(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0041079
(43) 공개일자 2022년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/29 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 31/20* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/292 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7001635
(22) 출원일자(국제) 2020년06월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2020/055698
(87) 국제공개번호 WO 2020/255009
국제공개일자 2020년12월24일
(30) 우선권주장
62/862,774 2019년06월18일 미국(US)

(71) 출원인
얀센 사이언시즈 아일랜드 언리미티드 컴퍼니
아일랜드 코 코크 링가스키디 바나헬리
(72) 발명자
호튼, 헬렌
벨기에왕국 비-2340-비어스 투른호우트세베그 30, 얀센파마슈티카 엔브이 내
드 크레우스, 안 마르틴 엠
벨기에왕국 비-2340-비어스 투른호우트세베그 30, 얀센파마슈티카 엔브이 내
반 굴르크, 엘렌 로살리 에이
벨기에왕국 비-2340-비어스 투른호우트세베그 30, 얀센파마슈티카 엔브이 내
(74) 대리인
강철중

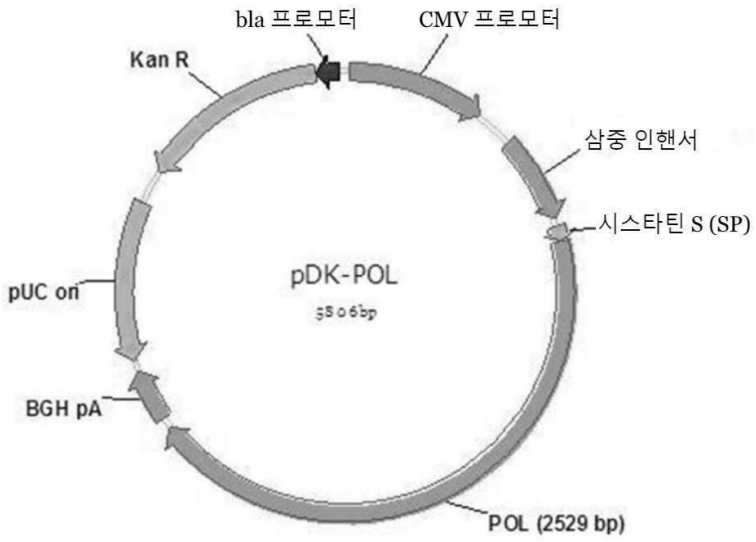
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **B형 간염 바이러스(HBV) 백신 및 항-PD-1 항체의 조합**

(57) 요 약

B형 간염 바이러스(HBV) 백신과 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 치료적 조합물이 기술된다. 구체적으로 만성 HBV 감염을 갖는 개인에서 개시된 치료적 조합물을 사용하여 HBV에 대한 면역 반응을 유도하거나 HBV-유도 질환을 치료하는 방법이 또한 기술된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61P 31/20 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2730/10134 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 데 사용하기 위한 치료적 조합물로서,

i) a) 서열번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원, 및

b) 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자,

c) 서열번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원으로서, 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, HBV 폴리머라제 항원, 및

d) HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자

중 적어도 하나; 및

ii) 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, HBV 폴리머라제 항원 및 절두된 HBV 코어 항원 중 적어도 하나를 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 3

제2항에 있어서, HBV 폴리머라제 항원 및 절두된 HBV 코어 항원을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 4

제1항에 있어서, 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자, 및 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자 중 적어도 하나를 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 5

B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 데 사용하기 위한 치료적 조합물로서,

i) 서열번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자; 및

ii) 서열번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자로서, HBV 폴리머라제 항원이 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, 제2 비-천연 핵산 분자; 및

iii) 각각 서열번호 25, 26 및 27 또는 각각 서열번호 25, 26 및 28의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열번호 29, 30 및 31의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 제1 비-천연 핵산 분자가 절두된 HBV 코어 항원의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 제2 비-천연 핵산 분자가 HBV 폴리머라제 항원의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 바람직하게 신호 서열이 독립적으로 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고, 바람직하게 신호 서열이 독립적으로 서열번호 8 또는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는, 치료적 조합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 절두된 HBV 코어 항원이 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지고;

b) HBV 폴리머라제 항원이 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자가 DNA 분자이고, 바람직하게 DNA 분자가 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 존재하는, 치료적 조합물.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 동일한 비-천연 핵산 분자에 제1 비-천연 핵산 분자 및 제2 비-천연 핵산 분자를 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 10

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 두 개의 상이한 비-천연 핵산 분자에 제1 비-천연 핵산 분자 및 제2 비-천연 핵산 분자를 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 11

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 3에 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 12

제11항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 13

제4항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 5 또는 서열번호 6에 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 5 또는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 서열번호

i) 각각 32, 35, 38, 42, 48 및 53;

ii) 각각 32, 35, 38, 43, 48 및 54;

iii) 각각 32, 36, 38, 44, 49 및 55;

iv) 각각 32, 36, 38, 44, 48 및 56;

v) 각각 32, 36, 38, 45, 50 및 57;

vi) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 53;

vii) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 58;

viii) 각각 32, 35, 39, 43, 48 및 54;

ix) 각각 32, 35, 39, 43, 49 및 59;

x) 각각 32, 35, 39, 45, 48 및 54;

xi) 각각 32, 36, 39, 45, 50 및 57;

xii) 각각 32, 36, 39, 44, 48 및 56; 또는

xiii) 각각 32, 36, 39, 45, 48 및 54

의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 치료적 조합물, 및 B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 데 치료적 조합물을 사용하기 위한 지침서를 포함하는, 키트.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 데 사용하기 위한, 치료적 조합물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 전자 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0002] 본 출원은 EFS-Web을 통해 전자 제출된 ASCII 형식 서열 목록으로서 2020년 6월 15일에 작성되고, 55 kb 크기의 파일명 "065814_14WO1_Sequence_Listing"인 서열 목록을 포함한다. 상기 EFS-Web을 통해 제출된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며 본 명세서에 전체가 참조로 통합된다.

[0003] 관련 출원에 관한 상호 참조

[0004] 본 출원은 2019년 6월 18일자로 출원된 미국 가출원 제62/862,774호의 우선권을 주장하며, 상기 출원의 기재사항은 전체가 본 명세서에 참조로 통합된다.

배 경 기 술

[0005] 발명의 배경

[0006] B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus, HBV)는 4 개의 개방형 해독틀(open reading frame) 및 7 개의 단백질을 인코딩하는 3.2-kb의 작은 간친화성(hepatotropic) DNA 바이러스이다. 대략 2억 4000만 인구가 만성 B형 간염(만성 HBV)에 감염되었으며, 6 개월 이상 동안 혈액 내 지속적 바이러스 및 서브바이러스 입자로 특징지어진다(Cohen et al. J. Viral Hepat. (2011) 18(6), 377-83). 지속적 HBV 감염은 HBV-특이적 T 세포 수용체의 바이러스 펩티드 및 순환 항원에 의한 만성적인 자극을 통해 순환 T 세포 및 간내 HBV-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 소진으로 이어진다. 결과적으로 T 세포 다기능성이 감소된다(즉, IL-2, 종양괴사인자(TNF)-α, IFN-γ 수준 감소, 및 증식 부족).

[0007] HBV 감염에 대한 안전하고 효과적인 예방 백신은 1980년대 이래로 활용 가능하였으며 B형 간염 예방의 중심이다(World Health Organization, Hepatitis B: Fact sheet No. 204 [Internet] 2015 March.). 세계보건기구는 모든 유아의 백신접종, 그리고 B형 간염의 풍토성이 낮거나 중도인 국가에서는 모든 어린이 및 사춘기(18세 미만), 및 특정 취약 개체군 카테고리에 속하는 인구의 백신접종을 권장한다. 백신접종 덕분에 세계 감염률은 극적으로 감소해왔다. 그러나 예방 백신은 수립된 HBV 감염을 치유하지 않는다.

[0008] 만성 HBV는 현재 IFN-α 및 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 유사체로 치료되지만, 바이러스 RNA의 주형, 및 따라서 새로운 비리온으로서 기본적인 역할을 하며 감염된 간세포 내의 세포내 바이러스 복제 중간체, 소위 공유결합 폐환형 DNA(ccc DNA)의 잔존으로 인하여 궁극적 치유는 없다. 유도된 바이러스 특이적 T-세포 및 B-세포 반응이 효과적으로 cccDNA-보유 간세포를 제거할 수 있을 것으로 생각된다. 현재의 HBV 폴리머라제를 표적화하는 요법들은 바이러스 혈증을 억제하지만, 핵에 존재하는 cccDNA 및 관련된 순환 항원의 생산에는 제한된 효과를 제공한다. 가장 철저한 치유 형태는 유기체로부터 HBV cccDNA를 제거하는 것일 수 있지만, 이는 천연 결과로

서 또는 임의의 치료적 개입의 결과로서 모두 관찰된 바 없다. 그러나, 질환 재발은 오로지 심각한 면역억제의 경우에만 발생하며 이는 이후 예방적 치료에 의해 예방될 수 있기 때문에, HBV 표면 항원(HBsAg)의 손실은 임상적으로 치유의 신뢰성 있게 상당한다. 따라서 적어도 임상적 관점에서, HBsAg의 손실은 가장 엄격한 형태의 HBV에 대한 면역 재구성과 연관된다.

[0009] 예를 들어, 유한형 치료 과정의 지속된 치료 중단 반응의 면에서 페길화 인터페론(pegIFN)-α로의 면역 조절은 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 요법과 비교하여 더 나은 것으로 입증되어 왔다. 직접적 항바이러스 효과는 물론, IFN-α는 세포 배양 및 인간화 마우스에서 cccDNA의 후성유전적 억제를 가하여 비리온 생산 및 전사의 감소에 이르게 하는 것으로 보고되었다(Belloni et al. J. Clin. Invest. (2012) 122(2), 529-537). 그러나 이 요법은 여전히 부작용을 안고 있으며 전반적 반응은 상당히 낮은데, 그 이유는 어느 정도 IFN-α가 HBV 특이적 T-세포에 부족한 조절적 영향만을 주기 때문이다. 구체적으로, 치유율은 낮고(< 10%) 독성은 높다. 유사하게, 직접적으로 작용하는 HBV 항바이러스제, 즉 HBV 폴리머라제 억제제인 엔테카비르(entecavir) 및 테노포비르(tenofovir)는 약제 내성 돌연변이 발생에 대한 높은 유전적 장벽 및 간질환 진행에 대한 연속 예방을 갖는 바이러스 억제 유도에서 단일 요법으로서 효과적이다. 그러나, HBsAg 손실 또는 혈청전환에 의해 규정되는 만성 B형 간염의 치유는, 이러한 HBV 폴리머라제 저해제에 의해서는 드물게 달성된다. 따라서, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)에 대한 항레트로바이러스 요법과 유사하게, 이론상 이들 항바이러스제는 간 질환의 재발을 예방하기 위해서는 무한정으로 투여될 필요가 있다.

[0010] 치료적 백신접종은 만성적 감염 환자로부터 HBV를 제거할 잠재성을 갖는다(Michel et al. J. Hepatol. (2011) 54(6), 1286-1296). 많은 전략들이 탐색되어왔지만, 지금까지 치료적 백신접종은 성공적이라고 입증되지 않았다.

발명의 내용

[0011] 발명의 간략한 요약

[0012] 따라서, B형 간염 바이러스(HBV), 특히 만성 HBV의 치료에서 보다 높은 치유율을 갖는 유한형의 내약성이 우수한 치료를 위한 충족되지 않은 의학적 요구가 존재한다. 본 발명은 B형 간염 바이러스(HBV) 감염에 대한 면역반응을 유도하는 치료적 조합물 또는 조성물 및 방법을 제공함으로써 이 요구를 만족시킨다. 본 발명의 면역원적 조성물/조합물 및 방법은 대상체, 예컨대, 만성 HBV 감염을 갖는 대상체에 치료적 면역성을 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0013] 일반적 양태에서, 본 출원은 HBV 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 HBV 감염을 치료하는 데 사용하기 위한 하나 이상의 HBV 항원, 또는 HBV 항원을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 및 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 치료적 조합물 또는 조성물에 관한 것이다.

[0014] 일 구현예에서, 치료적 조합물은

[0015] i) a) 서열번호 2와 적어도 95%, 예컨대, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원,

[0016] b) 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자,

[0017] c) 서열번호 7과 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원으로서, 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, HBV 폴리머라제 항원, 및

[0018] d) HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자

[0019] 중 적어도 하나; 및

[0020] ii) 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0021] 일 구현예에서, 절두된 HBV 코어 항원은 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지고, HBV 폴리머라제 항원은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함한다.

[0022] 일 구현예에서, 치료적 조합물은 HBV 폴리머라제 항원 및 절두된 HBV 코어 항원 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 구현예에서, 치료적 조합물은 HBV 폴리머라제 항원 및 절두된 HBV 코어 항원을 포함한다.

[0023] 일 구현예에서, 치료적 조합물은 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제

1 비-천연 핵산 분자, 및 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 비-천연 핵산 분자는 절두된 HBV 코어 항원의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 제2 비-천연 핵산 분자는 HBV 폴리머라제 항원의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 바람직하게 신호 서열은 독립적으로 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고, 보다 바람직하게 신호 서열은 서열번호 8 또는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 각각 인코딩된다.

[0024] 특정 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1 또는 서열번호 3에 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0025] 특정 구현예에서, 제2 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 5 또는 서열번호 6에 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0026] 특정 구현예에서, 본 발명에 유용한 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 뿐만 아니라 이의 구조, 생산, 생물학적 활성, 치료적 적용 등과 같은 관련 정보는 전체 내용이 본 명세서에 참조로 통합되는 미국 특허 출원 공개 제2017/0121409호(US20170121409)에 기재되어 있다.

[0027] 구현예에서, 치료적 조합물은

[0028] a) 서열번호 2와 적어도 95%, 예컨대, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자;

[0029] b) 서열번호 7과 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자로서, HBV 폴리머라제 항원이 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, 제2 비-천연 핵산 분자; 및

[0030] c) 각각 서열번호 25, 26 및 27 또는 28의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 각각 서열번호 29, 30 및 31의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0031] 바람직하게, 치료적 조합물은 a) 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자; b) 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자; 및 (c) 서열번호 i) 각각 32, 35, 38, 42, 48 및 53; ii) 각각 32, 35, 38, 43, 48 및 54; iii) 각각 32, 36, 38, 44, 49 및 55; iv) 각각 32, 36, 38, 44, 48 및 56; v) 각각 32, 36, 38, 45, 50 및 57; vi) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 53; vii) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 58; viii) 각각 32, 35, 39, 43, 48 및 54; ix) 각각 32, 35, 39, 43, 49 및 59; x) 각각 32, 35, 39, 45, 48 및 54; xi) 각각 32, 36, 39, 45, 50 및 57; xii) 각각 32, 36, 39, 44, 48 및 56; 또는 xiii) 각각 32, 36, 39, 45, 48 및 54의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0032] 바람직하게, 치료적 조합물은 서열번호 1 또는 서열번호 3에 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자, 및 서열번호 5 또는 서열번호 6에 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자를 포함한다.

[0033] 보다 바람직하게, 치료적 조합물은 a) 서열번호 1 또는 서열번호 3의 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자; b) 서열번호 5 또는 서열번호 6의 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자; 및 c) 서열번호 i) 각각 32, 35, 38, 42, 48 및 53; ii) 각각 32, 35, 38, 43, 48 및 54; iii) 각각 32, 36, 38, 44, 49 및 55; iv) 각각 32, 36, 38, 44, 48 및 56; v) 각각 32, 36, 38, 45, 50 및 57; vi) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 53; vii) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 58; viii) 각각 32, 35, 39, 43, 48 및 54; ix) 각각 32, 35, 39, 43, 49 및 59; x) 각각 32, 35, 39, 45, 48 및 54; xi) 각각 32, 36, 39, 45, 50 및 57; xii) 각각 32, 36, 39, 44, 48 및 56; 또는 xiii) 각각 32, 36, 39, 45, 48 및 54의 HCDR1, HCDR2,

HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0034] 구현예에서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자는 DNA 분자이고, 바람직하게 DNA 분자는 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 존재한다.

[0035] 다른 구현예에서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자는 RNA 분자, 바람직하게 mRNA 또는 자기-복제 RNA 분자이다.

[0036] 몇몇 구현예에서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자는 독립적으로 지질 나노입자(LNP)와 제형화된다.

[0037] 다른 일반적 양태에서, 본 출원은 본 출원의 치료적 조합물을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0038] 본 출원은 또한 B형 간염 바이러스(HBV)에 대한 면역 반응 유도에 사용하기 위한 본 출원의 치료적 조합물 또는 키트; 및 B형 간염 바이러스(HBV)에 대한 면역 반응 유도를 위한 의약의 제조에서의 본 출원의 치료적 조합물, 조성물 또는 키트의 용도에 관한 것이다. 상기 용도는 또 다른 면역원적 또는 치료적 제제, 바람직하게 또 다른 HBV 항원 또는 또 다른 HBV 요법제와의 조합물을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 대상체는 만성 HBV 감염을 갖는다.

[0039] 본 출원은 추가로 HBV-유도 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 HBV-유도 질환의 치료에 사용하기 위한 본 출원의 치료적 조합물 또는 키트; 및 HBV-유도 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 HBV-유도 질환의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 본 출원의 치료적 조합물 또는 키트의 용도에 관한 것이다. 상기 용도는 또 다른 치료적 제제, 바람직하게 또 다른 항-HBV 항원과의 조합물을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게, 상기 대상체는 만성 HBV 감염을 가지며, 상기 HBV-유도 질환은 진행성 섬유증(advanced fibrosis), 간경변(cirrhosis), 및 간세포 암종(hepatocellular carcinoma, HCC)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0040] 본 출원은 또한 HBV에 대한 면역 반응을 유도하는 방법 또는 HBV 감염 또는 HBV-유도 질환을 치료하는 방법으로서, 본 발명의 구현예에 따른 치료적 조합물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 다른 양태들, 특징들 및 유리점들은 발명의 상세한 설명 및 그 바람직한 구현예 및 첨부된 청구항을 포함하는 이하의 개시로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0042] 전술한 요지뿐만 아니라 뒤따르는 본 출원의 바람직한 구현예의 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 해석하는 경우 보다 잘 이해될 것이다. 그러나 본 출원은 도면에 나타난 엄밀한 구현예에 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

도 1a 및 도 1b는 본 출원의 구현예에 따른 DNA 플라스미드의 개략적 표현을 나타낸 것이고; 도 1a는 본 출원의 구현예에 따른 HBV 코어 항원을 인코딩하는 DNA 플라스미드를 나타낸 것이고; 도 1b는 본 출원의 구현예에 따른 HBV 폴리머라제(pol) 항원을 인코딩하는 DNA 플라스미드를 나타낸 것이고; HBV 코어 및 pol 항원은 세포로부터의 분비 시 발현된 항원으로부터 절단되는 N-말단 시스타틴 S 신호 펩티드를 갖는 CMV 프로모터의 조절 하에 발현되고; 플라스미드의 전사 조절 요소는 CMV 프로모터와 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 사이에 위치한 인핸서 서열 및 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 하류에 위치한 bGH 폴리아데닐화 서열을 포함하고; 제2 발현 카세트는 Amp(bla) 프로모터의 조절 하의 카나마이신 내성 유전자를 포함하는 역 배향의 플라스미드에 포함되고; 복제 기점(pUC)는 또한 역 배향에 포함된다.

도 2a 및 도 2b는 본 출원의 구현예들에 따른 아데노바이러스 벡터의 발현 카세트의 개략적 표현이고; 도 2a는 CMV 프로모터, 인트론(ApoAI 제2 인트론을 함유하는, 인간 ApoAI 유전자(GenBank 수탁 X01038 염기쌍 295 - 523) 유래의 단편), 인간 면역글로불린 분비 신호, 뒤이어 절두된 HBV 코어 항원을 위한 코딩 서열 및 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 절두된 HBV 코어 항원을 위한 발현 카세트를 나타내고; 도 2b는 HBV 폴리머라제 항원에 작동적으로 연결된 절두된 HBV 코어 항원의 융합 단백질을 위한 발현 카세트를 나타내며, 이는 달리 HBV 항원을 제외하고는 절두된 HBV 코어 항원을 위한 발현 카세트와 동일하다.

도 3은 실시예 3에 기술된 바와 같은 HBV 코어 항원 또는 HBV pol 항원을 발현하는 상이한 DNA 플라스미드로 면역화된 Balb/c 마우스의 ELISPOT 반응을 나타낸 것이고; 다양한 백신접종된 동물 그룹으로부터 단리된 비장세포를 자극하기 위해 사용된 펩티드 풀은 회색 스케일로 표시되고; 반응성-T 세포의 수는 10^6 개 비장세포 당 반점

-형성 세포(spotforming cell, SFC)로서 표현되어 있는 y-축에 나타나 있다.

도 4a 및 도 4b는 본 출원의 구현예에 따른 항-PD-1 또는 동종형 항체와 함께 본 출원의 구현예에 따른 DNA 플라스미드를 투여한(d0 및 d21에) 마우스의 ELISPOT에 의해 측정된 면역 반응을 나타낸 것이다. 도 4a는 첫 백신접종 후 1 주에 시작하여(즉, d7, d14, d21) 항-PD-1(검은색) 또는 동종형(회색)의 3 회 주사를 받은 마우스에 대한 결과를 나타낸 것이고; 도 4b는 첫 백신접종과 동시에 그리고 이후 7 일 마다(즉, d0, d7, d14, d21) 항-PD-1(검은색) 또는 동종형(회색)으로 처리된 마우스에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 5a, 도 5b, 도 5c, 도 5d, 도 5e 및 도 5f는 본 출원의 구현예에 따른 항-PD-1 또는 동종형 항체와 함께 본 출원의 구현예에 따른 DNA 플라스미드를 투여한(d0 및 d21에) 마우스로부터 단리된 비장세포의 ICS에 의해 측정된 면역 반응을 나타낸 것이고, 여기서 결과는 평균 +/- SEM로 표현되어 있고; 비장세포는 코어(도 5a 및 도 5d), pol1(도 5b 및 도 5e) 또는 pol2(도 5c 및 도 5f)로 6 시간 동안 자극되었고, IFN-γ, IL-2 또는 TNF-α에 대한 반응이 이후 측정되었다. 도 5a, 도 5b 및 도 5c는 첫 백신접종 후 1 주에 시작하여(즉, d7, d14, d21) 항-PD-1(검은색) 또는 동종형(회색)의 3 회 주사를 받은 마우스로부터 단리된 비장세포에 대한 결과를 나타낸 것이고; 도 5d, 도 5e 및 도 f는 첫 백신접종과 동시에 그리고 이후 7 일 마다(즉, d0, d7, d14, d21) 항-PD-1(검은색) 또는 동종형(회색)으로 처리된 마우스에 대한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 출원의 구현예에 따른 항-PD-1 또는 동종형 항체와 함께 본 출원의 구현예에 따른 DNA 플라스미드를 투여한(d28 및 d49에) 마우스로부터 단리된 간내 림프구(IHL)에서 CD8 T-세포의 증식 능력을 나타낸 것이고, 결과는 평균 +/- SEM로 표현되어 있다.

도 7은 본 출원의 구현예에 따른 항-PD-1 또는 동종형 항체와 함께 본 출원의 구현예에 따른 DNA 플라스미드를 투여한(d28 및 d49에) 마우스로부터 단리된 비장세포에서 CD8 T-세포의 증식 능력을 나타낸 것이고, 결과는 평균 +/- SEM로 표현되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 발명의 상세한 설명

[0044] 다양한 간행물, 논문 및 특허가 배경 및 명세서 전반에 걸쳐 인용되거나 기재되고, 이들 참고문헌은 각각 그 전체가 본 명세서에 참조로서 통합된다. 본 명세서에 포함된 문헌, 행동, 물질, 장치, 또는 물품 등의 논의는 본 발명의 맥락을 제공하는 목적을 위한 것이다. 이러한 논의는 이들 대상의 임의의 것이나 전부가 개시되거나 청구되는 임의의 발명에 대해 선행 발명의 일부를 형성한다는 인정이 아니다.

[0045] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 다르게는, 본 명세서에서 사용되는 특정 용어는 명세서에 나타낸 의미를 갖는다. 본 명세서에서 인용되는 모든 특허, 특허 출원 공보 및 간행물은 본원에 완전히 명시된 것처럼 참조로 통합된다.

[0046] 본 명세서 및 첨부되는 청구항에서 사용되는 단수 형태인 부정관사 및 정관사는 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한 복수의 대상을 포함함이 주지되어야 한다.

[0047] 달리 나타내지 않는 한, 일련의 요소들 앞에 있는 "적어도"라는 용어는 일련의 모든 요소들을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 당업자는 통상의 실험만을 사용하여 본원에 기술된 본 발명의 구체적 구현예에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 그러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0048] 본 명세서 및 이하의 청구항 전반에서, 문맥상 달리 요구하지 않는 한, "포함하다(comprise)" 라는 단어 및 "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"과 같은 활용형은 명시된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 그룹을 배제하지 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함하는"은 본 명세서에서 용어 "함유하는(containing)" 또는 "포함하는(including)" 또는 때로는 용어 "갖는(having)"과 함께 사용될 때 대체될 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 "~로 이루어지는(consisting of)"을 사용할 때 청구항 구성요소에서 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본 명세서에 사용될 때, "본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"은 청구항의 기본 및 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 재료 또는 단계를 배제하지 않는다. "포함하는(comprising)", "함유하는(containing)", "포함하는(including)" 및 "갖는(having)"의 전술한 임의의 용어는 본 출원의 양태 또는 구현예의 문맥에서 사용될 때마다 개시의 범위를 변경하기 위해 "이루어진

(consisting of)" 또는 "본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"의 용어로 대체할 수 있다.

[0050] 본 명세서에 사용되는, 여러 언급된 요소들 간의 연결 용어 "및/또는"은 개별 옵션과 결합된 옵션 둘 다를 포괄하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 두 요소가 "및/또는"으로 결합된 경우, 첫 번째 옵션은 두 번째 요소가 없는 첫 번째 요소가 적용될 수 있음을 나타낸다. 두 번째 옵션은 첫 번째 요소 없이 두 번째 요소가 적용될 수 있음을 나타낸다. 세 번째 옵션은 첫 번째 요소와 두 번째 요소가 함께 적용될 수 있음을 나타낸다. 이들 옵션들 중 어느 하나는 의미 내에 속하는 것으로 이해되고, 따라서 본 명세서에서 사용되는 "및/또는"이라는 용어의 요구 사항을 만족시킨다. 하나 보다 많은 옵션에 대한 동시 적용 가능성은 또한 그 의미 내에 해당되므로 "및/또는"이라는 용어의 요구 사항을 만족시키는 것으로 이해된다.

[0051] 달리 언급되지 않는 한, 본 명세서에 기술된 농도 또는 농도 범위와 같은 임의의 수치 값은 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 수치 값은 전형적으로, 인용된 값의 ± 10%를 포함한다. 예를 들어, 1 mg/mL의 농도는 0.9 mg/mL 내지 1.1 mg/mL를 포함한다. 마찬가지로, 1 mg/mL 내지 10 mg/mL의 농도 범위는 0.9 mg/mL 내지 11 mg/mL를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 수치 범위의 사용은 문맥상 명백히 달리 나타내지 않은 한, 모든 가능한 하위 범위, 상기 범위 내의 정수를 포함한 그 범위 내의 모든 개별 수치 값 및 그 값의 분수를 명백히 포함한다.

[0052] 아미노산 서열과의 관계에서 사용될 경우 문구 "퍼센트(%) 서열 동일성" 또는 "% 동일성" 또는 "와 % 동일한"은 아미노산 서열 전체 길이를 이루는 아미노산 잔기의 개수와 비교하여 둘 이상의 정렬된 아미노산 서열의 동일한 아미노산의 매칭("히트") 개수를 기술한다. 달리 말하면, 둘 이상의 서열을 위해, 서열이 기술 분야에 알려져 있는 서열 대비 알고리즘을 이용하여 측정된 최대 유사성을 위해 비교 및 정렬될 경우, 또는 수동으로 정렬되고 시각적으로 검사될 경우, 정렬을 이용하여, 동일한 아미노산 잔기의 백분율(예를 들어, 아미노산 서열 총장에 대한 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성)가 판별될 수 있다. 따라서, 대비하여 서열 동일성을 판별할 서열은 아미노산의 치환(들), 삽입(들) 또는 결실(들)에 의해 다를 수 있다. 숙련자에게 단백질 서열을 정렬하기 위한 적합한 프로그램이 알려져 있다. 단백질 서열의 서열 동일성 백분율은, 예컨대, CLUSTALW, Clustal Omega, FASTA 또는 BLAST와 같은 프로그램으로, 예를 들어, NCBI BLAST 알고리즘(Altschul SF, et al (1997), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)을 사용하여 판별될 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 둘 이상의 요법제 또는 구성요소를 대상체에게 투여하는 문맥에서 사용되는 용어 및 문구 "조합으로", "와 조합하여", "공동-전달" 및 "와 함께 투여"는 둘 이상의 요법제 또는 구성요소, 예컨대, 두 개의 벡터, 예를 들어, DNA 플라스미드, 펩티드 또는 치료적 조합물 및 애주번트의 일제 투여(simultaneous administration) 또는 후속 투여를 지칭한다. 일제 투여(simultaneous administration)"는 둘 이상의 요법제 또는 구성요소를 적어도 같은 날 내에 투여하는 것일 수 있다. 두 개의 구성요소가 "함께 투여" 또는 "조합으로 투여"되는 경우, 이들은 개별 조성물 내에 순차적으로 짧은 시간 간격, 예컨대, 24 시간, 20 시간, 16 시간, 12 시간, 8 시간 또는 4 시간 이내에, 또는 1 시간 이내에 투여될 수 있거나, 이들은 단일 조성물 내에 동시에 투여될 수 있다. "후속 투여"는 동일한 날에 또는 별개의 날에 둘 이상의 요법제 또는 구성요소를 투여하는 것일 수 있다. 용어 "와 조합으로"의 사용은 요법제 또는 구성요소가 대상체에게 투여되는 순서를 제한하지 않는다. 예를 들어, 제1 요법제 또는 구성요소(예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 제1 DNA 플라스미드)는 제2 요법제 또는 구성요소(예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 제2 DNA 플라스미드), 및/또는 제3 요법제 또는 구성요소(예를 들어, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편)의 투여에 앞서(예를 들어, 5 분 내지 1 시간 전), 이와 수반하여 또는 일제히, 또는 이후(예를 들어, 5 분 내지 1 시간 후)에 투여될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 제1 요법제 또는 구성요소(예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 제1 DNA 플라스미드), 제2 요법제 또는 구성요소(예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 제2 DNA 플라스미드), 및 제3 요법제 또는 구성요소(예를 들어, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편)는 동일 조성물로 투여된다. 다른 구현예에서, 제1 요법제 또는 구성요소(예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 제1 DNA 플라스미드), 제2 요법제 또는 구성요소(예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 제2 DNA 플라스미드), 및 제3 요법제 또는 구성요소(예를 들어, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편)는 별개의 조성물로, 예컨대, 두 개 또는 세 개의 별개의 조성물로 투여된다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 "비-천연" 핵산 또는 폴리펩티드는 자연에서 발생하지 않은 핵산 또는 폴리펩티드를 지칭한다. "비-천연" 핵산 또는 폴리펩티드는 실험실 및/또는 제조 환경에서 합성, 처리, 제작 및/또는 그 외 조작될 수 있다. 몇몇 경우, 비-천연 핵산 또는 폴리펩티드는 처리 전 천연 핵산 또는 폴리펩티드에 존재하지 않는 물성을 나타내도록 처리, 프로세싱 또는 조작되어 천연 핵산 또는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "비-천연" 핵산 또는 폴리펩티드는 이는 발견된 자연 공급원으로부터 단리되거나 분리된 핵산 또는 폴리펩티드일 수 있으며, 이것은 자연 공급원에 연합되었던 서열에 대한 공유결합을 결여한다. "비-천연" 핵

산 또는 폴리펩티드는 재조합적으로 또는 다른 방법, 예컨대, 화학적 합성을 통해 제조될 수 있다.

[0055] 본 명세서에 사용되는 "대상체"는 그에 대해 본 출원의 구현예에 따른 방법에 의해 처치될 것이거나 처치된 임의의 동물, 바람직하게 포유동물, 가장 바람직하게 인간을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "포유동물"는 임의의 포유동물를 포괄한다. 포유동물의 예는 소, 말, 양, 돼지, 고양이, 개, 마우스, 래트, 토끼, 기니아피그, 비-인간 영장류(non-human primate, NHP), 예컨대, 원숭이 또는 유인원 등, 보다 바람직하게 인간을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동적으로 연결된"은 그렇게 기술된 구성요소가 의도된 방식으로 기능할 수 있도록 하는 관계에 있는 연결 또는 병치를 지칭한다. 예를 들어, 관심 핵산 서열에 작동적으로 연결된 조절 서열은 관심 핵산 서열의 전사를 지시할 수 있거나, 관심 아미노산 서열에 작동적으로 연결된 신호 서열은 관심 아미노산 서열을 막을 넘어 분비 또는 이동시킬 수 있다.

[0057] 본 출원의 독자를 돕기 위해, 본 기술은 다양한 단락 또는 섹션으로 분리되거나, 본 출원의 다양한 구현예를 지시한다. 이러한 분리는 단락 또는 섹션 또는 구현예의 내용을 다른 단락 또는 섹션 또는 구현예의 내용으로부터 분리시키는 것으로 간주되어서는 안된다. 반대로, 당업자는 이 기술이 광범위하게 적용되며 고려될 수 있는 다양한 섹션, 단락 및 문장의 모든 조합을 포함한다는 것을 이해할 것이다. 임의의 구현예에 대한 논의는 단지 예시적인 것으로 의도되며 청구항을 포함하는 본 개시의 범위가 이들 예시로 제한됨을 제안하려는 의도가 아니다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 본 출원의 HBV 벡터(예를 들어, 플라스미드 DNA 또는 바이러스 벡터)의 구현예는 특정 순서로 배열된 소정 프로모터 서열, 인핸서 또는 조절 서열, 신호 펩티드, 및 HBV 항원의 코딩 펩티드, 폴리아데닐화 신호 서열 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 특정 성분을 포함할 수 있으나, 당업자는 본 명세서에 개시된 개념이 본 출원의 HBV 벡터에 사용될 수 있는 다른 순서로 배열된 다른 성분에도 동일하게 적용될 수 있음을 이해할 것이다. 본 출원은 특정 조합이 명시적으로 기술되거나 아니거나, 본 출원의 HBV 벡터에 사용될 수 있는 임의의 서열을 갖는 임의의 조합으로 임의의 적용 가능한 성분의 사용을 고려한다. 본 발명은 일반적으로 하나 이상의 HBV 항원 및 적어도 하나의 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 치료적 조합물에 관한 것이다.

[0058] **B형 간염 바이러스(HBV)**

[0059] 본 명세서에서 사용되는 "B형 간염 바이러스" 또는 "HBV"는 헤파드나바이러스과 패밀리의 바이러스를 지칭한다. HBV는 4 개의 개방형 해독틀 및 7 개의 단백질을 인코딩하는 작은(예를 들어, 3.2-kb) 간친화성 DNA 바이러스이다. HBV에 의해 인코딩되는 7 개의 단백질은 소형(S), 중형(M), 및 대형(L) 표면 항원(HBsAg) 또는 외피(Env) 단백질, 프리-코어 단백질(pre-Core protein), 코어 단백질, 바이러스 폴리머라제(Pol) 및 HBx 단백질을 포함한다. HBV는 3 개의 표면 항원, 또는 외피 단백질, L, M 및 S을 발현하며, S는 가장 작고 L이 가장 크다. M 및 L 단백질의 엑스트라 도메인은 각각 Pre-S2 및 Pre-S1으로 명명된다. 코어 단백질은 바이러스 뉴클레오캡시드의 서브유닛이다. Pol은 감염된 간세포의 세포질에 국부화된 뉴클레오캡시드에서 일어나는 바이러스 DNA(역전사효소, RNaseH 및 프라이머) 합성을 위해 필요하다. 프리코어(PreCore)는 소위 B형 간염 e-항원(HBeAg)와 같이, N-말단 신호 펩티드를 가지며 감염된 세포로부터 분비되기 전에 그 N 및 C 말단에서 단백분해적 프로세싱된 코어 단백질이다. HBx 단백질은 공유 결합 폐환형 DNA(cccDNA)의 효율적인 전사를 위해 필요하다. HBx는 바이러스 구조 단백질이 아니다. HBV의 모든 바이러스 단백질은 mRNA를 공유하는 코어 및 폴리머라제 이외에 그 자신의 mRNA를 갖는다. 단백질 프리코어 이외에, 모든 HBV 바이러스 단백질은 모두 후-전사 단백분해 프로세싱을 거치지 않는다.

[0060] HBV 비리온은 바이러스 외피, 뉴클레오캡시드 및 부분적 이중 가닥 DNA 게놈의 단일 카피를 포함한다. 뉴클레오캡시드는 코어 단백질의 120 이량체를 포함하며, S, M 및 L 바이러스 외피 또는 표면 항원 단백질이 내포된 캡시드 멤브레인에 의해 싸여 있다. 세포 내로 진입한 후, 바이러스는 탈각되고 공유 결합된 바이러스 폴리머라제를 갖는 캡시드-함유 이완된 환형 DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)는 핵으로 이동한다. 이 공정 중 코어 단백질의 포스포릴화는 핵 국재화 신호(nuclear localization signal, NLS)를 노출시켜 캡시드의 소위 임포틴(importin)과의 상호작용을 가능하게 하는 구조적 변화를 유도한다. 이들 임포틴은 코어 단백질이, 캡시드가 분해되는 핵공 복합체(nuclear pore complex)에 결합하는 것을 매개하며, 폴리머라제/rcDNA 복합체는 핵 내로 방출된다. 핵 내에서 rcDNA는 탈단백질되고(폴리머라제 제거) 숙주 DNA 복구 기구에 의해, 이로부터 중복 전사체가 HBeAg, HBsAg, 코어 단백질, 바이러스 폴리머라제 및 HBx 단백질을 인코딩하는 공유 결합 폐환형 DNA(cccDNA) 게놈으로 전환된다. 코어 단백질, 바이러스 폴리머라제, 및 전-게놈 RNA(pre-genomic RNA, pgRNA)은 세포질에 연합하고 미성숙 pgRNA-함유 캡시드 입자 내로 자가조립되어, 추가적으로 성숙 rcDNA-캡시드로

전환되고, 피복되어 감염성 바이러스 입자로서 분비되거나 핵으로 반송되어 안정된 cccDNA 풀을 보충 및 유지하는 둘 다의 공통 중간체로서 기능한다.

[0061] 지금까지, HBV는 외피 단백질 상에 존재하는 항원성 에피토프를 기초로 4가지 혈청형(adr, adw, ayr, ayw)으로 구분되고, 바이러스 게놈의 서열을 기초로 8가지 유전자형(A, B, C, D, E, F, G, 및 H)으로 구분되었다. HBV 유전자형은 상이한 지리적 영역에 따라 분포된다. 예를 들어, 아시아에서 가장 보편적인 유전자형은 유전자형 B 및 C 이다. 유전자형 D는 아프리카, 중동 및 인도에서 우세한 반면, 유전자형 A는 북부 유럽, 사하라 이남 아프리카, 및 서부 아프리카에 널리 퍼져있다.

[0062] **HBV 항원**

[0063] 본 명세서에서 사용되는 용어 "HBV 항원", "HBV의 항원성 폴리펩티드", "HBV 항원성 폴리펩티드", "HBV 항원성 단백질", "HBV 면역원적 폴리펩티드" 및 "HBV 면역원"은 모두 면역 반응, 예를 들어, 대상체에서 HBV에 대한 체액성 및/또는 세포성 매개 반응을 유도할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. HBV 항원은 HBV의 폴리펩티드, 이들의 단편 또는 에피토프, 또는 복수의 HBV 폴리펩티드의 조합, 이들의 일부 또는 유도체일 수 있다. HBV 항원은 숙주에서 보호 면역 반응을 일으킬 수 있는, 예를 들어, 바이러스 질환 또는 감염에 대해 면역 반응을 유도하고/유도하거나 바이러스 질환 또는 감염에 대해 대상체를 보호하는, 바이러스 질환 또는 감염에 대해 대상체에 면역을 생성(즉, 백신접종)할 수 있다. 예를 들어, HBV 항원은 임의의 HBV 단백질로부터의 폴리펩티드 또는 이들의 면역원적 단편(들), 예컨대, 임의의 HBV 유전자형, 예컨대, 유전자형 A, B, C, D, E, F, G, 및/또는 H, 또는 이들의 조합 유래의, HBeAg, 프리-코어 단백질, HBsAg(S, M, 또는 L 단백질), 코어 단백질, 바이러스 폴리머라제, 또는 HBx 단백질을 포함할 수 있다.

[0064] (1)HBV 코어 항원

[0065] 본 명세서에서 사용되는 각각의 용어 "HBV 코어 항원", "HBc", 및 "코어 항원"은 면역 반응, 예를 들어, 대상체에서 HBV 코어 단백질에 대한 체액성 및/또는 세포성 매개 반응을 유도할 수 있는 HBV 항원을 지칭한다. 각각의 용어 "코어", "코어 폴리펩티드" 및 "코어 단백질"은 HBV 바이러스 코어 단백질을 지칭한다. 전장(full length) 코어 항원은 전형적으로 183 개 아미노산 길이이고 조립 도메인(아미노산 1 내지 149) 및 핵산 결합 도메인(아미노산 150 내지 183)을 포함한다. 34-잔기 핵산 결합 도메인은 프리게놈 RNA 캡시드화를 위해 필요하다. 상기 도메인은 또한 핵 유입 신호(nuclear import signal)로서 기능한다. 이는 17 개 아르기닌 잔기를 포함하고 매우 염기성이고 그 기능에 일관된다. HBV 코어 단백질은 용액 내에서 이량체성이고, 이량체는 20면체(icosahedral) 캡시드로 자가조립된다. 코어 단백질의 각각의 이량체는 양쪽에 α-나선 도메인이 측접된 4 개의 α-나선 번들을 갖는다. 핵산 결합 도메인 결여된 절두된 HBV 코어 단백질 또한 캡시드를 형성할 수 있다.

[0066] 본 출원의 일 구현예에서, HBV 항원은 절두된 HBV 코어 항원이다. 본 명세서에서 사용되는 "절두된 HBV 코어 항원"은 HBV 코어 단백질의 전체 길이를 포함하지는 않지만 대상체에서 HBV 코어 단백질에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 HBV 항원을 지칭한다. 예를 들어, HBV 코어 항원은 전형적으로 17 개 아르기닌(R) 잔기를 포함하는, 코어 항원의 고도로 양전하를 띄는(아르기닌 풍부) C-말단 핵산 결합 도메인 중 하나 이상의 아미노산을 결실하도록 변형될 수 있다. 본 출원의 절두된 HBV 코어 항원은 바람직하게 HBV 코어 핵 유입 신호를 포함하지 않는 C-말단 절두된 HBV 코어 단백질 및/또는 C-말단 HBV 코어 핵 유입 신호가 결실된 절두된 HBV 코어 단백질이다. 일 구현예에서, 절두된 HBV 코어 항원은 C-말단 핵산 결합 도메인에 결실, 예컨대, C-말단 핵산 결합 도메인의 1 개 내지 34 개 아미노산 잔기, 예를 들어, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개, 15 개, 16 개, 17 개, 18 개, 19 개, 20 개, 21 개, 22 개, 23 개, 24 개, 25 개, 26 개, 27 개, 28 개, 29 개, 30 개, 31 개, 32 개, 33 개, 또는 34 개 아미노산 잔기의 결실, 바람직하게 34 개 아미노산 잔기 모두의 결실을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 절두된 HBV 코어 항원은 C-말단 핵산 결합 도메인에 결실, 바람직하게 34 개 아미노산 잔기 전부의 결실을 포함한다.

[0067] 본 출원의 HBV 코어 항원은 복수의 HBV 유전자형(예를 들어, 유전자형 A, B, C, D, E, F, G, 및 H)으로부터 유래한 컨센서스 서열(consensus sequence)일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "컨센서스 서열"은, 예를 들어, 동종성 단백질의 아미노산 서열의 정렬(예를 들어, Clustal Omega를 사용하여)에 의해 결정된 바와 같은 동종성 단백질의 아미노산 서열의 정렬에 기초한 아미노산의 인공 서열을 의미한다. 이는 적어도 100 개의 천연 HBV 단리체로부터의 HBV 항원(예를 들어, 코어, pol, 등)의 서열을 기초로 서열 정렬의 각 위치에서 발견되는 가장 빈번한 아미노산 잔기의 계산된 순서일 수 있다. 컨센서스 서열은 비-천연이며 천연형 바이러스 서열과 상이할 수 있다. 컨센서스 서열은 복수의 서열 정렬 툴을 사용한 상이한 공급원으로부터의 복수의 HBV 항원 서열을 정렬하고, 다양한 정렬 위치에서 가장 빈번한 아미노산을 선택하여 설계될 수 있다. 바람직하게, HBV 항원의 컨센서스

서열은 HBV 유전자형 B, C 및 D로부터 유래한다. 용어 "컨센서스 항원"은 컨센서스 서열을 갖는 항원을 지칭하기 위해 사용된다.

[0068] 본 출원에 따른 예시적인 절두된 HBV 코어 항원은 핵산 결합 기능이 결여되고 포유동물에서 적어도 2 개의 HBV 유전자형에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 바람직하게 절두된 HBV 코어 항원은 포유동물에서 적어도 HBV 유전자형 B, C 및 D에 대한 T 세포 반응을 유도할 수 있다. 보다 바람직하게, 절두된 HBV 코어 항원은 인간 대상체에서 적어도 HBV 유전자형 A, B, C 및 D에 대한 CD8 T 세포 반응을 유도할 수 있다.

[0069] 바람직하게, 본 출원의 HBV 코어 항원은 컨센서스 항원이고, 바람직하게 HBV 유전자형 B, C 및 D로부터 유래한 컨센서스 항원이고, 보다 바람직하게 HBV 유전자형 B, C 및 D로부터 유래한 절두된 컨센선스 항원이다. 본 출원에 따른 예시적 절두된 HBV 코어 컨센서스 항원은 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진다. 서열번호 2 및 서열번호 4는 HBV 유전자형 B, C 및 D로부터 유래한 코어 컨센서스 항원이다. 서열번호 2 및 서열번호 4는 각각 천연형 코어 항원의 고도로 양전하를 띄는(아르기닌 풍부) 핵산 결합 도메인의 34-아미노산 C-말단 결실을 포함한다.

[0070] 본 출원의 일 구현예에서, HBV 코어 항원은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 항원이다. 다른 구현예에서, HBV 코어 항원은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 항원이다. 다른 구현예에서, HBV 코어 항원은 성숙 HBV 코어 항원 서열, 예컨대, 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 추가로 함유한다. 바람직하게, 신호 서열은 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는다.

[0071] (2)HBV 폴리머라제 항원

[0072] 본 명세서에서 사용되는 용어 "HBV 폴리머라제 항원", "HBV Pol 항원", 또는 "HBV pol 항원"은 대상체에서 HBV 폴리머라제에 대한 면역 반응, 예를 들어, 체액성 및/또는 세포성 매개 반응을 유도할 수 있는 HBV 항원을 지칭한다. 각각의 용어 "폴리머라제", "폴리머라제 폴리펩티드", "Pol" 및 "pol"은 HBV 바이러스 DNA 폴리머라제를 지칭한다. HBV 바이러스 DNA 폴리머라제는 N 말단으로부터 C 말단으로, 마이너스-가닥 DNA 합성을 위한 프라이머로 작용하는 말단 단백질(TP) 도메인; 폴리머라제 기능에 비필수 스페이서; 전사를 위한 역전사효소(RT) 도메인; 및 RNase H 도메인을 포함하는 4 개의 도메인을 갖는다.

[0073] 본 출원의 일 구현예에서, HBV 항원은 HBV Pol 항원, 또는 이들의 임의의 면역원적 단편 또는 이들의 조합을 포함한다. HBV Pol 항원은, 예컨대, 폴리머라제 및/또는 RNase 도메인의 활성 부위에 돌연변이를 도입하여 소정 효소 활성을 감소시키거나 실질적으로 제거함으로써 항원의 면역원성을 향상시키기 위한 추가 변형을 함유할 수 있다.

[0074] 바람직하게, 본 출원의 HBV Pol 항원은 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 가지지 않으며, 포유동물에서 적어도 2 개의 HBV 유전자형에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 바람직하게 HBV Pol 항원은 포유동물에서 적어도 HBV 유전자형 B, C 및 D에 대한 T 세포 반응을 유도할 수 있다. 보다 바람직하게, HBV Pol 항원은 인간 대상체에서 적어도 HBV 유전자형 A, B, C 및 D에 대한 CD8 T 세포 반응을 유도할 수 있다.

[0075] 따라서, 몇몇 구현예에서, HBV Pol 항원은 불활성화 Pol 항원이다. 일 구현예에서, 불활성화 HBV Pol 항원은 폴리머라제 도메인의 활성 부위에 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 다른 구현예에서, 불활성화 HBV Pol 항원은 RNaseH 도메인의 활성 부위에 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 불활성화 HBV Pol 항원은 폴리머라제 도메인과 RNaseH 도메인 둘 다의 활성 부위에 하나 이상의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 뉴클레오티드/금속 이온 결합을 위해 필요할 수 있는 HBV pol 항원의 폴리머라제 도메인의 "YXDD" 모티프는, 예를 들어, 하나 이상의 아스파테이트 잔기(D)를 아스파라긴 잔기(N)로 교체하여 금속 배위 기능을 제거 또는 감소시킴으로써 돌연변이될 수 있으며, 이에 의해 역전사효소 기능을 감소 또는 실질적으로 제거한다. 대안적으로, 또는 상기 "YXDD" 모티프의 돌연변이에 더하여, Mg2+ 배위를 위해 필요한 HBV pol 항원의 RNaseH 도메인의 "DEDD" 모티프는, 예를 들어, 하나 이상의 아스파테이트 잔기(D)를 아스파라긴 잔기(N)로 교체하고/교체하거나 제1 글루타메이트 잔기(E)를 글루타민(Q)으로 교체함으로써 돌연변이될 수 있으며, 이에 의해 RNasH 기능을 감소 또는 실질적으로 제거할 수 있다. 구체적 구현예에서, HBV pol 항원은 (1) 폴리머라제 도메인의 "YXDD" 모티프에서 아스파테이트 잔기(D)를 아스파라긴 잔기(N)로 돌연변이시키고; (2) RNaseH 도메인의 "DEDD" 모티프에서 첫 번째 아스파테이트 잔기(D)를 아스파라긴 잔기(N)로 교체하고 첫 번째 글루타메

이트 잔기(E)를 글루타민 잔기(N)로 돌연변이시킴으로써 변형되어, pol 항원의 역전사효소와 RNaseH 기능 둘 다를 감소 또는 실질적으로 제거한다.

[0076] 본 출원의 바람직한 구현예에서, HBV pol 항원은 컨센서스 항원이고, 바람직하게 HBV 유전자형 B, C 및 D로부터 유래한 컨센서스 항원이고, 보다 바람직하게 HBV 유전자형 B, C 및 D로부터 유래한 불활성화 컨센선스 항원이다. 본 출원에 따른 예시적 HBV pol 컨센서스 항원은 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 7과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한, 바람직하게, 서열번호 7과 적어도 98%, 예컨대, 서열번호 7과 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 서열번호 7은 HBV 유전자형 B, C 및 D로부터 유래한 폴리머라제 및 RNaseH 도메인의 활성 부위에 위치한 4 개의 돌연변이를 포함하는 pol 컨센서스 항원이다. 구체적으로, 상기 4 개의 돌연변이는 폴리머라제 도메인의 "YXDD" 모티프에서 아스파르트산 잔기(D)의 아스파라긴 잔기(N)로의 돌연변이; 및 RNaseH 도메인의 "DEDD" 모티프에서 첫 번째 아스파테이트 잔기(D)의 아스파라긴 잔기(N)로의 돌연변이 및 글루타메이트 잔기(E)의 글루타민 잔기(Q)로의 돌연변이를 포함한다.

[0077] 본 출원의 구체적 구현예에서, HBV pol 항원은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함한다. 본 출원의 다른 구현예에서, HBV pol 항원은 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진다. 추가의 구현예에서, HBV pol 항원은 성숙 HBV pol 항원 서열, 예컨대, 서열번호 7의 아미노산 서열의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 추가로 함유한다. 바람직하게, 신호 서열은 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는다.

[0078] (3) HBV 코어 항원 및 HBV 폴리머라제 항원의 융합

[0079] 본 명세서에서 사용되는 용어 "융합 단백질" 또는 "융합"은 단일, 천연 폴리펩티드에서 정상적으로 존재하지 않는 적어도 2 개의 폴리펩티드 도메인을 갖는 단일 폴리펩티드 사슬을 지칭한다.

[0080] 본 출원의 일 구현예에서, HBV 항원은, 바람직하게 링커를 통해, HBV Pol 항원에 작동적으로 연결된 절두된 HBV 코어 항원, 또는 절두된 HBV 코어 항원에 작동적으로 연결된 절두된 HBV 코어 항원을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.

[0081] 예를 들어, 제1 폴리펩티드 및 제2 이종성 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질에서, 링커는 주로 제1 및 제2 폴리펩티드 사이의 스페이서로서 작용한다. 일 구현예에서, 링커는 펩티드 결합으로 서로 연결된 아미노산, 바람직하게 펩티드 결합으로 연결된 1 개 내지 20 개 아미노산으로 구성되고, 상기 아미노산은 20 개의 천연 아미노산으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 상기 1 개 내지 20 개 아미노산은 글리신, 알라닌, 프롤린, 아스파라긴, 글루타민, 및 리신으로부터 선택된다. 바람직하게, 링커는 대부분 입체적 장애가 없는 아미노산, 예컨대, 글리신 및 알라닌으로 구성된다. 예시적 링커는 폴리글리신, 구체적으로 (Gly)5, (Gly)8; poly(Gly-Ala), 및 폴리알라닌이다. 이하의 실시예에 나타난 바와 같은 일 예시적 적합한 링커는 (AlaGly)n이고, 여기서 n은 2 내지 5의 정수이다.

[0082] 바람직하게, 본 출원의 융합 단백질은 포유동물에서 적어도 2 개의 HBV 유전자형의 HBV 코어 및 HBV Pol에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다. 바람직하게 융합 단백질은 포유동물에서 적어도 HBV 유전자형 B, C 및 D에 대한 T 세포 반응을 유도할 수 있다. 보다 바람직하게, 융합 단백질은 인간 대상체에서 적어도 HBV 유전자형 A, B, C 및 D에 대한 CD8 T 세포 반응을 유도할 수 있다.

[0083] 본 출원의 일 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 절두된 HBV 코어 항원, 링커, 및 서열번호 7과 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV Pol 항원을 포함한다.

[0084] 본 출원의 바람직한 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원, (AlaGly)n을 포함하고 n은 2 내지 5의 정수인 링커, 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 HBV Pol 항원을 포함한다. 보다 바람직하게, 본 출원의 구현예에 따른 융합 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0085] 본 출원의 일 구현예에서, 융합 단백질은 융합 단백질의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 추가로 포함한다. 바람직하게, 신호 서열은 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는다. 일 구현예에서, 융합

단백질은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함한다.

[0086] 본 발명에 사용될 수 있는 HBV 백신에 대한 추가 개시는 2018년 12월 18일에 출원된 미국 특허 출원 제 16/223,251호에 기재되어 있으며, 출원의 내용, 보다 바람직하게 출원의 실시예는 그 전체가 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0087] **폴리뉴클레오티드 및 벡터**

[0088] 다른 일반적 양태에서, 본 출원은 본 출원의 구현예에 따른 본 발명에 유용한 HBV 항원을 인코딩하는 비-천연 핵산 분자, 및 비-천연 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 제1 또는 제2 비-천연 핵산 분자는 본 개시의 관점에서의 기술분야에 알려져 있는 방법을 사용하여 제조될 수 있는, 본 출원에 유용한 HBV 항원을 인코딩하는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게, 제1 또는 제2 폴리뉴클레오티드는 본 출원의 절두된 HBV 코어 항원 및 HBV 폴리머라제 항원 중 적어도 하나를 인코딩한다. 폴리뉴클레오티드는 재조합 기술(예를 들어, 클로닝)에 의해 얻어지거나 합성적으로(예를 들어, 화학적 합성) 생산된 RNA의 형태 또는 DNA의 형태일 수 있다. 상기 DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 이중 가닥과 단일 가닥 서열 둘 다의 부분을 포함할 수 있다. 상기 DNA는, 예를 들어, 게놈 DNA, cDNA 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드는 또한 DNA/RNA 하이브리드일 수 있다. 본 출원의 상기 폴리뉴클레오티드 및 벡터는 재조합 단백질 생산, 숙주 세포 내에서의 단백질 발현, 또는 바이러스 입자 생산을 위해 사용될 수 있다. 바람직하게, 폴리뉴클레오티드는 DNA이다.

[0089] 본 출원의 일 구현예에서, 제1 비-천연 핵산 분자는 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 2와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 본 출원의 구체적 구현예에서, 제1 비-천연 핵산 분자는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0090] 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 예는 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 1 또는 서열번호 3과 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 예시적인 비-천연 핵산 분자는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0091] 다른 구현예에서, 제1 비-천연 핵산 분자는 HBV 코어 항원 서열의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열에 대한 코딩 서열을 추가로 포함한다. 바람직하게, 신호 서열은 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는다. 보다 바람직하게, 신호 서열에 대한 코딩 서열은 서열번호 8 또는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0092] 본 출원의 일 구현예에서, 제2 비-천연 핵산 분자는 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 7과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 출원의 구체적 구현예에서, 제2 비-천연 핵산 분자는 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0093] 서열번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV Pol 항원을 인코딩하는 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 예는 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 5 또는 서열번호 6과 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. HBV pol 항원을 인코딩하는 예시적인 비-천연 핵산 분자는 서열번호 5 또는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0094] 다른 구현예에서, 제2 비-천연 핵산 분자는 HBV pol 항원 서열, 예컨대, 서열번호 7의 아미노산 서열의 N-말단

에 작동적으로 연결된 신호 서열에 대한 코딩 서열을 추가로 포함한다. 바람직하게, 신호 서열은 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는다. 보다 바람직하게, 신호 서열에 대한 코딩 서열은 서열번호 8 또는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0095] 본 출원의 다른 구현예에서, 비-천연 핵산 분자는 HBV Pol 항원에 작동적으로 연결된 절두된 HBV 코어 항원, 또는 절두된 HBV 코어 항원에 작동적으로 연결된 HBV Pol 항원을 포함하는 HBV 항원 융합 단백질을 인코딩한다. 구체적 구현예에서, 본 출원의 비-천연 핵산 분자는 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 더욱 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원; 링커; 및 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 7과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩한다. 본 출원의 구체적 구현예에서, 비-천연 핵산 분자는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원, (AlaGly)n을 포함하고 n은 2 내지 5의 정수인 링커; 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 HBV Pol 항원을 포함하는 융합 단백질을 인코딩한다. 본 출원의 구체적 구현예에서, 비-천연 핵산 분자는 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 HBV 항원 융합 단백질을 인코딩한다.

[0096] HBV 항원 융합 단백질을 인코딩하는 본 출원의 폴리뉴클레오티드 서열의 예는 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 1 또는 서열번호 3과 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하지만, 이로 제한되지 않고, 이는 서열번호 11과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 11과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 11과 98%, 99% 또는 100% 동일한 링커 코딩 서열에 작동적으로 연결되고, 이는 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 5 또는 서열번호 6과 98%, 99% 또는 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열과 추가적으로 작동적으로 연결된다. 본 출원의 구체적 구현예에서, HBV 항원 융합 단백질을 인코딩하는 비-천연 핵산 분자는 서열번호 1 또는 서열번호 3을 포함하고, 이는 서열번호 11에 작동적으로 연결되고, 이는 추가적으로 서열번호 5 또는 서열번호 6에 작동적으로 연결된다.

[0097] 다른 구현예에서, HBV 융합을 인코딩하는 비-천연 핵산 분자는 HBV 융합 서열, 예컨대, 서열번호 16의 아미노산 서열의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열에 대한 코딩 서열을 추가로 포함한다. 바람직하게, 신호 서열은 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는다. 보다 바람직하게, 신호 서열에 대한 코딩 서열은 서열번호 8 또는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 신호 서열을 갖는 인코딩된 융합 단백질은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함한다.

[0098] 본 출원은 또한 제1 및/또는 제2 비-천연 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 유전적 물질을 그것이 복제 및/또는 발현될 수 있는 다른 세포로 수송하기 위해 사용되는 핵산 분자이다. 본 개시의 관점에서 당업자에게 알려져 있는 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 바이러스 벡터(박테리오파지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스), 코스미드 및 인공 염색체(예를 들어, YAC)를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 바람직하게, 벡터는 DNA 플라스미드이다. 벡터는 DNA 벡터 또는 RNA 벡터일 수 있다. 당업자는 본 개시의 관점에서 표준 재조합 기술을 통해 본 출원의 벡터를 작제할 수 있다.

[0099] 본 출원의 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 RNA에 대해 코딩하는 핵산을 포함하는 임의의 유형의 유전적 작제물를 지칭한다. 발현 벡터는 재조합 단백질 발현을 위한 벡터, 예컨대, DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 및 대상체 조직에서의 발현을 위해 대상체로 핵산을 전달하기 위한 벡터, 예컨대, DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 당업자는 발현 벡터의 설계가 형질전환될 숙주 세포의 선택, 요망되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자들에 의존될 수 있음을 이해할 것이다.

[0100] 본 출원의 벡터는 다양한 조절 서열을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절 서열"은 복제

(replication), 중첩(duplication), 전사, 스플라이싱, 번역, 안정성(stability) 및/또는 핵산분자 또는 이의 유도체(즉, mRNA) 중 하나의 숙주 세포 또는 유기체로의 수송을 포함하는 핵산 분자의 기능적 조절을 허용, 기여 또는 조절하는 임의의 서열을 지칭한다. 본 개시의 문맥에서, 이 용어는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호 및 mRNA 안정성에 영향을 미치는 요소)를 포괄한다.

[0101] 본 출원의 몇몇 구현예에서, 벡터는 비-바이러스 벡터이다. 비-바이러스 벡터의 예는 DNA 플라스미드, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체, 박테리오파지 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 비-바이러스 벡터의 예는 RNA 레플리콘, mRNA 레플리콘, 변형된 mRNA 레플리콘 또는 자기-증폭 mRNA, 폐선형 데옥시리보핵산, 예컨대, 선형 공유결합 폐쇄형 DNA, 예컨대, 선형 공유결합 폐쇄형 이중 가닥 DNA 분자를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 바람직하게, 비-바이러스 벡터는 DNA 플라스미드이다. "DNA 플라스미드"는, "DNA 플라스미드 벡터", "플라스미드 DNA" 또는 "플라스미드 DNA 벡터"와 상호 교환적으로 사용되며, 적합한 숙주 세포에서 자율 복제가 가능한 이중 가닥 및 일반적으로 원형인 DNA 서열을 지칭한다. 인코딩된 폴리뉴클레오티드의 발현에 사용되는 DNA 플라스미드는 전형적으로 복제 기점, 다중 클로닝 부위, 및 예를 들어 항생제 내성 유전자일 수 있는 선택 가능한 마커를 포함한다. 사용될 수 있는 적합한 DNA 플라스미드의 예는 에세리키아 콜라이(Escherichia coli)의 단백질의 생산 및/또는 발현에 사용될 수 있는 pSE420(Invitrogen, San Diego, Calif.); 효모의 사카로미세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 균주에서의 생산 및/또는 발현에 사용될 수 있는 pYES2(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific); 곤충 세포에서의 생산 및/또는 발현에 사용될 수 있는 MAXBAC® 완전 바큘로바이러스 발현 시스템(Thermo Fisher Scientific); 포유동물 세포에서 고수준 구성 단백질 발현에 사용될 수 있는 pcDNATM 또는 pcDNA3TM(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific); 및 대부분의 포유동물 세포에서 관심 단백질의 고수준 일시적 발현에 사용될 수 있는 pVAX 또는 pVAX-1(Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)과 같은 잘 알려져 있는 발현 시스템(원핵생물 및 진핵생물 시스템 둘 다 포함)에 사용하기 위한 상업적으로 이용 가능한 발현 벡터를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 임의의 상업적으로 입수 가능한 DNA 플라스미드의 백본은 숙주 세포에서 단백질 발현을 최적화하도록, 예컨대, 특정 요소(예를 들어, 복제 기점 및/또는 항생제 내성 카세트)의 배향 역전, 플라스미드에 내인성인 프로모터의 대체(예를 들어, 항생제 내성 카세트의 프로모터), 및/또는 통상적인 기술 및 용이하게 입수 가능한 출발 물질을 사용하여 전사된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 항생제 내성 유전자의 코딩 서열)의 대체를 위해 변형될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)] 참조).

[0102] 바람직하게, DNA 플라스미드는 포유동물 숙주 세포에서의 단백질 발현에 적합한 발현 벡터이다. 포유동물 숙주 세포에서의 단백질 발현에 적합한 발현 벡터는 pcDNATM, pcDNA3TM, pVAX, pVAX-1, ADVAX, NTC8454 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 바람직하게, 발현 벡터는 pVAX-1에 기초하며, 이는 포유동물 세포에서의 단백질 발현을 최적화하도록 추가적으로 변형될 수 있다. pVAX-1은 DNA 백신에서 통상적으로 사용되는 플라스미드이며, 강력한 인간 급초기 사이토메갈로바이러스(human immediate early cytomegalovirus, CMV-IE) 프로모터와 뒤이어 소 성장 호르몬(bovine growth hormone, bGH)-유래 폴리아데닐화 서열(pA)을 포함한다. pVAX-1는 pUC 복제 기점 및 박테리아 플라스미드 증식을 가능하게 하는 소형 원핵 프로모터에 의해 구동되는 카나마이신(kanamycin) 내성 유전자를 추가로 포함한다.

[0103] 또한 본 출원의 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 일반적으로 바이러스 벡터는 비-감염성으로 만들었으나, 바이러스 프로모터 및 전이유전자를 여전히 포함하여 바이러스 프로모터를 통한 전이유전자의 번역이 가능하게 한 변형된 바이러스 DNA 또는 RNA를 보유하는 유전공학적으로 조작된 바이러스이다. 바이러스 벡터는 흔히 감염 서열을 결여하기 때문에 헬퍼바이러스나 대규모 형질감염을 위한 팩키징 라인을 필요로 한다. 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 폭스-바이러스 벡터, 창자(enteric) 바이러스 벡터, 베네수엘라 말 뇌염(Venezuelan Equine Encephalitis) 바이러스 벡터, 셈리키 삼림(Semliki Forest) 바이러스 벡터, 담배 모자이크 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 예는 아레나바이러스 바이러스 벡터, 복제-결함 아레나바이러스 바이러스 벡터 또는 복제-경합 아레나바이러스 바이러스 벡터, 이절편화(bi-segmented) 또는 삼절편화(tri-segmented) 아레나바이러스, 감염성 아레나바이러스 바이러스 벡터, 게놈 절편의 하나의 개방형 해독틀이 결실되거나 기능적으로 불활성화된(그리고 본 명세서에 기술된 바와 같은 HBV 항원을 인코딩하는 핵산으로 교체된) 아레나바이러스 게놈 절편을 포함하는 핵산, 림프구성 맥락 수막염 바이러스(lymphocytic choriomeningitidis virus, LCMV), 예를 들어, 클론 13 균주 또는 MP 균주와 같은 아레나바이러스, 및 주닌 바이러스(Junin virus) 예컨대 Candid #1와 같은 아레나바이러스 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 벡터는 또한 비-바이러스 벡터일 수

있다.

[0104] 바람직하게, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 예를 들어, 재조합 아데노바이러스 벡터이다. 재조합 아데노바이러스 벡터는, 예컨대, 인간 아데노바이러스(HAdV, 또는 AdHu), 또는 침팬지 또는 고릴라 아데노바이러스(ChAd, AdCh, 또는 SAdV)와 같은 시미안(simian) 아데노바이러스 또는 레서스(rhesus) 아데노바이러스(rhAd)로부터 유래할 수 있다. 바람직하게, 아데노바이러스 벡터는 재조합 인간 아데노바이러스 벡터, 예컨대, 재조합 인간 아데노바이러스 혈청형 26, 또는 재조합 인간 아데노바이러스 혈청형 5, 4, 35, 7, 48 등 중 어느 하나 등이다. 다른 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 rhAd 벡터, 예컨대, rhAd51, rhAd52 또는 rhAd53이다.

[0105] 벡터는 또한 선형 공유결합 폐쇄형 이중 가닥 DNA 벡터일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "선형 공유결합 폐쇄형 이중 가닥 DNA 벡터"는 플라스미드 DNA와 구조적으로 별개인 폐쇄 선형 데옥시리보핵산(DNA)을 지칭한다. 이는 플라스미드 DNA의 다수 이점뿐만 아니라 RNA 전략과 유사한 최소 카세트 크기를 갖는다. 예를 들어, 이는 일반적으로 인코딩된 항원 서열, 프로모터, 폴리아데닐화 서열 및 텔로머 말단을 포함하는 벡터 카세트일 수 있다. 플라스미드-비함유 작제물은 박테리아 서열에 대한 필요 없이 효소 과정을 통해 합성될 수 있다. 적합한 선형 공유결합 폐쇄형 이중 가닥 DNA 벡터의 예는 상업적으로 입수 가능한 발현 벡터, 예컨대, Doggybone™ 폐쇄 선형 DNA'(dbDNA™)(Touchlight Genetics Ltd.; 런던, 영국)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 전체 내용이 본 명세서에 참조로 통합되는 문헌[Scott et al, *Hum Vaccin Immunother*. 2015 Aug; 11(8): 1972-1982]을 참조한다. 선형 공유결합 폐쇄형 이중 가닥 DNA 벡터, 본 발명의 활성 분자와 같은 DNA 분자를 전달하기 위한 이러한 벡터의 조성물 및 생성 및 사용 방법의 몇몇 예는 각각 전체 관련 내용이 본 명세서에 참조로 통합되는 US2012/0282283, US2013/0216562, 및 US2018/0037943에 기재되어 있다.

[0106] 본 출원에 유용한 재조합 벡터는 본 개시의 관점에서 기술 분야에 알려져 있는 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 유전자 코드의 축퇴성(degeneracy)의 관점에서, 동일 폴리펩티드를 인코딩하는 여러 핵산 서열이 설계될 수 있다. 본 출원의 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 선택적으로 숙주 세포(예를 들어, 박테리아 또는 포유동물 세포)에서의 적절한 발현을 보장하도록 코돈-최적화될 수 있다. 코돈-최적화는 기술분야에 널리 적용되는 기술이고, 코돈-최적화된 폴리뉴클레오티드를 얻는 방법은 본 개시의 관점에서 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다.

[0107] 본 출원의 벡터, 예를 들어, DNA 플라스미드, 바이러스 벡터(구체적으로 아데노바이러스 벡터), RNA 벡터(예컨대, 자기-복제 RNA 레플리콘), 또는 선형 공유결합 폐쇄형 이중 가닥 DNA 벡터는 벡터의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는 HBV 항원(들)의 복제 및 발현을 포함하지만 이로 제한되지 않는 종래의 벡터의 기능(들)을 확립하기 위한 임의의 조절 요소를 포함할 수 있다. 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 번역 정지 코돈, 리보솜 결합 요소, 전사 종결자, 선택 마커, 복제 기점 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 벡터는 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. "발현 카세트"는 세포 기구로 하여금 RNA 및 단백질을 만들도록 지시하는 벡터의 부분이다. 발현 카세트는 전형적으로 3 개의 요소를 포함한다: 프로모터 서열, 개방형 해독틀, 및 선택적으로 폴리아데닐화 신호를 포함하는 3'-비번역 영역(UTR). 개방형 해독틀(ORF)은 관심 단백질(예를 들어, HBV 항원)의 개시 코돈부터 정지 코돈까지 코딩 서열을 포함하는 해독틀이다. 발현 카세트의 조절 요소는 관심 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동적으로 연결된"은 이의 가장 널리 합리적 맥락에서 해석되어야 하며 기능적 관련성을 갖는 폴리뉴클레오티드 요소의 연결을 지칭한다. 폴리뉴클레오티드가 다른 폴리뉴클레오티드와 기능적 관련성을 갖는 경우 "작동적으로 연결"된다. 예를 들어, 프로모터는 이것이 코딩 서열의 전사에 영향을 미친다면 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 기술된 발현 카세트에 사용하기에 적합한 임의의 구성요소는 본 출원의 벡터를 제조하기 위해 임의의 조합 및 임의의 순서로 사용될 수 있다.

[0108] 벡터는 프로모터 서열을, 바람직하게 발현 카세트 내에 포함할 수 있어 관심 HBV 항원의 발현을 조절한다. 용어 "프로모터"는 그 관습적 의미에서 사용되며, 작동적으로 연결된 뉴클레오티드 서열의 전사를 개시하는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 프로모터는 이것이 전사하는 뉴클레오티드 서열 인근의 동일 가닥 상에 위치한다. 프로모터는 구성성, 유도성 또는 억제성일 수 있다. 프로모터는 천연 또는 합성일 수 있다. 프로모터는 바이러스, 박테리아, 균류, 식물, 곤충 및 동물을 포함하는 공급원으로부터 유래할 수 있다. 프로모터는 동종성 프로모터(즉, 벡터로서 동일 유전적 공급원 유래) 또는 이종성 프로모터(즉, 상이한 벡터 또는 유전적 공급원 유래)일 수 있다. 예를 들어, 사용될 벡터가 DNA 플라스미드인 경우, 프로모터는 플라스미드에 내인성(동종성)이거나 다른 공급원 유래(이종성)일 수 있다. 바람직하게, 프로모터는 발현 카세트 내에 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 상류에 위치한다.

[0109] 사용될 수 있는 프로모터는 시미안 바이러스 40(simian virus 40, SV40) 유래의 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus, MMTV) 프로모터, 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 프로모터, 예컨대, 소과 면역결핍 바이러스(bovine immunodeficiency virus, BIV) 긴 말단 반복부(long terminal repeat, LTR) 프로모터, 몰로니 바이러스(Moloney virus) 프로모터, 조류 백혈병 바이러스(avian leukosis virus, ALV) 프로모터, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV) 프로모터, 예컨대, CMV 급초기 프로모터(CMV immediate early promoter, CMV-IE), 엡스타인 바 바이러스(Epstein Barr virus, EBV) 프로모터, 또는 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV) 프로모터를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 또한 프로모터는 인간 유전자, 예컨대, 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 또는 인간 메탈로티오닌으로부터의 프로모터일 수 있다. 프로모터는 또한 천연 또는 합성의, 조직 특이적 프로모터, 예컨대, 근육 또는 피부 특이적 프로모터일 수 있다.

[0110] 바람직하게, 프로모터는 강력한 진핵 프로모터, 바람직하게 사이토메갈로바이러스 급초기(CMV-IE) 프로모터이다. 예시적 CMV-IE 프로모터의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 18 또는 서열번호 19에 나타나 있다.

[0111] 벡터는 발현된 전사체를 안정화시키고, RNA 전사체의 핵 유출을 증진하고 및/또는 전사-번역 커플링을 향상하는 추가적인 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이러한 서열의 예는 폴리아데닐화 신호 및 인핸서 서열을 포함한다. 폴리아데닐화 신호는 전형적으로 벡터의 발현 카세트 내의 관심 단백질(예를 들어, HBV 항원)의 코딩 서열의 하류에 위치한다. 인핸서 서열은 전사 인자에 의해 결합되면 연관 유전자의 전사를 증진하는 조절 DNA 서열이다. 인핸서 서열은 바람직하게 벡터의 발현 카세트 내의 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 상류이지만 프로모터 서열의 하류에 위치한다.

[0112] 본 개시의 관점에서 당업자에게 알려져 있는 임의의 폴리아데닐화 신호가 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리아데닐화 신호는 SV40 폴리아데닐화 신호, LTR 폴리아데닐화 신호, 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 신호, 또는 인간 β-글로빈 폴리아데닐화 신호일 수 있다. 바람직하게, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬(bGH) 폴리아데닐화 신호 또는 SV40 폴리아데닐화 신호이다. 예시적 bGH 폴리아데닐화 신호의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 20에 나타나 있다. 예시적 SV40 폴리아데닐화 신호의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 13에 나타나 있다.

[0113] 본 개시의 관점에서 당업자에게 알려져 있는 임의의 인핸서 서열을 사용할 수 있다. 예를 들어, 인핸서 서열은 인간 액틴, 인간 미오신, 인간 헤모글로빈, 인간 근육 크레아틴, 또는 CMV, HA, RSV, 또는 EBV 중 하나와 같은 바이러스 인핸서일 수 있다. 특정 인핸서의 예는 우드척 HBV 후-전사 조절 요소(Woodchuck HBV Posttranscriptional regulatory element, WPRE), 인간 아포리포단백질 A1 전구체(human apolipoprotein A1 precursor, ApoAI) 유래 인트론/엑손 서열, 인간 T-세포 백혈병 바이러스 유형 1(human T-cell leukemia virus type 1, HTLV-1)의 긴 말단 반복부(LTR)의 비번역 R-U5 도메인, 스플라이싱 인핸서, 합성 토끼 β-글로빈 인트론, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 바람직하게, 인핸서 서열은 HTLV-1 LTR의 비번역 R-U5 도메인, 토끼 β-글로빈 인트론 및 스플라이싱 인핸서의 3 개의 연속 요소의 복합체 서열이고, 이는 본 명세서에서 "삼중 인핸서 서열"로 지칭된다. 예시적 삼중 인핸서 서열의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 10에 나타나 있다. 다른 예시적 인핸서 서열은 서열번호 12에 나타나는 ApoAI 유전자 단편이다.

[0114] 벡터는 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 바람직하게, 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 상류에 위치한다. 신호 펩티드는 전형적으로 단백질의 국부화를 지시하고, 단백질이 이것이 생산된 세포로부터의 분비되는 것을 촉진하고, 및/또는 항원 발현 및 항원-제시 세포에 대한 상호-제시를 증진한다. 신호 펩티드는 벡터로부터 발현될 때 HBV 항원의 N-말단에 존재할 수 있으나, 이는, 예를 들어, 상기 세포로부터의 분비 직후, 신호 펩티드에 의해 절단된다. 신호 펩티드가 절단된 발현된 단백질은 흔히 "성숙 단백질"이라 지칭된다. 본 개시의 관점에서 기술분야에 알려져 있는 임의의 신호 펩티드를 사용할 수 있다. 예를 들어, 신호 펩티드는 시스타틴 S 신호 펩티드; 면역글로불린(Ig) 분비 신호, 예컨대, Ig 중쇄 감마 신호 펩티드 SPIgG 또는 Ig 중쇄 엡실론 신호 펩티드 SPIgE일 수 있다.

[0115] 바람직하게, 신호 펩티드 서열은 시스타틴 S 신호 펩티드이다. 시스타틴 S 신호 펩티드의 예시적 핵산 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 8 및 서열번호 9에 나타나 있다. 면역글로불린 분비 신호의 예시적 핵산 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 14 및 서열번호 15에 나타나 있다.

[0116] 벡터, 예컨대, DNA 플라스미드는 또한 박테리아 복제 기점 및 박테리아 세포, 예를 들어, *이. 콜라이(E. coli)*의 플라스미드의 선택 및 유지를 위한 항생제 내성 발현 카세트를 포함할 수 있다. 박테리아 복제 기점 및 항생

제 내성 카세트는 HBV 항원을 인코딩하는 발현 카세트와 동일 배향으로 또는 반대(역) 배향으로 벡터에 위치할 수 있다. 복제 기점(ORI)은 복제가 개시되는 서열이며 플라스미드가 세포 내에서 재생산되고 생존할 수 있게 한다. 본 출원에서 사용되기에 적합한 ORI의 예는 ColE1, pMB1, pUC, pSC101, R6K, 및 15A, 바람직하게 pUC를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. pUC ORI의 예시적인 뉴클레오티드 서열은 서열번호 21에 나타나 있다.

[0117] 박테리아 세포의 선택 및 유지를 위한 발현 카세트는 전형적으로 항생제 내성 유전자에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함한다. 바람직하게, 항생제 내성 유전자에 작동적으로 연결된 프로모터 서열은 관심 단백질, 예를들어, HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열과 상이하다. 항생제 내성 유전자는 코돈 최적화될 수 있고, 항생제 내성 유전자의 서열 조성물은 일반적으로 박테리아, 예를 들어, 이. 콜라이, 코돈 사용에 조정된다. 본 개시의 관점에서 당업자에게 알려져 있는 임의의 항생제 내성 유전자를 사용할 수 있으며, 카나마이신 내성 유전자(kanamycin resistance gene, Kanr), 암피실린 내성 유전자(ampicillin resistance gene, Ampr), 및 테트라사이클린 내성 유전자(tetracycline resistance gene, Tetr), 뿐만 아니라 클로르암페니콜(chloramphenicol), 블레오마이신(bleomycin), 스펙티노마이신(spectinomycin), 카르베니실린(carbenicillin) 등에 내성을 부여하는 유전자를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0118] 바람직하게, 벡터의 항생제 발현 카세트 내의 항생제 내성 유전자는 카나마이신 내성 유전자(Kanr)이다. Kanr 유전자의 서열은 서열번호 22에 나타나 있다. 바람직하게, Kanr 유전자는 코돈 최적화된다. 코돈 최적화된 Kanr 유전자의 예시적 핵산 서열은 서열번호 23에 나타나 있다. 상기 Kanr는 그 천연형 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있거나, Kanr 유전자는 이종성 프로모터에 연결될 수 있다. 구체적 구현예에서, Kanr 유전자는, bla 프로모터로 알려진 암피실린 내성 유전자(Ampr) 프로모터에 작동적으로 연결된다. bla 프로모터의 예시적 뉴클레오티드 서열은 서열번호 24에 나타나 있다.

[0119] 본 출원의 구체적 구현예에서, 벡터는 서열번호 7과 적어도 90%, 예컨대, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96, 97%, 바람직하게 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV pol 항원, 및 서열번호 2 또는 서열번호 4의 적어도 95%, 예컨대, 95%, 96, 97%, 바람직하게 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 HBV 항원 중 적어도 하나를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드; 5' 말단으로부터 3' 말단으로, 프로모터 서열, 바람직하게 서열번호 18의 CMV 프로모터 서열, 인핸서 서열, 바람직하게 서열번호 10의 삼중 인핸서 서열, 및 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 바람직하게 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 시스타틴 S 신호 펩티드를 포함하는, HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 상류 서열; 및 폴리아데닐화 신호, 바람직하게 서열번호 20의 bGH 폴리아데닐화 신호를 포함하는, HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 하류 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 DNA 플라스미드이다. 이러한 벡터는 추가적으로 항생제 내성 유전자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 상류이고 이에 작동적으로 연결된 서열번호 24의 Amp^r(bla) 프로모터에 작동적으로 연결된, 항생제 내성 유전자, 바람직하게 Kan^r 유전자, 보다 바람직하게 서열번호 23과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 23과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 23과 100% 동일한, 코돈 최적화된 Kan^r 유전자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 항생제 내성 발현 카세트; 및 복제 기점, 바람직하게 서열번호 21의 pUC ori를 포함한다. 바람직하게, 상기 항생제 내성 카세트 및 복제 기점은 HBV 항원 발현 카세트와 비교하여 반대 배향(orientation)으로 플라스미드 내에 존재한다.

[0120] 본 출원의 다른 구체적 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 바람직하게 아데노바이러스 벡터, 보다 바람직하게 Ad26 또는 Ad35 벡터이고, 서열번호 7과 적어도 90%, 예컨대, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96, 97%, 바람직하게 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV pol 항원, 및 서열번호 2 또는 서열번호 4의 적어도 95%, 예컨대, 95%, 96, 97%, 바람직하게 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 HBV 항원 중 적어도 하나를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드; 5' 말단으로부터 3' 말단으로, 바람직하게 서열번호 19의 CMV 프로모터 서열인 프로모터 서열, 바람직하게 서열번호 12의 ApoAI 유전자 단편 서열인 인핸서 서열, 및 바람직하게 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분비 신호를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열인 신호 서열을 포함하는, HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오

티드에 작동적으로 연결된 상류 서열; 및 폴리아데닐화 신호, 바람직하게 서열번호 13의 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는, HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 하류 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0121] 본 출원의 일 구현예에서, 벡터, 예컨대, 플라스미드 DNA 벡터 또는 바이러스 벡터(바람직하게 아데노바이러스 벡터, 보다 바람직하게 Ad26 또는 Ad35 벡터)는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 HBV Pol 항원을 인코딩한다. 바람직하게 상기 벡터는 서열번호 5 또는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 5 또는 서열번호 6과 100% 동일한 HBV Pol 항원을 위한 코딩 서열을 포함한다.

[0122] 본 출원의 일 구현예에서, 벡터, 예컨대, 플라스미드 DNA 벡터 또는 바이러스 벡터(바람직하게 아데노바이러스 벡터, 보다 바람직하게 Ad26 또는 Ad35 벡터)는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩한다. 바람직하게, 상기 벡터는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 1 또는 서열번호 3과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 1 또는 서열번호 3과 100% 동일한 절두된 HBV 코어 항원을 위한 코딩 서열을 포함한다.

[0123] 본 출원의 추가의 다른 구현예에서, 벡터, 예컨대, 플라스미드 DNA 벡터 또는 바이러스 벡터(바람직하게 아데노바이러스 벡터, 보다 바람직하게 Ad26 또는 Ad35 벡터)는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 HBV Pol 항원 및 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 포함하는 융합 단백질을 인코딩한다. 바람직하게, 상기 벡터는 융합을 위한 코딩 서열을 포함하되, 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 1 또는 서열번호 3과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 1 또는 서열번호 3과 98%, 99% 또는 100% 동일한, 보다 바람직하게 서열번호 1 또는 서열번호 3과 동일한 절두된 HBV 코어 항원을 위한 코딩 서열을 포함하고, 이는 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 90%, 예컨대, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 5 또는 서열번호 6과 98%, 99% 또는 100% 동일한, 보다 바람직하게 서열번호 5 또는 서열번호 6과 동일한 HBV Pol 항원을 위한 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 바람직하게, 상기 절두된 HBV 코어 항원을 위한 코딩 서열은 서열번호 11과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 11과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한, 바람직하게 서열번호 11과 98%, 99% 또는 100% 동일한 링커를 위한 코딩 서열을 통해 HBV Pol 항원을 위한 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 본 출원의 구체적 구현예에서, 벡터는 서열번호 1 또는 서열번호 3을 갖는 융합을 위한 코딩 서열을 포함하고, 이는 서열번호 11에 작동적으로 연결되고, 서열번호 5 또는 서열번호 6에 추가적으로 작동적으로 연결된다.

[0124] 본 출원의 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 발현 벡터는 본 개시의 관점에서 기술분야에 알려져 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클로레오티드는, 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 등, 당업자에게 잘 알려져 있는 표준 분자생물학 기술을 사용하여 발현 벡터 내로 도입 또는 "클로닝"될 수 있다.

[0125] **세포, 폴리펩티드 및 항체**

[0126] 본 출원은 또한 본 명세서에서 기술된 폴리뉴클레오티드 및 벡터 중 임의의 것을 포함하는, 세포, 바람직하게 단리된 세포를 제공한다. 상기 세포는, 예를 들어, 재조합 단백질 생산을 위해, 또는 바이러스 입자의 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0127] 따라서 본 출원의 구현예들은 또한 본 출원의 HBV 항원을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 프로모터에 작동적으로 연결된 본 출원의 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터로 숙주 세포를 형질감염시키는 단계, HBV 항원의 발현에 적합한 조건 하에 형질감염된 세포를 성장시키는 단계, 및 선택적으로 세포 내에서 발현된 HBV 항원을 정제하거나 단리하는 단계를 포함한다. 상기 HBV 항원은 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography) 등을 포함하는 기술분야에 알려져 있는 임의의 방법에 의하여 세포로부터 단리되거나 수집될 수 있다. 재조합 단백질 발현을 위해 사용되는 기술

은 본 개시의 관점에서 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다. 발현된 HBV 항원은 또한 발현된 단백질을 정제하거나 단리하지 않고, 예를 들어, HBV 항원을 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염되고 HBV 항원의 발현에 적합한 조건 하에서 성장된 세포의 상청액을 분석하여, 연구될 수 있다.

[0128] 따라서, 서열번호 2, 서열번호 4, 또는 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 비-천연 또는 재조합 폴리펩티드가 또한 제공된다. 상기 및 이하에 기술되는 바와 같이, 이들 서열을 인코딩하는 단리된 핵산 분자, 프로모터에 작동적으로 연결된 이들 서열을 포함하는 벡터, 및 상기 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 조성물이 또한 본 출원에 의해 고려된다.

[0129] 본 출원의 일 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 2와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게, 비-천연 또는 재조합 폴리펩티드는 서열번호 2로 이루어진다.

[0130] 본 출원의 다른 구현예에서, 비-천연 또는 재조합 폴리펩티드는 서열번호 4의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 4와 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게, 비-천연 또는 재조합 폴리펩티드는 서열번호 4를 포함한다.

[0131] 본 출원의 다른 구현예에서, 비-천연 또는 재조합 폴리펩티드는 서열번호 7의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한, 예컨대, 서열번호 7과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95.5%, 96%, 96.5%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게, 비-천연 또는 재조합 폴리펩티드는 서열번호 7로 이루어진다.

[0132] 또한 본 출원의 비-천연 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공된다. 본 출원의 일 구현예에서, 본 출원의 비-천연 HBV 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 HBV 항원에 특이적으로 결합하지 않는다. 예를 들어, 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 HBV Pol 항원에 특이적으로 결합하는 본 출원의 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖지 않는 HBV Pol 항원에 특이적으로 결합하지 않을 것이다.

[0133] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 광의를 의미하며, 다클론성 항체, 뮤린, 인간, 인간화, 및 키메라 단클론성 항체를 포함하는 단클론성 항체, 항원-결합 단편, 이중특이성 또는 다중특이성 항체, 이량체성 항체, 사량체성 항체, 다량체성 항체, Fv, Fab, F(ab')2, 이작용성 하이브리드(예를 들어, 문헌[Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987]), 단일쇄(Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988; Bird et al., Science 242:423, 1988); 변경된 불변 영역을 갖는 항체(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호), 도메인 항체를 포함하는 면역글로불린 분자, 및 필요한 특이성의 항원 결합 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 구성의 면역글로불린 분자를 포함한다.

[0134] 본 명세서에서 사용되는 항원에 "특이적으로 결합하는" 항체는 1×10^{-7} M 이하의 KD로 항원에 결합하는 항체를 지칭한다. 바람직하게, 항원에 "특이적으로 결합하는" 항체는 1×10^{-8} M 이하, 보다 바람직하게 5×10^{-9} M 이하, 1×10^{-9} M 이하, 5×10^{-10} M 이하, 또는 1×10^{-10} M 이하의 KD로 항원에 결합한다. 용어 "KD"는 해리 상수를 지칭하며, Ka에 대한 Kd의 비율(즉, Kd/Ka)로부터 얻어지며 몰 농도(M)으로 표현된다. 항체에 대한 KD 값은 본 개시의 관점에서 기술분야에 알려져 있는 방법을 사용하여 판별될 수 있다. 예를 들어, 항체의 KD는 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 사용하여, 예컨대, 생체센서 시스템, 예컨대, Biacore® 시스템을 사용하여, 또는 생물층 간섭측정(bio-layer interferometry) 기술, 예컨대, Octet RED96 시스템을 사용하여 판별될 수 있다. 항체의 KD 값이 작을수록 표적 항원에 대한 항체의 결합 친화도는 높아진다.

[0135] **항-PD-1 항체**

[0136] 본 출원은 또한 항-PD-1 항체의 치료적 적용에 관한 것이다. 상술된 바와 같이, "항체"는 광의를 의미하며, 다클론성 항체, 뮤린, 인간, 인간화, 및 키메라 단클론성 항체를 포함하는 단클론성 항체, 항원-결합 단편, 이중특이성 또는 다중특이성 항체, 이량체성 항체, 사량체성 항체, 다량체성 항체, Fv, Fab, F(ab')2, 이중특이성 하이브리드 항체, 단일쇄 항체, 불변 영역이 변경된 항체, 도메인 항체를 포함하는 면역글로불린 분자, 및 필요한 특이성의 항원 결합 부위를 포함하는 임의의 다른 변형된 구성의 면역글로불린 분자를 포함한다.

[0137] "전장 항체"는 디설파이드 결합에 의해 상호연결된 2 개의 중쇄(H) 및 2 개의 경쇄(L)뿐만 아니라 이의 다량체(예를 들어, IgM)로 구성된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 불변 영역(도메인 CH1, 힌지 CH2 및

CH3으로 구성됨)으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 초가변성의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3 개의 CDR 및 4 개의 FR 세그먼트로 구성되며, 아미노-말단부터 카르복시-말단까지 하기의 순서대로 배열된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4.

[0138] "상보성 결정 영역(CDR)"은 항체 내의 "항원 결합 부위"이다. CDR은 다양한 용어를 사용하여 정의할 수 있다: (i) 상보성 결정 영역(CDR), VH 내에 3 개(HCDR1, HCDR2, HCDR3) 및 VL 내에 3 개(LCDR1, LCDR2, LCDR3)는 서열 가변성에 기초한다(문헌[Wu and Kabat, (1970) J Exp Med 132:211-50; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991]). (ii) "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV", VH 내에 3 개(H1, H2, H3) 및 VL 내에 3 개(L1, L2, L3)는 코티아(Chothia) 및 레스크(Lesk)에 의해 정의된 바와 같이 구조 내에서 초가변성인 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다(문헌[Chothia and Lesk, (1987) Mol Biol 196:901-17]). International ImMunoGeneTics(IMGT) 데이터베이스(http://www_imgt_org)는 항원-결합 부위의 표준화된 번호부호 및 정의를 제공한다. CDR, HV, 및 IMGT 도해 사이의 관련성은 문헌[Lefranc et al., (2003) Dev Comparat Immunol 27:55-77]에 기재되어 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "CDR", "HCDR1", "HCDR2", "HCDR3", "LCDR1", "LCDR2" 및 "LCDR3"은 본 명세서에 달리 명시적으로 기재되어 있지 않는 한, 상기에 기재된 임의의 방법들인 카바트, 코티아 또는 IMGT 중 임의의 것에 의해 정의된 CDR을 포함한다.

[0139] 면역글로불린은 중쇄 불변 도메인 아미노산 서열에 따라, 5개의 주요 분류, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 정해질 수 있다. IgA 및 IgG는 동종형 IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로 추가로 하위-분류된다. 임의의 척추동물 종의 항체 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 명확하게 별개인 2 개의 유형, 즉 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나로 정해질 수 있다.

[0140] 본 명세서에서 사용되는 "항체 단편" 또는 "항원-결합 단편"은 모 전장 항체의 항원 결합 특성을 보유하는 면역글로불린 분자의 일부분을 지칭한다. 예시적인 항원-결합 단편은 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 1, 2, 및 3, 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 1, 2, 및 3, 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL), Fab, F(ab')2, Fd, 및 Fv 단편뿐만 아니 라 하나의 VH 또는 VL 도메인으로 이루어진 도메인 항체(dAb)이다. VH 및 VL 도메인은 합성 링커를 통해 함께 연결되어 다양한 유형의 단일쇄 항체 설계를 형성할 수 있으며, 여기서 1가 항원 결합 부위, 예컨대, 단일쇄 Fv(scFv) 또는 이중항체(diabody)를 형성하기 위해, VH/VL 도메인은 분자 간에, 또는 VH 및 VL 도메인이 별도의 단일쇄 항체 작제물에 의해 발현되는 경우에는 분자내에, 쌍을 이룰 수 있으며; 이는 예를 들어 국제 특허 공개 WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 및 WO1992/01047에 기재되어 있다.

[0141] 본 명세서에서 사용되는 "단클론성 항체"는, 항체 중쇄로부터의 C-말단 라이신의 제거와 같은 가능한 잘 알려진 변경을 제외하고는, 각각의 중쇄 및 각각의 경쇄 내에 단일 아미노산 조성을 갖는 항체 집단을 지칭한다. 단클론성 항체는, 다중특이성 단클론성 항체가 2 개 이상의 별개의 항원 또는 에피토프와 결합하는 것을 제외하고는, 전형적으로 하나의 항원 에피토프와 결합한다. 이중특이성 단클론성 항체는 2 개의 별개의 항원 에피토프와 결합한다. 단클론성 항체는 항체 집단 내에 이종 당화를 가질 수 있다. 단클론성 항체는 단일특이성 또는 다중특이성, 또는 1가, 2가 또는 다가일 수 있다. 다중특이성 항체, 예컨대, 이중특이성 항체 또는 삼중특이성 항체는 용어 단클론성 항체 내에 포함된다.

[0142] 본 명세서에서 사용되는 "인간화 항체"는 적어도 하나의 CDR이 비-인간 종으로부터 유래되고 가변 영역 프레임워크가 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 항체를 지칭한다. 인간화 항체는 프레임워크 영역 내에 의도적으로 도입된 돌연변이를 포함할 수 있으므로, 프레임워크는 발현된 인간 면역글로불린 또는 생식세포계열(germline) 유전자 서열의 정확한 카피가 아닐 수 있다.

[0143] 본 명세서에서 사용되는 "인간 항체"는 프레임워크 및 모든 6개 CDR 둘 모두가 인간 기원의 서열로부터 유래되는, 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 이 항체가 불변 영역 또는 불변 영역의 일부분을 포함하는 경우, 불변 영역은 또한 인간 기원의 서열로부터 유래된다. 인간 항체는, 항체의 가변 영역이 인간 생식세포계열 면역글로불린 또는 재배열된 면역글로불린 유전자를 사용 하는 시스템으로부터 얻어지는 경우, 인간 기원의 서열"로부터 유래되는" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 예시적인 시스템은, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 파지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리, 및 인간 면역글로불린 유전자좌를 담지하는 유전자도입 인간 이외의 동물, 예컨대, 마우스 또는 래트를 포함한다. "인간 항체"는 인간 생식세포계열 면역글로불린 또는 재배열된 면역글로불린 유전자와 비교할 때 아미노산 차이를 포함할 수 있는데, 이는, 예를 들어 천연 발생 체세포 돌연변이 또는 프레임워크 또는 항원 결합 부위 내로의 의도적인 치환 도입,

또는 둘 모두에 기인한다. 전형적으로, "인간 항체"는 인간 생식세포계열 면역글로불린 또는 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩된 아미노산 서열과 아미노산 서열이 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다. 일부 경우에, "인간 항체"는, 예를 들어 문헌[Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86]에 기재된 바와 같이 인간 프레임워크 서열 분석으로부터 유래되는 컨센서스 프레임워크 서열을 함유하거나, 예를 들어 문헌[Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96] 및 예를 들어 국제 특허 출원 공개 WO2009/085462에 기재된 바와 같이 파지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리 내로 혼입된 합성 HCDR3을 함유할 수 있다.

[0144] 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 인간 항체는, 합성 CDR 및/또는 합성 프레임워크를 혼입시킨 파지 디스플레이와 같은 시스템을 사용하여 생성될 수 있거나, 시험관내 돌연변이생성(in vitro mutagenesis)을 거쳐서 항체 특성을 개선하여, 생체내에서 인간 항체 생식세포계열 레퍼토리에 의해 발현되지 않는 항체를 생성할 수 있다.

[0145] 본 명세서에서 사용되는 "에피토프"는 항체가 특이적으로 결합하는 항원의 부분을 지칭한다. 에피토프는 전형적으로 아미노산 또는 다당류 측쇄와 같은 모이어티(moiety)의 화학적으로 활성(예컨대, 극성, 비극성 또는 소수성)인 표면 그룹화(grouping)로 이루어지며, 특이적인 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 입체구조 공간 단위(conformational spatial unit)를 형성하는 연속 및/또는 불연속 아미노산으로 구성될 수 있다. 불연속 에피토프의 경우, 항원의 선형 서열의 상이한 부분으로부터의 아미노산이 단백질 분자의 접힘을 통해 3차원 공간에서 아주 근접하게 된다. 항체 "에피토프"는 에피토프를 확인하기 위해 사용되는 방법론에 따라 달라진다.

[0146] 본 명세서에서 사용되는 "다중특이성"은 적어도 2 개의 별개의 항원 또는 이러한 항원 내의 적어도 2 개의 별개의 에피토프, 예를 들어 3 개, 4 개 또는 5개의 별개의 항원 또는 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다.

[0147] 본 명세서에서 사용되는 "이중특이성"은 2 개의 별개의 항원 또는 동일한 항원 내의 2 개의 별개의 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다.

[0148] 본 명세서에서 사용되는 "PD-1"은 CD279 또는 PDCD1로도 공지된, 예정사 단백질 1(programmed cell death protein 1), T-세포 공동-억제제를 지칭한다. 전장 PD-1의 대표적인 아미노산 서열은 GenBank에서 수탁 번호 NP 005009.2로 제공된다. 용어 "PD-1"은 단백질 변이체 및 재조합 PD-1 또는 이의 단편을 포함한다. "PD-1"은 본 출원에서 달리 분명하게 반대로 명시되지 않는 한 인간 성숙 PD-1을 지칭한다.

[0149] PD-1은 활성화된 T-세포 및 B-세포, 자연 살해 세포 및 단핵구 상에서 발현되는 288개의 아미노산 단백질 수용체이다. PD-1은 T-세포 공동-억제 수용체의 CD28/CTLA-4(세포독성 T 림프구 항원)/ICOS(유도가능 공동-자극물질) 패밀리의 일원이다(Chen et al. 2013, Nat. Rev. Immunol. 13 : 227-242). 단백질은 IgV-유사인 세포외 N-말단 도메인, 막관통 도메인 및 면역수용체 티로신-기반 억제성(ITIM) 모티프 및 면역수용체 티로신-기반 스위치(ITSM) 모티프를 함유하는 세포내 도메인을 갖는다(Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev.). PD-1의 주요 기능은 면역 반응을 약화시키는 것이다(Riley 2009, Immunol. Rev. 229: 114-125). PD-1은 2 개의 리간드, PD-리간드 1(PD-L1) 및 PD-L2를 갖는다. PD-L1(CD274, B7H1)은 림프 및 비-림프 조직 둘 모두, 예컨대, CD4 및 CD8 T-세포, 대식세포 계통 세포, 말초 조직 뿐만 아니라 종양 세포, 바이러스 감염된 세포 및 자가면역 조직 세포 상에서 광범위하게 발현된다. PD-L2(CD273, B7-DC)는 PD-L1보다 더 제한적으로 발현되며, 활성화된 수지상 세포 및 대식세포 상에서 발현된다(Dong et al 1999, Nature Med.). PD-1의 이의 리간드에의 결합은 T-세포 증식 및 사이토카인 분비의 감소를 초래하고, 체액 및 세포 면역 반응을 손상시킨다.

[0150] T-세포 공동-자극 및 공동-억제 분자(총괄하여 공동-신호전달 분자로 명명됨)는 T-세포 활성화의 조절, 서브셋 분화, 효과기(effector) 기능 및 생존에서 중대한 역할을 한다(Chen et al2013, Nature Rev. Immunol. 13 : 227-242). 항원-제시 세포 상의 동족(cognate) 펩타이드-MHC 복합체의 T-세포 수용체에 의한 인식 후, 공동-신호전달 수용체는 면역 시냅스에서 T-세포 수용체와 함께 공동-국소화되고, 여기서 이들은 T-세포 활성화 및 기능을 촉진시키거나 억제하도록 TCR 신호전달과 상승작용한다(Flies et al. 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421). 궁극적인 면역 반응은 공동-자극과 공동-억제 신호들("면역 체크포인트") 간의 균형에 의해 조절된다(Pardoll 2012, Nature 12: 252-264). 이론으로 국한시키려는 것은 아니지만, PD-1은 말초 T-세포 내성을 매개하고 자가면역을 피하는 데 있어서 하나의 이러한 '면역 체크포인트'로서 기능하는 것으로 사료된다. PD-1은 PD-L1 또는 PD-L2에 결합하여 T-세포 활성화를 억제한다. T-세포 활성화를 억제하는 PD1의 능력은 면역 반응을 피하기 위한 만성 바이러스 감염 및 종양에 의해 활용된다. 만성 바이러스 감염에서, PD-1은 바이러스-특이적

T-세포에서 고도로 발현되며, 이들 T-세포는 효과기 기능 및 증식능(proliferative capacity)의 손실과 함께 "고갈(exhausted)"된다(Freeman 2008, PNAS 105: 10275-1 0276). PD-1:PD-L1 시스템은 또한 유도된 T-조절(Treg) 세포 발달 및 Treg 기능 유지에 중요한 역할을 한다(Francisco et al2010, Immunol. Rev. 236:219-242).

[0151] 본 명세서에서 사용되는 "길항제"는 세포 단백질에 결합될 때, 단백질의 천연 리간드에 의해 유도되는 적어도 하나의 반응 또는 활성을 억제하는 분자를 지칭한다. 분자는, 적어도 하나의 반응 또는 활성이, 길항제의 부재 하에서(예를 들어, 음성 대조군) 억제되는 적어도 하나의 반응 또는 활성보다 적어도 약 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 더 많이 억제될 때, 또는 그러한 억제가 길항제의 부재 하에서의 억제에 비하여 통계학적으로 유의할 때, 길항제이다. 길항제는 항체, 가용성 리간드, 소분자, DNA 또는 RNA, 예컨대, siRNA일 수 있다. 예시적인 길항제는 PD-1을 특이적으로 결합하는 길항성 항체다. PD-1이 이의 수용체 PD-L1 또는 PD-L2에 결합함으로써 유도되는 전형적인 반응 또는 활성은 항원-특이적 CD4+ 또는 CD8+ 세포 증식의 감소 또는 T 세포에 의한 인터페론-γ(IFN-γ) 생성의 감소일 수 있으며, 이는, 예를 들어, 면역 반응의 억제를 유발한다. 따라서, PD-1을 특이적으로 결합하는 길항성 PD-1 항체는 억제성 경로를 억제함으로써 면역 반응을 유도한다.

[0152] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하기 특성 중 1개, 2 개, 3 개, 4 개, 또는 5개를 갖는다:

[0153] a) 항원 특이적 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 활성화를 용량 의존적 방식으로 향상시키며, 여기서 활성화는 전체가 본 명세서에 참조로 통합되는 US20170121409의 실시예 1에 기재된 바와 같이 사이토메갈로바이러스 항원 리콜 검정(CMV 검정)을 사용하여 측정됨;

[0154] b) 약 100 nM 미만의 평형 해리 상수(K_D)로 인간 PD-1을 결합하며, 여기서 K_D는 +25℃에서 ProteOn XPR36 시스템을 사용하여 측정됨;

[0155] c) 약 1 nM 미만의 K_D로 인간 PD-1을 결합하며, 여기서 K_D는 +25℃에서 ProteOn XPR36 시스템을 사용하여 측정됨;

[0156] d) 약 100 nM 미만의 K_D로 사이노몰거스 PD-1을 결합하며, 여기서 K_D는 +25℃에서 ProteOn XPR36 시스템을 사용하여 측정됨; 또는

[0157] e) 약 1 nM 미만의 K_D로 사이노몰거스 PD-1을 결합하며, 여기서 K_D는 +25℃에서 ProteOn XPR36 시스템을 사용하여 측정됨.

[0158] 인간 또는 사이노몰거스 PD-1에 대한 항체의 친화도는 임의의 적합한 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 그러한 방법은 당업자에게 알려진 ProteOn XPR36, Biacore 3000 또는 KinExA 기기, ELISA 또는 경쟁적 결합 검정을 이용할 수 있다. 특정 항체/PD-1 상호작용의 측정된 친화도는 상이한 조건(예를 들어, 오스몰 농도, pH) 하에서 측정된다면 달라질 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 결합 파라미터(예를 들어, K_D, K_{on}, K_{off})의 측정은 전형적으로 표준화된 조건, 및 표준화된 완충액을 사용하여 행해진다. 예를 들어, Biacore 3000 또는 ProteOn을 사용하는 친화도 측정에 대한 내부 오차(표준 편차, SD로서 측정됨)는 전형적인 검출 한계 내에서의 측정에 대해 전형적으로 5 내지 33% 이내일 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 따라서, K_D와 관련하여 용어 "약"은 이 검정에서의 전형적인 표준 편차를 반영한다. 예를 들어, 1×10^{-9} M의 K_D에 대한 전형적인 SD는 최대 $\pm 0.33\times10^{-9}$ M이다.

[0159] 항원 특이적 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 활성화는 공지된 프로토콜 및 US20170121409의 실시예 1에 기재된 것들을 사용하여 혼합 림프구 반응(Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) 검정에서의 증가된 T 세포 증식, MLR 검정에서의 증가된 인터페론-γ(IFN-γ) 분비, MLR 검정에서의 증가된 TNF-α 분비, 사이토메갈로바이러스 항원 검정(CMV 검정)에서의 증가된 IFN-γ 분비, 또는 CMV 검정에서의 증가된 TNF-α 분비를 측정함으로써 평가될 수 있다. 측정된 T 세포 작용성이 본 출원의 항체에 의해 용량-의존적 방식으로 증가할 경우, 본 출원의 항체는 항원 특이적 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T의 활성화를 향상시킨다.

[0160] 항-PD-1 항체, 및 이의 단편은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 항-PD-1 항체는 전체 내용이 본 명세서에

통합되는 US20170121409에 기재된 것들을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0161] 항-PD-1 항체의 예는, 예를 들어, 각각 US20170121409의 서열번호 82, 83 및 84(본 출원에서 서열번호 25, 26 및 27에 상응함) 또는 각각 US20170121409의 서열번호 82, 83 및 85(본 출원에서 서열번호 25, 26 및 28에 상응함)의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 PD-1을 특이적으로 결합하는 단리된 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0162] 항-PD-1 항체의 예는, 예를 들어, 각각 US20170121409의 서열번호 86, 87 및 88(본 출원에서 서열번호 29, 30 및 31에 상응함)의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 PD-1을 특이적으로 결합하는 단리된 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0163] US20170121409의 서열번호 82 내지 88은 유사한 HCDR1, HCDR2, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열, 및 이러한 서열의 유사한 2 개의 HCDR3 기를 갖는 PD-1을 특이적으로 결합하는 길항성 항체의 친화성-성숙 변이체의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 속 서열을 나타낸다. 속 내에의 항체는 약 1×10^{-7} M 미만, 예컨대, 약 1×10^{-8} M 미만, 예를 들어, 약 1×10^{-9} M 미만, 또는 예를 들어, 약 1×10^{-10} M 미만의 K_D로 PD-1을 결합한다. 이러한 항-PD-1 항체의 예는 US20170121409에 기재된 바와 같은 항체 PD1B114, PD1B149, PD1B160, PD1B162, PD1B164, PD1B11, PD1B183, PD1B184, PD1B185, PD1B187, PD1B71, PD1B177, PD1B70, PD1B175, PD1B194, PD1B195, PD1B196, PD1B197, PD1B198, PD1B199, PD1B200, PD1B201 및 PD1B244의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열을 갖는 항체이다.

[0164] 항-PD-1 항체의 예는, 예를 들어, US20170121409의 서열번호 41 내지 48 또는 63 내지 34의 중쇄 가변 영역(VH) 내에 함유된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3(여기서, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3는 코티아, 카바트, 또는 IMGT에 의해 정의됨)를 포함하는 PD-1을 특이적으로 결합하는 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0165] 항-PD-1 항체의 예는, 예를 들어, US20170121409의 서열번호 49 내지 62 또는 65의 경쇄 가변 영역(VL) 내에 함유된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3(여기서, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3는 코티아, 카바트, 또는 IMGT에 의해 정의됨)를 포함하는 PD-1을 특이적으로 결합하는 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0166] 항-PD-1 항체의 예는, 예를 들어, 하기를 포함하는 PD-1을 특이적으로 결합하는 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다:

[0167] US20170121409의 서열번호 10 내지 12(본 출원에서 서열번호 32 내지 34에 상응함)의 HCDR1;

[0168] US20170121409의 서열번호 13 내지 15(본 출원에서 서열번호 35 내지 37에 상응함)의 HCDR2; 및

[0169] US20170121409의 서열번호 16 내지 19(본 출원에서 서열번호 38 내지 41에 상응함)의 HCDR3; 및/또는

[0170] US20170121409의 서열번호 20 내지 25(본 출원에서 서열번호 42 내지 47에 상응함)의 LCDR1;

[0171] US20170121409의 서열번호 26 내지 30(본 출원에서 서열번호 48 내지 52에 상응함)의 LCDR2; 및

[0172] US20170121409의 서열번호 31 내지 40(본 출원에서 서열번호 53 내지 62에 상응함)의 LCDR3.

[0173] 항-PD-1 항체의 예는, 예를 들어, US20170121409의 서열번호 72, 서열번호 74, 서열번호 76, 서열번호 212, 서열번호 214, 서열번호 216, 서열번호 218, 서열번호 220, 서열번호 222의 HC, 서열번호 224 또는 서열번호 226의 HC 또는 서열번호 228의 HC를 포함하는 PD-1를 특이적으로 결합하는 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0174] 항-PD-1 항체의 예는, 예를 들어, US20170121409의 서열번호 73, 서열번호 75, 서열번호 77, 서열번호 213, 서열번호 215, 서열번호 217, 서열번호 219, 서열번호 221, 서열번호 223, 서열번호 225, 서열번호 227 또는 서열번호 229의 LC를 포함하는 PD-1를 특이적으로 결합하는 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0175] 본 출원의 PD-1을 특이적으로 결합하는 예시적인 길항성 항체의 VH, VL, HCDR 및 LCDR 서열은 US20170121409의 표 2에 나타나 있다.

[0176] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 IgG1 동종형이다.

[0177] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 IgG2 동종형이다.

[0178] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 야생형 IgG2와 비교하여 V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S 및

P331S 치환을 포함하는 IgG2 동종형이다.

[0179] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 IgG3 동종형이다.

[0180] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 IgG4 동종형이다.

[0181] 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 야생형 IgG4와 비교하여 S228P 치환을 포함하는 IgG4 동종형이다.

[0182] US20170121409의 표 2, 표 21 및 표 22에 나타나 있는 VH, VL 또는 VH 및 VL 아미노산 서열을 포함하는 본 출원의 PD-1를 특이적으로 결합하는 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 변이체는 본 출원의 범위 내에 있다. 예를 들어, 변이체는 상동성 항체를 보유하거나 모 항체와 비교하여 개선된 기능적 특성을 갖는 한 VH 및/또는 VL에 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개, 10 개, 11 개, 12 개, 13 개, 14 개 또는 15 개의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 서열 동일성은 본 출원의 VH 또는 VL 아미노산 서열에 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%일 수 있다. 선택적으로, 모 항체와 비교한 변이체의 임의의 변이는 변이체의 CDR 내에 있지 않다.

[0183] 또한, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 VH 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열을 포함하는 VL을 포함하는 PD-1를 특이적으로 결합하는 길항성 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 제공되고, 여기서 CDR 서열 중 하나 이상의 본 명세서에 기재된 항체(예를 들어, US20170121409의 표 2, 표 21 및 표 22에 나타나 있는 항체)에 기초한 특정 아미노산 서열, 또는 이의 보존적 변형을 포함하고, 여기서 항체는 본 출원의 PD-1을 특이적으로 결합하는 모 길항성 항체의 요망되는 기능적 특성을 보유한다.

[0184] "보존적 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 유의한 영향을 주지 않거나 그를 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭한다. 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 보존적 치환은 아미노산이 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것들이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기들의 패밀리는 잘 정의되어 있고, 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 비하전된 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신, 트립토판), 방향족 측쇄(예를 들어, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘, 티로신), 지방족 측쇄(예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 세린, 트레오닌), 아미드(예를 들어, 아스파라긴, 글루타민), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 아이소류신), 및 황-함유 측쇄(시스테인, 메티오닌)를 갖는 아미노산을 포함한다. 추가로, 폴리펩티드 내의 임의의 천연의 잔기는 또한 알라닌 스캐닝(scanning) 돌연변이생성(문헌[MacLennan et al., Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67, 1998; Sasaki et al., Adv. Biophys. 35:1-24, 1998])에 대해 이전에 기재된 바와 같이 알라닌으로 치환될 수 있다. 본 출원의 항체에 대한 아미노산 치환은 잘 알려진 방법에 의해, 예를 들어 PCR 돌연변이생성(미국 특허 제4,683,195호)에 의해 이루어질 수 있다. 대안적으로, 변이체의 라이브러리를 알려진 방법을 사용하여 생성할 수 있는데, 예를 들어, 무작위(NNK) 또는 비무작위 코돈, 예를 들어 DVK 코돈 - 이는 11개의 아미노산(Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp)을 인코딩함 - 을 사용하여 생성할 수 있다. 생성되는 항체 변이체들은 본 명세서에 기재된 검정을 사용하여 이들의 특성에 대해 시험될 수 있다.

[0185] 항체, 및 이의 단편을 제조하고 사용하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 이러한 공지된 방법은 본 출원의 맥락에서 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체, 및 이의 단편을 제조하고 사용하는 데 사용될 수 있다. 항-PD-1 항체, 및 이의 단편을 제조하고 사용하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 모두 그 전체가 본 명세서에 참조로 통합되는 US20020110836, US20030044768, US20050180969, US20060110383, US20060210567, US2007/0065427, US2007/0122378, US20080025979, US20080044837, US20090028857, US20090055944, US20090217401, US20100040614, US20100055102, US20100151492, US20100266617, US20110008369, US20110085970, US20110117085, US20110171215, US20110171220, US20110177088, US20110195068, US20110229461, US20110271358, US2012/0237522, US20120039906, US20130017199, US20130022595, US20130095098, US20140234296, US20140044738, US20150079109, US20150203579, US20160075783, US20170210806, US20170247454, US20170121409, WO2017025051 및 WO2018039131에 기재되어 있다.

[0186] **조성물, 치료적 조합물, 및 백신**

[0187] 본 출원은 또한 하나 이상의 HBV 항원, 본 출원에 따른 하나 이상의 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터, 및/또는 HBV 유전자의 발현을 억제하기 위한 하나 이상의 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 조성물, 치료적 조합물, 보다 구체적으로 키트, 및 백신에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 본

출원의 HBV 항원, 폴리뉴클레오티드(RNA 및 DNA 포함), 및/또는 벡터, 및 본 명세서에 기술된 본 출원의 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 임의의 것이 본 출원의 조성물, 치료적 조합물 또는 키트, 및 백신에 사용될 수 있다.

[0188] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원 또는 서열번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 또는 비-천연 핵산 분자(DNA 또는 RNA), 상기 단리된 또는 비-천연 핵산 분자를 포함하는 벡터, 및/또는 상기 단리된 또는 비-천연 핵산 분자에 의해 인코딩되는 단리된 또는 비-천연 폴리펩티드를 포함한다.

[0189] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 또는 비-천연 핵산 분자(DNA 또는 RNA)를 포함한다.

[0190] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 단리된 또는 비-천연 핵산 분자(DNA 또는 RNA)를 포함한다.

[0191] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 또는 비-천연 핵산 분자(DNA 또는 RNA); 및 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV Pol 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 또는 비-천연 핵산 분자(DNA 또는 RNA)를 포함한다. 절두된 HBV 코어 항원 및 HBV Pol 항원을 위한 코딩 서열은 동일한 단리된 또는 비-천연 핵산 분자(DNA 또는 RNA) 내에 또는 두 개의 상이한 단리된 또는 비-천연 핵산 분자(DNA 또는 RNA) 내에 존재할 수 있다.

[0192] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터, 바람직하게 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 벡터)를 포함한다.

[0193] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은, 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV Pol 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터, 바람직하게 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 벡터)를 포함한다.

[0194] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터, 바람직하게 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 벡터); 및 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV Pol 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 벡터, 바람직하게 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 벡터)를 포함한다. 상기 절두된 HBV 코어 항원을 위한 코딩 서열을 포함하는 벡터 및 HBV Pol 항원을 위한 코딩 서열을 포함하는 벡터는 동일한 벡터 또는 두 개의 상이한 벡터일 수 있다.

[0195] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은, 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV Pol 항원에 작동적으로 연결된, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 포함하는 융합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 바람직하게 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 벡터)를 포함하거나, 그 반대로 마찬가지이다. 바람직하게, 상기 융합 단백질은 절두된 HBV 코어 항원을 HBV Pol 항원에 작동적으로 연결시키거나, 그 반대로 마찬가지인 링커를 추가로 포함한다. 바람직하게, 상기 링커는 (AlaGly)n의 아미노산 서열을 갖고, n은 2 내지 5의 정수이다.

[0196] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 단리된 또는 비-천연 절두된 HBV 코어 항원을 포함한다.

[0197] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아

미노산 서열을 포함하는 단리된 또는 비-천연 HBV Pol 항원을 포함한다.

[0198] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 4와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 단리된 또는 비-천연 절두된 HBV 코어 항원; 및 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단리된 또는 비-천연 절두된 HBV pol 항원을 포함한다.

[0199] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 서열번호 7과 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 7과 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HBV Pol 항원에 작동적으로 연결된, 서열번호 2 또는 서열번호 4와 적어도 90% 동일한, 바람직하게 서열번호 2 또는 서열번호 14와 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 포함하거나, 그 반대도 마찬가지로 포함하는, 단리된 또는 비-천연 융합 단백질을 포함한다. 바람직하게, 상기 융합 단백질은 절두된 HBV 코어 항원을 HBV Pol 항원에 작동적으로 연결시키거나, 그 반대로 마찬가지인 링커를 추가로 포함한다. 바람직하게, 상기 링커는 (AlaGly)n의 아미노산 서열을 갖고, n은 2 내지 5의 정수이다.

[0200] 본 출원의 일 구현예에서, 조성물은 US20170121409에 기재된 것들과 같은 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0201] 본 출원은 또한 본 출원의 구현예에 따른 절두된 HBV 코어 항원 및 HBV pol 항원을 발현하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 출원의 구현예에 따른 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 치료적 조합물 또는 키트에 관한 것이다. 본 명세서에 기술된 본 출원의 HBV 코어 및 pol 항원을 인코딩하는 임의의 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터는 본 출원의 치료적 조합물 또는 키트에 사용될 수 있고, 본 명세서에 기술된 본 출원의 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 본 출원의 치료적 조합물 또는 키트에 사용될 수 있다.

[0202] 본 출원의 구현예에 따르면, HBV 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 HBV 감염을 치료하는 데 사용하기 위한 치료적 조합물 또는 키트는

[0203] i) a) 서열번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원, 및

[0204] b) 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자,

[0205] c) 서열번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원으로서, 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, HBV 폴리머라제 항원, 및

[0206] d) HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자

[0207] 중 적어도 하나; 및

[0208] ii) 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0209] 본 출원의 구체적 구현예에서, 치료적 조합물 또는 키트는 i) 서열번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴크레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자; ii) 서열번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자로서, HBV 폴리머라제 항원이 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, 제2 비-천연 핵산 분자; 및 iii) 각각 서열번호 25, 26 및 27 또는 28의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 각각 서열번호 29, 30 및 31의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 바람직하게는 서열번호 i) 각각 32, 35, 38, 42, 48 및 53; ii) 각각 32, 35, 38, 43, 48 및 54; iii) 각각 32, 36, 38, 44, 49 및 55; iv) 각각 32, 36, 38, 44, 48 및 56; v) 각각 32, 36, 38, 45, 50 및 57; vi) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 53; vii) 각각 32, 35, 39, 42, 48 및 58; viii) 각각 32, 35, 39, 43, 48 및 54; ix) 각각 32, 35, 39, 43, 49 및 59; x) 각각 32, 35, 39, 45, 48 및 54; xi) 각각 32, 36, 39, 45, 50 및 57; xii) 각각 32, 36, 39, 44, 48 및 56; 또는 xiii) 각각 32, 36, 39, 45, 48 및 54의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0210] 본 출원의 구현예에 따르면, 백신 조합물 또는 키트 내의 폴리뉴클레오티드는 연결되거나 또는 별개일 수 있어, 동일하거나 상이한 폴리뉴클레오티드로부터 발현되는지의 여부에 상관 없이, 이러한 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 HBV 항원이 서로 융합되거나 별개 단백질로서 생산된다. 일 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드는 동일한 또는 별개의 조성물에서 조합되어 사용되는 별개의 벡터, 예를 들어, DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 존재하여, 발현된 단백질이 또한 별개의 단백질이지만 조합되어 사용된다. 다른 구현예에서, 제1 및 제2

폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 HBV 항원은 동일한 벡터로부터 발현될 수 있어, HBV 코어-pol 융합 항원이 생산된다. 선택적으로, 코어 및 pol 항원은 짧은 링커에 의해 서로 연결 또는 융합될 수 있다. 대안적으로, 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 HBV 항원은 코어 및 pol 항원 코딩 서열 사이의 리보좀 슬리파지(slippage) 부위(시스-하이드롤라제 부위로도 알려짐)를 사용하여 단일 벡터로부터 독립적으로 발현될 수 있다. 이 전략은 단일 mRNA 전사체로부터 개별 코어 및 pol 항원이 내부에서 생산되는 바이시스트로닉(bicistronic) 발현 벡터를 초래한다. 이러한 바이시스트로닉 발현 벡터로부터 생산된 코어 및 pol 항원은 mRNA 전사체 상의 코딩 서열의 배치에 의존하여 추가적인 N 또는 C-말단 잔기를 가질 수 있다. 이 목적을 위해 사용될 수 있는 리보좀 슬리파지 부위의 예는 구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus, FMDV)로부터의 FA2 슬리파지 부위를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 다른 가능성은 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩되는 HBV 항원이 하나는 HBV 코어 항원을 인코딩하고 하나는 HBV pol 항원을 인코딩하는, 두 개의 별개의 벡터로부터 독립적으로 발현될 수 있는 것이다.

[0211] 바람직한 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드는 별개의 벡터, 예를 들어, DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 존재한다. 바람직하게, 별개의 벡터는 동일한 조성물에 존재한다.

[0212] 본 출원의 바람직한 구현예에 따르면, 치료적 조합물 또는 키트는 제1 벡터에 존재하는 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 벡터에 존재하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 제1 및 제2 벡터는 동일하거나 상이할 수 있다. 바람직하게, 상기 벡터는 DNA 플라스미드이다.

[0213] 본 출원의 구체적인 구현예에서, 제1 벡터는 제1 DNA 플라스미드이고 제2 벡터는 제2 DNA 플라스미드이다. 제1 및 제2 DNA 플라스미드 각각은 복제 기점, 바람직하게 서열번호 21의 pUC ORI, 및 바람직하게 서열번호 23과 적어도 90% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 코돈 최적화된 Kanr 유전자를 포함하는, 바람직하게 bla 프로모터, 예컨대, 서열번호 24에 나타나 있는 bla 프로모터의 조절 하에 놓인, 항생제 내성 카세트를 포함한다. 각각의 제1 및 제2 DNA 플라스미드는 독립적으로 프로모터 서열, 인핸서 서열 및 제1 폴리뉴클레오티드 서열 또는 제2 폴리뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 중 적어도 하나를 추가로 포함한다. 바람직하게, 각각의 제1 및 제2 DNA 플라스미드는 제1 폴리뉴클레오티드 또는 제2 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 상류 서열을 포함하며, 상기 상류 서열은, 5' 말단으로부터 3' 말단으로, 서열번호 18 또는 서열번호 19의 프로모터 서열, 인핸서 서열, 및 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 각각의 제1 및 제2 DNA 플라스미드는 또한 HBV 항원의 코딩 서열의 하류에 위치한 서열번호 20의 bGH 폴리아데닐화 신호와 같은 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.

[0214] 본 출원의 구체적 일 구현예에서, 제1 벡터는 바이러스 벡터이고 제2 벡터는 바이러스 벡터이다. 바람직하게, 각각의 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 보다 바람직하게 Ad26 또는 Ad35 벡터이고, 본 출원의 HBV pol 항원 또는 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드; 5' 말단으로부터 3' 말단으로, 바람직하게 서열번호 19의 CMV 프로모터 서열인 프로모터 서열, 바람직하게 서열번호 12의 ApoAI 유전자 단편 서열인 인핸서 서열, 및 바람직하게 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분비 신호인 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 상류 서열; 및 폴리아데닐화 신호로서 바람직하게 서열번호 13의 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 하류 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0215] 본 출원의 다른 바람직한 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오티드는 단일 벡터, 예를 들어, DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터에 존재한다. 바람직하게, 단일 벡터는 본 출원의 HBV pol 항원 및 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는, 바람직하게 융합 단백질로서 본 출원의 HBV pol 항원 및 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드; 5' 말단으로부터 3' 말단으로, 바람직하게 서열번호 19의 CMV 프로모터 서열인 프로모터 서열, 바람직하게 서열번호 12의 ApoAI 유전자 단편 서열인 인핸서 서열, 및 바람직하게 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분비 신호인 신호 펩티드 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, HBV pol 및 절두된 코어 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 상류 서열; 및 폴리아데닐화 신호로서 바람직하게 서열번호 13의 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함하는 HBV 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 하류 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는, 아데노바이러스 벡터, 더욱 바람직하게 Ad26 벡터이다.

[0216] 본 출원의 치료적 조합물이 제1 벡터, 예컨대, DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 및 제2 벡터, 예컨대, DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 포함할 경우, 각각의 제1 및 제2 벡터의 양은 특별히 제한되지 않는다. 예를

들어, 제1 DNA 플라스미드 및 제2 DNA 플라스미드는 중량비로 10:1 내지 1:10, 예컨대, 중량비로 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 또는 1:10의 비율로 존재할 수 있다. 바람직하게, 제1 및 제2 DNA 플라스미드는 중량비로 1:1의 비율로 존재한다. 본 출원의 치료적 조합물은 HBV 감염을 치료하는 데 유용한 제3 활성제를 인코딩하는 제3 벡터를 추가로 포함할 수 있다.

[0217] 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물은 추가적 HBV 항원 및/또는 추가적 HBV 항원 또는 그 면역원적 단편, 예컨대, HBsAg, HBV L 단백질 또는 HBV 외피 단백질, 또는 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 인코딩하는 추가적 폴리뉴클레오티드 또는 벡터, 또는 본 출원의 구현예에 따른 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 그러나, 구체적 구현예에서, 본 출원의 상기 조성물 및 치료적 조합물은 특정 항원을 포함하지 않는다.

[0218] 구체적 구현예에서, 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물 또는 키트는 HBsAg 또는 HBsAg를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.

[0219] 다른 구체적 구현예에서, 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물 또는 키트는 HBV L 단백질 또는 HBV L 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.

[0220] 본 출원의 추가의 다른 구체적 구현예에서, 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물은 HBV 외피 단백질 또는 HBV 외피 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.

[0221] 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물은 약학적으로 허용되는 담체를 또한 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는 비-독성이고 활성 성분의 효능과 경합하지 않아야 한다. 약학적으로 허용되는 담체는 하나 이상의 부형제, 예컨대, 결합제, 붕해제, 팽윤제, 현탁화제, 유화제, 수화제, 윤활제, 풍미제, 감미제, 보존제, 염료, 가용화제 및 코팅을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 비히클, 예컨대, 지질 나노입자(LNP)를 포함할 수 있다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은 투여 경로, 예를 들어, 근육내, 피내, 피하, 경구, 정맥내, 피부, 점막내(예를 들어, 장), 비내 또는 복강내 경로에 의존할 수 있다. 액체 주사 조제물에 있어서, 예를 들어, 현탁액 및 용액, 적합한 담체 및 첨가제는 물, 글리콜, 오일, 알콜, 보존제, 착색제 등을 포함한다. 고체 경구 조제물에 있어서, 예를 들어, 분말, 캡슐, 캐플릿, 젤캡 및 정제, 적합한 담체 및 첨가제는 전분, 당, 희석제, 과립화제, 윤활제, 결합제, 붕해제 등을 포함한다. 비강 스프레이/흡입제 혼합물에 있어서, 수용액/현탁액은 물, 글리콜, 오일, 연화제, 안정화제, 수화제, 보존제, 방향제, 풍미제 등을 적합한 담체 및 첨가제로서 포함할 수 있다.

[0222] 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물은 경구(장관) 투여 및 비경구 주사를 포함하지만, 이로 제한되지 않으며, 투여를 촉진하고 유효성을 향상하기 위한 대상체에 대한 투여에 적합한 임의의 물질로 제형화될 수 있다. 비경구 주사는 정맥내 주사 또는 주입, 피하 주사, 피내 주사, 및 근육내 주사를 포함한다. 본 출원의 조성물은 또한 점막통과, 눈, 직장, 장기 작용 이식, 설하 투여, 혀 아래, 경구 점막으로부터 문맥 순환, 흡입, 또는 비강내를 포함하는 다른 투여 경로를 위해 제형화될 수 있다.

[0223] 본 출원의 바람직한 구현예에서, 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물은 비경구 주사, 바람직하게 피하, 피내 주사 또는 근육내 주사, 보다 바람직하게 근육내 주사로 제형화된다.

[0224] 본 출원의 구현예에 따르면, 투여를 위한 조성물 및 치료적 조합물은 전형적으로 약학적으로 허용되는 담체 내의 완충 용액, 예를 들어, 완충 식염수와 같은 수성 담체 등, 예를 들어, 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 포함할 것이다. 상기 조성물 및 치료적 조합물은 또한 pH 조절제 및 완충제와 같은 생리학적 조건을 근사화하기 위해 요구되는 약학적으로 허용되는 물질을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 플라스미드 DNA를 포함하는 조성물 또는 치료적 조합물은 포스페이트 완충 식염수(PBS)를 약학적으로 허용되는 담체로서 함유할 수 있다. 상기 플라스미드 DNA는, 예를 들어, 0.5 mg/mL 내지 5 mg/mL, 예컨대, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 또는 5 mg/mL, 바람직하게 1 mg/mL의 농도로 존재할 수 있다.

[0225] 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물은 당업계에 잘 알려져 있는 방법에 따라 백신("면역원적 조성물"로도 지칭됨)으로 제형화될 수 있다. 이러한 조성물은 면역 반응을 증진하기 위해 애주번트를 포함할 수 있다. 제형 내 각 성분의 최적 비율은 본 개시의 관점에서 당업자에게 잘 알려져 있는 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0226] 본 출원의 구체적 구현예에서, 조성물 또는 치료적 조합물은 DNA 백신이다. DNA 백신은 전형적으로 강력한 진핵생물 프로모터의 조절 하에 관심 항원을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 박테리아 플라스미드를 포함한다. 숙주의 세포의 세포질로 플라스미드가 전달되면, 인코딩되는 항원은 내생적으로 생산 및 프로세싱된다. 결과물 항원은 전형적으로 체액 및 세포-매개 면역 반응 둘 다를 유도한다. DNA 백신은 적어도 이들이 개선된

안전성을 제공하고, 온도 안정성이고, 항원성 변이체를 발현하기 위해 용이하게 개조되고, 생산이 간단하기 때문에 유리하다. 본 출원의 임의의 DNA 플라스미드를 이러한 DNA 백신을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0227] 본 출원의 다른 구체적 구현예에서, 조성물 또는 치료적 조합물은 RNA 백신이다. RNA 백신은 전형적으로 관심 항원, 예를 들어, 본 출원에 따른 융합 단백질 또는 HBV 항원을 인코딩하는 적어도 하나의 단일 가닥 RNA 분자를 포함한다. DNA 백신과 유사하게 숙주의 세포의 세포질로 RNA가 전달되면, 인코딩되는 항원은 내생적으로 생산 및 프로세싱되며, 체액 및 세포-매개 면역 반응 둘 다를 유도한다. RNA 서열은 번역 효율성을 향상시키기 위해 코돈 최적화될 수 있다. RNA 분자는 안정성 및/또는 번역을 증진시키기 위해 본 개시의 관점에서 기술분야에 알려져 있는 임의의 방법에 의하여 변형, 예컨대, 폴리A 꼬리, 예를 들어, 적어도 30 아데노신 잔기를 첨가하여; 및/또는 5-말단을 변형된 리보뉴클레오티드로, 예를 들어, 7-메틸구아노신 캡으로 캡핑하여 변형될 수 있으며, 이는 RNA 합성 도중에 포함되거나 RNA 전사 후 효소적으로 조작될 수 있다. RNA 백신은 또한 알파바이러스 발현 벡터로부터 개발된 자기-복제 RNA 백신일 수 있다. 자기-복제 RNA 백신은 융합 단백질 또는 HBV 항원 RNA의 복제를 조절하는 서브게놈 프로모터와 뒤이어 복제효소의 하류에 위치한 합성 폴리 A 꼬리를 갖는 알파바이러스 패밀리에 속하는 바이러스 유래의 복제효소 RNA 분자를 포함한다.

[0228] 특정 구현예에서, 추가의 애주번트는 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물에 포함되거나, 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물과 공동-투여된다. 또 다른 애주번트의 사용은 선택적이며, 조성물이 백신접종 목적을 위해 사용될 때 면역 반응을 보다 증진할 수 있다. 공동-투여 또는 본 출원에 따른 조성물 내에 포함시키기에 적합한 애주번트는 인간에게 잠재적으로 안전하고 내약성이 우수하며 효과적인 것이 바람직할 것이다. 애주번트는 소분자 또는 항체로서, 면역 체크포인트 억제제(예를 들어, 항-PD-1, 항-TIM-3 등), 톨-유사 수용체 효능제(예를 들어, TLR7 효능제 및/또는 TLR8 효능제), RIG-1 효능제, IL-15 수퍼효능제(Altor Bioscience), 돌연변이 IRF3 및 IRF7 유전적 애주번트, STING 효능제(Aduro), FLT3L 유전적 애주번트, 및 IL-7-hyFc를 포함할 수 있지만, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 애주번트는, 예를 들어, 다음 항-HBV 제제 중에서 선택될 수 있다: HBV DNA 폴리머라제 억제제; 면역조절제; 톨-유사 수용체 7 조절제; 톨-유사 수용체 8 조절제; 톨-유사 수용체 3 조절제; 인터페론 알파 수용체 리간드; 히알루로니다제 억제제; IL-10의 조절제; HBsAg 억제제; 톨-유사 수용체 9 조절제; 사이클로필린 억제제; HBV 예방 백신; HBV 치료 백신; HBV 바이러스 진입 억제제; 바이러스 mRNA를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 보다 구체적으로 항-HBV 안티센스 올리고뉴클레오티드; 단(short) 경합 RNA(siRNA), 보다 구체적으로 항-HBV siRNA; 엔도뉴클레아제 조절제; 리보뉴클레오티드 리덕타제의 억제제; B형 간염 E 항원 억제제; B형 간염 바이러스의 표면 항원을 표적화하는 HBV 항체; HBV 항체; CCR2 케모카인 길항제; 티모신 효능제; 사이토킨, 예컨대, IL12; 캡시드 조립 조절제, 핵단백질 억제제(HBV 코어 또는 캡시드 단백질 억제제); 핵산 폴리머(NAP); 레티노산-유도성 유전자 1의 자극제; NOD2의 자극제; 재조합 티모신 알파-1; B형 간염 바이러스 복제 억제제; PI3K 억제제; cccDNA 억제제; 면역 체크포인트 억제제, 예컨대, PD-L1 억제제, PD-1 억제제, TIM-3 억제제, TIGIT 억제제, Lag3 억제제, 및 CTLA-4 억제제; 면역 세포(보다 구체적으로 T 세포) 상에 발현되는 공동-자극 수용체의 효능제, 예컨대, CD27 및 CD28; BTK 억제제; HBV 치료를 위한 기타 약제; IDO 억제제; 아르기나제 억제제; 및 KDM5 억제제.

[0229] 특정 구현예에서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자는 독립적으로 지질 나노입자(LNP)와 제형화된다.

[0230] 본 출원은 또한 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물의 제조 방법을 제공한다. 조성물 또는 치료적 조합물의 제조 방법은 본 출원의 HBV 항원, 벡터 및/또는 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 것을 포함한다. 당해 분야의 숙련가는 이러한 조성물의 제조에 사용되는 통상적인 기술에 익숙할 것이다.

[0231] **면역 반응을 유도하거나 HBV 감염을 치료하는 방법**

[0232] 본 출원은 또한 B형 간염 바이러스(HBV)에 대한 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV)에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 면역원적 유효량의 본 출원의 조성물 또는 면역원적 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 기술된 본 출원의 임의의 조성물 및 치료적 조합물이 본 출원의 방법에 사용될 수 있다.

[0233] 본 명세서에서 사용되는 용어 "감염"은 질환을 야기하는 인자에 의한 숙주의 침입을 지칭한다. 질환을 야기하는 인자는 숙주에 침입할 수 있고, 숙주 내에서 복제 또는 증식할 수 있을 때 "감염성"이라 여겨진다. 감염성 인자의 예는 바이러스, 예를 들어, HBV 및 아데노바이러스의 특정 종, 프리온, 박테리아, 균류, 원생동물 등을 포함한다. "HBV 감염"은 특히 숙주 유기체, 예컨대, 숙주 유기체의 세포 및 조직의 HBV에 의한 침입을 지칭한다.

[0234] 본 명세서에 기술된 방법에 관하여 사용될 때의 문구 "면역 반응을 유도하는"은 감염, 예를 들어, HBV 감염에 대하여 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 요망하는 면역 반응 또는 효과를 야기하는 것을 포함한다. "면역 반응을 유도하는"은 또한 병원체, 예를 들어, HBV에 대하여 치료를 위한 치료적 면역을 제공하는 것을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료적 면역" 또는 "치료적 면역 반응"은 백신접종된 대상체가 대항하여 백신접종된 병원체로의 감염을 제어할 수 있는 것, 예컨대, HBV 백신의 백신접종에 의해 부여된 HBV 감염에 대한 면역, 을 의미한다. 일 구현예에서, "면역 반응을 유도하는"은 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에 면역을 생산하는 것, 예컨대, 질환, 예를 들어, HBV 감염에 대하여 치료적 효과를 제공하는 것을 의미한다. 구체적 구현예에서, "면역 반응을 유도하는"은 HBV 감염에 대하여, 세포 면역, 예컨대, T 세포 반응을 야기 또는 향상하는 것을 지칭한다. 특정 구현예에서, "면역 반응을 유도하는"은 HBV 감염에 대하여, 체액 면역 반응을 야기하거나 개선하는 것을 지칭한다. 특정 구현예에서, "면역 반응을 유도하는"은 HBV 감염에 대하여 세포 및 체액 면역 반응을 야기하거나 개선하는 것을 지칭한다.

[0235] 본 명세서에서 사용되는 용어 "보호 면역성" 또는 "보호 면역 반응"은 백신접종된 대상체가 백신접종된 병원체에 대항하여 감염을 조절할 수 있는 것을 의미한다. 통상, 전개된 "보호 면역 반응"을 갖는 대상체는 단지 경증 내지 중등도 임상 증상만을 전개하거나 증상이 전혀 없다. 통상, 특정 병원체에 대항하여 "보호 면역 반응" 또는 "보호 면역성"을 갖는 대상체는 상기 병원체로의 감염 결과로 사망하지 않을 것이다.

[0236] 전형적으로, 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물을 투여하는 것은 HBV 감염 또는 HBV 감염의 특징적 증상의 전개 후에 HBV에 대한 면역 반응을 생성하는, 예를 들어, 치료적 백신접종을 위한, 치료적 목표를 가질 것이다.

[0237] 본 명세서에서 사용되는 "면역원적 유효량" 또는 "면역학적 유효량"은 이를 필요로 하는 대상체에서 요망되는 효과 또는 면역 반응을 충분히 유도하는 조성물, 폴리뉴클레오티드, 벡터 또는 항원의 양을 의미한다. 면역원적 유효량은 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 유도하기에 충분한 양일 수 있다. 면역원적 유효량은 이를 필요로 하는 대상체에서 면역을 생산, 예를 들어, HBV 감염과 같은 질환에 대한 치료적 효과를 제공하기에 충분한 양일 수 있다. 면역원적 유효량은 다양한 요인, 예컨대, 대상체의 신체 상태, 연령, 체중, 건강 등; 특정 적용, 예를 들어, 보호 면역 또는 치료적 면역을 제공하는지; 및 그에 대한 면역성이 요망되는 특정 질환, 예를 들어, 바이러스 감염에 따라 다를 수 있다. 면역원적 유효량은 본 개시의 관점에서 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0238] 본 출원의 구체적 구현예에서, 면역원적 유효량은 다음 효과 중 1 개, 2 개, 3 개, 4 개 이상을 달성하기에 충분한 조성물 또는 치료적 조합물의 양을 지칭한다: (i) HBV 감염 또는 이와 연관된 증상의 중증도를 감소 또는 개선; (ii) HBV 감염 또는 이와 연관된 증상의 지속기간을 감소; (iii) HBV 감염 또는 이와 연관된 증상의 진행을 예방; (iv) HBV 감염 또는 이와 연관된 증상의 퇴행을 야기; (v) HBV 감염, 또는 이와 연관된 증상의 전개 또는 시작을 예방; (vi) HBV 감염 또는 이와 연관된 증상의 재발을 예방; (vii) HBV 감염을 갖는 대상체의 입원 감소; (viii) HBV 감염을 갖는 대상체의 입원 기간 감소; (ix) HBV 감염이 있는 대상체의 생존을 증가; (x) 대상체 내의 HBV 감염을 제거; (xi) 대상체 내의 HBV 복제를 억제 또는 감소; 및/또는 (xii) 다른 요법의 예방적 또는 치료적 효과(들)를 증진 또는 향상.

[0239] 면역원적 유효량은 또한 임상적 혈청전환으로의 진전과 일관되는 HBsAg 수준을 감소; 대상체의 면역계에 의한 감염된 간세포의 감소와 관련이 있는 일관된 HBsAg 제거를 달성; HBV-항원 특이적 활성 T-세포 개체군의 유도; 및/또는 12 개월 이내에 HBsAg의 지속적 손실을 달성하기에 충분한 양일 수 있다. 표적 지표의 예는 500 개 카피의 HBsAg 국제단위(IU)의 역치 미만의 보다 낮은 HBsAg 및/또는 보다 높은 CD8 수를 포함한다.

[0240] 일반 지침으로서, 면역학적 유효량은 DNA 플라스미드와 관련하여 사용되는 경우 총 DNA 플라스미드의 약 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL 범위, 예컨대, 0.1 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL. 0.75 mg/mL 1 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 또는 10 mg/mL일 수 있다. 바람직하게, DNA 플라스미드의 면역원적 유효량은 8 mg/mL 미만, 보다 바람직하게 6 mg/mL 미만, 보다 더 바람직하게 3 mg/mL 내지 4 mg/mL이다. 면역원적 유효량은 하나의 벡터 또는 플라스미드로부터 또는 복수의 벡터 또는 플라스미드로부터일 수 있다. 추가의 일반 지침으로서, 면역원적 유효량은 펩티드와 관련하여 사용되는 경우 투여 당 10 μg 내지 1 mg, 예컨대, 투여 당 10 μg, 20 μg, 50 μg, 100 μg, 200 μg, 300 μg, 400 μg, 500 μg, 600 μg, 700 μg, 800 μg, 9000 μg, 또는 1000 μg의 범위일 수 있다. 면역원적 유효량은 단일 조성물에서 또는 복수의 조성물, 예컨대, 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개 또는 10 개 조성물(예를 들어, 정제, 캡슐 또는 주사제, 또는 근육내 전달, 예컨대, 근육내 전달 패치를 사용한 근육내 전달을 위해 개조된 임의의 조성물)로 투여될 수 있으며, 복수의 캡슐 또는 주사의 투여는 종합적으로 대상체에 면역원적

유효량을 제공한다. 예를 들어, 두 개의 DNA 플라스미드가 사용될 경우, 면역원적 유효량은 3 mg/mL 내지 4 mg/mL, 각 플라스미드 당 1.5 mg/mL 내지 2 mg/mL일 수 있다. 또한 소위 프라임-부스트 요법으로, 대상체에 면역원적 유효량을 투여하고, 후속적으로 동일한 대상체에 하나 더(another)의 면역원적 유효량의 용량을 투여할 수 있다. 이러한 프라임-부스트 요법의 일반적 개념은 백신 분야의 당업자에 잘 알려져 있다. 추가적 부스터 투여는 필요한 경우 상기 요법에 선택적으로 추가될 수 있다.

[0241] 두 개의 DNA 플라스미드, 예를 들어, HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 DNA 플라스미드 및 HBV pol 항원을 인코딩하는 제2 DNA 플라스미드를 포함하는 치료적 조합물은 둘 다의 플라스미드를 혼합하고 혼합물을 단일 해부학적 부위에 전달하여 대상체에게 투여될 수 있다. 대안적으로, 단일 발현 플라스미드를 각각 전달하는 두 별개의 면역화가 수행될 수 있다. 이러한 구현예에서, 둘 다의 플라스미드가 두 별개의 면역화의 혼합으로서 단일 면역화로 투여되는지의 여부에 따라, 제1 DNA 플라스미드 및 제2 DNA 플라스미드는 중량비로 10:1 내지 1:10, 예컨대, 중량비로 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 또는 1:10의 비율로 투여될 수 있다. 바람직하게, 상기 제1 및 제2 DNA 플라스미드는 중량비로 1:1의 비율로 투여된다.

[0242] 일반 지침으로서, 면역학적 유효량은 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 관련하여 사용되는 경우 약 0.005 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 예를 들어, 약 0.05 mg/kg 내지 약 30 mg/kg 또는 약 5 mg/kg 내지 약 25 mg/kg, 또는 약 4 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 16 mg/kg 또는 약 24 mg/kg, 또는 예를 들어 약 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg의 범위일 수 있지만, 예를 들어, 약 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg 또는 100 mg/kg와 같이 더욱 더 높을 수 있다. 고정 단위 용량은 또한, 예를 들어, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 500 mg 또는 1000 mg로 주어질 수 있거나, 용량은 환자의 표면적, 예를 들어, 500 mg/m^2, 400 mg/m^2, 300 mg/m^2, 250 mg/m^2, 200 mg/m^2, 또는 100 mg/m^2에 기초할 수 있다. 환자를 치료하기 위해 통상 1 회 내지 8 회 용량(예를 들어, 1 회, 2 회, 3 회, 4 회, 5 회, 6 회, 7 회 또는 8 회)이 투여될 수 있지만, 9 회, 10 회, 11 회, 12 회, 13 회, 14 회, 15 회, 16 회, 17 회, 18 회, 19 회, 20 회 또는 그 초과의 용량이 주어질 수 있다.

[0243] 본 출원의 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 투여는 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 1 주, 2 주, 3 주, 1 개월, 5 주, 6 주, 7 주, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월 이상 후에 반복될 수 있다. 반복된 치료 과정이 만성 투여이므로 또한 가능하다. 반복 투여는 동일한 용량 또는 상이한 용량일 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 정맥내 주입에 의해 8 주 동안 매주 간격으로 8 mg/kg 또는 16 mg/kg로 투여되고, 이어서 추가 16 주 동안 2 주 마다 8 mg/kg 또는 16 mg/kg, 이어서 4 주 마다 8 mg/kg 또는 16 mg/kg으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일 용량 또는 24 시간, 12 시간, 8 시간, 6 시간, 4 시간, 또는 2 시간 마다의 분할 용량, 또는 이들의 조합을 이용하여 치료 개시 후 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일, 10 일, 11 일, 12 일, 13 일, 14 일, 15 일, 16 일, 17 일, 18 일, 19 일, 20 일, 21 일, 22 일, 23 일, 24 일, 25 일, 26 일, 27 일, 28 일, 29 일, 30 일, 31 일, 32 일, 33 일, 34 일, 35 일, 36 일, 37 일, 38 일, 39 일, 또는 40 일 중 적어도 하나, 또는 대안적으로 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 8 주, 9 주, 10 주, 11 주, 12 주, 13 주, 14 주, 15 주, 16 주, 17 주, 18 주, 19 주 또는 20 주 중 적어도 하나, 또는 이들의 임의의 조합으로 일당 약 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg, 예컨대, 0.5 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23 mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg 또는 100 mg/kg의 양의 일일 투여량으로 제공될 수 있다.

[0244] 바람직하게, 본 출원의 방법에 따라 치료되는 대상체는 HBV-감염된 대상체, 구체적으로 만성 HBV 감염을 갖는 대상체이다. 급성 HBV 감염은 후속하는 광범위 적응 면역 반응(예를 들어, HBV-특이적 T 세포, 중화 항체)에 의해 보완되는 선천 면역계의 효율적인 활성을 특징으로 하며, 이는 통상 성공적인 복제 저해 또는 감염된 간세포의 제거를 야기한다. 반대로, 이러한 반응은 높은 바이러스 및 항원 로드(load)로 인해 손상 또는 약화되며, 예를 들어, HBV 외피 단백질이 풍부하게 생산되며 감염성 바이러스의 1,000배 과량의 서브바이러스 입자로 방출될 수 있다.

[0245] 만성 HBV 감염은 바이러스 로드, 간 효소 수준(괴사염증(necroinflammatory) 활성), HBeAg, 또는 HBsAg 로드

또는 이들 항원에 대한 항체의 존재를 특징으로 하는 시기(phase)들로 기술된다. 바이러스 혈증은 상당히 다양할 수 있지만, cccDNA 수준은 세포 당 대략 10 내지 50 카피로 비교적 일정하게 유지된다. cccDNA 종의 지속은 만성성에 이르게 한다. 보다 구체적으로, 만성 HBV 감염의 시기는: (i) 높은 바이러스 로드 및 정상 또는 최소 상승된 간 효소를 특징으로 하는 면역-내성 시기; (ii) 현저하게 상승되는 간 효소가 관찰되면서 바이러스 복제 수준이 보다 낮거나 감소하는 면역 활성 HBeAg-양성 시기; (iii) HBeAg 혈청전환에 뒤따를 수 있는 낮은 바이러스 로드 및 혈청 내 정상 간 효소 수준을 갖는 저 복제 상태인 비활성 HBsAg 담체 시기; 및 (iv) 바이러스 복제가 간 효소 수준의 수반 변동(concomitant fluctuation)으로 주기적으로(재활성화) 일어나고, 프리-코어(pre-core) 및/또는 기저 코어(basal core) 프로모터의 돌연변이가 통상적이어서 HBeAg가 감염된 세포에 의해 생산되지 않는, HBeAg-음성 시기를 포함한다.

[0246] 본 명세서에서 사용되는 "만성 HBV 감염"은 6 개월 넘게 HBV 존재가 검출 가능한 대상체를 지칭한다. 만성 HBV 감염을 갖는 대상체는 만성 HBV 감염의 임의의 시기에 있을 수 있다. 만성 HBV 감염은 기술 분야에서 보편적 의미에 따라 이해된다. 만성 HBV 감염은, 예를 들어, 급성 HBV 감염 후 6 개월 이상 동안 HBsAg의 지속에 의해 특정지어질 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 지칭되는 만성 HBV 감염은 질병 통제 예방 센터(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)에 의해 출간된 정의를 따르며, 이에 따르면 만성 HBV 감염은 다음과 같은 실험실 기준을 특징으로 할 수 있다: (i) B형 간염 코어 항원에 대한 IgM 항체(IgM 항-HBc)에 음성 및 B형 간염 표면 항원(HBsAg), B형 간염 e 항원(HBeAg), 또는 B형 간염 바이러스 DNA를 위한 핵산 시험에 양성 또는 (ii) HBsAg 또는 HBV DNA를 위한 핵산 시험에 양성, 또는 HBeAg에 대해 적어도 6 개월 간격으로 2 회 양성.

[0247] 바람직하게, 면역원적 유효량은 만성 HBV 감염을 치료하기에 충분한 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물의 양을 지칭한다.

[0248] 몇몇 구현예에서, 만성 HBV 감염을 갖는 대상체는 뉴클레오시드 유사체(NUC) 치료를 받고, NUC-저해된다. 본 명세서에서 사용되는 "NUC-저해된"은 적어도 6 개월 동안 검출불능 HBV 바이러스 수준 및 안정된 알라닌 아미노트랜스퍼라제(alanine aminotransferase, ALT) 수준을 갖는 대상체를 지칭한다. 뉴클레오시드/뉴클레오티드 유사체 치료의 예는 HBV 폴리머라제 억제제, 예컨대, 엔타카비르 및 테노포비르를 포함한다. 바람직하게, 만성 HBV 감염을 갖는 대상체는 진행성 간 섬유증 또는 간경변를 갖지 않는다. 이러한 대상체는 전형적으로 간 섬유증에서 3 미만의 METAVIR 스코어 및 9 kPa 미만의 파이브로스캔(fibroscan) 결과를 갖는다. METAVIR 스코어는 B형 간염을 갖는 환자의 간 생검에서 조직병리학적 평가에 의해 염증 및 섬유증의 정도를 평가하기 위해 통상적으로 사용되는 평점 시스템이다. 상기 평점 시스템은 2 개의 표준화된 수치를 부여한다: 염증 정도를 나타내는 것 및 섬유증 정도를 나타내는 것.

[0249] 만성 HBV의 제거 또는 감소는 바이러스-유도 간경변 및 간세포 암종(hepatocellular carcinoma)을 포함하는 중증 간 질환의 조기 질환 차단을 가능하게 할 수 있는 것으로 사료된다. 따라서, 본 출원의 방법은 또한 HBV-유도 질환을 치료하는 요법으로서 사용될 수 있다. HBV-유도 질환의 예는 간경변, 암(예를 들어, 간세포 암종), 및 섬유증, 구체적으로 간 섬유증에서 METAVIR 스코어 3 이상을 특징으로 하는 진행성 섬유증을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 이러한 구현예에서, 면역원적 유효량은 12 개월 이내 HBsAg의 지속적인 손실 및 임상 질환(예를 들어, 간경변, 간세포 암종 등)의 현저한 감소를 달성하기에 충분한 양이다.

[0250] 본 출원의 구현예에 따른 방법은 이를 필요로 하는 대상체에 본 출원의 조성물과 조합하여 또 다른 면역원적 제제(예컨대, 또 다른 HBV 항원 또는 다른 항원) 또는 또 다른 항-HBV 항원(예컨대, 뉴클레오티드 유사체 또는 다른 항-HBV 제제)를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 또 다른 항-HBV 제제 또는 면역원적 제제는 면역 체크포인트 억제제(예를 들어, 항-PD1, 항-TIM-3, 등), 톨-유사 수용체 효능제(예를 들어, TLR7 효능제 및/또는 TLR8 효능제), RIG-1 효능제, IL-15 초효능제(Altor Bioscience), 돌연변이 IRF3 및 IRF7 유전적 애주번트, STING 효능제(Aduro), FLT3L 유전적 애주번트, IL-12 유전적 애주번트, IL-7-hyFc; HBV env를 결합하는 CAR-T(S-CAR 세포); 캡시드 조립 조절제; cccDNA 억제제, HBV 폴리머라제 억제제(예를 들어, 엔테카비르 및 테노포비르)를 포함하지만 이로 제한되지 않는, 소분자 또는 항체일 수 있다. 하나 이상의 다른 항-HBV 활성제는, 예를 들어, 소분자, 항체 또는 그 항원 결합 단편, 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산일 수 있다. 하나 또는 다른 항-HBV 제제는, 예를 들어, HBV DNA 폴리머라제 억제제; 면역조절제; 톨-유사 수용체 효능제 7 조절제; 톨-유사 수용체 8 조절제; 톨-유사 수용체 3 조절제; 인터페론 알파 수용체 리간드; 히알루로니다제 억제제; IL-10의 조절제; HBsAg 억제제; 톨-유사 수용체 9 조절제; 사이클로필린 억제제; HBV 예방 백신; HBV 치료 백신; HBV 바이러스 진입 억제제; 바이러스 mRNA를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 보다 구체적으로 항-HBV 안티센스 올리고뉴클레오티드; 단경합 RNA(siRNA), 보다 구체적으로 항-HBV siRNA; 엔도뉴클레아제 조절제; 리보뉴클레오티드 리덕타제 억제제; B형 간염 바이러스 E 항원 억제제; B형 간염 바이러스의 표면 항원을 표적화하는

HBV 항체; HBV 항체; CCR2 케모카인 길항제; 티모신 효능제; 사이토카인, 예컨대, IL12; 캡시드 조립 조절제, 핵단백질 억제제(HBV 코어 또는 캡시드 단백질 억제제); 핵산 폴리머(NAP); 레티노산-유도성 유전자 1의 자극제; NOD2의 자극제; 재조합 티모신 알파-1; B형 간염 바이러스 복제 억제제; PI3K 억제제; cccDNA 억제제; 면역 체크포인트 억제제, 예컨대, PD-L1 억제제, PD-1 억제제, TIM-3 억제제, TIGIT 억제제, Lag3 억제제, 및 CTLA-4 억제제; 면역 세포(보다 구체적으로 T 세포) 상에 발현되는 공동-자극 수용체의 효능제, 예컨대, CD27, CD28; BTK 억제제; HBV 치료를 위한 기타 약제; IDO 억제제; 아르기나제 억제제; 및 KDM5 억제제 중에서 선택될 수 있다.

[0251] 전달 방법

[0252] 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물은 본 개시의 관점에서 기술분야에 알려져 있는, 비경구 투여(예를 들어, 근육내, 피하, 정맥내 또는 피내 주사, 경구 투여, 경피 투여, 및 비강 투여를 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 방법에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직하게, 조성물 및 치료적 조합물은 비경구(예를 들어, 근육내 주사 또는 피내 주사) 또는 경피로 투여된다.

[0253] 조성물 및 치료적 조합물이 하나 이상의 DNA 플라스미드를 포함하는 본 출원의 몇몇 구현예에서, 투여는 피부를 통한 주사, 예를 들어, 근육내 또는 피내 주사, 바람직하게 근육내 주사에 의할 수 있다. 근육내 주사는 전기천공법(electroporation), 즉, DNA 플라스미드의 세포로의 전달을 용이하게 하기 위한 전기장의 적용과 조합될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "전기천공법"은 생체막의 미세 경로(포어)를 유도하기 위한 막통과 전기장 펄스의 사용을 지칭한다. 생체내 전기천공법 중, 적절한 세기 및 지속시간의 전기장을 세포에 적용하여, 세포막 투과성이 증진된 일시적 상태를 유도하고, 이에 따라 그 자체로는 세포 막을 통과하지 못하는 분자의 세포 흡수를 가능하게 한다. 전기천공법에 의한 이러한 포어의 형성은 생체분자, 예컨대, 플라스미드, 올리고뉴클레오티드, siRNA, 약제 등의 세포 막 한쪽에서 다른 쪽으로의 통과를 용이하게 한다. DNA 백신의 전달을 위한 생체내 전기천공법은 주사 부위에 경증 내지 중등도 염증을 초래하면서도 숙주 세포에 의해 플라스미드 흡수를 유의하게 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 결과적으로, 통상적인 주사와 비교하여 피내 또는 근육내 전기천공법으로 형질감염 효율 및 면역 반응이 유의하게 향상되었다(예를 들어, 각각 1,000 배 및 100 배까지).

[0254] 전형적인 구현예에서, 전기천공법은 근육내 주사와 조합된다. 그러나, 전기천공법은 또한 다른 형태의 비경구 투여, 예를 들어, 피내 주사, 피하 주사 등과 조합될 수 있다.

[0255] 전기천공법을 통한 본 출원의 조성물, 치료적 조합물 또는 백신의 투여는 세포 막에 가역적 포어를 유발하기에 효과적인 에너지 펄스를 포유동물의 요망되는 조직에 전달하도록 구성될 수 있는 전기천공 장치를 사용하여 수행될 수 있다. 전기천공 장치는 전기천공 구성요소 및 전극 조립체 또는 핸들 조립체를 포함할 수 있다. 전기천공 구성요소는 전기천공 장치의 다음 구성요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 컨트롤러, 전류파형 발생기, 임피던스 테스터, 파형 로거, 입력 요소, 상태 보고 요소, 통신 포트, 메모리 구성요소, 전원 및 전원 스위치. 전기천공법은 생체내 전기천공 장치를 사용하여 수행될 수 있다. 구체적으로 DNA 플라스미드를 포함하는, 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물의 전달을 용이하게 할 수 있는 전기천공 장치 및 전기천공 방법의 예는 CELLECTRA®(Inovio Pharmaceuticals, Blue Bell, PA), Elgen 전기천공기(Inovio Pharmaceuticals, Inc.), Tri-GridTM 전달 시스템(Ichor Medical Systems, Inc., San Diego, CA 92121) 및 미국 특허 제7,664,545호, 미국 특허 제8,209,006호, 미국 특허 제9,452,285호, 미국 특허 제5,273,525호, 미국 특허 제6,110,161호, 미국 특허 제6,261,281호, 미국 특허 제6,958,060호, 및 미국 특허 제6,939,862호, 미국 특허 제7,328,064호, 미국 특허 제6,041,252호, 미국 특허 제5,873,849호, 미국 특허 제6,278,895호, 미국 특허 제6,319,901호, 미국 특허 제6,912,417호, 미국 특허 제8,187,249호, 미국 특허 제9,364,664호, 미국 특허 제9,802,035호, 미국 특허 제6,117,660호, 및 국제 특허 출원 공개 제WO2017172838호에 기술된 것을 포함하며, 이들 모두는 전체가 참조로서 본 명세서에 통합된다. 생체내 전기천공 장치의 다른 예는 전체 내용이 본 명세서에 참조로 통합되는 대리인 명부 번호 688097-405WO로 본 출원과 동일자로 출원된 "Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines"라는 명칭의 국제 특허 출원에 기재되어 있다. 예를 들어, 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물의 전달을 위해 적용이 고려되는 것은 또한, 예를 들어, 전체가 참조로서 본 명세서에 통합되는 미국 특허 제6,697,669호에 기술된 바와 같은, 펄스 전기장(pulsed electric field)의 사용이다.

[0256] 조성물 또는 치료적 조합물이 하나 이상의 DNA 플라스미드를 포함하는 본 출원의 다른 구현예에서, 투여 방법은 경피이다. 경피 투여는 DNA 플라스미드의 세포로의 전달을 용이하게 하기 위해 표피 피부 마찰과 조합될 수 있다. 예를 들어, 피부 패치(dermatological patch)가 표피 피부 마찰에 사용될 수 있다. 피부 패치의 제거 시, 조성물 또는 치료적 조합물이 마찰된 피부 상에 침착될 수 있다.

[0257] 전달 방법은 상술한 구현예에 제한되지 않으며, 세포내 전달을 위한 임의의 수단을 사용할 수 있다. 본 출원의 방법에 의해 고려되는 다른 세포내 전달 방법은 리포솜 캡슐화, 지질 나노입자(LNP) 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0258] 본 출원의 특정 구현예에서, 투여 방법은 지질 조성물, 예컨대, 지질 나노입자(LNP)이다. 치료 생산물(예컨대, 본 발명의 하나 이상의 핵산 분자)을 전달하기 위해 사용될 수 있는 지질 조성물, 바람직하게 지질 나노입자는, 수성 부피가 양친매성 지질 이중층에 의해 캡슐화되거나, 지질이 치료 생산물을 포함하는 내부를 코팅하는, 리포좀 또는 지질 소수포; 또는 지질-캡슐화된 치료 생산물이 비교적 무질서한 지질 혼합물 내에 함유되는 지질 응집체 또는 미셀을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0259] 구체적 구현예에서, LNP는 표적 세포로의 본 발명의 핵산 분자, 예컨대, DNA 또는 RNA 분자를 캡슐화하고/캡슐화하거나 이의 전달을 향상시키기 위해 양이온성 지질을 포함한다. 양이온성 지질은 선택된 pH, 예컨대, 생리적 pH에서 순 양전하를 보유하는 임의의 지질 종일 수 있다. 지질 나노입자는 하나 이상의 양이온성 지질, 비-양이온성 지질 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-변형 지질을 사용하는 다양한 비율의 다성분 지질 혼합물을 포함함으로써 제조될 수 있다. 여러 양이온성 지질이 문헌에 기재되어 있으며, 이들 중 다수는 상업적으로 입수 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기에 적합한 양이온성 지질은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(DOTAP)을 포함한다.

[0260] LNP 제형은 음이온성 지질을 포함할 수 있다. 음이온성 지질은 선택된 pH, 예컨대, 생리적 pH에서 순 음전하를 보유하는 임의의 지질 종일 수 있다. 음이온 성 지질은 양이온성 지질과 조합될 때, LNP의 전체 표면 전하를 감소시키고 LNP 이중층 구조의 pH-의존적 파괴를 도입하여 뉴클레오티드 방출을 촉진하는 데 사용된다. 여러 음이온성 지질이 문헌에 기재되어 있으며, 이들 중 다수는 상업적으로 입수 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법에 사용하기에 적합한 음이온성 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)을 포함한다.

[0261] LNP는 본 개시의 측면에서 당업계에 잘 알려져 있는 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, LNP는 에탄올 주입 또는 희석, 박막 수화, 동결-해동, 프렌치 프레스(French press) 또는 막 압출, 정용여과, 초음파 처리, 세제 투석, 에테르 주입 및 역상 증발을 이용하여 제조될 수 있다.

[0262] 지질, 지질 조성물 및 활성 핵산 분자, 예컨대, 본 발명의 것들을 전달하기 위한 지질 담체를 생성하는 방법의 몇몇 예들은 각각 전체 관련 내용이 본 명세서에 참조로 통합되는 US2017/0190661, US2006/0008910, US2015/0064242, US2005/0064595, WO/2019/036030, US2019/0022247, WO/2019/036028, WO/2019/036008, WO/2019/036000, US2016/0376224, US2017/0119904, WO/2018/200943, WO/2018/191657, US2014/0255472, 및 US2013/0195968에 기재되어 있다.

[0263] 본 출원의 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 임의의 적합한 경로, 예를 들어, 정맥내(i.v.) 주입 또는 볼루스 주사에 의해 비경구로, 근육내 또는 피하 또는 복강내로 대상체에게 투여될 수 있다. 정맥내 주입은, 예를 들어, 15 분, 30 분, 60 분, 90 분, 120 분, 180 분, 또는 240 분, 또는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간 또는 12 시간에 걸쳐 제공될 수 있다.

[0264] 애주번트

[0265] 본 출원의 몇몇 구현예에서, HBV에 대한 면역 반응을 유도하는 방법은 추가로 애주번트를 투여하는 것을 포함한다. 용어 "애주번트" 및 "면역 자극제"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되고, 면역계의 자극을 유발하는 하나 이상의 물질로 정의된다. 이러한 맥락에서, 애주번트는 본 출원의 HBV 항원 및 항원성 HBV 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 증진하기 위해 사용된다.

[0266] 본 출원의 구현예에 따르면, 애주번트는 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물에 존재하거나, 별개 조성물로 투여될 수 있다. 애주번트는, 예를 들어, 소분자 또는 항체일 수 있다. 본 출원에서 사용하기에 적합한 애주번트의 예는 면역 체크포인트 억제제(예를 들어, 항-PD-1, 항-TIM-3 등), 톨-유사 수용체 효능제(예를 들어, TLR7 효능제 및/또는 TLR8 효능제), RIG-1 효능제, IL-15 수퍼효능제(AltorBioscience), 돌연변이 IRF3 및 IRF7 유전적 애주번트, STING 효능제(Aduro), FLT3L 유전적 애주번트, IL-12 유전적 애주번트, 및 IL-7-hyFc를 포함할 수 있지만, 이로 제한되지 않는다. 애주번트의 예는, 예를 들어, 다음 항-HBV 제제 중에서 선택될 수 있다: HBV DNA 폴리머라제 억제제; 면역조절제; 톨-유사 수용체 7 조절제; 톨-유사 수용체 8 조절제; 톨-유사 수용체 3 조절제; 인터페론 알파 수용체 리간드; 히알루로니다제 억제제; IL-10의 조절제; HBsAg 억제제; 톨-유사 수용체 9 조절제; 사이클로필린 억제제; HBV 예방 백신; HBV 치료 백신; HBV 바이러스 진입 억제제; 바이러스 mRNA를 표

적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 보다 구체적으로 항-HBV 안티센스 올리고뉴클레오티드; 단경합 RNA(siRNA), 보다 구체적으로 항-HBV siRNA; 엔도뉴클레아제 조절제; 리보뉴클레오티드 리덕타제의 억제제; B형 간염 E 항원 억제제; B형 간염 바이러스의 표면 항원을 표적화하는 HBV 항체; HBV 항체; CCR2 케모카인 길항제; 티모신 효능제; 사이토카인, 예컨대, IL12; 캡시드 조립 조절제, 핵단백질 억제제(HBV 코어 또는 캡시드 단백질 억제제); 핵산 폴리머(NAP); 레티노산-유도성 유전자 1의 자극제; NOD2의 자극제; 재조합 티모신 알파-1; B형 간염 바이러스 복제 억제제; PI3K 억제제; cccDNA 억제제; 면역 체크포인트 억제제, 예컨대, PD-L1 억제제, PD-1 억제제, TIM-3 억제제, TIGIT 억제제, Lag3 억제제, 및 CTLA-4 억제제; 면역 세포(보다 구체적으로 T 세포) 상에 발현되는 공동-자극 수용체의 효능제, 예컨대, CD27, CD28; BTK 억제제; HBV 치료를 위한 기타 약제; IDO 억제제; 아르기나제 억제제; 및 KDM5 억제제.

[0267] 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물은 또한 적어도 하나의 다른 항-HBV 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 본 출원과 사용되기에 적합한 항-HBV 제제의 예는 소분자, 항체, 및/또는, HBV env(S-CAR 세포)를 결합하는 CAR-T 요법제, 캡시드 조립 조절제, TLR 효능제(예를 들어, TLR7 및/또는 TLR8 효능제), cccDNA 억제제, HBV 폴리머라제 억제제(예를 들어, 엔테카비르 및 테노포비르, 및/또는 면역 체크포인트 억제제 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0268] 적어도 하나의 항-HBV 제제는, 예를 들어, HBV DNA 폴리머라제 억제제; 면역조절제; 톨-유사 수용체 7 조절제; 톨-유사 수용체 8 조절제; 톨-유사 수용체 3 조절제; 인터페론 알파 수용체 리간드; 히알루로니다제 억제제; IL-10의 조절제; HBsAg 억제제; 톨-유사 수용체 9 조절제; 사이클로필린 억제제; HBV 예방 백신; HBV 치료 백신; HBV 바이러스 진입 억제제; 바이러스 mRNA를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 보다 구체적으로 항-HBV 안티센스 올리고뉴클레오티드; 단경합 RNA(siRNA), 보다 구체적으로 항-HBV siRNA; 엔도뉴클레아제 조절제; 리보뉴클레오티드 리덕타제의 억제제; B형 간염 E 항원 억제제; B형 간염 바이러스의 표면 항원을 표적화하는 HBV 항체; HBV 항체; CCR2 케모카인 길항제; 티모신 효능제; 사이토카인, 예컨대, IL12; 캡시드 조립 조절제, 핵단백질 억제제(HBV 코어 또는 캡시드 단백질 억제제); 핵산 폴리머(NAP); 레티노산-유도성 유전자 1의 자극제; NOD2의 자극제; 재조합 티모신 알파-1; B형 간염 바이러스 복제 억제제; PI3K 억제제; cccDNA 억제제; 면역 체크포인트 억제제, 예컨대, PD-L1 억제제, PD-1 억제제, TIM-3 억제제, TIGIT 억제제, Lag3 억제제, 및 CTLA-4 억제제; 면역 세포(보다 구체적으로 T 세포) 상에 발현되는 공동-자극 수용체의 효능제, 예컨대, CD27, CD28; BTK 억제제; HBV 치료를 위한 기타 약제; IDO 억제제; 아르기나제 억제제; 및 KDM5 억제제 중에서 선택될 수 있다. 이러한 항-HBV 제제는 본 출원의 조성물 및 치료적 조합물과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0269] 프라임/부스트 면역화 방법

[0270] 본 출원의 구현예는 또한 소위 프라임-부스트 요법으로, 대상체에게 면역원적 유효량의 조성물 또는 면역원적 조합물을 투여하고, 후속적으로 동일한 대상체에게 또 다른(another) 용량의 면역원적 유효량의 조성물 또는 면역원적 조합물을 투여하는 것을 고려한다. 따라서, 일 구현예에서, 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물은 면역 반응을 프라이밍하기 위해 사용되는 프라이머 백신이다. 다른 구현예에서, 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물은 면역 반응을 부스팅하기 위해 사용되는 부스터 백신이다. 본 출원의 프라이밍 및 부스팅 백신은 본 명세서에 기술되는 본 출원의 방법에 사용될 수 있다. 이러한 프라임-부스트 요법의 일반적인 개념은 백신 분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 명세서에 기술된 본 출원의 임의의 조성물 및 치료적 조합물은 HBV에 대한 면역 반응을 프라임 및/또는 부스팅하기 위한 프라이밍 및/또는 부스팅 백신으로서 사용될 수 있다.

[0271] 본 출원의 몇몇 구현예에서, 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물은 면역화를 프라이밍하기 위해 투여될 수 있다. 조성물 또는 치료적 조합물은 면역화를 부스팅하기 위해 재-투여될 수 있다. 조성물 또는 백신 조합물의 추가적 부스터 투여는 필요에 따라 요법에 선택적으로 추가될 수 있다. 애주번트는 면역화를 부스팅하기 위해 사용되는 본 출원의 조성물에 존재하거나, 면역화를 부스팅하기 위한 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물과 함께 투여될 별개 조성물에 존재하거나, 부스팅 면역화로서 그 자체로 투여될 수 있다. 애주번트가 요법에 포함되는 이들 구현예에서, 애주번트는 바람직하게 부스팅 면역화를 위해 사용된다.

[0272] 프라임-부스트 요법의 예시적 및 비제한적 예는 면역 반응을 프라이밍하기 위해 대상체에게 단일 용량의 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물의 면역원적 유효량을 투여하고; 후속적으로 하나 더(another)의 용량의 본 출원의 조성물 또는 치료적 조합물의 면역원적 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 상기 부스팅 면역화는 프라이밍 면역화가 최초 투여되고 약 2 주 내지 6 주, 바람직하게 4 주 후에 1차 투여된다. 선택적으로, 프라이밍 면역화가 최초 투여된 후 약 10 주 내지 14 주, 바람직하게 12 주에, 조성물 또는 치료적 조합물, 또는 기타 애주번트

의 추가적 부스팅 면역화가 투여된다.

[0273] 키트

[0274] 본 명세서에서 본 출원의 치료적 조합물을 포함하는 키트가 또한 제공된다. 키트는 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드 및 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 하나 이상의 별개의 조성물에 포함할 수 있거나, 키트는 제1 폴리뉴클레오티드, 제2 폴리뉴클레오티드, 및 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 단일 조성물에 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 애주번트 또는 면역 자극제, 및/또는 다른 항-HBV 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0275] 동물 또는 인간 유기체에게 투여 시 항-HBV 면역 반응을 유도하거나 자극하는 능력은 시험관내 또는 생체내에서 기술 분야에 표준인 다양한 검정법을 사용하여 평가될 수 있다. 면역 반응의 개시 및 활성화를 평가할 수 있는 기술의 일반적인 설명에 대하여, 예를 들어, 문헌[Coligan et al. (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health]을 참조한다. 세포 면역의 측정은 CD4+ 및 CD8+ T-세포로부터 유래한 것들을 포함하는 활성화된 이펙터 세포에 의해 분비되는 사이토카인 프로파일의 측정에 의해(예를 들어, ELISPOT에 의한 IL-10 또는 IFN 감마-생산 세포의 정량화), 면역 이펙터 세포의 활성화 상태의 결정에 의해(예를 들어, 고전적 [3H] 티미딘 흡수 또는 유세포 분석-기반 검정에 의한 T 세포 증식 검정), 감작화된 대상체의 항원-특이적 T 림프구에 대한 검정에 의해(예를 들어, 세포독성 검정에서 펩티드-특이적 용해, 등) 수행될 수 있다.

[0276] 세포 및/또는 체액 반응을 자극하는 방법은 항체 결합 및/또는 결합에서의 경합에 의해 결정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press] 참조). 예를 들어, 면역원을 제공하는 조성물의 투여에 대한 반응으로 생산된 항체의 역가는 효소-결합 면역흡착 검정(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 의해 측정될 수 있다. 면역 반응은 또한 중화 항체 검정에 의해 측정할 수 있으며, 바이러스의 중화는 특정 항체로의 바이러스의 반응/억제/중화를 통한 감염성 손실로 정의된다. 면역 반응은 추가적으로 항체-의존성 세포식작용(Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis, ADCP) 검정에 의해 측정될 수 있다.

[0277] **구현예**

[0278] 본 발명은 또한 하기 비-제한적인 구현예를 제공한다.

[0279] 구현예 1은 B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 데 사용하기 위한 치료적 조합물로서,

[0280] i) a) 서열번호 2와 적어도 95%, 예컨대, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원,

[0281] b) 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자,

[0282] c) 서열번호 7과 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원으로서, 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, HBV 폴리머라제 항원, 및

[0283] d) HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자

[0284] 중 적어도 하나; 및

[0285] ii) 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0286] 구현예 2는 구현예 1에 있어서, HBV 폴리머라제 항원 및 절두된 HBV 코어 항원 중 적어도 하나를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0287] 구현예 3은 구현예 2에 있어서, HBV 폴리머라제 항원 및 절두된 HBV 코어 항원을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0288] 구현예 4는 구현예 1에 있어서, 절두된 HBV 코어 항원을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자, 및 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자 중 적어도 하나를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0289] 구현예 5는 B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 데 사용하기 위한 치료적 조합물로서,

[0290] i) 서열번호 2와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열로 이루어진 절두된 HBV 코어 항원를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 비-천연 핵산 분자; 및

[0291] ii) 서열번호 7과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 비-천연 핵산 분자로서, HBV 폴리머라제 항원이 역전사효소 활성 및 RNase H 활성을 갖지 않는, 제2 비-천연 핵산 분자; 및

[0292] iii) 각각 서열번호 25, 26 및 27 또는 각각 서열번호 25, 26 및 28의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 각각 서열번호 29, 30 및 31의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0293] 구현예 6은 구현예 4 또는 구현예 5에 있어서, 제1 비-천연 핵산 분자가 절두된 HBV 코어 항원의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0294] 구현예 6a는 구현예 4 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 비-천연 핵산 분자가 HBV 폴리머라제 항원의 N-말단에 작동적으로 연결된 신호 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0295] 구현예 6b는 구현예 6 또는 구현예 6a에 있어서, 신호 서열이 독립적으로 서열번호 9 또는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0296] 구현예 6c는 구현예 6 또는 구현예 6a에 있어서, 신호 서열이 독립적으로 서열번호 8 또는 서열번호 14의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩되는, 치료적 조합물이다.

[0297] 구현예 7은 구현예 1 내지 구현예 6c 중 어느 한 구현예에 있어서, HBV 폴리머라제 항원이 서열번호 7과 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0298] 구현예 7a는 구현예 7에 있어서, HBV 폴리머라제 항원이 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0299] 구현예 7b는 구현예 1 내지 구현예 7a 중 어느 한 구현예에 있어서, 절두된 HBV 코어 항원이 서열번호 2와 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열로 이루어지는, 치료적 조합물이다.

[0300] 구현예 7c는 구현예 7b에 있어서, 절두된 HBV 항원이 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는, 치료적 조합물이다.

[0301] 구현예 8은 구현예 1 내지 구현예 7c 중 어느 한 구현예에 있어서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자가 DNA 분자인, 치료적 조합물이다.

[0302] 구현예 8a는 구현예 8에 있어서, DNA 분자가 DNA 벡터에 존재하는, 치료적 조합물이다.

[0303] 구현예 8b는 구현예 8a에 있어서, DNA 벡터가 DNA 플라스미드, 박테리아 인공 염색체, 효모 인공 염색체, 및 폐쇄된 선형 데옥시리보핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 치료적 조합물이다.

[0304] 구현예 8c는 구현예 8에 있어서, DNA 분자가 바이러스 벡터에 존재하는, 치료적 조합물이다.

[0305] 구현예 8d는 구현예 8c에 있어서, 바이러스 벡터가 박테리오파지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 치료적 조합물이다.

[0306] 구현예 8e는 구현예 1 내지 구현예 7c 중 어느 한 구현예에 있어서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자가 RNA 분자인, 치료적 조합물이다.

[0307] 구현예 8f는 구현예 8e에 있어서, RNA 분자가 RNA 레플리콘, 바람직하게 자기-복제 RNA 레플리콘, mRNA 레플리콘, 변형된 mRNA 레플리콘, 또는 자기-증폭 mRNA인, 치료적 조합물이다.

[0308] 구현예 8g는 구현예 1 내지 구현예 8f 중 어느 한 구현예에 있어서, 각각의 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자가 독립적으로 지질 조성물, 바람직하게 지질 나노입자(LNP)와 제형화되는, 치료적 조합물이다.

[0309] 구현예 9는 구현예 4 내지 구현예 8g 중 어느 한 구현예에 있어서, 동일한 비-천연 핵산 분자에 제1 비-천연 핵

산 분자 및 제2 비-천연 핵산 분자를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0310] 구현예 10은 구현예 4 내지 구현예 8g 중 어느 한 구현예에 있어서, 두 개의 상이한 비-천연 핵산 분자에 제1 비-천연 핵산 분자 및 제2 비-천연 핵산 분자를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0311] 구현예 11은 구현예 4 내지 구현예 10 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 3에 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0312] 구현예 11a는 구현예 11에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 3에 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0313] 구현예 12는 구현예 11a에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 1 또는 서열번호 3의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0314] 구현예 13은 구현예 4 내지 구현예 12 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 5 또는 서열번호 6에 적어도 90%, 예컨대, 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0315] 구현예 13a는 구현예 13에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 5 또는 서열번호 6에 적어도 98%, 예컨대, 적어도 98%, 98.5%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0316] 구현예 14는 구현예 13a에 있어서, 제2 폴리뉴클레오티드 서열이 서열번호 5 또는 서열번호 6의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0317] 구현예 15는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 35, 38, 42, 48 및 53의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0318] 구현예 15a는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 35, 38, 43, 48 및 54의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0319] 구현예 15b는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 36, 38, 44, 49 및 55의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0320] 구현예 15c는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 36, 38, 44, 48 및 56의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0321] 구현예 15d는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 36, 38, 45, 50 및 57의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0322] 구현예 15e는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 35, 39, 42, 48 및 53의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0323] 구현예 15f는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 35, 39, 42, 48 및 58의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0324] 구현예 15g는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 35, 39, 43, 48 및 54의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0325] 구현예 15h는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이

각각 서열번호 32, 35, 39, 43, 49 및 59의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0326] 구현예 15i는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 35, 39, 45, 48 및 54의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0327] 구현예 15j는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 36, 39, 45, 50 및 57의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0328] 구현예 15k는 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 36, 39, 44, 48 및 56의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0329] 구현예 15l은 구현예 1 내지 구현예 14 중 어느 한 구현예에 있어서, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 각각 서열번호 32, 36, 39, 45, 48 및 54의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3를 포함하는, 치료적 조합물이다.

[0330] 구현예 16은 구현예 1 내지 구현예 15l 중 어느 한 구현예의 치료적 조합물, 및 B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 데 치료적 조합물을 사용하기 위한 지침서를 포함하는, 키트이다.

[0331] 구현예 17은 B형 간염 바이러스(HBV) 감염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스(HBV) 감염을 치료하는 방법으로서, 구현예 1 내지 구현예 15l 중 어느 한 구현예의 치료적 조합물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 방법이다.

[0332] 구현예 17a는 구현예 17에 있어서, 치료가 B형 간염 바이러스에 대한 면역 반응의 유도를 필요로 하는 대상체에서 B형 간염 바이러스에 대한 면역 반응을 유도하고, 바람직하게 대상체가 만성 HBV 감염을 갖는, 방법이다.

[0333] 구현예 17b는 구현예 17 또는 구현예 17a에 있어서, 대상체가 만성 HBV 감염을 갖는, 방법이다.

[0334] 구현예 17c는 구현예 17 내지 구현예 17b 중 어느 한 구현예에 있어서, 대상체가 진행성 섬유증, 간경변, 및 간세포 암종(HCC)으로 이루어진 군으로부터 선택된 HBV-유도 질환의 치료를 필요로 하는, 방법이다.

[0335] 구현예 18은 구현예 17 내지 구현예 17c 중 어느 한 구현예에 있어서, 치료적 조합물이 경피 주사, 예를 들어, 근육내 또는 피내 주사, 바람직하게 근육내 주사에 의해 투여되는, 방법이다.

[0336] 구현예 19는 구현예 18에 있어서, 치료적 조합물이 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자 중 적어도 하나를 포함하는, 방법이다.

[0337] 구현예 19a는 구현예 19에 있어서, 치료적 조합물이 제1 및 제2 비-천연 핵산 분자를 포함하는, 방법이다.

[0338] 구현예 20은 구현예 19 또는 구현예 19a에 있어서, 비-천연 핵산 분자가 전기천공법과 조합하여 근육내 주사에 의해 대상체에게 투여되는, 방법이다.

[0339] 구현예 21은 구현예 19 또는 구현예 19a에 있어서, 비-천연 핵산 분자가 지질 조성물에 의해, 바람직하게 지질 나노입자에 의해 대상체에게 투여되는, 방법이다.

[0340] **실시예**

[0341] 상기 기술된 구현예는 이의 광범위한 본 발명의 개념으로부터 벗어나지 않고 수정될 수 있다는 것이 당업자에게 인지될 것이다. 따라서, 본 발명은 개시된 구체적 구현예로 제한되지 않고, 본 설명에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 사상 및 범위 내에서 변형을 포괄하도록 의도된 것으로 이해된다.

[0342] **실시예 1. HBV 코어 플라스미드 & HBV pol 플라스미드**

[0343] pDK-pol 및 pDK-코어 벡터의 개략적 표현은 도 1a 및 도 1b에 각각 나타나 있다. CMV 프로모터(서열번호 18), 스플라이싱 인핸서(삼중 복합 서열)(서열번호 10), 시스타틴 S 전구체 신호 펩티드 SPCS(NP_0018901.1)(서열번호 9), 및 pol(서열번호 5) 또는 코어(서열번호 2) 유전자를 함유하는 HBV 코어 또는 pol 항원 최적화 발현 카세트를 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 pDK 플라스미드 골격에 도입하였다.

[0344] 코어 및 pol 특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 코어 및 pol 항원 발현에 대하여 플라스미드를 시험관내에서 시험하였고, 이는 세포 및 분비 코어 및 pol 항원에 대한 지속적인 발현 프로파일을 제공한 것으로 나타났다(데이터 미도시).

[0345] **실시예 2. 절두된 HBV 코어 항원의 HBV Pol 항원과의 융합을 발현하는 아데노바이러스 벡터의 생성**

[0346] 아데노바이러스 벡터의 형성은 단일 개방형 해독틀로부터 발현된 융합 단백질로서 설계되었다. 예를 들어, 두 개의 별개의 발현 카세트를 사용하는, 또는 2 개 서열을 분리하기 위한 2A-유사 서열을 사용하는, 2 개 단백질의 발현을 위한 추가적인 구성 역시 상정될 수 있다.

[0347] 아데노바이러스 벡터를 위한 발현 카세트의 설계

[0348] 발현 카세트(도 2a 및 도 2b에 도시됨)는 CMV 프로모터(서열번호 19), 인트론(서열번호 12)(ApoAI 제2 인트론을 함유하는 인간 ApoAI 유전자(GenBank 수탁 X01038 염기쌍 295 - 523) 유래의 단편), 뒤이어 인간 면역글로불린 분비 신호 코딩 서열(서열번호 14)을 앞세운 최적화된 코딩 서열 - 코어 단독 또는 코어 및 폴리머라제 융합 단백질, 및 뒤이어 SV40 폴리아데닐화 신호(서열번호 13)를 포함하였다.

[0349] 유발된 T-세포 반응에 영향 없이 분비된 전이유전자를 함유하는 몇몇 아데노바이러스 벡터의 제조능력 향상을 보이는 과거 경험 때문에 분비 신호가 포함되었다(마우스 실험).

[0350] 코어 단백질의 마지막 2 개의 잔기(VV) 및 폴리머라제 단백질의 처음 2 개 잔기(MP)가 융합된 경우 측접한 상동성과 함께 인간 도파민 수용체 단백질(D3 이소폼) 상에 존재하는 접합부 서열(VVMP)을 생성시켰다.

[0351] 코어 및 폴리머라제 서열 사이의 AGAG 링커의 개입은 이러한 상동성을 제거하며 인간 프로테옴의 Blast에서 더 이상의 히트(hit)를 내지 않았다.

[0352] **실시예 3: 마우스에서의 DNA 백신의 생체내 면역원성 연구**

[0353] HBV 코어 항원 또는 HBV 폴리머라제 항원을 인코딩하는 DNA 플라스미드를 포함하는 면역치료적 DNA 백신을 마우스 내에서 시험하였다. 본 연구의 목적은 BALB/c 마우스 내로 전기천공법을 통한 근육내 전달 후 백신에 의해 유도된 T-세포 반응을 검출하기 위해 설계되었다. 초기 면역원성 연구는 주입된 HBV 항원에 의하여 유발될 세포 면역 반응을 판별하는 것에 중점을 두었다.

[0354] 구체적으로, 시험된 플라스미드는 각각 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같은, 그리고 상기 실시예 1에 기술된 바와 같은 pDK-Pol 플라스미드 및 pDK-코어 플라스미드를 포함하였다. pDK-Pol 플라스미드는 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 폴리머라제 항원을 인코딩하였고, pDK-코어 플라스미드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 코어 항원을 인코딩하였다. 먼저, 각각의 플라스미드에 의해 유도된 T-세포 반응을 개별적으로 시험하였다. DNA 플라스미드(pDNA) 백신을 상업적으로 입수 가능한 마우스 모델에 적용을 위해 개조된 TriGrid™ 전달 시스템-근육내(TDS-IM)를 사용하여 앞정강근(cranialis tibialis)에 전기천공법을 통해 Balb/c 마우스에 근육내 전달하였다. 전기천공법에 의해 마우스에 DNA를 근육내 전달하기 위한 방법 및 장치에 관한 추가 설명에 대하여, 개시의 전체가 본 명세서에 참조로 통합되는, 국제 특허 출원 공개 WO2017172838 및 명칭이 "Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines"인 2017년 12월 19일에 출원된 미국 특허 출원 제62/607,430호를 참조한다. 구체적으로, 전극간 간격 2.5 mm 및 전극 직경 0.030 인치의 전극 어레이를 갖는 TDS-IM v1.0 장치의 TDS-IM 어레이가 전도성 길이 3.2 mm 및 유효 침투 깊이 3.2 mm로, 전극의 다이아몬드 형상의 주축이 근섬유와 평행한 배향으로 선택된 근육 내로 경피 삽입하였다. 전극 삽입 후, 주사를 개시하여 근육내로 DNA를 분배(예를 들어, 0.020 ml)하였다. IM 주사 완료 후, 250 V/cm 전기장(인가 전압 59.4 V 내지 65.6 V, 인가 전류 제한 4 A 미만, 0.16 A/sec)을 10% 듀티 사이클에서 총 지속 시간 약 400 ms(즉, 전압은 총 약 400 ms 지속시간의 약 40 ms로 능동적으로 인가됨) 동안 총 6 회 펄스로 국소적으로 인가하였다. 전기천공법 절차가 완료되면, TriGridTM 어레이를 제거하고 동물을 회수하였다. BALB/c 마우스에 대한 고용량(20 μg) 투여를 표 1에 요약된 바와 같이 수행하였다. 6 마리의 마우스에 HBV 코어 항원을 인코딩하는 플라스미드 DNA를 투여하고(pDK-코어; 그룹 1), 6 마리의 마우스에 HBV pol 항원을 인코딩하는 플라스미드 DNA를 투여하고(pDK-pol; 그룹 2), 2 마리의 마우스에 음성 대조군으로서 빈(empty) 벡터를 수용하였다. 동물들은 2 주 간격으로 2 회 DNA 면역화를 수용하였고, 마지막 면역화 후 1 주에 비장세포를 수집하였다.

[0355] **표 1: 파일럿 연구의 마우스 면역화 실험 설계**

그룹	N	pDNA	일방 투여 부위 (교번측)	용량	부피	투여일	종점 (비장 수확) 일
1	6	코어	CT + EP	20 μg	20 μL	0, 14	21
2	6	Pol	CT + EP	20 μg	20 μL	0, 14	21
3	2	빈 벡터 (음성 대조군)	CT + EP	20 μg	20 μL	0, 14	21

[0356] CT, 앞정강근; EP, 전기천공법.

[0357] 항원-특이적 반응을 IFN-γ 효소-결합 면역점(ELISPOT)에 의해 분석 및 정량화하였다. 이 검정에서, 면역화된 동물의 단리된 비장세포를 코어 단백질, Pol 단백질, 또는 리더 및 접합부 서열 작은 펩티드(각 펩티드 2 μg/ml)를 포함하는 펩티드 풀과 함께 밤새 인큐베이션하였다. 이들 풀은 코어 및 Pol 백신 벡터의 유전자형 BCD 컨센서스 서열과 매칭하는 11 개 잔기가 중첩하는 15 량체 펩티드로 이루어졌다. 큰 94 kDa HBV Pol 단백질은 중간이 나뉘어 2 개 펩티드 풀이 된다. 항원-특이적 T 세포를 동종성 펩티드 풀로 자극하고 IFN-γ양성 T 세포를 ELISPOT 검정을 사용하여 평가하였다. 단일 항원-특이적 T 세포에 의한 IFN-γ 방출을 적절한 항체 및 후속적 발색 검출에 의하여 반점-형성 세포(spot-forming cell, SFC)라 지칭되는 마이크로플레이트 상의 착색된 점으로서 시각화하였다.

[0358] DNA 백신 플라스미드 pDK-코어로 면역화된 마우스(그룹 1)에서 10^6 개 세포 당 1,000 개 SFC에 도달하는 HBV 코어에 대한 실질적인 T-세포 반응이 달성되었다(도 3). Pol 1 펩티드 풀에 대한 Pol T-세포 반응은 강력했다(10^6 개 세포 당 약 1,000 개 SFC). 약한 Pol-2-지시 항-Pol 세포 반응은 마우스에서의 제한된 MHC 다양성, 하나의 항원으로부터 상이한 에피토프의 불균등 인지로 정의되는 T-세포 면역우세라 불리는 현상에 기인한 것으로 예상되었다. 이 연구에서 얻어진 결과를 확인하는 보강 연구를 수행하였다(데이터 미도시).

[0359] 상기 결과는 HBV 항원을 인코딩하는 DNA 플라스미드 백신으로의 백신접종이 마우스에서 투여된 HBV 항원에 대한 세포 면역 반응을 유도한다는 것을 입증해 준다. 비-인간 영장류로 또한 유사한 결과가 얻어졌다(데이터 미도시).

[0360] **실시예 4. HBV 백신-유도 면역 반응에 대한 항-PD-1의 영향**

[0361] PD-1의 차단이 건강한 마우스에서 HBV-백신 유도 세포-매개 면역(CMI)에 영향을 미치는지의 여부를 평가하기 위해, 성인 C57BL/6 마우스를 d0 및 d21에 DNA 전기천공에 의해 백신접종하고, d28에 이들의 비장을 수확하였다. 백신은 pDF-코어와 pDF-Pol vax의 혼합(pDK-코어 및 pDK-Pol과 동일한 서열이지만, 상이한 항생제 내성을 인코딩하는 상이한 백본)이었고, 이를 10 μg/각/부위로 양 다리에 투여하였다. 항-PD-1 mAb(CD279; InVivomab) 또는 동종형 mAb(InVivomab)를 d21(즉, d0, d7, d14 및 d21)까지 첫 백신화 시점 및 이후 주 1 회로 복강내 주사(10 mg/kg)에 의해 투여하였다. 두 번째 그룹의 마우스를 d7, d14 및 d21에 항-PD-1 mAb 또는 동종형 mAb로 처리하였다. 대조군 마우스를 동형 항체로 처리하였다.

[0362] 28 일에, 즉, 마지막 백신접종 1 주 후, 마우스를 희생시키고, 이들의 비장세포를 분리하여 ELISPOT 및 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의한 면역 반응을 측정하였다. 간략히, 각 비장을 희생된 면역화된 마우스로부터 멸균 방식으로 제거하고 2 ml의 R10 배지를 함유하는 5 ml의 스냅-캡 폴리프로필렌 튜브에 넣었다. 그 다음 비장을 금속 격자를 통해 긁음으로써 6 cm 페트리 접시에서 파괴하였다. 그리드를 추가 2 ml의 R10 배지로 세척하고, 샘플을 튜브에 수집하였다. 잔해를 몇 분 동안 따라내고, 상부 상을 신속하게 새로운 튜브로 옮기고, 실온에서 10 분 동안 1200 rpm으로 원심분리하였다. 4.5 ml의 세포용해 완충액(ACK 세포용해 완충액)을 현탁된 세포 펠렛에 첨가하고, 조심스럽게 혼합하고, 10 분 동안 정치시킴으로써 적혈구(RBC) 삼투 용해를 수행하였다. 0.5 ml의 10X PBS를 첨가하여 세포용해 완충액을 중화시켰다. 실온에서 10 분 동안 1200 rpm으로 회전시킨 후, 세포를 R10으로 세척하고, 재원심분리하고, 1 ml의 R10 배지에 재현탁시켰다. 세포의 생존력을 평가하기 위해, 비장세

포를 Guava ViaCount 시약에서 1:10으로 희석하고, Accuri C6 FACS 분류기를 사용하여 계수하였다. 세포 생존율은 전형적으로 96% 내지 99%였다. 제공된 펩티드 풀을 각각 0.33 mg/ml로 DMSO에 재현탁시키고, 다음과 같이 구성하였다: 코어: 35 개 펩티드, Pol1: 103 개 펩티드, 및 Pol2: 105 개 펩티드.

[0363] ELISPOT 검정을 4 개의 플레이트를 사용하여 표준 관행에 따라 수행하고, 여기서 각 샘플에 대해 400,000 개 또는 200,000 개의 비장세포를 이중으로 플레이팅하고, DMSO, 코어 또는 ConA로 자극하였다.

[0364] 펩티드 풀을 1 ㎍/ml의 최종 농도로 사용하였다. 검정은 저 배경(DMSO 자극) 및 콘카나발린 A(Concanavalin A, ConA)로의 활성화를 나타냈다. 반점-형성 세포(SFC)를 다음 식으로 계산하였다: [(2,5*평균400K) + (5*평균200K)]/2. 품질 검사 및 데이터 정교화는 0 일에 pCore로 백신접종된 동물들을 포함하여 모든 동물에서 면역 반응이 없음을 보여주었다.

[0365] 결과는 도 4에 나타나 있으며, 이전의 백신접종 연구에서 얻어진 데이터와 일치하는 Core 및 Pol 항원에 대한 강한 면역 반응을 지시하였다. 유의한 배경(DMSO)은 측정되지 않았지만, Pol2 펩티드 풀에 대해 강한 반응이 측정되었다. Pol1 펩티드 풀에 대해 더 낮은 반응이 측정되었다. 흥미롭게도, 항-PD-1의 3 회 주사를 받은 그룹은 동종형 항체에 비해 Pol 항원에 대해 유의하게 더 높은 반응을 나타냈다(Pol1 및 Pol2에 대해 각각 $p = 0.04$ 및 $p = 0.015$). 또한, 3 개의 항-PD-1 주사를 받은 그룹에서 Pol에 대한 반응은 또한 4 개의 항체 처리를 받은 마우스에 비해 더 높았다(Pol1 및 Pol2에 대해 각각 $p = 0.02$ 및 $p = 0.004$). 종합하면, 이들 데이터는 3x 항-PD-1 투여가 백신접종된 건강한 마우스에서 HBV-면역 반응을 증가시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0366] 면역 반응을 추가로 특성화하기 위해, IFNγ, TNFα 및 IL2의 분비에 대해 다색 ICS에 의해 비장세포를 분석하였다. 검정을 표준 ICS 관행에 따라 실시하였다.

[0367] 결과는 도 5에 나타나 있다.

[0368] ICS 분석은 ELISPOT와 일치했다: 코어-특이적 반응은 주로 CD4+/IFNγ+/TNFα+/IL2+인 반면, Pol1-특이적 반응은 CD4+ 및 CD8+/IFNγ+/TNFα+/IL2+ 둘 모두였다. 대조적으로, Pol2-특이적 CMI는 CD8+/IFNγ+/TNFα+였다. ICS에 의해 검출된 Pol-CMI는 다른 그룹에 비해 항-PD-1로 3 회 처리된 마우스에서 더 높았다.

[0369] 종합하면, 이들 데이터는 HBV 코어/Pol 백신이 면역원적이며 항-PD-1의 3 회 투여가 최적의 면역 효과를 야기할 수 있다는 것을 보여준다.

[0370] **실시예 5. AAV/HBV 감염된 마우스에서 HBV 백신-유도 면역 반응에 대한 항-PD-1의 영향**

[0371] PD-1의 차단이 AAV/HBV 감염 마우스에서 HBV-백신 유도 세포-매개 면역(CMI)에 영향을 미치는지의 여부를 추가로 평가하기 위해, 성인 C57BL/6 마우스를 28 일 동안 AAV/HBV로 감염시켰다. 그 후에, 14 마리 동물의 한 그룹을 d28 및 d49에 DNA 전기천공법(2.5 μg의 각 플라스미드)에 의해 백신접종하고, 한 그룹을 d28 및 d49에 DNA 전기천공법에 의해 백신접종하고, 56 일에 항-PD-1 항체(10 mg/kg)로 처리하였다. 세 번째 동물 그룹을 백신접종 후 동종형 항체로 처리하였다. 63 일에 마우스를 희생시켰다. 비장세포뿐만 아니라 간내 림프구(IHL)를 분리하고, CD8 T-세포의 증식 능력을 측정하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 항-PD-1로 처리된 마우스로부터의 IHL은 항-PD-1로 처리되지 않은 마우스 및 동위원소 항체로 처리된 마우스에 비해 유의하게 더 높은 CD8 증식성 T-세포를 가졌다. 대조적으로, 비장세포는 더 높은 증식 능력을 나타내지 않았는데(도 7), 이는 이러한 경우 간에서 감염이 발생하는 부위로 증식성 CD8 T-세포가 이동한다는 사실을 반영한다.

[0372] **동물:** C57BL/6 마우스를 MOI 10^{11}에서 꼬리 정맥을 통해 rAAV8-1.3HBV(Fiveplus Medical Institute, 중국)로 감염시켰다. 백신접종을 감염 후 28일에 HBV 만성에 도달했을 때 수행하였다.

[0373] **플라스미드 DNA:** DNA 백신은 각각 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같이, HBV의 코어(pDF-코어) 및 폴리머라제(Pol) 단백질(pDF-Pol)을 인코딩하는 2 개의 개별 DNA 플라스미드의 조합이었다. 2.5 μg의 각 플라스미드를 트리그리드 시스템(trigrid system) i.m.으로 전기천공하였다.

[0374] **항체:** 항-PD-1 항체(RMP1-14, Bioxcell), 동종형 대조군 항체(Bioxcell). 10 μg/ml의 항체를 연구에 사용하고, i.p. 투여하였다.

[0375] **연구 설계:** 성인 C57BL/6 마우스를 28 일 동안 AAV/HBV로 감염시켰다. 그 후에, 14 마리 동물의 한 그룹을 d28 및 d49에 DNA 전기천공법(2.5 μg/kg의 각 플라스미드)에 의해 백신접종하고, 한 그룹을 d28 및 d49에 DNA 전기천공법에 의해 백신접종하고, 56 일에 항-PD-1 항체(10 mg/kg)로 처리하였다. 세 번째 동물 그룹을 백신접종 후 동종형 항체로 처리하였다.

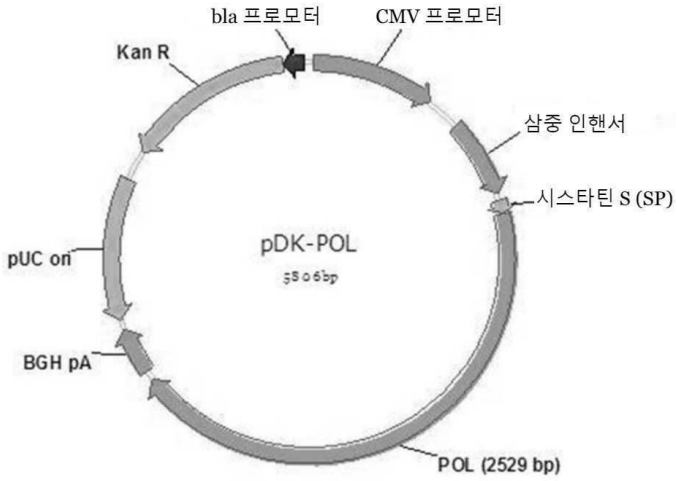
[0376] **비장세포 및 IHL의 단리:** 마우스로부터 비장을 분리하고; GentleMACS 해리기(Miltenyi Biotec)를 사용하여 조직 파괴를 수행하고, 세포를 계수하고, 지정된 검정에 사용하였다. 간을 PBS로 관류시킴으로써 간내 림프구를 얻고, 조직 파괴를 GentleMACS 해리기를 사용하여 수행한 다음, 33.75%(v/v)의 Percoll®/PBS2%FCS 구배를 수행하였다. 700xg에서의 원심분리(12 분, 실온, 최대 가속 및 1에서 제동)에 의해 림프구로부터 간세포를 분리하였다. 이들 샘플을 주의하여 흡인하고, 지정된 검정에 사용하였다.

[0377] **면역표현형화:** 비장세포 및 IHL을 웰당 100.000 개의 세포로 플레이팅하였다. 다음으로, 이들을 생존성 염료로 염색하였다. 그 후에, 세포를 고정하고, 투과시켜 세포내 염색을 수행하였다. 세포를 다음 마커로 염색하였다: 증식성 T-세포에 대한 마커인, 항-CD3, 항-CD8, 항-CD4, 및 ki67. 1 시간 후, 세포를 2 회 세척하고, 100 μl의 염색 완충액에 재현탁시키고, Facs fortessa에서 판독을 수행하였다.

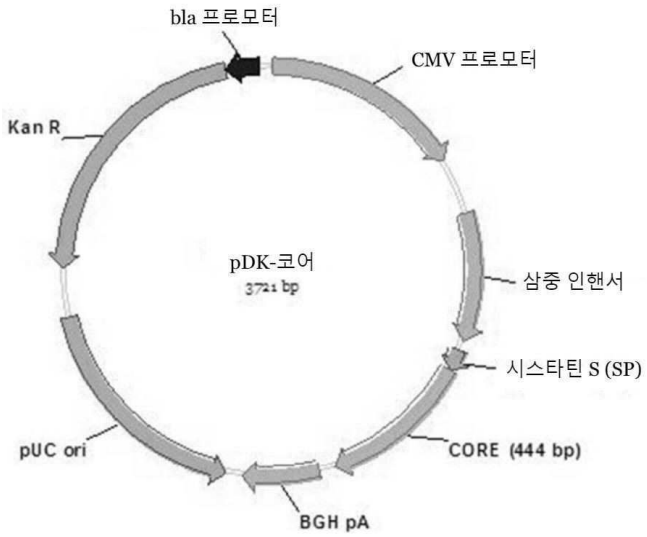
[0378] 본 명세서에 기술된 실시예 및 구현예는 오로지 예시적 목적을 위한 것이며 이의 전반적인 발명적 개념에서 벗어남 없이 상술된 구현예들에 변화가 이루어질 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 본 발명은 개시된 구체적 구현예로 제한되지 않으며, 첨부된 청구항에 규정된 바에 따른 발명의 사상 및 범위 내에서의 변형을 포함하고자 의도된 것으로 이해된다.

도면

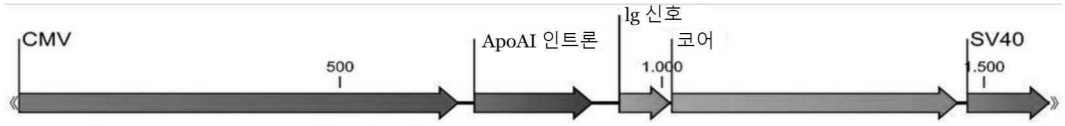
도면1a



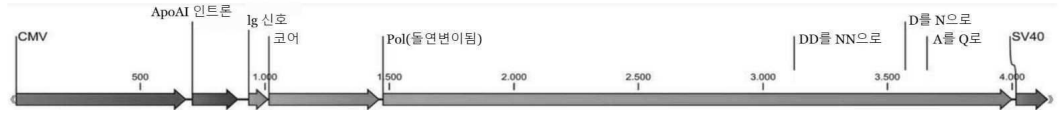
도면1b



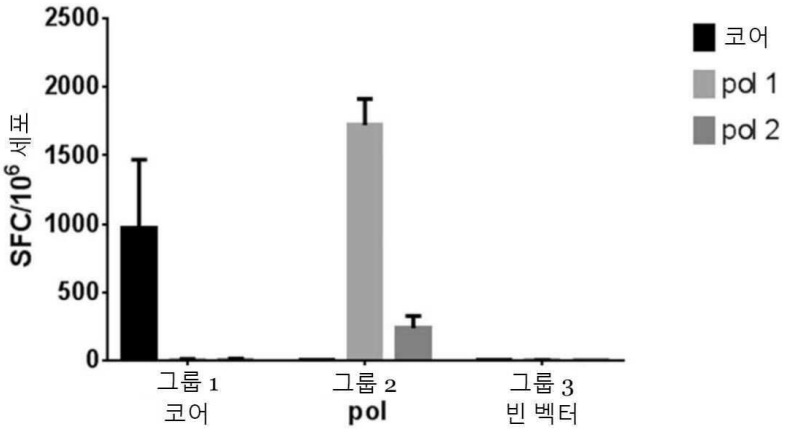
도면2a



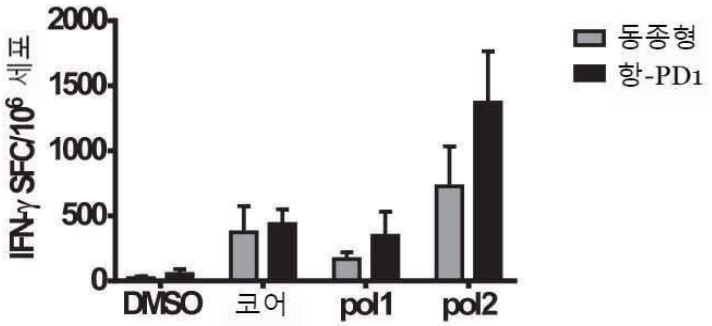
도면2b



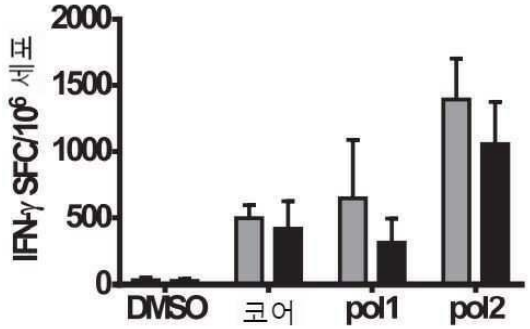
도면3



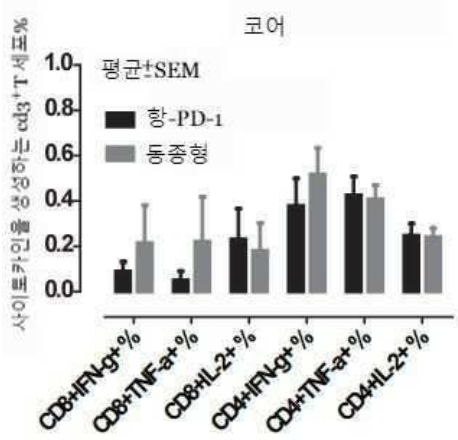
도면4a



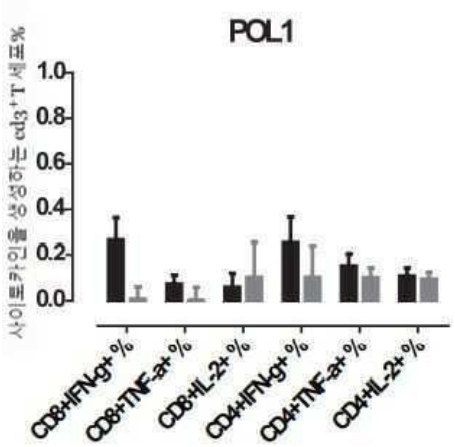
도면4b



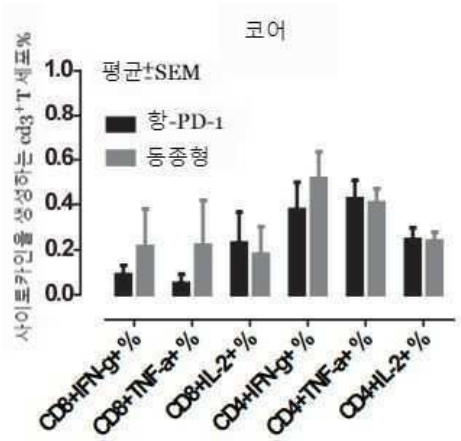
도면5a



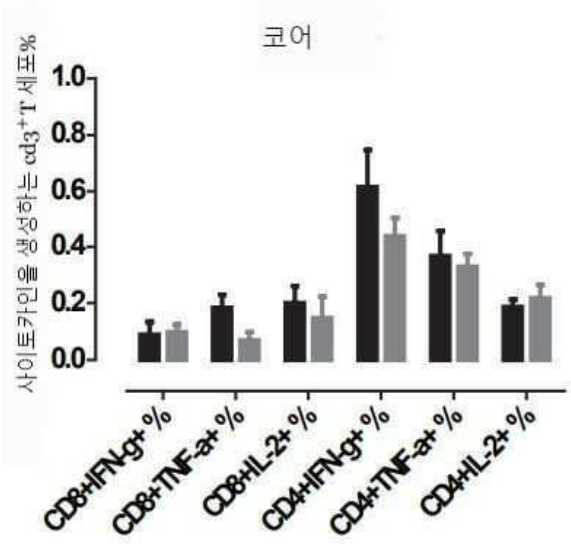
도면5b



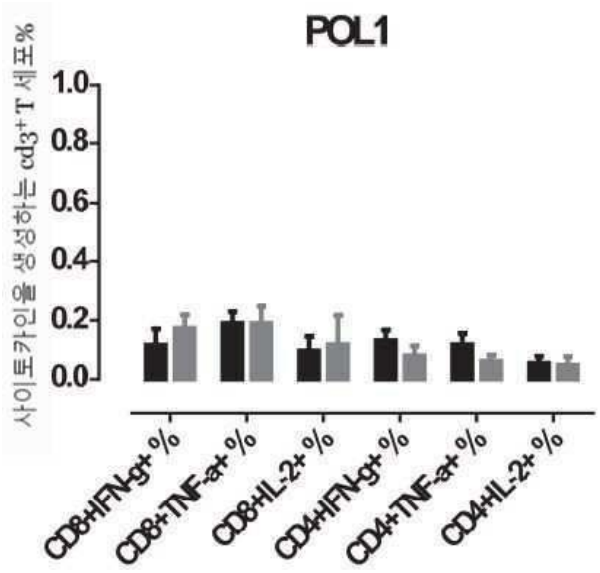
도면5c



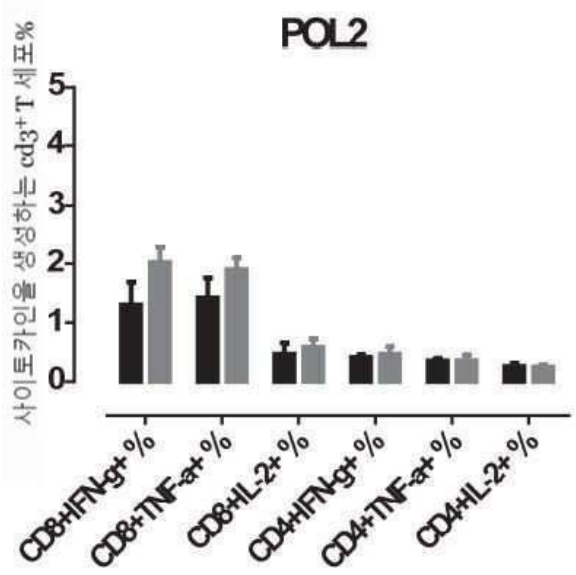
도면5d



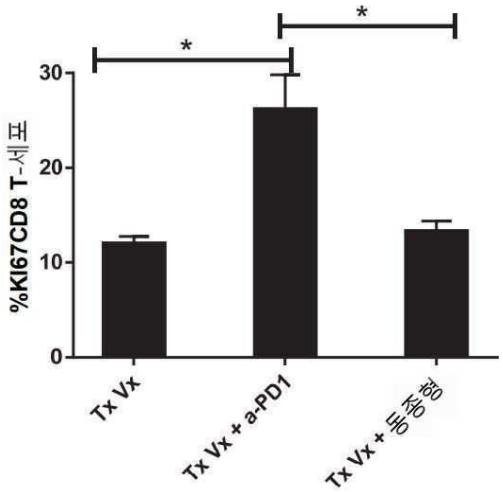
도면5e


POL1
사이토카인을 생성하는 cd3+T 세포%
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CD8+IFN-g+ %
CD8+TNF-a+ %
CD8+IL-2+ %
CD4+IFN-g+ %
CD4+TNF-a+ %
CD4+IL-2+ %

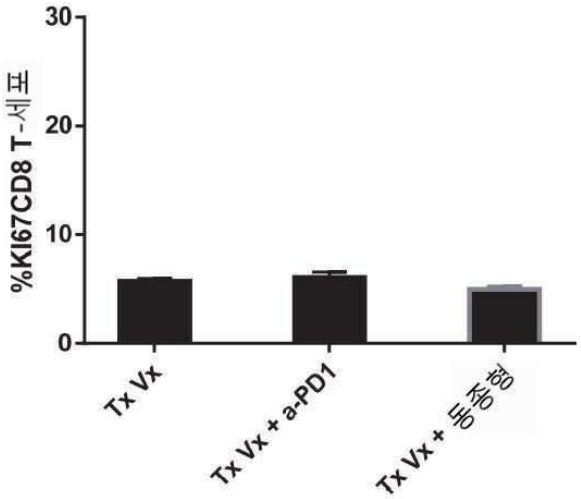
도면5f


POL2
사이토카인을 생성하는 cd3+T 세포%
5
4
3
2
1
0
CD8+IFN-g+ %
CD8+TNF-a+ %
CD8+IL-2+ %
CD4+IFN-g+ %
CD4+TNF-a+ %
CD4+IL-2+ %

도면6



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Sciences Ireland Unlimited Company

<120> Combination of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines and Anti-PD-1 Antibody

<130> 065814.11197/14WO1

<150> US62/862,774

<151> 2019-06-18

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 444

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBV truncated core antigen gene

<400> 1

gacatcgacc cttacaagga gttcggcgcc agcgtggaac tgctgtcttt tctgcccagt 60

gatttctttc cttccattcg agacctgctg gataccgcct ctgctctgta tcgggaagcc 120

ctggagagcc cagaacactg ctccccacac cataccgctc tgcgacaggc aatcctgtgc 180

tgggggggagc tgatgaacct ggccacatgg gtgggatcga atctggagga ccccgcttca 240

cgggaactgg tggtcagcta cgtgaacgtc aatatgggcc tgaaaatccg ccagctgctg 300

tggttccata ttagctgcct gacttttgga cgagagaccg tgctggaata cctggtgtcc 360

ttcggcgtct ggattcgcac tccccctgct tatcgaccac ccaacgcacc aattctgtcc 420

accctgcccg agaccacagt ggtc 444

<210> 2

<211> 148

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBV truncated core antigen

<400> 2

Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser

1 5 10 15

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp Thr

20 25 30

Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser

35 40 45

Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile

85 90 95

Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu

100 105 110

Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro

115 120 125

Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu

130 135 140

Thr Thr Val Val

145

<210> 3

<211> 447

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBV truncated core antigen gene

<400> 3

atggacatcg acccttacaa ggagttcggc gccagcgtgg aactgctgtc ttttctgccc 60

agtgatttct ttccttccat tcgagacctg ctggataccg cctctgctct gtatcgggaa 120

gccctggaga gcccagaaca ctgctcccca caccataccg ctctgcgaca ggcaatcctg 180

tgctgggggg agctgatgaa cctggccaca tgggtgggat ccaatctgga ggaccccgct 240

tcacgggaac tggtggtcag ctacgtgaac gtcaatatgg gcctgaaaat ccgccagctg 300

ctgtggttcc atattagctg cctgactttt ggacgagaga ccgtgctgga atacctggtg 360

tccttcggcg tctggatccg cactcccccct gcttatcgac cacccaacgc accaattctg 420

tccaccctgc ccgagaccac agtggtc 447

<210> 4

<211> 149

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBV truncated core antigen

<400> 4

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp

20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50 55 60

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

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

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

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115 120 125

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

Glu Thr Thr Val Val
145

<210> 5

<211> 2529

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBV pol antigen gene

<400> 5

atgcccctgt cttaccagca ctttagaaag cttctgctgc tggacgatga agccgggcct 60

ctggaggaag agctgccaag gctggcagac gaggggctga accggagagt ggccgaagat 120

ctgaatctgg gaaacctgaa cgtgagcatc ccttggactc ataaagtcgg caacttcacc 180

gggctgtaca gctccacagt gcctgtcttc aatccagagt ggcagacacc atcctttccc 240

aacattcacc tgcaggagga catcattaat agatgcgaac agttcgtggg acctctgaca 300

gtcaacgaaa agaggcgcct gaaactgatc atgcctgcca ggttttaccc aaatgtgact 360

aagtatctgc cactggataa gggcatcaag ccttactatc cagagcacct ggtgaaccat 420

tacttccaga ctagacacta tctgcatacc ctgtggaagg ccggaatcct gtacaaacga 480

gaaactaccc ggagtgcttc attttgtggc tccccatatt cttgggaaca ggagctgcag 540

catggcaggc tggtgttcca gaccagcaca cgccacgggg atgagtcctt ttgccagcag 600

tctagtggca tcctgagcag atcccccgtg gggccttgtc tgcagtctca gctgcggaag 660

agtagactgg gactgcagcc acagcaggga cacctggcac gacggcagca gggaaggtct 720

ggcagtatcc gggctagagt gcatcccaca actagaaggc ctttcggcgt cgagccatca 780

ggaagcggcc acaccacaaa caccgcatca agctcctcta gttgcctgca tcagtcagcc 840

gtgagaaagg ccgcttacag ccacctgtcc acatctaaaa ggcactcaag ctccgggcat 900

gctgtggagc tgcacaacat ccctccaaat tctgcacgca gtcagtcaga aggacccgtg 960

ttcagctgct ggtggctgca gtttcggaac tcaaagcctt gcagcgacta ttgtctgagc 1020

catattgtga atctgctgga ggattggggc ccttgtaccg agcacgggga acaccatatc 1080

aggattccac gaacaccagc acgagtgact ggaggggtgt tcctggtgga caagaacccc 1140

cacaatacta ccgagagccg gctggtggtc gatttcagtc agttttcaag aggcaacaca 1200

agggtgtcat ggcccaaatt cgccgtccct aatctgcaga gtctgactaa cctgctgtct 1260

agtaatctga gctggctgtc cctggacgtg tccgcagcct tttaccacct gcctctgcat 1320

ccagctgcaa tgccccatct gctggtgggg tcaagcggac tgagtcgcta cgtcgcccga 1380

ctgtcctcta actcacgcat cattaatcac cagcatggca ccatgcagaa cctgcacgat 1440

agctgttccc ggaatctgta cgtgtctctg ctgctgctgt ataagacatt cggcagaaaa 1500

ctgcacctgt acagccatcc tatcattctg gggtttagga agatcccaat gggagtggga 1560

ctgagcccct tcctgctggc acagtttacc tccgccattt gctctgtggt ccgccgagcc 1620

ttcccacact gtctggcttt ttcctatatg aacaatgtgg tcctgggcgc caaatccgtg 1680

cagcatctgg agtctctgtt cacagctgtc actaactttc tgctgagcct ggggatccac 1740

ctgaacccaa ataagactaa acgctggggg tacagcctga atttcatggg atatgtgatt 1800

ggatcctggg ggaccctgcc acaggagcac atcgtgcaga agatcaagga atgctttcgg 1860

aagctgcccg tcaacagacc tatcgactgg aaagtgtgcc agcggattgt cggactgctg 1920

ggcttcgccg ctccctttac ccagtgcggg tacccagcac tgatgcccct gtatgcctgt 1980

atccagtcta agcaggcttt cacctttagt cctacataca aggcattcct gtgcaaacag 2040

tacctgaacc tgtatccagt ggcaaggcag cgacctggac tgtgccaggt ctttgcaaat 2100

gccactccta ccggctgggg gctggctatc ggacatcagc gaatgcgggg cacattcgtg 2160

gccccctgc ctattcacac tgctcagctg ctggcagcct gctttgctag atctaggagt 2220

ggagcaaagc tgatcggcac cgacaatagt gtggtcctgt caagaaaata cacatccttc 2280

ccatggctgc tgggatgtgc tgcaaactgg attctgaggg gcaccagctt cgtgtacgtc 2340

ccctcagccc tgaatcctgc tgacgatcca tcccgcgggc gactgggact gtaccgacct 2400

ctgctgagac tgcccttcag gcctacaact ggccggacat ctctgtatgc cgattcacca 2460

agcgtgccct cacacctgcc tgacagagtc cactttgctt cacccctgca cgtcgcttgg 2520

cggcctcca 2529

<210> 6

<211> 2529

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBV pol antigen gene

<400> 6

atgcccctgt cttaccagca ctttagaaag ctgctgctgc tggacgatga agccgggcct 60

ctggaggaag agctgccaag gctggcagac gaggggctga accggagagt ggccgaagat 120

ctgaatctgg gaaacctgaa cgtgagcatc ccttggactc ataaagtcgg caacttcacc 180

gggctgtaca gctccacagt gcctgtcttc aatccagagt ggcagacacc atcctttccc 240

aacattcacc tgcaggagga catcattaat agatgcgaac agttcgtggg acctctgaca 300

gtcaacgaaa agaggcgcct gaaactgatc atgcctgcca ggttttaccc aaatgtgact 360

aagtatctgc cactggataa gggcatcaag ccttactatc cagagcacct ggtgaaccat 420

tacttccaga ctagacacta tctgcatacc ctgtggaagg ccggaatcct gtacaaacga 480

gaaactaccc ggagtgcttc attttgtggc tccccatatt cttgggaaca ggagctgcag 540

catggcaggc tggtgttcca gaccagcaca cgccacgggg atgagtcctt ttgccagcag 600

tctagtggca tcctgagcag atcccccgtg gggccttgtc tgcagtctca gctgcggaag 660

agtagactgg gactgcagcc acagcaggga cacctggcac gacggcagca gggaaggtct 720

ggcagtatcc gggctagagt gcatcccaca actagaaggc ctttcggcgt cgagccatca 780

ggaagcggcc acaccacaaa caccgcatca agctcctcta gttgcctgca tcagtcagcc 840

gtgagaaagg ccgcttacag ccacctgtcc acatctaaaa ggcactcaag ctccgggcat 900

gctgtggagc tgcacaacat ccctccaaat tctgcacgca gtcagtcaga aggacccgtg 960

ttcagctgct ggtggctgca gtttcggaac tcaaagcctt gcagcgacta ttgtctgagc 1020

catattgtga atctgctgga ggattggggc ccttgtaccg agcacgggga acaccatatc 1080

aggattccac gaacaccagc acgagtgact ggaggggtgt tcctggtgga caagaacccc 1140

cacaatacta ccgagagccg gctggtggtc gatttcagtc agttttcaag aggcaacaca 1200

agggtgtcat ggcccaaatt cgccgtccct aatctgcaga gtctgactaa cctgctgtct 1260

agtaatctga gctggctgtc cctggacgtg tccgcagcct tttaccacct gcctctgcat 1320

ccagctgcaa tgccccatct gctggtgggg tcaagcggac tgagtcgcta cgtcgcccga 1380

ctgtcctcta actcacgcat cattaatcac cagcatggca ccatgcagaa cctgcacgat 1440

agctgttccc ggaatctgta cgtgtctctg ctgctgctgt ataagacatt cggcagaaaa 1500

ctgcacctgt acagccatcc tatcattctg gggtttagga agatcccaat gggagtggga 1560

ctgagcccct tcctgctggc acagtttacc tccgccattt gctctgtggt ccgccgagcc 1620

ttcccacact gtctggcttt ttcctatatg aacaatgtgg tcctgggcgc caaatccgtg 1680

cagcatctgg agtctctgtt cacagctgtc actaactttc tgctgagcct ggggatccac 1740

ctgaacccaa ataagactaa acgctggggg tacagcctga atttcatggg atatgtgatt 1800

ggatcctggg ggaccctgcc acaggagcac atcgtgcaga agatcaagga atgctttcgg 1860

aagctgcccg tcaacagacc tatcgactgg aaagtgtgcc agcggattgt cggactgctg 1920

ggcttcgccg ctccctttac ccagtgcggg tacccagcac tgatgcccct gtatgcctgt 1980

atccagtcta agcaggcttt caccttagt cctacataca aggcattcct gtgcaaacag 2040

tacctgaacc tgtatccagt ggcaaggcag cgacctggac tgtgccaggt ctttgcaaat 2100

gccactccta ccggctgggg gctggctatc ggacatcagc gaatgcgggg cacattcgtg 2160

gccccctgc ctattcacac tgctcagctg ctggcagcct gctttgctag atctaggagt 2220

ggagcaaagc tgatcggcac cgacaatagt gtggtcctgt caagaaaata cacatccttc 2280

ccatggctgc tgggatgtgc tgcaaactgg attctgaggg gcaccagctt cgtgtacgtc 2340

ccctcagccc tgaatcctgc tgacgatcca tcccgcgggc gactgggact gtaccgacct 2400

ctgctgagac tgcccttcag gcctacaact ggccggacat ctctgtatgc cgattcacca 2460

agcgtgccct cacacctgcc tgacagagtc cactttgctt cacccctgca cgtcgcttgg 2520

cggcctcca 2529

<210> 7

<211> 843

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBV pol antigen

<400> 7

Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Lys Leu Leu Leu Leu Asp Asp

1 5 10 15

Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly

20 25 30

Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val

35 40 45

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

50 55 60

Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro Glu Trp Gln Thr Pro Ser Phe Pro
65 70 75 80
Asn Ile His Leu Gln Glu Asp Ile Ile Asn Arg Cys Glu Gln Phe Val
85 90 95
Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Lys Leu Ile Met Pro
100 105 110
Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly

115 120 125

Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr
130 135 140
Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg
145 150 155 160
Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu
165 170 175
Gln Glu Leu Gln His Gly Arg Leu Val Phe Gln Thr Ser Thr Arg His

180 185 190

Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Ser
195 200 205
Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln Ser Gln Leu Arg Lys Ser Arg Leu Gly
210 215 220
Leu Gln Pro Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser
225 230 235 240
Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val His Pro Thr Thr Arg Arg Pro Phe Gly

245 250 255

Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Thr Ala Ser Ser Ser
260 265 270
Ser Ser Cys Leu His Gln Ser Ala Val Arg Lys Ala Ala Tyr Ser His
275 280 285
Leu Ser Thr Ser Lys Arg His Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu

290 295 300

His Asn Ile Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser Glu Gly Pro Val

305 310 315 320

Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp

325 330 335

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

340 345 350

Thr Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg

355 360 365

Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Thr

370 375 380

Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Thr

385 390 395 400

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

405 410 415

Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala

420 425 430

Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu

435 440 445

Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn

450 455 460

Ser Arg Ile Ile Asn His Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp

465 470 475 480

Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Thr

485 490 495

Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe

500 505 510

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

515 520 525

Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys

530 535 540

Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asn Asn Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val
545 550 555 560
Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser

565 570 575
Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser
580 585 590
Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Ser Trp Gly Thr Leu Pro Gln
595 600 605
Glu His Ile Val Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg Lys Leu Pro Val
610 615 620
Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu

625 630 635 640
Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro Ala Leu Met Pro
645 650 655
Leu Tyr Ala Cys Ile Gln Ser Lys Gln Ala Phe Thr Phe Ser Pro Thr
660 665 670
Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala
675 680 685
Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asn Ala Thr Pro Thr

690 695 700
Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Val
705 710 715 720
Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Gln Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala
725 730 735
Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val
740 745 750
Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala

755 760 765
Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu
770 775 780
Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro

785 790 795 800

Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr

805 810 815

Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe

820 825 830

Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro

835 840

<210> 8

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cystatin S signal peptide coding sequence

<400> 8

atggctcgac ctctgtgtac cctgctactc ctgatggcta ccctggctgg agctctggcc 60

agc 63

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Cystatin S signal peptide sequence

<400> 9

Met Ala Arg Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Met Ala Thr Leu Ala

1 5 10 15

Gly Ala Leu Ala Ser

20

<210> 10

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> triple enhancer regulatory sequence

<400> 10

ggctcgcatc tctccttcac gcgcccgccg ccctacctga ggccgccatc cacgccggtt 60

gagtcgcgtt ctgccgcctc ccgcctgtgg tgcctcctga actgcgtccg ccgtctaggt 120

aagtttaaag ctcaggtcga gaccgggcct ttgtccggcg ctcccttgga gcctacctag 180

actcagccgg ctctccacgc tttgcctgac cctgcttgct caactctagt tctctcgtta 240

acttaatgag acagatagaa actggtcttg tagaaacaga gtagtcgcct gcttttctgc 300

caggtgctga cttctctccc ctgggctttt ttctttttct caggttgaaa agaagaagac 360

gaagaagacg aagaagac 378

<210> 11

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker coding sequence

<400> 11

gccggagctg gc 12

<210> 12

<211> 248

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApoAI gene fragment

<400> 12

ttggccgtgc tcttcctgac gggtaggtgt cccctaacct agggagccaa ccatcggggg 60

gccttctccc taaatccccg tggcccaccc tcctgggcag aggcagcagg tttctcactg 120

gccccctctc ccccacctcc aagcttggcc tttcggctca gatctcagcc cacagctggc 180

ctgatctggg tctcccctcc caccctcagg gagccaggct cggcatttcg tcgacaagct 240

tagccacc 248

<210> 13

<211

> 130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SV40 polyadenylation signal sequence

<400> 13

aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 60

aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 120

tatcatgtct 130

<210> 14

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunoglobulin secretion signal coding sequence

<400> 14

atggagttcg gcctgtcttg ggtctttctg gtggcaatcc tgaagggcgt gcagtgtgaa 60

gtgcagctgc tggagtctgg a 81

<210> 15

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunoglobulin secretion signal sequence

<400> 15

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

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

<210> 16

<211> 996

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

HBV core-pol fusion antigen sequence

<400> 16

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

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

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

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys

85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Ala Gly Ala Gly Met Pro Leu Ser Tyr Gln His

145 150 155 160

Phe Arg Lys Leu Leu Leu Leu Asp Asp Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu

165 170 175

Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu

180 185 190

Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys

195 200 205

Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn

210 215 220

Pro Glu Trp Gln Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu Gln Glu Asp

225 230 235 240

Ile Ile Asn Arg Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu

245 250 255

Lys Arg Arg Leu Lys Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val

260 265 270

Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu

275 280 285

His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu

290 295 300

Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser

305 310 315 320

Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu Gln Glu Leu Gln His Gly Arg

325 330 335

Leu Val Phe Gln Thr Ser Thr Arg His Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln

340 345 350

Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Ser Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln

355 360 365

Ser Gln Leu Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Pro Gln Gln Gly His

370 375 380

Leu Ala Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val

385 390 395 400

His Pro Thr Thr Arg Arg Pro Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly

405 410 415

His Thr Thr Asn Thr Ala Ser Ser Ser Ser Ser Cys Leu His Gln Ser

420 425 430

Ala Val Arg Lys Ala Ala Tyr Ser His Leu Ser Thr Ser Lys Arg His

435 440 445

Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Ile Pro Pro Asn Ser

450 455 460

Ala Arg Ser Gln Ser Glu Gly Pro Val Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln

465 470 475 480

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

485 490 495

Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Thr Glu His Gly Glu His His

500 505 510

Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu

515 520 525

Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Thr Glu Ser Arg Leu Val Val Asp

530 535 540

Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Thr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe

545 550 555 560

Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu

565 570 575

Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu

580 585 590

His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser

595 600 605

Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Ile Asn His Gln

610 615 620

His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr

625 630 635 640

Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu

645 650 655

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

660 665 670

Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser

675 680 685

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

690 695 700

Asn Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe

705 710 715 720

Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

Val Cys Gln Arg Ile Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr

785 790 795 800

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

820 825 830
Gln Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys
835 840 845
Gln Val Phe Ala Asn Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly
850 855 860
His Gln Arg Met Arg Gly Thr Phe Val Ala Pro Leu Pro Ile His Thr
865 870 875 880
Ala Gln Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys

885 890 895
Leu Ile Gly Thr Asp Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser
900 905 910
Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr
915 920 925
Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser
930 935 940
Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg

945 950 955 960
Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro
965 970 975
Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala
980 985 990
Trp Arg Pro Pro
995

<210> 17
<211> 1023
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> HBV core-pol fusion antigen sequence with Ig signal sequence
<

400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

245 250 255

Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu Gln Glu Asp Ile Ile Asn Arg Cys
260 265 270
Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Lys
275 280 285
Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro
290 295 300
Leu Asp Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His
305 310 315 320

Tyr Phe Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile
325 330 335
Leu Tyr Lys Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro
340 345 350
Tyr Ser Trp Glu Gln Glu Leu Gln His Gly Arg Leu Val Phe Gln Thr
355 360 365
Ser Thr Arg His Gly Asp Glu Ser Phe Cys Gln Gln Ser Ser Gly Ile
370 375 380

Leu Ser Arg Ser Pro Val Gly Pro Cys Leu Gln Ser Gln Leu Arg Lys
385 390 395 400
Ser Arg Leu Gly Leu Gln Pro Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg Gln
405 410 415
Gln Gly Arg Ser Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val His Pro Thr Thr Arg
420 425 430
Arg Pro Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Thr Thr Asn Thr
435 440 445

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Cys Leu His Gln Ser Ala Val Arg Lys Ala
450 455 460
Ala Tyr Ser His Leu Ser Thr Ser Lys Arg His Ser Ser Ser Gly His
465 470 475 480
Ala Val Glu Leu His Asn Ile Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln Ser
485 490 495

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ser Val Gln His Leu Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn

740 745 750

Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg

755 760 765

Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met Gly Tyr Val Ile Gly Ser Trp Gly

770 775 780

Thr Leu Pro Gln Glu His Ile Val Gln Lys Ile Lys Glu Cys Phe Arg

785 790 795 800

Lys Leu Pro Val Asn Arg Pro Ile Asp Trp Lys Val Cys Gln Arg Ile

805 810 815

Val Gly Leu Leu Gly Phe Ala Ala Pro Phe Thr Gln Cys Gly Tyr Pro

820 825 830

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

835 840 845

Phe Ser Pro Thr Tyr Lys Ala Phe Leu Cys Lys Gln Tyr Leu Asn Leu

850 855 860

Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val Phe Ala Asn

865 870 875 880

Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Ala Ile Gly His Gln Arg Met Arg

885 890 895

Gly Thr Phe Val Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Gln Leu Leu Ala

900 905 910

Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Asp

915 920 925

Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu

930 935 940

Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val

945 950 955 960

Pro Ser Ala Leu Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly

965 970 975

Leu Tyr Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg

980 985 990

Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro Asp
995 1000 1005

Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
1010 1015 1020

<210> 18

<211> 584

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCMV promoter

<400> 18

tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 60

ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc 120

aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg 180

actttccatt gacgtcaatg ggtggactat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat 240

caagtgtatc atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc 300

tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta 360

ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag 420

cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg gagtttgttt 480

tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa 540

atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagc 584

<210> 19

<211> 684

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCMV promoter sequence

<400> 19

accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 60

agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg 120

ctgaccgccc aacgaccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 180

gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 240

ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tacgcccccc attgacgtca atgacggtaa 300

atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 360

catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 420

gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg 480

gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaaca actccgcccc 540

attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 600

agtgaaccgt cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 660

ccgggaccga tccagcctcc gcgg 684

<210> 20

<211> 225

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bGH polyA signal

<400> 20

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc 60

tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatgg 225

<210> 21

<211> 671

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pUC ORI

<400> 21

cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc 60

ttgcaaacaa aaaaaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 120

ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagtg 180

tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg 240

ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac 300

tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca 360

cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga 420

gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 480

ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct 540

gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg 600

agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct 660

tttgctcaca t 671

<210> 22

<211> 795

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kanr

<400> 22

atgattgagc aagatggtct tcacgctggc tcgccagctg cgtgggtgga acgcctgttt 60

ggttatgatt gggcgcagca gactattgga tgttccgacg cggctgtatt tcggctgtct 120

gctcagggtc gccccgtgct gtttgtgaag acggatttgt ctggcgcatt aaatgagtta 180

caggacgagg cggctcgtct gagttggttg gccaccaccg gcgtgccctg cgccgcagtg 240

ctggatgtcg tgacagaagc aggccgcgat tggctccttc tcggcgaagt gccgggccag 300

gacctgctca gcagccactt ggcaccggca gaaaaagttt ctatcatggc cgacgccatg 360

cgtcgtcttc acactctcga tccggccacg tgccccttg accaccaggc caagcatcgt 420

attgaacgtg cgcgtactcg gatggaagca ggtttagtag accaggacga tttggatgag 480

gaacatcaag gcctggcccc ggctgaactg tttgcgcgct taaaagcgtc gatgccagat 540

ggcgaagatt tggtagtcac ccatggagat gcgtgtttgc caaacatcat ggttgaaaat 600

ggccgcttct caggctttat tgactgtggg cgcctgggtg ttgccgaccg ctatcaagat 660

attgcgctcg caactcgtga catcgctgaa gagctgggcg gagaatgggc tgaccgtttc 720

ctggtactgt atggcattgc agcgcccgat tcccaacgca tcgcatttta tcgtctgctg 780

gatgagtttt tctaa 795

<210> 23

<211> 264

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon optimized Kanr

<400> 23

Met Ile Glu Gln Asp Gly Leu His Ala Gly Ser Pro Ala Ala Trp Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Ala Ala Val Phe Arg Leu Ser Ala Gln Gly Arg Pro Val Leu Phe

35 40 45

Val Lys Thr Asp Leu Ser Gly Ala Leu Asn Glu Leu Gln Asp Glu Ala

50 55 60

Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Thr Thr Gly Val Pro Cys Ala Ala Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Pro Gly Gln Asp Leu Leu Ser Ser His Leu Ala Pro Ala Glu Lys

100 105 110

Val Ser Ile Met Ala Asp Ala Met Arg Arg Leu His Thr Leu Asp Pro

115 120 125

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

130 135 140

Arg Thr Arg Met Glu Ala Gly Leu Val Asp Gln Asp Asp Leu Asp Glu

145 150 155 160

Glu His Gln Gly Leu Ala Pro Ala Glu Leu Phe Ala Arg Leu Lys Ala

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Cys Gly Arg Leu Gly Val Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Ile Ala Leu Ala

210 215 220

Thr Arg Asp Ile Ala Glu Glu Leu Gly Gly Glu Trp Ala Asp Arg Phe

225 230 235 240

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

245 250 255

Tyr Arg Leu Leu Asp Glu Phe Phe

260

<210> 24

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bla promoter

<400> 24

acccctattt gtttatttttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 60

ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagt 99

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 HCDR1 genus

<220><221> 1MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa may be Ser or Asp

<220><221> 1MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa may be Val or Ala

<220><221> 1MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa may be His or Ser

<400> 25

Xaa Tyr Xaa Ile Xaa

1 5

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 HCDR2 genus

<220><221> MISC_FEATURE

<222>

(6)..(6)

<223> Xaa may be Tyr or Phe

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa may be Gly or Asp

<400> 26

Gly Ile Ile Pro Ile Xaa Xaa Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 HCDR3 genus 1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa is Asn or Ser

<400> 27

Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Xaa Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 HCDR3 genus 2

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Thr or Tyr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Leu or Val

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Asp or Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Arg or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is His or Met

<400> 28

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Gly Xaa Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 LCDR1 genus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Ser, Arg or Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Ser or Asn

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 LCDR2 genus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Asn, Asp, Tyr, Ser or Thr

<400> 30

Asp Ala Ser Xaa Arg Ala Thr

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 LCDR3 genus

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Ser, Asn, Gly, Glu, Asp, Trp or Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa is Asn, Tyr, Glu or Ala

<400> 31

Gln Gln Arg Xaa Xaa Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR1

<400> 32

Ser Tyr Ala Ile Ser

1 5

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR1

<400> 33

Asp Tyr Val Ile Ser

1 5

<210> 34

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR1

<400> 34

Ser Tyr Val Ile His

1 5

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR2

<400> 35

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR2

<400> 36

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR2

<400> 37

Gly Ile Ile Pro Ile Tyr Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR3

<400> 38

Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Asn Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 39

<211> 14

<212> PRT

<

213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR3

<400> 39

Pro Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR3

<400> 40

Gly Thr Leu Asp Arg Thr Gly His Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody HCDR3

<400> 41

Gly Tyr Val Arg Ala Thr Gly Met Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR1

<400> 42

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR1

<400> 43

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR1

<400> 44

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR1

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR1

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR1

<400> 47

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR2

<400> 48

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR2

<400> 49

Asp Ala Ser Asp Arg Ala Thr

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR2

<400> 50

Asp Ala Ser Tyr Arg Ala Thr

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR2

<400> 51

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR2

<400> 52

Asp Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 53

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 54

Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 55

Gln Gln Arg Gly Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 56

Gln Gln Arg Glu Tyr Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 57

Gln Gln Arg Asp Tyr Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 58

Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 59

Gln Gln Arg Trp Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 60

Gln Gln Arg Ala Tyr Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 61

<211

> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 61

Gln Gln Arg Ala Glu Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> PD-1 antibody LCDR3

<400> 62

Gln Gln Arg Ser Ala Trp Pro Leu Thr

1 5