表現卡匣包括編碼選自由以下組成之群之HBV抗原中之至少一種的聚核苷酸：包含與SEQ ID NO: 4至少98%

一致，諸如與SEQ ID NO: 4至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致之胺基酸序列的HBV pol抗原，及由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原；可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的上游序列，自5'端至3'端，其包含啟動子序列(較佳為SEQ ID NO: 7之CMV-IE啟動子序列)、強化子序列(較佳為SEQ ID NO: 8之三強化子序列或SEQ ID NO: 15之ApoA1強化子序列)及編碼信號肽序列(較佳為具有SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的胱抑素S信號或具有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的免疫球蛋白分泌信號)之聚核苷酸序列；以及可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的下游序列，其包含聚腺苷酸化信號，較佳為SEQ ID NO: 16之SV40聚腺苷酸化信號或SEQ ID NO: 9之bGH聚腺苷酸化信號。

【0118】 在本申請案之另一特定實施例中，載體係病毒載體，較佳為MVA載體，其包含表現卡匣，該表現卡匣包括編碼選自由以下組成之群之HBV抗原中之至少一種的聚核苷酸：包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致，諸如與SEQ ID NO: 4至少98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致之胺基酸序列的HBV pol抗原，及由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原；可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的上游序列，自5'端至3'端，其包含啟動子序列，較佳為SEQ ID NO: 25之PrMVA13.5長啟動子序列或SEQ ID NO: 26之PrHyb啟動子序列，及編碼信號肽序列(較佳為具有SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的胱抑素S信號或具有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的免疫球蛋白分泌信號)之聚核苷酸序列；以及可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的下游序列，其包

含聚腺昔酸化信號或早期終止信號，其中該早期終止信號具有SEQ ID NO: 28之核昔酸序列，或其中該聚腺昔酸化信號選自具有SEQ ID NO: 16之聚核昔酸序列的SV40聚腺昔酸化信號或具有SEQ ID NO: 9之聚核昔酸序列的bGH聚腺昔酸化信號，較佳該可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核昔酸的下游序列係具有SEQ ID NO: 28之核昔酸序列的早期終止信號。

【0119】 在本申請案之一個實施例中，載體，諸如病毒載體，編碼具有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的HBV Pol抗原。較佳地，該載體包含HBV Pol抗原之編碼序列，其與SEQ ID NO: 3之聚核昔酸序列至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 3有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳與SEQ ID NO: 3達100%一致。

【0120】 在本申請案之另一個實施例中，載體，諸如病毒載體編碼由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原。較佳地，該載體包含截短之HBV核心抗原的編碼序列，其與SEQ ID NO: 1之聚核昔酸序列至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 1有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳與SEQ ID NO: 1達100%一致。

【0121】 在本申請案之又一實施例中，載體，諸如病毒載體編碼融合蛋白，該融合蛋白包含具有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的HBV Pol抗原及由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原。較佳

地，該載體包含該融合物之編碼序列，其含有與SEQ ID NO: 1至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 1有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳與SEQ ID NO: 1有98%、99%或100%一致的截短之HBV核心抗原之編碼序列可操作地連接至與SEQ ID NO: 3至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 3有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳與SEQ ID NO: 3有98%、99%或100%一致的HBV Pol抗原之編碼序列。較佳地，該截短之HBV核心抗原的編碼序列經由與SEQ ID NO: 14至少90%一致，諸如與SEQ ID NO: 14有90%、91%、92%、93%、94%、95%、95.5%、96%、96.5%、97%、97.5%、98%、98.5%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%一致，較佳與SEQ ID NO: 14有98%、99%或100%一致的連接子編碼序列可操作地連接至HBV Pol抗原之編碼序列。在本申請案之特定實施例中，該載體包含該融合物之編碼序列，其具有SEQ ID NO: 1可操作地連接至SEQ ID NO: 14，SEQ ID NO: 14進一步可操作地連接至SEQ ID NO: 3。

【0122】 編碼本申請案之HBV抗原的聚核苷酸及表現載體可以根據本發明，利用此項技術中已知之任何方法製備。舉例而言，可以使用熟習此項技術者熟知的標準分子生物學技術，例如聚合酶鏈反應(PCR)等將編碼HBV抗原之聚核苷酸引入或「選殖」至表現載體中。

【0123】腺病毒

【0124】在一個態樣中，本申請案提供一種包含編碼抗原性HBV核心抗原之異源核苷酸序列的重組腺病毒。在另一態樣中，本申請案提供一種包含編碼抗原性HBV pol抗原之異源核苷酸序列的腺病毒。在另一態樣中，本申請案提供一種重組腺病毒載體，其包含編碼抗原性HBV核心抗原之第一異源核苷酸序列及編碼抗原性HBV pol抗原之第二異源核苷酸序列。在另一態樣中，本申請案提供一種包含編碼抗原性HBV核心-HBV pol融合蛋白之異源核苷酸序列的重組腺病毒。

【0125】根據本申請案之腺病毒屬於腺病毒科(Adenoviridae)且較佳為屬於哺乳動物腺病毒屬(Mastadenovirus)之病毒。其可以為人類腺病毒，且亦可為感染其他物種之腺病毒，包括(但不限於)牛類腺病毒(例如牛腺病毒3，BAdV3)、犬類腺病毒(例如CAdV2)、豬類腺病毒(例如PAdV3或5)或猴類腺病毒(其包括猴腺病毒及猿腺病毒，諸如黑猩猩腺病毒或大猩猩腺病毒)。較佳地，腺病毒係人類腺病毒(HAdV或AdHu；在本申請案中，若稱為Ad而不指示物種，則表示人類腺病毒，例如簡寫符號「Ad5」與HAdV5的意思相同，指人類腺病毒血清型5)，或猴類腺病毒，諸如黑猩猩或大猩猩腺病毒(ChAd、AdCh或SAdV)。

【0126】已經使用人類腺病毒進行最先進之研究，且根據本申請案之某些態樣，人類腺病毒係較佳的。在某些較佳實施例中，根據本申請案之重組腺病毒係基於人類腺病毒。在較佳實施例中，該重組腺病毒係基於人類腺病毒血清型5、11、26、34、35、48、49或50。根據本申請案之一尤佳實施例，腺病毒係血清型26或35之一的人類腺病毒。

【0127】該等血清型之優勢在於在人類群體中之低血清陽性率及/或

較低的現有中和抗體力價。rAd26載體之製備描述於例如WO 2007/104792及Abbink等人(2007)Virol 81(9):4654-63中，兩者以全文引用之方式併入本文中。例示性Ad26基因組序列見於GenBank寄存編號EF 153474及WO2007/104792(參見例如SEQ ID NO: 1)中。rAd35載體之製備描述於例如美國專利第7,270,811號、WO00/70071及Vogels等人(2003)J Virol 77(15):8263-71中，其皆以全文引用之方式併入本文中。例示性Ad35基因組序列見於GenBank寄存編號AC_000019及WO00/70071(參見例如圖6)中。

【0128】 猴類腺病毒一般亦在人類群體中具有低血清陽性率及/或較低的現有中和抗體力價，且已報導使用黑猩猩腺病毒載體之大量研究(例如 US6083716 ； WO2005/071093 ； WO 2010/086189 ； WO 2010085984 ； Farina等人，2001，J Virol 75: 11603-13 ； Cohen等人，2002，J Gen Viro 83: 151-55；Kobinger等人，2006，Virology 346: 394-401 ； Tatsis等人，2007，Molecular Therapy 15: 608-17；亦參見Bangari及Mittal，2006，Vaccine 24: 849- 62之評述；以及Lasaro及Ertl，2009，Mol Ther 17: 1333-39之評述)。因此，在其他較佳實施例中，根據本申請案之重組腺病毒係基於猴類腺病毒，例如黑猩猩腺病毒。在本申請案之一個實施例中，重組腺病毒係基於猴類腺病毒類型1、3、7、8、21、22、23、24、25、26、27.1、28.1、29、30、31.1、32、33、34、35.1、36、37.2、39、40.1、41.1、42.1、43、44、45、46、48、49、50或SA7P。

【0129】 腺病毒載體rAd26及rAd35

【0130】 在本申請案之一個較佳實施例中，腺病毒載體包含來自兩

種稀少血清型Ad26及Ad35之衣殼蛋白。在該典型實施例中，該載體係rAd26或rAd35病毒。

【0131】因此，可以用於本申請案中之載體包含Ad26或Ad35衣殼蛋白(例如纖毛、五鄰體或六鄰體蛋白質)。熟習此項技術者應認識到，本申請案之載體中不必使用整個Ad26或Ad35衣殼蛋白。因此，在本申請案之載體中可以使用包括Ad26或Ad35衣殼蛋白之至少一部分的嵌合衣殼蛋白。本申請案之載體亦可包含纖毛、五鄰體及六鄰體蛋白質各自來源於不同血清型之衣殼蛋白，只要至少一種衣殼蛋白係來源於Ad26或Ad35即可。在較佳實施例中，纖毛、五鄰體及六鄰體蛋白質各自來源於Ad26或各自來源於Ad35。

【0132】熟習此項技術者應認識到，來源於多種血清型之元件可以組合於單一重組腺病毒載體中。因此，可以產生組合來自不同血清型之所需特性的嵌合腺病毒。因此，在一些實施例中，本申請案之嵌合腺病毒可以將Ad26及Ad35血清型現有免疫之不存在與諸如溫度穩定性、組裝、錨定、製造產率、重定向或改良之感染、DNA在目標細胞中之穩定性及類似特徵之特徵組合。

【0133】在本申請案之一個實施例中，可用於本申請案中之重組腺病毒載體主要或完全來源於Ad35或Ad26(亦即，該載體係rAd35或rAd26)。在一些實施例中，腺病毒係複製缺陷型的，例如因為其含有基因組E1區域之缺失。對於來源於Ad26或Ad35的本申請案之腺病毒，通常用人類亞群C之腺病毒，諸如Ad5的E4-orf6替代該腺病毒之E4-orf6編碼序列。此允許此類腺病毒在表現Ad5之E1基因的熟知補充性細胞株，諸如293細胞、PER.C6細胞及類似細胞中繁殖(參見例如，Havenga等人，

2006, J Gen Virol 87: 2135-43 ; WO 03/104467)。在本申請案之一個實施例中，該腺病毒係血清型35之人類腺病毒，其缺失已選殖有編碼該抗原之核酸的E1區域，且具有Ad5之E4 orf6區域。在本申請案之一個實施例中，該腺病毒係血清型26之人類腺病毒，其缺失已選殖有編碼該抗原之核酸的E1區域，且具有Ad5之E4 orf6區域。對於Ad35腺病毒，通常保留腺病毒中E1B 55K開放閱讀框架之3'端，例如正好在pIX開放閱讀框架或構成其之片段之上游之166 bp，諸如正好在pIX起始密碼子上游之243 bp片段，在5'端經Bsu36I限制位點標記，因為此會由於pIX基因啟動子部分存在於此區域中而增加腺病毒之穩定性(參見例如Havenga等人, 2006, 前述；WO 2004/001032)。

【0134】 重組腺病毒載體之製備係此項技術中熟知的。rAd26載體之製備描述於例如 WO 2007/104792 及 Abbink 等人, (2007) Virol 81(9):4654-63 中。例示性 Ad26 基因組序列見於 GenBank 寄存編號 EF 153474 及 WO2007/104792 之 SEQ ID NO: 1 中。rAd35載體之製備描述於例如美國專利第7,270,811號及Vogels等人(2003) J Virol 77(15): 8263-71 中。例示性 Ad35 基因組序列見於 GenBank 寄存編號 AC_000019 中。

【0135】 在本申請案之一個實施例中，可用於本申請案中之載體包括WO2012/082918中所描述之載體，其揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

【0136】 通常，可用於本申請案中之載體係使用構成完整重組腺病毒基因組之核酸製備(例如質體、黏質體或桿狀病毒載體)。因此，本申請案亦提供編碼本申請案之腺病毒載體的分離之核酸分子。本申請案之核酸分子可呈藉由選殖或合成製造而獲得的RNA形式或DNA形式。DNA可以

為雙股或單股的。

【0137】 可用於本申請案中之腺病毒載體通常係複製缺陷型的。在此等實施例中，藉由使對於病毒複製至關重要之區域，諸如E1區域缺失或失活來使病毒呈現複製缺陷。可以藉由例如插入所關注基因(通常連接至啟動子)使該等區域基本上缺失或失活。在一些實施例中，本申請案之載體可以含有其他區域，諸如E2、E3或E4區域之缺失或連接至啟動子之異源基因的插入。對於E2及/或E4突變之腺病毒，一般使用E2及/或E4補充性細胞株產生重組腺病毒。該細胞株不必補充腺病毒E3區域中之突變，因為E3並非複製所需的。

【0138】 通常使用包裝細胞株產生足量的本申請案之腺病毒載體。包裝細胞係包含在複製缺陷型載體中已經缺失或失活之基因，由此允許病毒在細胞中複製的細胞。適合細胞株包括例如PER.C6、911、293及E1 A549。

【0139】 如上所指出，在該等載體中可以表現多種B型肝炎病毒(HBV)抗原(例如HBV核心及HBV聚合酶抗原)。必要時，可以對編碼HBV抗原之異源基因進行密碼子優化以確保在經治療宿主(例如人類)中之適當表現。密碼子優化係此項技術中廣泛應用之技術。通常，將異源基因選殖至腺病毒基因組之E1及/或E3區域中。

【0140】 異源B型肝炎病毒基因可以處於腺病毒源性啟動子(例如主要晚期啟動子)之控制下(亦即，可操作地連接至該啟動子)或可以處於異源啟動子之控制下。適合異源啟動子之實例包括CMV啟動子及RSV啟動子。較佳地，該啟動子係位於表現卡匣內所關注異源基因之上游。

【0141】 MVA載體

【0142】可用於本申請案之MVA載體利用來源於改良型安卡拉牛痘病毒之減毒病毒。MVA載體表現多種HBV抗原(例如HBV核心及HBV聚合酶抗原)。在一個態樣中，本申請案提供一種包含編碼抗原性HBV核心抗原之異源核苷酸序列的重組MVA載體。在另一態樣中，本申請案提供一種包含編碼抗原性HBV pol抗原之異源核苷酸序列的重組MVA載體。在一個態樣中，本申請案提供一種重組MVA載體，其包含編碼抗原性HBV核心抗原之第一異源核苷酸序列及編碼抗原性HBV pol抗原之第二異源核苷酸序列。在另一態樣中，本申請案提供一種包含編碼抗原性HBV核心-HBV pol融合蛋白之異源核苷酸序列的重組MVA載體。

【0143】改良型安卡拉牛痘病毒(「MVA」)

【0144】人造減毒改良型安卡拉牛痘病毒(「MVA」)係在帶有牛痘病毒安卡拉株(CVA)之雞胚胎纖維母細胞上連續傳代516次產生(相關評述，參見Mayr, A.等人, *Infection* 3, 6-14 (1975))。作為該等長期傳代之結果，所得MVA病毒之基因組具有約31千鹼基之基因組序列缺失且因此描述為在禽類細胞中複製高度受限之宿主細胞(Meyer, H.等人, *J. Gen. Virol.* 72, 1031-1038 (1991))。在多種動物模型中已顯示，相較於有完全複製能力之起始物質，所得MVA明顯無毒(Mayr, A.及Danner, K., *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34 (1978))。

【0145】可用於實踐本申請案之MVA病毒可以包括(但不限於)MVA-572(1994年1月27日以ECACC V94012707寄存)；MVA-575(2000年12月7日以ECACC V00120707寄存)、MVA-I721(參見Suter等人, *Vaccine* 2009)及ACAM3000(2003年3月27日以ATCC® PTA-5095寄存)。

【0146】更佳地，根據本申請案使用之MVA包括MVA-BN及MVA-BN之衍生物。MVA-BN描述於國際PCT公開案WO 02/042480中。MVA-BN之「衍生物」係指展現與如本文中所描述之MVA-BN基本上相同之複製特徵，但在其基因組之一或多個部分中展現差異的病毒。

【0147】MVA-BN以及其衍生物係不能複製的，意味著無法在活體內及活體外繁殖性複製。更具體言之，在活體外，MVA-BN或其衍生物描述為能夠在雞胚胎纖維母細胞(CEF)中繁殖性複製，但無法在人角質細胞細胞株HaCat (Boukamp等人(1988), J. Cell Biol. 106:761-771)、人骨肉瘤細胞株143B(ECACC寄存編號91112502)、人胚腎細胞株293(ECACC寄存編號85120602)及人子宮頸腺癌細胞株HeLa(ATCC寄存編號CCL-2)中繁殖性複製。另外，MVA-BN或其衍生物在HeLa細胞及HaCaT細胞株中之病毒擴增比率比MVA-575低至少兩倍，更佳低三倍。針對MVA-BN及其衍生物之該等特性的測試及分析法描述於WO 02/42480(美國專利申請案第2003/0206926號)及WO 03/048184(美國專利申請案第2006/0159699號)中。

【0148】如前一段落中所描述的術語在活體外於人類細胞株中「不能繁殖性複製」或「無繁殖性複製之能力」例如描述於WO 02/42480中，其亦教示如何獲得具有如上文所提及之所需特性的MVA。該術語適用於使用WO 02/42480或美國專利第6,761,893號中所描述之分析法，在感染之後4天在活體外具有小於1之病毒擴增比率的病毒。

【0149】術語「無法繁殖性複製」係指如前一段落中所描述，在感染之後4天，病毒在活體外於人類細胞株中之病毒擴增比率小於1。WO 02/42480或美國專利第6,761,893號中描述之分析法適用於測定病毒擴增

比率。

【0150】 如前一段落中所描述的病毒在活體外於人類細胞株中之擴增或複製通常以受感染細胞產生之病毒(輸出)與最初先用於感染細胞(輸入)之量的比率表示，稱為「擴增比率」。擴增比率為「1」定義為受感染細胞產生之病毒量與最初用於感染細胞之量相同的擴增狀態，意味著受感染細胞能夠用於病毒感染及繁殖。相比之下，擴增比率小於1，亦即輸出低於輸入量，指示缺乏繁殖性複製且因此病毒減毒。

【0151】 基於MVA之疫苗的優勢包括其安全型態以及在大規模疫苗製造方面之可用性。臨床前測試披露，相較於其他MVA株，MVA-BN展示優良的減毒作用及功效(WO 02/42480)。MVA-BN株之另外的特性係能夠在牛痘病毒初打/牛痘病毒加打療程中誘導與DNA-初打/牛痘病毒加打療程基本上相同程度之免疫。

【0152】 作為本文中之最佳實施例的重組MVA-BN病毒由於其在哺乳動物細胞中獨特的複製缺陷性及其公認的無毒性而被認為係安全的。此外，除其功效外，工業規模製造之可行性亦可為有益的。另外，基於MVA之疫苗可以遞送多種異源抗原且允許同時誘導體液及細胞免疫。

【0153】 可用於本申請案中之MVA載體可以使用此項技術中已知之方法製備，諸如WO/2002/042480及WO/2002/24224中所描述之方法，各案之相關揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0154】 在本申請案的一個較佳實施例中，MVA載體包含編碼一或多種選自由以下組成之群之抗原蛋白質的核酸：HBV核心抗原、HBV pol抗原及HBV核心-HBV pol融合抗原。

【0155】 HBV抗原蛋白質可以插入MVA之一或多個基因間區域

(IGR)中。在本申請案之一個實施例中，IGR 係選自IGR07/08、IGR 44/45、IGR 64/65、IGR 88/89、IGR 136/137及IGR 148/149。在本申請案之一個實施例中，重組MVA中少於5、4、3或2個IGR包含編碼HBV核心抗原及/或HBV pol抗原之抗原決定子的異源核苷酸序列。異源核苷酸序列可以另外或替代地插入MVA基因組之一或多個天然存在之缺失位點，特定言之主要缺失位點I、II、III、IV、或VI中。在本申請案之一個實施例中，重組MVA之天然存在之缺失位點中少於5、4、3或2個包含編碼HBV核心抗原及/或HBV pol抗原之抗原決定子的異源核苷酸序列。

【0156】 MVA中包含編碼HBV蛋白質之抗原決定子之異源核苷酸序列的插入位點之數量可以為1、2、3、4、5、6、7個或更多。在本申請案之一個實施例中，異源核苷酸序列係插入4、3、2或更少插入位點中。較佳地，使用兩個插入位點。在本申請案之一個實施例中，使用三個插入位點。較佳地，重組MVA包含至少2、3、4、5、6或7個基因插入2或3個插入位點中。

【0157】 本文中提供的重組MVA病毒可以藉由此項技術中已知之常規方法產生。獲得重組痘病毒或將外源編碼序列插入痘病毒基因組中之方法係熟習此項技術者熟知的。舉例而言，標準分子生物學技術之方法，諸如DNA選殖、DNA及RNA分離、西方墨點分析、RT-PCR及PCR擴增技術描述於Molecular Cloning, A laboratory Manual (第2版) (J. Sambrook等人, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))，且用於處理及操作病毒之技術描述於Virology Methods Manual (B.W.J. Mahy等人(編), Academic Press (1996))中。類似地，用於處理、操作及基因工程改造MVA之技術及訣竅描述於Molecular Virology: A Practical Approach

(A.J. Davison及R.M. Elliott (編), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993)(參見例如第9章: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)及Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Son, Inc. (1998)(參見例如第16章, 第IV節: Expression of proteins in mammalian cells using vaccinia viral vector))。

【0158】可以應用不同方法產生本文所揭示之各種重組MVA。欲插入病毒中之DNA序列可以放置於已插入與MVA之一段DNA同源之DNA的大腸桿菌質體構築體中。欲插入之DNA序列可以單獨地連接至啟動子。啟動子-基因連接可以定位於質體構築體中以使得該啟動子-基因連接在兩端上側接與側接含有非必需基因座之MVA DNA區域的DNA序列同源之DNA。所得質體構築體可以藉由在大腸桿菌細菌內繁殖來擴增並經分離。分離的含有欲插入之DNA基因序列的質體可以轉染至例如雞胚胎纖維母細胞(CEF)之細胞培養物中，同時用MVA感染該培養物。質體與病毒基因組中各別同源MVA DNA之間的重組可以產生藉由外源DNA序列之存在修飾的MVA。

【0159】根據一個較佳實施例，適合細胞培養之細胞，如例如CEF細胞，可以用痘病毒感染。受感染細胞隨後可以用包含一或多個外源或異源基因之第一質體載體轉染，該一或多個外源或異源基因較佳處於痘病毒表現控制元件之轉錄控制下。如上所解釋，該質體載體亦包含能夠引導外源序列插入痘病毒基因組之選定部分中的序列。視情況，該質體載體亦含有包含可操作地連接至痘病毒啟動子之標記物及/或選擇基因的卡匣。

【0160】適合標記物或選擇基因係例如編碼綠色螢光蛋白、 β -半乳

糖苷酶、新黴素-磷酸核糖轉移酶或其他標記物之基因。選擇或標記物卡匣之使用使所產生之重組痘病毒的鑑別及分離變得簡單。然而，亦可藉由PCR技術鑑別重組痘病毒。隨後，可以用如上文所描述獲得的重組痘病毒感染另一細胞且用包含一或多個第二外源或異源基因之第二載體轉染。在此情況下，此基因應引入痘病毒基因組之不同插入位點中，第二載體亦在引導該一或多個第二外源基因或基因整合至痘病毒基因組中的痘病毒同源序列中有不同。在發生同源重組之後，可以分離出包含兩個或兩個以上外源或異源基因之重組病毒。對於將另外的外源基因引入重組病毒中，可以藉由使用在先前步驟中分離之重組病毒進行感染且藉由使用包含另外的一或多個外源基因之另一載體進行轉染來重複感染及轉染步驟。

【0161】或者，如上文所描述的感染及轉染步驟可互換，亦即，適合細胞可以先用包含外源基因之質體載體轉染且接著用痘病毒感染。作為另一替代方案，亦可將各外源基因引入不同病毒中，用所有所獲得的重組病毒共感染細胞並篩選包括所有外源基因之重組株。第三個替代方案係在活體外連接DNA基因組及外源序列且使用輔助病毒重建重組之牛痘病毒DNA基因組。第四個替代方案係選殖作為細菌人工染色體(BAC)之牛痘病毒基因組(諸如MVA)與線性外源序列之間在大腸桿菌或另一細菌物種中的同源重組，該線性外源序列側接有與側接牛痘病毒基因組中所需整合位點之序列同源的DNA序列。

【0162】異源HBV基因(例如HBV核心抗原、HBV pol抗原及/或HBV核心-HBV-pol融合蛋白)可以處於一或多個痘病毒啟動子之控制下(亦即，可操作地連接至該一或多個痘病毒啟動子)。在本申請案之一個實施例中，痘病毒啟動子係Pr7.5啟動子、混合早期/晚期啟動子，或PrS啟

動子、PrS5E啟動子、合成或天然早期或晚期啟動子，或牛痘病毒ATI啟動子。

【0163】組合物、免疫原性組合及疫苗

【0164】本申請案亦係關於包含根據本申請案之一或多種HBV抗原、編碼一或多種HBV抗原之聚核苷酸及/或載體的組合物、免疫原性組合，更特定言之套組，及疫苗。本文所描述的本申請案之HBV抗原、聚核苷酸(包括RNA及DNA)及/或載體中之任一種均可用於本申請案之組合物、免疫原性組合或套組，及疫苗中

【0165】在一個通用態樣中，本申請案提供包含編碼由與SEQ ID NO: 2至少90%一致之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原，或包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致之胺基酸序列之HBV聚合酶抗原的分離或非天然存在之核酸分子(DNA或RNA)的組合物，包含該分離或非天然存在之核酸分子的載體，及/或由該分離或非天然存在之核酸分子編碼的分離或非天然存在之多肽。

【0166】在本申請案之一個實施例中，組合物包含編碼截短之HBV核心抗原的分離或非天然存在之核酸分子(DNA或RNA)，該截短之HBV核心抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成。

【0167】在本申請案之一個實施例中，組合物包含編碼HBV pol抗原的分離或非天然存在之核酸分子(DNA或RNA)，該HBV pol抗原包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列。

【0168】在本申請案之一個實施例中，組合物包括：含編碼截短之

HBV核心抗原之聚核苷酸序列的分離或非天然存在之核酸分子(DNA或RNA)，該截短之HBV核心抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成；以及含編碼HBV pol抗原之聚核苷酸序列的分離或非天然存在之核酸分子(DNA或RNA)，該HBV pol抗原包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列。截短之HBV核心抗原及HBV Pol抗原之編碼序列可以存在於同一分離或非天然存在之核酸分子(DNA或RNA)中，或兩個不同的分離或非天然存在之核酸分子(DNA或RNA)中。

【0169】 在本申請案之一個實施例中，組合物包括含編碼截短之HBV核心抗原之聚核苷酸的病毒載體，該截短之HBV核心抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成。

【0170】 在本申請案之一個實施例中，組合物包括含編碼HBV pol抗原之聚核苷酸的病毒載體，該HBV pol抗原包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列。

【0171】 在本申請案之一個實施例中，組合物包括：含編碼截短之HBV核心抗原之聚核苷酸的病毒載體，該截短之HBV核心抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成；以及含編碼HBV pol抗原之聚核苷酸的病毒載體，該HBV pol抗原包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列。包含截短之HBV核心抗原之編碼序列的載體及包含HBV pol抗原之編碼序列的載體可以為相同載體，或兩種不同的載體。

【0172】 在本申請案之一個實施例中，組合物包括含編碼融合蛋白

之聚核苷酸的病毒載體，該融合蛋白包含由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原可操作地連接至包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列的HBV Pol抗原，或該HBV Pol抗原可操作地連接至該截短之HBV核心抗原。較佳地，該融合蛋白進一步包含將截短之HBV核心抗原可操作地連接至HBV Pol抗原或將HBV Pol抗原可操作地連接至截短之HBV核心抗原的連接子。較佳地，該連接子具有胺基酸序列(AlaGly) n ，其中n係2至5之整數。

【0173】在本申請案之一個實施例中，組合物包含由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成的分離或非天然存在之截短之HBV核心抗原。

【0174】在本申請案之一個實施例中，組合物包括含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列的分離或非天然存在之HBV Pol抗原。

【0175】在本申請案之一個實施例中，組合物包含由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成的分離或非天然存在之截短之HBV核心抗原；以及包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列的分離或非天然存在之HBV Pol抗原。

【0176】在本申請案之一個實施例中，組合物包含分離或非天然存在之融合蛋白，該融合蛋白包含由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原可操作地連接至包含與SEQ ID NO: 4至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 4

達100%一致之胺基酸序列的HBV Pol抗原，或該HBV Pol抗原可操作地連接至該截短之HBV核心抗原。較佳地，該融合蛋白進一步包含將截短之HBV核心抗原可操作地連接至HBV Pol抗原或將HBV Pol抗原可操作地連接至截短之HBV核心抗原的連接子。較佳地，該連接子具有胺基酸序列(AlaGly) n ，其中n係2至5之整數。

【0177】 在另一通用態樣中，本申請案係關於免疫原性組合或套組，其包含表現根據本申請案之實施例之截短之HBV核心抗原及HBV pol抗原的聚核苷酸。編碼本文所描述的本申請案之HBV核心及pol抗原之任何聚核苷酸及/或載體均可用於本申請案之免疫原性組合或套組中。

【0178】 根據本申請案之實施例，疫苗組合或套組中之聚核苷酸可以連接或分開，由此使自此類聚核苷酸表現之HBV抗原融合在一起或作為獨立蛋白質產生，無論自相同抑或不同聚核苷酸表現。在一個實施例中，第一聚核苷酸及第二聚核苷酸係存在於獨立的病毒載體中，以同一組合物或獨立組合物形式組合使用，由此使所表現之蛋白質亦為獨立蛋白質，但組合使用。在另一個實施例中，由第一聚核苷酸及第二聚核苷酸編碼的HBV抗原可以由同一病毒載體表現，由此產生HBV核心-pol融合抗原。視情況，核心及pol抗原可以藉由短連接子接合或融合在一起。或者，由第一聚核苷酸及第二聚核苷酸編碼的HBV抗原可以使用在核心與pol抗原編碼序列之間的核糖體滑移位點(ribosomal slippage site)(又稱為順式水解酶位點)，獨立地由單一載體表現。此策略產生雙順反子表現載體，其中個別核心及pol抗原係由單一mRNA轉錄物產生。取決於mRNA轉錄物上編碼序列之次序，由此類雙順反子表現載體產生之核心及pol抗原可以具有另外的N或C末端殘基。可用於此目的的核糖體滑移位點之實

例包括(但不限於)來自口蹄疫病毒(FMDV)之FA2滑移位點。另一種可能係由第一聚核苷酸及第二聚核苷酸編碼之HBV抗原可以獨立地由兩個獨立載體表現，一個載體編碼HBV核心抗原且一個編碼HBV pol抗原。

【0179】 在一個較佳實施例中，第一聚核苷酸及第二聚核苷酸係存在於獨立病毒載體中。較佳地，該等獨立載體係存在於同一組合物中。

【0180】 在本申請案之一個特定實施例中，免疫原性組合或套組包括：含編碼截短之HBV核心抗原之聚核苷酸的第一載體，較佳為DNA質體或病毒載體，該截短之HBV核心抗原由與SEQ ID NO: 2至少90%一致，較佳與SEQ ID NO: 2達100%一致之胺基酸序列組成；以及含編碼HBV聚合酶抗原之聚核苷酸的第二載體，較佳為DNA質體或病毒載體，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致，較佳與SEQ ID NO: 4達100%一致之胺基酸序列。

【0181】 在本申請案之一個特定實施例中，第一載體係第一DNA質體且第二載體係第二DNA質體。該第一DNA質體及該第二DNA質體各自包含複製起點，較佳為SEQ ID NO: 21之pUC ORI，及抗生素抗性卡匣，其較佳包含具有與SEQ ID NO: 22至少90%一致之聚核苷酸序列的經密碼子優化之Kan^r (卡那黴素抗性)基因，該基因較佳處於bla啟動子，例如SEQ ID NO: 24中顯示之bla啟動子的控制下。該第一DNA質體及該第二DNA質體各自獨立地進一步包含以下至少一個：啟動子序列、強化子序列，及編碼可操作地連接至第一聚核苷酸序列或第二聚核苷酸序列之信號肽序列的聚核苷酸序列。較佳地，該第一DNA質體及該第二DNA質體各自包含可操作地連接至第一聚核苷酸或第二聚核苷酸之上游序列，其中該上游序列自5'端至3'端包含SEQ ID NO: 7之啟動子序列、SEQ ID NO: 8

之強化子序列及編碼具有SEQ ID NO: 6之胺基酸序列之信號肽序列的聚核苷酸序列。該第一DNA質體及該第二DNA質體各自亦可包含位於HBV抗原編碼序列下游的聚腺苷酸化信號，諸如SEQ ID NO: 9之bGH聚腺苷酸化信號。

【0182】 在本申請案之一個特定實施例中，第一載體係第一病毒載體且第二載體係第二病毒載體。較佳地，該第一病毒載體及該第二病毒載體各自為腺病毒載體，更佳為Ad26或Ad35載體，其包含表現卡匣，該表現卡匣包括編碼本申請案之HBV pol抗原或截短之HBV核心抗原的聚核苷酸；可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的上游序列，該上游序列自5'端至3'端包含啟動子序列(較佳為SEQ ID NO: 7之CMV啟動子序列)、強化子序列(較佳為SEQ ID NO: 15之ApoAI基因片段序列，或SEQ ID NO: 8之三強化子序列)及編碼信號肽序列(較佳為具有SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的胱抑素S信號，或具有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之免疫球蛋白分泌信號)的聚核苷酸序列；以及可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的下游序列，該下游序列包含聚腺苷酸化信號，較佳為SEQ ID NO:16之SV40聚腺苷酸化信號。

【0183】 在本申請案之一個特定實施例中，第一載體係第一病毒載體且第二載體係第二病毒載體。較佳地，該第一病毒載體及該第二病毒載體各自係MVA載體，其包含表現卡匣，該表現卡匣包括編碼本申請案之HBV pol抗原及/或截短之HBV核心抗原的聚核苷酸；可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的上游序列，該上游序列自5'端至3'端包含啟動子序列，較佳為SEQ ID NO: 25之PrMVA13.5長啟動子序列或SEQ ID NO: 26之PrHyb啟動子序列，及編碼信號肽序列(較佳為具有SEQ ID NO:

6之胺基酸序列之胱抑素S信號，或具有SEQ ID NO: 11之胺基酸序列之免疫球蛋白分泌信號)的聚核苷酸序列；以及可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的下游序列，該下游序列包含聚腺苷酸化信號，或早期終止信號，其中該早期終止信號具有SEQ ID NO: 28之核苷酸序列，或其中該聚腺苷酸化信號係選自具有SEQ ID NO: 16之聚核苷酸序列的SV40聚腺苷酸化信號或具有SEQ ID NO: 9之聚核苷酸序列的bGH聚腺苷酸化信號，較佳該可操作地連接至該編碼HBV抗原之聚核苷酸的下游序列係具有SEQ ID NO: 28之核苷酸序列的早期終止信號。

【0184】 在本申請案之一個實施例中，提供一種疫苗組合，其包括(a)包含免疫有效量之腺病毒載體的第一組合物，該腺病毒載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致的胺基酸序列，其中該HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性；以及(b)包含免疫有效量之改良型安卡拉牛痘病毒(MVA)載體的第二組合物，該MVA載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第二聚核苷酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致的胺基酸序列，其中該HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性；其中該第一組合物投與人類個體用於引發免疫反應，且該第二組合物投與人類個體一或多次用於增強免疫反應。

【0185】 在本申請案之一個實施例中，提供一種疫苗組合，其包括(a)包含免疫有效量之改良型安卡拉牛痘病毒(MVA)載體的第一組合物，該MVA載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致的胺基酸序列，其中該HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性；以及(b)包含免疫有效

量之腺病毒載體的第二組合物，該腺病毒載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第二聚核昔酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致的胺基酸序列，其中該HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性；其中該第一組合物投與人類個體用於引發免疫反應，且該第二組合物投與人類個體一或多次用於增強免疫反應。

【0186】 在免疫原性組合包含第一病毒載體及第二病毒載體的本申請案之該等實施例中，該第一載體及該第二載體各自之量不受特別限制。舉例而言，第一病毒載體及第二病毒載體可以按重量計以10:1至1:10，諸如按重量計以10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10之比率存在。較佳地，第一病毒載體及第二病毒載體按重量計係以1:1之比率存在。

【0187】 本申請案之組合物及免疫原性組合可以包含編碼另外的HBV抗原之另外的聚核昔酸或載體及/或另外的HBV抗原或其免疫原性片段。然而，在特定實施例中，本申請案之組合物及免疫原性組合不包含某些抗原。

【0188】 在一個特定實施例中，本申請案之組合物或免疫原性組合或套組不包含HBsAg或編碼HBsAg之聚核昔酸序列。

【0189】 在另一特定實施例中，本申請案之組合物或免疫原性組合或套組不包含HBV L蛋白質或編碼HBV L蛋白質之聚核昔酸序列。

【0190】 在本申請案之又一特定實施例中，本申請案之組合物或免疫原性組合不包含HBV包膜蛋白或編碼HBV包膜蛋白之聚核昔酸序列。

【0191】 本申請案之組合物及免疫原性組合亦可包含醫藥學上可接受之載劑。醫藥學上可接受之載劑係無毒的且不應干擾活性成分之功效。

醫藥學上可接受之載劑可以包括一或多種賦形劑，諸如黏合劑、崩解劑、膨潤劑、懸浮劑、乳化劑、潤濕劑、潤滑劑、調味劑、甜味劑、防腐劑、染料、增溶劑及包覆劑。該載劑或其他材料之確切性質可以取決於投與途徑，例如肌肉內、皮內、皮下、經口、靜脈內、皮膚、黏膜內(例如腸)、鼻內或腹膜內途徑。對於液體可注射製劑，例如懸浮液及溶液，適合的載劑及添加劑包括水、二醇、油、醇、防腐劑、著色劑及類似物。對於固體口服製劑，例如散劑、膠囊、囊片、膠囊錠(gelcap)及錠劑，適合的載劑及添加劑包括澱粉、糖、稀釋劑、成粒劑、潤滑劑、黏合劑、崩解劑及類似物。對於鼻噴霧劑/吸入劑混合物，水溶液/懸浮液可以包含水、二醇、油、潤滑劑、穩定劑、潤濕劑、防腐劑、芳族物、調味劑及類似物作為適合的載劑及添加劑。

【0192】 本申請案之組合物及免疫原性組合可以用適於向個體投與之任何物質調配以有助於投與並改善功效，包括(但不限於)經口(腸)投與及非經腸注射。非經腸注射包括靜脈內注射或輸注、皮下注射、皮內注射及肌肉內注射。本申請案之組合物亦可調配用於其他投藥途徑，包括經黏膜、眼、直腸、長效植入、舌下投與(即在舌頭下方，自口腔黏膜投與，繞過門脈循環)、吸入或鼻內投與。

【0193】 在本申請案之一個較佳實施例中，本申請案之組合物及免疫原性組合係調配用於非經腸注射，較佳經皮下、皮內注射或肌肉內注射，更佳肌肉內注射。

【0194】 根據本申請案之實施例，供投與之組合物及免疫原性組合通常將包含於醫藥學上可接受之載劑，例如水性載劑，諸如緩衝生理食鹽水及類似物，例如磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)中之緩衝溶液。視需要，

該等組合物及免疫原性組合亦可含有醫藥學上可接受之物質以接近生理條件，諸如pH調節及緩衝劑。在一個典型實施例中，本申請案的包含質體DNA之組合物或免疫原性組合可以含有磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)作為醫藥學上可接受之載劑。質體DNA之存在濃度可以為例如0.5 mg/mL至5 mg/mL，諸如為0.5 mg/mL、1 mg/mL、2 mg/mL、3 mg/mL、4 mg/mL或5 mg/mL，較佳為1 mg/mL。

【0195】可以根據此項技術中熟知之方法，將本申請案之組合物及免疫原性組合調配為疫苗(又稱為「免疫原性組合物」)。此類組合物可以包括用以增強免疫反應之佐劑。根據本發明，調配物中各組分之最佳比率可以藉由熟習此項技術者熟知之技術測定。

【0196】在本申請案之一個實施例中，本申請案之組合物或免疫原性組合中包括佐劑，或將佐劑與本申請案之組合物或免疫原性組合共投與。佐劑之使用係可選的，且當該組合物係用於疫苗接種目的時，其可以進一步增強免疫反應。適於共投與或包括在根據本申請案之組合物中的佐劑應較佳地為可能安全、具有良好耐受性且有效用於人類之佐劑。佐劑可以為小分子或抗體，包括(但不限於)免疫檢查點抑制劑(例如抗PD1、抗RIM-3等)、鐸樣受體(toll-like receptor)抑制劑、RIG-1抑制劑、IL-15超級促效劑(Altor Bioscience)、突變IRF3及IRF7基因佐劑、STING促效劑(Aduro)、FLT3L基因佐劑、IL-12基因佐劑及IL-7-hyFc。

【0197】本申請案之實施例亦關於製備本申請案之組合物及免疫原性組合的方法。根據本申請案之實施例，製備組合物或免疫原性組合之方法包含將本申請案的編碼HBV抗原之分離之聚核苷酸、載體及/或多肽與一或多種醫藥學上可接受之載劑混合。一般熟習此項技術者將熟悉用於製

備此類組合物之習知技術。

【0198】誘發/增強免疫反應之方法

【0199】在另一通用態樣中，本申請案係關於一種在有需要之個體中誘發針對B型肝炎病毒(HBV)之免疫反應的方法，其包含向該個體投與免疫有效量的本申請案之組合物或免疫原性組合物。本文所描述的本申請案之組合物及免疫原性組合中之任一種均可用於本申請案之方法中。

【0200】本申請案提供使用MVA載體與腺病毒載體之組合引發及增強針對人類個體中之HBV抗原蛋白質或其免疫原性多肽之免疫反應的改良方法。

【0201】根據本申請案之一通用態樣，增強人類個體中之免疫反應的方法包含：

- a. 向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之腺病毒載體的第一組合物；以及
- b. 向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之MVA載體的第二組合物；

由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。

【0202】根據本申請案之另一通用態樣，增強人類個體中之免疫反應的方法包含：

- a. 向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之MVA載體的第一組合物；以及
- b. 向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之腺病毒載體的第二組合物；

由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。

【0203】根據本申請案之另一通用態樣，增強人類個體中之免疫反應的方法包含：

a. 向該人類個體投與第一組合物，該第一組合物包含免疫有效量之第一質體，該第一質體包括含編碼本申請案之HBV pol抗原之第一聚核苷酸序列的第一非天然存在之核酸；及免疫有效量之第二質體，該第二質體包括含編碼本申請案之截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列的第二非天然存在之核酸；以及

b. 向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之MVA載體的第二組合物；

由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。

【0204】根據本申請案之另一通用態樣，增強人類個體中之免疫反應的方法包含：

a. 向該人類個體投與包含免疫有效量的本申請案之MVA載體的第一組合物；以及

b. 向該人類個體投與第二組合物，該第二組合物包含免疫有效量之第一質體，該第一質體包括含編碼本申請案之HBV pol抗原之第一聚核苷酸序列的第一非天然存在之核酸；及免疫有效量之第二質體，該第二質體包括含編碼本申請案之截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列的第二非天然存在之核酸；

由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。

【0205】該第一組合物投與有需要之人類個體以引發免疫反應，且第二組合物投與有需要之人類個體以增強免疫反應。引發及增強免疫反應可以例如促進免疫反應。

【0206】根據本申請案之實施例，增強之免疫反應包含針對人類個體中之HBV抗原蛋白質的增強之抗體反應。

【0207】較佳地，增強之免疫反應進一步包含針對該人類個體中之HBV抗原蛋白質的增強之CD4+反應或增強之CD8+ T細胞反應。由根據本申請案之一實施例之方法產生的增強之CD4+ T細胞反應可以例如為對HBV蛋白質之主要CD4+ T細胞反應的增加或誘導，及/或對人類個體中之HBV抗原蛋白質具有特異性之多功能CD4+ T細胞的增加或誘導。多功能CD4+ T細胞表現多於一種細胞介素，諸如IFN- γ 、IL-2及TNF- α 中之兩種或超過兩種。由根據本申請案之一實施例之方法產生的增強之CD8+ T細胞反應可以例如為對人類個體中之HBV抗原蛋白質具有特異性之多功能CD8+ T細胞的增加或誘導。

【0208】更佳地，由根據本申請案之一實施例之方法產生的增強之免疫反應包含針對人類個體中之HBV抗原蛋白質的增強之CD4+ T細胞反應、增強之抗體反應及增強之CD8+ T細胞反應。

【0209】如本文所使用，術語「感染」係指致病物對宿主之侵襲。當致病物能夠侵襲宿主，且在宿主內複製或繁殖時，認為其具有「感染性」。感染物之實例包括病毒，例如HBV及某些物種之腺病毒、朊病毒、細菌、真菌、原蟲及類似物。「HBV感染」特指HBV對宿主生物體，諸如宿主生物體之細胞及組織之侵襲。

【0210】根據本申請案之實施例，當關於本文所描述之方法使用時，「誘發免疫反應」涵蓋在有需要之個體中引起針對HBV或HBV感染之所需免疫反應或作用。「誘發免疫反應」亦涵蓋提供針對病原體，亦即HBV之治療性免疫以進行治療。如本文所使用，術語「治療性免疫」或

「治療性免疫反應」意思指經疫苗接種的感染HBV之個體能夠控制該疫苗接種所針對之病原體(亦即HBV)之感染。在一個實施例中，「誘發免疫反應」意謂在有需要之個體中產生免疫，例如以提供針對疾病，諸如HBV感染之治療作用。在本申請案之一個實施例中，「誘發免疫反應」係指引起或改善針對HBV之細胞免疫，例如T細胞反應。在本申請案之一個實施例中，「誘發免疫反應」係指引起或改善針對HBV之體液免疫反應。在本申請案之一個實施例中，「誘發免疫反應」係指引起或改善針對HBV之細胞及體液免疫反應。

【0211】 通常，根據本申請案之實施例之組合物及免疫原性組合的投與將具有治療目的，用於在HBV感染或發展HBV感染特有之症狀之後產生針對HBV之免疫反應，亦即，用於治療性疫苗接種。

【0212】 如本文所使用，「免疫原性有效量」或「免疫有效量」意謂足以在有需要之個體中誘發所需免疫作用或免疫反應的組合物、聚核昔酸、載體或抗原之量。在一個實施例中，免疫有效量意謂足以在有需要之個體中誘發免疫反應的量。在另一個實施例中，免疫有效量意謂足以在有需要之個體中產生免疫，例如針對疾病，諸如HBV感染提供治療作用的量。免疫有效量可以取決於多種因素而變化，諸如個體之身體狀況，年齡、體重、健康狀況等；具體應用，例如提供保護性免疫或治療性免疫；以及需要免疫之具體疾病，例如病毒感染。一般熟習此項技術者根據本發明可以容易地確定免疫有效量。

【0213】 在本申請案之特定實施例中，免疫有效量係指足以實現以下作用中之一種、兩種、三種、四種或更多種的組合物或免疫原性組合之量：(i)降低或改善HBV感染或其相關症狀之嚴重程度；(ii)縮短HBV感染

或其相關症狀之持續時間；(iii)預防HBV感染或其相關症狀進展；(iv)使HBV感染或其相關症狀消退；(v)預防HBV感染或其相關症狀之發展或發作；(vi)預防HBV感染或其相關症狀之復發；(vii)減少患HBV感染之個體的住院；(viii)縮短患HBV感染之個體之住院時間；(ix)增加患HBV感染之個體之存活期；(x)消除個體之HBV感染；(xi)抑制或減少個體中之HBV複製；及/或(xii)增強或改善另一療法之預防或治療作用。

【0214】 在其他特定實施例中，免疫有效量係足以減小HBsAg含量以符合臨床血清轉化之發展；利用個體之免疫系統達成持續清除HBsAg以及減少受感染肝細胞；誘導HBV抗原特異性活化之T細胞群；及/或在12個月內達成持續減損HBsAg。目標指標之實例包括低於500個複本之HBsAg國際單位(IU)臨限值之較低HBsAg及/或較高CD8計數。

【0215】 作為指導通則，當用於病毒載體時，免疫有效量之範圍可以為每劑約 1×10^7 個病毒粒子至每劑約 1×10^{12} 個病毒粒子。免疫有效量可以為每劑約 1×10^{10} 、約 2×10^{10} 、約 3×10^{10} 、約 4×10^{10} 、約 5×10^{10} 、約 6×10^{10} 、約 7×10^{10} 、約 8×10^{10} 、約 9×10^{10} 、約 1×10^{11} 、約 2×10^{11} 、約 3×10^{11} 、約 4×10^{11} 、約 5×10^{11} 或約 1×10^{12} 個病毒粒子。免疫有效量可以來自一個載體或來自多個載體。免疫有效量可呈單一組合物或呈多種組合物投與，諸如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10種組合物(例如錠劑、膠囊或可注射劑)，其中該多個膠囊或注射液之投與總體向個體提供免疫有效量。亦可按所謂的初打-加打療程，向個體投與免疫有效量，且隨後向該個體投與另一劑免疫有效量。此初打-加打療程之一般概念係熟習疫苗領域之技術者熟知的。可以依需要，在該療程中視情況增加投與其他追加劑。

【0216】根據本申請案之實施例，包含兩個病毒載體(例如編碼HBV核心抗原之第一病毒載體及編碼HBV pol抗原之第二病毒載體)的免疫原性組合可以藉由混合該兩個病毒載體且將該混合物遞送至單一解剖部位來投與個體。或者，可進行兩次獨立的免疫接種，分別遞送單一表現載體。在此類實施例中，無論兩個病毒載體係作為混合物以單次免疫接種投與抑或分兩次獨立的免疫接種投與，第一病毒載體及第二病毒載體均可按重量計以10:1至1:10，諸如按重量計以10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10之比率投與。較佳地，該第一病毒載體及該第二病毒載體按重量計係以1:1之比率投與。

【0217】在一些實施例中，根據本申請案之方法治療之個體係感染HBV之個體，特別是患有慢性HBV感染之個體。急性HBV感染之特徵在於先天免疫系統之高效活化加上隨後的廣泛適應性反應(例如HBV特異性T細胞、中和抗體)，由此通常造成成功抑制複製或移除受感染之肝細胞。反之，此類反應會因高病毒及抗原負荷而減弱或減小，例如大量產生HBV包膜蛋白，且可以於亞病毒粒子中釋放超過感染性病毒1,000倍之量。

【0218】慢性HBV感染係以病毒負荷、肝酶含量(壞死性發炎活性)、HBeAg或HBsAg負荷，或者針對該等抗原之抗體之存在等特徵分階段說明。cccDNA含量保持相對恆定，每個細胞有約10至50個複本，即使病毒血症可能變化極大。cccDNA物種之存留導致慢性化。更具體言之，慢性HBV感染各階段包括：(i)免疫耐受期，以高病毒負荷及正常或最小升高程度之肝酶為特徵；(ii)免疫活化HBeAg陽性期，在此階段觀察到較

低或下降之病毒複製程度及明顯升高之肝酶；(iii)非活動性HBsAg攜帶期，該階段係具有低病毒負荷之低複製狀態且在血清中具有可以遵循HBeAg血清轉化之正常肝酶含量；以及(iv)HBeAg陰性期，在該階段中，定期發生病毒複製(再活化)且伴隨肝酶含量之波動，前核心及/或基礎核心啟動子中常有突變，使得受感染細胞無法產生HBeAg。

【0219】如本文所使用，「慢性HBV感染」係指個體中可偵測到HBV存在超過6個月。患有慢性HBV感染之個體可以處於慢性HBV感染之任何階段。在較佳實施例中，本文所提及的慢性HBV感染遵循疾病控制與預防中心(Centers for Disease Control and Prevention，CDC)所公開之定義，根據該定義，慢性HBV感染係藉由以下實驗室標準表徵：(i)針對B型肝炎核心抗原之IgM抗體呈陰性(IgM抗HBc)及針對B型肝炎表面抗原(HBsAg)、B型肝炎e抗原(HBeAg)或有關B型肝炎病毒DNA之核酸測試呈陽性；或(ii)針對HBsAg或有關HBV DNA之核酸測試呈陽性，或間隔至少6個月兩次針對HBeAg呈陽性。

【0220】根據特定實施例，免疫原性有效量係指足以治療慢性HBV感染的組合物或免疫原性組合之量。

【0221】在一些實施例中，患有慢性HBV感染之個體正在接受核昔類似物(NUC)治療，且受NUC抑制。如本文所使用，「受NUC抑制」係指個體具有不可偵測之HBV病毒含量及穩定丙氨酸轉胺酶(ALT)含量達至少六個月。核昔/核昔酸類似物治療之實例包括HBV聚合酶抑制劑，諸如恩替卡韋及替諾福韋。較佳地，患有慢性HBV感染之個體不會患上晚期肝纖維化或肝硬化。此類個體通常會具有小於3分的METAVIR分數及小於9 kPa之肝纖維化掃描(fibroscan)結果。METAVIR分數係藉由B型肝炎患者

之肝切片之組織病理學評價來評估炎症及纖維化程度的一種常用評分系統。該評分系統指定兩個標準化數字：一個反映炎症之程度且一個反映纖維化之程度。

【0222】 咸信消除或減輕慢性HBV可以允許包括病毒誘發肝硬化及肝細胞癌在內之重度肝病的早期疾病攔截。因此，本申請案之方法亦可用作治療HBV誘發之疾病的療法。HBV誘發疾病之實例包括(但不限於)肝硬化、癌症(例如肝細胞癌)及纖維化，特別是以3分或更高之METAVIR分數為特徵的晚期纖維化。在此類實施例中，免疫原性有效量係足以在12個月內達成HBsAg之持久喪失且明顯減輕臨床疾病(例如肝硬化、肝細胞癌等)的量。

【0223】 根據本申請案之實施例的方法進一步包含向有需要之個體投與另一免疫原性藥劑(諸如另一HBV抗原或其他抗原)或另一抗HBV藥劑(諸如核昔類似物或其他抗HBV藥劑)與本申請案之組合物的組合。

【0224】 遞送方法

【0225】 本申請案之組合物及免疫原性組合可以根據本發明，藉由此項技術中已知之任何方法投與個體，包括(但不限於)非經腸投與(例如肌肉內、皮下、靜脈內或皮內注射)、經口投與、經皮投與及鼻投與。較佳地，組合物及免疫原性組合係非經腸(例如藉由肌肉內注射或皮內注射)或經皮投與。

【0226】 在組合物或免疫原性組合包含一或多個病毒載體的本申請案之些實施例中，投與可以藉由經皮膚注射，例如肌肉內或皮內注射，較佳肌肉內注射實現。肌肉內注射可以與電穿孔組合，亦即，施加電場以有助於DNA質體遞送至細胞中。如本文所使用，術語「電穿孔」係指使

用跨膜電場脈衝在生物膜中誘導產生微觀路徑(孔)。在活體內電穿孔期間，向細胞施加適當幅值及持續時間之電場，誘導短暫的細胞膜滲透性增強狀態，由此實現無法獨自跨越細胞膜之分子的細胞吸收。藉由電穿孔產生此類孔有助於諸如質體、寡核苷酸、siRNA、藥物等生物分子穿過細胞膜之一側到達另一側。經顯示，利用活體內電穿孔來遞送DNA疫苗使宿主細胞對質體之吸收明顯增加，同時亦會在注射部位引起輕度至中度炎症。因此，相較於習知注射，利用皮內或肌肉內電穿孔使轉染效率及免疫反應顯著改良(例如分別增加1,000倍及100倍)。

【0227】 在一個典型實施例中，將電穿孔與肌肉內注射組合。然而，亦可將電穿孔與其他非經腸投與形式，例如皮內注射、皮下注射等組合。

【0228】 經由電穿孔投與本申請案之組合物、免疫原性組合或疫苗可以使用電穿孔器件實現，該等電穿孔器件可經組態以將有效引起細胞膜中形成可逆孔的能量脈衝遞送至所希望的哺乳動物組織。電穿孔器件可以包括電穿孔組件及電極總成或手柄總成。電穿孔組件可以包括以下電穿孔器件組件中之一或多個：控制器、電流波形產生器、阻抗測試儀、波形記錄器、輸入元件、狀態報告元件、通信端口、記憶體組件、電源及電源開關。電穿孔可以使用活體內電穿孔器件實現。可以有助於遞送本申請案之組合物及免疫原性組合，特別是包含DNA質體者的電穿孔器件及電穿孔方法之實例包括 CELLECTRA®(Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA)、Elgen電穿孔器(Inovio Pharmaceuticals, Inc.)Tri-Grid™遞送系統(Ichor Medical Systems, Inc., San Diego, CA 92121)，及以下中描述者：美國專利第7,664,545號、美國專利第8,209,006號、美國專利第9,452,285

號、美國專利第5,273,525號、美國專利第6,110,161號、美國專利第6,261,281號、美國專利第6,958,060號及美國專利第6,939,862號、美國專利第7,328,064號、美國專利第6,041,252號、美國專利第5,873,849號、美國專利第6,278,895號、美國專利第6,319,901號、美國專利第6,912,417號、美國專利第8,187,249號、美國專利第9,364,664號、美國專利第9,802,035號、美國專利第6,117,660號，及國際專利申請公開案WO2017172838，其皆以全文引用的方式併入本文中。用於遞送本申請案之組合物及免疫原性組合的本申請案亦涵蓋使用脈衝電場，如例如美國專利第6,697,669號中所描述，其以全文引用的方式併入本文中。

【0229】在組合物或免疫原性組合包含一或多個DNA質體的本申請案之其他實施例中，投與方法係經皮投與。經皮投與可以與表皮磨蝕組合以有助於將DNA質體遞送至細胞。舉例而言，可以使用皮膚貼片進行表皮磨蝕。在移除皮膚貼片後，組合物或免疫原性組合可以沈積於經磨蝕之皮膚上。

【0230】遞送方法不限於上述實施例，且用於細胞內遞送之任何手段均可使用。本申請案之方法所涵蓋的其他細胞內遞送方法包括(但不限於)脂質體包封、奈米粒子等。

【0231】佐劑

【0232】在本申請案之些實施例中，誘發針對HBV之免疫反應的方法進一步包含投與佐劑。術語「佐劑」與「免疫刺激劑」在本文中可互換地使用，且定義為刺激免疫系統之一或多種物質。在此情形下，佐劑係用於增強針對本申請案之HBV抗原及抗原性HBV多肽之免疫反應。

【0233】根據本申請案之實施例，佐劑可以存在於本申請案之免疫

原性組合或組合物中，或以獨立組合物形式投與。佐劑可以為例如小分子或抗體。適用於本申請案中之佐劑的實例包括(但不限於)免疫檢查點抑制劑(例如抗PD1、抗RIM-3等)、鐸樣受體抑制劑、RIG-1抑制劑、IL-15超級促效劑(Altor Bioscience)、突變IRF3及IRF7基因佐劑、STING促效劑(Aduro)、FLT3L基因佐劑、IL-12基因佐劑及IL-7-hyFc。

【0234】 本申請案之組合物及免疫原性組合亦可與至少一種其他抗HBV藥劑組合投與。適合用於本申請案的抗HBV藥劑之實例包括(但不限於)小分子、抗體，及/或充當衣殼蛋白抑制劑之CAR-T療法、TLR抑制劑、cccDNA抑制劑、HBV聚合酶抑制劑(例如恩替卡韋及替諾福韋)及/或免疫檢查點抑制劑等。此類抗HBV藥劑可以與本申請案之組合物及免疫原性組合同時或依序投與。

【0235】初打/加打免疫接種方法

【0236】 本申請案之實施例亦涵蓋在所謂的初打-加打療程中，向個體投與免疫有效量之組合物或免疫原性組合，且隨後向該個體投與另一劑免疫有效量之組合物或免疫原性組合。因此，在一個實施例中，本申請案之組合物或免疫原性組合係用於引發免疫反應之初打疫苗。在另一個實施例中，本申請案之組合物或免疫原性組合係用於增強免疫反應之加打疫苗。根據本申請案之實施例的初打及加打疫苗可以用於本文所描述的本申請案之方法中。此初打-加打療程之一般概念係熟習疫苗領域之技術者熟知的。本文所描述的本申請案之組合物及免疫原性組合中之任一種可以用作初打及/或加打疫苗以引發及/或增強針對HBV之免疫反應。

【0237】 根據本申請案之實施例，本申請案之組合物或免疫原性組合可以投與至少一次以用於初打免疫接種。該組合物或免疫原性組合可以

再投與用於加打免疫接種。視需要，該組合物或疫苗組合之進一步加打投與可以視情況添加至該療程中。佐劑可以存在於用於加打免疫接種的本申請案之組合物中，存在於欲投與本申請案之組合物或免疫原性組合一起投與以用於加打免疫接種的獨立組合物中，或獨自投與以作為加打免疫接種。在該療程中包括佐劑的該等實施例中，佐劑較佳用於加打免疫接種。

【0238】 初打-加打療程之說明性且非限制性實例包括向個體投與單次劑量的免疫有效量之本申請案之組合物或免疫原性組合以引發免疫反應；且隨後投與另一劑免疫有效量的本申請案之組合物或免疫原性組合以增強免疫反應，其中該加打免疫接種先在初始投與初打免疫接種之後約一至十二週(1至12週)、約二至十二週(2至12週)、約二至十週(2至10週)、約二至六週(2至6週)，較佳約四週投與，較佳在初始投與初打免疫接種之後約八週投與。在本申請案之一個實施例中，加打免疫接種係在初打免疫接種之後至少一週投與。在本申請案之一個實施例中，加打免疫接種係在初打免疫接種之後至少兩週投與。視情況，在初始投與初打免疫接種之後約10至14週，較佳12週，再投與該組合物或免疫原性組合，或其他佐劑之加打免疫接種。

【0239】套組

【0240】 本申請案亦提供一種包含本申請案之免疫原性組合的套組。套組可以包含呈獨立組合物形式之第一聚核苷酸及第二聚核苷酸，或套組可以包含呈單一組合物形式之第一聚核苷酸及第二聚核苷酸。套組可以進一步包含一或多種佐劑或免疫刺激劑，及/或其他抗HBV藥劑。

【0241】 在投與動物或人類生物體中時誘發或刺激抗HBV免疫反應的能力可以使用此項技術中之多種標準分析法在活體外或活體內評價。有

關可用於評價免疫反應之起始及活化之技術的大體描述，參見例如 Coligan等人(1992及1994年, Current Protocols in Immunology; J Wiley & Sons Inc編, National Institute of Health)。細胞免疫性之量測可藉由量測由活化之效應細胞，包括來源於CD4+及CD8+ T細胞之該等細胞所分泌之細胞介素譜(例如藉由ELISPOT定量產生IL-10或IFN γ 之細胞)、藉由確定免疫效應細胞之活化狀態(例如藉由經典的[3H]胸昔吸收進行之T細胞增殖分析)、藉由分析致敏個體中之抗原特異性T淋巴細胞(例如細胞毒性分析中之肽特異性溶解等)進行。

【0242】 刺激細胞及/或體液反應之能力可以藉由抗體結合及/或結合競爭來測定(參見例如，Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press)。舉例而言，可以藉由酶聯結免疫吸附分析法(ELISA)量測響應於提供免疫原之組合物之投與而產生之抗體的力價。亦可藉由中和抗體分析法量測免疫反應，其中病毒之中和定義為經由特異性抗體對該病毒之反應/抑制/中和引起之感染性損失。免疫反應亦可藉由抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)分析法量測。

實施例

【0243】 本申請案亦提供以下非限制性實施例。

【0244】 實施例1係一種改良型安卡拉牛痘病毒(MVA)載體，其包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核昔酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列。

【0245】 實施例2係如實施例1之MVA載體，其中該HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性。

【0246】 實施例3係如實施例1或2之MVA載體，其中該HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0247】 實施例4係如實施例1至3中任一個之MVA載體，其中該HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【0248】 實施例5係如實施例1至4中任一個之MVA載體，其進一步包含編碼可操作地連接至該HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【0249】 實施例6係如實施例5之MVA載體，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0250】 實施例7係如實施例1至6中任一個之MVA載體，其中該第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 3至少90%一致。

【0251】 實施例8係如實施例7之MVA載體，其中該第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 3之聚核苷酸序列。

【0252】 實施例9係如實施例1至8中任一個之MVA載體，其進一步包含編碼由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原的第二聚核苷酸序列。

【0253】 實施例10係如實施例9之MVA載體，其中該第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 1至少90%一致。

【0254】 實施例11係如實施例10之MVA載體，其中該第二聚核苷酸

序列包含SEQ ID NO: 1之聚核苷酸序列。

【0255】 實施例12係如實施例9至11中任一個之MVA載體，其中該第二聚核苷酸序列進一步包含編碼可操作地連接至該截短之HBV核心抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【0256】 實施例13係如實施例12之MVA載體，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0257】 實施例14係如實施例9至13中任一個之MVA載體，其中該第一聚核苷酸序列及該第二聚核苷酸序列編碼包含該截短之HBV核心抗原可操作地連接至該HBV聚合酶抗原之融合蛋白。

【0258】 實施例15係如實施例14之MVA載體，其中該融合蛋白包含該截短之HBV核心抗原經由連接子可操作地連接至該HBV聚合酶抗原。

【0259】 實施例16係如實施例15之MVA載體，其中該連接子包含胺基酸序列(AlaGly) n ，且 n 係2至5之整數，較佳該連接子係由包含SEQ ID NO: 14之聚核苷酸序列編碼。

【0260】 實施例17係如實施例16之MVA載體，其中該融合蛋白包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。

【0261】 實施例18係如實施例14至17中任一個之MVA載體，其中該融合蛋白進一步包含信號序列，較佳該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，更佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0262】 實施例19係如實施例1至18中任一個之MVA載體，其進一步包含至少一個啟動子序列、視情況一或多個另外的調控序列，較佳該至

少一個啟動子序列包含SEQ ID NO: 25及/或SEQ ID NO: 26之聚核苷酸序列，且該另外的調控序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 15之強化子序列，及SEQ ID NO: 9或SEQ ID NO: 16之聚腺苷酸化信號序列。

【0263】 實施例20係如實施例1至19中任一個之MVA載體，其中該非天然存在之核酸分子不編碼選自由B型肝炎表面抗原(HBsAg)、HBV包膜(Env)抗原及HBV L蛋白質抗原組成之群的HBV抗原。

【0264】 實施例21係一種MVA載體，其包括：含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列，其中該第一聚核苷酸序列進一步編碼包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的信號序列，且其中該第一聚核苷酸序列進一步包括含SEQ ID NO: 26之聚核苷酸序列的啟動子序列；及含編碼截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列的第二非天然存在之核酸分子，該截短之HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成，其中該第二聚核苷酸序列進一步編碼包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的信號序列，且其中該第二聚核苷酸序列進一步包括含SEQ ID NO: 25之聚核苷酸序列的啟動子序列。

【0265】 實施例22係一種組合物，其包含如實施例1至21中任一個之MVA載體及醫藥學上可接受之載劑。

【0266】 實施例23係一種增強人類個體中之免疫反應的方法，該方法包含(a)向該人類個體投與包含免疫有效量之腺病毒載體的第一組合物，該腺病毒載體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%

一致之胺基酸序列；以及(b)向該人類個體投與包含免疫有效量的如實施例1至21中任一個之MVA載體的第二組合物，由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。

【0267】 實施例24係如實施例23之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性。

【0268】 實施例25係如實施例23或24之方法，其中該第一組合物係用於引發免疫反應且該第二組合物係用於增強免疫反應。

【0269】 實施例26係如實施例23至25中任一個之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0270】 實施例27係如實施例23至26中任一個之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【0271】 實施例28係如實施例23至27中任一個之方法，其進一步包含編碼可操作地連接至該第一組合物之HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【0272】 實施例29係如實施例28之方法，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0273】 實施例30係如實施例23至29中任一個之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 19至少90%一致。

【0274】 實施例31係如實施例30之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 19之聚核苷酸序列。

【0275】 實施例32係如實施例23至31中任一個之方法，其中該第一組合物中該腺病毒之核酸分子進一步包含編碼由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原的第二聚核苷酸序列。

【0276】 實施例33係如實施例32之方法，其中該第一組合物之第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 17至少90%一致。

【0277】 實施例34係如實施例33之方法，其中該第一組合物之第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 17之聚核苷酸序列。

【0278】 實施例35係如實施例32至34中任一個之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列及第二聚核苷酸序列編碼包含該截短之HBV核心抗原可操作地連接至該HBV聚合酶抗原之融合蛋白。

【0279】 實施例36係如實施例35之方法，其中該第一組合物之融合蛋白包含該截短之HBV核心抗原經由連接子可操作地連接至該HBV聚合酶抗原。

【0280】 實施例37係如實施例36之方法，其中該第一組合物之連接子包含胺基酸序列(AlaGly) n ，且 n 係2至5之整數，較佳該連接子係由包含SEQ ID NO: 14之聚核苷酸序列編碼。

【0281】 實施例38係如實施例37之方法，其中該第一組合物之融合蛋白包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。

【0282】 實施例39係如實施例35至38中任一個之方法，其中該第一組合物之融合蛋白進一步包含信號序列，較佳該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，更佳該信號序列係由SEQ ID NO:

5或SEQ ID NO: 10之聚核昔酸序列編碼。

【0283】 實施例40係如實施例23至39中任一個之方法，其中該第一組合物之非天然存在之核酸分子進一步包含啟動子序列、視情況一或多個另外的調控序列，較佳該啟動子序列包含SEQ ID NO: 7之聚核昔酸序列，且該另外的調控序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 15之強化子序列，及SEQ ID NO: 16之聚腺昔酸化信號序列。

【0284】 實施例41係如實施例23至40中任一個之方法，其中該第一組合物之非天然存在之核酸分子不編碼選自由**B**型肝炎表面抗原(HBsAg)、HBV包膜(Env)抗原及HBV L蛋白質抗原組成之群的HBV抗原。

【0285】 實施例42係如實施例23至41中任一個之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之抗體反應。

【0286】 實施例43係如實施例42之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之CD8+ T細胞反應。

【0287】 實施例44係如實施例42或43之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之CD4+ T細胞反應。

【0288】 實施例45係如實施例23至44中任一個之方法，其中該腺病毒載體係rAd26或rAd35載體。

【0289】 實施例46係如實施例23至45中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後1-12週進行。

【0290】 實施例47係如實施例23至45中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後2-12週進行。

【0291】 實施例48係如實施例23至45中任一個之方法，其中步驟

(b)係在步驟(a)之後至少1週進行。

【0292】 實施例49係如實施例23至45中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少2週進行。

【0293】 實施例50係一種疫苗組合，其包括(a)包含免疫有效量之腺病毒載體的第一組合物，該腺病毒載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；以及(b)包含免疫有效量之改良型安卡拉牛痘病毒(MVA)載體的第二組合物，該MVA載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第二聚核苷酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；其中該第一組合物係投與人類個體用於引發免疫反應，且該第二組合物係投與人類個體一或多次用於增強免疫反應。

【0294】 實施例51係如實施例50之疫苗組合，其中該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性。

【0295】 實施例52係如實施例50或51之疫苗組合，其中該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0296】 實施例53係如實施例50至52中任一個之疫苗組合，其中該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【0297】 實施例54係如實施例50至53中任一個之疫苗組合，其進一步包含編碼可操作地連接至該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【0298】 實施例55係如實施例54之疫苗組合，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0299】 實施例56係如實施例50至55中任一個之疫苗組合，其中該第一聚核苷酸序列及該第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 3至少90%一致。

【0300】 實施例57係如實施例56之疫苗組合，其中該第一聚核苷酸序列及該第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 3之聚核苷酸序列。

【0301】 實施例58係如實施例50至57中任一個之疫苗組合，其中該第一組合物之腺病毒載體進一步包含第三聚核苷酸序列且該第二組合物之MVA載體進一步包含第四聚核苷酸序列，其中該第三及第四聚核苷酸序列編碼由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原。

【0302】 實施例59係如實施例58之疫苗組合，其中該第三聚核苷酸序列及該第四聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 1至少90%一致。

【0303】 實施例60係如實施例59之疫苗組合，其中該第三聚核苷酸序列及該第四聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1之聚核苷酸序列。

【0304】 實施例61係一種疫苗組合，其包括(a)包含免疫有效量之改良型安卡拉牛痘病毒(MVA)載體的第一組合物，該MVA載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；以及(b)包含免疫有效量之腺病毒載體

的第二組合物，該腺病毒載體包含編碼HBV聚合酶抗原之第二聚核苷酸序列，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；其中該第一組合物係投與人類個體用於引發免疫反應，且該第二組合物係投與人類個體一或多次用於增強免疫反應。

【0305】 實施例62係如實施例61之疫苗組合，其中該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性。

【0306】 實施例63係如實施例61或62之疫苗組合，其中該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0307】 實施例64係如實施例61至63中任一個之疫苗組合，其中該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【0308】 實施例65係如實施例61至64中任一個之疫苗組合，其進一步包含編碼可操作地連接至該第一組合物及該第二組合物之HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【0309】 實施例66係如實施例65之疫苗組合，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0310】 實施例67係如實施例61至66中任一個之疫苗組合，其中該

第一聚核苷酸序列及該第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 3至少90%一致。

【0311】 實施例68係如實施例67之疫苗組合，其中該第一聚核苷酸序列及該第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 3之聚核苷酸序列。

【0312】 實施例69係如實施例61至68中任一個之疫苗組合，其中該第一組合物之MVA載體進一步包含第三聚核苷酸序列且該第二組合物之腺病毒載體進一步包含第四聚核苷酸序列，其中該第三及第四聚核苷酸序列編碼由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原。

【0313】 實施例70係如實施例69之疫苗組合，其中該第三聚核苷酸序列及該第四聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 1至少90%一致。

【0314】 實施例71係如實施例70之疫苗組合，其中該第三及第四聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1之聚核苷酸序列。

【0315】 實施例72係如實施例50至71中任一個之疫苗組合，其係套組。

【0316】 實施例73係一種增強人類個體中之免疫反應的方法，該方法包含(a)向該人類個體投與第一組合物，該第一組合物包含免疫有效量之第一質體，該第一質體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的第一非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；及第二質體，該第二質體包括含編碼截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列的第二非天然存在之核酸分子，該截短之HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成；以及(b)向該人類個體投與包含免疫有效量的如實施例1至21中任一個之MVA載體的第二組合物；由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。

【0317】 實施例74係如實施例73之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性。

【0318】 實施例75係如實施例73或74之方法，其中該第一組合物係用於引發免疫反應且該第二組合物係用於增強免疫反應。

【0319】 實施例76係如實施例73至75中任一個之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0320】 實施例77係如實施例73至76中任一個之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【0321】 實施例78係如實施例73至77中任一個之方法，其進一步包含編碼可操作地連接至該第一組合物之HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【0322】 實施例79係如實施例78之方法，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0323】 實施例80係如實施例73至79中任一個之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 20至少90%一致。

【0324】 實施例81係如實施例80之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 20之聚核苷酸序列。

【0325】 實施例82係如實施例73至81之方法，其中該第一組合物之

第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 18至少90%一致。

【0326】 實施例83係如實施例82之方法，其中該第一組合物之第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 18之聚核苷酸序列。

【0327】 實施例84係如實施例73至83中任一個之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列及第二聚核苷酸序列進一步包含啟動子序列、視情況一或多個另外的調控序列，較佳該啟動子序列包含SEQ ID NO: 7之聚核苷酸序列，且該另外的調控序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 15之強化子序列，及SEQ ID NO: 16之聚腺苷酸化信號序列。

【0328】 實施例85係如實施例73至84中任一個之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之抗體反應。

【0329】 實施例86係如實施例85之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之CD8+ T細胞反應。

【0330】 實施例87係如實施例85或86之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之CD4+ T細胞反應。

【0331】 實施例88係如實施例73至87中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後1-12週進行。

【0332】 實施例89係如實施例73至87中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後2-12週進行。

【0333】 實施例90係如實施例73至87中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少1週進行。

【0334】 實施例91係如實施例73至87中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少2週進行。

【0335】 實施例92係一種增強人類個體中之免疫反應的方法，該方法包含(a)向該人類個體投與包含免疫有效量的如實施例1至21中任一個之MVA載體的第一組合物；以及(b)向該人類個體投與第二組合物，該第二組合物包含：免疫有效量之第一質體，該第一質體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；及第二質體，該第二質體包括含編碼截短之HBV核心抗原之第二聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該截短之HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成；由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強之免疫反應。

【0336】 實施例93係如實施例92之方法，其中該第二組合物之HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H活性。

【0337】 實施例94係如實施例92或93之方法，其中該第一組合物係用於引發免疫反應且該第二組合物係用於增強免疫反應。

【0338】 實施例95係如實施例92至94中任一個之方法，其中該第二組合物之HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【0339】 實施例96係如實施例92至95中任一個之方法，其中該第二組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【0340】 實施例97係如實施例92至96中任一個之方法，其進一步包含編碼可操作地連接至該第二組合物之HBV聚合酶抗原之信號序列的聚

核苷酸序列。

【0341】 實施例98係如實施例97之方法，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【0342】 實施例99係如實施例92至98中任一個之方法，其中該第二組合物之第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 20至少90%一致。

【0343】 實施例100係如實施例99之方法，其中該第二組合物之第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 20之聚核苷酸序列。

【0344】 實施例101係如實施例92至100之方法，其中該第二組合物之第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 18至少90%一致。

【0345】 實施例102係如實施例101之方法，其中該第二組合物之第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 18之聚核苷酸序列。

【0346】 實施例103係如實施例92至102中任一個之方法，其中該第二組合物之第一聚核苷酸序列及第二聚核苷酸序列進一步包含啟動子序列、視情況一或多個另外的調控序列，較佳該啟動子序列包含SEQ ID NO: 7之聚核苷酸序列，且該另外的調控序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 15之強化子序列，及SEQ ID NO: 16之聚腺苷酸化信號序列。

【0347】 實施例104係如實施例92至103中任一個之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之抗體反應。

【0348】 實施例105係如實施例104之方法，其中該增強之免疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之CD8+ T細胞反應。

【0349】 實施例106係如實施例104或105之方法，其中該增強之免

疫反應包含增強的針對該人類個體中之HBV抗原之CD4+ T細胞反應。

【0350】 實施例107係如實施例92至106中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後1-12週進行。

【0351】 實施例108係如實施例92至106中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後2-12週進行。

【0352】 實施例109係如實施例92至106中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少1週進行。

【0353】 實施例110係如實施例92至106中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少2週進行。

【0354】 實施例111係如實施例92至106中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少4週進行。

【0355】 實施例112係如實施例92至106中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少8週進行。

【0356】 實施例113係如實施例92至106中任一個之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少12週進行。

實例

【0357】 以下本申請案之實例進一步說明本申請案之性質。應理解，以下實例並不限制本發明且本發明之範圍應由所附申請專利範圍決定。

【0358】 實例1：產生核心及Pol抗原序列

【0359】 肝炎核心蛋白上之T細胞抗原決定基被認為對於消除B型肝炎感染及B型肝炎病毒蛋白，諸如聚合酶極為重要，可以用來改善反應之廣度。因此，選擇B型肝炎核心及聚合酶蛋白質作為設計治療性B型肝炎

病毒(HBV)疫苗之抗原。

【0360】HBV核心及聚合酶抗原共同序列之衍生化

【0361】基於HBV基因型B、C及D，產生HBV pol及核心抗原共同序列。自不同來源獲得不同HBV序列並針對核心及聚合酶蛋白質分別進行比對。隨後將所有亞型(A至H)之原始序列比對侷限於HBV基因型B、C及D。根據各蛋白質比對，確定單獨各亞型中及所有接合BCD序列中之共同序列。在變化之比對位置中，使用共同序列中最常見的胺基酸。

【0362】HBV核心抗原之優化

【0363】HBV核心抗原共同序列係藉由在原生病毒蛋白質中產生兩個缺失來優化。第一個缺失係缺失該核心蛋白中構成前核心「鋅指」部分之N末端延伸，因為文獻中之報導指示，該病毒利用此序列誘導感染個體對病毒蛋白之耐受性。第二個缺失係缺失對應於C末端帶大量正電之區段的三十四個胺基酸，該等胺基酸係病毒生命週期中前基因組衣殼化及生產性病毒正股DNA合成所需的。

【0364】HBV Pol抗原之優化

【0365】HBV pol抗原共同序列係藉由改變四個殘基以移除逆轉錄酶及核糖核酸酶H活性來優化。詳言之，將逆轉錄酶結構域之「YXDD」基元中的天冬胺酸殘基(D)變成天冬醯胺殘基(N)以除去任何配位功能，且由此消除核苷酸/金屬離子結合。另外，將核糖核酸酶H結構域之「DEDD」基元中的第一個天冬胺酸殘基(D)變成天冬醯胺殘基(N)且將第一個麩胺酸殘基(E)變成麩醯胺酸殘基(A)以除去Mg²⁺配位。另外，HBV pol抗原序列經密碼子優化以擾亂包膜蛋白，包括S蛋白質及具有N末端延伸之S蛋白質形式前S1及前S2的內部開放閱讀框架。因此，包膜蛋白(前

S1、前S2及S蛋白質)及X蛋白質之開放閱讀框架移除。

【0366】選擇實現高效蛋白質分泌之信號肽

【0367】評價在HBV核心抗原之N末端處框內引入之三個不同信號肽：(1) Ig重鏈 γ 信號肽 SPIgG(BAA75024.1)；(2) Ig重鏈 ϵ 信號肽 SPIgE(AAB59424.1)；以及(3) 脲抑素S前驅體信號肽 SPCS(NP_0018901.1)。使用Signal P預測程式，藉由計算機模擬來優化核心融合物之信號肽裂解位點。藉由分析上清液中之核心蛋白含量來測定分泌效率。利用西方墨點分析使用在N末端融合之三個不同信號肽的核心抗原分泌展示，胱抑素S信號肽引起最高效之蛋白質分泌。

【0368】實例2：表現截短之HBV核心抗原與HBV Pol抗原之融合物的腺病毒載體之產生

【0369】產生一種經設計為自單一開放閱讀框架表現截短之HBV核心抗原及HBV pol抗原之融合蛋白的腺病毒載體。亦可設想例如使用兩個獨立的表現卡匣，或使用2A樣序列分開兩個序列以表現兩種蛋白質(例如截短之HBV核心抗原及HBV pol抗原)之另外的組態。

【0370】有關腺病毒載體之表現卡匣的設計

【0371】表現卡匣(圖解於圖2A及圖2B中)包含CMV啟動子(SEQ ID NO:7)、內含子(SEQ ID NO:15)(來源於人類ApoAI基因之片段，Genbank寄存號X01038鹼基對295-523，帶有ApoAI第二內含子)，隨後為在人類免疫球蛋白分泌信號編碼序列(SEQ ID NO:10)之後的經優化的單獨核心或核心與聚合酶融合蛋白之編碼序列，且隨後為SV40聚腺苷酸化信號(SEQ ID NO: 16)。

【0372】包括分泌信號係歸因於過去一些含有分泌型轉殖基因的腺

病毒載體顯示可製造性之改良，同時不影響所引發之T細胞反應的經驗(小鼠實驗)。

【0373】核心蛋白的最後兩個殘基(VV)及聚合酶蛋白質之前兩個殘基(MP)若融合，則產生接合序列(VVMP)，其存在於人類多巴胺受體蛋白(D3同功異型物)以及側接同源序列上。

【0374】核心與聚合酶序列之間AGAG連接子之插入消除此同源序列且恢復成在人類蛋白質組之Blast中無其他匹配(hit)。

【0375】實例3：表現HBV核心抗原及HBV Pol抗原之MVA載體的產生

【0376】MVA載體係設計成編碼本申請案之HBV核心及Pol編碼序列中的每一個。將該HBV核心及Pol編碼序列各自插入MVA載體中IGR44/45處，各自處於獨立啟動子之控制下。亦可設想表現兩種蛋白質之另外的組態，例如使用核心及Pol抗原構成融合蛋白之單一表現卡匣，或替代地利用2A樣序列分開兩個序列。另外，亦可設想MVA載體中另外及/或替代的插入位點，例如將HBV核心及Pol編碼序列各自插入相同或不同的插入位點中。

【0377】有關MVA載體之表現卡匣的設計

【0378】表現卡匣(圖解於圖2C中)包含在HBV核心抗原附近且引導HBV核心抗原表現之Pr13.5長啟動子(SEQ ID NO: 25)及在HBV Pol抗原附近且引導HBV Pol抗原表現之PrHyb啟動子(SEQ ID NO: 26)。HBV核心編碼序列包含SEQ ID NO: 1且HBV Pol編碼序列包含SEQ ID NO: 3。SEQ ID NO: 1及3各自藉由除去負順式作用位點及藉由調整GC含量進行修飾。另外，SEQ ID NO: 1及3各自在不影響胺基酸序列情況下，針對人

類密碼子使用進行密碼子優化。SEQ ID NO: 1及3各自包含佈置在終止密碼子附近之另外的早期終止信號(TTTTTNT(SEQ ID NO: 28))。

【0379】 實例4：HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合在小鼠中之免疫原性

【0380】 材料與方法

【0381】 載體設計：使用表現單獨核心(具有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的HBV核心抗原)或表現聚合酶(具有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的HBV pol抗原)及核心的兩個腺病毒載體，該聚合酶及核心係自單一開放閱讀框架表現為融合蛋白形式。為此，藉由計算機模擬設計序列以提供B型肝炎病毒B、C及D基因型之共同序列。表現卡匣包含CMV啟動子、ApoAI內含子、人類免疫球蛋白分泌信號，隨後為單獨核心或核心及聚合酶融合蛋白之編碼序列，及SV40聚腺苷酸化信號。

【0382】 重組MVA載體包含痘病毒啟動子Pr13.5(SEQ ID NO: 25)連接至核心編碼序列(SEQ ID NO: 1之核苷酸序列及SEQ ID NO: 2之多肽序列)及PrHyb(SEQ ID NO: 26)連接至編碼聚合酶之核苷酸序列(SEQ ID NO: 3之核苷酸序列及SEQ ID NO: 4之多肽序列)，二者隨後均為轉錄終止序列TTTTTNT(SEQ ID NO: 28)。核心編碼序列包含N末端免疫球蛋白分泌標籤(SEQ ID NO: 11)，且聚合酶編碼序列包含N末端胱抑素S信號序列(SEQ ID NO: 6)。參見例如圖2C。

【0383】 在小鼠中進行之活體內免疫原性研究：為了評價HBV腺病毒載體及HBV MVA之組合的活體內免疫原性，用不同載體組合經肌肉內對F1小鼠(C57BL/6×Balb/C)進行初打-加打免疫接種。該等免疫原性研究集中在測定由HBV抗原核心及聚合酶引發的細胞免疫反應。

【0384】藉由IFN- γ 酶聯免疫斑點(ELISPOT)分析及定量抗原特異性反應且藉由流式細胞測量術偵測細胞內細胞介素之產生(TNF- α 、IL-2及IFN- γ)。在該等分析法中，將自經免疫接種之動物分離的脾細胞與包含核心蛋白、Pol蛋白質或小肽前導序列及接合序列(每種肽2 μ g/ml)的肽池一起培育。此外，亦使用MVA特異性肽(2 μ g/ml)。該等池由重疊11個殘基之15聚體肽組成，該等殘基匹配核心及Pol腺病毒載體之基因型ABCD共同序列。將較大的94 kDa HBV Pol蛋白質自中間分至兩個肽池中。在ELISPOT中，利用適當抗體且隨後顯色偵測來觀測在微量盤上呈有色斑點(稱為斑點形成細胞(SFC))形式的單一抗原特異性T細胞釋放之IFN- γ 。在ICS中，測定特定細胞群(CD3陽性、CD4陽性或CD8陽性細胞)中細胞介素釋放細胞之百分含量。

【0385】結果

【0386】評價HBV腺病毒載體及HBV MVA組合在小鼠中之免疫原性：本研究之目的係評價HBV腺病毒載體及HBV MVA之組合在IM遞送至F1小鼠中之後誘發的免疫反應。如表1中所概述，對F1小鼠進行投與。動物接受一次HBV腺病毒載體免疫接種，隨後在8週後接受HBV MVA免疫接種。最後一次免疫接種之後一週收集脾細胞。

【0387】表1：小鼠免疫接種實驗設計

組	N	初打 第0天	R	劑量 (vp)	加打 第56天	途徑	劑量 TCID50	終點 天數
1	4	核心聚合酶融合物 + 核心	IM	10^8	-	-	-	63
2	4	核心聚合酶融合物 + 核心	IM	10^9	-	-	-	63
3	4	核心聚合酶融合物 + 核心	IM	10^{10}	-	-	-	63
4	4	核心聚合酶融合物 + 核心	IM	10^8	MVA	IM	8.9×10^7	63
5	4	核心聚合酶融合物 + 核心	IM	10^9	MVA	IM	8.9×10^7	63
6	4	核心聚合酶融合物 + 核心	IM	10^{10}	MVA	IM	8.9×10^7	63

7	4	核心聚合酶融合物	IM	10^8	-	-	-	63
8	4	核心聚合酶融合物	IM	10^9	-	-	-	63
9	4	核心聚合酶融合物	IM	10^{10}	-	-	-	63
10	4	核心聚合酶融合物	IM	10^8	MVA	IM	8.9×10^7	63
11	4	核心聚合酶融合物	IM	10^9	MVA	IM	8.9×10^7	63
12	4	核心聚合酶融合物	IM	10^{10}	MVA	IM	8.9×10^7	63
13	4	空載體	IM	10^{10}	EV	IM	-	63

IM：肌肉內；vp：病毒粒子；TCID50：50%組織培養物感染之劑量；MVA：改良型安卡拉牛痘病毒

【0388】 單獨HBV腺病毒載體及其與HBV MVA載體之組合在小鼠中引起Pol特異性T細胞反應。核心聚合酶融合物+核心腺病毒載體誘發低程度核心反應且藉由加打HBV MVA載體使該等反應增大。核心聚合酶融合物腺病毒載體及HBV MVA載體之組合亦誘發核心反應(圖3)。

【0389】 Pol反應主要由CD8(+)T細胞介導，而核心反應主要涉及CD4(+)T細胞(圖4及5)。核心聚合酶融合物+核心腺病毒載體及HBV MVA之組合亦誘發CD8(+)T細胞引起之核心反應(圖4)。

【0390】 結論：HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合在F1小鼠中引起針對核心及pol之T細胞反應。

【0391】 實例5：HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合在非人類靈長類動物(NHP)中之免疫原性

【0392】 在NHP中進行之活體內免疫原性研究：為了評價HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合的活體內免疫原性，用不同載體組合經肌肉內對毛里求斯食蟹獼猴(Mauritian cynomolgus monkey)進行初打-加打-加打免疫接種。該等免疫原性研究集中在測定由HBV核心及聚合酶抗原引發的細胞免疫反應。

【0393】藉由IFN- γ 酶聯免疫斑點(ELISPOT)分析及定量抗原特異性反應且藉由流式細胞測量術偵測細胞內細胞介素之產生(TNF- α 、IL-2及IFN- γ)。在此等分析中，將經免疫接種動物之PBMC與包含核心蛋白或Pol蛋白質(2 μ g/ml各肽)之肽池一起培育。該等池由重疊11個殘基之15聚體肽組成，該等殘基匹配核心及Pol腺病毒載體之基因型ABCD共同序列。將較大的94 kDa HBV Pol蛋白質自中間分至兩個肽池中。在ELISPOT中，利用適當抗體且隨後顯色偵測來觀測在微量盤上呈有色斑點(稱為斑點形成細胞(SFC))形式的單一抗原特異性T細胞釋放之IFN- γ 。在細胞內細胞介素染色(ICS)中，測定特定群體(CD3陽性、CD4陽性或CD8陽性細胞)中細胞介素釋放細胞之百分含量。

【0394】結果

【0395】評價HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合在NHP中之免疫原性：本研究之目的係評價HBV腺病毒載體及HBV MVA載體之組合在IM遞送至毛里求斯食蟹獮猴體內之後所誘發的免疫反應。如表2中所概述，對NHP進行投與。動物接受一次HBV腺病毒載體免疫接種，隨後在8週後接受HBV MVA載體免疫接種且再接著在8週後接受HBV腺病毒載體免疫接種。在每次免疫接種之後兩週，收集PBMC。

【0396】表2：NHP免疫接種實驗設計

組	N	初打 第0天	R	每個載 體之劑 量 (vp)	加打 第 56 天	R	劑量 TCID50	加打 第112天	劑量 (vp)	R
1	8	核心聚合酶 融合物	IM	$5*10^{10}$	MVA	IM	$5*10^8$	核心聚合酶 融合物	$1*10^{11}$	IM
2	8	核心聚合酶 融合物+核心	IM	$5*10^{10}$	MVA	IM	$5*10^8$	核心聚合酶 融合物	$1*10^{11}$	IM

IM：肌肉內；vp：病毒粒子；TCID50：50%組織培養物感染之劑

量；MVA：改良型安卡拉牛痘病毒

【0397】單獨核心聚合酶融合物腺病毒載體以及核心聚合酶融合物+核心腺病毒載體與HBV MVA載體之組合在NHP中產生穩定的聚合酶及核心特異性T細胞反應。進一步加打核心聚合酶融合物腺病毒載體不會使反應進一步增加(圖6)。

【0398】在NHP中之核心及聚合酶反應係由CD4(+)及CD8(+) T細胞介導。核心聚合酶融合物腺病毒載體+核心腺病毒載體(用作初打)與HBV MVA(用作加打)之組合誘發最高的CD4(+)核心特異性及CD8(+)聚合酶特異性T細胞IFN- γ 反應(圖7)。

【0399】此等結果展示，HBV腺病毒載體與HBV MVA載體之組合在NHP中引起針對核心及聚合酶抗原之穩定T細胞反應。

【0400】熟習此項技術者應瞭解，在不脫離本發明之廣義發明理念之情況下，可對上述實施例作出改變。因此，應理解，本發明不限於所揭示之特定實施例，而是意圖涵蓋在本發明說明所限定的本發明精神及範圍內之修改。

參考文獻

1. Cohen et al. “Is chronic hepatitis B being undertreated in the United States?” J. Viral Hepat. (2011) 18(6), 377-83.
2. Obeng-Adjei et al. “DNA vaccine cocktail expressing genotype A and C HBV surface and consensus core antigens generates robust cytotoxic and antibody responses and mice and Rhesus macaques” Cancer Gene Therapy (2013) 20, 652-662.
3. World Health Organization, Hepatitis B: Fact sheet No. 204

[Internet] 2015 March. Available from
[http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/.](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/)

4. Belloni et al. “IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome” J. Clin. Invest. (2012) 122(2), 529-537.

5. Michel et al. “Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges.” J. Hepatol. (2011) 54(6), 1286-1296.

【序列表】

<110> 愛爾蘭商健生科學愛爾蘭無限公司
丹麥商北歐巴伐利亞公司

<120> 誘發抗B型肝炎病毒(HBV)免疫反應之方法及組合物

<130> 688097-413TW1

<150> TW 106144636
<151> 2017-12-19

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 447
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBV核心

<400> 1
atggacatcg atccciacaa ggagttcggt gccagcgtagg aacgtgttag cttccctgccc 60
agcgacitct tccc:::ccat cagagaccccg ctggacactg ccagcgcact gtacagagag 120
gcctcgaaaz gccctgagca ctgeagccct caccacacccg ctcgtgagaca ggccatcccg 180
tgctggggag agctgtatgaa cctggccacc tgggtcgaa gcaaccctggg agatccagcc 240
agtcgcgagc tgg:ggggc ctaacgtgaac gtaaacatgg gcttgaagat ccggcagc 300
ctggggatcc acatcagctg cctgacccctc ggacggaaa ccgtgtggaa ataccgtgt 360
tcccttggcg tgtggatccg gacaccctcca gcctacagac ctcccaacgc tcctatcccg 420
agcacccttgc ctgagacaaac cggtgg 447

<210> 2
<211> 149
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HBV核心

<400> 2

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

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

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val 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
145

<210> 3
<211> 2529
<212> DNA
<213> 人HIV

<220>
<223> HBV聚合酶

<400> 3
atgcctctga gctaccagca ctttcggaag ctgcgtgtcc tggacgacga ggccggacct 60
ctggaaagg aacigccag actggcagac gagggctcga acagaagagt ggccgaggac 120
ctgaacctgg gcaacctgaa cgtgtccatc ccttggaccc acaaggctgg aaacttcc 180
ggctgtaca gcagcacccgt gcctgtgttc aaccctgagt ggcagacacc cagcttcc 240
aacatccatc tgcaggaaga tatcatcaac cgctgcgagc agttcggtgg acctctgacc 300
gtgaacgaga agcggagact gaagctgatc atgcctgcca gattctaccc taacgtgacc 360
aagtaccatgc ctctggacaa gggcatcaag ccctactacc ctgagcacct ggtcaaccac 420
tacttccaga ccagacacta cctgcacacc ctgttggagg ccggcatct gtacaagaga 480
gagacaacca gaagcgccag cttctgcggc agcccttaca gcttgggagca ggaactccag 540
cacggacgccc tggtgttcca gaccagcacc agacacggcg acggagactt ttgcccagcag 600
a gcacggccatca tccctgagcag atcttcgttg ggtcttgcgc tgcagagccca gcttggagg 660
tccagactgg gcctgcagcc tca gaggatca catctggcta gacggcagca gggcagaagc 720
ggcagcatca gagccagatgtt gaccccttacc accagacggc ctttggcgtt ggaaccttgc 780
ggctctggcc acaccaccaa caccgcctt acgttccatc ccttgcctgca ccagtcagcc 840
gttgcggagg ctgccttacag ccacctgagc accagcaaga gacacagcag ctccggacac 900
gctgtcgagc tgcacaacat ccccccac acgcccagaa gccagagcga ggttccctgtt 960

ttcagctgtt	ggtggc:gca	gttccggaac	agcaagccc:	gcagcgacta	ctgcctgagc	1020
cacatcgta	acctgctgga	agaitggga	ccttgcacccg	agcacggcga	gcaccacatc	1080
cggatcccta	gaacaccaggc	cagagtgaca	ggaggcggt	tccctcg:gga	cazgaaccc	1140
cacaacacca	ccgagagcag	actggtggtg	gact:cagcc	agttctccag	aggcaacacc	1200
agagtgcc:	ggcccaagtt	cgccgttccc	aacctgcagt	ccctgaccaa	ccctgtgago	1260
agcaac:ga	gttggctgag	cctggacgt	tccgcgtcc	tctaccatct	gcctctgac	1320
cctgcagcca	tgccatcatct	gctcggtggc	agcagcggac	tgtccagata	cgtggctcgg	1380
cgttccagca	acicicggat	catcaaccac	cagcaeggca	ccatgcagaa	ccigcacgac	1440
agctgcagca	gaaalctgta	tgtgicccctg	ctcclgtgt	acaagacctt	tggccggaag	1500
ctgcacctg:	acagccatcc	catcatcctg	ggcttccgga	agatccctat	gggcgtggga	1560
ctgagcccat	tcctgctggc	ccagtttacc	agegcctatct	gcagcgtgt	gcccggagcc	1620
:tccttcact	gcctggctt	cagctacatg	aaacaacgtgg	tgttggggcc	caagagcgtg	1680
cagcacctgg	aatccctgtt	taccggcg	accaacttcc	tgcgttccct	gggcataccac	1740
ctgaatccca	acaagaccaa	gagaatgggg	tacagctga	acitca:ggg	ctacgtgatc	1800
ggcagc:ggg	gcacactgcc	ttaggaacac	atcg:ccaga	agatcaaaga	gtgcgtccgc	1860
aaaccttcccg	tgaacagacc	catcgacitgg	aaagtgtgcc	agcggatgt	tggactgt	1920
ggcttgcag	ctctttcac	ccagtgccgc	taccctgctc	tga:gcctci	gtacgcccgc	1980
atccagagca	agcaggcc	caccttccgc	cctacctaca	aggcccttct	gtgcaagcag	2040
tacctgaatc	tgttccctgt	ggccagacag	agaccaggcc	tgtgccaggt	tttcgcctaat	2100
gccacaccta	ccggc:gggg	ccttgttatt	ggccaccaga	gaa:gagagg	caccttgcgt	2160
gttcccttgc	ccatccacac	agcccagctg	ctggctgcct	gtt:cgccag	aagcagatcc	2220
ggagccazgc	tgtcgccac	cgacaactcc	gigggtgtga	gccggaagta	caccagttc	2280
ccttggctgc	tggctgcgc	tgcctactgg	atcccgag	gcaccagctt	cgtgtacgt	2340
ccctctgc	tgaaccttgc	cgacgaccct	tctaggaggca	ggc:gggact	gtacagacct	2400
ctgcttagac	tgccttctag	acccaccacc	ggacggacca	gcctgtacgc	cgatagccct	2460
agcgtgcaca	gecatctgcc	cgacagagtg	cacttgcaca	gccctctgca	tgtggccctgg	2520
agacccatcca						2529

<210> 4
 <211> 843
 <212> PRT
 <213> 人门胱列

 <220>
 <223> HBV聚合酶

 <400> 4

Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Lys Leu Leu Leu Leu Asp Asp
 1 5 10 15

Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly
 20 25 30

Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val
 35 40 45

Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro Glu Trp Gln Thr Pro Ser Phe Pro
 65 70 75 80

Asn Ile His Leu Gln Glu Asp Ile Ile Asn Arg Cys Glu Gln Phe Val
 85 90 95

Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Lys Leu Ile Met Pro
 100 105 110

Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly
 115 120 125

Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr
 130 135 140

Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu
 165 170 175

Gln Glu Leu Gln His Gly Arg Leu Val Phe Gln Thr Ser Thr Arg His
 180 185 190

Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Ser
 195 200 205

Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln Ser Gln Leu Arg Lys Ser Arg Leu Gly
 210 215 220

Leu Gln Pro Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser
 225 230 235 240

Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val His Pro Thr Thr Arg Arg Pro Phe Gly
 245 250 255

Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Thr Ala Ser Ser Ser
 260 265 270

Ser Ser Cys Leu His Gln Ser Ala Val Arg Lys Ala Ala Tyr Ser His

275

280

285

Leu Ser Thr Ser Lys Arg His Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu
 290 295 300

His Asn Ile Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser Glu Gly Pro Val
 305 310 315 320

Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp
 325 330 335

Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys
 340 345 350

Thr Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg
 355 360 365

Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Thr
 370 375 380

Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Thr
 385 390 395 400

Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr
 405 410 415

Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala
 420 425 430

Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu
 435 440 445

Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn
 450 455 460

Ser Arg Ile Ile Asn His Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp
 465 470 475 480

Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Tyr Lys Thr
 485 490 495

Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe
 500 505 510

Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln
 515 520 525

Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys
 530 535 540

Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asn Asn Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val
545 550 555 560

Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser
565 570 575

Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser
580 585 590

Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Ser Trp Gly Thr Leu Pro Gln
595 600 605

Glu His Ile Val Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val
610 615 620

Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu
625 630 635 640

Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro
645 650 655

Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr
660 665 670

Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala
675 680 685

Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asn Ala Thr Pro Thr
690 695 700

Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Val
705 710 715 720

Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Gln Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala
725 730 735

Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val
740 745 750

Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala
755 760 765

Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu
770 775 780

Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro
785 790 795 800

Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr
805 810 815

Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe
 820 825 830

Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
 835 840

<210> 5
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 脲基素S信號肽

<400> 5
 atggctcgac ctctgtgtac cctgtatctc ctgtatggcta cccggcgg agctctggcc 60
 agc 63

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 脲基素S信號肽

<400> 6

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Ser
 20

<210> 7
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hCMV啟動子

<400> 7
 accggccatgt tgacatgtat tattgactag ttaattaaatg taatcaatla cggggccatt 60
 agttcatagc ccatatataatgg agttcccgct tacataactt acggtaatgt gccccccctgg 120
 ctgaccggccc aacgacccccc gccccattgac gtcaataatgg acgtatgttc ccatagttaac 180
 gccaataatggg actttccattt gacgtcaatgt gggtggatgttttacggtaaa ctgccccactt 240
 ggcagttacat caaggtatc atatgccaatgg tacggcccccatttgcgtca aatgcggtaa 300
 atggcccgcc tggcattatgt cccagttacat gaccttatgg gactttccata cttggcagta 360
 catctacgtttttagtcatgtt ctattaccat ggtgtatgcgg tttttggcagt acatcaatgg 420
 gcggtggatgtt cgggtttactt cacggggatttccaaatctc caccccatgtt acgtcaatgg 480
 gagttttttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaaatgtcgtaaca actccggcccc 540

atggacgcaa atggggcggtta ggcgtgtacg gtggggaggtc tatataagca gagctcgttt 600
agtgaaccgt cagatcgccct ggagacgcca tccacgttgtt tttgacctcc atagaagaca 660
ccggggacgca tccagccctcc gcccc 684

<210> 8
<211> 378
<212> DNA
<213> 人口序列

<220>
<223> 三強化子

<210> 9
<211> 225
<212> DNA
<213> 人口序列

<220>
<223> BGH聚腺苷酸

<210> 10
<211> 81
<212> DNA
<213> 人口序列

<220>
<223> 免疫球蛋白分泌信號

<400> 10 aatggaggttcg ggctgtcttg ggatctttctg gtggcaatcc tgaagggcgt gcagtgtgaa 60
gtgcagtcgc tggagtcgtgg a 81

<210> 11
<211> 27
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫球蛋白分泌信號

<400> 11

Met	Glu	Phe	Gly	Leu	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Val	Ala	Ile	Leu	Lys	Gly
1				5					10				15		

Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly
				20				25		

<210> 12

<211> 996

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 核心-聚合酶融合物

<400> 12

Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Leu	Leu
1				5						10			15		

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

Ser	Arg	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Val	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	Ala	Gly	Ala	Gly	Met	Pro	Leu	Ser	Tyr	Gln	His
				145			150			155			160		

Phe	Arg	Lys	Leu	Leu	Leu	Asp	Asp	Glu	Ala	Gly	Pro	Leu	Gly	Glu
					165			170			175			

Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu
 180 185 190
 Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys
 195 200 205
 Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn
 210 215 220
 Pro Glu Trp Gln Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu Gln Glu Asp
 225 230 235 240
 Ile Ile Asn Arg Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu
 245 250 255
 Lys Arg Arg Leu Lys Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val
 260 265 270
 Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu
 275 280 285
 His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu
 290 295 300
 Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu Gln Glu Leu Gln His Gly Arg
 325 330 335
 Leu Val Phe Gln Thr Ser Thr Arg His Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln
 340 345 350
 Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Ser Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln
 355 360 365
 Ser Gln Leu Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Pro Gln Gln His
 370 375 380
 Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val
 385 390 395 400
 His Pro Thr Thr Arg Arg Pro Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly
 405 410 415
 His Thr Thr Asn Thr Ala Ser Ser Ser Ser Cys Leu His Gln Ser
 420 425 430
 Ala Val Arg Lys Ala Ala Tyr Ser His Leu Ser Thr Ser Lys Arg His

435

440

445

Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Ile Pro Pro Asn Ser
 450 455 460

Ala Arg Ser Gln Ser Glu Gly Pro Val Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln
 465 470 475 480

Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val
 485 490 495

Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Thr Glu His Gly Glu His His
 500 505 510

Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu
 515 520 525

Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Thr Glu Ser Arg Leu Val Val Asp
 530 535 540

Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Thr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe
 545 550 555 560

Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu
 565 570 575

Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu
 580 585 590

His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser
 595 600 605

Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Ile Asn His Gln
 610 615 620

His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr
 625 630 635 640

Val Ser Leu Leu Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu
 645 650 655

Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val
 660 665 670

Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser
 675 680 685

Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asn
 690 695 700

Asn Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe
705 710 715 720

Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro
725 730 735

Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val
740 745 750

Ile Gly Ser Trp Gly Thr Leu Pro Gln Glu His Ile Val Gln Lys Ile
755 760 765

Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys
770 775 780

Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr
785 790 795 800

Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser
805 810 815

Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys
820 825 830

Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys
835 840 845

Gln Val Phe Ala Asn Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly
850 855 860

His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Val Ala Pro Leu Pro Ile His Thr
865 870 875 880

Ala Gln Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys
885 890 895

Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser
900 905 910

Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr
915 920 925

Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser
930 935 940

Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg
945 950 955 960

Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro
965 970 975

Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala
 980 985 990

Trp Arg Pro Pro
 995

<210> 13
 <211> 1023
 <212> PRT
 <213> 人白介素

<220>
 <223> 核心-聚合酶融合物

<400> 13

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Met Asp Ile Asp Pro
 20 25 30

Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser
 35 40 45

Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu
 50 55 60

Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr
 65 70 75 80

Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu Ala
 85 90 95

Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val
 100 105 110

Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Leu Leu
 115 120 125

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

Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg
 145 150 155 160

Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
 165 170 175

Ala Gly Ala Gly Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Lys Leu Leu
 180 185 190

Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu
 195 200 205

Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly
 210 215 220

Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr
 225 230 235 240

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

Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu Gln Glu Asp Ile Ile Asn Arg Cys
 260 265 270

Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Lys
 275 280 285

Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro
 290 295 300

Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His
 305 310 315 320

Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile
 325 330 335

Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro
 340 345 350

Tyr Ser Trp Glu Gln Glu Leu Gln His Gly Arg Leu Val Phe Gln Thr
 355 360 365

Ser Thr Arg His Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln Gln Ser Ser Gly Ile
 370 375 380

Leu Ser Arg Ser Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln Ser Gln Leu Arg Lys
 385 390 395 400

Ser Arg Leu Gly Leu Gln Pro Gln Gln His Leu Ala Arg Arg Gln
 405 410 415

Gln Gly Arg Ser Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val His Pro Thr Thr Arg
 420 425 430

Arg Pro Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Thr
 435 440 445

Ala Ser Ser Ser Ser Cys Leu His Gln Ser Ala Val Arg Lys Ala
 450 455 460

Ala Tyr Ser His Leu Ser Thr Ser Lys Arg His Ser Ser Ser Gly His
465 470 475 480

Ala Val Glu Leu His Asn Ile Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser
485 490 495

Glu Gly Pro Val Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys
500 505 510

Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Gln Asp
515 520 525

Trp Gly Pro Cys Thr Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro Arg
530 535 540

Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro
545 550 555 560

His Asn Thr Thr Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser
565 570 575

Arg Gly Asn Thr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu
580 585 590

Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu
595 600 605

Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met
610 615 620

Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg
625 630 635 640

Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Ile Asn His Gln His Gly Thr Met Gln
645 650 655

Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu
660 665 670

Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile
675 680 685

Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe
690 695 700

Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala
705 710 715 720

Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asn Asn Val Val Leu Gly
725 730 735

Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn
 740 745 750

 Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg
 755 760 765

 Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Ser Trp Gly
 770 775 780

 Thr Leu Pro Gln Glu His Ile Val Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg
 785 790 795 800

 Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile
 805 810 815

 Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro
 820 825 830

 Ala Leu Met Pro Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr
 835 840 845

 Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu
 850 855 860

 Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asn
 865 870 875 880

 Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Gln Arg Met Arg
 885 890 895

 Gly Thr Phe Val Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Gln Leu Leu Ala
 900 905 910

 Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp
 915 920 925

 Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu
 930 935 940

 Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val
 945 950 955 960

 Pro Ser Ala Leu Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly
 965 970 975

 Leu Tyr Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg
 980 985 990

 Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp

gccccggaga gcccagaaca ctgtctccccca caccataccg ctctgcgaca ggcaatcccg 180
tgctgggggg agctgatgaa cctggccaca tgggtggat ccaatctgga ggaccccgt 240
tcacgggaac tggtggtcag ctacgtgaac gtcaaatatgg gcctgaaaat ccggcagctg 300
ctgiggttcc atattagcgt cctgacilli ggacgagaga ccgigctgga atacctggtg 360
tccttcggcg tctggatccg cacccccctt gcttatcgac cacccaacgc accaattctg 420
tccacccctgc ccgagaccac agtgtggtc 447

<210> 18
<211> 447
<212> DNA
<213> 人口序列

<220>
<223> HBV核心

```

<400> 18
atggacatcg acccttacaa ggagttcgcc gccagcgigg aactgtgtc ttttgtcccc 60
agtgattttt ttccttccat tccagaccctg cggataaccg cctctgtct gtatcgaa 120
gcccctggaga gcccagaaca ctgcctccca caccataccg ctctgcgaca ggcaatcccg 180
tgctgggggg agctgtatgaa cctggccaca tgggtggat cgaatctgga ggaccccgct 240
tcacgggaac tggllggicag ctacgtgaac gtaataatgg gcctgaaaat cggccagctg 300
ctgtgggtcc atattagctg cctgactttt ggacgagaga ccgtgtggaa atacctggtg 360
tccttccggcg tctggattcg cactccccct gcttatcgac cacccaaacgc accaattctg 420
tccaccctgc ccgagaccac aglggc 447

```

<210> 19
<211> 2529
<212> DNA
<213> 人口

<220>

<400> 19	atgcggccgtt citaccagca ctttagaaag ctgtgtgtgc tggacga:ga agccggccct	60
	ctggaggaag agctgccaag gctggcagac gaggggctga accggagagt ggcgaaagat	120
	ctgtttctgg gaaacctgaa cgtgagtc cttggactc ataaagtcgg caacttcacc	180
	gggcgttaca gtcacacag: gctgttccaa aatccagagt ggcagacacc atccttccc	240
	aacatttacc tgcaggagga catcatata agatgcgttccaa aatgtgtact	300
	gtcaacgaaa agaggccct gaaactgttc atgcgttccaa ggttttaccc aatgtgtact	360
	aagtatctgc cactggataa gggcatcaag ctttacatc cagagcacct ggtgttccat	420
	tacttccaga ctagacacta tctgcgttccaa ctgtggaaagg cggaaatccct gtacaaacgaa	480
	gaaacttccatcc ggatgtgttccaa attttgtggc tcccccattt ctgtggaaaca ggatgtgttccaa	540

<210> 20
<211> 2529
<212> DNA
<213> 人口序列

<220>

<223> HBV聚合酶

<400> 20
atgc(ccctgt cttaccagca cttagaaag ctctgcgc tgacatgca agccggcct
ctggaggaag agctgccaaag gctggcagac gaggggctga accggagagt ggcgaagat
ctgaatctgg gaaacctgaa cgtgagcatc cctggactc ataaagtctgg caacttcacc
ggcgtgtaca gtcacagt gctgttcc aatccagagt ggcagacacc aliccttccc
aaccatccacc tgcaggagga catcattaaat agatgcgaac agttctgtggg acctctgaca
gtcaacgaaa agaggcgct gaaactgatc atgcctgcca ggttttaccc aaatgtgact
aaatctgc cactggatza gggcatcaag cttactatc cagagcacct gglgaaccat
tacttccaga ctagacacta tctgcatacc ctgtggaaagg cccgaatctt gtacaaacga
gaaactaccc ggagtgcctc attttgtgc tccctatalt ctggaaaca ggagctgcag
catggcagggc tgggttcca gaccagcaca cggccacgggg atgagtcctt ttgccagcag
tctagggca tcctgagcag atccccctg gggccctgtc tgcagtctca gtcgccaag
atgtactgg gactgcagcc acagcaggga cacctggcac gacggcagca gggaaaggct
ggcagttatcc gggctagagt gcatcccaca actagaaggc ctgtggcgt cgagccatca
ggaaaggcgcc acaccacaaa caccgcatca agctcctcta ttgcctgca tcagtctgg
gtgagaaagg cccgttacag ccacctgtcc acatctaaaa ggcactcaag ctccggcat
gtgtggagc tgcacaacat ccctccaaat tctgcacgca gtcagtcaga aggaccctg
ttcagctgt ggtggctgca ttgcggaaac tcaaaggctt gcagcgacta ttgtctgagc
cata:tg:ga alictgcgttgg ggttggggc ctttgtaccg agcacgggaa acaccatcc
aggatccac gaacaccaggc acgagtgtact ggagggggtgt tctgtggca aaaaacccc
cacaatacta cccggcggc gctgggtgtc gatitcgtc agttttcaag aggcaacaca
agggtgtcat ggcggaaatt cggccgtccct alictgcaga tgcgtactaa cctgtgtct
agtaatctga gctggctgtc cctggacgtg tccgcagcct ttaccaccc gtcctgtcat
ccagctgca tggcccatct gtcgtgggg tcaagggac tgcgtgtcat cggccggcga
ctgtctctata actcacgtca: cattaatcac cagca:ggca ccatgcagaa cctgcacgt
agctgttccc ggaatctgtca cgtgtctgtc ctgtgtgttataagacatt cggcagaaaa
ctgcaccgti acagccatcc tatttcattgt ggggtttagga agatccaaat gggagggtgg
ctgagccctt tctgcgtggc acatgttacc tccgcacattt gtcgtgtgtt cggccggc
ttccacact gtcgtggctt ttccatataa aacaatgtgg tctggggcga caaatccgt
1680

cagcatctgg	agtctctgtt	cacagctgtc	actaactttc	1gc1gagcc1	ggggatccac	1740
ctgaacccaa	ataagactaa	acgc1ggggg	tacagcc1ga	at11ca1ggg	atatgigall	1800
ggatctggg	ggaccctgcc	acaggagcac	atcg1gcaga	agatcaagga	atgc1ttcg	1860
aagctgccc1	tcaacagacc	tatcgactgg	aaag1gtgcc	agcggattgt	cg1act1gc1g	1920
ggct1cgcccg	ctcc1c1tac	ccagtgcggg	tacccagcac	1gatgc1ccct	gtatgcctgt	1980
atcc1agt1cta	agcaggctt	cac1ttagt	cctacataca	aggc1ttcct	gt1gcaaa1cag	2040
tac1tgc1acc	tgtatcc1agi	ggcaaggcag	cgacc1tggac	tgtgc1caggt	ctttgcaat	2100
gccacteeta	ccggctgggg	gctggctatc	ggacatc1gc	gaatgcgggg	cacattcg1g	2160
gcccccc1gc	ctat1cacac	tgc1cagctg	c1ggc1agcc1	gc1tt1gctag	atctaggagt	2220
ggagc1aa1gc	tgc1cggcac	cgacaatagt	g1gg1cc1gt	caagazaata	cacatcc1lc	2280
ccatggctgc	tgggatgtgc	tgcaaaactgg	at1ctgaggg	gcacc1agctt	cgtgtac1gc	2340
ccctc1agcccc	tgaatcc1tc	tgacgatcca	tcccgccggc	gac1tggact	gtacc1gac1t	2400
ctgctgagac	tgc1cc1t1cag	gcctacaact	gcccggacat	ctc1gtatgc	cgatt1c1cca	2460
agcgtgc1ccct	cacac1t1gc	tgacagagtc	cac1ttgc1t	caccc1t1gca	cgtcgc1t1gg	2520
cggc1ct1cca						2529

<210> 21
 <211> 671
 <212> DNA
 <213> 人白介素

<220>
 <223> pUC Ori

cccgtagaaa	agatcaaagg	atct1ct1ga	gatcc1t1t1	t1ctgcgcgt	aatc1gc1gc	60
ttgcaaacaa	aaaaaccgct	accagcgg1t	g1ttg1t1gc	cg1atcaaga	gctacc1act	120
cttttcc1ga	agg1taactgg	cttc1agcaga	g1gc1agatac	caa1actgt	tcttct1tag1	180
tagcc1tag1	taggc1acca	cttcaagaac	tctgt1agcac	cgcc11acata	cctcg1c1t1g	240
cta1tcc1gl	tacc1ag1ggc	tgc1tgc1c1gt	ggcgata1gt	cgt1t1c1l1ac	cggg1t1ggac	300
tca1agac1gt	ag1t1acc1ga	taaggcgc1ag	cg1gc1gggc1	gaacgggggg	ttcg1g1caca	360
cagccc1agct	tggagcgaac	gac1t1acacc	gaact1gagat	acc1t1ac1gc1g	t1gagctat1ga	420
gaa1agcgc1ca	cgc1t1cc1ga	agg1gagaa1g	g1cg1ac1aggt	atcc1gg1ta2g	cg1gc1agg1lc	480
gga1acaggag	agc1gc1ac1gc1g	gg1agct1cc1a	gg1ggg1aa1ac1g	cct1gg1tat1t1	ttat1ag1t1ct	540
gtc1ggg1t1c	gcc1acc1c1t1g	act1t1gagc1gt	cg1at1t1t1gt	gat1gc1t1gc1c	agg1ggggc1gg	600
agoctat1gga	aaa1ac1gc1c1ag	caac1gc1gg1cc	t1t1t1ac1ggt1	cc11gg1cc1t1	ttgc1:gg1cc1	660
t1t1gc1caca	t					671

<210> 22
 <211> 795

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 卡那霉素抗性

<400> 22
atgatttgcg aagatggctt tcacgctggc tcgcgcagctg cgtgggtggc acgcctgttt 60
ggttatgatt gggcgccagca gactatggc tggccgcacg cggctgtatt tccggctgtct 120
gtctcagggtc gccccgtgtt gtttgtgaag acggatgtgt ctggcgcat taaatgagttt 180
caggacgagg cggctcgctt gagttgggtt gccaccacccg gctgtccctg cggccgcgtt 240
ctggatgtcg tggacagaagg agggccgcgtt tggcccttc tccggcgaagt gcccggccag 300
gaccctgtca gcagccactt ggcacccggca gaaaaagttt ctatcatggc cgacgcacatg 360
cgtcgcttc acactctcg tccggccacg tggcccttgc accaccaggc caagcatgtt 420
atggaaacgtt cggctactcg gatggaaagca ggttttagtag accaggacgtt tttggatgag 480
gaacatczag gcccggccccc ggctgtactt tttgcgcgtt taaaagcgcc gatggccgtt 540
ggcgaagatt tggtagtacccatggagat gctgtttgc caaacatcat ggttggaaat 600
ggccgttctt caggctttat tggactgtggg cgcctgggtg tggccgcacccg ctatcaagat 660
atggcgctcg caactcgtga catcgctgaa gagctggcgc gagaatggc tggccgttcc 720
ctggatctgt atggcatttc agcgccccgtt tcccaacgc tccgcattttt tccgttgcgtt 780
gatgagttttt tctaa 795

<210> 23
<211> 264
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 卡那霉素抗性

<400> 23

Met Ile Glu Gln Asp Gly Leu Ile Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val
1 5 10 15

Glu Arg Leu Phe Gly Tyr Asp Trp Ala Gln Gln Thr Ile Gly Cys Ser
20 25 30

Asp Ala Ala Val Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe
35 40 45

Val Lys Thr Asp Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala
50 55 60

Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val
65 70 75 80

Leu Asp Val Val Thr Glu Ala Gly Arg Asp Trp Leu Leu Gly Glu

85

90

95

Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys
 100 105 110

Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro
 115 120 125

Ala Thr Cys Pro Phe Asp His Gln Ala Lys His Arg Ile Glu Arg Ala
 130 135 140

Arg Thr Arg Met Glu Ala Gly Leu Val Asp Gln Asp Asp Leu Asp Glu
 145 150 155 160

Glu His Gln Gly Leu Ala Pro Ala Gln Leu Phe Ala Arg Leu Lys Ala
 165 170 175

Ser Met Pro Asp Gly Glu Asp Leu Val Val Thr His Gly Asp Ala Cys
 180 185 190

Leu Pro Asn Ile Met Val Glu Asn Gly Arg Phe Ser Gly Phe Ile Asp
 195 200 205

Cys Gln Arg Leu Gly Val Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Ala Leu Ala
 210 215 220

Thr Arg Asp Ile Ala Glu Glu Leu Gly Gly Glu Trp Ala Asp Arg Phe
 225 230 235 240

Leu Val Leu Tyr Gly Ile Ala Ala Pro Asp Ser Gln Arg Ile Ala Phe
 245 250 255

Tyr Arg Leu Leu Asp Glu Phe Phe
 260

<210> 24

<211> 99

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> bla_{质粒}

<400> 24

```
accctatattt gtttatTTTt ctzzatACAT tcaaaATATGT atccgcTcaT gagacaataa
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagt
```

60

99

<210> 25

<211> 124

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PrMVA13.5長啟動子

<400> 25
taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttgg: agtattgctc ttgtgactag 60
agacttttgta taaggtactg taaaaataga aactataatc atataatagt gtaggttgg: 120
agta 124

<210> 26

<211> 227

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PrHyb啟動子

<400> 26
gtttttaaaa ttttttata ataaaatatcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaattttat 60
tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaattttat tgcacggtcc ggtaaaaatt 120
aaaaaaactat tctaattttat tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaattttat 180
tgcacggtcc ggtaaaaatt gaaaaactat tctaattttat tgcacgg 227

<210> 27

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 免疫球蛋白分泌標籤

<400> 27

aiggaatctcg ccctgagctg ggtgttccctg gtggccatcc tgaaggaggt gcagtgcgag 60
gigcagctgc tggaaagcgg t 81

<210> 28

<211> 7

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 轉錄終止序列

<220>

<221> n

<222> (6)..(6)

<223> n，其中n可以為任何核苷酸

<400> 28

ttttttat

7



201928061

【發明摘要】

【中文發明名稱】

誘發抗B型肝炎病毒(HBV)免疫反應之方法及組合物

【英文發明名稱】

METHODS AND COMPOSITIONS FOR INDUCING AN IMMUNE RESPONSE AGAINST HEPATITIS B VIRUS (HBV)

【中文】

本文中提供編碼HBV抗原之改良型安卡拉牛痘病毒(Modified Vaccinia Ankara)(MVA)載體及腺病毒載體。亦提供增強人類個體之免疫反應的方法，該等方法係藉由在初打/加打療程中，利用該等編碼HBV抗原之MVA及腺病毒載體增強該人類個體之免疫反應。

【英文】

Provided herein are Modified Vaccinia Ankara (MVA) vectors and adenovirus vectors encoding HBV antigens. Also provided are methods of enhancing an immune response in a human subject by utilizing the MVA and adenovirus vectors encoding HBV antigens in a prime/boost regimen to enhance the immune response in the human subject.

【指定代表圖】

圖2A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種改良型安卡拉牛痘病毒(Modified Vaccinia Ankara)(MVA)載體，其包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列。

【第2項】

如請求項1之MVA載體，其中該HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在哺乳動物中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【第3項】

如請求項1之MVA載體，其中該HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之MVA載體，其進一步包含編碼可操作地連接至該HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之MVA載體，其中該第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 3至少90%一致。

【第6項】

如請求項5之MVA載體，其中該第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO:

3之聚核苷酸序列。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之MVA載體，其進一步包含編碼由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原的第二聚核苷酸序列。

【第8項】

如請求項7之MVA載體，其中該第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 1至少90%一致。

【第9項】

如請求項8之MVA載體，其中該第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 1之聚核苷酸序列。

【第10項】

一種組合物，其包含如請求項1至9中任一項之MVA載體及醫藥學上可接受之載劑。

【第11項】

一種增強人類個體中之免疫反應的方法，該方法包含：

a. 向該人類個體投與包含免疫有效量之腺病毒載體的第一組合物，該腺病毒載體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核苷酸序列的非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；以及

b. 向該人類個體投與包含免疫有效量的如請求項1至10中任一項之MVA載體的第二組合物；

由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強免疫反應。

【第12項】

如請求項11之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【第13項】

如請求項12之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【第14項】

如請求項10至13中任一項之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 19至少90%一致。

【第15項】

如請求項14之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 19之聚核苷酸序列。

【第16項】

如請求項10至15中任一項之方法，其中該第一組合物中該腺病毒載體之核酸分子進一步包含編碼由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成的截短之HBV核心抗原的第二聚核苷酸序列。

【第17項】

如請求項16之方法，其中該第一組合物之第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 17至少90%一致。

【第18項】

如請求項17之方法，其中該第一組合物之第二聚核苷酸序列包含

SEQ ID NO: 17之聚核苷酸序列。

【第19項】

如請求項16至18中任一項之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列及第二聚核苷酸序列編碼包含該截短之HBV核心抗原可操作地連接至該HBV聚合酶抗原的融合蛋白。

【第20項】

如請求項19之方法，其中該第一組合物之融合蛋白包含該截短之HBV核心抗原經由連接子可操作地連接至該HBV聚合酶抗原。

【第21項】

如請求項20之方法，其中該第一組合物之連接子包含胺基酸序列(AlaGly) n ，且 n 係2至5之整數，較佳該連接子係由包含SEQ ID NO: 14之聚核苷酸序列編碼。

【第22項】

如請求項21之方法，其中該第一組合物之融合蛋白包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列。

【第23項】

如請求項11至22中任一項之方法，其中該增強之免疫反應包含增強針對該人類個體中之HBV抗原的抗體反應。

【第24項】

如請求項23之方法，其中該增強之免疫反應包含增強針對該人類個體中之HBV抗原之CD8+ T細胞反應。

【第25項】

如請求項23或24之方法，其中該增強之免疫反應包含增強針對該人

類個體中之HBV抗原之CD4+ T細胞反應。

【第26項】

如請求項11至25中任一項之方法，其中該腺病毒載體係rAd26或rAd35載體。

【第27項】

如請求項11至26中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後1-12週進行。

【第28項】

如請求項11至26中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後2-12週進行。

【第29項】

如請求項11至26中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少1週進行。

【第30項】

如請求項11至26中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少2週進行。

【第31項】

一種增強人類個體中之免疫反應的方法，該方法包含：

a. 向該人類個體投與第一組合物，該第一組合物包含免疫有效量之第一質體，該第一質體包括含編碼HBV聚合酶抗原之第一聚核昔酸序列的第一非天然存在之核酸分子，該HBV聚合酶抗原包含與SEQ ID NO: 4至少98%一致之胺基酸序列；及第二質體，該第二質體包括含編碼截短之HBV核心抗原之第二聚核昔酸序列的第二非天然存在之核酸分子，該截

短之HBV核心抗原由SEQ ID NO: 2之胺基酸序列組成；以及

b. 向該人類個體投與包含免疫有效量的如請求項1至10中任一項之MVA載體的第二組合物；

由此獲得針對該人類個體中之HBV抗原的增強免疫反應。

【第32項】

如請求項31之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原不具有逆轉錄酶活性及核糖核酸酶H(RNase H)活性。

【第33項】

如請求項31或32之方法，其中該第一組合物係用於引發該免疫反應且該第二組合物係用於增強該免疫反應。

【第34項】

如請求項31至33中任一項之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少兩種HBV基因型之免疫反應，較佳該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型B、C及D之T細胞反應，且更佳地，該HBV聚合酶抗原能夠在該人類個體中誘發針對至少HBV基因型A、B、C及D之CD8 T細胞反應。

【第35項】

如請求項31至34中任一項之方法，其中該第一組合物之HBV聚合酶抗原包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。

【第36項】

如請求項31至35中任一項之方法，其進一步包含編碼可操作地連接至該第一組合物之HBV聚合酶抗原之信號序列的聚核苷酸序列。

【第37項】

如請求項36之方法，其中該信號序列包含SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 11之胺基酸序列，較佳該信號序列係由SEQ ID NO: 5或SEQ ID NO: 10之聚核苷酸序列編碼。

【第38項】

如請求項31至37中任一項之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 20至少90%一致。

【第39項】

如請求項38之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 20之聚核苷酸序列。

【第40項】

如請求項31至39中任一項之方法，其中該第一組合物之第二聚核苷酸序列與SEQ ID NO: 18至少90%一致。

【第41項】

如請求項40之方法，其中該第一組合物之第二聚核苷酸序列包含SEQ ID NO: 18之聚核苷酸序列。

【第42項】

如請求項31至41中任一項之方法，其中該第一組合物之第一聚核苷酸序列及第二聚核苷酸序列進一步包含啟動子序列、視情況一或多個另外的調控序列，較佳地，該啟動子序列包含SEQ ID NO: 7之聚核苷酸序列，且該另外的調控序列係選自由以下組成之群：SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 15之強化子序列，及SEQ ID NO: 16之聚腺苷酸化信號序列。

【第43項】

如請求項31至42中任一項之方法，其中該增強之免疫反應包含增強

針對該人類個體中之HBV抗原的抗體反應。

【第44項】

如請求項43之方法，其中該增強之免疫反應包含增強針對該人類個體中之HBV抗原之CD8+ T細胞反應。

【第45項】

如請求項43或44之方法，其中該增強之免疫反應包含增強針對該人類個體中之HBV抗原之CD4+ T細胞反應。

【第46項】

如請求項31至45中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後1-12週進行。

【第47項】

如請求項31至45中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後2-12週進行。

【第48項】

如請求項31至45中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少1週進行。

【第49項】

如請求項31至45中任一項之方法，其中步驟(b)係在步驟(a)之後至少2週進行。

