



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118576699 A

(43) 申请公布日 2024.09.03

(21) 申请号 202410387306.0

C12N 15/863 (2006.01)

(22) 申请日 2018.04.10

C12N 15/62 (2006.01)

(30) 优先权数据

1705765 4 2017 04 10 GB

ASTR 555 (2006.01)

(62) 分案原由及数据

A61P 37/04 (2006.01)

201880028408.6 2018.04.10

(7) 申请人 天津大学创新有限公司
地址 英国牛津

地址 英国牛津

(72)发明人 E·巴恩斯 S·钦纳坎南

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

专利代理人 杨黎峰 王奕勋

(51) Int.Cl.

A61K 39/29 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

权利要求书3页 说明书34页

序列表（电子公布） 附图28页

(54) 发明名称

HBV疫苗

(57) 摘要

本发明涉及一种多HBV免疫原病毒载体疫苗,其包含:包含免疫原表达盒的病毒载体,其中由表达盒编码的蛋白的表达设置为由启动子驱动,其中所述免疫原表达盒编码:a) HBV核心;b)修饰的HBV聚合酶(P_{mut}),其中所述修饰是对野生型HBV聚合酶的突变以基本上除去聚合酶功能;c) HBV表面抗原(HbsAg);和d)基因间序列,其设置为导致至少HBV表面抗原(HbsAg)表达为与HBV核心和修饰的HBV聚合酶(P_{mut})分离的蛋白,其中所述基因间序列在编码HBV核心和修饰的HBV聚合酶(P_{mut})的序列的下游(3')和编码HBV表面抗原(HbsAg)的序列的上游(5');并且涉及相关的组合物,接种疫苗方法以及治疗或预防HBV感染的方法。



1. 一种多HBV免疫原病毒载体疫苗,其包含:

包含免疫原表达盒的病毒载体,其中,由所述表达盒编码的蛋白的表达设置为由启动子驱动,其中,所述免疫原表达盒编码:

a) HBV核心;

b) 修饰的HBV聚合酶(P_{mut}),其中,所述修饰是对野生型HBV聚合酶的突变以基本上除去聚合酶功能;

c) HBV表面抗原(HbsAg);和

d) 基因间序列,其设置为导致至少所述HBV表面抗原(HbsAg)表达为与所述HBV核心和所述修饰的HBV聚合酶(P_{mut})分离的蛋白,

其中,所述基因间序列在编码所述HBV核心和所述修饰的HBV聚合酶(P_{mut})的序列的下游(3')和编码所述HBV表面抗原(HbsAg)的序列的上游(5')。

2. 根据权利要求1所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述基因间序列包含切割结构域、IRES(内部核糖体进入位点)、剪接信号或次级启动子;或者其中,所述基因间序列包含切割结构域;

任选地其中,所述切割结构域包含核糖体跳跃切割结构域;

进一步任选地其中,所述切割结构域包含弗林蛋白酶2A(F2A)肽序列或其功能性变体、或由其组成;或者其中,所述基因间序列包含促进至少所述表面抗原(HbsAg)表达的次级启动子。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒进一步编码HBV前核心(PreC);和/或其中,所述免疫原表达盒进一步编码HBV PreS1和/或其截短形式。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒进一步编码HBV PreS2。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒编码HBV前核心(PreC)和HBV PreS1以及截短形式的PreS1。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒能够表达HBV e-抗原。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述HBV核心和修饰的聚合酶(P_{mut})设置成表达为融合蛋白。

8. 根据权利要求3-7所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述HBV前核心、HBV核心和修饰的聚合酶(P_{mut})设置成表达为融合蛋白。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒不编码HBV X蛋白。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒包含具有以下序列的核酸:

SEQ ID NO:46 (SII-HBV-CPmutS) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:46具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;

SEQ ID NO:48 (SII-HBV-CPmutPreS-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:48具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;

SEQ ID NO:49 (SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:49具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;

SEQ ID NO:24 (MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:24具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;或者

SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:58 (MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:58具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;和/或其中,所述病毒载体编码以下氨基酸序列:

SEQ ID NO:3 (SII-HBV-CPmutS) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:3具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;

SEQ ID NO:13 (SII-HBV-CPmutPreS-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:13具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;

SEQ ID NO:25 (SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:25具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;

SEQ ID NO:23 (MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:23具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性;

SEQ ID NO:26 (MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)) 或其变体,所述变体与SEQ ID NO:26具有至少95%、98%、99%或99.5%序列同一性。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述病毒载体包含腺病毒载体或修饰的安卡拉痘苗 (MVA) 载体;或者其中,所述病毒载体包含E组猿猴腺病毒载体。

12. 根据前述权利要求中任意一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述启动子编码在所述免疫原表达盒中;或者

其中,将所述启动子可以编码为所述免疫原表达盒外部的病毒载体核酸的一部分;和/或其中,所述启动子包括CMV启动子或痘病毒启动子。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述启动子促进所述免疫原表达盒的全部编码蛋白的表达。

14. 根据权利要求1-12所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒包含次级启动子,其中所述启动子是初级启动子,其设置为促进至少所述HBV核心和修饰的聚合酶 (Pmut) 的表达,并且不促进设置为由所述次级启动子单独促进的所述HBV表面抗原 (HbsAg) 的表达;和/或其中,所述启动子包含CMV启动子或痘病毒启动子。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述HBV核心包含全长野生型HBV核心序列、或由其组成。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述修饰的HBV聚合酶 (P_{mut}) 不是截短形式的HBV聚合酶;和/或其中,所述修饰的HBV聚合酶 (P_{mut}) 包含序列SEQ ID NO:8或其变体、或由其组成;和/或其中,所述HbsAg包含全长野生型HbsAg序列或其变体、或由其组成。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗,其中,所述免疫原表达盒编码截短形式的HBV PreS1,并且所述截短的PreS1设置为表达与所述HBV表面抗原 (S/HbsAg) 的融合蛋白;并且任选地进一步包含在所述截短的PreS1和表面抗原 (S/HbsAg)

之间提供的接头序列；和/或其中，将具有融合的表面抗原的所述截短的PreS1编码在所述基因间序列的下游(3')。

18.根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗，其中，所述表达盒编码N Δ PreS1和PreS2融合序列；并且任选地其中，所编码的N Δ PreS1和PreS2融合序列编码在所述基因间序列的上游(5')；并且进一步任选地其中，所编码的N Δ PreS1和PreS2融合序列进一步与所述修饰的聚合酶(P_{mut})融合；并且进一步任选地其中，在所述PreS2和修饰的聚合酶(P_{mut})之间提供接头序列。

19.根据前述权利要求中任一项所述的多HBV免疫原病毒载体疫苗，其中，所述免疫原表达盒进一步编码肽佐剂；任选地其中，所述肽佐剂包含TPA(组织纤溶酶原活化剂)或人或非人不变链(Ii)或其片段。

20.一种包含HBV免疫原表达盒或由其组成的核酸，其中，所述免疫原表达盒编码：

- a) HBV核心；
- b) 修饰的HBV聚合酶(P_{mut})，其中，所述修饰是对野生型HBV聚合酶的突变以基本上除去聚合酶功能；
- c) HBV表面抗原(HbsAg)；和
- d) 基因间序列，其设置为导致至少所述HBV表面抗原(HbsAg)表达为与所述HBV核心和所述修饰的HBV聚合酶(P_{mut})分离的蛋白，

其中，所述基因间序列在编码HBV核心和修饰的HBV聚合酶(P_{mut})的序列的下游(3')和编码HBV表面抗原(HbsAg)的序列的上游(5')。

21.根据权利要求20所述的核酸，其中，所述免疫原表达盒进一步编码启动子；和/或其中，在非病毒载体中分离或提供所述免疫原表达盒。

22.一种包含根据权利要求1-19中任一项所述的病毒载体或根据权利要求20-21中任一项所述的核酸的组合物，任选地其中，所述组合物是药学上可接受的组合物。

23.根据权利要求22所述的组合物、根据权利要求1-19中任一项所述的病毒载体或根据权利要求20-21中任一项所述的核酸，其使用于预防或治疗受试者的HBV感染；任选地其中，所述使用是作为疫苗。

24.一种初免加强接种疫苗试剂盒，其包含：

-初免接种疫苗，其包含根据权利要求22所述的组合物、根据权利要求1-19中任一项所述的病毒载体或根据权利要求20-21中任一项所述的核酸；和

-加强接种疫苗，其包含根据权利要求22所述的组合物、根据权利要求1-19中任一项所述的病毒载体或根据权利要求20-21中任一项所述的核酸。

HBV疫苗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年4月10日提交的申请号为201880028408.6的中国专利申请的优先权,其全部内容通过引用的方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于慢性乙型肝炎的治疗性疫苗的病毒载体疫苗的多抗原HBV免疫原。

背景技术

[0004] 乙型肝炎是一种侵袭肝脏并可能导致急性和慢性疾病的病毒感染。乙型肝炎病毒(HBV)通过与感染者的血液或其它体液接触传播。没有针对急性乙型肝炎的特异性治疗。因此,护理旨在保持舒适性和足够的营养平衡,包括补充因呕吐和腹泻而流失的液体。然而,解决急性乙型肝炎的主要方法是通过使用接种疫苗来预防。一旦确定,可以用药物治疗慢性乙型肝炎感染,其包括口服抗病毒剂。治疗可以减缓肝硬化的进程,减少肝癌的发生率并改善长期存活率。然而,一旦确定了慢性感染,自发的病毒控制就很少了。因此,主要目标是开发免疫治疗性HBV疫苗以诱导病毒控制或治愈。

[0005] 目前,在I期和II期临床试验中几乎没有不同的T细胞诱导疫苗,它们全部基于一种或两种全长HBV抗原或多种截短或全长嵌合HBV抗原或基于HBV蛋白组的合成肽。GlobeImmune公司的GS-4774目前处于II期临床试验中(GS-4774具有热灭活的酵母细胞,其可表达HBx HBsAg和HBcAg的嵌合体)。Transgene公司的TG1050目前处于I期临床试验中(TG1050是一种基于编码三种HBV抗原(核心-聚合酶-包膜)的截短形式嵌合体疫苗的人腺病毒血清型5。Altimmune公司的HepTcellTM目前处于I期临床试验中(HepTcell是一种完全合成的肽产品,基于源自HBV蛋白保守区的9种合成的32-40聚体肽)。Inovio公司的IN0-1800目前处于I期临床试验中(IN0-1800是一种靶向乙型肝炎病毒分支A和C表面抗原和HBV核心抗原的多抗原SynCon®DNA免疫疗法)。目前可用的预防性HBV疫苗(通常基于HBV蛋白疫苗)对慢性感染的HBV个体无治疗作用,因此它们无法控制慢性HBV感染。

[0006] 因此,本发明的目的是提供一种用于HBV感染的改良疫苗。

发明内容

[0007] 根据本发明的第一方面,提供了一种多HBV免疫原病毒载体疫苗,其包含:

[0008] 包含免疫原表达盒的病毒载体,其中,由所述表达盒编码的蛋白的表达设置为由启动子驱动,其中,所述免疫原表达盒编码:

[0009] a)HBV核心;

[0010] b)修饰的HBV聚合酶(P_{mut}),其中,所述修饰是对野生型HBV聚合酶的突变以基本上除去聚合酶功能;

[0011] c)HBV表面抗原(HbsAg);和

[0012] d) 基因间序列,其设置为导致至少HBV表面抗原(HbsAg)表达为与HBV核心和修饰的HBV聚合酶(P_{mut})分离的蛋白,

[0013] 其中,所述基因间序列在编码HBV核心和修饰的HBV聚合酶(P_{mut})的序列的下游(3')和编码HBV表面抗原(HbsAg)的序列的上游(5')。

[0014] 该基因间序列可以包含切割结构域、IRES(内部核糖体进入位点)、剪接信号或次级启动子。在一个实施方式中,该基因间序列包含切割结构域,其包含设置为导致核糖体跳跃的序列。在另一个实施方式中,该基因间序列包含次级启动子以促进至少表面抗原(HbsAg)的表达。

[0015] 对不同的HBV蛋白诱导强烈的、多抗原特异性的T细胞应答被认为在解决慢性HBV感染的病毒清除中起着重要作用。为了诱导多抗原T细胞应答,重要的是要具有最大数量的T细胞表位,这需要在诱导T细胞的HBV疫苗中编码全长HBV蛋白。目前正在开发的某些HBV疫苗不编码全长HBV抗原。本发明的疫苗可以编码3种全长HBV蛋白(即核心,任选地具有核心前区、聚合酶和表面蛋白)。另外,疫苗设计利用至少两种蛋白表达,例如使用F2A肽切割策略来编码单独的表面蛋白,该蛋白除了诱导T细胞应答外还可以诱导抗体应答,这可能在增强T细胞疫苗的治疗效果中起作用,并可能有助于清除慢性感染个体中的病毒。基于哺乳动物系统(与例如酵母的其它系统相比)的诱导抗体具有提供可以诱导适用于天然宿主的抗体的哺乳动物型糖基化的选择性优势。

[0016] 本发明有利地提供了一种编码全长多HBV抗原的单一疫苗,该抗原可以诱导广泛的T细胞应答,并且另外还可以诱导针对表面蛋白的抗体。新型HBV免疫原至少涵盖3种全长HBV抗原(即核心、聚合酶和表面),并将它们编码为病毒载体,例如黑猩猩腺病毒和MVA病毒载体。另外,免疫原中的HBV聚合酶蛋白具有使其功能失效的突变,从而避免其参与HBV基因组复制并提高疫苗的安全性。

[0017] 通过使用肽切割策略,例如通过使用Furin-2A切割序列或次级启动子,转基因盒可以产生至少两种蛋白,即融合的核心和聚合酶蛋白以及单独的表面蛋白,两者均产生T细胞免疫应答。除了产生T细胞免疫应答外,编码的表面蛋白还可以产生抗体应答。

[0018] 免疫原表达盒

[0019] 技术人员将认识到切割结构域可能不会在所有情况下都导致切割,例如,基于F2A的核糖体跳跃事件可能会在小部分的表达中发生,从而使所制得的小部分蛋白将是所有HBV蛋白/抗原的融合体,否则它们会通过切割被分离。因此,在一个实施方式中,免疫原表达盒可以进一步编码至少包含HBV核心、修饰的HBV聚合酶(P_{mut})和HBV表面抗原的融合蛋白。

[0020] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒进一步编码HBV前核心(PreC)。在另一个实施方式中,该免疫原表达盒进一步编码HBV PreS1和/或其截短形式。在另一个实施方式中,该免疫原表达盒进一步编码HBV PreS2。

[0021] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒进一步编码HBV前核心(PreC)和HBV PreS1或截短形式的HBV PreS1。在另一个实施方式中,该免疫原表达盒进一步编码HBV前核心(PreC)和HBV PreS2。在一个实施方式中,该免疫原表达盒进一步编码HBV前核心(PreC)和HBV PreS1以及截短形式的PreS1。在一个实施方式中,该免疫原表达盒进一步编码HBV前核心(PreC)、HBV PreS1和/或其截短形式以及HBV PreS2。

[0022] 在其中编码HBV前核心和核心的实施方式中,免疫原表达盒能够表达HBV e-抗原。本领域技术人员将认识到,HBV e-抗原包含前核心的10个C末端氨基酸和核心的149个N末端氨基酸、或由其组成。为了表达HBV e-抗原,前核心和核心一起表达,并且整个表达的蛋白经历N末端和C末端切割。

[0023] 在一个实施方式中,HBV核心和修饰的聚合酶(Pmut)设置成表达为融合蛋白。在其中免疫原表达盒编码HBV前核心的实施方式中,HBV前核心、HBV核心和修饰的聚合酶(Pmut)设置成表达为融合蛋白。

[0024] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒编码至少两种蛋白,其包含至少包含HBV核心和修饰的HBV聚合酶(Pmut)的第一融合蛋白,以及至少包含HBV表面抗原(HbsAg)的第二蛋白。在另一个实施方式中,该免疫原表达盒仅编码两种蛋白,其包含至少包含HBV核心和修饰的HBV聚合酶(Pmut)的第一融合蛋白,以及至少包含HBV表面抗原(HbsAg)的第二蛋白。

[0025] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒不编码HBV X蛋白。

[0026] 在一个实施方式中,如本文所述,该免疫原表达盒可以包含编码以下中任一个的核酸序列:

[0027] SII-HBV-CPmutS;

[0028] SII-HBV-SCPmut;

[0029] HBV-CPmutS;

[0030] SII-HBV-CPmutPreS-S(sh);

[0031] SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh);

[0032] SII-HBV-PreS-Pmut-C;

[0033] MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh);或

[0034] MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)。

[0035] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:46(SII-HBV-CPmutS)或其变体。SEQ ID NO:46的变体可以包含与SEQ ID NO:46具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:46的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:46编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。

[0036] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:47(SII-HBV-SCPmut)或其变体。SEQ ID NO:47的变体可以包含与SEQ ID NO:47具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:47的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:47编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。

[0037] 在另一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:48(SII-HBV-CPmutPreS-S(sh))或其变体。SEQ ID NO:48的变体可以包含与SEQ ID NO:48具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:48的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:48编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。

[0038] 在另一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:49(SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh))或其变体。SEQ ID NO:49的变体可以包含与SEQ ID NO:49具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:49的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:49编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。

[0039] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:59(SII-HBV-PreS-Pmut-C)

或其变体。SEQ ID NO:59的变体可以包含与SEQ ID NO:59具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:59的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:59编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。

[0040] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:24 (MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:24的变体可以包含与SEQ ID NO:24具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:24的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:24编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。

[0041] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:27 (MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:27的变体可以包含与SEQ ID NO:27具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:27的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:27编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。在一个实施方式中,该免疫原表达盒包含SEQ ID NO:58 (MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:58的变体可以包含与SEQ ID NO:58具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:58的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:58编码的等效蛋白的免疫原性的蛋白。

[0042] 病毒载体

[0043] 该病毒载体可以包含病毒。可将本发明的免疫原表达盒序列克隆到已知导致良好免疫应答的任何合适的病毒载体中。合适的病毒载体已经在Dicks等人 (Vaccine. 2015年2月25日;33 (9):1121-8. doi:10.1016/j.vaccine.2015.01.042. Epub 2015年1月25日)、Antrobus等人 (Mol Ther. 2014 Mar;22 (3):668-74. doi:10.1038/mt.2013.284. Epub 2013年12月30日) 和 Warimwe等人 (Virology. 2013年12月5日;10:349. doi:10.1186/1743-422X-10-349) 中描述,其通过引用并入本文。

[0044] 该病毒载体可以是减毒的病毒载体。该病毒载体可以包含腺病毒,例如人或猿猴腺病毒。在一个实施方式中,当用于初免加强方案的初免疫苗中时,该病毒载体包含腺病毒,例如E组猿猴腺病毒。该病毒载体可以包含E组猿猴腺病毒。该病毒载体可以包含ChAd0x1 (E组猿猴腺病毒,如在疟疾试验中安全使用的AdCh63载体) 或ChAd0x2。技术人员将熟悉例如来自专利公开号W02012172277 (其通过引用并入本文) 的基于ChAd0x1的病毒载体。该病毒载体可以包含AdCh63。该病毒载体可以包含AdC3或AdH6。在一个实施方式中,该病毒载体是人血清型。在另一个实施方式中,该病毒载体包含修饰的安卡拉痘苗 (MVA)。当在初免加强方案中用作疫苗加强剂时,该病毒载体可以包含MVA。在一个实施方式中,当用于初免加强方案的初免疫苗中时,该病毒载体包含腺病毒,例如E组猿猴腺病毒,当在初免加强方案中用作疫苗加强剂时,其可能包含MVA。技术人员将熟悉例如来自美国专利公开号US9273327 (其通过引用并入本文) 的基于MVA的病毒载体。

[0045] MVA有利地允许使用不同的痘病毒启动子表达一种以上蛋白。

[0046] 在另一个实施方式中,该病毒载体可以包含腺相关病毒 (AAV) 或慢病毒。在另一个实施方式中,该病毒载体可以包含痘苗病毒、鸡痘病毒或金丝雀痘病毒 (例如痘病毒科和禽痘病毒属的成员) 或纽约减毒痘苗病毒 (Tartaglia等人 Virology. 1992年5月;188 (1):217-32,其通过引用并入本文) 中的任一种。在另一个实施方式中,该病毒载体可以包含单纯疱疹病毒、人巨细胞病毒、麻疹病毒 (MeV)、仙台病毒 (SeV)、黄病毒 (例如黄热病毒-17D) 或甲

病毒载体(例如辛德比斯病毒(SINV))、委内瑞拉马脑炎病毒或赛姆利基森林病毒中的任一种。

[0047] 在一个实施方式中,该病毒载体可以包含具有SEQ ID NO:39和40(ChAd0x1)序列的核酸或其变体。SEQ ID NO:39和40的变体可以包含与SEQ ID NO:39和40具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:39和40的变体可以编码基本上保留SEQ ID NO:39和40(ChAd0x1)的病毒载体功能的病毒载体。

[0048] 在一个实施方式中,该病毒载体可以包含具有SEQ ID NO:41和42(ChAd0x2)序列的核酸或其变体。SEQ ID NO:41和42的变体可以包含与SEQ ID NO:41和42具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:41和42的变体可以编码基本上保留SEQ ID NO:41和42(ChAd0x2)的病毒载体功能的病毒载体。

[0049] 在一个实施方式中,该病毒载体可以包含具有SEQ ID NO:44和45(MVA)序列的核酸或其变体。SEQ ID NO:44和45的变体可以包含与SEQ ID NO:44和45具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:44和45的变体可以编码基本上保留SEQ ID NO:44和45(MVA)的病毒载体功能的病毒载体。

[0050] 在一个实施方式中,该病毒载体编码以下中的任一个:

[0051] SII-HBV-CPmutS;

[0052] SII-HBV-SCPmut;

[0053] SII-HBV-CPmutPreS-S(sh);

[0054] SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh);

[0055] MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh);或

[0056] MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)。

[0057] 在一个实施方式中,该病毒载体编码SEQ ID NO:3(SII-HBV-CPmutS)或其变体。SEQ ID NO:3的变体可以包含与SEQ ID NO:3具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:3的变体可以基本上保留SEQ ID NO:3的免疫原性。

[0058] 在一个实施方式中,该病毒载体编码SEQ ID NO:11(SII-HBV-SCPmut)或其变体。SEQ ID NO:11的变体可以包含与SEQ ID NO:11具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:11的变体可以基本上保留SEQ ID NO:11的免疫原性。

[0059] 在一个实施方式中,该病毒载体编码SEQ ID NO:13(SII-HBV-CPmutPreS-S(sh))或其变体。SEQ ID NO:13的变体可以包含与SEQ ID NO:13具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:13的变体可以基本上保留SEQ ID NO:13的免疫原性。

[0060] 在一个实施方式中,该病毒载体编码SEQ ID NO:25(SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh))或其变体。SEQ ID NO:25的变体可以包含与SEQ ID NO:25具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:25的变体可以基本上保留SEQ ID NO:25的免疫原性。

[0061] 在一个实施方式中,该病毒载体编码SEQ ID NO:23(MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh))或其变体。SEQ ID NO:23的变体可以包含与SEQ ID NO:23具有至少70%、75%、80%、

85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:23的变体可以基本上保留SEQ ID NO:23的免疫原性。

[0062] 在一个实施方式中,该病毒载体编码SEQ ID NO:26 (MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:26的变体可以包含与SEQ ID NO:26具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:26的变体可以基本上保留SEQ ID NO:26的免疫原性。

[0063] 在一个实施方式中,该病毒载体包含核酸序列SEQ ID NO:46 (SIi-HBV-CPmutS) 或其变体。SEQ ID NO:46的变体可以包含与SEQ ID NO:46具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0064] 在一个实施方式中,该病毒载体包含核酸序列SEQ ID NO:47 (SIi-HBV-SCPmut) 或其变体。SEQ ID NO:47的变体可以包含与SEQ ID NO:47具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0065] 在一个实施方式中,该病毒载体包含核酸序列SEQ ID NO:48 (SIi-HBV-CPmutPreS-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:48的变体可以包含与SEQ ID NO:48具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0066] 在一个实施方式中,该病毒载体包含核酸序列SEQ ID NO:49 (SIi-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:49的变体可以包含与SEQ ID NO:49具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0067] 在一个实施方式中,该病毒载体包含核酸序列SEQ ID NO:24 (MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:24的变体可以包含与SEQ ID NO:24具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0068] 在一个实施方式中,该病毒载体包含核酸序列SEQ ID NO:27 (MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:27的变体可以包含与SEQ ID NO:27具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。在一个实施方式中,该病毒载体包含核酸序列SEQ ID NO:58 (MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)) 或其变体。SEQ ID NO:58的变体可以包含与SEQ ID NO:58具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。

[0069] 启动子

[0070] 在一个实施方式中,启动子编码在免疫原表达盒中,例如,该启动子可以编码在免疫原表达盒的5'端或与5'端相邻。可替代地,可以将该启动子编码为免疫原表达盒外部的病毒载体核酸的一部分。例如,该启动子可以编码在免疫原表达盒的上游(5')。

[0071] 该启动子可以促进免疫原表达盒的所有编码蛋白的表达。在其中免疫原表达盒包含次级启动子的替代实施方式中,该启动子可以是初级启动子,其设置为至少可以促进HBV核心和修饰的聚合酶(Pmut)的表达,并且任选地不促进设置为由次级启动子单独促进的HBV表面抗原(HbsAg)的表达。

[0072] 技术人员将认识到任何合适的启动子都可以用作适合于表达宿主的初级和/或次级启动子。在一个实施方式中,该启动子包含CMV启动子。该CMV启动子可以包含长或短CMV启动子。在其中病毒载体包括腺病毒载体(例如ChAd0x1或2)的实施方式中,该启动子可以包含CMV启动子、SV40启动子或EF1a启动子。在其中病毒载体包括腺病毒载体(例如ChAd0x1

或2)的实施方式中,该启动子可以包含CMV启动子。

[0073] 用于载体(例如腺病毒载体(例如ChAd0x1或2))的启动子元件可以包含四环素操纵子(tetO)序列。四环素操纵子(tetO)序列有助于产生病毒载体,该四环素操纵基因(tetO)序列有助于产生病毒载体,该病毒载体可以表达对产生它们的细胞有毒的外源蛋白。

[0074] 在另一个实施方式中,该启动子包括痘病毒启动子。在病毒载体包含MVA的实施方式中,该启动子可以包含痘病毒启动子,例如F11。在一个实施方式中,该启动子包含早期F11启动子。可替代地,该痘病毒启动子可以包含早期启动子(例如选自B8R、K6L、A44L、C11R和B2R中的任一种),具有早期和晚期活性的启动子(例如选自mH5、p7.5和SSP中的任一种)或晚期启动子(例如FP4b)。

[0075] 基于早期启动子的转基因表达可用于旨在主要用于T细胞应答的免疫原(使用这些早期启动子时,T细胞的诱导程度更高)。然而,具有早期和晚期活性的启动子可以旨在用于诱导抗体应答的免疫原。然而,这些早期和晚期活性的启动子也可以旨在用于T细胞诱导的免疫原。

[0076] 在一个实施方式中,该启动子包含核酸序列SEQ ID NO:50或52(CMV长或短启动子)或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:50或52的变体可以包含分别与SEQ ID NO:50或52具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。该变体可以基本上保留SEQ ID NO:50或52的启动子功能。

[0077] 在一个实施方式,该启动子包含位于F11左翼序列中的序列(SEQ ID NO:35)或其变体、或由其组成。该变体可以包含与位于F11左翼序列中的启动子序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。该变体可以基本上保留位于F11左翼序列中的启动子(SEQ ID NO:35)的启动子功能。

[0078] 次级启动子

[0079] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒编码次级启动子。在其中除了第一/初级启动子外还提供次级启动子的实施方式中,该次级启动子可以由免疫原表达盒/在免疫原表达盒中编码。可以将该次级启动子编码为第一/初级启动子的3'端。可以将次级启动子编码为待表达的第一个蛋白/抗原的3'端,例如在HBV核心和HBV修饰的聚合酶的下游以及HBV表面抗原的上游。该次级启动子可以促进至少HBV表面抗原的表达。

[0080] 该次级启动子可以包含痘病毒启动子。该次级启动子可以包含痘病毒早期启动子(例如B8R、K6L、A44L、C11R和B2R中的任一个),或具有早期和晚期活性的痘病毒启动子(例如mH5、p7.5或SSP)或晚期启动子(例如FP4b)。

[0081] 在一个实施方式中,该次级启动子包含早期/晚期启动子mH5。在一个实施方式中,该次级启动子包含核酸序列SEQ ID NO:28(mH5启动子)或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:28的变体可以包含与SEQ ID NO:28具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。该变体可以基本上保留SEQ ID NO:28的次级启动子功能。

[0082] 在另一个实施方式中,该次级启动子可以包含SV40启动子或EF1a启动子。

[0083] 切割结构域

[0084] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒编码切割结构域。在一个实施方式中,该切割结构域是翻译后蛋白水解切割结构域,其允许例如通过蛋白水解切割酶切割翻译的蛋白。

该切割酶可以由宿主提供,例如被接种疫苗的宿主(例如人)。在另一个实施方式中,可以在免疫原表达盒或病毒载体中编码该切割酶。在一个实施方式中,该切割结构域包含非HBV序列,例如哺乳动物序列。在一个实施方式中,该切割结构域包含人衍生序列。

[0085] 在一个实施方式中,该切割结构域包含核糖体跳跃切割结构域。在一个实施方式中,该切割结构域包含弗林蛋白酶(Furin)识别位点,该识别位点包含序列RXRR、或由其组成,其中X可以是任何氨基酸。在一个实施方式中,该切割结构域包含弗林蛋白酶识别位点和2A肽序列。该2A肽序列可能包含FMDV(口蹄疫病毒)2A肽序列(APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP-SEQ ID NO:43)。可替代地,该2A肽可以选自P2A(猪破伤风病毒-1 2A)、T2A(明脉扁刺蛾β四体病毒2A(Thosea asigna virus 2A))和E2A(马鼻炎A病毒[ERAV]2A)。可以提供任何小核糖核酸病毒2A肽序列,并用作肽切割位点。因此,该切割结构域可以包含编码小核糖核酸2A肽序列的序列。

[0086] 在一个实施方式中,该切割结构域包含弗林蛋白酶-2A(F2A)肽序列或其功能变体、或由其组成。该切割结构域可以包含序列SEQ ID NO:9或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:9的变体可以包含与SEQ ID NO:9具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:9的变体可以基本上保留SEQ ID NO:9的切割功能。

[0087] F2A有利地是短的(仅28个氨基酸),这有助于提供合适的插入片段并由可能具有大小限制的载体(例如基于腺病毒的载体,包括ChAdOx1/2)表达一种以上的蛋白。

[0088] 在其中病毒载体是MVA或者在初次接种疫苗后以其它方式将病毒载体用作加强接种疫苗的实施方式中,可以提供不同的切割结构域以避免T细胞对初免接种疫苗的切割结构域的任何潜在加强。可替代地,可以使用次级启动子代替切割结构域以便避免T细胞对初免接种疫苗的切割结构域的任何潜在加强。

[0089] IRES(内部核糖体进入位点)

[0090] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒编码内部核糖体进入位点(IRES)。技术人员将认识到IRES是RNA结构,其允许帽独立地启动翻译,并且能够在信使RNA的中间启动翻译。

[0091] 剪接信号

[0092] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒编码mRNA剪接信号。技术人员将熟悉适合于此用途的常用剪接信号。可以使用的mRNA剪接信号的这种示例是由人β-珠蛋白基因和分支的第一个内含子的5'供体位点和表达载体pCI-neo哺乳动物表达载体(Promega)中的免疫球蛋白基因重链可变区的内含子的3'受体位点组成的嵌合内含子。

[0093] HBV前核心(PreC)

[0094] HBV PreC可以包含全长野生型HBV PreC序列或其变体、或由其组成。HBV PreC变体可以包含截短的HBV PreC序列、或由其组成。

[0095] HBV PreC可以包含序列SEQ ID NO:16或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:16的变体可以包含与SEQ ID NO:16具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:16的变体可以基本上保留SEQ ID NO:16的免疫原性。SEQ ID NO:16的变体可以基本上保留SEQ ID NO:16的三级结构。

[0096] HBV核心

[0097] HBV核心可以包含全长野生型HBV核心序列或其变体、或由其组成。HBV核心变体可

以包含截短的HBV核心序列、或由其组成。HBV核心可以不包含HBV前核心。

[0098] HBV核心可以包含序列SEQ ID NO:6或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:6的变体可以包含与SEQ ID NO:6具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:6的变体可以基本上保留SEQ ID NO:6的免疫原性。SEQ ID NO:6的变体可以基本上保留SEQ ID NO:6的三级结构。

[0099] HBV e-抗原 (HBeAg)

[0100] HBV e-抗原 (HBeAg) 可以包含全长野生型HBV e-抗原序列或其变体、或由其组成。HBV e-抗原变体可以包含截短的HBV e-抗原序列、或由其组成。

[0101] HBV e-抗原 (HBeAg) 可以包含以下序列、或由其组成: SKLCLGWLWGMDIDPYKEFGASV ELLSFLPSDFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYV NVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPISTLPETTVV (SEQ ID NO:17)。

[0102] HBV e-抗原 (HBeAg) 包含序列SEQ ID NO:17或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:17的变体可以包含与SEQ ID NO:17具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:17的变体可以基本上保留SEQ ID NO:17的免疫原性。SEQ ID NO:17的变体可以基本上保留SEQ ID NO:17的三级结构。

[0103] 修饰的HBV聚合酶

[0104] 修饰的HBV聚合酶 (P_{mut}) 可以包含截短的HBV聚合酶、或由其组成。特别地,野生型HBV聚合酶的突变以基本上除去聚合酶功能可以包含编码截短的HBV聚合酶的序列。可替代地或另外地,该突变包含编码的HBV聚合酶序列的一个或多个点突变。该修饰可以包含在编码的HBV聚合酶序列中的一个或多个氨基酸取代、缺失或添加。在一个实施方式中,修饰的HBV聚合酶 (P_{mut}) 不是HBV聚合酶的截短形式(即其相对于野生型HBV聚合酶是全长的)。

[0105] 修饰的HBV聚合酶 (P_{mut}) 可以包含SEQ ID NO:8或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:8的变体可以包含与SEQ ID NO:8具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:8的变体可以基本上保留SEQ ID NO:8的免疫原性。SEQ ID NO:8的变体可以基本上保留SEQ ID NO:8的三级结构。

[0106] 该修饰可以是阻止蛋白初免的突变。另外地或可替代地,可以在逆转录酶和/或RNA酶结构域中提供突变以阻止其功能。进一步,另外地或可替代地,该突变可以是结构性的,使得破坏聚合酶的正确蛋白折叠。通过参考本文的野生型HBV聚合酶共有序列(即SEQ ID NO:19),该修饰可以包含Y63、C323、C334、C338、C352、R714、D788、R792或其等同残基中的一个或多个或全部。在一个实施方式中,通过参考本文的野生型HBV聚合酶共有序列(即SEQ ID NO:19),该修饰可以包含Y63A、C323A、C334A、C338A、C352A、R714A、D788A、R792A或其等同残基中的一个或多个或全部。在另一个实施方式中,通过参考本文的野生型HBV聚合酶共有序列(即SEQ ID NO:19),该修饰可以包含R714、D788和R792或其等同残基中的一个或多个或全部。在一个实施方式中,通过参考本文的野生型HBV聚合酶共有序列(即SEQ ID NO:19),该修饰可以包含R714A、D788A和R792A或其等同残基中的一个或多个或全部。参考等同残基应理解为是指HBV聚合酶可以基于本文所提供的HBV聚合酶序列外的可替换序列,并且氨基酸残基的编号或同一性在序列之间可以不同。通过将HBV聚合酶序列与本文的野生型HBV聚合酶共有序列(即SEQ ID NO:19)进行比对,可以容易地确定这种差异和等同性。

[0107] 突变R714A、D788A、R792A有利地停止了聚合酶功能。然而,如果在这些功能性突变

内发生逆转，则可以添加Y63的额外突变和其它半胱氨酸突变(C323、C334、C338和C352)中的一个或多个或全部作为额外措施。额外突变可以包含Y63A、C323A、C334A、C338A和/或C352A。

[0108] 所述突变有利地提供了HBV聚合酶功能被(a)RNA酶H功能性突变破坏以停止其酶活性,和/或(b)Y63A突变破坏以停止复制的第一步(DNA合成的初免),和/或(c)半胱氨酸突变破坏以破坏其天然构象并阻止HBV聚合酶参与病毒复制的初始步骤(蛋白初免、RNA结合和RNA包装)。

[0109] 技术人员将熟悉可以提供的各种HBV聚合酶修饰,其显著降低或消除功能,并且可以在根据本发明的修饰的聚合酶中提供。例如在W02016020538、W02013007772和W02011015656中描述了这种修饰,其通过引用并入本文。

[0110] 在一个实施方式中,将经修饰的聚合酶修饰以便相对于野生型HBV聚合酶表现出降低的逆转录酶(RTase)酶活性。可以通过负责RTase酶活性的结构域中的一个或多个突变来提供RTase活性的降低。

[0111] 已经发现四个残基参与RTase活性,在野生型HBV聚合酶的约位置538至约位置541处形成基序“YMDD”(用于Tyr、Met、Asp和Asp残基)。本发明涵盖该基序或RTase结构域中其它地方的任何突变,该突变提供RTase活性的显著降低(例如至少降低10倍)或消除。合适的RTase-缺陷型聚合酶突变体的代表性示例描述于Radziwill等人(1990,J.Virol.64:613)、Bartenschlager等人(1990,J.Virol.64:5324)和Jeong等人(1996,Biochem Biophys Res Commun.223(2):264)中,其通过引用并入本文。在一个实施方式中,经修饰的聚合酶可以包含将YMDD基序的第一个Asp残基或位于天然HBV聚合酶中等同位置的氨基酸残基取代为除Asp外的任何氨基酸残基,任选地取代为His残基(D540H突变)。

[0112] 在一个实施方式中,将经修饰的聚合酶修饰以相对于野生型HBV聚合酶提供降低的RNase H酶活性。可以通过负责RNase H酶活性的结构域中的一个或多个突变来提供RNase H活性的降低。涉及RNase H活性的功能性结构域在HBV聚合酶的C末端部分内,约从野生型聚合酶的位置680到C端位置832,并且本发明的经修饰的聚合酶可以涵盖提供RNase H活性显著降低(例如至少降低10倍)或消除的该结构域中的任何突变。合适的RNase H-缺陷型聚合酶突变体的代表性示例描述于Radziwill等人(1990,J.Virol.64:613)、Bartenschlager等人(1990,J.Virol.64:5324)中。

[0113] HBV表面抗原(HbsAg)

[0114] 技术人员将理解PreS1和PreS2是HBV表面蛋白的大(L)形式的组分(例如L形式=PreS1+PreS2+S)。HBV表面蛋白的中等(M)形式具有PreS2+S。将这些序列放在一起意味着以这些顺序包括T细胞表位。

[0115] HbsAg可以包含全长野生型HbsAg序列或其变体、或由其组成。HbsAg变体可以包含截短的HbsAg序列、或由其组成。

[0116] 包括PreS1和PreS2序列的HbsAg可以包含序列SEQ ID NO:10或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:10的变体可以包含与SEQ ID NO:10具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:10的变体可以基本上保留SEQ ID NO:10的免疫原性。SEQ ID NO:10的变体可以基本上保留SEQ ID NO:10的三级结构。

[0117] 在另一个实施方式中,HbsAg可以包含没有PreS1和/或PreS2的表面抗原。HbsAg可

以包含序列SEQ ID NO:18或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:18的变体可以包含与SEQ ID NO:18具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:18的变体可以基本上保留SEQ ID NO:18的免疫原性。SEQ ID NO:18的变体可以基本上保留SEQ ID NO:18的三级结构。

[0118] 在一个实施方式中,HbsAg可以包含HbsAg(氨基酸1-226)中四个已知的跨膜区中的任一个或全部、或由其组成,这些跨膜区为氨基酸(8-32)FLGPLVLQAGFFLLTRILTIPQL(SEQ ID NO:54)、氨基酸(80-98)FIIFLFILLLCLIFLLVLL(SEQ ID NO:55)、氨基酸(160-184)RFLWEWASVRFSWLSLLVPFPFVQWFV(SEQ ID NO:56)和氨基酸(189-210)TVWLSVIWMMWYWGPSLYNILS(SEQ ID NO:57)。在一个实施方式中,HbsAg可以至少包含氨基酸(8-32)FLGPLVLQAGFFLLTRILTIPQL(SEQ ID NO:54)的HbsAg跨膜区、或由其组成。

[0119] HBV PreS1

[0120] HBV PreS1可以包含全长野生型HBV PreS1序列或其变体、或由其组成。HBV PreS1可以包含序列SEQ ID NO:52或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:52的变体可以包含与SEQ ID NO:52具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:52的变体可以基本上保留SEQ ID NO:52的免疫原性。SEQ ID NO:52的变体可以基本上保留SEQ ID NO:52的三级结构。

[0121] HBV PreS1变体可以包含截短的HBV PreS1序列、或由其组成,例如本文所述的C Δ PreS1或N Δ PreS1(C Δ PreS1是指C末端截短的PreS1,而N Δ PreS1是指N末端截短的PreS1)。在一个实施方式中,免疫原表达盒可以编码N Δ PreS1和C Δ PreS1两者。在其中免疫原表达盒编码N Δ PreS1和C Δ PreS1两者的实施方式中,N Δ PreS1编码可以在基因间序列的上游(5'),并且C Δ PreS1可以编码在基因间序列的下游(3')。在免疫原表达盒在基因间序列上游(5')编码N Δ PreS1的实施方式中,它可以与PreS2和/或经修饰的聚合酶(Pmut)融合。在其中免疫原表达盒在基因间序列的上游(5')编码N Δ PreS1的实施方式中,它可以与PreS2和/或经修饰的聚合酶(Pmut)融合,并且在基因间序列的下游(3')编码的C Δ PreS1可以与表面抗原(HbsAg)融合。

[0122] C Δ PreS1

[0123] 在一个实施方式中,该免疫原表达盒编码截短形式的HBV PreS1。该截短可以包含C末端截短。在一个实施方式中,截短的HBV PreS1包含本文所述的C Δ PreS1(SEQ ID NO:21)。在一个实施方式中,截短的PreS1(例如本文所述的C Δ PreS1)设置为表达与HBV表面抗原的融合蛋白(S/HbsAg)。可以在截短的PreS1和表面抗原(S/HbsAg)之间提供接头序列,例如本文所述的接头。例如,C Δ PreS1+接头+S(本文所述为S(sh))。编码S(sh)的核苷酸序列可以包含SEQ ID NO:61或SEQ ID NO:38、或由其组成。

[0124] C Δ PreS1可以包含序列SEQ ID NO:21或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:21的变体可以包含与SEQ ID NO:21具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:21的变体可以基本上保留SEQ ID NO:21的免疫原性。SEQ ID NO:21的变体可以基本上保留SEQ ID NO:21的三级结构。

[0125] 在一个实施方式中,截短的PreS1(例如本文所述的C Δ PreS1)任选地具有融合的表面抗原,其编码在基因间序列的下游(3')。

[0126] PreS1截短有利于促进T细胞的抗体产生以及免疫原表达盒中所提供的HBV抗原的

抗体应答。不受理论的束缚,抗体的产生可能是由于PreS1和表面抗原的适当折叠。

[0127] N Δ PreS1

[0128] 在一个实施方式中,截短的PreS1包含如本文所述的N Δ PreS1。N Δ PreS1和PreS2融合体可以包含SEQ ID NO:15或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:15的变体可以包含与SEQ ID NO:15具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:15的变体可以基本上保留SEQ ID NO:15的免疫原性。

[0129] 在一个实施方式中,截短的PreS1包含如本文所述的N Δ PreS1。N Δ PreS1和PreS2融合体可以由包含SEQ ID NO:38或61或其变体、或由其组成的核酸编码。SEQ ID NO:38和61的变体可以包含与SEQ ID NO:38和61具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:38或61的编码变体可以基本上保留由SEQ ID NO:38或61编码的肽的免疫原性。

[0130] N Δ PreS1和PreS2融合序列有利地提供了良好的T细胞应答。N Δ PreS1有利地包括在仍将保留T细胞表位的序列中的氨基酸(对于CD8 T细胞表位为8-11个氨基酸,而对于CD4 T细胞表位则稍长(12-16个))。

[0131] 在其中免疫原表达盒编码与基因间序列上游(5')的PreS2融合的N Δ PreS1的实施方式中,它可以进一步与经修饰的聚合酶(Pmut)融合。可以在PreS2和经修饰的聚合酶(Pmut)之间提供接头序列,例如本文所述的接头。例如,N Δ PreS1+PreS2+接头+Pmut。

[0132] HBV PreS2

[0133] HBV PreS2可以包含全长野生型HBV PreS2序列或其变体、或由其组成。HBV PreS2变体可以包含截短的HBV PreS2序列、或由其组成。

[0134] HBV PreS2可以包含序列SEQ ID NO:53或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:53的变体可以包含与SEQ ID NO:53具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:53的变体可以基本上保留SEQ ID NO:53的免疫原性。SEQ ID NO:53的变体可以基本上保留SEQ ID NO:53的三级结构。

[0135] 肽佐剂

[0136] 该免疫原表达盒可以进一步编码肽佐剂。该肽佐剂可以包含TPA(组织纤溶酶原活化剂)。在一个实施方式中,该肽佐剂可以包含人或非人不变链(Ii)或其片段。人CD74分子的长异构体(异构体(b))的片段也称为不变链(Nucleic Acids Res. 1985 December 20; 13 (24): 8827-8841)。已知的是,在表达为与目的抗原的融合蛋白时,至少包含其跨膜结构域的不变链(Ii)的N末端片段提供了令人惊讶的有效佐剂功能。涵盖跨膜结构域和胞质结构域(优选地包括蛋白的长异构体的N末端16个氨基酸)的片段是特别有效的。

[0137] 该不变链可以包含鲨鱼不变链(SIi)或其片段或功能性变体、或由其组成。变体鲨鱼不变链(SIi)可以包含截短的恒定的鲨鱼不变链。不变链或其片段的其它非人动物来源包括鸡、鹤鹑、鳟鱼、斑马鱼、鲤鱼、青蛙、石斑鱼、鲨鱼、桂鱼或野鸭。技术人员将熟悉用作在表达盒/载体中编码的肽佐剂(例如不变链)的合适的不变链或其片段可以是如W02015082922中所提供的任何不变链,其通过引用并入本文。

[0138] 该肽佐剂可以包含序列SEQ ID NO:4(S1i)或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:4的变体可以包含与SEQ ID NO:4具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:4的变体可以基本上保留SEQ ID NO:4的佐剂功能。

[0139] 该肽佐剂可以由包含序列SEQ ID NO:29 (TPA核酸序列) 或其变体、或由其组成的序列编码。SEQ ID NO:29的变体可以包含与SEQ ID NO:29具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:29的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:29编码的TPA的佐剂功能的肽佐剂。该肽佐剂可以由包含序列SEQ ID NO:60 (TPA核酸序列) 或其变体、或由其组成的序列编码。SEQ ID NO:60的变体可以包含与SEQ ID NO:60具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:60的变体可以编码基本上保留由SEQ ID NO:60编码的TPA的佐剂功能的肽佐剂。

[0140] 该肽佐剂可以包含序列SEQ ID NO:30 (TPA) 或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:30的变体可以包含与SEQ ID NO:30具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:30的变体可以基本上保留SEQ ID NO:30的佐剂功能。

[0141] 该肽佐剂可以在待由免疫原表达盒表达的蛋白/抗原的N末端位置编码。第一肽佐剂可以在待由免疫原表达盒表达的第一蛋白/抗原(例如核心和聚合酶融合体)的N末端位置编码,且第二肽佐剂可以在待由免疫原表达盒表达的第二蛋白/抗原(例如表面抗原)的N末端位置编码。

[0142] HBV基因型

[0143] HBV可以是HBV基因型C。在另一个实施方式中,HBV可以是10种基因型 (A - J) 中的任何一种。所有编码的HBV蛋白/抗原都可以源自一种基因型,例如HBV基因型C。

[0144] 接头

[0145] 在一个实施方式中,可以在融合蛋白中提供的一种或多种或全部蛋白/抗原序列之间(例如在蛋白中的序列之间提供连接)编码接头残基。在包含肽佐剂的实施方式中,可以在肽佐剂和下游编码的蛋白/抗原之间编码接头。在一个实施方式中,在HBV核心和经修饰的HBV聚合酶的序列之间编码接头。

[0146] 接头残基可以包含随机氨基酸序列,或已基于表位预测计算机程序或动物模型中的实验选择为非免疫原性的氨基酸。例如,如果预测或已知其为表位(即为了避免对HBV中未发现的表位(例如人工表位)产生免疫应答),则可以不考虑该接头。该接头可以是柔性的。该接头可以包含K、G、P或S个氨基酸残基或其组合、或由其组成。在一个实施方式中,该接头可以包含G和/或P个氨基酸残基、或由其组成。该接头残基的长度可以在1至10个氨基酸之间。在另一个实施方式中,该接头残基的长度可以在2至8个残基之间。在另一个实施方式中,该接头残基的长度可以在1至6个残基之间。

[0147] 该接头可以包含序列KGGGPGGG (SEQ ID NO:5)、GGGSAGGG (SEQ ID NO:7)、KGGS (SEQ ID NO:14)、KSP、GSKGK (SEQ ID NO:20)、LEGGSGG (SEQ ID NO:22)、SKSGPPSGKS (SEQ ID NO:31)、GSKSGSK (SEQ ID NO:32)、SKSPGSGPP (SEQ ID NO:33) 或ASKGGKSG (SEQ ID NO:34) 中的任一种、或由其组成。

[0148] 在一个实施方式中,该接头可以包含序列KGGGPGGG (SEQ ID NO:5)。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列GGGSAGGG (SEQ ID NO:7)。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列KGGS (SEQ ID NO:14)。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列KSP。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列GSKGK (SEQ ID NO:20)。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列LEGGSGG (SEQ ID NO:22)。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列SKSGPPSGKS (SEQ ID NO:31)。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列GSSKSGK (SEQ ID NO:32)。在

另一个实施方式中,该接头可以包含序列SKSPGSGPP (SEQ ID NO:33)。在另一个实施方式中,该接头可以包含序列ASKGGKSG (SEQ ID NO:34)。

[0149] 有利地,使用接头可以避免产生与人蛋白质组同源的肽(其可能产生对自身抗原的免疫应答),并且它们避免了以免疫为主的人工表位。另外,接头可以在蛋白片段之间提供柔性铰链,使得它们可以折叠成其天然构象。例如,C Δ PreS1和S之间的接头允许C Δ PreS1和S独立地折叠,使得它们可以产生相应蛋白构象表位的抗体。

[0150] 接头可以在不同的免疫原表达盒之间变化。使用不同的接头避免了对任何潜在的人工表位产生的任何T细胞应答的增强(即通过改变接头或改变连接)。例如,当疫苗用于初免加强接种疫苗策略时,改变免疫原布局内的接头或蛋白顺序有助于克服人工表位应答的加强。

[0151] 免疫原表达盒的其它元件

[0152] 在其中免疫原表达盒用于MVA载体的实施方式中,该免疫原表达盒可以进一步包含F11左右侧翼序列以允许通过同源重组插入到MVA F11基因座中。

[0153] F11左侧翼序列可以包含SEQ ID NO:35或其变体、或由其组成。F11右侧翼序列可以包含SEQ ID NO:36或其变体、或由其组成。SEQ ID NO:35或36的变体可以包含分别与SEQ ID NO:35或36具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%同一性的序列。SEQ ID NO:35或36的变体可以分别基本上保留SEQ ID NO:35或36的同源重组功能。技术人员将理解,可以在不影响功能的情况下取代、添加或除去1、2、3、4、5或更多个氨基酸残基。例如,可以考虑保守取代。

[0154] 该免疫原表达盒可以进一步包含转录终止子序列。可以在包含次级启动子的免疫原表达盒的实施方式中提供转录终止子序列。例如,该转录终止子序列可以提供在初级启动子表达的蛋白的下游,但是在次级启动子之前(上游)。该转录终止子序列可以包含序列TTTTGT或其变体、或由其组成。

[0155] 在一个实施方式中,可以在非病毒载体中分离或提供本文所述的免疫原表达盒。

[0156] 因此,根据本发明的另一方面,提供了一种核酸,其包含本文所述的免疫原表达盒,任选地其中,所述核酸是经分离的核酸。

[0157] 根据本发明的另一方面,提供了一种组合物,其包含根据本发明的病毒载体,任选地其中,所述组合物是药学上可接受的组合物。

[0158] 该组合物可以是免疫原性的,例如在哺乳动物(例如人)中。该组合物可以包含药学上可接受的载体。该组合物可以是包含药学上可接受的载体的药物组合物。该组合物可以用于预防或治疗HBV感染。

[0159] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗或预防HBV感染的方法,其包括施用根据本发明的病毒载体、核酸或组合物。

[0160] 治疗或预防HBV感染的方法可以是接种疫苗的方法。

[0161] 根据本发明的另一方面,提供了一种根据本发明的病毒载体、核酸或组合物在治疗或预防HBV感染中的用途,任选地其中,该用途是在疫苗中。

[0162] 根据本发明的另一方面,提供了一种疫苗,其包含根据本发明的病毒载体、核酸或组合物。

[0163] 该疫苗可以是初免疫苗。该疫苗可以是加强疫苗。在初免疫苗之后提供加强疫苗

的情况下,该病毒载体可以是根据本发明的不同的病毒载体。

[0164] 有利地,在初免和加强疫苗之间提供不同的病毒载体可以避免提供跨一种蛋白/抗原序列与另一种蛋白/抗原序列的连接形成的“假”表位,即在重新排序的蛋白中可能不会出现相同的连接。

[0165] 根据本发明的另一方面,提供了一种初免加强接种疫苗试剂盒,其包含:

[0166] -根据本发明的初免接种疫苗;

[0167] -根据本发明的加强接种疫苗。

[0168] 初免和加强接种疫苗可以包含不同的病毒载体。

[0169] 该病毒载体可以与另一种治疗或预防活性成分组合用于疫苗。该病毒载体可以与佐剂组合用于疫苗。

[0170] 可以在药学上可接受的载体中提供病毒载体、编码病毒载体的核酸。

[0171] 根据本发明的病毒载体或组合物可以不包含野生型HBV,或者根据本发明的核酸可以不编码野生型HBV。

[0172] 本文所用的对序列“同一性”的参考可以指使用标准NCBI BLASTp参数(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)的两个比对序列之间的同一性百分比。

[0173] 当将术语“免疫原性的”应用于本发明的病毒载体、核酸或组合物时,是指能够在人或动物体内引发免疫应答。该免疫应答可以对HBV是保护性的。术语“保护性的”是指预防乙型肝炎疾病,降低乙型肝炎疾病的风险,降低乙型肝炎病毒感染、传播和/或进展的风险,降低乙型肝炎疾病的严重程度,治愈乙型肝炎,减轻乙型肝炎的症状或降低乙型肝炎疾病症状的严重程度。

[0174] 术语“预防”是指对乙型肝炎的预防或保护性治疗。预防可以包括降低HBV感染、传播和/或乙型肝炎疾病进展的风险或降低乙型肝炎疾病的严重程度。

[0175] 术语“治疗”是指治愈乙型肝炎、减轻症状或降低乙型肝炎疾病或乙型肝炎疾病症状的严重程度。

[0176] 关于“变体”核酸序列,技术人员将理解,可以在不影响功能的情况下取代、添加或除去1、2、3、4、5或更多个密码子。例如,可以考虑保守取代。

[0177] 关于“变体”氨基酸序列,技术人员将理解,可以在不影响功能的情况下取代、添加或除去1、2、3、4、5或更多个氨基酸。例如,可以考虑保守取代。

[0178] 技术人员将理解,在适当的情况下,本发明的一个实施方式或方面的任选特征可以适用于本发明的其它实施方式或方面。

附图说明

[0179] 现在将仅通过举例的方式,参考附图更详细地描述本发明的实施方式。

[0180] 图1: (A) 用于产生共有序列的1447个HBV基因型C序列的亲缘关系 (B) HBV基因型C共有序列 (SEQ ID NO:1) 和KP017269.1HBV分离株JP-02 (SEQ ID NO:2) 的比较。使用MAFFT (多序列比对程序) 将从HBV数据库 (<https://hbvdb.ibcp.fr/HBVdb/HBVdbIndex>) 下载的1447个HBV基因型C核苷酸序列进行比对以产生HBV基因型C共有序列和系统发育树。共有序列的3215个核苷酸序列与所选患者的序列 (KP017269.1HBV分离株JP-02) 的比对显示出三个核苷酸差异 (在52、1053和2699位置), 其被突出显示为灰色。下面提供了从1447个

基因型c分离株jp-02产生的HBV基因型C共有序列的序列。

[0181] 图2: (A) HBV病毒基因组和密码子布局。HBV病毒粒子具有部分双链DNA(具有全长负链DNA和与聚合酶蛋白连接的部分合成的正链DNA)。基因组的长度约为3.2Kb且具有四个主要密码子:核心(包括前核心区)、聚合酶、表面(包括preS1和preS2区)和X。(B) HBV免疫原布局。设计了两种免疫原SI i -HBV-CPmutS和SI i -HBV-SCPmut。两种免疫原均编码HBV密码子(涵盖前核心、核心、聚合酶[Pmut]、preS1、preS2和表面蛋白)和非HBV密码子(包含截短的鲨鱼不变链[SI i]、两个接头[以翠蓝色表示]和一个弗林蛋白酶2A[F2A]肽序列)。在哺乳动物表达盒内,将该免疫原密码子序列置于CMV启动子附近。(C) 体外表达分析。将编码SI i -HBV-CPmutS和SI i -HBV-SCPmut的质粒转染到HEK293A细胞中。转染后24小时,将细胞裂解,并使用小鼠抗HBV-PreS1和小鼠抗HBV聚合酶抗体在蛋白印迹实验中分析裂解物。将用小鼠抗GAPDH探测的印迹用作上样对照。(D) ChAdOX2-SI i -HBV-CPmutS。将具有SI i -HBV-CPmutS免疫原密码子的哺乳动物表达盒插入到复制缺陷型ChAdOx2载体中。通过使用前述标准方法将ChAdOX2-SI i -HBV-CPmutS载体转染到T-RExTM-293细胞(Thermo Fisher Scientific)中产生了重组ChAdOX2-SI i -HBV-CPmutS病毒。

[0182] 图3:在幼稚小鼠模型中测试ChAdOx2-SI i -HBV-CPmutS疫苗。(A) BALB/c小鼠的脾细胞应答(B)BALB/c小鼠的肝内淋巴细胞应答(C)CD1小鼠的脾细胞应答(D)CD1小鼠的肝内淋巴细胞应答。通过将每只小鼠分别肌内注射 4×10^7 IU和 5×10^7 IU的ChAdOx2-SI i -HBV-CPmutS疫苗而给BALB/c小鼠(4只7周龄的小鼠)和CD1(2只18周龄的小鼠和5只13周龄的小鼠)接种疫苗。接种疫苗后14天,将小鼠处死,根据标准方案从脾脏和肝脏分离脾细胞和肝内淋巴细胞(IHL)。将 2×10^5 脾细胞和 1×10^5 IHL与DMSO(1%)或非HBV肽库(A、I、L浓度为 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$)或HBV肽库(核心、Pol-1、Pol-2、Pol-3、Pol-4、PreS1/S2和表面的浓度为 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$)或阳性对照有丝分裂原(PHA或刀豆球蛋白A的浓度分别为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)一起平铺在ELISPOT平板(通过过夜温育预先涂有抗小鼠INF γ 单克隆抗体)上。在37°C过夜温育15小时后,将平板用PBS洗涤7次,并在室温下与生物素结合的小鼠抗INF γ 温育2小时,然后用PBS和AP结合的抗生素洗涤4次,在室温下温育2小时。然后将平板用PBS洗涤4次,并用BCIP/NBT底物显影,直到孔上出现斑点。最后用水洗涤并干燥后,在自动ELISpot读板仪(ELISpot plate reader)上对每个孔中每百万个细胞的斑点形成单位(SFU)进行计数。在单独的图表中显示了来自BALB/c和CD1小鼠的脾细胞和IHL对每种肽库刺激的ELISPOT应答。通过将对全部HBV肽库(核心、Pol-1、Pol-2、Pol-3、Pol-4、PreS1/S2和表面)的ELISPOT应答组合,还可以计算出来自HBV肽刺激的总应答。

[0183] 图4:具有和不具有鲨鱼不变链(SI i)的HBV免疫原SI i -HBV-CPmutS的免疫原性的比较。(A) HBV-CPmutS免疫原布局。通过缺失存在于SI i -HBV-CPmutS中的SI i 和第一接头来产生免疫原性HBV-CPmutS。HBV-CPmutS具有完全相同的氨基酸,只是它缺少存在于SI i -HBV-CPmutS免疫原中的SI i 和第一接头序列。(B) CD1小鼠中的脾细胞应答。(C) CD1小鼠中的肝内淋巴细胞应答。如前所述产生ChAdOX2-HBV-CPmutS,并通过将每只小鼠肌内注射 5×10^7 IU的ChAdOx2-HBV-CPmutS疫苗而给CD1小鼠(10只7周龄的小鼠)接种疫苗,如前所述,接种疫苗后14天将小鼠处死,并产生了脾细胞和肝内淋巴细胞应答数据。将来自分别接种疫苗ChAdOx2-SI i -HBV-CPmutS和ChAdOx2-HBV-CPmutS的5只和10只CD1小鼠的数据进行比较,并在图表中表示以方便比较。

- [0184] 图5A:SIi-HBV-CPmutPreS-S(sh)的示意布局。
- [0185] 图5B:SIi-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh)的示意布局。
- [0186] 图6A:MVA-SIi-HBV-PreS-P_{mut}-C-S(sh)的示意布局。
- [0187] 图6B:MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)的示意布局。
- [0188] 图7:在BALB/c小鼠中测试ChAd0x1-SIi-HBV-CPmutS疫苗,脾细胞应答:通过将每只小鼠肌内注射 5×10^7 IU的ChAd0x1-SIi-HBV-CPmutS疫苗而给BALB/c小鼠(8只8周龄的小鼠)接种疫苗。如前所述,接种疫苗后14天将小鼠处死,并产生了脾细胞应答数据。条形图中表示了每个肽库刺激的脾细胞T细胞应答和全部HBV肽库的合并总应答。
- [0189] 图8:由ChAd0x1和ChAd0x2编码的HBV免疫原SIi-HBV-CPmutS的免疫原性的比较。如前所述(图2D),产生了编码ChAd0x1和ChAd0x2病毒载体疫苗的HBV-CPmutS免疫原。如前所述,通过将每只小鼠分别肌内注射 5×10^7 IU的ChAd0x2-HBV-CPmutS和ChAd0x1-HBV-CPmutS疫苗而给10只7周龄的CD1小鼠和8只8周龄的CD1小鼠接种疫苗,接种疫苗后14天将小鼠处死,并产生了脾细胞应答数据。将来自接种疫苗ChAd0x2-SIi-HBV-CPmutS和ChAd0x1-HBV-CPmutS的10只和8只CD1小鼠的数据进行比较,并在图表中表示以方便比较。与ChAd0x1-HBV-CPmutS疫苗相比,在接种疫苗ChAd0x2-HBV-CPmutS疫苗的小鼠中观察到总脾细胞T细胞应答具有统计学上显著更高的程度。
- [0190] 图9:使用短CMV启动子或长CMV启动子由ChAd0x1和ChAd0x2病毒载体编码的HBV免疫原SIi-HBV-CPmutPreS-S(sh)(称为HBV-v2)的免疫原性的比较。如前所述,产生了基于两个短CMV启动子和一个长CMV启动子的编码ChAd0x1(ChAd0x1-LP-HBV-v2和ChAd0x1-SP-HBV-v2)和ChAd0x2(ChAd0x2-SP-HBV-v2)疫苗的SIi-HBV-CPmutPreS-S(sh)免疫原(称为HBV-v2)。将15只8周龄的Balbc小鼠分为3组(每组5只小鼠),并通过肌内注射 5×10^7 IU的ChAd0x1-SP-HBV-v2或ChAd0x2-SP-HBV-v2或ChAd0x1-LP-HBV-v2疫苗而接种疫苗。如前所述,接种疫苗后14天将小鼠处死,并产生了脾细胞应答数据。在同一图表中表示来自全部三种HBV-v2疫苗的比较数据以方便比较。与其它两种HBV-v2疫苗相比,在接种疫苗ChAd0x1-SP-HBV-v2疫苗的小鼠中观察到总脾细胞T细胞应答具有统计学上显著更高的程度。另外,与ChAd0x1-LP-HBV-v2疫苗相比,ChAd0x2-SP-HBV-v2疫苗在总脾细胞T细胞应答中显示出统计学上显著更高的程度。
- [0191] 图10A-G:显示了(A)SIi-HBV-CPmutS;(B)SIi-HBV-SCP_{mut};(C)HBV-CP_{mut}S;(D)SIi-HBV-CP_{mut}PreS-S(sh);(E)MVA-SIi-HBV-PreS-P_{mut}-CS(sh);(F)SIi-HBV-CP_{mut}PreS-TPA-S(sh)和(G)MVA-SIi-HBV-PreS-P_{mut}-C-TPA-S(sh)的免疫原布局。

具体实施方式

[0192] 基于HBV基因型C产生了HBV疫苗,HBV基因型C为东南亚最常见的HBV基因型之一,与慢性HBV感染的关联更为频繁。为了设计HBV免疫原,选择患者的HBV基因型C序列(GeneBank:KP017269.1),该序列最接近共有序列,这是通过比对乙型肝炎病毒数据库HBVdb的1447个HBV基因型C序列而产生的(图1A和1B)。与共有序列相比,所选的HBV基因型C序列只有三个核苷酸变化,其中两个是沉默突变,一个是聚合酶蛋白突变。

[0193] 据信,针对不同HBV蛋白的强大且具有多种抗原特异性的T细胞应答在解决HBV感染的病毒清除中起主要作用。基于该HBV免疫原已设计为编码病毒的所有主要蛋白,即核心

(包括核心前区)、非功能性聚合酶Pmut(具有功能性突变的Pmut:HBV聚合酶旨在阻止疫苗编码的聚合酶参与HBV病毒复制的能力)和表面蛋白(包括其PreS1和PreS2区)。图2A和2B分别显示了HBV基因组的密码子布局和前两种HBV疫苗免疫原设计的示意图。该布局已设计为使用弗林蛋白酶2A(F2A)肽切割机制将前核心、核心和Pmut编码为融合蛋白和单独的表面蛋白,该机制通过导致核糖体跳跃事件而有助于从单个开放阅读框架编码两种蛋白。

[0194] 在单个转基因盒中编码多个蛋白需要仔细设计,其中,密码子序列与CMV启动子的接近程度在编码蛋白的表达水平中起着重要作用。为了分析这两种免疫原(图2B)(SII-HBV-CPmutS和SII-HBV-SCPmut),我们产生了分别在免疫原盒的末端或开始编码表面蛋白的蛋白,并在蛋白印迹表达研究中对其进行了测试。蛋白印迹表达分析显示了布局SII-HBV-CPmutS具有最佳的F2A切割可能性,当与SII-HBV-SCPmut相比时,该布局产生了大量预期的CPmut和S蛋白(图2c)。

[0195] 基于该观察,我们决定采用SII-HBV-CPmutS免疫原布局以产生基于黑猩猩腺病毒(ChAd0x2)的T细胞诱导HBV疫苗(图2D)。按照良好的制造规范,在牛津大学詹纳研究所的病毒载体核心设施中制造了小批量的ChAd0x2-SII-HBV-CPmutS,并用于小鼠免疫原性研究。

[0196] 使用幼稚小鼠模型测试了ChAd0x2-SII-HBV-CPmutS疫苗产生T细胞免疫应答的能力。通过将每只小鼠分别肌内注射 4×10^7 IU和 5×10^7 IU的ChAd0x2-SII-HBV-CPmutS疫苗而对幼稚BALB/c小鼠和CD1小鼠进行免疫。接种疫苗后14天将小鼠处死,并用从脾脏和肝脏分离出脾细胞和肝内淋巴细胞(IHL)进行IFN- γ ELISPOT分析。将整个SII-HBV-CPmutS免疫原中产生的15聚体合成肽(重叠11个氨基酸)组合成特异性库(表示SII-HBV-CPmutS免疫原的不同区)并用作IFN- γ ELISPOT测定中的兴奋剂。结果显示ChAd0x2-SII-HBV-CPmutS疫苗对SII-HBV-CPmutS免疫原产生了良好的IFN- γ ELISPOT应答(图3)。BALB/c和CD1小鼠在免疫原中均显示出对聚合酶和表面蛋白应答较强、对核心蛋白应答较弱以及对非HBV蛋白(鲨鱼不变链[SII]、F2A和接头)应答可忽略或无应答。

[0197] 先前的研究已经显示了当放在免疫原的N末端时,鲨鱼不变链(SII)可作为分子佐剂起作用,并增加对免疫原的总体T细胞免疫应答。为了对此进行测试,我们产生了没有SII的HBV免疫原(HBV-CPmutS疫苗)(图4A),然后产生了ChAd0x2-HBV-CPmutS疫苗,并在类似的CD1小鼠免疫原性实验中对其进行了测试。结果显示与非SII疫苗(ChAd0x2-HBV-CPmutS)相比,SII疫苗(ChAd0x2-SII-HBV-CPmutS)产生更高程度的IFN- γ ELISPOT应答(脾细胞和肝内淋巴细胞IFN- γ ELISPOT应答,如图4B、4C所示)。

[0198] 病毒载体HBV疫苗设计的主要目的是产生针对HBV免疫原的T细胞和抗体应答。为了产生成功的抗体应答,该免疫原编码的蛋白必须折叠成其天然构象。为此,HBV免疫原(SII-HBV-CPmutPreS-S(sh)和SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh))被设计(图5A和5B),该免疫原编码用接头融合至表面蛋白S结构域的PreS1结构域的N末端的一半,可作为抗体诱导免疫原组分,并将表面蛋白的剩余肽序列(PreS1结构域的C末端的一半和整个PreS2结构域)融合至前核心/核心/Pmut以便保留产生T细胞免疫应答所需的T细胞表位。图5A和5B显示了SII-HBV-CPmutPreS-S(sh)的示意布局。

[0199] 还设计了MVA-HBV免疫原,其设计按照类似于SII-HBV-CPmutPreS-S(sh)和SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh)设计。然而,HBV免疫原SII-HBV-CPmutPreS的T细胞组分由早期启动子F11编码,并且抗体诱导组分S(sh)或TPA-S(sh)由早期/晚期启动子mH5编码。克隆盒

还具有F11左侧翼序列和F11右侧翼序列以允许通过同源重组插入到F11基因座中。图6A和6B分别显示了MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)和MVA-SIi-HBV-CPmutPreS-TPA-S(sh)的示意布局。

[0200] 结论:基于新颖的多抗原HBV免疫原的ChAd0x2-SIi-HBV-CPmutS在幼稚小鼠模型中具有高度免疫原性。这些研究为将来在慢性HBV小鼠模型中的研究铺平了道路,以评估其通过免疫治疗方法克服慢性HBV感染的能力。

[0201] 序列:

[0202] 由1447个基因型C序列(3215个碱基对)产生的HBV基因型C共有序列如SEQ ID NO:1所提供。KP017269.1HBV分离株JP-02的序列如SEQ ID NO:2所提供。

[0203] 示例盒

[0204] 1.SIi-HBV-CP_{mut}S

[0205] 1.1.SIi-HBV-CP_{mut}S:免疫原布局如图10A所示

[0206] 1.2.SIi-HBV-CP_{mut}S:氨基酸序列(SEQ ID NO:3)

[0207] MSLLWGGTVLAA~~MLIAGQVASVVFLV~~KGGGPGGGMQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWGMDID PYKEFGASVELLSFLPSDFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPA SRELVVSYVNVMGLKIRQLLWFHISCLTFGRET~~VLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPI~~STLPETTVVRRGRSP RRRTPSPRRRRS~~QSPRRRRS~~QSRESQCGGGSGGGMPLSYQHFRKLLLDDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDLN LGNLNVSI~~WP~~THKVG~~NFT~~GLASSTVPVNPEWQTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEK~~RLK~~IMP~~RF~~YPN LTKYLP~~LDKG~~IKPYYPEHAVNHYFKTRH~~YL~~HTLW~~KAG~~I~~LY~~KRET~~TRS~~ASFCGSPYSWEQELQHGR~~LV~~FQTSTRHGD ESFC~~SQSSG~~ILSRSPVG~~PCVR~~SQLK~~QSR~~LG~~LP~~QQ~~GS~~LARGK~~SGRS~~GSIRARV~~HPT~~RSFGVE~~PSG~~GHID~~NSA~~ STS~~SCL~~HQS~~AVRK~~TAYSHL~~STSKR~~QSSSGHA~~VELHN~~IPPSS~~ARSQ~~SEGPI~~FS~~AWWLQFRNSKPASD~~Y~~ALTHIVNLL EDWGPATEHGEHNIRIPRT~~PAR~~VTGGVFLVDKNPHNT~~TE~~SLVVDFSQFSRG~~STH~~V~~SWPK~~FAV~~PNL~~Q~~SLT~~NLLSSN LSWL~~SLD~~V~~SAAFY~~HIPLHPAAMPHLLVGSSGLPRY~~V~~ARLS~~STS~~R~~N~~INYQH~~GTM~~Q~~DL~~H~~DS~~CSRNLYV~~SL~~LLYK~~T~~FG RKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQFTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDVVLGA~~KSVQ~~H~~LES~~LFTS~~IT~~NFL LSLGI~~IHLN~~PNKTKRWGYS~~LNFM~~GYVIGSW~~G~~TL~~P~~QEHIVL~~KIK~~QC~~FR~~KL~~P~~V~~N~~R~~P~~IDW~~KVC~~Q~~R~~I~~V~~GLGFA~~AP~~FTQ~~G~~ YPALMPLYACIQSKQAF~~TS~~PTYKAFLCKQ~~Y~~LNLYP~~V~~ARQ~~R~~SG~~L~~C~~Q~~V~~F~~ADATPT~~G~~W~~G~~LA~~I~~GH~~R~~AMRGTFV~~AP~~LI~~H~~ TAELLAACF~~ARS~~RSG~~AKL~~IGTD~~N~~SV~~V~~LS~~R~~K~~Y~~T~~S~~F~~W~~L~~G~~CA~~AN~~W~~I~~R~~G~~T~~S~~F~~V~~Y~~V~~P~~S~~AL~~N~~P~~A~~ADPSAGR~~L~~GLY~~R~~P~~L~~ HLPFRPTTGR~~T~~SLYAVSP~~S~~V~~P~~SHLP~~D~~R~~V~~H~~F~~A~~S~~PL~~H~~V~~A~~WR~~P~~PR~~K~~R~~R~~AP~~V~~K~~Q~~T~~N~~F~~D~~LL~~K~~LAGD~~V~~E~~S~~N~~P~~PG~~M~~GG~~W~~SS~~K~~ PRQGMGT~~N~~LP~~N~~PLG~~F~~FP~~D~~H~~Q~~L~~D~~P~~A~~F~~G~~AN~~S~~NN~~P~~W~~D~~F~~N~~P~~N~~K~~D~~H~~W~~P~~E~~AN~~Q~~V~~G~~AG~~A~~F~~G~~PG~~F~~TP~~H~~GG~~L~~LG~~W~~SP~~Q~~A~~Q~~ ILTTVPA~~APP~~P~~A~~STNR~~Q~~SG~~R~~Q~~PT~~P~~I~~S~~P~~PL~~R~~D~~H~~SP~~Q~~AM~~Q~~W~~N~~ST~~T~~F~~H~~Q~~AL~~D~~P~~R~~V~~R~~G~~LY~~F~~P~~A~~G~~G~~SS~~G~~GT~~V~~N~~P~~V~~P~~TT~~A~~ PISSIFS~~R~~T~~G~~D~~P~~A~~P~~N~~M~~ENT~~T~~SG~~F~~LG~~P~~LL~~V~~L~~Q~~AG~~F~~LL~~T~~RI~~L~~T~~I~~P~~Q~~SL~~D~~SW~~W~~T~~S~~L~~N~~FL~~G~~GA~~P~~TC~~P~~Q~~N~~QS~~P~~TS~~N~~H~~S~~ PTSC~~P~~PI~~C~~PG~~Y~~R~~W~~M~~C~~L~~R~~RF~~I~~I~~F~~L~~F~~ILL~~C~~LI~~F~~L~~V~~LL~~D~~Y~~Q~~G~~M~~LP~~V~~C~~P~~LL~~P~~GT~~T~~T~~S~~GPC~~C~~ KTCTIPA~~Q~~GT~~S~~MF~~P~~ CCCTKPSDG~~N~~CTC~~I~~PIP~~S~~SWA~~F~~AR~~F~~L~~W~~E~~W~~A~~S~~V~~R~~F~~S~~W~~L~~L~~V~~PF~~Q~~WF~~V~~GL~~S~~PT~~V~~W~~L~~S~~V~~I~~W~~MM~~W~~Y~~W~~GPS~~L~~Y~~N~~IL~~S~~P~~F~~ PLLPIFFCLWVYI

[0208] 1.3.SIi-HBV-CP_{mut}S:HBV免疫原的氨基酸序列说明

[0209] 1.3.1.多肽的第一个氨基酸=M

[0210] 1.3.2.鲨鱼不变链(SIi)=SLLWGGTVLAA~~MLIAGQVASVVFLV~~(SEQ ID NO:4)

[0211] 1.3.3.接头=KGGGPGGG(SEQ ID NO:5)

[0212] 1.3.4.C=

- [0213] 1.3.4.1.PreC=
- [0214] MQLFHLCCLIISCSCTVQASKLCLGWLWG (SEQ ID NO:16)
- [0215] 1.3.4.2.核心=
- [0216] MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPSIRDLLTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAICLGELMNL
ATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPISTLP
ETTVVRRGRSPRRRTSPRRRSQSPRRRSQSRESQC (SEQ ID NO:6)
- [0217] 1.3.5.接头=GGGGGG (SEQ ID NO:7)
- [0218] 1.3.6.Pmut=(突变:Y63A,C323A,C334A,C338A,C352A,R714A,D788A,R792A)
- [0219] MPLSYQHFRKLLLLDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDNLGNLNVSIPWTHKVGNTGLASSSTVP
VFNPEWQTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMPARYPNLTQYLPDKGIKPYYPEHAVNHYFKT
RHYLHTLWKAGILYKRETTRASFCGSPYSWEQELQHGRFLVFQTSTRHGDESFCSQSSGILSRSPVGPCVRSQLKQ
SRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTRRSGVEPSGSGHIDNSASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQS
SSGHAVELHNIPPSSARSQSEGPIFSAWWLQFRNSKPASDYALTHIVLNLEDWGPATEHEHNIRIPRTPARVTGG
VFLVDKNPHNTTESRLVVDFSQFSRGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLSTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGV
GLSPFLLAQFTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLESLFTSITNFLLSLGIHLNPNKTRWGYSLN
MGYVIGSWGTLQEHIVLKIJKQCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQSKQAFTFSP
TYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADATPTGWGLAIGHRAMRGTFVAPLPIHTAELAACFARSRSGAKLIGT
DNSVVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADPSAGRLGLYRPLLHLPFRPTTGRTSLYAVSPSVP
SHLPDRVHFASPLHVAWRPP (SEQ ID NO:8)
- [0220] 1.3.7.弗林蛋白酶2A (F2A) =RKRRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:9)
- [0221] 1.3.8.表面蛋白 (S) =
- [0222] 1.3.8.1.PreS1=
- [0223] MGGWSSKPRQGMGTNLVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEAN QVGAGAFGPGF
TPPHGGLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDHPQ A (SEQ ID NO:52)
- [0224] 1.3.8.2.PreS2=
- [0225] MQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSGTVPVPTTASPISSIFSRTGDPAPN (SEQ ID NO:53)
- [0226] 1.3.8.3.表面 (S) =
- [0227] MENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSCPPI
CPGYRWMCLRRFIIFLFI_{LL}CLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPKTCTI_{PA}QGTSMFPSCCCTKPSD
GNCTCIPSSWAFARFLWEASVRFSLVLLVFPVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF
CLWVYI (SEQ ID NO:10)
- [0228] SII-HBV-CPmutS核苷酸序列如SEQ ID NO:46所提供。
- [0229] 2.SII-HBV-SCP_{mut}
- [0230] 2.1.SII-HBV-SCP_{mut}:免疫原布局如图10B所示
- [0231] 2.2.SII_HBV-SCP_{mut}:氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)
- [0232] MSLLWGGTVLAAMLIAGQVASVVFVLKGGSMGGWSSKPRQGMGTNLSVNPNGFFPDHQLDPAFGAN
SNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSGRQPTPISPPLR
DSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSGTVPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNMENTSGFLGPLLV
QAGFFLLTRILTIQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFI_{LL}CL

IFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNTCTIPSSWAFARFLWEWAS
VRFWSLSSLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGSPSLYNILSPFLPLPIFFCLWVYIRKRRAPVKQTLNFDLLK
LAGDVESENPGPMLFHLCIISCSCTVQASKCLGWLWGMDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPSIRDLLDTASA
LYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWGSNLEDPASRELVVSYVNVMGLKIRQLLWFHISCLTFGR
ETVLEYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRGRSPRRRTSPRQQRSQSPRRRSQSRESQCGGGSG
GGMPLSYQHFRKLLLLDDEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLGNLNVSIIPWTHKVGNTGLASSTVPVFNP
QTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMPARFYPNLTKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFKTRHYLH
TLWKAGILYKRETRRSASFCGSPYSWEQELQHGRLVFTSTRHGDESFCSQSSGILSRSPVGPCVRSQLKQSRLGLQ
PQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTRRSGVEPGSGHIDNSASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSQRQSSSGHAVE
LHNIPSSARSQSEGPIFSAWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDWGPATEHGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNP
HNTTESRLVVDFSQFSRGSTHWSWPKFAVPNQLSNTLSSNLSWLSLDVSAAFYHIPLHPAAMPHLLVGSSGLPRY
VARLSSTSRNINYQHGTMQDLHDSCSRNLYVSLLLLYKTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQFTSAIC
SVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLFTSITNFLLSLGIHLNPNTKRGYSLNFMGYVIGSWGTLQ
VLKIKQCFRKLPVNRIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQSKQAF
TFSPTYKAFLCKQYLNLYPVA
RQRSGLCQVFADATPTGWGLAIGHRAMRTFVAPLPIHTAELLAACFARSRS
GAKLIGTDNSVLSRKYTSFPWLLG
CAANWILRGTSFVYVPSALNPAADPSA
GRGLYRPLLHLPFRPTTGR
TSLYAVSPSVPSHLPDRVHFASPLHVAWRP
P

- [0233] 2.3.SII-HBV-SCP_{mut}:HBV免疫原的氨基酸序列说明

[0234] 2.3.1.多肽的第一个氨基酸=M

[0235] 2.3.2.鲨鱼不变链(SII)=SLLWGGVTVLAAMLIAGQVASVVFLV (SEQ ID NO:4)

[0236] 2.3.3.接头=KGGS (SEQ ID NO:14)

[0237] 2.3.4.表面蛋白(S)=

[0238] 2.3.4.1.PreS1=

[0239] MGGWSSKPRQGMGTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEAN QVGAGAFGPGF
TPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQA (SEQ ID NO:52)

[0240] 2.3.4.2.PreS2=

[0241] MQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPN (SEQ ID NO:53)

[0242] 2.3.4.3.表面(S)=

[0243] MENTTSGFLGPLLVQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSCPPI
CPGYRWMCRRFIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLPGTSTTSTGPKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSD
GNCTCIPSSWAFARFLWEWASVRFWSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF
CLWVYI (SEQ ID NO:10)

[0244] 2.3.5.弗林蛋白酶2A(F2A)=RKRRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:9)

[0245] 2.3.6.C=

[0246] 2.3.6.1.前核心=

[0247] MQLFHLCCLIISCSCTVQASKLCLGWLWG (SEQ ID NO:16)

[0248] 2.3.6.2.核心=

[0249] MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPSIRDLLTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNL
ATWVGSNLEDPASRELVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLP

ETTVVRRGRSPRRRTSPRRRSQSPRRRSQSRESQC (SEQ ID NO:6)

[0250] 2.3.7.接头=GGGGGG (SEQ ID NO:7)

[0251] 2.3.8.Pmut=(突变:Y63A、C323A、C334A、C338A、C352A、R714A、D788A、R792A)

[0252] MPLSYQHFRKLLLLDDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDLNGLGNLNVSI_{PWTHKVNFTGLASSTVP}
VFNPEWQTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMP_{FYPNLTKYLP}LDKGIKPYYPEHAVNHYFKT
RHYLHTLWKAGILYKRE_{TRSASF}CGSPYSWEQELQHGR_{LF}QTSTRHGDESFC_{SQSSGIL}SRSPVG_{PCVRSQ}LKQ
SRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPT_{RRSFGVE}PSGHIDNSASSTSSCLHQ_{SAVR}KTAYSHL_{STSKRQ}S
SSGHA_{VELHN}IPPSSARSQSEGPI_{FS}AWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDWGPATEHGEHNIRIPRT_{PARV}TGG
VFLVDKNPHNT_{TESRLV}DFSQFSRG_{STH}V_{SWPKF}AVPNLQSLTNLLSSNL_{STFGRKLH}LYSHPI_{ILGFRKIP}MGV
GLSPFLLAQFTSAICSVVR_{RAF}PHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLES_{LF}TSITNFLLSLGI_{HLNPNK}TKRWG_{YSLNF}
MGYVIGSWG_{TL}TPQEHIVL_{KIKQC}FRKLPVNRPIDW_{KVC}Q_{RIV}GLGFAAPFTQCG_YPALM_{PL}YACI_{QSK}Q_{AFT}FS_P
TYKAFLCKQ_{YLN}LYPVARQ_{RSGLC}QVFADATPTG_{WGLA}IGH_{RAM}R_{GT}F_{VAPL}PIHTAELLAACF_{ARS}RSG_{AKL}IGT
DNSV_{VLSR}KYTSFPWLLGCAANW_{ILRG}TSFV_VVPSALN_{PA}ADPSAGRLLYRPLL_{HP}FR_{PT}GR_{TS}LYAVSP_{SP}V_P
SHLPDRVHFASPLHVAWRPP (SEQ ID NO:8)

[0253] SII-HBV-SCP_{mut}核苷酸序列如SEQ ID NO:47所提供。

[0254] 3.HBV-CP_{mut}S

[0255] 3.1.HBV-CP_{mut}S:免疫原布局如图10C所示

[0256] 3.2.HBV-CP_{mut}S:氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)

[0257] MQLFHLC_{LI}IS_{CSCPTV}QASKLCLGWLWGMDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDL_{LD}TASALYR
EALESPEHCSPHHTALRQ_{AILC}WGELMN_{LA}TWVG_NLED_{PAS}REL_{VV}S_YV_NVMGL_KIRQLLWFHISCLTF_GRET_V
LEYLV_{SFGV}W_{IRTP}PAYRPPN_{AP}ILSTLPET_{TV}V_{RRR}SP_{RR}RTSP_{RRR}SQSP_{RRR}SQ_SRESQCCGGGGG
PLSYQHFRK_{LLLL}DDEAGPLEELP_R LADEGLNRRVAEDLN_{LG}LN_{VS}IP_{WTH}KVNFTGLASSTVPFNPEWQT
PSFPHIHLQEDIINRCQQYVG_{PLT}V_{NEK}RLKLIMP_{FYPNL}TKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFKTRH_{YL}HTL_WK
AGILYKRE_{TRSASF}CGSPYSWEQELQHGR_{LF}QTSTRHGDESFC_{SQSSGIL}SRSPVG_{PCVRSQ}LQ_{SRLGLQPQQG}
SLARGKSGRSGSIRARVHPT_{RRSFGVE}PSGHIDNSASSTSSCLHQ_{SAVR}KTAYSHL_{STSKRQ}SSSG_HAVELHN_I
PPSSARSQSEGPI_{FS}AWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDWGPATEHGEHNIRIPRT_{PARV}TGG_VFLVDKNPHNT_T
ESRLVVDFSQFSRG_{STH}V_{SWPKF}AVPNLQSLTNLLSSNLSL_{SDV}S_AAFYH_IPLHPAAMPH_LV_{GSSGL}PRY_VARL_S
SSTS_{RN}N_{YQHGT}M_{QDL}H_DSC_{SRN}LY_VS_{LL}LY_KTF_{GRKLH}LYSHPI_{ILGFRKIP}MGV_{GLSP}FLLAQFTSAICSVVR
RAFPHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLES_{FTS}ITNFLLSLGI_{HLNPNK}TKRWG_{YSLNF}MGYVIGSWG_{TL}TPQEHIVL_{KI}
KQC_{FRKL}PVNRPIDW_{KVC}Q_{RIV}GLGFAAPFTQCG_YPALM_{PL}YACI_{QSK}Q_{AFT}FS_{PTY}KAFLCKQ_{YLN}LYPVARQ_{RS}
GLCQVFADATPTG_{WGLA}IGH_{RAM}R_{GT}F_{VAPL}PIHTAELLAACF_{ARS}RSG_{AKL}IGT_{DNSV}LSRKYTSFPWLLGCAAN
W_{ILRG}TSFV_VVPSALN_{PA}ADPSAGRLLYRPLL_{HP}FR_{PT}GR_{TS}LYAVSP_{SP}V_{PSHLP}DRVHFASPLHVAWR_{PPR}K_R
RAPV_KQ_TLNFDLL_{KL}AGD_{VES}NP_{PGM}GGWSSK_{PRQ}GM_{GT}N_{LP}GF_{PDH}QL_{DP}A_{FG}ANSNNP_{DWDF}N_{PNK}D_HW
PEANQVGAGAFGPGFTPPH_{GG}LLG_{WSP}QAQ_GIL_{TT}V_{PA}APP_PASTNRQ_{SGR}Q_{PT}P_{IS}PL_{RD}SH_PQAMQWN_{STTF}H_Q
ALLDPRVR_{GLY}YFPAG_{GSSG}TV_{NPV}PTTASPISS_IFS_{RT}G_DP_{AP}N_{MENT}T_SG_{FL}G_{PLL}VLQAG_{FF}LL_{TR}LT_{IP}Q_{SL}
DSW_{WT}SLN_{FLGG}AP_{TC}PG_{QNS}Q_{SP}T_{NH}S_{PT}C_{PP}C_{PGY}R_{WM}C_{LLRF}I_{IF}L_{ILL}L_{CL}I_{FL}L_{VLLD}YQ_{GML}P_{VC}PL
LPGT_{STT}STGP_{CKT}CT_IPAQ_{GT}SM_{FP}SC_{CC}CT_{KP}SD_{GN}NC_{TC}CI_{PIP}SS_{WA}RF_LWE_{AS}VR_{FS}W_{LS}LL_{VPF}V_{QWF}V_{GL}
SPTV_{WLS}SV_IW_{MMWY}W_{GPS}LYN_{ILSP}FL_{PL}LL_{PI}FF_{CLW}Y_I

[0258] 3.3.HBV-CP_{mut}S:HBV免疫原的氨基酸序列说明

- [0259] 3.3.1.C=
- [0260] 3.3.1.1.前核心=
- [0261] MQLFHLCIISCSCTVQASKLCLGWLWG (SEQ ID NO:16)
- [0262] 3.3.1.2核心=
- [0263] MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNL
ATWVGSNLEDPASRELVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLP
ETTVVRRGRSPRRRTSPRRRSQSPRRRSQSRESQC (SEQ ID NO:6)
- [0264] 3.3.2.接头=GGGSGGG (SEQ ID NO:7)
- [0265] 3.3.3.Pmut=(突变:Y63A、C323A、C334A、C338A、C352A、R714A、D788A、R792A)
- [0266] MPLSYQHFRKLLLLDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDLNLNQNLNSIPWTHKVG NFTGLASSTV
PVFNPEWQTPSFPHIHLQEDI INRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMPARFYPNLTKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFK
TRHYLHTLWKAGILYKRETRASFCGSPYSWEQELQHGRLVFQTSTRHGDESFCSQSSGILSRSPVGPCVRSQLK
QSRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTTRRSFGVEPSGSGHIDNSASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQ
SSSGHAVELNIPPSSARSQSEGPIFSAWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDWGPATEHGEHNIRIPRTPARVTG
GVFLVDKNPHNTTESRLVVDQSQFSRGSTHWSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLSTFGRKLHLYSHPI ILGFRKIPMG
VGLSPFLLAQFTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLFTSITNFLSLGIHLNPNKTKRWGYSLN
FMGYVIGSWGTLQEHIVLKIJKQCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQSKQAFATFS
PTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADATPTGWGLAIGHRAMRGTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSAKLIG
TDNSVVLRSRKYTSFPWLLGCAANWILGTSFVYVPSALNPAADPSAGRGLYRPLLHLPFRPTTGRTSLYAVSPSV
PSHLPDVRHFASPLHVAWRPP (SEQ ID NO:8)
- [0267] 3.3.4.弗林蛋白酶2A (F2A) =RKRRAPVKQTLNF DLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:9)
- [0268] 3.3.5.表面蛋白 (S) =
- [0269] 3.3.5.1PreS1=
- [0270] MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEAN QVGAGAGPGF
TPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPAPSTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQ A (SEQ ID NO:52)
- [0271] 3.3.5.2PreS2=
- [0272] MQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPN (SEQ ID NO:53)
- [0273] 3.3.5.3表面 (S)
- [0274] MENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSCPPI
CPGYRWMCLRRFIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTMFPSCCCTKPSD
GNCTCIPIPSSWAFARFLWEWASVRFSLVLPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF
CLWVYI (SEQ ID NO:10)
- [0275] 4.SIi-HBV-CP_{mut}PreS-S(sh)
- [0276] 4.1SIi-HBV-CP_{mut}PreS-S(sh):免疫原布局如图10D所示
- [0277] 4.2SIi-HBV-CP_{mut}PreS-S(sh):氨基酸序列 (SEQ ID NO:13)
- [0278] MSLLWGGTVLAAMLIAGQVASVVFLVKGGGPGGGMQLFHLCLIISCSCTVQASKLCLGWLWGMDID
PYKEFGASVELLSFLPSDFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTAL RQAILCWGELMNLATWVGSNLEDP
ASRELVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVRGRSP
RRRTSPRRRSQSPRRRSQSRESQCGGGSGGGMPLSYQHFRKLLLDDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDLN

GNLNVSIPWTHKVG~~NFTGL~~ASSTVPVFNPEWQTPSFPHIHLQEDI INRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMP~~ARF~~YPNLTKYLP~~LDKG~~IKPYYPEHAVNHYFKTRH~~YL~~HTLWKAGILYKRET~~TR~~SASFCGSPYSWEQELQHGR~~L~~V~~Q~~TSTRHGDESFCSQSSGILSRSPVG~~PC~~VRSQLKQSRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPT~~RS~~FGVEPSGS~~G~~HIDNSASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTS~~K~~RQSSSGHAVE~~L~~HNI~~PP~~SARSQSEGPI~~S~~AWWLQFRNS~~K~~PASDY~~Y~~ALTHIVNLLEDWGP~~A~~TEHGEHNIRIPRT~~P~~ARVTGGVFLVDKNPHNT~~T~~ESRLVVDFSQFSRG~~S~~THVSWPKFAV~~P~~NLQSLTNLLSSNLSTFGRKLHLYSHPI~~I~~LGFRKIPMG~~V~~GLSPFLLAQFTSAICSVVR~~R~~AFPHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLES~~L~~FTSITN~~F~~LLS LGIHLNP~~N~~KTRWGYSLNF~~M~~GYVIGSWG~~T~~LPQE~~H~~IVL~~K~~IKQCFRKL~~P~~V~~N~~R~~P~~IDWKVCQ~~R~~IVG~~L~~LGFAAPFTQCGYPA~~L~~MP~~Y~~ACI~~Q~~SKQAF~~T~~FSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSG~~L~~CQVFADATPTG~~W~~GLAIGHRA~~M~~R~~G~~TFVAPLPIHTAELLAACF~~A~~RSRSG~~A~~KLIG~~T~~DNSV~~V~~LSRK~~Y~~TS~~F~~WL~~G~~CAANW~~I~~LR~~G~~TS~~F~~VYV~~P~~SA~~N~~PA~~A~~DPS~~A~~GR~~L~~GLYR~~P~~LLH~~L~~P~~F~~PTTGR~~T~~SLYAVSP~~S~~VPSHLP~~D~~R~~V~~H~~A~~SP~~L~~H~~V~~WR~~P~~PK~~S~~PSNNPDWDFN~~P~~N~~K~~D~~H~~W~~P~~EA~~N~~QVGAGAF~~G~~PG~~F~~TP~~H~~GG~~L~~LGWSPQAQGIL~~T~~TV~~P~~A~~P~~PPASTNRQSGRQ~~P~~TP~~I~~SP~~P~~PL~~R~~D~~H~~SP~~Q~~AMQWN~~S~~TFHQ~~A~~LLD~~P~~RV~~R~~GLYFPAGGSSG~~T~~VNPVPTTASPISSIFSRTGDP~~A~~P~~N~~GS~~K~~GR~~K~~R~~R~~AP~~V~~K~~Q~~T~~N~~FD~~L~~L~~K~~LAGD~~V~~E~~S~~N~~P~~PG~~M~~GG~~S~~SK~~P~~RG~~M~~GT~~N~~SV~~P~~NP~~L~~GFFPD~~H~~Q~~L~~DP~~A~~FG~~G~~ANSNNPDWDFN~~P~~N~~K~~D~~H~~W~~P~~EA~~N~~QVG~~L~~EGG~~S~~GG~~M~~ENT~~T~~SG~~F~~LG~~P~~LL~~V~~L~~Q~~AG~~F~~FL~~L~~TR~~I~~LT~~I~~P~~Q~~SDL~~S~~W~~T~~SLN~~F~~LG~~G~~AP~~T~~CP~~G~~Q~~N~~S~~Q~~S~~P~~T~~S~~N~~H~~S~~P~~T~~C~~CPP~~I~~CP~~G~~Y~~R~~W~~M~~C~~L~~R~~R~~FI~~I~~FL~~F~~ILL~~C~~L~~I~~F~~L~~L~~V~~LL~~D~~YQ~~G~~ML~~P~~V~~C~~PL~~L~~PG~~T~~STT~~S~~T~~G~~PC~~K~~T~~C~~T~~I~~PA~~Q~~GT~~S~~M~~F~~P~~S~~CC~~C~~TK~~P~~SD~~G~~N~~C~~TC~~I~~PIP~~S~~SW~~A~~FA~~R~~FL~~W~~E~~W~~AS~~V~~R~~F~~SW~~L~~LL~~V~~PF~~V~~Q~~W~~F~~V~~GL~~S~~P~~T~~V~~W~~LS~~V~~I~~W~~MM~~W~~Y~~W~~GPS~~L~~Y~~N~~IL~~S~~P~~F~~L~~P~~LL~~P~~IFF~~C~~L~~W~~Y~~I~~

- [0279] 4.3SIi-HBV-CP_{mut}PreS-S(sh): HBV免疫原的氨基酸序列说明
- [0280] 4.3.1.多肽的第一个氨基酸=M
- [0281] 4.3.2.鲨鱼不变链(SIi)=SLLWGGVTVLAAMLIAGQVASVVFLV(SEQ ID NO:4)
- [0282] 4.3.3.接头=KGGGPGGG(SEQ ID NO:5)
- [0283] 4.3.4.C=
- [0284] 4.3.4.1前核心=
- [0285] MQLFHLC~~I~~I~~S~~CSCPTVQASKLCLGWLWG(SEQ ID NO:16)
- [0286] 4.3.4.2核心=
- [0287] MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLTASALYREALESPEHCSPH~~T~~ALRQ~~A~~ILCW~~G~~ELMNLATWVG~~S~~NLED~~P~~ASRELVVSYVN~~N~~M~~G~~L~~K~~IRQ~~Q~~LLWFHISCLTF~~G~~RET~~V~~LEYLVS~~F~~GVWIRTPPAYRPPNAP~~I~~L~~S~~LPETTV~~V~~RRRG~~R~~SPRRRT~~P~~SP~~R~~RR~~S~~Q~~S~~PR~~R~~RR~~S~~Q~~S~~RESQC((SEQ ID NO:6)
- [0288] 4.3.5.接头=GGGSGGG(SEQ ID NO:7)
- [0289] 4.3.6.P_{mut}=(突变:Y63A、C323A、C334A、C338A、C352A、R714A、D788A、R792A)
- [0290] MPLSYQHFRK~~L~~LL~~D~~EA~~G~~PLEELP~~R~~LA~~E~~GLN~~R~~RA~~E~~DLNLGN~~N~~V~~S~~IPW~~T~~H~~K~~VG~~N~~FT~~G~~~~L~~AS~~S~~T~~V~~VF~~N~~PEWQ~~T~~PSFPHIHLQEDI INRCQQYVG~~P~~LT~~V~~NEKRLKLIMP~~ARF~~YPNLTKYLP~~D~~K~~I~~KPYYPEHAVNHYFKTRH~~Y~~LT~~L~~WKAGILYKRET~~TR~~SASFCGSPYSWEQELQHGR~~L~~V~~Q~~TSTRHGDESFCSQSSGILSRSPVG~~P~~CVRSQ~~L~~K~~Q~~SSHAVE~~L~~HNI~~PP~~SARSQSEGPI~~S~~AWWLQFRNS~~K~~PASDY~~Y~~ALTHIVNLLEDWGP~~A~~TEHGEHNIRIPRT~~P~~ARVTGGVFLVDKNPHNT~~T~~ESRLVVDFSQFSRG~~S~~THVSWPKFAV~~P~~NLQSLTNLLSSNLSTFGRKLHLYSHPI~~I~~LGFRKIPMG~~V~~GLSPFLLAQFTSAICSVVR~~R~~AFPHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLES~~L~~FTSITN~~F~~LLSLGI~~H~~LN~~P~~N~~K~~TKRWGYSLNF~~M~~GYVIGSWG~~T~~LPQE~~H~~IVL~~K~~IKQCFRKL~~P~~V~~N~~R~~P~~IDWKVCQ~~R~~IVG~~L~~LGFAAPFTQCGY~~P~~ALM~~P~~LYACI~~Q~~SKQAF~~T~~FSP~~T~~YKAFLCKQYLNLYPVARQRSG~~L~~CQVFADATPTG~~W~~GLAIGHRA~~M~~R~~G~~TFVAPLPIHTAELLAACF~~A~~RSRSG~~A~~KLIG~~T~~DNSV~~V~~LSRK~~Y~~TS~~F~~WL~~G~~CAANW~~I~~LR~~G~~TS~~F~~VYV~~P~~SA~~N~~PA~~A~~DPS~~A~~GR~~L~~GLYR~~P~~LLH~~L~~P~~F~~R~~T~~GR~~T~~SLYAVSP~~S~~V~~P~~

SHLPDRVHFASPLHVAWRPP (SEQ ID NO:8)

[0291] 4.3.7.接头=KSP

[0292] 4.3.8.N Δ PreS1和PreS2=

[0293] NSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPP PASTNRQSGR QPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVP TTASPISSIFSRTGDPAPN (SEQ ID NO:15)

[0294] 4.3.9.接头=GSKGK (SEQ ID NO:20)

[0295] 4.3.10.弗林蛋白酶2A (F2A) =RKRRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:9)

[0296] 4.3.11.S(sh) =

[0297] 4.3.11.1.C Δ PreS1=

[0298] MGGWSSKPRQGMGTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHHWPE ANQVG (SEQ ID NO:21)

[0299] 4.3.11.2.接头=LEGGSGG (SEQ ID NO:22)

[0300] 4.3.11.3.表面(S)=

[0301] MENTTSGFLGPLLVHQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSCPPI CPGYRWMCLRRFIIFLFI_{LL}CLIFLLVLLDYQGMLPVCPLPGTSTTSTGPKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSD GNCTCIPPIPSSWAFARFLWEWASVRFSLVLPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF CLWVYI (SEQ ID NO:18)

[0302] SII-HBV-CPmutPreS-S(sh)核苷酸序列如SEQ ID NO:48所提供。

[0303] 5.MVA-SII-HBV-PreS-P_{mut}-C-S(sh)

[0304] 5.1.MVA-SII-HBV-PreS-P_{mut}-C-S(sh):免疫原布局如图10E所示

[0305] 5.2.MVA-SII-HBV-PreS-P_{mut}-C-S(sh):氨基酸序列 (SEQ ID NO:23)

[0306] MSLLWGGTVLAAMLIAGQVASVVFVLSKGPPSGKNSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFT PPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGG SSSGTVPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNGSKSGSKMPLSYQHFRKLLLDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDL NLGNLNVSIPWTHKVGNTGLASSTVPVNPEWQTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMPARYPN LTKYLPDKGIKPYYPEHAVNHYFKTRHYLHTLWKAGILYKRETTRSASFCSGSPYSWEQELQHGRLVFQTSTRHGE SFCSQSSGILSRSPVGPCVRSQQLQKQSLQSLARGKSGRSGSIRARVHPTRRSGVEPGSQHIDNSASST SSCLHQSAVRKTAYSHLSTSQRQSSGHAVELHNIPSSARSQSEGPIFSAWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDW GPATEHGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTTESRLVVDFSQFSRGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLSWL SLDVSAAFYHIPLHPAAMPHLLVGSSGLPRYVARLSSTSrnINyQHGTMQDLHDCSRNLyVSLLLYKTFGRKLHL YSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQFTAICSVVRAFPHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLESLFTSITNFLLSLGIH LNPNKTKRKGYSLNFMGYVIGSWGLPQEHLVLIKQCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLGFAAPFTQCGYPALMPL YACIQSKQAFTFSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADATPTGWLAIGHRAMRGTFVAPLPIHTAELLAAC FARSRSGAKLIGTDNSVVLRSKYTSFPWLLCCAANWILRGTSFVYVPSALNPAADPSAGRLGLYRPLLHLPFRPTTG RTSLYAVSPSPVSHLPDRVHFASPLHVAWRPPSKSPGSGPPMQLFHLCIISCSCTVQASKLCLGWLWGMDIDPYK EFGASVELLSFLPSDFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWGSNLEDPASREL VVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGWIRTPPAYRPPNAPIILSTLPETTVVRGRSPRRRTP SPRRRRSQSPRRRR

- [0307] SQSRESQC
- [0308] MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGASKGGKSGME
NTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRR
FIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTGPCKTCTIPAQGTSMPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSW
AFARFLWEWASVRFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFFCLWVYI
- [0309] 5.3.MVA-SIi-HBV-PreS-P_{mut}-C-S(sh): HBV免疫原的氨基酸序列说明5.3.1.1.多肽的第一个氨基酸=M
- [0310] 5.3.1.2.鲨鱼不变链(SIi)=SLLWGGVTVLAAMLIAGQVAVVFLV (SEQ ID NO:4)
- [0311] 5.3.1.3.接头=SKSGPPSGKS (SEQ ID NO:31)
- [0312] 5.3.1.4.NΔPreS1和PreS2=
- [0313] NSNNPDWDFNPNKDHDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHGLLGWSPQAQGILTTVPA APPPASTNRQS
GRQPTPISPPPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVN PVPTTASPISSIFSRTGDPAPN
(SEQ ID NO:15)
- [0314] 5.3.1.5.接头=GSKSGSK (SEQ ID NO:32)
- [0315] 5.3.1.6.Pmut=(突变:Y63A、C323A、C334A、C338A、C352A、R714A、D788A、R792A)
- [0316] MPLSYQHFRKLLLLDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDLNGLNLNVSI~~PWTHKVG~~NFTGLASSSTVP
VFNPEWQTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEKRRKLIMP~~ARF~~YPNLTKYPLDKGIKPYYPEHAVNHYFKT
RHYLHTLWKAGILYKRETRRSASF~~C~~FGSPYSWEQELQHGR~~L~~V~~Q~~FTSTRHGDESFC~~S~~QSSGILSRSPVG~~C~~VRSQLKQ
SRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTRRSGVEPSGSHIDNSASSTSSCLHQ~~SA~~VRKTAYSHLSTS~~K~~RQS
SSGHA~~V~~ELHNIPPSSARSQSEGPIFSAW~~W~~QFRNSKP~~A~~SDY~~A~~LT~~H~~IVNLLEDWGP~~A~~TEHGEHNIRIPRT~~P~~ARVTGG
VFLVDKNPHNTTESRLVVDFSQFSRG~~S~~THVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLSTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGV
GLSPFLLAQFTAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLES~~L~~FTSITNFLLSLGIH~~L~~NPNKTKRWG~~Y~~SLNF
MGYVIGSWG~~T~~LPQE~~H~~IVLKIKQCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVGLGFAAPFTQC~~G~~Y~~P~~ALMPLYACIQSKQ~~A~~FTFSP
TYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADATPTG~~W~~GLAIGH~~R~~AMRGTFVAPLPIHTAELAACFARSRS~~G~~AKL~~I~~G
DNSVVL~~S~~RKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPA~~A~~DPSA~~G~~RLGLYRPLLHLPFRPTGRTSLYAVSP~~S~~V
SHLPDRVHFASPLHVAWRPP (SEQ ID NO:8)
- [0317] 5.3.1.7.接头=SKSPGSGPP (SEQ ID NO:33)
- [0318] 5.3.1.8.C=
- [0319] 5.3.1.8.1.前核心
- [0320] MQLFHLCLIIS~~C~~CPTVQASKLCLGWLWG (SEQ ID NO:16)
- [0321] 5.3.1.8.2.核心=
- [0322] MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLTASALYREALESPEHCS~~P~~HHTALRQAILCWGELMNL
ATWVG~~S~~NLED~~P~~ASRELVVSYVNVMGLKIRQLLWFHISCLTFGRE~~T~~VLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPI~~L~~STLP
ETTVVRRGRSPRRTPSPRRRSQSPRRRSQSRESQC (SEQ ID NO:6)
- [0323] 5.3.1.9.S(sh)
- [0324] 5.3.1.9.1.CΔPreS1=
- [0325] MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEAN QVG
- [0326] 5.3.1.9.2.接头=
- [0327] ASKGGKSG (SEQ ID NO:34)

[0328] 5.3.1.9.3. 表面=

[0329] MENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCGQNSQSPTSNHSPTSCPPI
CPGYRWMCLRRFIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSD
GNCTCIPIPSSWAFARFLWEASVRFWSLLVLPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF
CLWVYI (SEQ ID NO:18)

[0330] 5.4.MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)的核苷酸序列如SEQ ID NO:24所提供。

[0331] 5.5.MVA-SIi-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)核苷酸序列的说明:

[0332] 5.5.1.F11-L-侧翼=碱基1-1097 (SEQ ID NO:35)

[0333] 5.5.2.SIi-HBV-PreS-Pmut-C=碱基1098-4838 (SEQ ID NO:37)

[0334] 5.5.3.转录终止子序列=碱基4839-4845

[0335] TTTTGT

[0336] 5.5.4.mH5启动子=碱基4846-4942 (SEQ ID NO:28)

[0337] 5.5.5.S(sh)=碱基4943-5824 (SEQ ID NO:38)

[0338] 5.5.6.F11-R-侧翼=碱基5582-7143 (SEQ ID NO:36)

[0339] 6.SIi-HBV-CP_{mut}PreS-TPA-S(sh)

[0340] 6.1.SIi-HBV-CP_{mut}PreS-TPA-S(sh):免疫原布局如图10F所示

[0341] 6.2.SIi-HBV-CP_{mut}PreS-TPA-S(sh):氨基酸序列 (SEQ ID NO:25)

[0342] MSLLWGGVTVLAAMLIAGQVASVVFLVKGGGGGGMQLFHLCIISCSCTVQASKLCLGWLWGMDIDP
YKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWGSNLEDPASR
ELVVSYVNVMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGWIRTPPAYRPPNAPISTLPETTVVRRGRSPRR
TPSPRRRRSQQSPRRRSQSRESQCGGGSGGGMPLSYQHFRKLLLLDDEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDLNGLN
NVSIPWTHKVGNFTGLASSSTVPVNPEWQTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMPARFYPNLTKYL
PLDKGIKPYYPEHAVNHYFKTRHYLHTLWKAGILYKRETRASFCGSPYSWEQELQHGRLVFQTSTRHGDESFCSQ
SSGILSRSPVGPCVRSQLKQSRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTRRSFGVEPSGSGHIDNSASSTSSCLH
QSAVRKTAYSHLSTSKRQSSSGHAVELNIPPSSARSQSEGPIFSAWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDWGPATE
HGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTTESRLVVDFSQFSRGSTHVSWPKFAVPNLQLSLTNLLSSNLSTFGRKLH
LYSHPIILGFRKIPMGVGLSPFLLAQFTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLFTSITNFLSLGI
HLNPNKTKRWGYSLNFMGYVIGSWGTLQEHIVLKIKQCFRKLPVNRPIDWKVCQRIVLLGFAAPFTQCGYPALMP
LYACIQSKQAFTSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQFADATPTGWGLAIGHRAMRGTFVAPLPIHTAELAA
CFARSRSGAKLIGTDNSVVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPAADPSAGRLGLYRPLLHPFRPTT
GRTSLYAVSPSVPSHLPDRVHFASPLHVAWRPPKSPNSNNPWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGW
SPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSGRQPTPISPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSGTVPV
PTTASPISSIFSRTGDPAPNGSKGKRRAPVKQTLNFDLLLAGDVESNPGPMDAMKRGLCVLLCGAVFVSPSQ
EIHARFRMGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGLEGGGMEN
TTSGFLGPLLVQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCGQNSQSPTSNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRF
IIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWA
FARFLWEASVRFWSLLVLPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFFCLWVYI

[0343] 6.3.SIi-HBV-CP_{mut}PreS-TPA-S(sh):HBV免疫原的氨基酸序列说明

[0344] 6.3.1.多肽的第一个氨基酸=M

- [0345] 6.3.2.鲨鱼不变链(SIi)=SLLWGGVTVLAAMLIAGQVASVVFLV (SEQ ID NO:4)
- [0346] 6.3.3.接头=KGGPGGG (SEQ ID NO:5)
- [0347] 6.3.4.C=
- [0348] 6.3.4.1.前核心
- [0349] MQLFHLCCLIISCCPTVQASKLCLGWLWG (SEQ ID NO:16)
- [0350] 6.3.4.2.核心=
- [0351] MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNL
ATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPISTLP
ETTVVRRGRSPRRRTSPRRRSQSPRRRSQSRESQC (SEQ ID NO:6)
- [0352] 6.3.5.接头=GGGSGGG (SEQ ID NO:7)
- [0353] 6.3.6.Pmut=(突变:Y63A、C323A、C334A、C338A、C352A、R714A、D788A、R792A)
- [0354] MPLSYQHFRKLLLLDEAGPLEELPRLADEGLNRRVAEDNLGNLNVSIPWTHKVGNTGLASSSTVP
VFNPEWQTPSFPHIHLQEDIINRCQQYVGPLTVNEKRLKLIMPARFYPNLTKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFKT
RHYLHTLWKAGILYKRETRASFCGSPYSWEQELQHGRFLVFQTSTRHGDESFCSSQSSGILSRSPVGPCVRSQLKQ
SRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTRRSFGVEPGSGHIDNSASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQS
SSGHAVELHNIPPSSARSQSEGPIFSAWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDWGPATEHGEHNIRIPRTPARVTGG
VFLVDKNPHNTTESRLVVDFSQFSRGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLSTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGV
GLSPFLLAQFTSAICSVVRRAFPHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLFTSITNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLN
MGYVIGSWGTLQEHIVLKIQCFCRKLNVNPIDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQSQRAFTFSP
TYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADATPTGWLAIGHRAMRGTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSGAKLIGT
DNSVVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPAADPSAGRGLYRPLLHLPFRPTGRTSLYAVSPSVP
SHLPDRVHFASPLHVAWRPP (SEQ ID NO:8)
- [0355] 6.3.7.接头=KSP
- [0356] 6.3.8.N Δ PreS1和PreS2=
- [0357] NSNNPDWDFNPNKDHDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPA APPPASTNRQS
GRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVN PVPTTASPISSIFSRTGDPAPN
(SEQ ID NO:15)
- [0358] 6.3.9.接头=GSKGK (SEQ ID NO:20)
- [0359] 6.3.10.弗林蛋白酶2A(F2A)=RKRRAPVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:9)
- [0360] 6.3.11.TPA=MDAMKRLCCVLLCGAVFVSPSQEIHARFRR (SEQ ID NO:30)
- [0361] 6.3.12.S(sh)=
- [0362] 6.3.12.1.C Δ PreS1=
- [0363] MGGWSSKPRQGMGTNLSPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHDHWPE ANQVG (SEQ ID
NO:21)
- [0364] 6.3.12.2.接头=LEGGSGG (SEQ ID NO:22)
- [0365] 6.3.12.3.表面(S)=
- [0366] MENTTSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTSNHSPTSCPPI
CPGYRWMCLRRFIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSD
GNCTCIPPIPSSWAFARFLWEWASVRFSLVLPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLPIFF

CLWVYI (SEQ ID NO:18)

[0367] SII-HBV-CPmutPreS-TPA-S (sh) 核苷酸序列如SEQ ID NO:49所提供。

[0368] 7.MVA-SII-HBV-PreS-P_{mut}-C-TPA-S (sh)

[0369] 7.1.MVA-SII-HBV-PreS-P_{mut}-C-TPA-S (sh) :免疫原布局如图10G所示7.2.MVA-SII-HBV-PreS-P_{mut}-C-TPA-S (sh) :氨基酸序列 (SEQ ID NO:26)

[0370] MSLLWGGVTVLAAMLIAGQVASVVFVSKSGPPSGKSNSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGF TPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPA GGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPNGSKSGSKMPLSYQHFRKLLLLDDEAGPLEEELPRLADEGLNRRVA EDLNLGNLNVSIPWTHKVG~~NFTGL~~ASSSTVVFNPEWQTPSFPHIHLQEDI INRCQQYVGPLTVNEKRRKLIMPAR FYPNLTKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFKTRHYLHTLWKAGILYKRETTRSSFCGSPYSWEQELQHGRLVFQTST RHGDESFCSQSSGILSRSPVGPCVRSQLKQSRLGQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTTRSGVEPSGSGHID NSASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQSSGHAVELHNIPPSSARSQSEGPIFAWWLQFRNSKPASDYALTHI VNLLEDWGPATEHGEHNIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTTESRLVVDFSQFSRGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNL LSSNLSWLSLDVSAAFYHIPLHPAAMPHLLVGSSGLPRYVARLSSTSRNINYQHGTMDLHDSCRNLYV~~SL~~LLY KTFGRKLHLYSHPI ILGFRKIPMGVGLSPFLLAQFTSAICSVVRAFPHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLESLFTSI TNFLLSLGIHLPNKTKRWGYSLNFMGYVIGSWGTLQEHIVLKIKQCFRKLPVNRP IDWKVCQRVGLLGFAAPF TQCGYPALMPLYACIQSKQAFTSPTYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADATPTGWLGAIGHRAMRGTFVAP LPIHTAELLAACFARSRSGAKLIGTDNSVVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVVPSALNPAADPSSAGRLLY RPLLHLPFRPTTGRTSLYAVSPSVPSHLPDRVFASPLHVAWRPPSKSPGSGPPMQLFHLCLI ISCSCPTVQASKL CLGWLWGMDIDPYKEFGASVELLSPLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLA TWVGSNLEDPASRELVSYVNNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSGWWIRTPPAYRPPNAPILSTLPE TTVVRRGRSPRRTPSPRRRSQSPRRRSQRESQCMDAMKRGLCCVLLCGAVFVPSQEIHARFRRMGGWSS KPRQGMGTNLSVPN PLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGASKGGKSGMENTTSGFLGPLV LQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPGQNSQSPTNHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFILLCL IFLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFLWEWASV RFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYNILSPFLPLLPIFFCLWVYI

[0371] 7.3.MVA-SII-HBV-PreS-P_{mut}-C-TPA-S (sh) :HBV免疫原的氨基酸序列说明

[0372] 7.3.1.1.多肽的第一个氨基酸=M

[0373] 7.3.1.2.鲨鱼不变链(SII) =SLLWGGVTVLAAMLIAGQVASVVFV (SEQ ID NO:4)

[0374] 7.3.1.3.接头=SKSGPPSGKS (SEQ ID NO:31)

[0375] 7.3.1.4.N Δ PreS1和PreS2=

[0376] NSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTPPHGGLLGWSPQAQGILTTVPA APPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQAMQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAAGGSSGTVN PVPTTASPISSIFSRTGDPAPN (SEQ ID NO:15)

[0377] 7.3.1.5.接头=GSKSGSK (SEQ ID NO:32)

[0378] 7.3.1.6.Pmut=(突变:Y63A、C323A、C334A、C338A、C352A、R714A、D788A、R792A)

[0379] MPLSYQHFRK~~LLLLD~~DEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDLNLGNLNVSIPWTHKVG~~NFTG~~ASSTVVFNPEWQTPSFPHIHLQEDI INRCQQYVGPLTVNEKRRKLIMPARFYPNLTKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFKT RHYLHTLWKAGILYKRETTRSSFCGSPYSWEQELQHGRLVFQTSTRHGDESFCSQSSGILSRSPVGPCVRSQLKQ

SRLGLQPQQGSLARGKSGRSGSIRARVHPTRRSFGVEPGSGHIDNSASSTSSCLHQSAVRKTAYSHLSTSKRQS
 SSGHAVELNIPPSSARSQSEGPIFSAWWLQFRNSKPASDYALTHIVNLLEDWGPATEHGEHNIRIPRTPARVTGG
 VFLVDKNPHNTTESRLVVDFSQFSRGSTHVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLSTFGRKLHLYSHPIILGFRKIPMGV
 GLSPFLLAQFTSAICSVVRRAFPHCLAFSYMDVVLGAKSVQHLESLFTSITNFLLSLGIHLNPNKTKRWGYSLNF
 MGYVIGSWGTLPQEHIVLKIKQCRKLPVNRPDWKVCQRIVGLLGFAAPFTQCGPALMPLYACIQSKQAFTFSP
 TYKAFLCKQYLNLYPVARQRSGLCQVFADATPTGWGLAIGHRAMRGTFVAPLPIHTAELAACFARSRSGAKLIGT
 DNSVVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADPSAGRLGLYRPLLHLPFRPTGRTSLYAVSPSVP
 SHLPDRVHFASPLHVAWRPP (SEQ ID NO:8)

- [0380] 7.3.1.7.接头=SKSPGSGPP (SEQ ID NO:33)
- [0381] 7.3.1.8.C=
- [0382] 7.3.1.8.1.前核心=
- [0383] MQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWG (SEQ ID NO:16)
- [0384] 7.3.1.8.2.核心=
- [0385] MDIDPYKEGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHTALRQAILCWGELMNL
 ATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPISTLP
 ETTVVRRGRSPRRRTPSPRRRSQSPRRRSQSRESQC (SEQ ID NO:6)
- [0386] 7.3.1.9.TPA=MDAMKRGLCCVLLCGAVFVSPSQEIHFR (SEQ ID NO:30)
- [0387] 7.3.1.10.S(sh)=
- [0388] 7.3.1.10.1.C Δ PreS1=
- [0389] MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHDHWPE ANQVG (SEQ ID NO:21)
- [0390] 7.3.1.10.2.接头=ASKGGKSG (SEQ ID NO:34)
- [0391] 7.3.1.10.3.表面(S)=
- [0392] MENTTSGFLGPLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGAPTCPQNSQSPTSNHSPTCPPI
 CPGYRWMCLRRFIIFLFILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLLPGTSTTSTGPCKTCTIPAQGTSMFPSCCCTKPSD
 GNCTCIPSSWAFARFLWEWASVRFWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYGPSLYNILSPFLPLPIFF
 CLWVYI (SEQ ID NO:18)
- [0393] 7.4.MVA-S1i-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)的核苷酸序列如SEQ ID NO:27所提供的。
- [0394] 7.5.MVA-S1i-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)核苷酸序列的说明:
- [0395] 7.5.1.F11-L-侧翼=碱基1-1097 (SEQ ID NO:35)
- [0396] 7.5.2.S1i-HBV-PreS-P_{mut}-C=碱基1098-4838 (SEQ ID NO:37)
- [0397] 7.5.3.转录终止子序列=碱基4839-4845
- [0398] TTTTGT
- [0399] 7.5.4.mH5启动子=碱基4846-4942 (SEQ ID NO:28)
- [0400] 7.5.5.TPA=碱基4943-5038 (SEQ ID NO:29)
- [0401] 7.5.6.S(sh)=碱基5039-5920 (SEQ ID NO:38)
- [0402] 7.5.7.F11-R-侧翼=碱基5921-7239 (SEQ ID NO:36)
- [0403] 8.低GC含量形式MVA-S1i-HBV-PreS-Pmut-C-TPA-S(sh)的核苷酸序列 (SEQ ID NO:27)

NO:58) :

[0404] gtaatctattcgatataccgttctaacaactgtggatggaaaatctataat
aatacattaatcatccgatggctagggtattggatggatgcgtataaatttctgcggttatcttac
aagactattttatcattgggtagcaaaccagagagccgaccattcgattaataaaaaaaatcagatgctaaacg
caattctaaatcggtcaaagaatctatggcatcctgaaatcctgtacgaggcattcgagacacaatcagga
gcgttagaagttaatgagtccatgttaggatgtttcgtagaatagaagacatgttacttagtgtca
ttaatagagtatccgagaatactggaatgggatgttattatcctaccaacgatatacctcttattatcgaatc
atctatctgtcttagattatattatagtaataatcaggaatccaacaaatatcgatcaaattctgtcgtatc
atttctcaaaacaataccctgcaggacgtcccaactacgtaaaaatggtacaaaaggaaagtatataatcgcgt
tgtgtaaagttaccgtacctaactacgaccatattccagtagttatcagatgtacatgacaatactaccaccc
tacagtattgacgtccgtcgatattgaaactgctatcagagcaggatattcgatgtcgaattagggcttacaa
tggataataattccagaactaaaaacggttactggatagttcaagatgattatgacttgaacgcagtta
caacaaataatttattgaaacagctcatagaaaatattaacttacactctagataattcggtttatac
attingcatttagttattgccgagcattcattactcaattatggaaaccatagatccgttatatactcagttc
agtataaagaattatacgtagtagctctataaagatattaatgaatccatgagtcaagatggtaaaattataaa
aagtaaaaacaatattttatcggtttacactATGTCACTTCTGGGGCGGAGTTACAGTTCTGC
TGCTATGCTATTGCTGGACAAGTTGCTTCTGTTGTTCTGTTCTAAATCTGGACCTCCTCTGGAAAATCT
AATTCTAACAACTCCTGATTGGGATTCAATCCTAACAAAGATCATTGGCCTGAAGCTAATCAAGTTGGAGCTGGTG
CTTTGGACCTGGTTTACACCTCCTCATGGTGGATTGCTTGGATGGTCACCTCAAGCTCAGGAATTCTTACAAC
AGTCCAGCTGCTCCTCCTGCTCTACAAATAGACAATCTGGTAGACAACCTACACCTATTCTCCACCTCTT
AGAGATTCTCATCCTCAAGCTATGCAATGGAATTCTACTACATTCTCATCAAGCTTGTGATCCTAGAGTAGAG
GACTTATTTCCTGCTGGTGAAGTTCTCTGGAACAGTTAATCCTGTTCTACACAGCTCTCCAATTCTTC
TATATTCTAGAACAGGCATCCTGCTCTAACATGGATCAAATCTGGATCAAATGCCTCTGTCTTACACAC
TTAGAAAATTGCTGCTCTGATGATGAAGCTGGACCTCTGAAGAAGAATTGCCTAGACTGCTGATGAAGGAC
TTAATAGAACAGAGTTGCTGAAGATCTTAATCTGGAAATCTTAATGTTCTATTCTGGACACACAAAGTTGGAAA
TTTCACAGGACTTGCATCTCTACAGTGCCTGTTTAATCCTGAATGGCAAACACCTCTTCCACATATTCT
CTGCAAGAGGATATCATCAATAGATGTCAACAAATATGTTGGACCACTGACAGTTAATGAGAACAGCTAAAC
TTATTATGCCTGCTAGATTCTATCCTAACAAAGTATTGCCTCTGGATAAGGGAAATCAAACCTTATTATCC
TGAACATGCTGTGAATCACTACTTAAACAAAGACATTCTGCATACACTGTGGAAAGCTGGTATTCTTACAAA
AGAGAAACAACAAGATCTGCTCATTGTTGACATCTTGGGACACTGACAGTTAATGAGAACAGCTAAAC
TTTTCAAACATCTACAAGACATGGGATGAATCATTGTTCTCAAAGTTCTGGAATTCTTAGATCTCCTGT
TGGACCTGTTGATCTCAACTAAACAAATCTAGACTTGGACTCAACCTCAACAGGATCTCTGCTAGAGGA
AAAAGTGGAAAGATC TGGATCTATTAGAGCTAGAGTTCTACCTACAACAGTAAAGATCTTGGAGTTGAACCTCT
GGATCTGGACATATTGATAATTGCCTCTTACATCTCTGCTGATCAATCTGCTGTTAGAAAGACAGCTT
ATTCTCATTGCTACTCTAACAGAGACAATCATCTCTGGACATGCTGTTGAACCTCATAATATTCTCCAAGTAG
TGCTAGAACGTCATCTGAAGGACCAATATTTCAGCTGGTGGCTTCAATTGAGAAATTCTAAACCTGCTTGT
TATGCTCTGACACATATAGTTAATTGCTGTTGAAGATTGGGGACCTGCTACAGAACATGGCGAACACAATATTAGAA
TACCTAGAACCTGCTAGAGTTACAGGCAGGAGTCTTTGGTTGATAAGAACCTCATAATACCACAGAACATCAAG
ACTTGGTGTGATTTCACAGTTCTAGAGGATCTACACATGTTCTGGCCTAAATTGCTGTTCCAATCTT

CAATCTCTTACAAATTGCTTCATCTAATCTTCTTGGCTGCTCTGATGTTCTGCTGCCCTTATCATATTCTCTTCATCCTGCTGCAATGCCTCATTGCTTGGATCATCTGGACTTCCAAGATATGTTGCTAGACTAGCTCTACATCTAGAAATATCAATTATCAGCATGGAACAATGCAGGATCTCACGATTCTGTAGTAGGAATCTGTATGTTCTTTGCTCTGCTGATAAGACATTGGAAGAAAACCTCATCTGTATTCTCACCCATTATTCTGGGTTTAGAAAGATTCCATGGGAGTTGGACTTCTCCTTTGCTCAATTCACATCTGCTATTGTTCTGTTAGAAGGGCTTCTCATGTCTGCATTCTTATGGATGATGTTGTTCTGGAGCTAAATCTGTTCAACATCTGAAAGTCTGTTACCTCTATTACTAATTCTGCTTCTGGAAATTCATCTGAATCCAACAAAACAAAGAGATGGGGATATTCTCTTAATTTCATGGGATATGTTATTGGATCTTGGGAACACTTCCTCAAGAACATATCGTTGAAAACAAAGCAATGTTCAGAAAACGCCTGTGAATAGACCTATTGATTGGAAAGTTGTCAAAGAATTGTTGGACTTCTTGGATTGCTGCTCCTTACACAATGTGGATATCCTGCTCTATGCCACTTTATGCTGTATTCAATCTAAACAGGCTTTACATTCTCCAACATACAAAGCTTCTGTGTAACAGTATCTGAATCTTATCCTGTTGGCTAGACAAAGATCTGGCTTGTCAAGTTTGCTGATGCTACACCAACAGGATGGGACTTGCTATTGGACATAGAGCTATGAGAGAACATTGTTGCTCCATTGCCTATTCATACAGCTGAATTGCTGCTGCTTGTCTAGATCTAGAACAGGCAAAACTATTGGTACAGATAATAGTGTGCTGAGTAGAAAGTACACATCTTCCATGGTTGTTGGATGTGCTGCTAATTGGATTCTAGAGGAACCTCTTGTCTTATGTTCTGCTCTGCTTAATCCTGCAGCTGATCCATCTGCTGGTAGATTGGACTGTATAGACACTCTTCATTGCCTTTAGACCAACAACGGAAAGAACATCTTATGCTGTTCTCCTGTTCCATCTCATTTGCCTGATAGAGTCATTTGCTCTCCACTCATGTTGCTTGGAGGCCACCATCTAAATCTCCAGGTTCTGGACCACCTATGCAACTTTCATTTGTGTTGATCATTAGCTGTTCTGCTCCTACAGTCAAGCTTCTAAACTTGTCTGGATGGCTTGGGAATGGATATTGATCCATACAAAGAATTGGAGCTAGTTGAATTGCTGTCAATTCTCCATCTGATTTTCCCTCTATTGCTGATCTTCTGATACAGCATCTGCTCTGATAGAGCTCTTGAATCTCCTGAACACTGTTCTCCACATCATAACAGCACTAGACAAGCTATTCTTGTGTTGGGAACACTTATGAATCTTGTACATGGTTGGATCTAATTGGAAGATCCAGCTCTAGAGAATTGGTGGTTCTTATGTTAATGTGAATATGGACTGAAAATTAGACAACTGTTGGTTCATATCTCTGTCTTACATTGGTAGAGAAACAGTTGGAAATATTGGTTCTTGGCCTTGGATTAGAACACCTCCAGCTTATAGACCTCTAATGCTCCTATTGTCACACTCCTGAAACAAACAGTCGTTAGAAGAAGAGGAAGATCTCAAGAAGAACACCAAGTCCTAGAAAGAAG ATCTCAATCACCAAGAAGAAGAAGTCAATCTAGAGAATCTCAATGTTGATTTGTTGACATTAAAATTGAAAATAACAAAGTTCTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATATGATTCAAGTGACGGATCCATGGATGCTATGAAGCGAGGACTTGTGTTGCTTCTTGTGGCTGTGTTGTTCTCATCTCAAGAAATTCTCATGCCAGATTCAAGAATGGGAGGCTGGCATCTAAACCTAGACAAGGCATGGGAACAAATCTTCTGTTCTAATCCTTGGGATTCTTCTGATCATCAATTGGATCCAGCATTGGAGCAAATAGTAACAATCCAGATTGGACTTTAACCAAACAAAGATCATTGCCAGAAGCTAATCAAGTGGAGCATCTAAAGGTGGAAAAAGTGGAAATGGAAAACACTACATCTGGATTCTTCTGACCTTGTGTTCTGCTTCAAGCTGGATTCTTCTGTTGACAAGAATACTACAATTCTCAATCACTGGATTCTGGTGACAAGTCTTAATTCTGGAGGTGCTCCTACATGTCCTGGACAAATTCTCAATCTCAATCTCCAAATTGTCCTGGATATAGATGGATGTGCTTAGAGATTCTTCTGTTGCTTGGCTTGGATTTCTGTTGTTGGATTATCAGGGAATGCTTCTGTTGCTTGTGCTTGGAAACTCTACAAACAAGTACAGGACCTGTAAAACATGTACATTCCAGCACAGGAAACATCTATGTTCCAAGTTGTTGTTGACAAAACCTCTGATGGAAATTGCACATGTATTCTATTCCAAGTTCTGGCATTGCTAGATTCTTGGGAATGGGCTCTGTTAGATTCAAGTTGGTTGTCCTTGGCCATTGTCAGATTGTTGTTGATGTGGTATTGG

GGACCTTCTCTTACAATATTTGAGTCCTTCTCCCTTGCTGCCAATTTCTTGTCTTGGGTTACATTGAttaaccgagttctgcattattgttaattcgatgcgtggcaccatcaaagaatcactctaaaagatatacacacatacaaataattactaccctattgaatgagacagccaaggatcaagtttagtaaaatctggtagataaaagaagatactgatattgtgaataatttcattaccaaagaattaaaacagagacaaaatagtaatagttgtctctatcaaaccctggacttcgttgtaaattgggctTttgtacaataatgggtgtgccaatgattcatcccgtaatatcaatggatgtctcccatagattatcagatactgttatatttaggagactgtttagttacaatataatgtcccaattagattcacacaaaattgggctccatcagtttagattgttaatttttaagaatttaataaggaaacactactaaagatagaagagaatgattacattaattcatcctttccaacaaaaggataaaacgattttatcctaataacgacgattttatcacatatctacaggaggatggtagttatgtcttaagatagataactatgttagtaaaatttgtattcgaggccacaaaattatagtcctatggaaactacggcggagttcacagtacccaaatttctatacaacaaatctaaaggagatgaaaaaaaattaatcgtgtgcgtggccatggattaaactataaaattacatttttacatactctgtataaacgtgttctcatatgtgctattattgatacaaactatggatggcaggaactatcattgagatattcttctaaagtttttaaggcgtaacgagagaaaggacagtatcaaattcgtgaaattactatcccactttatccgcagttattaacagtaatattaatgttataaactattttaaccgcattttcaactttcgaacatgaaaagagaactacgaatacgaagagaaaattataattttccctagcactgttattcggcagataaagtataccgagctagctatcaaatttaggattaaatcttggtacaatacataaaagtttatctttacagatggctgttatacattaaatttacgaactaccatgctgcgcaact

[0405] 8.1低GC含量形式MVA-SII-HBV-PreS-Pmut-C-S(sh)的核苷酸序列说明：

[0406] 8.1.1F11-L-侧翼=碱基1-1097(SEQ ID NO:35)

[0407] 8.1.2SII-HBV-PreS-Pmut-C=碱基1098-4838(SEQ ID NO:59)

[0408] 8.1.3转录终止子序列=碱基4839-4845

[0409] TTTTGT

[0410] 8.1.4mH5启动子=碱基4846-4942(SEQ ID NO:28)

[0411] 8.1.5TPA=碱基4943-5038(SEQ ID NO:60)

[0412] 8.1.6S(sh)=碱基5039-5920(SEQ ID NO:61)

[0413] 8.1.7F11-R-侧翼=5921-7239碱基(SEQ ID NO:36)

[0414] 野生型HBV聚合酶的序列如SEQ ID NO:19所提供。

[0415] ChAd0x1序列

[0416] 免疫原盒的ChAd0x1序列5'如SEQ ID NO:39所提供。免疫原盒的ChAd0x1序列3'如SEQ ID NO:40所提供。

[0417] ChAd0x2序列

[0418] 免疫原盒的ChAd0x2序列5'如SEQ ID NO:41所提供。免疫原盒的ChAd0x2序列3'如SEQ ID NO:42所提供。

[0419] MVA序列

[0420] 免疫原盒的MVA序列5'如SEQ ID NO:44所提供。免疫原盒的MVA序列3'如SEQ ID NO:45所提供。

[0421] 具有Tetron操纵子序列的CMV长启动子如SEQ ID NO:50所提供。具有Tetron操纵子序列的CMV短启动子如SEQ ID NO:51所提供。

[0422] PreS1序列(SEQ ID NO:52)：

[0423] MGGWSSKPRQGMGTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPNKDHWPEANQVGAGAFGPGFTP
PHGGLLGWSPQAQGILTTVPAAPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQA

[0424] PreS2序列 (SEQ ID NO:53) :

[0425] MQWNSTTFHQALLDPRVRGLYFPAGGSSSGTVNPVPTTASPISSIFSRTGDPAPN

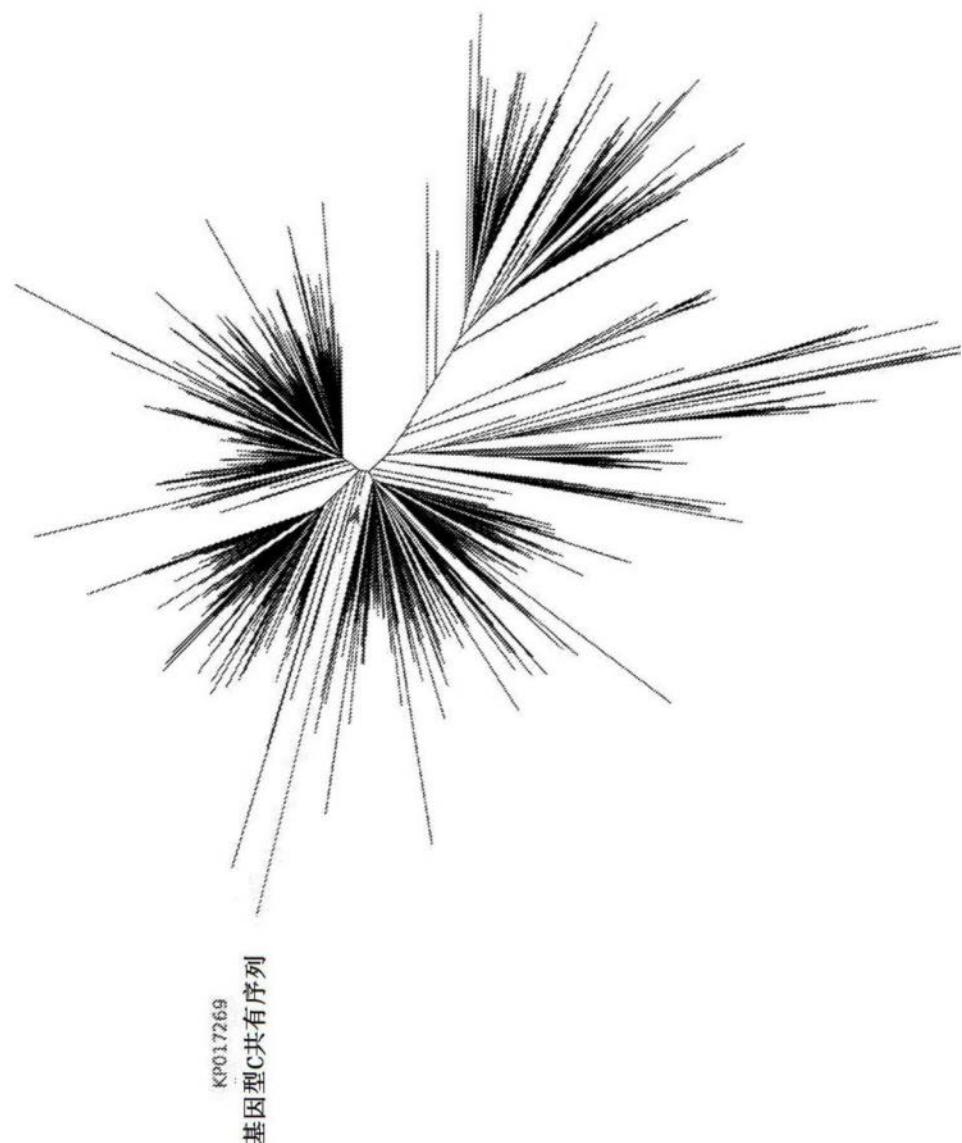


图1A

基因型C共有有序列

7269.1 HBV分离株JP-02:

图1B

图1B(续)

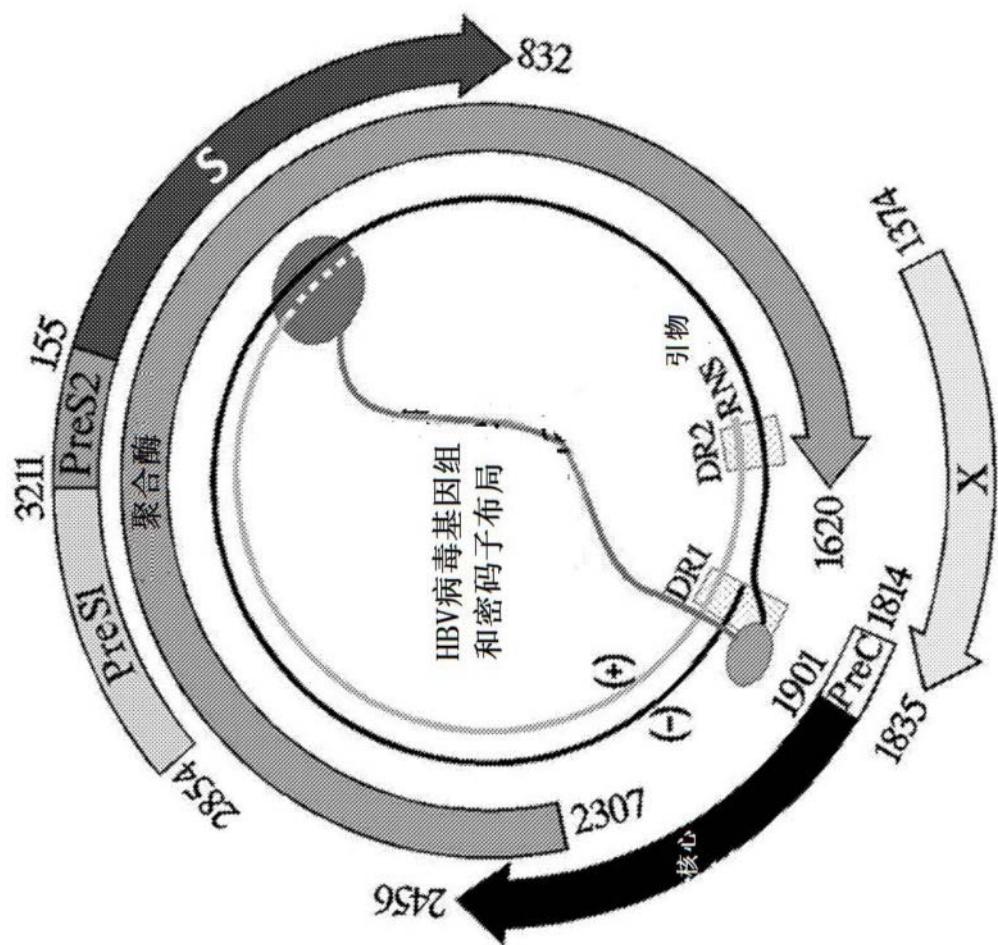


图2A

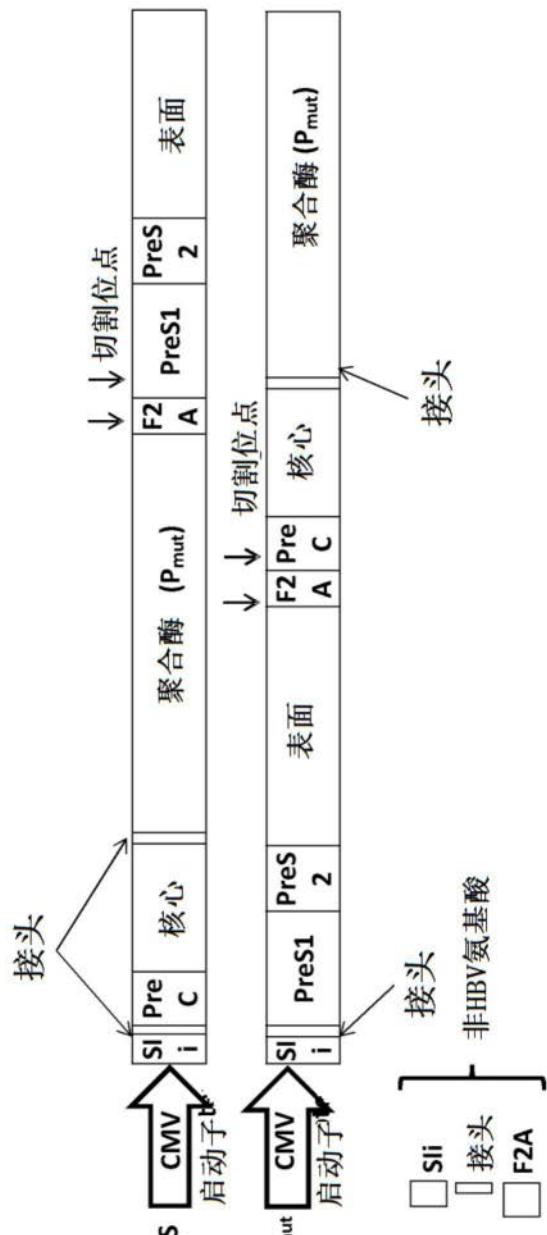


图2B

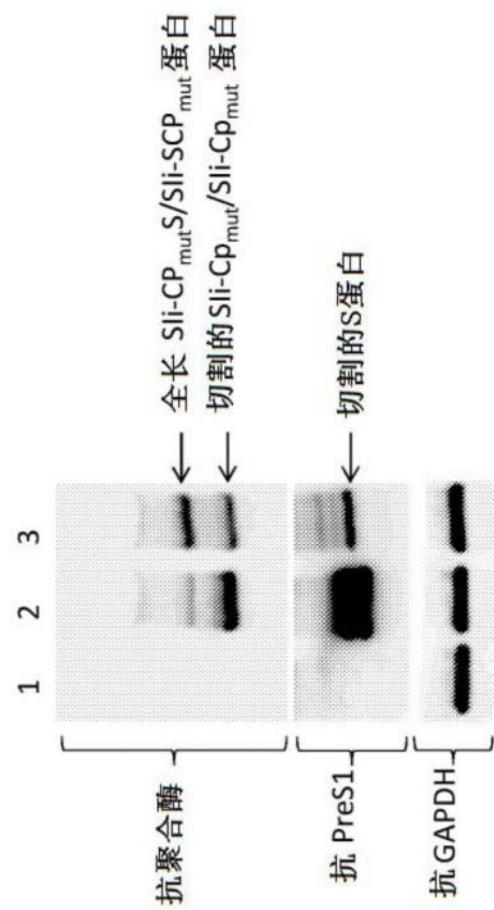


图2C

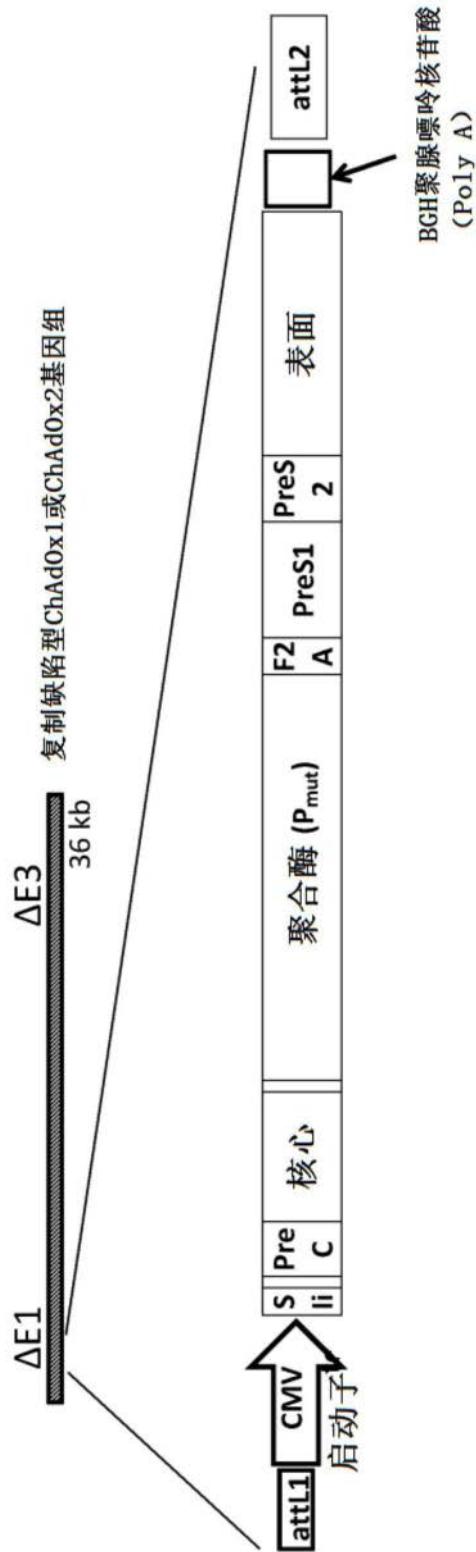


图2D

用 4×10^7 TU的ChAdOx2-SIIi-HBV-CPmutS接种疫苗的BALB/c小鼠的脾细胞应答

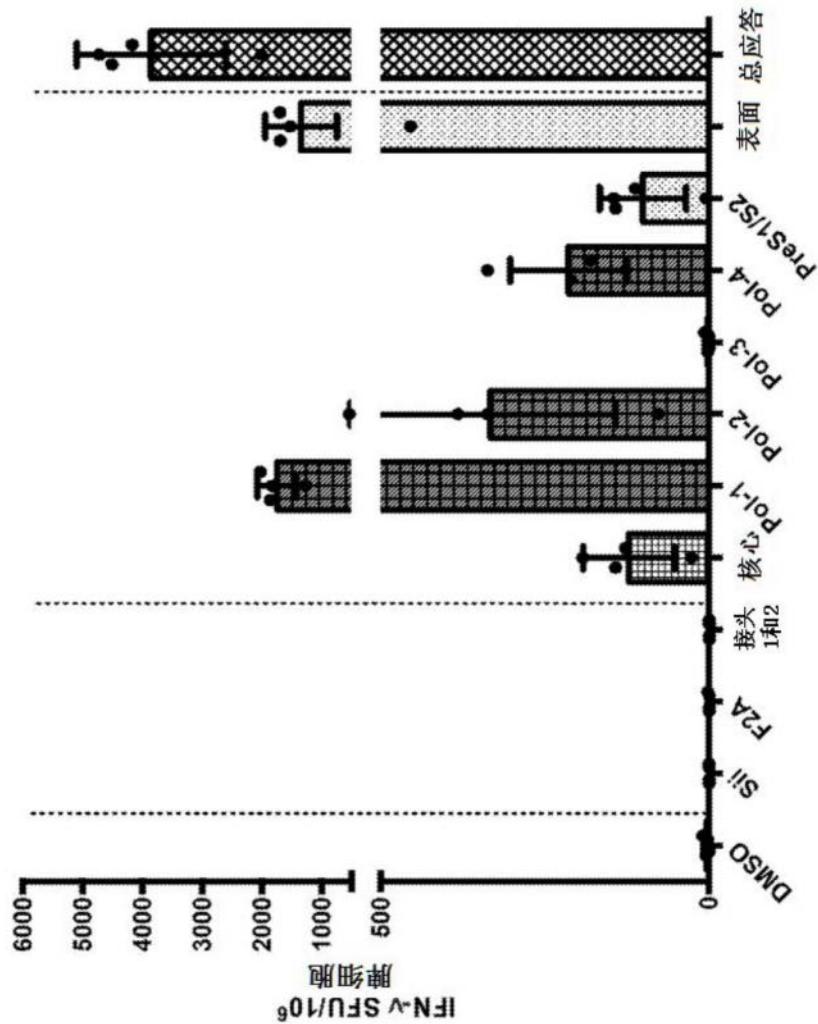


图3A

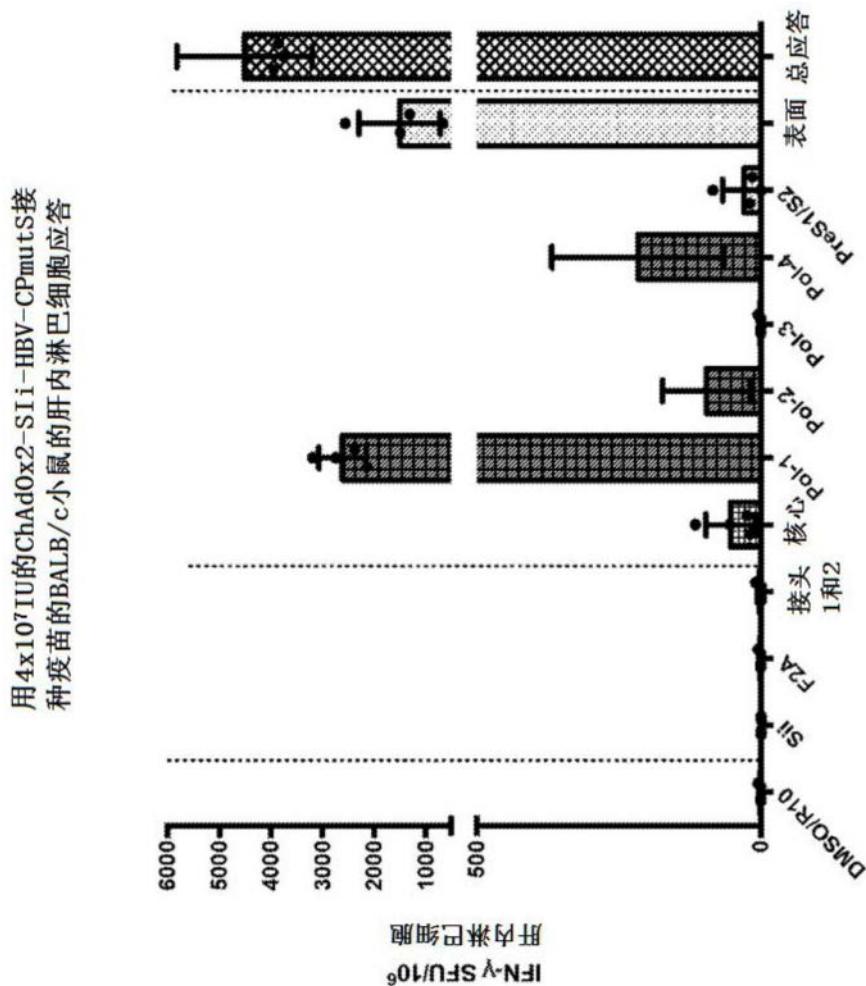


图3B

用 5×10^7 IU 的 ChAd0x2-SI i-HBV-CPmutS 接种疫苗的 CD1 小鼠的脾细胞应答

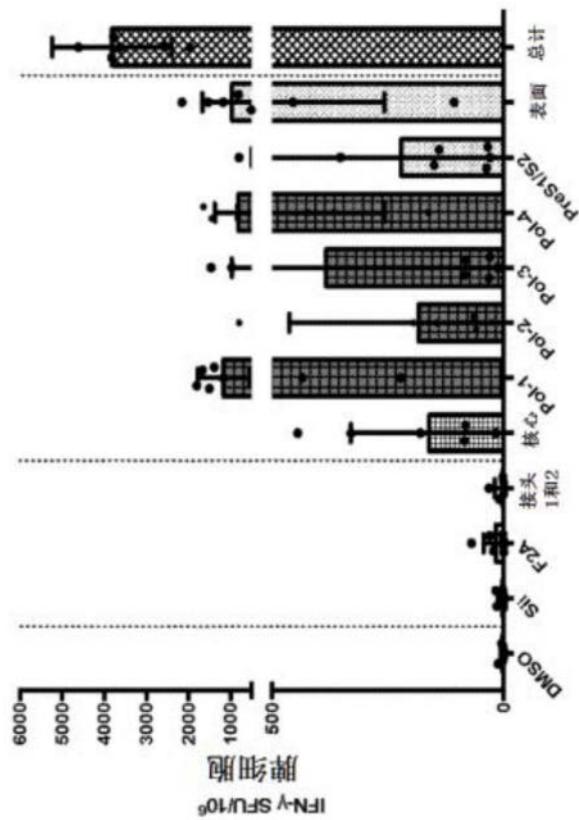


图3C

用 5×10^7 IU的ChAd0x2-SI-i-HBV-CPmutS接种疫苗的CD1小鼠的肝内淋巴细胞应答

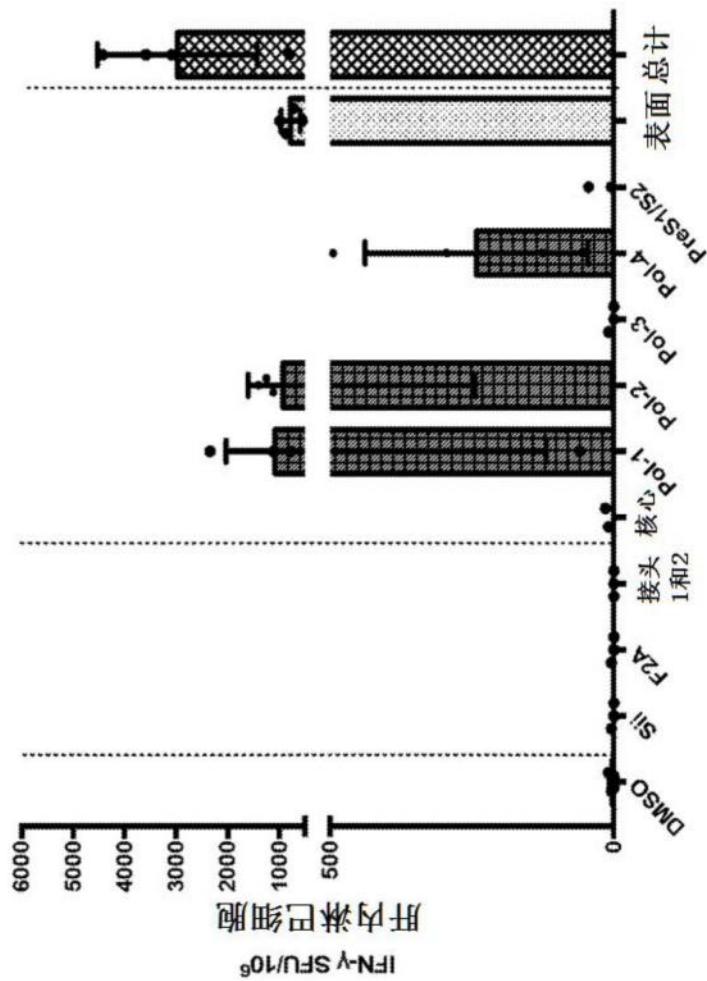


图3D

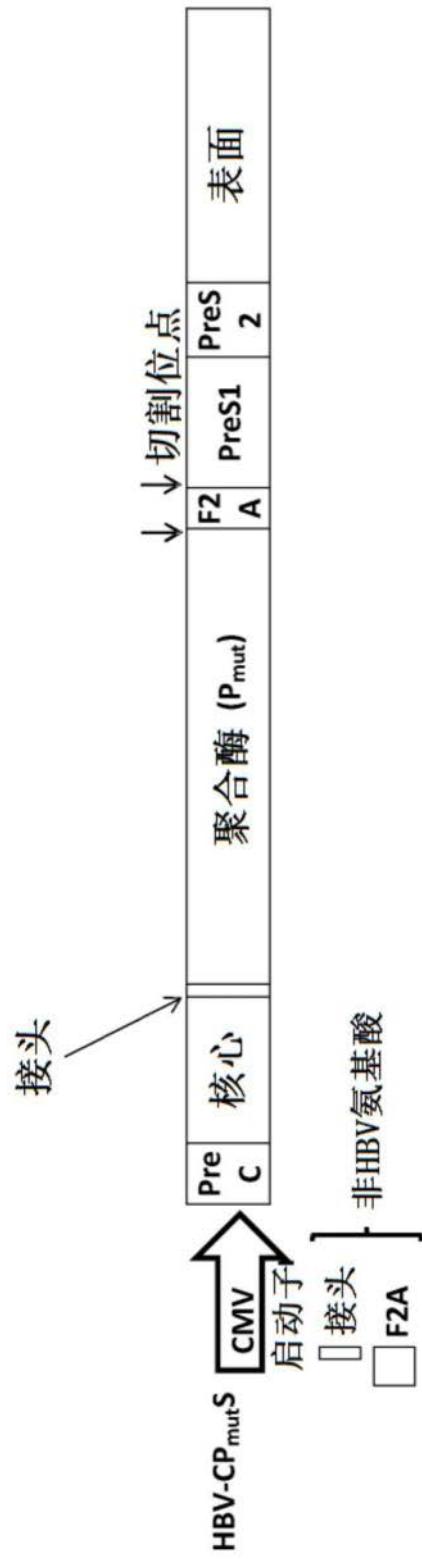


图4A

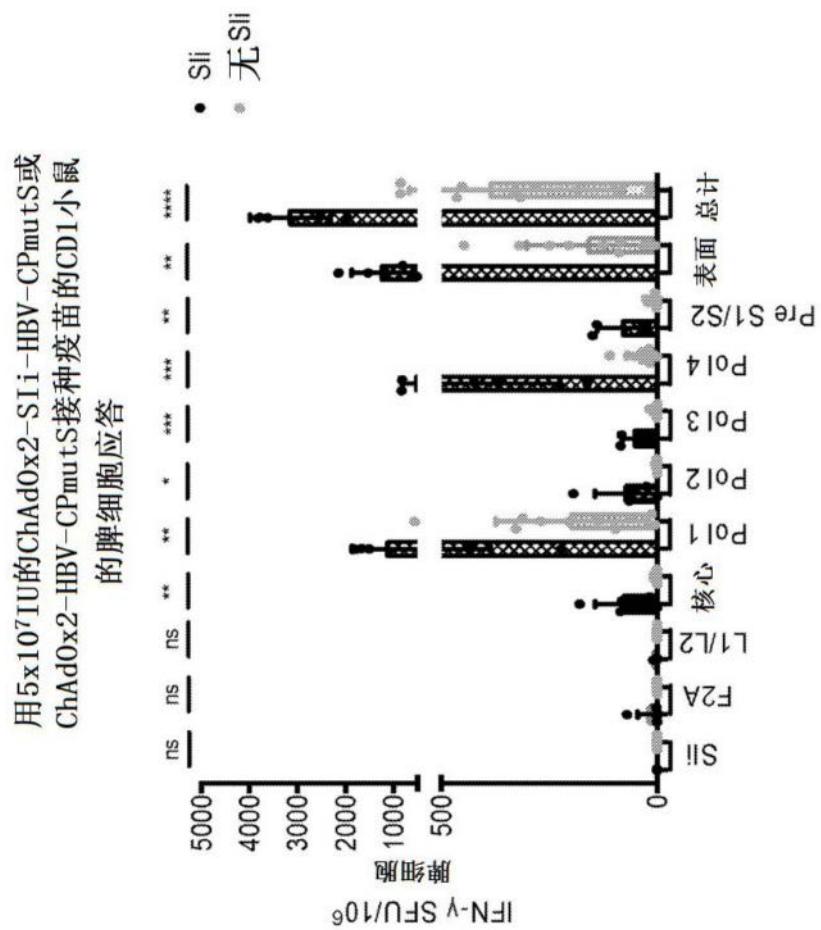


图4B

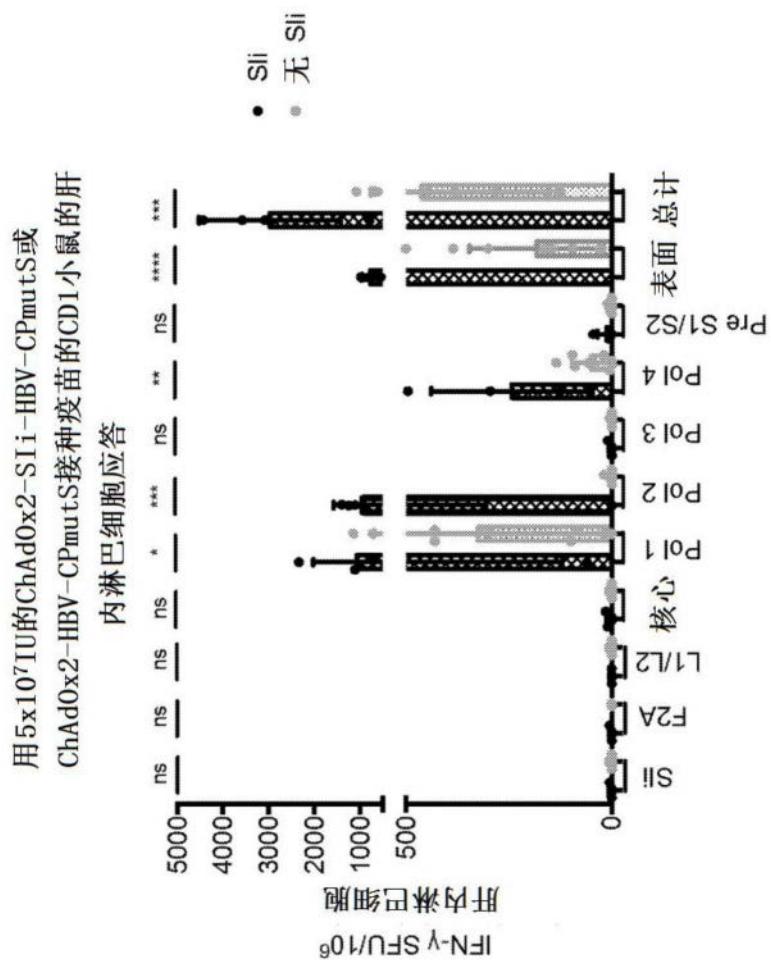


图4C

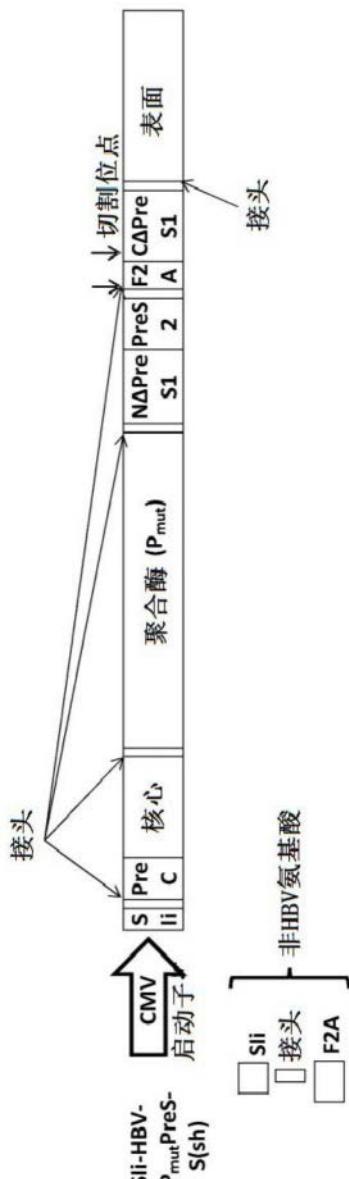


图 5A

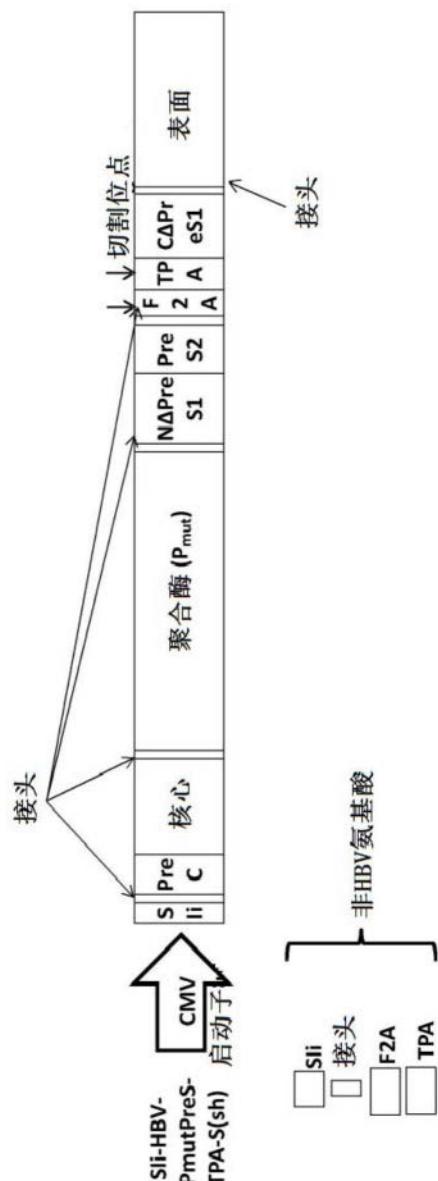


图5B

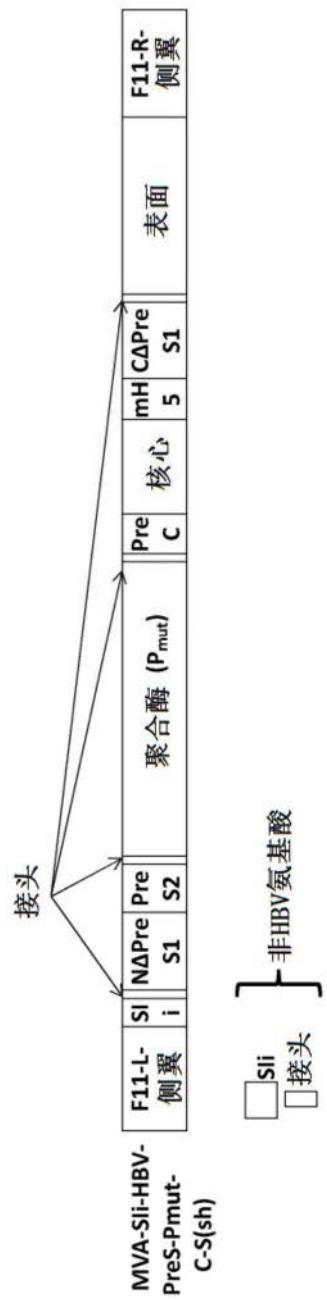


图6A

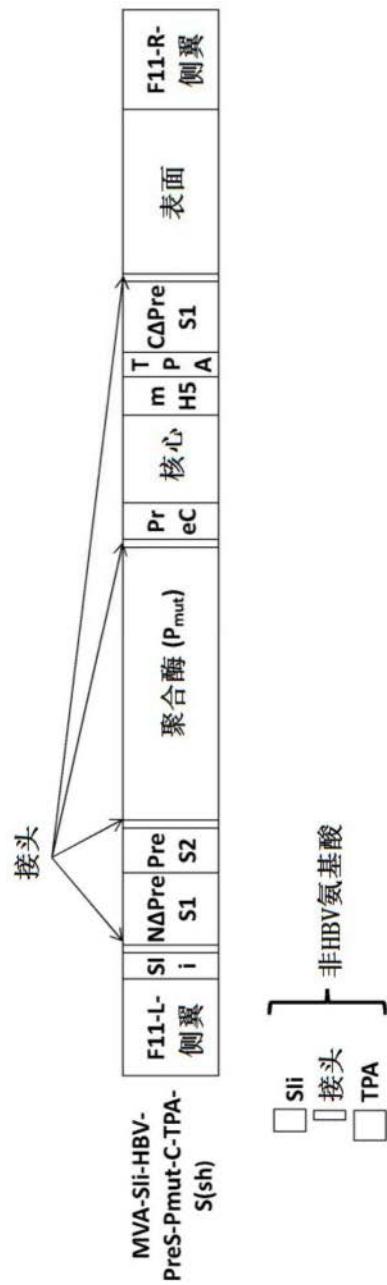


图6B

用 5×10^7 IU的ChAdOx1-SI i-HBV-CPmutS接种疫苗的CD1小鼠的脾细胞应答

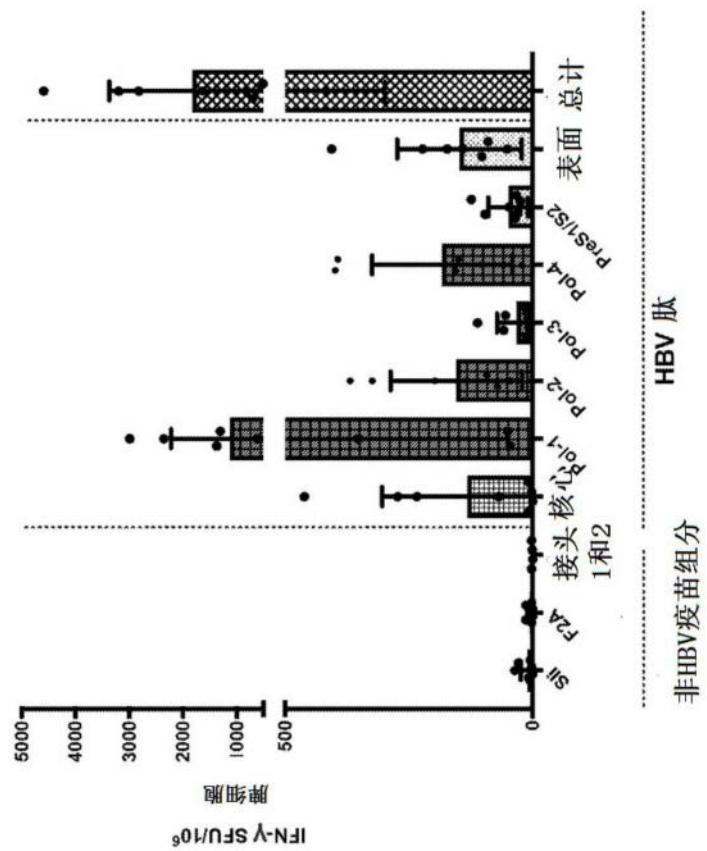


图7

用 5×10^7 IU的ChAdOx2-SIi-HBV-CPmutS和ChAdOx1-HBV-CPmutS接种疫苗的CD1小鼠的脾细胞应答

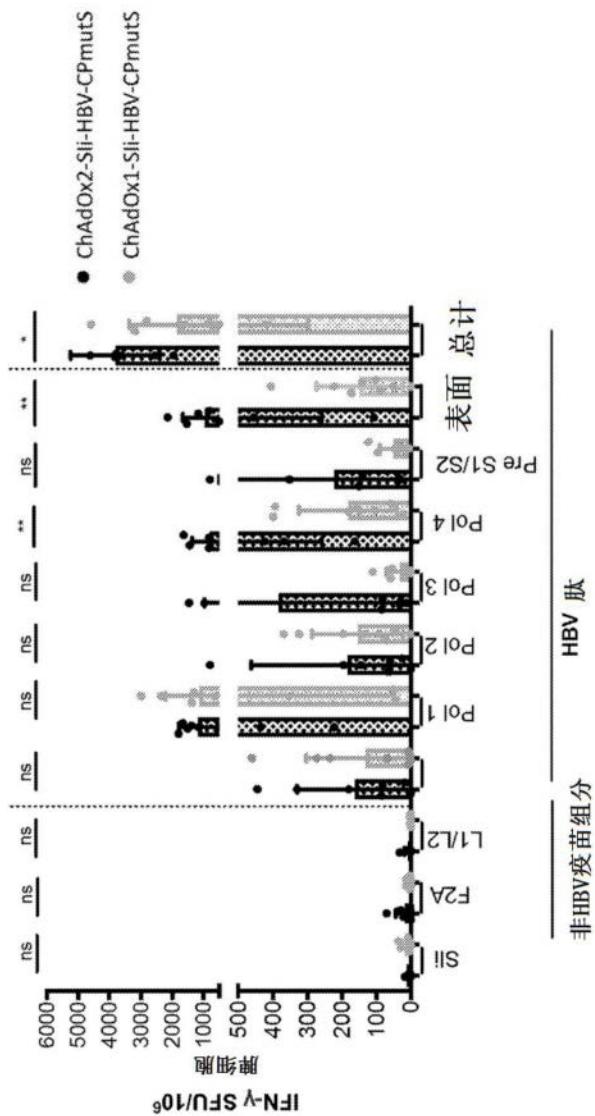


图8

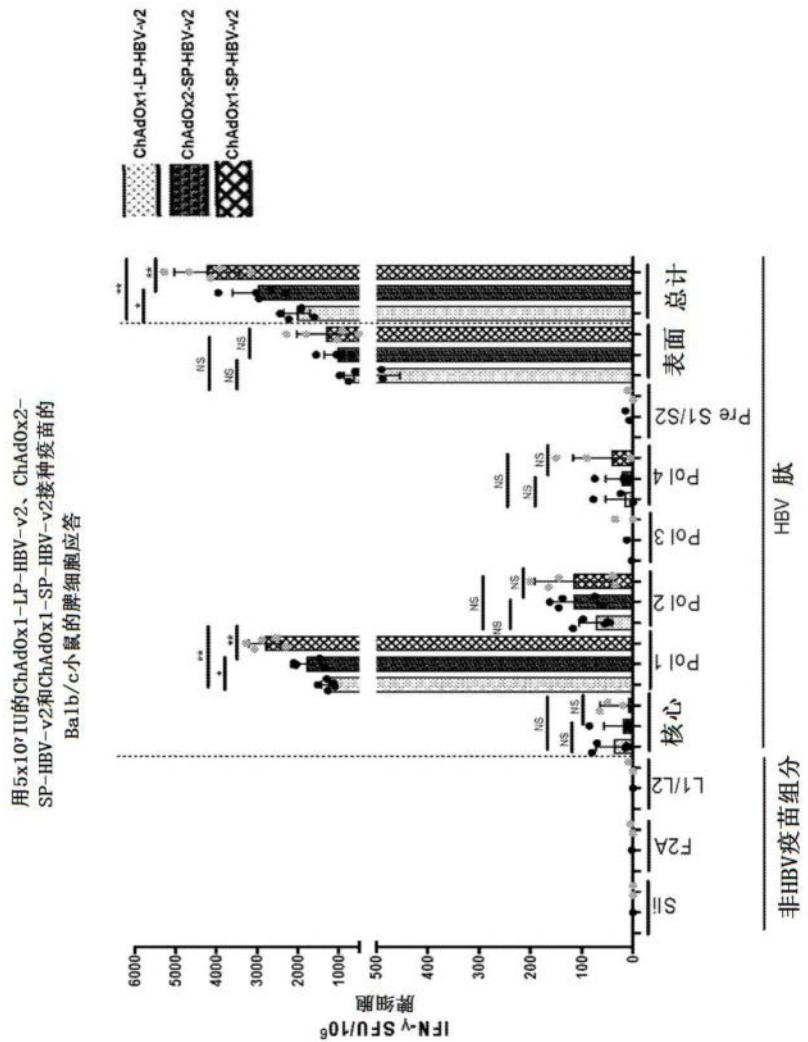


图9

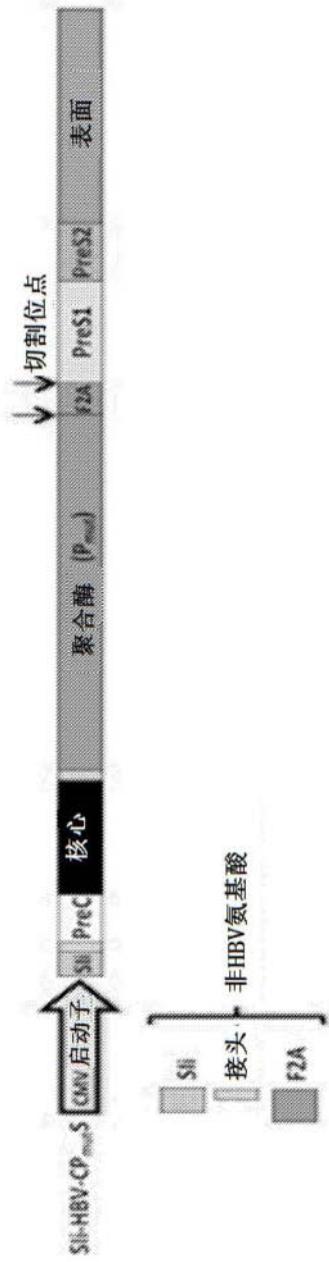


图10A

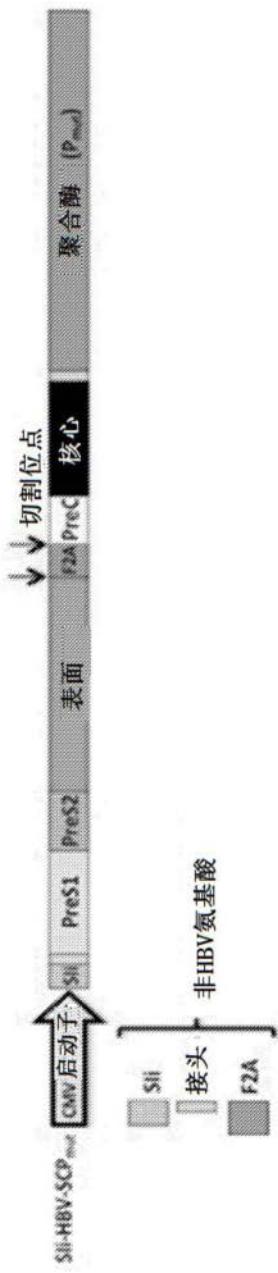


图10B

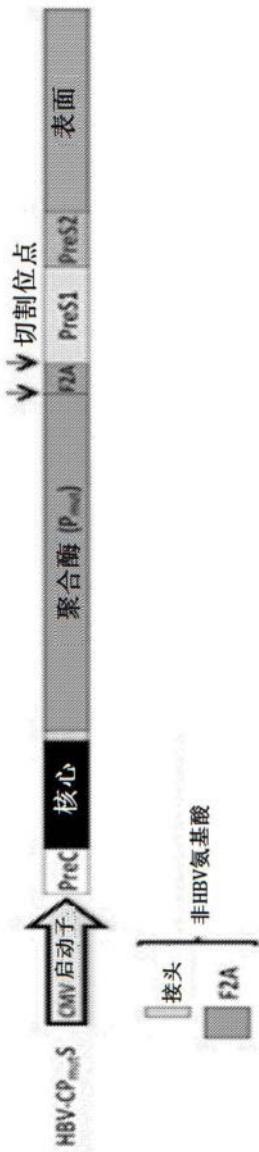


图10C

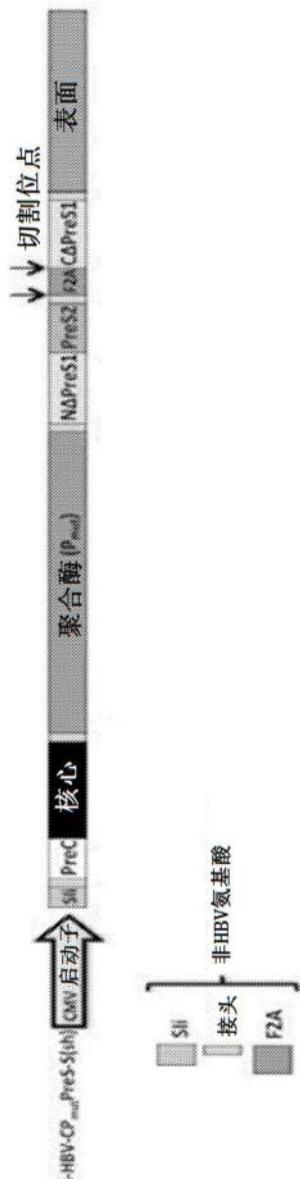


图10D

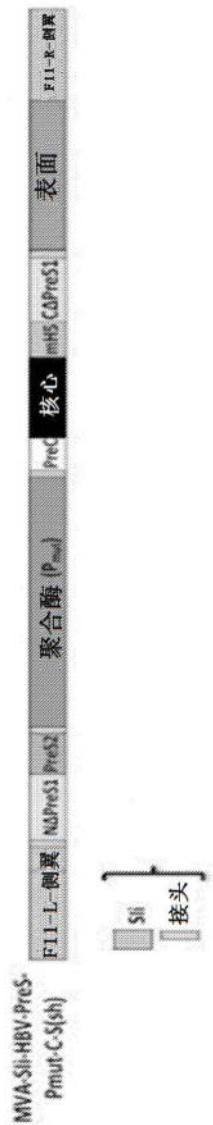


图10E

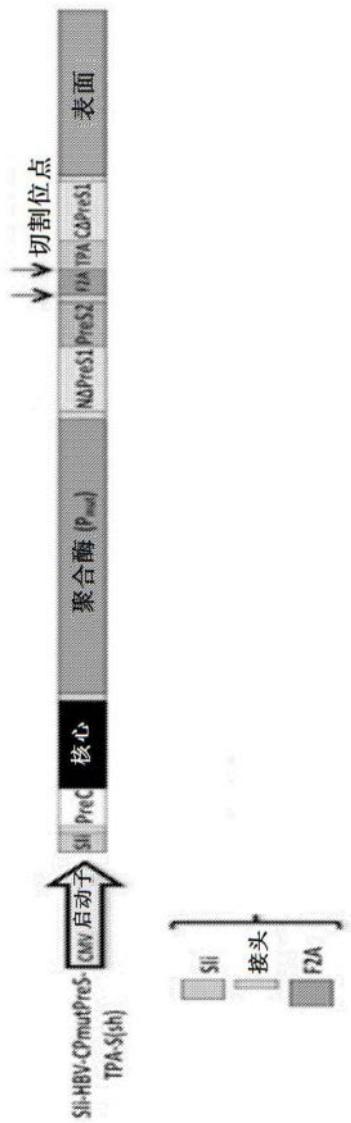


图10F

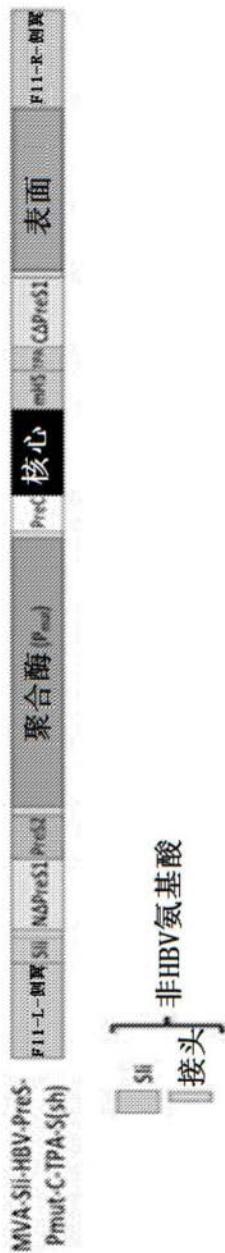


图10G