

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **239831**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **427320**

(22) Data zgłoszenia: **01.10.2018**

(51) Int.Cl.

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

C07K 14/02 (2006.01)

(54) **Chimeryczne cząsteczki wiruso-podobne eksponujące sekwencje antygenowe wirusa HCV do zastosowania w leczeniu przewencyjnym zakażenia wirusem HCV i/lub HBV**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

06.04.2020 BUP 08/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

17.01.2022 WUP 03/22

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

KATARZYNA GRZYB, Bielkówek, PL

ANNA CZARNOTA, Gdynia, PL

**KRYSTYNA BIEŃKOWSKA-SZEWCZYK,
Gdańsk, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 239831 B1

Opis wynalazku

Przedmiot wynalazku mieści się w dziedzinie prewencji zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C – HCV i zapalenia wątroby typu B – HBV. Wynalazek dotyczy chimerycznych cząstek wiruso-podobnych, białek chimerycznych, opartych na białku sHBsAg wirusa HBV eksponującym wybrane sekwencje antygenowe HCV w wybranych układach. Wynalazek dotyczy sekwencji wybranych epitopów – czterech sekwencji antygenowych rejonów glikoproteiny E2 w kombinacji po dwie sekwencje w jednym zastosowaniu i jednej sekwencji antygenowej rejonu glikoproteiny E2 zastosowanej odrębnie – do zastosowania w leczeniu prewencyjnym HCV i/lub HBV, a dokładniej do zastosowania jako składnika rekombinowanej szczepionki opartej na tych epitopach w postaci chimerycznych cząsteczek wiruso-podobnych opartych na białku sHBsAg.

Szacuje się, że na świecie żyje ponad 70 milionów ludzi zainfekowanych wirusem zapalenia wątroby typu C (z ang. Hepatitis C Virus – HCV) a corocznie odnotowuje się 1.75 miliona nowych przypadków zakażenia. Wg. najbardziej aktualnego raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – Global Hepatitis Report, 2017) liczba zgonów spowodowana wirusami zapalenia wątroby jest porównywalna z liczbą zgonów spowodowanych wirusem HIV czy gruźlicą.

W Polsce, w wyniku różnych badań prowadzonych na terenie całego kraju, liczbę zakażonych wirusem HCV szacuje się obecnie na około 150 tys. osób (Polska Grupa Ekspertów, Hepatologia, 2018, 18: 1–9; „Raport Polskiej Grupy Ekspertów HCV dotyczące leczenia wirusowych zapaleń wątroby typu C w roku 2018”). Jednakże ze względu na brak powszechnych badań diagnostycznych mających na celu określenie rzeczywistej skali problemu liczba ta może być znacznie większa. Do zakażeń wirusem HCV dochodzi różnymi drogami. Już na początku badań nad HCV zaobserwowano związek między objawami chorobowymi, a wcześniejszym kontaktem pacjenta z krwią lub produktami krwiopochodnymi. Obecnie jednak, ze względu na obowiązujące procedury szpitalne, w krajach rozwiniętych rzadko dochodzi do zakażeń HCV podczas procedur medycznych. Jednak w krajach rozwijających się nadal pozostaje to jedną z częstszych dróg zakażeń. Najpopularniejszą drogą zakażeń w krajach rozwiniętych jest dożylne przyjmowanie narkotyków (około 60% nowych zakażeń), przeniesienie wirusa z matki na dziecko oraz kontakty seksualne. Ze względu na niezwykle różnorodność ludzkich zachowań, które zawierają ryzyko kontaktu z krwią lub produktami krwiopochodnymi, można wymienić wiele więcej czynności potencjalnie niosących ze sobą ryzyko zakażenia wirusem HCV. Są to m. in. zabiegi kosmetyczne z użyciem igieł: kolczykowanie, tatuowanie czy akupunktura. Większość z tych zabiegów jest wykonywana w regionach, w których nie przeprowadza się rutynowych badań przesiewowych w kierunku infekcji HCV, trudno więc określić ich wpływ na rozprzestrzenianie się epidemii.

Około 80% infekcji wirusem HCV przechodzi w fazę chroniczną, która przez lata może nie dawać żadnych specyficznych objawów, dlatego też zakażenia HCV często nazywa się „cichą epidemią”. Przewlekła postać choroby w 20% przypadków prowadzi do ciężkiego uszkodzenia wątroby, marskości wątroby i w efekcie często do rozwinięcia się raka wątrobowo komórkowego. Często jedynym ratunkiem dla chorych jest przeszczep wątroby, który nie prowadzi niestety do wyleczenia. Przeszczepiona wątroba jest od razu zakażona cząstkami wirusa krążącymi we krwi. W ciągu kilku do kilkudziesięciu dni po przeszczepie u pacjentów odnotowuje się wzrost wirerii. Przez lata standardem leczenia antywirusowego była terapia dwulekowa, podczas której podawane były: interferon i ribawiryna. Terapia ta obciążona była jednak poważnymi skutkami ubocznymi, a jej skuteczność nie przekraczała 50%. Intensywne badania prowadzone w ostatnich latach pozwoliły na dokładniejsze poznanie biologii wirusa HCV i w efekcie doprowadziły do odkrycia nowych leków działających bezpośrednio na cząsteczki wirusowe (ang. Direct acting antivirals – DAAs), które osiągają skuteczność powyżej 90%. Jednak zarówno cena leków jak i koszty hospitalizacji są bardzo wysokie i znacznie obciążają budżet pacjentów oraz państwa. Co więcej, stosowanie terapii opartej na lekach DAAs skutkuje selekcją wariantów opornych na leczenie (z ang. resistance associated variants – RAVs), których obecność stanowi coraz większy problem w przebiegu leczenia.

Z tego względu, opracowanie skutecznej i powszechnie dostępnej szczepionki chroniącej przed zakażeniem jest ważnym celem aktualnych badań nad HCV. Istotnym elementem badawczym w opracowaniu szczepionki jest wybór miejsca antygenowego, czyli takiego białka HCV lub jego fragmentu – epitopu, który będzie wzbudzał długotrwałą i skuteczną odpowiedź humoralną.

HCV jest małym, osłonkowym wirusem należącym do rodziny *Flaviviridae*. Nukleokapsyd tego wirusa otoczony jest osłonką lipidową, w której zakotwiczone są heterodimery glikoprotein E1 i E2. Glikoproteiny te odgrywają istotną rolę w cyklu życiowym wirusa i ze względu na swoją ekspozycję na powierzchni cząsteczki wirusowej stanowią główny cel dla przeciwciał neutralizujących.

Przeszkodą w tworzeniu uniwersalnej szczepionki chroniącej przed zakażeniem HCV jest wysoka zmienność glikoprotein E1 i E2, która pozwala wirusowi na ucieczkę przed układem immunologicznym gospodarza. Według badań filogenetycznych wyróżnia się siedem genotypów oraz wiele subtypów wirusa, a poziom zróżnicowania między nimi sięga nawet 35%. Ponadto podczas infekcji organizmu wirus różnicuje się tworząc blisko spokrewnione warianty w obrębie jednego zainfekowanego organizmu (quasi-gatunki).

Zmienność sekwencji manifestuje się głównie w sekwencji glikoproteiny E2, która zawiera regiony hiper-zmienne (z ang. hypervariable regions – HVRs). Regiony te stanowią wysoko immunogenne sekwencje, które dzięki nieustannym zmianom działają jako tak zwane „przynęty dla przeciwciał”. Ze względu na silną immunogenność, znane jest wykorzystanie rejonów hiper-zmiennych glikoproteiny E2 jako głównego celu antygenowego w szczepionkach przeciwko HCV, co opisano w publikacji zgłoszenia międzynarodowego WO2002010416 oraz publikacji: Netter H. J. et al., *Journal of Virology*, 2000, 2130–2141; "Antigenicity and Immunogenicity of Novel Chimeric Hepatitis B Surface Antigen Particles with Exposed Hepatitis C Virus Epitopes" oraz P.T.K. Vietheer et al., *Antiviral Therapy*, 2007, 12(4): 477–487; "Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies.". We wcześniej testowanych szczepionkach wykorzystywane były obie glikoproteiny E1 oraz E2 w formie pełnej, tylko jedno z białek heterodimeru glikoprotein E1E2 np. monomeryczna forma E2 lub E1 lub skrócone formy monomerów oraz heterodimerów glikoprotein E1 i E2, pozbawione domen transmembranowych. Należy w tym miejscu podkreślić, że regiony hiper-zmienne są elementem wszystkich szczepionek opartych na pełnych lub pozbawionych domen transmembranowych formach glikoproteiny E2 wirusa HCV np. takich jak opisano w publikacjach: Beaumont E. et al., *Hepatology*, 2013, 57:1303–1313; "Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine." oraz Frey S. E. et al., *Vaccine*, 2010, 28:6367–6373; "Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults."

Co istotne, mechanizm „przynęty dla przeciwciał” powoduje skierowanie większości odpowiedzi immunologicznej w kierunku wysoko zmiennych rejonów przy jednoczesnym braku lub obniżonej ilości przeciwciał wiążących się do rejonów silnie konserwowanych. W efekcie w przypadku podania szczepionki zawierającej regiony hiper-zmienne (np. szczepionki oparte na pełnej lub skróconej formie glikoproteiny E2) lub szczepionki zawierającej tylko różne warianty regionów hiper-zmiennych wirusa HCV (np. szczepionka oparta na cząsteczkach wiruso-podobnych eksponujących region hiper-zmienny pierwszy – HVR1) obserwuje się wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej przeciwciał, które mają znacznie ograniczoną zdolność do rozpoznania różnych genotypów, subtypów i quasi-gatunków wirusa HCV.

Przeciwciała neutralizujące poprzez efekt steryczny lub poprzez wiązanie się z miejscem biorącym udział w oddziaływaniu cząsteczka wirusowa – receptor komórki gospodarza zapobiegają wnikaniu wirusa do komórki i rozprzestrzenianiu się infekcji. Jednak jak wcześniej wspomniano wzbudzenie specyficznej odpowiedzi przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko wybranym, konserwowanym fragmentom nie jest możliwy w przypadku wykorzystania jako immunogenu pełnej formy glikoproteiny E1 oraz E2 wirusa HCV. Jest to związane z obecnością dobrze wyeksponowanych oraz wysoko immunogennych regionów HVR i relatywnie słabą ekspozycją i immunogennością regionów silnie konserwowanych. Z tego powodu prawdziwym wyzwaniem jest zarówno identyfikacja takich regionów, dobrane kombinacji epitopów umożliwiające zwiększenie potencjału immunogenu jako uniwersalnej szczepionki oraz ekspozycja wybranych epitopów, w taki sposób aby uzyskać możliwie wysokie miano przeciwciał szeroko neutralizujących wirusa HCV.

Istnieje szereg silnie konserwowanych epitopów znajdujących się w sekwencji glikoproteiny E2 jak i E1, które jednocześnie odgrywają ważną rolę w wiązaniu cząsteczki wirusowej do receptorów komórki gospodarza i mogą stanowić doskonały cel dla przeciwciał neutralizujących, zatem możliwość wyboru epitopów w tych białkach jest duża, a tym samym znalezienie najbardziej skutecznej wymaga szeregu prac naukowych.

Znalezienie i opracowanie skutecznych sekwencji antygenowych stanowi cel wynalazku.

Jednym ze znanych spośród wielu możliwych rejonów glikoproteiny E2 jest tzw. domena neutralizująca (z ang. neutralizing face) glikoproteiny E2, zawierająca "frontalną" część glikoproteiny (rejon 421–459 lub 422–444), która częściowo pokrywa się z tzw. epitopem I glikoproteiny E2 (rejon 412–423) oraz położoną dalej sekwencję odpowiedzialną za wiązanie tetraspaniny CD81, która jest głównym receptorem wejścia dla wirusa HCV – rejon 519–535 (Kong L et al. *Science*, 2013, 342(6162): 1090–1094; Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure.) Ponadto w literaturze opisano szereg innych, silnie konserwowanych fragmentów glikoproteiny E2 mogących mieć znaczenie w procesie wejścia wirusa do komórki gospodarza m.in. silnie konserwowane rejony 454–463, 496–515 oraz rejon 611–619 zaangażowany w wiązanie CD81 oraz wiele innych rejonów, pokrywających się częściowo lub w całości z wcześniej wspomnianymi sekwencjami (publikacje Tzarum N et al. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1315; „The Neutralizing Face of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein.”, Deng K et al. *PLoS ONE*, 2015, 10(9):e0138756; "Antibodies Targeting Novel Neutralizing Epitopes of Hepatitis C Virus Glycoprotein Preclude Genotype 2 Virus Infection." oraz Lavie M et al. *Journal of Virology*, 2014, 88(18):10584–10597; "Identification of Conserved Residues in Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 That Modulate Virus Dependence on CD81 and SRB1 Entry Factors").

W obrębie sekwencji glikoproteiny E1 opisany został natomiast rejon 314–324 zdolny do wzbudzenia przeciwciał neutralizujących rozpoznających większość genotypów wirusa HCV oraz częściowo nakładający się na niego rejon 313–327 (publikacje Meunier J-C et al. *Journal of Virology*, 2008, 82(2):966–973; "Isolation and Characterization of Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to the E1 Glycoprotein of Hepatitis C Virus." oraz Kong L et al. *Journal of molecular biology*, 2015, 427(16):2617–2628; "Structure of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 antigenic site 314–324 in complex with antibody IGH526.").

Epitopami HCV, których znane jest wykorzystanie jako pojedynczych sekwencji w szczepionkach przeciwko HCV i/lub HBV są rejony HVR1 oraz silnie konserwowany rejon 412–423.

W opisie wynalazku WO2002010416 oraz w publikacji Netter H. J. et al., *Journal of Virology*, 2000, 2130–2141; "Antigenicity and Immunogenicity of Novel Chimeric Hepatitis B Surface Antigen Particles with Exposed Hepatitis C Virus Epitopes." Ujawniono chimeryczną cząsteczkę wiruso-podobną opartą na małym białku powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B eksponującym sekwencję pochodzącą z wirusa HCV. Przedstawione w powyższych dokumentach konstrukty zawierały część lub całość rejonu hiper-zmiennego pierwszego (HVR1) glikoproteiny E2 wirusa HCV. Ponadto konstrukty z pełną sekwencją HVR1 zawierały dodatkowe sekwencje położone poniżej sekwencji rejonu HVR1, w tym część lub całość rejonu 412–425 glikoproteiny E2 wirusa HCV. Surowice otrzymane po szczepieniach zwierząt tymi konstrukcjami wykazywały się znaczną immunogennością, jednak ograniczoną zdolnością do wiązania glikoprotein E1E2 pochodzących z różnych genotypów wirusa HCV wynikającą prawdopodobnie z obecności rejonu HVR1 w chimerycznych cząsteczkach i w efekcie wzbudzania przeciwciał rozpoznających tylko bardzo ograniczone spektrum wariantów wirusa HCV (publikacje: Vietheer P.T.K. et al., *Antiviral Therapy*, 2007, 12(4): 477–487; "Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies." oraz Netter H. J. et al., *Vaccine*, 2003, 21: 2692–2697; "Immunogenicity of recombinant HBsAg/HCV particles in mice pre-immunised with hepatitis B virus-specific vaccine.").

W zgłoszeniu patentowym P.410950 oraz w publikacji Czarnota A. et al., *Microbial Cell Factories*, 2016, 15:62; "Immunogenicity of *Leishmania*-Derived Hepatitis B Small Surface Antigen Particles Exposing Highly Conserved E2 Epitope of Hepatitis C Virus." opisano chimeryczne cząsteczki sHBsAg eksponujące silnie konserwowany epitop 412–425 glikoproteiny E2 wirusa HCV. Przyjęta strategia dotyczyła silnie konserwowanego rejonu 412–425. Strategia szczepień oparta na pojedynczym epitopie 412–425 jest obciążona pewnym ryzykiem, gdyż istnieją warianty sekwencji 412–425 pozwalające na ucieczkę wirusa przed przeciwciałami neutralizującymi. Możliwość ucieczki jest spowodowana zdolnością rejonu 412–423 do przesunięcia miejsca N-glikozylacji z Ser417 lub Thr417 do Asn15, które skutecznie zapobiega wiązaniu neutralizujących przeciwciał rozpoznających epitop 412–423 (Li Y et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(16):10117–10125; Structural Basis for Penetration of the Glycan Shield of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein by a Broadly Neutralizing Human Antibody").

W związku z powyższym, wyselekcjonowanie właściwych epitopów glikoproteiny E2, które umożliwiłyby uzyskanie skutecznej odpowiedzi w postaci przeciwciał neutralizujących wszystkie warianty wirusa HCV jest bardzo skomplikowane.

Z proponowanych mechanizmów wzbudzania odpowiedzi przeciwko pojedynczym fragmentom białka jest ich ekspozycja na powierzchni cząsteczek wiruso-podobnych (ang. virus-like particles – VLP). Cząsteczki wiruso-podobne są małymi, wysoko immunogennymi strukturami tworzonymi z multimerów białek wirusowych. Dzięki multimerycznej, przestrzennej strukturze VLP spowodują agregację receptorów BCR (ang. B cell receptor) na powierzchni limfocytów B i w efekcie aktywują odpowiedź humoralną organizmu. Jednocześnie są zdolne do pobudzania odpowiedzi limfocytów T, zarówno pomocniczych jak i cytotoksycznych oraz komórek dendrytycznych. Ze względu na dobre właściwości immunogenne są one wykorzystywane w szczepionkach nowej generacji np. w dostępnej w Polsce od roku 2007 szczepionce przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (ang. Human Papilloma Virus – HPV) czy w szczepionce przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B (ang. Hepatitis B Virus – HBV).

Wirus zapalenia wątroby typu B posiada materiał genetyczny złożony z częściowo dwuniciowego DNA, które w czterech częściowo nachodzących na siebie ramkach odczytu koduje białka strukturalne i funkcjonalne wirusa. Wirion HBV ma około 42 nm średnicy i utworzony jest z rdzenia budowanego przez białko C. Rdzeń ten osłonięty jest osłonką białkowo-lipidową tworzoną przez antygen powierzchniowy wirusa HBV – HBsAg, występujący w trzech formach długiej, średniej krótkiej. Krótka forma tego białka – sHBsAg o długości około 226 aminokwasów ma ciekawe właściwości tworzenia cząsteczek wiruso-podobnych. Te małe struktury o średnicy około 22 nm pozbawione są wirulencji, jednakże są wysoko immunogenne i zdolne do wyzwalania silnej odpowiedzi immunologicznej. Struktura trzyczłonowa sHBsAg tworzy hydrofilowe pętle. Na jednej z tych pętli znajduje się silnie konserwowana determinanta „a” przeciwko której kierowana jest najsilniejsza odpowiedź immunologiczna. Ze względu na zdolność do tworzenia silnie immunogennych cząsteczek VLP oraz silnie konserwowaną i wyeksponowaną determinantę „a” białko sHBsAg jest wykorzystywane w dostępnych szczepionkach przeciwko wirusowi HBV. Szczepionki te zaprojektowane zostały przy wykorzystaniu techniki rekombinacji DNA i są produkowane w drożdżowym systemie ekspresji. System ten pozwala na uzyskanie prawidłowo sfałdowanego białka sHBsAg w dużej ilości i przy niskich kosztach. Białko to ulega ekspresji w wielu innych systemach, w tym w ssaczym, gdzie w przeciwieństwie do systemu drożdżowego jest prawidłowo glikozylowane i wyprowadzane do pożywki. Jednak ekspresja białek w komórkach ssaczych niesie ze sobą wysokie koszty produkcji.

Ze względu na silną immunogenność determinanty „a” białka HBsAg i jej zdolność do wzbudzania silnej odpowiedzi zarówno komórkowej jak i humoralnej jest ona często wykorzystywana jako potencjalny nośnik antygenów patogenów człowieka. W ciągu ostatnich lat badane były potencjalne szczepionki oparte na białku sHBsAg niosącym antygeny m. in. wirusa polio, ludzkiego wirusa niedoboru odporności (ang. human immuno-deficiency virus – HIV), zarodźca malarii oraz wirusa chikungunya.

Oprócz nośnika antygenów opartego na białku HBsAg do ekspozycji epitopów pochodzących z wirusa HCV można wykorzystać m.in. inne białka posiadające zdolność tworzenia cząsteczek wiruso-podobnych np. białko rdzenia wirusa zapalenia wątroby typu B (z ang. Hepatitis B core antygen – HBcAg) czy białka strukturalne flawiwirusów np. japońskiego zapalenia mózgu, (publikacje Sominskaya I et al. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010, 17(6):1027–1033; "Construction and Immunological Evaluation of Multivalent Hepatitis B Virus (HBV) Core Virus-Like Particles Carrying HBV and HCV Epitopes", oraz Saga R et al. *Scientific Reports*, 2016, 6:28688; "Bivalent vaccine platform based on Japanese encephalitis virus (JEV) elicits neutralizing antibodies against JEV and hepatitis C virus."

Oprócz tego krótkie peptydy mogą zostać chemicznie skoniugowane lub zamknięte w chemicznie otrzymanych nanostrukturach np. liposomach (Jiao X et al. *J Gen Virol*, 2004, 85: 1545–1553; "Enhanced hepatitis C virus NS3 specific Th1 immune responses induced by co-delivery of protein antigen and CpG with cationic liposomes.").

Dodatkowo epitopy mogą być podawane w formie pojedynczych peptydów lub peptydów w formie cyklicznej, jednak taka prezentacja immunogenów zwykle okazuje się skutkować słabą odpowiedzią układu odpornościowego szczepionych zwierząt (Sandomenico A et al. *Journal of Virology*, 2016, 90(7):3745–3759; "Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies against a Cyclic Variant of Hepatitis C Virus E2 Epitope 412–422.").

Celem wynalazku jest wyselekcjonowanie epitopów antygenowych HCV i opracowanie na ich podstawie białek chimericznych do zastosowania w leczeniu przewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV, które zdolne są do wzbudzania odpowiedzi immunologicznej w postaci przeciwciał neutralizujących wiele genotypów wirusa zapalenia wątroby typu C. Nieoczekiwanie okazało się, że przyjęcie odmiennej strategii od głównego nurtu badań nad szczepionką HCV – wykorzystania pełnej formy glikoproteiny powierzchniowej E2 zawierającej regiony hiper-zmienne pozwala na zaprojektowanie szczepionki, która

indukuje odpowiedź humoralną skierowaną przeciwko wielu genotypom i subtypom wirusa HCV. Ponadto nieoczekiwanie się okazało, że wykorzystanie kilku sekwencji antygenowych stwarza możliwość wykorzystania konstruktów, jako uniwersalnej szczepionki bez ryzyka ucieczki wirusa HCV poprzez wprowadzanie punktowej mutacji w pojedynczym epitopie.

Według wynalazku wykorzystuje się w opracowanej sekwencji białek chimerycznych wybrane sekwencje antygenowe oznaczona na sekwencjach Seq. 2 albo Seq. 3 albo Seq. 4 w kombinacji z Seq. 5 lub samą Seq. 5 (wszystkie wyeksponowane na powierzchni Seq. 1 (białka nośnikowego)).

Wynalazek dotyczy białek chimerycznych opartych na wybranych sekwencjach zawierających sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B oraz umiejscowione w określonym, dobranym miejscu sekwencje antygenowe według wynalazku pojedynczo lub w kompozycji. Białka chimeryczne przedstawiono na Seq. 6–14.

Wynalazek umożliwia jego zastosowanie w opracowaniu:

- szczepionki na bazie wytypowanych sekwencji antygenowych i/lub białek chimerycznych zapewnia wzbudzanie odpowiedzi immunologicznej w postaci przeciwciał skierowanych przeciwko HCV i/lub HBV,

- biwalentnej szczepionki do profilaktyki i/lub leczenia HBV i HCV, gdzie poprzez zastosowanie chroni i/lub hamuje zachorowalność powodowaną przez HBV i/lub HCV. Szczepionkę można stosować w celu prewencji/profilaktyki i/lub leczenia infekcji HBV i/lub HCV.

Wytypowane sekwencje antygenowe można wykorzystać w celu otrzymania czynnych biologicznie i immunogennych cząsteczek wiruso-podobnych złożonych z małego białka powierzchniowego wirusa HBV (HBsAg), które charakteryzują się: wysoką immunogennością, wzbudzaniem humoralnej odpowiedzi immunologicznej.

Wykorzystuje się sekwencje 412–425 albo 434–446 albo 502–520 w połączeniu z 523–535 albo samej sekwencji 523–535. Wbudowane w dużą pętlę hydrofilową białka HBsAg regiony 412–425, 434–446, 502–520, 523–535 z glikoproteiny E2 wirusa HCV – pojedynczo jak i w kompozycji kilku sekwencji, które charakteryzują się: małą zmiennością pomiędzy genotypami wirusa HCV, obecnością miejsca wiązania dla przeciwciał neutralizujących wirusa.

W wynalazku używa się terminy zwłaszcza zdefiniowane następująco:

białko fuzyjne – oznacza to samo co białko chimeryczne;

biwalentna szczepionka – oznacza szczepionkę wzbudzającą odpowiedź immunologiczną przeciwko dwóm różnym patogenom (lub dwóm różnym serotypom patogenów). W tym przypadku oznacza szczepionkę wzbudzającą odpowiedź immunologiczną zarówno przeciwko wirusowi HBV i/lub HCV; białka chimeryczne – oznacza białka pokazane na Seq. 6–14, uzyskane w wyniku ekspresji genów rekombinowanych, powstałych w wyniku połączenia dwóch lub większej ilości genów/sekwencji, które wyjściowo kodowały różne białka. W wynalazku oznaczają połączenie krótkiej formy antygeny powierzchniowego wirusa HBV (HBsAg) przedstawionego na Seq. 1 oraz regionów glikoproteiny E2 wirusa HCV przedstawionych na Seq. 2 i/lub Seq. 3 i/lub Seq. 4 i/lub Seq. 5 i/lub, ich wybranych według wynalazku kombinacji, w ten sposób, że te sekwencje lub ich kombinacje znajdują się wewnątrz dużej, hydrofilowej pętli białka HBsAg przedstawionego na Seq. 1;

duża hydrofilowa pętla białka HBsAg – oznacza wysoko immunogenny region małego białka powierzchniowego HBsAg, znajdujący się w pozycji 99–170 białka przedstawionego na Seq. 1 (Genbank accession number – AF397207.1);

białko HBsAg – małe białko powierzchniowe subtypu adw wirusa HBV o długości 226 aminokwasów, opisywane także jako sHBsAg lub forma S białka HBsAg. Sekwencja białka przedstawiona na Seq. 1;

rejon 412–425 – oznacza wybrany według wynalazku rejon znajdujący się w pozycji od 412 do 425 sekwencji aminokwasowej glikoproteiny E2 wirusa HCV izolatu H77 (Genbank accession number – AF011751.1) przedstawionej na Seq. 2. Region ten zawiera konserwowaną sekwencję rozpoznawaną przez przeciwciała neutralizujące o szerokim spektrum działania, które zdolne są do wiązania się z glikoproteina E2 pochodzącą z różnych genotypów HCV;

rejon 434–446 – oznacza wybrany rejon znajdujący się w pozycji 434 do 446 sekwencji aminokwasowej glikoproteiny E2 wirusa HCV izolatu H77 (Genbank accession number – AF011751.1) przedstawiony na wzorze sekwencji Seq. 3. Region ten zawiera konserwowaną sekwencję rozpoznawaną przez przeciwciała neutralizujące o szerokim spektrum działania, które zdolne są do wiązania się z glikoproteina E2 pochodzącą z różnych genotypów HCV;

rejon 502–520 – oznacza rejon o sekwencji aminokwasowej przedstawionej na Seq. 4. Jest to zmodyfikowany rejon znajdujący się w pozycji od 502 do 520 sekwencji aminokwasowej glikoproteiny E2 wirusa HCV izolatu H77 (Gen bank accession numer – AF011751.1) o sekwencji aminokwasowej przedstawionej na Seq. 15 w którym sekwencje kodujące cysteiny w pozycjach 503 oraz 508 zostały zamienione na sekwencje kodujące alaniny. Region ten zawiera konserwowaną sekwencję rozpoznawaną przez przeciwciała neutralizujące o szerokim spektrum działania, które zdolne są do wiązania się z glikoproteiną E2 pochodzącą z różnych genotypów HCV; rejon 523–535 – oznacza wybrany rejon znajdujący się w pozycji 523 do 535 sekwencji aminokwasowej glikoproteiny E2 wirusa HCV izolatu H77 (Gen bank accession numer – AF011751.1) o przedstawionej na Seq. 5. Region ten zawiera konserwowaną sekwencję rozpoznawaną przez przeciwciała neutralizujące o szerokim spektrum działania, które zdolne są do wiązania się z glikoproteiną E2 pochodzącą z różnych genotypów HCV;

subtyp adw wirusa HBV – oznacza wariant wirusa HBV posiadający determinanty „a”, „d” oraz „w”. Wirus HBV posiada trzy determinanty, z których determinanta „a” jest uniwersalna i wspólna dla wszystkich subtypów. Regiony flankujące determinantę „a” nazywane są determinantami d/y oraz w/r. Ze względu na rodzaj aminokwasu w pozycji 122 dla determinanty d/y oraz 160 dla determinanty w/r każdy izolat wirusa HBV można przypisać do danego subtypu.

Wynalazek przedstawiono na rysunku i w przykładach wykonania.

Fig. 1 (A, B, C) – przedstawia schematy chimericznych konstruktów Seq. 6 do Seq. 14 użytych w poniższym badaniu. W przypadku konstruktów niosących dwa rejony pochodzące z glikoproteiny E2 osłonki wirusa HCV pierwszy został umieszczony w pozycji I110/S117(Δ 111-116) a drugi w pozycji P127/A128 małego białka powierzchniowego wirusa HBV (HBsAg) w obrębie dużej, hydrofilowej pętli białka HBsAg przedstawionego na Seq. 1.

Fig. 2 – przedstawia wyniki testu Western Blot. Białka Seq. 1, Seq. 6, Seq. 7 oraz Seq. 8 zostały rozdzielone na żelu SDS-PAGE w warunkach redukujących, przeniesione na membranę PVDF a następnie były wykrywane przeciwciałami anti-HBsAg. Marker masy cząsteczkowej w kDa umieszczono po lewej stronie żelu.

Fig. 3 – przedstawia przykładowe zdjęcia cząstek wiruso-podobnych Seq. 6 oglądanych w mikroskopie elektronowym. W eksperymencie zastosowano barwienie negatywowe octanem uranylu. Czarne strzałki wskazują pojedynczą cząsteczkę wiruso-podobną złożoną z chimericznego białka. Czarna linia = 50 nm.

Fig. 4 – przedstawia badanie zdolności surowic do specyficznego rozpoznawania epitopów pochodzących z glikoproteiny E2 wirusa HCV. Wcześniej zsyntetyzowane peptydy Seq. 3, Seq. 4 oraz Seq. 5 skoniugowane z biotyną naniesiono na płytkę 96-dołkową opłaszczoną streptawidyną. Peptydy nanoszono w ilości 1 μ g/studzienkę. Peptydy wykrywano surowicami w rozcieńczeniach 250, 10^3 , $5 \cdot 10^3$, 10^4 , $5 \cdot 10^4$.

Fig. 5 – przedstawia badanie zdolności surowic myszy szczepionych chimerycznymi białkami przedstawionymi na Seq. 6, Seq. 7, Seq. 8 oraz Seq. 1 do specyficznego rozpoznawania białka HBsAg. Oczyszczone białko HBsAg uzyskane w systemie drożdżowym (yHBsAg) naniesiono na płytkę 96 dołkową w ilości 0,5 μ g/studzienkę. Białko wykrywano surowicami w rozcieńczeniach 10^3 , $5 \cdot 10^5$, 10^4 , $2,5 \cdot 10^4$, 10^5 , $1,25 \cdot 10^5$.

Poszczególne sekwencje według wynalazku przedstawiono odrębnie zgodnie z akceptowanymi wymogami.

Przykład 1

Uzyskanie ekspresji wybranych białek przedstawionych na Seq. 6, Seq. 7, Seq. 8 w komórkach pierwotniaka *Leishmania tarentolae* i oczyszczenie cząstek wiruso-podobnych poprzez ultrawirowanie na gradiencie.

Opis uzyskiwania ekspresji opisany w przykładzie 1, dla osoby w stanie techniki można zastosować analogicznie dla innych sekwencji według wynalazku.

Ekspresja

Geny kodujące białka przedstawione na Seq. 6, Seq. 7 oraz Seq. 8 (Fig. 1) zostały zsyntetyzowane (Life Technologies Inc. USA) w oparciu o sekwencję z bazy danych (sekwencja białka HBsAg – GenBank accession number – AF397207.1 sekwencja glikoproteiny E2 wirusa HCV – GenBank accession numer – AF011751.1), w pozycję odpowiadającą dużej, hydrofilowej pętli białka HBsAg przedstawionego na Seq. 1 wprowadzono sekwencję lub kombinację sekwencji rejonów przedstawionych na Seq. 3, Seq. 4 oraz Seq. 5. Jako kontrola używany był konstrukt kodujący naturalnie występujące białko HBsAg przedstawiony na Seq. 1. Następnie przy użyciu miejsc restrykcyjnych BglII oraz NotI zsyntetyzowane fragmenty

zostały wklonowane do plazmidu pLEXSY_I-blecherry3 (Jena Bioscience GmbH, Germany) pod kontrolę promotora T7 z operatorem tetracyklinowym. Poprawność wprowadzenia insertów potwierdzono sekwencjonowaniem. Tak przygotowane wektory ekspresyjne zostały użyte do elektroporacji komórek *L. tarentolae*. Elektroporację, selekcję poliklonalną, hodowlę komórek oraz indukcję ekspresji chimerycznych białek przeprowadzano wg. procedury dla systemu Lexsy (Jena Bioscience GmbH, Germany).

Liza i formowanie cząsteczek wiruso-podobnych

Indukowane hodowle (OD₆₀₀~4.5) były wirowane (4500 rpm, 10 min). Osady komórek z 50 ml hodowli były przemywane buforem PBS a następnie lizowane w 5 ml buforu (0,6% Tween 20 w PBS) oraz sonifikowane. Następnie całość lizatu wirowano (8500 rpm, 30 min.). Po wirowaniu zebrano supernatant, który inkubowano w temperaturze pokojowej przez (12–48 h). W celu potwierdzenia ekspresji chimerycznych białek przedstawionych na Seq. 6, Seq. 7 oraz Seq. 8, przeprowadzono analizę metodą Western Blot z użyciem specyficznych przeciwciał anti-HBsAg (OriGene Technologies) (Fig. 2). Uzyskane wyniki potwierdzają prawidłową ekspresję wszystkich zaprojektowanych wariantów. Wszystkie konstrukty posiadają spodziewaną masę molekularną (około 27 kDa) oraz są prawidłowo rozpoznawane przez przeciwciała skierowane przeciwko małemu białku powierzchniowemu wirusa HBV (sHBsAg).

Oczyszczanie

W celu oczyszczenia chimerycznych cząstek przygotowano gradient OptiPrep (AxisShield) w PBS z frakcjami od 6% do 30%, na który nanoszono po 3,5 ml otrzymanych lizatów komórkowych. Całość wirowano (28000 rpm, 4°C, 16 h). Wszystkie powstałe na gradiencie frakcje zostały zbadane na obecność chimerycznych cząsteczek metodą Western Blot z użyciem przeciwciał anti-HBsAg (Origene Technologies). Frakcje zawierające najwięcej poszukiwanego białka były zbierane i zagęszczane przy pomocy filtrów do wirowania Amicon 30 NMLW (Millipore Inc. USA). Do pomiaru stężenia białka w przygotowanych preparatach zastosowano metodę Bradforda (A=595 nm). Oszacowano, że ilość białka wynosi około 8 mg/l hodowli. Tak oczyszczony preparat przechowywano w 4°C. Powyższe procedury pozwoliły na efektywne, jednoetapowe oczyszczenie chimerycznych cząstek wiruso-podobnych opartych na chimerycznych białkach przedstawionych na Seq. 6, Seq. 7 oraz Seq. 8.

Mikroskopia elektronowa

W celu potwierdzenia obecności cząstek wiruso-podobnych 10 µl próbek zawierających białka przedstawione na Seq. 6, Seq. 7 oraz Seq. 8 nanoszono na niklowe siatki pokryte błoną węglową i barwiono octanem uranylu. Preparaty oglądano z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego (Fig. 3). Wyniki z mikroskopii elektronowej potwierdziły obecność chimerycznych cząsteczek wiruso-podobnych o średnicy ~ 25 nm, co jest zgodne z danymi literaturowymi.

Opisane wyżej procedury zostały przeprowadzone dla konstruktów Seq. 6 posiadającego pojedynczy epitop pochodzący z wirusa HCV zlokalizowany w pozycji 128 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1 oraz dla konstruktów Seq. 7 i Seq. 8, które posiadają dwa epitopy pochodzące z wirusa HCV zlokalizowane w pozycjach 111 oraz 128 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1. W związku z tym analogicznie – dla osoby w stanie techniki w oczywisty sposób na podstawie opisu powyższego – skonstruowano, poddano ekspresji, oczyszczono i scharakteryzowano inny opisany przez nas konstrukt zawierający pojedynczy epitop (Seq. 5) w pozycji 111 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1 tzn. konstrukt przedstawiony na Seq. 9. oraz konstrukty zawierające dwa epitopy (Seq. 2, Seq. 3, Seq. 4, Seq. 5) w pozycjach 111 oraz 128 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1 tzn. konstrukty przedstawione na Seq. 10–14.

Przykład 2

Potwierdzenie skuteczności chimerycznych cząsteczek wiruso-podobnych eksponujących sekwencje antygenowe wirusa HCV, jako immunogenu wzbudzającego odpowiedź humoralną skierowaną przeciwko specyficznym fragmentom glikoproteiny E2 wirusa HCV oraz małemu białku powierzchniowemu wirusa HBV.

Szczepienie myszy

W celu zbadania immunogenności cząstek wiruso-podobnych do szczepień zastosowano model myszy. Oczyszczone antygeny oparte na chimerycznych białkach przedstawionych na Seq. 6, Seq. 7, Seq. 8 oraz kontrolny konstrukt przedstawiony na Seq. 1 zostały zawieszone w PBS oraz zmieszane w stosunku 1:1 z adiuwantem (Addavax; Invivogen, USA) bezpośrednio przed szczepieniem. Dla każdego chimerycznego konstruktów grupa w postaci sześciu myszy BALB/c została zaszczepiona podskórnie mieszaniną antygen/adjuwant w dawce 15 µg/mysz. Grupa kontrolna złożona z trzech myszy BALB/c została zaszczepiona mieszaniną PBS/adjuwant. W dniu 14 i 28 od pierwszego szczepienia myszy zostały doszczepione mniejszą ilością tego samego antygeny w dawce 10 µg/mysz, natomiast

grupie kontrolnej podano mieszaninę PBS/adiuwant. W dniu 42 wszystkie myszy zostały skrwawione, a z zebranych próbek wyizolowano surowice.

ELISA z wykorzystaniem peptydów oraz białka yHBsAg

W otrzymanych surowicach oznaczono miano przeciwciał skierowanych przeciwko konserwowanym rejonom glikoproteiny E2 wirusa HCV przedstawionych na Seq. 3, Seq. 4 oraz Seq. 5 wykorzystując syntetyczne peptydy skoniugowane ze streptawidyną. Dla peptydu Seq. 5 surowice myszy zaszczepionych konstruktem Seq. 6 lub Seq. 7 lub Seq. 8 osiągnęły takie samo miano na poziomie 10^4 . Dodatkowo, surowice z myszy zaszczepionych konstruktem Seq. 7 wykazywały się wysokim poziomem przeciwciał skierowanych przeciwko peptydowi Seq. 4 (miano 10^3) a surowice z myszy zaszczepionych konstruktem Seq. 8 wykrywały peptyd Seq. 3 osiągając miano $5 \cdot 10^3$. (Fig. 4).

Przeprowadzono także analizę surowic pod kątem obecności przeciwciał skierowanych specyficznie przeciwko białku HBsAg. W tym celu płytki 96-dołkowe zostały opłaszczane zakupionym białkiem HBsAg pochodzącym z drożdżowego systemu ekspresji (yHBsAg). Wszystkie konstrukty uzyskały pozytywny sygnał dla białka yHBsAg. Jednakże w surowicach myszy szczepionych konstruktem Seq. 6 zaobserwowano podobnie silną odpowiedź przeciwciał skierowanych przeciwko białku yHBsAg jak w surowicach myszy szczepionych konstruktem kontrolnym przedstawionym na Seq. 1 (Fig. 5).

We wszystkich eksperymentach, jako wynik negatywny przyjęto wartości ($n < 0,15$), gdzie 0,15 stanowi trzykrotność wartości kontroli negatywnej ($A_{450} \sim 0,05$). Wyniki immunizacji potwierdzają silną odpowiedź immunologiczną w postaci przeciwciał skierowanych przeciwko konserwowanym rejonom glikoproteiny E2 wirusa HCV, co potwierdza użyteczność wszystkich opisanych chimericznych cząsteczek wiruso-podobnych jako szczepionki przeciwko wirusowi HCV. Jednakże warto zauważyć, że konstrukty zawierające dwie sekwencje antygenowe (przedstawione na Seq. 7, oraz Seq. 8) wzbudzają odpowiedź przeciwciał skierowaną przeciwko obydwóm wyeksponowanym epitopom HCV. W związku z tym mogą zapobiegać mechanizmowi ucieczki wirusa HCV przed układem immunologicznym polegającego na wprowadzeniu mutacji w obrębie jednej z sekwencji antygenowych (przedstawionych na Seq. 2 – Seq. 5). Co więcej wszystkie konstrukty wzbudziły odpowiedź humoralną skierowaną przeciwko białku HBsAg, co stwarza możliwość do wykorzystania tych konstruktyw jako potencjalnej biwalentnej szczepionki przeciwko wirusom HBV oraz HCV.

W tym przykładzie pokazano, że konstrukty Seq. 6 posiadający pojedynczy epitop pochodzący z wirusa HCV zlokalizowany w pozycji 128 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1 jest w stanie wzbudzić specyficzną odpowiedź przeciwciał skierowanych zarówno przeciwko specyficznym epitopom glikoproteiny E2 jak i białku HBsAg. Analogiczną odpowiedź przeciwciał otrzymano dla innego konstruktu zawierającego pojedynczy epitop Seq. 5 w pozycji 111 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1 tzn. dla konstruktu Seq. 9.

W powyższym przykładzie opisano także przebieg szczepień i otrzymaną odpowiedź immunologiczną dla konstruktyw zawierających dwa epitopy pochodzące z wirusa HCV, zlokalizowane w pozycjach 111 oraz 128 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1. – Seq. 7 oraz Seq. 8. Wykazano, że wszystkie te konstrukty są w stanie wzbudzić specyficzną odpowiedź przeciwciał skierowanych zarówno przeciwko specyficznym epitopom glikoproteiny E2 oraz przeciwko białku HBsAg.

Analogiczne wyniki otrzymano dla opisanych w wynalazku konstruktyw zawierające dwa epitopy (Seq. 2, Seq. 3, Seq. 4, Seq. 5) w pozycjach 111 oraz 128 białka sHBsAg przedstawionego na Seq. 1 tzn. dla konstruktyw przedstawionych na Seq. 10–14.

Dodatkowo wykazano, że wykorzystanie dwóch sekwencji antygenowych pochodzących z wirusa HCV pozwala na uniknięcie mechanizmu ucieczki wirusa przed układem immunologicznym poprzez wprowadzenie mutacji w obrębie jednej z sekwencji antygenowych przedstawionych na Seq. 2 – Seq. 5. Zastosowanie kompozycji według wynalazku stanowi zatem korzystny wariant według wynalazku.

SEQUENCE LISTING

<110> Uniwersytet Gdanski

<120> Kompozycje sekwencji antygenowych wirusa HCV do zastosowania w leczeniu przewencyjnym zakażenia wirusem HCV i/lub HBV chimeryczne czasteczki wiruso-podobne eksponujące sekwencje antygenowe wirusa HCV, szczepionka przeciwko wirusowi HCV i/lub HBV oparta na chimerycznych czasteczkach wiruso-podobnych.

<130> sHBsAg VLPs

<160> 29

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 226

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus subtype adw2

<220>

<223> sHBsAg

<400> 1

Met	Glu	Asn	Ile	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln	1	5	10	15
Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	20	25	30	
Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Val	Cys	35	40	45	
Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Gln	Ile	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Thr	Cys	50	55	60	
Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe	65	70	75	80
Ile	Ile	Phe	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val	85	90	95	
Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Pro	Gly	100	105	110	
Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	115	120	125	
Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	130	135	140	
Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Ala	Lys	145	150	155	160
Tyr	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	165	170	175	
Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu	180	185	190	
Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	195	200	205	
Leu	Ser	Pro	Phe	Met	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val	210	215	220	

Tyr Ile
225

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<220>
<223> 412-425

<400> 2
Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr
1 5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<220>
<223> 434-446

<400> 3
Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys
1 5 10

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 502-520

<400> 4
Val Ala Gly Pro Val Tyr Ala Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly
1 5 10 15
Thr Thr Asp

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<220>
<223> 523-535

<400> 5

Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp
 1 5 10

<210> 6
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sHBsAg_523-535

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 128..140
 <223> Seq. 5

<400> 6
 Met Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Lys Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30
 Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys
 35 40 45
 Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys
 50 55 60
 Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80
 Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
 100 105 110
 Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Gly
 115 120 125
 Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Ala Gln Gly Thr
 130 135 140
 Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys
 145 150 155 160
 Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp
 165 170 175
 Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe
 180 185 190
 Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile
 195 200 205
 Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro
 210 215 220
 Phe Met Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 225 230 235

<210> 7
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sHBsAg_434-446_523-535

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 111..123
 <223> Seq. 3

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> 135..147
 <223> Seq. 5

<400> 7
 Met Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Lys Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
 20 25 30
 Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys
 35 40 45
 Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys
 50 55 60
 Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
 65 70 75 80
 Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
 85 90 95
 Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Asn Thr
 100 105 110
 Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Ser Thr Gly Pro Cys
 115 120 125
 Lys Thr Cys Thr Thr Pro Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn
 130 135 140
 Asp Thr Asp Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr
 145 150 155 160
 Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
 165 170 175
 Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
 180 185 190
 Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro
 195 200 205
 Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser
 210 215 220
 Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe
 225 230 235 240
 Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 245

<210> 8
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sHBsAg_523-535

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 111..123

<223> Seq. 5

<400> 9

Met	Glu	Asn	Ile	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln
1				5					10					15	
Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
			20					25					30		
Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Val	Cys
		35					40					45			
Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Gln	Ile	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Thr	Cys
	50					55					60				
Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe
65				70						75					80
Ile	Ile	Phe	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val
			85						90					95	
Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Gly	Ala
			100					105					110		
Pro	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Ala	Asn	Asp	Thr	Asp	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys
		115					120					125			
Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys
	130					135					140				
Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro
145				150						155					160
Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Ala	Lys	Tyr	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg
			165						170					175	
Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly
			180					185					190		
Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp
		195				200						205			
Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	Pro	Phe	Met	Pro	Leu	Leu	Pro
	210					215					220				
Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile							
225						230									

<210> 10

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sHBsAg_412-425_523-535

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 111..124

<223> Seq. 2

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 136..148

<223> Seq. 5

<400> 10

```

Met Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1          5          10          15
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Lys Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
          20          25          30
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys
          35          40          45
Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys
          50          55          60
Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65          70          75          80
Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
          85          90          95
Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Gln Leu
          100          105          110
Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ser Thr Gly Pro
          115          120          125
Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala
          130          135          140
Asn Asp Thr Asp Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys
145          150          155          160
Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser
          165          170          175
Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser
          180          185          190
Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser
          195          200          205
Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro
          210          215          220
Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu Pro Ile Phe
225          230          235          240
Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
          245

```

<210> 11

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sHBsAg_523-535_502-520

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 111..123

<223> Seq. 5

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 135..153

<223> Seq. 4

<400> 11

Met	Glu	Asn	Ile	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln
1				5					10					15	
Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
			20				25						30		
Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Val	Cys
		35				40					45				
Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Gln	Ile	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Thr	Cys
	50				55					60					
Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe
65				70					75						80
Ile	Ile	Phe	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val
			85					90					95		
Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Gly	Ala
		100					105					110			
Pro	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Ala	Asn	Asp	Thr	Asp	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys
		115				120						125			
Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Val	Tyr	Ala	Phe	Thr	Pro
	130					135					140				
Ser	Pro	Val	Val	Val	Gly	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Phe
145				150					155						160
Pro	Ser	Cys	Cys	Cys	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile
			165					170					175		
Pro	Ile	Pro	Ser	Ser	Trp	Ala	Phe	Ala	Lys	Tyr	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala
		180				185						190			
Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp
	195					200						205			
Phe	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met
	210				215					220					
Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	Pro	Phe	Met	Pro
225				230						235					240
Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile				
			245						250						

<210> 12

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sHBsAg_523-535_412-425

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 111..123

<223> Seq. 5

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 135..148

<223> Seq. 2

<400> 12

Met	Glu	Asn	Ile	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Gln
1				5					10					15	
Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Ile	Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu
			20					25					30		
Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	Val	Cys
		35					40					45			
Leu	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Gln	Ile	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Thr	Cys
	50					55					60				
Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg	Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe
65				70					75						80
Ile	Ile	Phe	Leu	Cys	Ile	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Leu	Leu	Val
			85						90					95	
Leu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Gly	Met	Leu	Pro	Val	Cys	Pro	Leu	Ile	Gly	Ala
			100					105					110		
Pro	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Ala	Asn	Asp	Thr	Asp	Ser	Thr	Gly	Pro	Cys
		115					120					125			
Lys	Thr	Cys	Thr	Thr	Pro	Gln	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	His
	130					135					140				
Ile	Asn	Ser	Thr	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Phe	Pro	Ser	Cys	Cys	Cys
145				150					155					160	
Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Pro	Ile	Pro	Ser	Ser
				165					170					175	
Trp	Ala	Phe	Ala	Lys	Tyr	Leu	Trp	Glu	Trp	Ala	Ser	Val	Arg	Phe	Ser
			180					185					190		
Trp	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Val	Gln	Trp	Phe	Val	Gly	Leu	Ser
	195						200					205			
Pro	Thr	Val	Trp	Leu	Ser	Val	Ile	Trp	Met	Met	Trp	Tyr	Trp	Gly	Pro
	210					215					220				
Ser	Leu	Tyr	Asn	Ile	Leu	Ser	Pro	Phe	Met	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe
225				230						235					240
Phe	Cys	Leu	Trp	Val	Tyr	Ile									
				245											

<210> 13

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sHBsAg_523-535_434-446

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 111..123

<223> Seq. 5

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 135..147

<223> Seq. 3

<400> 13

```

Met Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1      5      10      15
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Lys Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20      25      30
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys
35      40      45
Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys
50      55      60
Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65      70      75      80
Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85      90      95
Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Gly Ala
100     105     110
Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Ser Thr Gly Pro Cys
115     120     125
Lys Thr Cys Thr Thr Pro Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr
130     135     140
Gln His Lys Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr
145     150     155     160
Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
165     170     175
Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
180     185     190
Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro
195     200     205
Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser
210     215     220
Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe
225     230     235     240
Cys Leu Trp Val Tyr Ile
245

```

<210> 14

<211> 246

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> sHBsAg_523-535_523-535

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 111..123

<223> Seq. 5

<220>

<221> PEPTIDE

<222> 135..147

<223> Seq. 5

<400> 14

```

Met Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1          5          10          15
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Lys Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
          20          25          30
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Pro Val Cys
          35          40          45
Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Gln Ile Ser Ser His Ser Pro Thr Cys
          50          55          60
Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65          70          75          80
Ile Ile Phe Leu Cys Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
          85          90          95
Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Gly Ala
          100          105          110
Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Ser Thr Gly Pro Cys
          115          120          125
Lys Thr Cys Thr Thr Pro Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn
          130          135          140
Asp Thr Asp Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr
145          150          155          160
Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
          165          170          175
Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
          180          185          190
Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro
          195          200          205
Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser
          210          215          220
Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Met Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe
225          230          235          240
Cys Leu Trp Val Tyr Ile
          245

```

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> 502-520

<400> 15

```

Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Gly
1          5          10          15
Thr Thr Asp

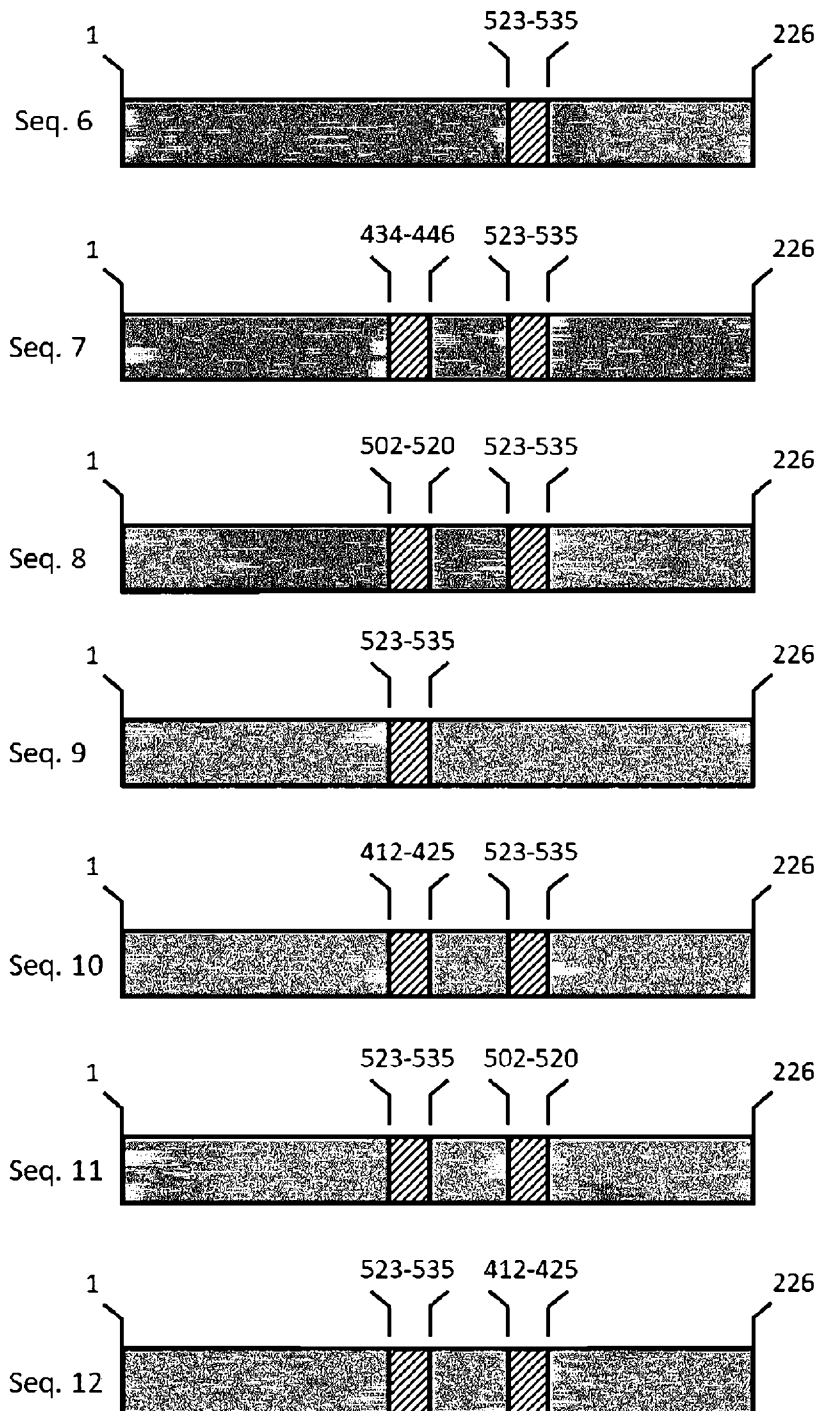
```

Zastrzeżenia patentowe

1. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 6 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
2. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 7 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1, sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 3 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
3. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 8 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1, sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 4 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
4. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 9 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
5. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 10 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1, sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 2 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
6. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 11 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1, sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 4 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
7. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 12 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1, sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 2 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
8. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 13 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1, sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 3 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.
9. Białko chimeryczne przedstawione na Seq. 14 zawierające sekwencję małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B o sekwencji przedstawionej na Seq. 1, sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 oraz sekwencję antygenową przedstawioną na Seq. 5 do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia HCV i/lub HBV.

Rysunki

Fig. 1A



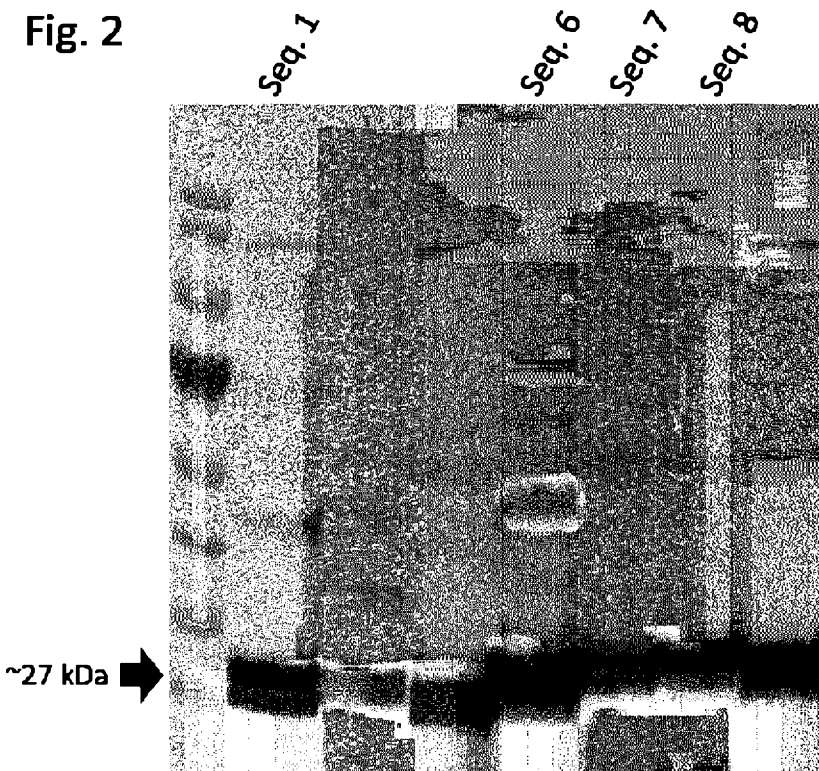
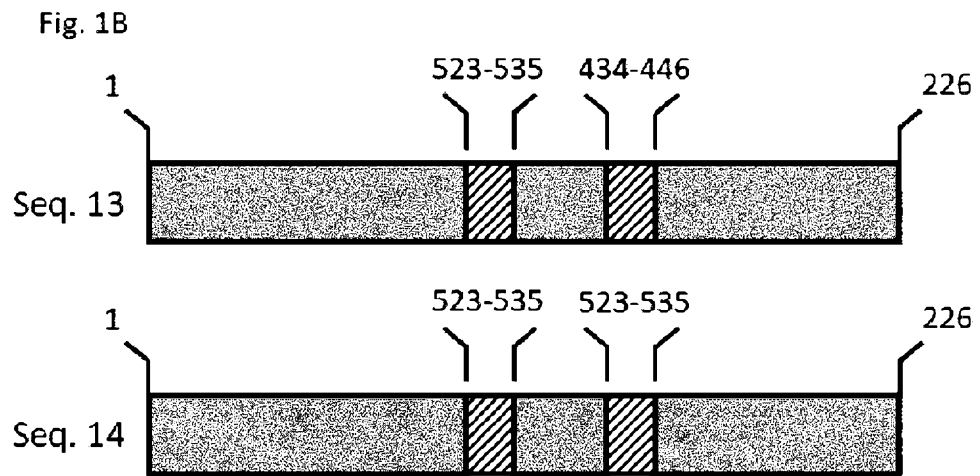


Fig. 3



Seq. 6

Fig. 4.

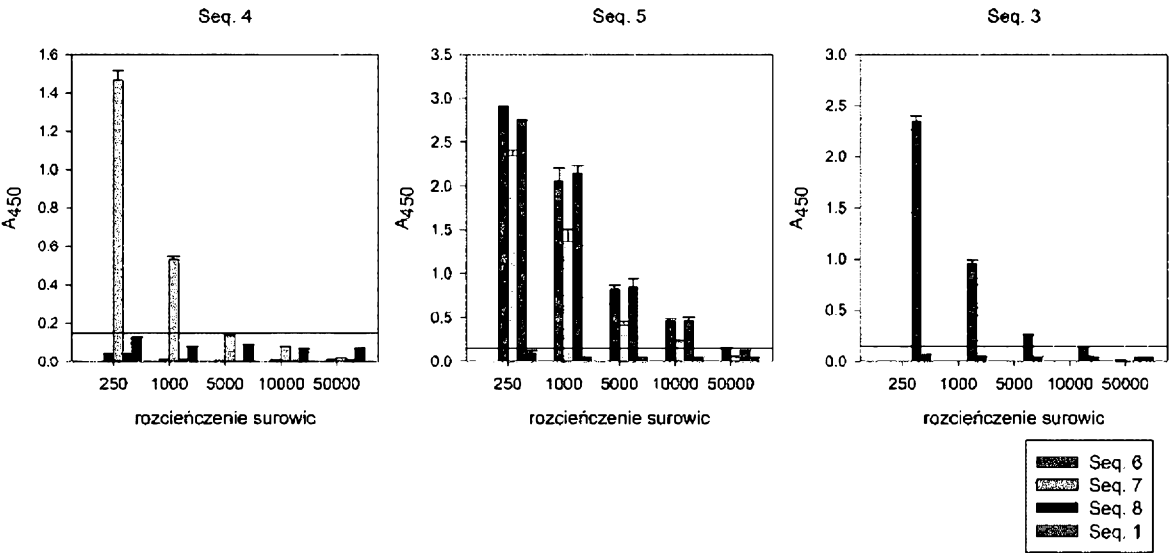


Fig. 5

