(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103442732 B
(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201280008596.9

(22)申请日 2012.02.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103442732 A

(43)申请公布日 2013.12.11

(30)优先权数据
61/442,162 2011.02.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.08.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/024905 2012.02.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/109668 EN 2012.08.16

(73)专利权人 宾夕法尼亚大学托管会
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 D·B·韦纳 严健
N·奥本-阿杰伊

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陶家蓉

(51)Int.Cl.
A61K 39/29(2006.01)

(56)对比文件
CN 1832956 A,2006.09.13,说明书第16、55页.
WO 2008089144 A2,2008.07.24,说明书第59页.
Negi,S.S et al..core protein [Hepatitis B virus].《GenBank: ADH82159.1》.2010,1.
Negi,S.S et al..core protein [Hepatitis B virus].《GenBank: ADH82159.1》.2010,1.
殷瑛,徐俊杰,陈薇.乙型肝炎病毒核心蛋白作为表位疫苗载体的应用.《生物工程学报》.2010,431-438.

审查员 宋梦

权利要求书1页 说明书23页
序列表8页 附图24页

(54)发明名称

编码乙型肝炎病毒核心蛋白的核酸分子和包含其的疫苗

(57)摘要

本文提供编码HBV核心蛋白的新型共有氨基酸序列的核酸序列,以及表达所述蛋白质序列的基因构建体/载体和疫苗。本文还提供使用所提供的所述核酸序列来产生针对HBV的免疫反应的方法。

CN 103442732 B

1.一种核酸分子,所述核酸分子编码在个体中诱导免疫反应的共有HBV核心蛋白的序列,所述蛋白是:SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的蛋白质。

2.如权利要求1所述的核酸分子,其进一步包含一条核酸序列,所述序列编码连接至所述蛋白质的N端的信号肽。

3.如权利要求1所述的核酸分子,其编码SEQ ID NO:2的蛋白质。

4.如权利要求1所述的核酸分子,其核苷酸序列是SEQ ID NO:1。

5.如权利要求1所述的核酸分子,其进一步包含一条核酸序列,所述序列编码连接至所述蛋白质序列的5'端的信号肽。

6.如权利要求1所述的核酸分子,其核苷酸序列是选自由以下组成的组的一个或多个核苷酸序列:SEQ ID NO:1;SEQ ID NO:3;以及SEQ ID NO:5。

7.如权利要求1所述的核酸分子,其中所述核酸分子被并入到病毒颗粒中。

8.一种质粒,其特征在于,所述质粒包含权利要求1所述的核酸分子。

9.一种表达载体,其特征在于,所述表达载体包含可操作性地连接至调控元件的权利要求1所述的核酸分子。

10.如权利要求1所述的核酸分子的用途,其特征在于,用于制备诱导针对HBV抗原的免疫反应的药物。

11.如权利要求1所述的核酸分子的用途,其特征在于,用于制备一种保护个体免受HBV感染的药物。

12.如权利要求1所述的核酸分子的用途,其特征在于,用于制备一种保护已被诊断患有HBV感染的个体的药物。

13.一种SEQ ID NO:2的蛋白质。

14.一种SEQ ID NO:4的蛋白质。

15.一种SEQ ID NO:6的蛋白质。

16.如权利要求13-15任一所述的蛋白质的用途,其特征在于,用于制备一种诱导针对HBV抗原的免疫反应的药物。

17.如权利要求13-15任一所述的蛋白质的用途,其特征在于,用于制备一种保护个体免受HBV感染的药物。

18.如权利要求13-15任一所述的蛋白质的用途,其特征在于,用于制备一种保护已被诊断患有HBV感染的个体的药物。

19.一种适用于在受试者体内产生针对HBV的免疫反应的疫苗,所述疫苗包含:

根据权利要求1所述的核酸分子,以及

佐剂分子。

20.如权利要求19所述的疫苗,其中所述佐剂是IL-12、IL-15、IL-28或RANTES。

编码乙型肝炎病毒核心蛋白的核酸分子和包含其的疫苗

发明领域

[0001] 本发明涉及编码乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白及其片段的核酸序列;涉及乙型肝炎病毒(HBV)核心蛋白及其片段、涉及改进的HBV疫苗、用于诱导针对HBV的免疫反应的改进方法以及用于预防地和/或治疗地使个体针对HBV免疫的改进方法。

[0002] 发明背景

[0003] 本申请要求2011年2月11日提交的美国临时专利申请号61/442,162的优先权,所述专利申请以引用方式并入本文。

[0004] 乙型肝炎是全球范围内流行的常见感染,其导致了肝硬化、肝功能衰竭以及肝细胞癌的发展。显著数量的肝炎病例未被报道出来是因为所述疾病的无症状特性。虽然如此,每年仍报道了约3.5亿慢性乙型肝炎病例。大部分肝炎感染的人群是在不发达国家或者发展中国家。

[0005] 所述病毒基于其包膜蛋白上存在的抗原表位而被分为四种主要血清型(adr、adw、ayr、ayw)。根据基因组序列的变化,HBV存在至少八种基因型(A-H)。HBV的替代基因型具有流行的地理分布。

[0006] 表1是HBV基因型的地理分布。

[0007] 表1-HBV的地理分布

[0008]

HBV 基因型	*HBV 基因亚型*	*HBsAg 亚型*	*频率*	*主要地理分布*
A	A2	adw2	高	欧洲、北美洲、澳大利

[0009]

				亚
	A1	ayw1, adw2	高	非洲
B	B1 B2、B3	adw2	高	远东
	B4	ayw1	高	远东
	B2	adw3	低	远东
C	C1、C2、C4	adr	高	远东
	C3	adrq-	高	新几内亚、太平洋
	C1、C2	ayr	高	远东
	C1、C3	adw2	低	远东
	C4	ayw3	低	远东、太平洋
D	D1、D3、D4	ayw2	高	西亚、东欧、地中海
	D2、D3	ayw3	高	全世界
	未识别	adw3	低	东欧、西班牙
	D2	ayw4	低	东欧、西班牙、美国
E	-	ayw4	高	非洲
F	F1、F2	adw4q-	高	拉丁美洲、阿拉斯加州、太平洋
	F1、F2	ayw4	低	拉丁美洲
G	-	adw2	低	欧洲、北美洲
H	-	ayw4	低	中美洲

[0010] 医学病毒学杂志(J.Med.Virol),DOI 10.1002jmv

[0011] HBV基因组是环形DNA分子,所述分子主要是双链但该双链具有由比另一链更长的一链产生的单链区域。所述双链区域由约3020个核苷酸的较短链的一条链与约3320个核苷酸的较长链杂交而产生。在所述较长链的非杂交核苷酸上的单链区域与HBV DNA聚合酶相缔合。HBV基因组DNA和HBVDNA聚合酶两者都包含在由多个HBV核心蛋白(HBcAg)分子形成的核蛋白壳内。HBV核心蛋白由HBV表面蛋白质(HBsAgs)和脂质分子包膜。

[0012] 所述HBV基因组含有四个开放阅读框架(ORF):1)编码HBVDNA聚合酶的ORF,2)具有两个起始密码子的ORF,其中连接到第二个起始密码子的序列编码核心蛋白并且包括另一个上游起始密码子的序列编码被称为pre-C的序列;3)具有三个起始密码子的ORF,其中一个编码表面蛋白质(gp27)、一个包括编码被称为pre-S2(gp36)的序列的上游起始密码子,并且另一个包括编码被称为pre-S1(gp42)的序列的更上游的起始密码子;以及4)编码HBxAg的ORF,所述HBxAg是功能较少被了解的蛋白质。

[0013] 用于HBV感染的预防疫苗和治疗涉及注射从慢性携带者的血浆中纯化的亚病毒颗粒或在稳定转染的真核细胞系中作为重组蛋白质而被产生的亚病毒颗粒。所述亚病毒颗粒是病毒蛋白质，并且这些疫苗通常被称为亚单位疫苗。HBV蛋白被施用给个体并变为个体的免疫系统的靶标。在未感染的个体中，针对亚单位疫苗的免疫反应保护所述未感染个体免受HBV感染。在感染个体中，由疫苗诱导的免疫反应可以具有治疗效果。

[0014] 奇萨利·F.V.(Chisari F.V.)，美国病理学杂志(Am J Pathol.)，2000.156:1117-1132和帕巴斯·P.(Pumpeus P.)等国际病毒学(Intervirology)2001.44:98-114公开了HBV基因组结构。迪奈·P.(Deny P.)和F.·邹莉(F.Zoulim)，病理学与生物学(Pathologie Biologie)2010,8月,58(4):245 53讨论了乙型肝炎病毒的诊断和治疗。麦克·M.L.(Michel M.L.)和P.·蒂奥莱(P.Tiollais)，病理学与生物学2010,8月,58(4):288 95讨论了乙型肝炎疫苗以及它们的保护功效和治疗潜能。PCT公布WO2004026899公开了含有具有HBV氨基酸序列的多肽序列的免疫原的用途。PCT公布的申请WO2008093976公开了包括包含重组全长HBV表面抗原和HBV核心抗原的疫苗的HBV编码序列、蛋白质和疫苗。整个HBV表面抗原由三种类型的表面蛋白质(L蛋白、M蛋白和S蛋白)组成。PCT公布的申请WO2009130588公开了包括编码乙型肝炎病毒核心抗原的核酸的HBV编码序列、蛋白质和疫苗，所述核酸是被优化来用于在人中表达的密码子。PCT公布WO2010127115公开了使用重组载体递送HBV序列。

[0015] 可用的HBV疫苗已经表现出了一些功效，但生产昂贵。此外，来源于血浆的亚单位疫苗还具有关于安全性方面的担忧。已经研究了若干疫苗方法，所述方法包括基于重组活载体、合成肽以及包含HBV蛋白质的密码子优化编码序列的DNA疫苗的那些方法。这些其它的方法迄今已具有改变的有限功效。此外，由于基因组的差异，一些HBV疫苗已经在一些地理区域内表现积极的功效并在其它区域内表现有限的功效。

[0016] 已经研究直接施用核酸序列来针对动物和人疾病进行疫苗接种，并且很多努力集中在核酸递送的有效且高效的手段上，以便产生所需抗原的必要表达，从而引起免疫原性反应和最终这个技术的成功。

[0017] DNA疫苗允许内源性抗原合成，这诱导CD8+组织相容性的复杂的I类受限的细胞毒性T淋巴细胞，所述淋巴细胞用亚单位疫苗很少获得。此外，一段持续的时期内发生的抗原合成可以有助于克服低响应性并除去或减少强化注射的需要。另外，DNA疫苗似乎非常稳定且生产简单。此外，可以通过结合策略如密码子优化、RNA优化和添加免疫球蛋白前导序列来诱导更广泛的细胞免疫反应。

[0018] DNA疫苗安全、稳定、易于生产，并且在人中耐受良好，其中临床前实验指示几乎没有质粒整合迹象[马丁·T.(Martin,T.)等，质粒DNA疟疾疫苗:肌肉内注射之后基因组整合的可能性。(Plasmid DNA malaria vaccine:the potential for genomic integration after intramuscular injection.)人类基因治疗(Hum Gene Ther)，1999.10(5):759-68页；尼克尔斯·W.W.(Nichols,W.W.)等，可能的DNA疫苗整合到宿主细胞基因组中。(Potential DNA vaccine integration into host cell genome.)纽约科学院学术年报(Ann N Y Acad Sci)，1995.772:30-9页]。此外，DNA疫苗非常适合用于重复施用，这是因为这样的事实，即疫苗的功效不受预先存在的对载体的抗体滴度的影响[常特谷·M.(Chattergoon,M.)、J.·泊伊尔(J.Boyer)和D.B.·维纳(D.B.Weiner)，基因免疫:疫苗和

免疫治疗的新时代。(Genetic immunization:a new era in vaccines and immune therapeutics.)美国实验生物学学会联合会杂志(FASEB J),1997.11(10):753-63页]。然而,对于临床上采用DNA疫苗的一个主要障碍是当移动到较大动物身上时平台的免疫原性减小[刘·M.A.(Liu,M.A.)和J.B.·厄尔默(J.B.Ulmer),质粒DNA疫苗的人临床实验。(Human clinical trials of plasmid DNA vaccines.)遗传学进展(Adv Genet),2005.55:25-40页]。

[0019] 在DNA疫苗免疫原的工程方面的最近的技术进步已经改善了DNA疫苗的表达和免疫原性,这些技术如密码子优化、RNA优化和免疫球蛋白前导序列的添加[安德烈·S.(Andre,S.)等,通过用具有优化密码子使用的合成gp120序列进行DNA疫苗接种而引发的增强的免疫反应。(Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage.)病毒学杂志(J Virol),1998.72(2):1497-503页;黛米·L.(Demi,L.)等,密码子使用优化对编码人免疫缺陷病毒1型Gag蛋白的DNA候选疫苗的表达和免疫原性的多重影响。(Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein.)病毒学杂志,2001.75(22):10991-1001页;雷迪·D.J.(Laddy,D.J.)等,新型基于共有序列的DNA疫苗针对禽流感的免疫原性。(Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza.)疫苗(Vaccine),2007.25(16):2984-9页;弗勒兰·L.(Frelin,L.)等,密码子优化和mRNA扩增有效地增强了丙型肝炎病毒非结构性3/4A基因的免疫原性。(Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene.)基因治疗(Gene Ther),2004.11(6):522-33页],以及在质粒递送系统方面的最近开发的技术,如电穿孔[平尾·L.A.(Hirao,L.A.)等,通过电穿孔进行皮内/皮下免疫改进了在猪和恒河猴中质粒疫苗递送和效力。(Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques.)疫苗,2008.26(3):440-8页;拉凯·A.(Luckay,A.)等,质粒DNA疫苗设计和体内电穿孔对在恒河猴中产生的疫苗特异性免疫反应的影响。(Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques.)病毒学杂志,2007.81(10):5257-69页;阿伦·G(Ahlen,G.)等,体内电穿孔通过增加的局部DNA摄取、蛋白质表达、炎症以及CD3+T细胞浸润而增强了丙型肝炎病毒非结构性3/4A DNA的免疫原性。(In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake,protein expression,inflammation,and infiltration of CD3+T cells.)免疫学杂志(J Immunol),2007.179(7):4741-53页]。体内电穿孔技术在人临床试验中已被用来递送抗癌药物如博来霉素并且在很多临床前研究中被用于大量的动物种类上。此外,研究已表明使用共有免疫原与单独的天然抗原相比能够增加细胞免疫反应的广泛性[严·J.(Yan,J.)等,通过工程化的HIV-1B亚型基于共有序列的包膜DNA疫苗引发的增强的细胞免疫反应。(Enhanced cellular immune responses elicited by an engineered HIV-1 subtype B consensus-based envelope DNA vaccine.)细胞治疗(Mol

Ther),2007.15(2):411-21页;罗兰·M.(Rolland,M.)等,祖先的进化系统中心的人免疫缺陷病毒1型蛋白质的重构和功能。(Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins.)病毒学杂志,2007.81(16):8507-14页]。

[0020] 依然存在对编码HBV抗原的核酸构建体和适用于诱导针对HBV的免疫反应的组合物的需要。依然存在对经济而有效的针对HBV的有效疫苗的需要。依然存在对增加中和抗体的水平并引发T细胞组分的有效疫苗的需要。依然存在对针对HBV的有效疫苗,包括针对具有广泛基因型范围的HBV病毒株有效的那些疫苗,并且优选地为全球范围内有效的通用疫苗的需要。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明的一方面包括适用于诱导针对HBV的免疫反应的疫苗。具有针对多种基因型的广泛效力的HBV免疫治疗疫苗的开发可以基于靶向普遍保存的HBV核心特异性抗原,使用针对HBV感染的治疗性DNA疫苗来提供。利用共有的HBV免疫原诱导了更广泛的细胞免疫反应,并且可以适用于使在不同病毒株间的序列相异程度减至最低。

[0023] 本文提供选自由以下组成的组的蛋白质:包含SEQ ID NO:2的蛋白质;与SEQ ID NO:295%同源的蛋白质;SEQ ID NO:2的片段;与SEQ ID NO:2的片段95%同源的蛋白质;SEQ ID NO:4,与SEQ ID NO:495%同源的蛋白质;SEQ ID NO:4的片段;与SEQ ID NO:4的片段95%同源的蛋白质;SEQ ID NO:6,与SEQ ID NO:695%同源的蛋白质;SEQ ID NO:6的片段;以及与SEQ ID NO:6的片段95%同源的蛋白质。

[0024] 还提供包含编码上文所述的一种或多种蛋白质分子的序列的核酸分子。在一些实施方案中,所述核酸分子包含选自由以下组成的组的序列:SEQ ID NO:1;与SEQ ID NO:195%同源的核酸序列;SEQ ID NO:1的片段;与SEQ ID NO:1的片段95%同源的核酸序列;SEQ ID NO:3;与SEQ ID NO:395%同源的核酸序列;SEQ ID NO:3的片段;与SEQ ID NO:3的片段95%同源的核酸序列;SEQ ID NO:5;与SEQ ID NO:595%同源的核酸序列;SEQ ID NO:5的片段;以及与SEQ ID NO:5的片段95%同源的核酸序列。

[0025] 本发明一些方面提供诱导针对来自一种或多种HBV基因型的核心抗原的免疫反应的方法,所述方法包括以下步骤:对个体施用此类核酸分子和/或组合物。

[0026] 本发明另外的方面提供保护个体免受HBV感染的方法。这些方法包括以下步骤:对所述个体施用预防有效量的包含此类核酸序列的核酸分子或组合物;其中所述核酸序列在所述个体的细胞中表达,并且针对由所述核酸序列编码的蛋白质诱导保护性免疫反应。

[0027] 在本发明的一些方面,提供用于治疗已经被HBV感染的个体的方法。这些方法包括以下步骤:对所述个体施用治疗有效量的此类核酸分子和/或组合物。

[0028] 本发明的方面另外涉及包含蛋白质或编码选自由以下组成的组的蛋白质的核酸的疫苗:包含SEQ ID NO:2的蛋白质,与SEQ ID NO:295%同源的蛋白质;SEQ ID NO:2的片段;与SEQ ID NO:2的片段95%同源的蛋白质;SEQ ID NO:4,与SEQ ID NO:495%同源的蛋白质;SEQ ID NO:4的片段;与SEQ ID NO:4的片段95%同源的蛋白质;SEQ ID NO:6,与SEQ ID NO:695%同源的蛋白质;SEQ ID NO:6的片段;以及与SEQ ID NO:6的片段95%同源的蛋白质。所述疫苗可以进一步包含佐剂蛋白或编码佐剂蛋白的核酸序列。在一些实施方案中,所述佐剂是IL-12、IL-15、IL-28或RANTES。

[0029] 包含核酸分子的疫苗可以包含核酸分子，所述核酸分子包含选自由以下组成的组的核酸序列：SEQ ID NO:1；与SEQ ID NO:195%同源的核酸序列；SEQ ID NO:1的片段；与SEQ ID NO:1的片段95%同源的核酸序列；SEQ ID NO:3；与SEQ ID NO:395%同源的核酸序列；SEQID NO:3的片段；与SEQ ID NO:3的片段95%同源的核酸序列；SEQ ID NO:5；与SEQ ID NO:595%同源的核酸序列；SEQ ID NO:5的片段；以及与SEQ ID NO:5的片段95%同源的核酸序列。所述疫苗可进一步包含编码佐剂蛋白的核酸序列。在一些实施方案中，所述佐剂是IL-12、IL-15、IL-28或RANTES。

[0030] 附图简述

[0031] 图1是示出由四个重叠的ORF组成的HBV基因组的结构的示意图。

[0032] 图2A和图2B示出了来自pM Core表达实验的结果。图3A示出了来自体外翻译方案的结果。图3B示出了蛋白质印迹的结果。

[0033] 图3A和图3B示出了来自用pM-Core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠的脾脏的CD8+和CD4+T细胞中增大的IFN-γ分泌的量。

[0034] 图4A和图4B示出了来自用pM-Core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠的脾脏的CD8+和CD4+T细胞中增大的TNF-α分泌的量。

[0035] 图5A和图5B示出了来自用pM-Core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠的脾脏的CD8+和CD4+T细胞中增大的CD 107a分泌的量。

[0036] 图6A和图6B示出了在来自用pM-Core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠的肝脏中的干扰素-γT细胞反应。

[0037] 图7A和图7B示出了在来自用pM-Core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠的肝脏中的肿瘤坏死因子-αT细胞反应。

[0038] 图8示出了来自ELISPOT测定的数据。

[0039] 图9示出了来自实验的数据，所述实验使用CSFE标记的细胞来比较进行疫苗接种和未进行疫苗接种的动物中由CD8 T细胞体内除去体内肽处理的靶细胞。

[0040] 图10示出了用pVax载体(对照)或者用表达HBV M-核心的质粒pMCore处理的CD3+CD4+细胞和CD3+CD8+的增殖百分比的比较。

[0041] 图11A和图11B示出了来自用pVax载体(对照)或者用表达HBVM-核心的质粒pMCore处理的动物的系列稀释的血清中的抗-HBV核心抗体的比较。

[0042] 图12示出了来自CD4+和CD8+脾脏和肝脏细胞中的TNF-a和IFN-g百分比。

[0043] 图13示出了来自通过测量血清中的ALT水平来确定由免疫小鼠所诱导的清除是否影响肝脏的实验中的数据。

[0044] 详述

[0045] 1.定义.

[0046] 本文所用的术语仅仅是出于描述具体实施方案的目的而并不旨在限制。如在说明书和所述权利要求中所使用，除上下文另外明确规定之外，单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数指示物。

[0047] 对于本文所列举的数值范围，明确涵盖了在有相同精密度之间的每个插入的数字。例如，对于6-9的范围，除了6和9外还涵盖数字7和8，并且对于6.0-7.0的范围，明确涵盖了数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9以及7.0。

[0048] a.佐剂

[0049] 如本文所用的“佐剂”意指被添加到本文所述的DNA质粒疫苗中来增强由下文所述的DNA质粒和编码核酸序列的所编码的抗原的免疫原性的任何分子。

[0050] b.抗体

[0051] 如本文所用的“抗体”意指类型IgG、IgM、IgA、IgD或IgE的抗体，或片段、其片段或衍生物，包括Fab、F(ab′)2、Fd以及单链抗体、双链抗体、双特异性抗体、双功能抗体及其衍生物。所述抗体可以是从哺乳动物的血清样本中分离出的抗体、多克隆抗体、亲和纯化抗体或其混合物，所述混合物对所需的表位或从其衍生的序列表现足够的结合特异性。

[0052] c.编码序列

[0053] 如本文所用的“编码序列”或“编码核酸”意指包含编码蛋白质的核苷酸序列的核酸(RNA或DNA分子)。所述编码序列可以进一步包括可操作地连接至调控元件的起始信号和终止信号，所述调控元件包括能够在施用核酸的个体或哺乳动物的细胞中指导表达的启动子和多聚腺苷酸化信号。

[0054] d.互补体

[0055] 如本文所用的“互补体”或“互补”意指核酸可以指在核苷酸或核酸分子的核苷酸类似物之间的沃森-克里克(Watson-Crick)(例如，A-T/U和C-G)或者胡斯坦(Hoogsteen)碱基配对。

[0056] e.共有或共有序列

[0057] 如本文所用的“共有”或“共有序列”意指基于分析特定HBV抗原的一队列的多个亚型的多肽序列。可制备编码共有多肽序列的核酸序列。包含蛋白质的疫苗可以被用来诱导针对特定HBV抗原的多种亚型或血清型的广泛免疫，所述疫苗包含编码这些蛋白质的共有序列和/或核酸分子。

[0058] f.电穿孔

[0059] 如本文可互换使用的“电穿孔”、“电-透化作用”或“电动增强”(“EP”)意指使用跨膜电场脉冲来诱导在生物膜中的微观途径(孔隙)；它们的存在允许生物分子如质粒、寡核苷酸、siRNA、药物、离子以及水从细胞膜的一侧流动到另一侧。

[0060] g.片段

[0061] 如本文所用的相对于核酸序列的“片段”意指编码能够在与全长野生型病毒株HBV抗原交叉反应的哺乳动物中引发免疫反应的多肽的核酸序列或其一部分。所述片段可以是选自编码下文所述的蛋白质片段的各种核苷酸序列的至少一种的DNA片段。

[0062] 就多肽序列来说，“片段”或“免疫原性片段”意指能够在与全长野生型病毒株HBV抗原交叉反应的哺乳动物中引发免疫反应的多肽。共有蛋白的片段可以包含共有蛋白的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一些实施方案中，共有蛋白的片段可以包含共有蛋白的至少20个氨基酸或更多、至少30个氨基酸或更多、至少40个氨基酸或更多、至少50个氨基酸或更多、至少60个氨基酸或更多、至少70个氨基酸或更多、至少80个氨基酸或更多、至少90个氨基酸或更多、至少100个氨基酸或更多、至少110个氨基酸或更多、至少120个氨基酸或更多、至少130个氨基酸或更多、至少140个氨基酸或更多、至少150个氨基酸或更多、至少160个氨基酸或更多、至少170个氨基酸或更多、至少180个氨基酸或更多。

[0063] h.基因构建体

[0064] 如本文所用的术语“基因构建体”是指包含编码蛋白质的核苷酸序列的DNA或RNA分子。所述编码序列包含可操作地连接至调控元件的起始信号和终止信号，所述调控元件包括能够在施用核酸分子的个体的细胞中指导表达的启动子和多聚腺苷酸化信号。如本文所用的术语“表达形式”是指基因构建体，所述基因构建体含有可操作地连接至编码蛋白质的编码序列的必须的调控元件，以使得当存在于所述个体的细胞中时，编码序列将表达。

[0065] i.相同

[0066] 在两种或更多种核酸或多肽序列的情况下，如本文所用的“相同”或“同一性”意指在指定区域中序列具有相同残基的指定百分比。可以通过以下来计算所述百分比：最佳地比对两个序列、在指定区域比较两个序列、确定在两个序列中相同的残基的位置的数量以产生匹配位置的数量、以匹配位置的数量除以在指定区域内的位置的总数量，并且将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。在两个序列具有不同的长度或者比对产生一个或多个交错的末端并且比较的指定区域仅包括单一序列的情况下，单一序列的残基被包括在计算的分母中而不是分子中。当比较DNA和RNA时，胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)可以被认为是等同的。同一性可以手动地或者通过使用计算机序列算法如BLAST或者BLAST 2.0来执行。

[0067] j.免疫反应

[0068] 如本文所用的“免疫反应”意指响应于抗原如HBV共有抗原的引入，宿主的免疫系统(例如哺乳动物的免疫系统)的活化。所述免疫反应可以是细胞反应或体液反应或两者的形式。

[0069] k.核酸

[0070] 如本文所用的“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”意指共价连接在一起的至少两个核苷酸。单链的描述还定义了互补链的序列。因此，核酸还涵盖了所描述的单链的互补链。核酸的很多变体可以被用于与给定的核酸相同的目的。因此，核酸还涵盖了基本上相同的核酸和其互补体。单链提供可以与靶序列在严格的杂交条件下杂交的探针。因此，核酸还涵盖了在严格杂交条件下杂交的探针。

[0071] 核酸可以是单链的或者双链的或可以含有双链或者单链序列两者的部分。所述核酸可以是DNA、基因组和cDNA两者、RNA或杂合体，其中所述核酸可以含有脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的组合，以及包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌啉、肌苷、黄嘌呤次黄嘌呤、异胞嘧啶以及异鸟嘌呤的碱基的组合。核酸可以通过化学合成方法或者通过重组方法来获得。

[0072] l.可操作地连接

[0073] 如本文所用的“可操作地连接”意指基因的表达是在空间上与之连接的启动子的控制下进行的。在其控制下，启动子可以被定位在基因的5′(上游)或者3′(下游)。所述启动子和基因之间的距离可以大约与所述启动子和其在启动子从中衍化的基因中所控制的基因之间的距离相同。如本领域所已知，这个距离的变化可以在没有失去启动子功能的情况下进行调整。

[0074] m.启动子

[0075] 如本文所用的“启动子”意指合成的或自然来源的分子，所述分子能够赋予、活化或增强细胞中的核酸的表达。启动子可包含一个或多个特定的转录调控序列以便进一步增

强表达和/或改变其空间的表达和/或时间的表达。启动子还可以包含远端增强子或阻遏元件，它们可以位于从转录的起始点开始的差不多几千对碱基对处。启动子可以从包括病毒、细菌、真菌、植物、昆虫以及动物的来源中获得。启动子可以相对于其中发生表达的细胞、组织或器官或相对于发生表达的发育阶段或响应于外部刺激如生理应激、病原体、金属离子或诱导剂而基本地或区别地调控基因组分的表达。启动子的代表性实例包括噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、乳糖操纵子-启动子、tac启动子、SV40后期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或者SV40后期启动子以及CMV IE启动子。

[0076] n.信号肽

[0077] “信号肽”和“前导序列”在本文可互换使用并且是指可以被连接在本文所述的HBV蛋白质的氨基末端的氨基酸序列。信号肽/前导序列通常指示蛋白质的位置。本文所用的信号肽/前导序列优选地促进蛋白质从产生其的细胞中分泌。信号肽/前导序列常常从蛋白质的剩余部分裂解，所述蛋白质在从细胞分泌后经常被称为成熟蛋白质。信号肽/前导序列连接在所述蛋白质的N端。如本文所提到的关于将信号肽或前导序列连接至蛋白质的N端，信号肽/前导序列替换由核酸序列的起始密码子编码的蛋白质的N端的蛋氨酸，而不是在没有信号肽编码序列的情况下编码所述蛋白质。因此例如，SEQ ID NO:4是带有连接在SEQ ID NO:2的N端信号肽/前导序列的SEQ ID NO:2，即SEQ ID NO:4是包含连接至SEQ ID NO:2的N端的信号肽的蛋白质。在SEQ ID NO:2中的第一残基“Xaa”不存在信号肽时通常是蛋氨酸。然而，包含连接至SEQ ID NO:2的信号肽的蛋白质如SEQ ID NO:4以将信号肽连接至所述蛋白质的残基替换在Xaa处的残基1蛋氨酸。因此，SEQ ID NO:2的N端残基可以是任何氨基酸，但是如果它由起始序列编码的则它是蛋氨酸。信号肽/前导序列连接在SEQ ID NO:2的N端通常消除了N端蛋氨酸。如本文所用的，希望SEQ ID NO:4包含带有连接在SEQ ID NO:2的N端处的信号肽/前导序列的SEQ ID NO:2，尽管除去了SEQ ID NO:2的N段Xaa残基。相似地，SEQ ID NO:4的编码序列包括SEQ ID NO:2的编码序列和连接至编码SEQ ID NO:2的编码序列的5’端的信号肽/前导序列的编码序列。在SEQ ID NO:2的编码序列中起始密码子可以是“nnn”，但是当信号肽/前导序列的编码序列连接至编码SEQ ID NO:2的编码序列的5’端时，其被消除。如本文所用的，希望SEQ ID NO:4的编码序列包含SEQ ID NO:2的编码序列和连接在出现nnn的SEQ ID NO:2的编码序列的5’端的信号肽/前导序列的编码序列。因此，例如，希望SEQ ID NO:3包含SEQ ID NO:1和连接在SEQ ID NO:1的5’端的信号肽/前导序列的编码序列，代替nnn。在一些实施方案中，nnn是在SEQ ID NO:1的5’端的起始密码子。

[0078] o.严格的杂交条件

[0079] 如本文所用的“严格的杂交条件”意指这样的条件，即在所述条件下如在核酸的复杂混合物中第一核酸序列(例如，探针)将与第二核酸序列(例如，靶标)进行杂交。严格的条件是序列依赖性的并且在不同的环境中将是不同的。严格的条件在限定的离子强度pH下可以被选择为比特定序列的热力学熔点(T_m)低约5-10℃。所述T_m可以是这样的温度(在限定的离子强度、pH以及核酸浓度下)，在所述温度下与靶标互补的50%的探针与靶序列在平衡状态下进行杂交(因为靶序列过量存在，在T_m下，50%的探针在平衡状态下被占用)。严格条件可以是那些条件，即其中盐浓度小于约1.0M的钠离子，如在pH 7.0至8.3下约0.01-1.0M的钠离子浓度(或其它盐)，并且温度对于短的探针(例如，约10-50个核苷酸)为至少约30℃且

对于长的探针(例如,大于约50个核苷酸)为至少约60℃。严格的条件还可以通过添加去稳定剂如甲酰胺来实现。对于选择的或特定的杂交,阳性信号可以是背景杂交的至少2至10倍。示例性的严格的杂交条件包括以下:50%甲酰胺、5x SSC以及1%SDS、在42℃下孵育,或者5x SSC、1%SDS、在65℃下孵育、在65℃下用0.2x SSC和0.1%SDS洗涤。

[0080] p.基本上互补

[0081] 如本文所用的"基本上互补"意指第一序列在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、180、270、360、450、540或更多个核苷酸或氨基酸的区域内与第二序列的互补体至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同,或者意指两个序列在严格的杂交条件下进行杂交。

[0082] q.基本上相同

[0083] 如本文所用的"基本上相同"意指第一序列和第二序列在8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、180、270、360、450、540或更多个核苷酸或氨基酸区域内是至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%相同的,或者就核酸而言,如果第一序列与第二序列的互补体基本上互补,则第一序列和第二序列也这样相同。

[0084] r.亚型或血清型

[0085] "亚型"或"血清型":如本文交换使用的并且关于HBV,意指HBV的基因变体,以使得一个亚型被免疫系统识别而从不同的亚型中分离。

[0086] s.变体

[0087] 本文就核酸而言所用的"变体"意指(i)参考核苷酸序列的一部分或片段;(ii)参考核苷酸序列或其部分的互补体;(iii)与参考核酸或其互补体基本上相同的核酸;或者(iv)在严格的条件下与参考核酸、其互补体或与其基本上相同的序列杂交的核酸。

[0088] 就肽或多肽而言的"变体"通过氨基酸的插入、缺失或保守性取代而在氨基酸序列上不同,但是保留至少一种生物活性。变体还意指具有与参考蛋白质基本上相同的氨基酸序列的蛋白质,所述参考蛋白质具有保留至少一种生物活性的氨基酸序列。氨基酸的保守性取代,即以相似特性(例如,亲水性、带电区域的程度和分布)的不同氨基酸来替换氨基酸,在本领域中被认为通常涉及微小变化。如本领域所理解的,这些微小变化可以部分通过考虑氨基酸的亲疏水性指数来识别。凯特(Kyte)等,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)157:105-132(1982)。所述氨基酸的亲疏水性指数是基于其疏水性和电荷的考虑。本领域已知的是相似的亲疏水性指数的氨基酸可以被取代并仍然保留蛋白质功能。在一个方面,亲疏水性指数为±2的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性还可以被用来揭示会产生保留生物功能的蛋白质的取代。在肽的情形下考虑氨基酸的亲水性允许计算所述肽最大的局部平均亲水性,这是已经被报道来与抗原性和免疫原性良好关联的有用测量。美国专利号4,554,101以引用方式全部并入本文。如本领域所了解的,具有相似亲水性值的氨基酸的取代可以产生保留生物活性(例如免疫原性)的肽。可用具有彼此在±2内的亲水性值的氨基酸进行取代。氨基酸的亲疏水性指数和亲水性值两者都受所述氨基酸的特定侧链影响。与所述观察一致的是,与生物功能相容的氨基酸取代被理解为取决于这些氨基酸相对的相似性,并且特别是那些氨基酸的侧链,如通过疏水性、亲水性、电荷、大小以及其它特性所揭示的。

[0089] t.载体

[0090] 如本文所用的“载体”意指含有复制起点的核酸序列。载体可以是病毒载体、噬菌体、细菌人工染色体或酵母人工染色体。载体可以是DNA或RNA载体。载体可以是自我复制的染色体外载体，并优选地是DNA质粒。

[0091] 2.HBV核心抗原

[0092] HBV核心抗原代表通过诱导1)细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应、2)T辅助细胞反应以及/或3)B细胞反应或者优选地上述所有的免疫介导的病毒清除的重要靶标，来用于交叉呈递。

[0093] 表2示出了来自HBV-A、HBV-B、HBV-C、HBV-D和HBV-E基因型的带有共有HBV核心蛋白的核心抗原的基因型之间的相似性，所述核心抗原在图表中被称为“HBV-M-核心”。对于一些实施方案，HBV M核心构建体被设计为具有对广泛的HBV核心靶标的增加的同源性。具有所设计M-核心构建体的核心抗原的基因型之间的相似性-增加了对广泛HBV核心靶标的同源性。所有的基因型应该以HBV的通用免疫治疗疫苗来代表。

[0094] 表2

[0095]

同一性百分比								
分散度								
	1		96.2	96.2	97.8	95.6	98.4	1-HBV-A-Con核心
	2	3.9		100	95.6	93.4	96.7	2-HBV-B-Con核心
	3	3.9	0		95.6	93.4	96.7	3-HBV-C-Con核心

[0096]

4	2.2	4.5	4.5		97.8	97.8	4-HBV-D-Con核心
5	4.5	6.9	6.9	2.2		95.6	5-HBV-E-Con核心
6	1.7	3.4	3.4	2.2	4.5		6-HBV-M-核心
	1	2	3	4	5	6	

[0097] 本文提供能够在哺乳动物中引发针对一种或多种HBV血清型的免疫反应的抗原。所述抗原可以包含使它们特别有效地作为免疫原的核心蛋白表位，可针对所述免疫原诱导抗-HBV免疫反应。HBV抗原可以包括全长翻译产物、其变体、其片段或其组合。

[0098] 提供了共有HBV核心蛋白(SEQ ID NO:2)。产生在HBV核心蛋白共有序列的N端包含IgE前导序列的氨基酸序列。因此，还提供了具有连接至共有HBV核心蛋白(SEQ ID NO:2)的IgE前导序列(SEQ ID NO:7)蛋白质，以便提供IgE前导序列-共有HBV核心蛋白(SEQ ID NO:

4)。提供的一些实施方案还包括连接在HBV核心蛋白共有序列的C端的HA标记(SEQ ID NO:8)。因此,提供了HBV核心蛋白共有蛋白(SEQ ID NO:6),所述共有蛋白包含连接到HBV核心蛋白共有序列(SEQ ID NO:2)的IgE前导序列(SEQ ID NO:7)和连接到HBV核心蛋白共有序列的C端的HA标记(SEQ ID NO:8)。

[0099] 蛋白质可以与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4以及SEQ ID NO:6同源。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列具有95%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列具有96%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列具有97%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列具有98%同源性的免疫原性蛋白质。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列具有99%同源性的免疫原性蛋白质。

[0100] 在一些实施方案中,所述蛋白质没有前导序列。在一些实施方案中,所述蛋白质没有IgE前导序列。共有蛋白的片段可以包含共有蛋白的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%。可以提供SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4以及SEQ ID NO:6的免疫原性片段。免疫原性片段可以包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%。在一些实施方案中,片段包含前导序列,例如免疫球蛋白前导序列,如IgE前导序列。在一些实施方案中,片段没有前导序列。在一些实施方案中,片段没有前导序列,即IgE前导序列。

[0101] 可以提供具有与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4以及SEQ ID NO:6的免疫原性片段同源的氨基酸序列的蛋白质的免疫原性片段。此类免疫原性片段可以包含与S SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:695%同源的蛋白质的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或至少55%至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列的免疫原性片段具有96%同源性的免疫原性片段。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列的免疫原性片段具有97%同源性的免疫原性片段。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列的免疫原性片段具有98%同源性的免疫原性片段。一些实施方案涉及与本文的共有蛋白序列的免疫原性片段具有99%同源性的免疫原性片段。在一些实施方案中,片段包含前导序列,例如免疫球蛋白前导序列,如IgE前导序列。在一些实施方案中,片段没有前导序列。在一些实施方案中,片段没有前导序列,即IgE前导序列。

[0102] 3.基因序列、构建体以及质粒

[0103] 可以按常规产生编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:6以及同源蛋白质、免疫原性片段以及同源蛋白质的免疫原性片段的核酸序列。因此,可以提供编码与共有序列具有高达95%同源性、与共有序列高达96%同源性、与共有序列高达96%同源性、与共有序列高达97%同源性、与共有序列达高98%同源性以及与共有序列高达99%同源性的免疫原性蛋白质的核酸分子。同样地,还提供了编码本文所述的免疫原性片段和与本文所述的蛋白质同源的蛋白质的免疫原性片段的核酸序列。

[0104] 产生编码共有氨基酸序列的核酸分子。疫苗可以包含编码一种或多种共有形式的

免疫原性蛋白质的一种或多种核酸序列，所述免疫原性蛋白质选自产生来优化在人中的稳定性和表达的序列的这个组。编码HBV核心蛋白共有蛋白(SEQ ID NO:2)的核酸序列(SEQ ID NO:1)、编码IgE前导序列-HBV核心蛋白共有蛋白(SEQ ID NO:4)的核酸序列(SEQ ID NO:3)以及编码IgE前导序列-HBV核心蛋白共有蛋白-HA标记(SEQ ID NO:6)的核酸序列(SEQ ID NO:5)。一些实施方案涉及编码免疫原性蛋白质的与本文核酸编码序列具有95%同源性的核酸分子。一些实施方案涉及编码免疫原性蛋白质的与本文核酸编码序列具有96%同源性的核酸分子。一些实施方案涉及编码免疫原性蛋白质的与本文核酸编码序列具有97%同源性的核酸分子。一些实施方案涉及编码免疫原性蛋白质的与本文核酸编码序列具有98%同源性的核酸分子。一些实施方案涉及编码免疫原性蛋白质的与本文核酸编码序列具有99%同源性的核酸分子。在一些实施方案中，具有与本文所公开的共有蛋白的编码序列同源的本文所公开的编码序列的核酸分子包含编码IgE前导序列的连接至编码本文所公开的同源蛋白质序列的编码序列的5'端的序列。

[0105] 在一些实施方案中，所述核酸序列没有编码前导序列的编码序列。在一些实施方案中，所述核酸序列没有编码IgE前导序列的编码序列。

[0106] 一些实施方案涉及SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5的片段。片段可以是SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%或至少55%至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%。片段可以与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:5的片段至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或者至少99%同源。在一些实施方案中，片段包含编码前导序列的序列，例如免疫球蛋白前导序列，如IgE前导序列。在一些实施方案中，片段没有编码前导序列的编码序列。在一些实施方案中，片段没有编码前导序列，即IgE前导序列的编码序列。

[0107] 本文提供可以包含编码本文所公开的HBV核心抗原的核酸序列的基因构建体，所述核心抗原包括共有蛋白序列、与共有蛋白序列同源的序列、共有蛋白序列的片段以及与共有蛋白序列的片段同源的序列。所述基因构建体可以作为功能性染色体外的分子而存在。所述基因构建体可以是包括着丝粒、端粒或质粒或粘粒的线性微型染色体。

[0108] 所述基因构建体还可以是重组病毒载体的基因组的一部分，所述重组病毒载体包括重组腺病毒、重组腺病毒伴随病毒以及重组牛痘。基因构建体可以是在减毒的活微生物或活在细胞中的重组微生物载体中的遗传物质的部分。

[0109] 基因构建体可以包含用于核酸的编码序列的基因表达的调控元件。调控元件可以是启动子、增强子、起始密码子、终止密码子或多聚腺苷酸化信号。

[0110] 核酸序列可组成可以是载体的基因构建体。所述载体能够以在哺乳动物中有效引发免疫反应的量在哺乳动物的细胞中表达抗原。所+述载体可以是重组体。所述载体可以包含编码抗原的异源核酸。所述载体可以是质粒。所述载体可以适用于用编码抗原的核酸来转染细胞，所述转化的宿主细胞在其中发生抗原表达的条件下培养并维持。

[0111] 编码序列可以被优化来用于表达的稳定性和高水平。在一些情况下，选择密码子来减少RNA二级结构的形成，如由于分子内键而形成的二级结构。

[0112] 所述载体可以包含编码抗原的异源核酸，并且可以进一步包含可以在抗原编码序列的上游的起始密码子和可以在抗原编码序列的下游的终止密码子。起始密码子和终止密

码子可以与抗原编码序列在框中。所述载体还包含可操作地连接至抗原编码序列的启动子。可操作地连接至抗原编码序列的启动子可以是来自猿猴病毒40(SV40)的启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、人免疫缺陷病毒(HIV)启动子如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复(LTR)启动子、莫洛尼(Moloney)病毒启动子、鸟类白血病病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子如CMV立即早期启动子、爱巴二氏(Epstein Barr)病毒(EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子。所述启动子还可以是来自人基因的启动子，所述人基因如人肌动蛋白、人肌凝蛋白、人血红素、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白。所述启动子还可以是组织特异性启动子，如天然或合成的肌肉或皮肤特异性启动子。这些启动子的实例在美国专利申请公布号US20040175727中进行描述，所述申请公布的整体内容被并入本文中。

[0113] 所述载体还可以包含多聚腺苷酸化信号，所述多聚腺苷酸化信号可以在HBV核心蛋白编码序列的下游。所述多聚腺苷酸化信号可以是SV40多聚腺苷酸化信号、LTR多聚腺苷酸化信号、牛生长激素(bGH)多聚腺苷酸化信号、人生长激素(hGH)多聚腺苷酸化信号或人β-球蛋白多聚腺苷酸化信号。所述SV40多聚腺苷酸化信号可以是来自pCEP4载体(英杰公司(Invitrogen)，圣地亚哥(San Diego)，加利福尼亚州(CA))的多聚腺苷酸化信号。

[0114] 所述载体还可以包含在共有HBV核心蛋白编码序列上游的增强子。所述增强子对于DNA表达是必须的。所述增强子可以是人肌动蛋白、人肌凝蛋白、人血红素、人肌肉肌酸或病毒增强子，如来自CMV、HA、RSV或者EBV的一种增强子。多聚核苷酸功能增强子被描述在美国专利号5,593,972、5,962,428以及WO94/016737中，每个专利的全部内容以引用方式并入本文。

[0115] 载体还可以包含哺乳动物的复制起点，以便将载体维持在染色体外并在细胞中产生载体的多个拷贝。所述载体可以是来自英杰公司(圣地亚哥，加利福尼亚州)的pVAX1、pCEP4或者pREP4，其可以包含爱巴二氏病毒的复制起点和核抗原EBNA-1编码区域，这可以在没有整合的情况下产生高拷贝附加型复制。所述载体可以是具有变化的pVAX1或者pVax1变体，如本文所述的变体质粒。所述变体pVax1质粒是主链载体质粒pVAX1(英杰公司，卡尔斯巴德(Carlsbad)，加利福尼亚州)的2998碱基对变体。所述CMV启动子位于碱基137-724处。T7启动子/引发位点位于碱基664-683处。多克隆位点位于碱基696-811处。牛GH多聚腺苷酸化信号是在碱基829-1053处。卡那霉素(Kanamycin)抗性基因是在碱基1226-2020处。pUC起点是在碱基2320-2993处。

[0116] 基于可从英杰公司获得的pVAX1的序列，在被用作本文所述的质粒1-6的主链的pVAX1的序列中发现以下突变：

[0117]

C>G	241	在CMV启动子中
C>T	1942	主链，在牛生长激素多聚腺苷酸化信号(bGHpolyA)的下游
A>-	2876	主链，在卡那霉素基因的下游
C>T	3277	在高拷贝数突变的pUC复制起

点(Ori)中(参见核酸研究 1985(Nucleic Acid Research 1985))

[0118] G>C 3753 在RNA酶H位点上游的pUC Ori的最末端中

在CMV启动子上游的主链上碱基对2、3和4从ACT变为CTG。

[0119] 所述载体的主链可以是pAV0242。所述载体可以是复制缺陷5型腺病毒(Ad5)载体。

[0120] 所述载体还可以包含调控序列,所述调控序列可以非常适合在施用所述载体的哺乳动物或人细胞中的基因表达。共有HBV编码序列可以包含密码子,所述密码子可以允许在宿主细胞中更有效地转录编码序列。

[0121] 所述载体可以是pSE420(英杰公司,圣地亚哥,加利福尼亚州(Calif.)),其可用于在大肠杆菌(Escherichia coli)(E.coli)中产生蛋白质。所述载体可以是pYES2(英杰公司,圣地亚哥,加利福尼亚州),其可用于在酵母的酿酒酵母菌株(Saccharomyces cerevisiae strains)中产生蛋白质。所述载体还可以具有MAXBAC™完整的杆状病毒表达系统(英杰公司,圣地亚哥,加利福尼亚州),其可用于在昆虫细胞中产生蛋白质。所述载体还可以是pcDNA I或者pcDNA3(英杰公司,圣地亚哥,加利福尼亚州),其可用于在哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生蛋白质。所述载体可以是通过常规技术和容易可得的起始物质来产生蛋白质的表达载体或系统,所述技术和物质包括萨姆布鲁克(Sambrook)等,分子克隆和实验室手册(Molecular Cloning and Laboratory Manual),第二版,冷泉巷实验室(Cold Spring Harbor)(1989),其以引用方式全部并入本文。

[0122] 4.药物组合物

[0123] 本文提供根据本发明的药物组合物,所述组合物包含约1纳克至约10mg的DNA。在一些实施方案中,根据本发明的药物组合物包含在以下之间:1)至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100纳克或至少1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、890、895.900、905、910、915、920、925、930、935、940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、990、995或1000微克或至少1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10mg或更多;以及2)多达并包括15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100纳克,或多达并包括1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、

120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490、495、500、605、610、615、620、625、630、635、640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、890、895.900、905、910、915、920、925、930、935、940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、990、995或1000微克，或多达并包括1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10mg。在一些实施方案中，根据本发明的药物组合物包含约5纳克至约10mg的DNA。在一些实施方案中，根据本发明的药物组合物包含约25纳克至约5毫克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约50纳克至约1毫克的DNA.在一些实施方案中，所述药物组合物含有约0.1微克至约500微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约1微克至约350微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约5微克至约250微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约10微克至约200微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约15微克至约150微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约20微克至约100微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约25微克至约75微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约30微克至约50微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约35微克至约40微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物含有约100微克至约200微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物包含约10微克至约100微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物包含约20微克至约80微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物包含约25微克至约60微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物包含约30纳克至约50微克的DNA。在一些实施方案中，所述药物组合物包含约35纳克至约45微克的DNA。在一些优选的实施方案中，所述药物组合物含有约0.1微克至约500微克的DNA。在一些优选的实施方案中，所述药物组合物含有约1微克至约350微克的DNA。在一些优选的实施方案中，所述药物组合物含有约25微克至约250微克的DNA。在一些优选的实施方案中，所述药物组合物含有约100微克至约200微克的DNA。

[0124] 根据本发明的药物组合物根据待使用的施用方式来配制。在药物组合物是可注射的药物组合物的情况下，它们是无菌、无热原以及无颗粒的。优选使用等渗制剂。通常，等渗的添加剂可包括氯化钠、葡萄糖、甘露醇、山梨醇和乳糖。在一些情况下，优选等渗溶液如磷酸盐缓冲盐水。稳定剂包括明胶和白蛋白。在一些实施方案中，将血管收缩剂添加到制剂中。

[0125] 优选地，所述药物组合物是疫苗，并且更优选地是DNA疫苗。

[0126] 本文提供能够在哺乳动物中产生针对HBV的一种或多种基因型的免疫反应的疫苗。所述疫苗可包括如上文所讨论的基因构建体。

[0127] 虽然未受到科学理论的束缚，但疫苗可用于引发广泛针对HBV的一种或多种基因型的免疫反应(体液免疫、细胞免疫或二者)。疫苗可包含共有HBV核心蛋白序列(SEQ ID NO:2)的编码序列；连接至共有HBV核心蛋白序列(SEQ ID NO:4)的IgE前导序列；以及连接至共有HBV核心蛋白的IgE前导序列，所述核心蛋白连接至HA标记序列(SEQ ID NO:6)。疫苗

可包含共有HBV核心蛋白序列(SEQ ID NO:2)的特异编码序列如(SEQ ID NO:1);连接至共有HBV核心蛋白序列(SEQ ID NO:4)的IgE前导序列如(SEQ ID NO:3);以及连接至共有HBV核心蛋白的IgE前导序列如(SEQ ID NO:5),所述核心蛋白连接至HA标记序列(SEQ ID NO:6)。

[0128] 一些替代实施方案包括包含编码以下的核酸序列的那些:共有HBV核心蛋白的免疫原性片段、与共有HBV核心蛋白同源的一种或多种蛋白质以及与共有HBV核心蛋白同源的一种或多种蛋白质的免疫原性片段。

[0129] 一些实施方案提供产生针对HBV核心蛋白的免疫反应的方法,所述方法包括对个体施用本文所述的一种或多种组合物。一些实施方案提供预防性地针对HBV感染对个体进行疫苗接种的方法,所述方法包括施用本文所述的一种或多种组合物。一些实施方案提供治疗性地对已感染HBV的个体进行疫苗接种的方法,所述方法包括施用本文所述的一种或多种组合物。在施用之前可以常规地完成HBV感染的诊断。

[0130] 所述疫苗可以是DNA疫苗。所述DNA疫苗可以包含多种相同或不同的质粒,所述质粒包含编码共有HBV核心蛋白的核酸序列。

[0131] DNA疫苗公开在美国专利号5,593,972、5,739,118、5,817,637、5,830,876、5,962,428、5,981,505、5,580,859、5,703,055以及5,676,594中,所述美国专利以引用方式全部并入本文中。所述DNA疫苗可以进一步包含阻止其整合到染色体中的元素或试剂。所述疫苗可以是HBV核心蛋白的RNA。所述RNA疫苗可以被引入到细胞中。

[0132] 所述疫苗可以是包含上文所述的基因构建体或抗原的重组疫苗。所述疫苗还可以包含呈一个或多个蛋白质亚单位形式的一种或多种共有HBV核心蛋白、包含一种或多种共有HBV核心蛋白的一种或多种被杀死的病毒颗粒或包含一种或多种共有HBV核心蛋白的减毒病毒颗粒。所述减毒的疫苗可以是减毒的活疫苗、被杀死的疫苗或使用重组载体来递送外源基因的疫苗以及亚单位疫苗和糖蛋白疫苗,所述外源基因编码一种或多种共有HBV核心蛋白。减毒活疫苗、使用重组载体来递送外源抗原的那些疫苗、亚单位疫苗和糖蛋白疫苗的实例描述在美国专利号:4,510,245;4,797,368;4,722,848;4,790,987;4,920,209;5,017,487;5,077,044;5,110,587;5,112,749;5,174,993;5,223,424;5,225,336;5,240,703;5,242,829;5,294,441;5,294,548;5,310,668;5,387,744;5,389,368;5,424,065;5,451,499;5,453,364;5,462,734;5,470,734;5,474,935;5,482,713;5,591,439;5,643,579;5,650,309;5,698,202;5,955,088;6,034,298;6,042,836;6,156,319和6,589,529中,它们中的每一个都以引用方式并入本文。

[0133] 所述疫苗可以包含针对来自世界上多个特定地区的多个HBV基因型的载体和/或蛋白质。所提供的疫苗可用于诱导免疫反应,所述免疫反应包括治性疗或预防性的免疫反应。可以产生针对共有HBV核心蛋白的且还广泛跨越HBV病毒的多种基因型的抗体和/或杀伤T细胞。此类抗体和细胞可以被分离。

[0134] 所述疫苗可以进一步包含药学上可接受的赋形剂。所述药学上可接受的赋形剂可以是作为媒介物、佐剂、载体(carrier)或稀释剂的功能分子。所述药学上可接受的赋形剂可以是转染促进剂,其可包括表面活性剂如免疫刺激复合物(ISCOMS)、费氏(Freunds)不完全佐剂、LPS类似物(包括单磷酰脂A)、胞壁肽、苯醌类似物、囊泡如角鲨烯和角鲨烯、透明质酸、脂质、脂质体、钙离子、病毒蛋白质、聚阴离子、聚阳离子或纳米粒子或其它已知的转染

促进剂。

[0135] 所述转染促进剂是聚阴离子、聚阳离子(包括聚-L-谷氨酸(LGS))或脂质。所述转染促进剂是聚-L-谷氨酸,并且更优选地,所述聚-L-谷氨酸以小于6mg/ml的浓度存在于疫苗。所述转染促进剂还可以包括表面活性剂如免疫刺激复合物(ISCOMS)、费氏不完全佐剂、LPS类似物(包括单磷酰酯A)、胞壁肽、苯醌类似物和囊泡如角鲨烯和角鲨烯,并且透明质酸还可以用来与所述基因构建体一起施用。在一些实施方案中,所述DNA载体疫苗还可以包括转染促进剂如脂质、脂质体(包括卵磷脂脂质体或本领域已知的其它脂质体(如DNA-脂质体混合物(参见例如W09324640)))、钙离子、病毒蛋白质、聚阴离子、聚阳离子或纳米粒子或其它已知的转染促进剂。优选地,所述转染促进剂是聚阴离子、聚阳离子(包括聚-L-谷氨酸(LGS))或脂质。转染剂在所述疫苗中的浓度为小于4mg/ml、小于2mg/ml、小于1mg/ml、小于0.750mg/ml、小于0.500mg/ml、小于0.250mg/ml、小于0.100mg/ml、小于0.050mg/ml或小于0.010mg/ml。

[0136] 所述药学上可接受的赋形剂可以是佐剂。所述佐剂可以是在替代的质粒中表达或作为蛋白质与在疫苗中的以上质粒组合而被递送的其它基因。所述佐剂可以选自由以下组成的组:α-干扰素(IFN-α)、β-干扰素(IFN-β)、γ-干扰素、血小板衍化生长因子(PDGF)、TNFα、TNFβ、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、皮肤的T细胞吸引趋化因子(CTACK)、上皮胸腺表达趋化因子(TECK)、粘膜有关的上皮趋化因子(MEC)、IL-12、IL-15、MHC、CD80、CD86(包括缺失信号序列并任选包括来自IgE的信号肽的IL-15)。所述佐剂可以是IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、血小板衍化生长因子(PDGF)、TNFα、TNFβ、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18或其组合。

[0137] 可以是适用的佐剂的其它基因包括编码以下的那些基因:MCP-1、MIP-1a、MIP-1p、IL-8、RANTES、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、半胱天冬酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Re1、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、失活NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素反应基因、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配体、Ox40、Ox40配体、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2以及其功能片段。

[0138] 5.递送的方法

[0139] 本文提供用于递送药物制剂、优选疫苗的方法,以用于提供包含表位的HBV核心蛋白的基因构建体和蛋白质,所述表位使它们成为特别有效的免疫原,针对所述免疫原可诱导对HBV病毒感染的免疫反应。递送所述疫苗或疫苗接种的方法可以被提供来诱导治疗性和/或预防性免疫反应。所述疫苗接种过程可以在哺乳动物中产生针对多种HBV基因型的免疫反应。所述疫苗可以被递送至个体以便调整哺乳动物的免疫系统的活动并增强免疫反应。所述疫苗的递送可以是作为核酸分子的HA抗原的转染,所述核酸分子表达在细胞中并被递送到细胞的表面,在细胞表面上免疫系统识别并诱导细胞免疫、体液免疫或细胞和体液免疫。疫苗的递送可用于通过对哺乳动物施用如本文所讨论的疫苗而在哺乳动物中诱导或引发针对多种HBV病毒的免疫反应。

[0140] 在将所述疫苗递送给所述哺乳动物并因此将所述载体递送到哺乳动物的细胞中后，转染的细胞将表达并分泌共有HBV核心蛋白。这些分泌的蛋白质或合成抗原将作为外源物质而被免疫系统识别，这将进行可以包括以下的免疫反应：生成针对所述抗原的抗体和特异性针对所述抗原的T细胞反应。在一些实施方案中，用本文所讨论的疫苗接种的哺乳动物将具有引发的免疫系统，并且在被HBV病毒株激发时，引发的免疫系统将允许通过体液免疫、细胞免疫或两者来快速清除随后的HBV病毒。所述疫苗可以被递送至个体以便调整个体的免疫系统的活动，从而增强免疫反应。

[0141] 所述疫苗可以DNA疫苗的形式被递送并且递送DNA疫苗的方法描述在美国专利号4,945,050和5,036,006，两者都以引用方式全部并入本文。

[0142] 所述疫苗可以施用至哺乳动物以在哺乳动物中引发免疫反应。所述哺乳动物可以是人、非人灵长类、母牛、猪、绵羊、山羊、羚羊、野牛、水牛、牛科动物、鹿、刺猬、象、骆驼、羊驼、小鼠、大鼠或鸡，并且优选为人、母牛、猪或鸡。

[0143] a.组合治疗

[0144] 所述药物组合物、优选本文所述的疫苗可以与蛋白质或编码佐剂的基因组合来施用，所述佐剂可以包括：α-干扰素(IFN-α)、β-干扰素(IFN-β)、γ-干扰素、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、血小板衍化生长因子(PDGF)、TNFα、TNFβ、GM-CSF、表皮生长因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、MCP-1、MIP-1a、MIP-1p、IL-8、RANTES、L-选择素、P-选择素、E-选择素、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18的突变形式、CD40、CD40L、血管生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-7、神经生长因子、血管内皮生长因子、Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、半胱天冬酶ICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、失活NIK、SAP K、SAP-1、JNK、干扰素反应基因、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK配体、Ox40、Ox40配体、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1或TAP2或其功能片段。

[0145] b.施用途径

[0146] 所述疫苗可以通过不同的途径来施用，所述途径包括口服、胃肠外、舌下、经皮、经直肠、粘膜、局部地、经由吸入、经由颊施用、胸腔内、静脉内、动脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、鼻囊内以及关节内或其组合。对于兽医使用，所述组合可以根据标准的兽医规范而作为适当可接受制剂来施用。兽医可以轻易地确定最适合于特定动物的给药方案和施用途径。所述疫苗可以通过传统的注射器、无针注射设备、“微粒轰击枪”或其它物理方法如电穿孔(“EP”)、“流体动力学方法”或超声波来施用。

[0147] 疫苗的载体可以通过若干熟知的技术来递送至哺乳动物，所述技术包括在有和没有体内电穿孔、脂质体介导的纳米颗粒促进的重组载体情况下的DNA注射(也被称为DNA疫苗接种)，所述重组载体如重组腺病毒、重组腺病毒伴随病毒以及重组牛痘。所述HBV抗原可以可以经由DNA注射并随同体内的电穿孔一起而被递送。

[0148] c.电穿孔

[0149] 经由疫苗的质粒的电穿孔而施用所述疫苗可以使用电穿孔设备来完成，所述电穿孔设备被配置来对所需的哺乳动物组织递送在细胞膜中有效形成可逆的细孔的脉冲能量，

并且优选地所述脉冲能量是与使用者输入的预先设定的电流相似的恒定电流。所述电穿孔设备可以包括电穿孔部件和电极组件或手柄组件。电穿孔部件可以包括且并入电穿孔设备的各种元件中的一种或多种，其包括：控制器，电流波形发生器、阻抗测定仪、波形记录器、输入元件、状态报告元件、通信端口、存储部件、电源以及电源开关。电穿孔可以使用体内电穿孔设备例如CELLECTRA®EP系统(因诺维制药有限公司(Inovio Pharmaceuticals, Inc.)，蓝铃市(Blue Bell)，宾尼法尼亚州(PA))或者Elgen电穿孔仪(因诺维制药有限公司)来促进质粒转染细胞而完成。

[0150] 可以促进本发明的DNA疫苗的递送的电穿孔设备和电穿孔方法的实例包括在德拉吉亚-奥克利(Draghia-Akli)等的美国专利号7,245,963、由史密斯(Smith)等提交的美国专利公开2005/0052630中描述的那些，它们的内容以引用方式整体并入本文。可以用于促进DNA疫苗的递送的其它电穿孔设备和电穿孔方法包括在2007年10月17日提交的共同待决的和共同拥有的美国专利公开序列号11/874072中所提供的那些，所述专利公开根据美国法典第35篇第119条第(e)款要求2006年10月17日提交的美国临时申请序列号60/852,149和2007年10月10日提交的美国临时申请序列号60/978,982的权益，它们所有都整体并入本文。

[0151] 德拉吉亚-奥克利等的美国专利号7,245,963描述了模块化电极系统以及它们用于促进将生物分子引入到身体或植物中所选定组织的细胞中的使用。所述模块化电极系统可以包括多个针电极；皮下注射针；提供从可编程的恒定电流脉冲控制器到多个针电极的传导性连接的电连接器；以及电源。操作者可以抓住固定在支撑结构上的多个针电极并将它们坚固地插入到身体或植物中所选定的组织中。然后经由皮下注射针将生物分子递送到所选定的组织中。启动可编程的恒定电流脉冲控制器，并将恒定电流电脉冲应用到多个针电极中。所应用的恒定电流电脉冲促进将生物分子引入到多个电极之间的细胞中。美国专利号7,245,963的全部内容以引用方式并入本文中。

[0152] 史密斯等提交的美国专利公开2005/0052630描述了可用于有效地促进将生物分子引入到身体或植物中选定组织的细胞中的电穿孔设备。所述电穿孔设备包括其操作由软件或固件来规定的电动力学设备(“EKD设备”)。所述EKD设备基于使用者控制和脉冲参数的输入而在一个阵列的电极之间产生一系列的可编程的恒定电流脉冲模式，并允许电流波形数据的存储和获得。所述电穿孔设备还包括具有一排针电极的可替换的电极圆盘、用于注射针的中央注射通道以及可移动的导向盘。美国专利公开2005/0052630的全部内容以引用方式并入本文中。

[0153] 在美国专利号7,245,963和美国专利公开2005/0052630中描述的电极阵列和方法可以被适配来用于不仅深入穿透到组织如肌肉中，而且深入穿透到其它组织或器官中。由于电极阵列的配置，注射针(以递送选择的生物分子)也被完全插入到靶器官中，并且注射是在由这些电极预先描绘的区域内垂直地施用至的靶组织上。在美国专利号7,245,963和美国专利公开2005/005263中描述的这些电极优选是20mm长和21号规格。

[0154] 此外，在一些实施方案中涵盖的是合并的电穿孔设备和其使用，有电穿孔设备描述在以下专利中：1993年12月28日公告的美国专利5,273,525、2000年8月29日公告的美国专利6,110,161、2001年7月17日公告的6,261,281以及2005年10月25日公告的6,958,060以及2005年9月6日公告的美国专利6,939,862。此外，本文涵盖了覆盖主题的专利，所述主题

提供在涉及使用多种设备中的任一种来递送DNA的2004年2月24日公告的美国专利6,697,669和关于注射DNA的方法的2008年2月5日公告的美国专利7,328,064中。以上专利的全部内容以引用方式并入本文。

[0155] d.制备疫苗的方法

[0156] 本文提供用于制备包含本文所讨论的DNA疫苗的DNA质粒的方法。所述DNA质粒在最终亚克隆步骤进入哺乳动物表达质粒之后，可用于在大型发酵罐中使用本领域已知的方法接种细胞培养物。

[0157] 用于与本发明的EP设备一起使用的DNA质粒可以使用已知设备和技术的组合来配制或制造，但是优选地它们使用优化质粒制造技术来制造，所述技术描述在2007年5月23日提交的美国公开的申请号20090004716中。在一些实例中，在这些研究中使用的DNA质粒可以按大于或等于10mg/mL的浓度来配制。制造技术还包括或并入本领域普通技术人员普遍已知的各种设备和方案，除在美国序列号60/939792中所述的那些外，还包括2007年7月3日公告的许可专利、美国专利号7,238,522中所述的那些。上文引用的申请和专利、美国序列号60/939,792和美国专利号7,238,522的全部内容地分别并入本文。

实施例

[0158] 本发明进一步在以下实施例中进行说明。应了解，这些实施例在表示本发明的优选实施方案时仅仅通过说明来给出。从上文的讨论和实施例中，本领域的技术人员可以确定本发明的必要特性，并且在不背离其精神和范围的情况下，可以做出本发明的各种变化和修改以便使其适应于各种用法和条件。因此，除本文所示和所述的那些之外，从以上描述本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。这些修改也旨在属于所附权利要求的范围内。

[0159] 共有HBV核心蛋白也被称为HBV修改的或M-核心构建体，它是从来自HBV基因型A、B、C、D以及E的表位序列中设计。选择来自这些基因型的HBV核心蛋白序列来包含在共有核心的构建中，所述共有核心会诱导针对广泛范围的基因型的免疫，从而提供HBV的通用疫苗。在一些实施方案中，M-核心构建体的修改包括添加IgE前导序列。在一些实施方案中，M-核心蛋白质是使用用于增强表达的密码子优化和RNA优化来编码的。

[0160] 将编码具有IgE前导序列和HA标记(SEQ ID NO:5)的M-核心序列的核酸序列克隆到表达载体pVAX中以便产生构建体pM-core。体外表达测试使用pM构建体和pVAX来完成并且被用作对照。示出阳性表达的结果描绘在图2A和图2B中示出的凝胶图像中。

[0161] C57BL/6转基因小鼠被分成每组4只小鼠的两组并使用电穿孔来以20μg的DNA按每两周一次的间隔免疫三次(组1-pVAX载体对照；组2pM-core)。小鼠在第0天、第14天、第28天被免疫并在第35天被处死。从处死的动物中收获脾脏、肝脏以及血清。

[0162] C57BL/6小鼠品系的体内研究表明从脾脏获得的CD8和CD4 T细胞中的肿瘤坏死因子(TNF-α)、干扰素γT-细胞(IFN-γ)和CD 107a的分泌的量增加。图3A和图3B示出了用pM-core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠来自脾脏的CD8+和CD4+T细胞中的IFN-γ分泌的量增加。图4A和图4B示出了用pM-Core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠来自脾脏的CD8+和CD4+T细胞中的TNF-α分泌的量增加。图5A和图5B示出了用pM-Core进行疫苗接种的C57BL/6小鼠来自脾脏的CD8+和CD4+T细胞中的CD 107a分泌的量增加。

[0163] 在施用pM-Core DNA疫苗的动物中还证明了HBV特异性T-细胞向肝脏的迁移。以高频率和对肝的效应功能来靶向HBV核心抗原特异性T细胞是研发HBV免疫治疗的重要目标。在免疫之后，处死动物并移除它们的肝脏，并确定HBV特异性效应子T细胞向肝脏的迁移。结果显示在体内pM-Core疫苗将效应子T细胞驱使到肝脏中。图6A和图6B示出干扰素-γT细胞肝脏反应，图7A和图7B示出肿瘤坏死因子-α肝免疫反应和由用pM-Core进行疫苗接种而引起的提高的反应。

[0164] 由pM-core DNA构建体编码的M-核心共有免疫原驱动强烈平衡的CD4+/CD8+T细胞免疫反应。在HBV感染后诱导的T细胞以高频率流通到肝脏中并且表现用于免疫清除的正确效应子表型。

[0165] 图8示出了使用酶联免疫吸附斑点(ELISPOT)测定通过pM-Core诱导的细胞免疫反应。用横跨整个pMCore长度和具有8个氨基酸重叠的15-mer肽的两个集合来刺激脾细胞。将R10培养基中的200,000个脾细胞接种在96孔的IFN-γ捕获抗体(R&D系统(R&D system))涂布的板中，并在37℃下5%CO_2中在特异性肽集合存在下刺激过夜。将细胞冲洗掉并使板与生物素化的抗小鼠IFN-γ检测抗体(R&D系统)孵育过夜。随后将链霉亲和素-碱性磷酸酶和5-溴-4-氯-3′-吲哚基磷酸酯对甲苯胺盐以及氯化硝基四氮唑蓝用于生长斑点。使用自动化ELISPOT读取器(CTL有限公司(CTL Limited))计数斑点。如图8所示，用pMCore免疫可以诱导强烈的细胞免疫反应。数据显示优势表位偏向肽集合2。平均HBcAg-特异性IFN-γT细胞反应是每百万脾细胞约2000(±210)SFU。

[0166] 体内细胞毒性测定研究使用与流式细胞术结合的羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记来进行。我们评估了细胞群的细胞中的细胞分裂。将脾细胞从初始实验的小鼠中分离并将其分为两个群。CFSE高度标记的一个群用有关肽(例如HBV核心肽)脉冲处理。CFSE低度标记的另一个群用不相关的肽(例如HCV NS3肽)脉冲处理。将标记的、肽处理的细胞组合并用于进行流分析的继承性转移实验中。将处理的、标记的靶细胞的组合群施用给两组小鼠，即对照组以及免疫组。从每组小鼠中分离脾细胞，并在流式细胞仪上运行样本。测量CFSE的数量。通常，在这样的实验中，形成两个峰，第一个是不相关肽；第二个是指示更大CFSE的峰中的免疫肽。

[0167] 图9示出通过疫苗接种所诱导的CD8 T细胞可以明确地除去体内靶细胞。这些结果显示来自初始实验的小鼠的脾脏和肝脏的样本含有在不相关肽和相关肽的峰中的几乎等量的细胞，同时这些结果清楚地显示在免疫组中，来源于用相关肽进行脉冲的那些的细胞的峰显著小于不相关的肽。这些数据显示用HBV肽处理的靶细胞在用HBV疫苗进行免疫的小鼠中被明确地除去，但是在未免疫的小鼠中没有。用不相关肽处理的靶细胞的任何除去如果全部发生，则其在用HBV疫苗进行免疫的小鼠中和在未免疫的小鼠中是相同的，并且显著少于用HBV肽处理的靶细胞的除去。

[0168] 图10示出从使用CFSE标记的T细胞增殖测定中收集的数据。比较用pVax载体(对照)或者用表达HBV M-核心的质粒pMCore处理的CD3+CD4+细胞和CD3+CD8+的增殖百分比。简要来说，根据制造商的说明，将分离的脾细胞用羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(CFDA-SE)细胞示踪剂试剂盒(Cell Tracer Kit)(英杰公司)来染色。染色细胞用盐水冲洗三次并用pMCore-特异性重叠肽刺激。使细胞在37℃下孵育96小时。48小时后，除去50%的培养基并用新鲜的R10更换。在第4天，收获细胞并将其用CD3、CD4和CD8-特异性单克隆抗体(BD

Pharmingen)染色。用含有1%多聚甲醛(PFA)的PBS固定细胞并在流式细胞仪(FACScalibur)(碧迪医疗器械有限公司(Becton Dickinson))上获得所述细胞。使用FlowJo程序来分析数据。CFSE低的和CFSE中等的群被认为是增殖的细胞。如图10所示,分离自脾脏的CD3+CD8+T细胞与CD3+CD4+T细胞相比增殖更多。

[0169] 图11A和图11B是示出来自用pVax载体(对照)或者用表达HBVM-核心的质粒pMCore处理的动物的系列稀释血清中抗-HBV核心抗体的比较的ELISA数据。简要来说,将高结合ELISA板(康宁公司(Costar),康宁(Coming),纽约(NY))用PBS中的1μg/ml HBcAg蛋白质涂布,在4℃下放置24h,并且然后用PBS-吐温冲洗,并用含有1%BSA的PBS在室温下封闭2h。将连续稀释的血清样本添加到孔中,并在室温下孵育1h。冲洗之后,通过HRP-标记的山羊抗小鼠IgG(图11A)或者IgA(图11B)来显示结合的血清抗体。使用四甲基联苯胺(西格玛奥瑞奇公司(Sigma-Aldrich))作为底物来检测过氧化物酶缀合的Ab,并且用多重扫描ELISA板读取器来测量450nm处的OD。观察在从免疫小鼠收集的血清中的抗原特异性体液反应。

[0170] 图12示出了来自CD4+和CD8+脾和肝细胞中的TNF-α和IFN-γ百分比。

[0171] 在不存在HBV的小动物模型的情况下,通过流体动力学注射将HBcAg用于瞬时转染小鼠肝脏。用pMCore或者HCV NS3/4A转染免疫的小鼠肝脏。转染后三天免疫组织化学染色显示与NS3/4A-转染的肝细胞相比HBcAg-转染的肝细胞的清除。测量血清中的ALT水平以便确保通过免疫小鼠诱导的清除不引起任何肝损伤。图13中的结果显示由免疫小鼠诱导的清除没有引起任何肝损伤。

序列表

<110> 宾夕法尼亚大学托管会(THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA)
D·韦纳 (WEINER, David)
严健 (YAN, Jian)
N·奥本一阿杰伊 (NYAMEKYE, Obeng-Adjei)

<120> 编码乙型肝炎病毒核心蛋白的核酸分子和包含其的疫苗

<130> 130694.09500 UPVG0037 X5786

<150> 61/442,162
<151> 2011-02-11

<160> 8

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1
<211> 552
<212> DNA
<213> 人工序列

[0001]

<220>
<223> 核酸序列 M-核心

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 1

nnngacatcg acccctacaa agaatteggc gccaccgtgg aactgctgag cttcctgccc 60

agcgacttct tcccctccgt gcgggacctg ctggataccg ccagcgccct gtacagagag 120

gccctggaaa gccccgagca ctgcagccct caccacacag ccctgcggca ggccatcctg 180

tgctgggggg agctgatgac cctggccacc tgggtcggaa gcaacctgga agatcccgcc 240

agccgggacc tggtggtgtc ctacgtgaac accaacatgg gcctgaagat ccggcagctg 300

ctgtggttcc acatctcctg cctgaccttc ggccgggaaa ccgtgctgga atacctggtg 360

tccttcggcg tgtggatcag aacccccect gcctacagac cccccaacgc ccctatcctg 420

agcaccctgc ccgagacaac cgtggtccgc agacggggca gaagccccag aagaagaacc 480

cccagcccta gacggcggag atctcagagc cccaggcgga gaagatccca gagccgcgag 540

agccagtgct ga 552

<210> 2
<211> 183
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> M-核心的氨基酸序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
[0002] <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0003] Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
165 170 175

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180

<210> 3
<211> 603
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 核酸序列 IgE 前导序列-M-核心

<400> 3
atggactgga cctggattct gttcctggtg gccgctgcca caagggtgca cagcgacatc 60

gaccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttcctgcc cagcgacttc 120

ttccctccg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa 180

agcccegagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctgggge 240

gagctgatga ccctggccac ctgggtcgga agcaacctgg aagatcccgc cagccgggac 300

ctggtggtgt cctacgtgaa caccaacatg ggcctgaaga tccggcagct gctgtggttc 360

cacatctcct gcctgacctt cggccgggaa accgtgctgg aatacctggt gtccttcggc 420

gtgtggatca gaaccccccc tgcctacaga ccccccaacg ccccctatcct gagcaccctg 480

cccgagacaa ccgtggtccg cagacggggc agaagccccca gaagaagaac ccccagccct 540

agacggcgga gatctcagag ccccaggcgg agaagatccc agagccgcga gagccagtgc 600

tga 603

<210> 4
<211> 200
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> IgE前导序列-M-核心的氨基酸序列

<400> 4

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

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

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

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

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

65 70 75 80

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

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

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

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

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

[0005]

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

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

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
195 200

<210> 5
<211> 630
<212> DNA
<213>人工序列

<220>
<223>核酸序列 IgE 前导序列-M-核心+HA 标记

<400> 5

atggactgga cctggattct gttcctggtg gccgctgcca caagggtgca cagcgacatc 60

gacccctaca aagaattcgg cgccaccgtg gaactgctga gcttcctgcc cagcgacttc 120

ttccccteeg tgcgggacct gctggatacc gccagcgccc tgtacagaga ggccctggaa 180

agccccgagc actgcagccc tcaccacaca gccctgcggc aggccatcct gtgctggggc 240

gagctgatga ccctggccac ctgggtcgga agcaacctgg aagatccegc cagccgggac 300

ctggtggtgt cctacgtgaa caccaacatg ggcctgaaga tccggcagct gctgtggttc 360

cacatctcct gcctgacctt cggccgggaa accgtgctgg aatacctggt gtccttcggc 420

gtgtggatca gaaccccccc tgcctacaga ccccccaacg ccectatcct gagcaccctg 480

ccegagacaa ccgtggtccg cagacggggc agaagcccca gaagaagaac ccccagccct 540

agacggcgga gatctcagag ccccaggcgg agaagatccc agagccgcga gagccagtgc 600

tacccctacg acgtgccega ctacgcctga 630

[0006]

<210> 6
<211> 209
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgE 前导序列-M-核心+HA 标记的氨基酸序列

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

[0007] Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg
130 135 140

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

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

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

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

Ala

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgE 前导序列氨基酸序列

<400> 7

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

His Ser

[0008]

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HA 标记氨基酸序列

<400> 8

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

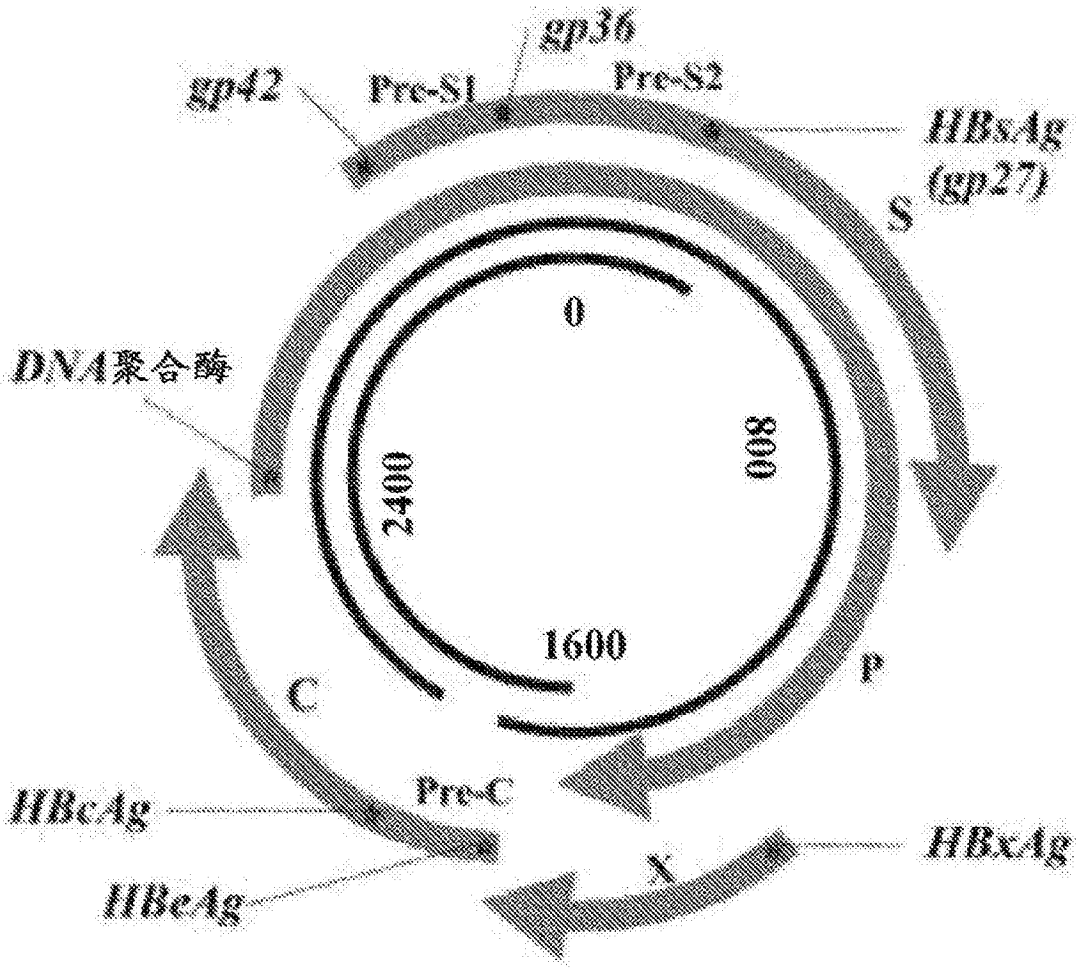

gp36
gp42
Pre-S1
Pre-S2
HBsAg
(gp27)
S
0
DNA聚合酶
2400
800
1600
C
P
HBcAg
Pre-C
HBxAg
HBeAg
X

图1

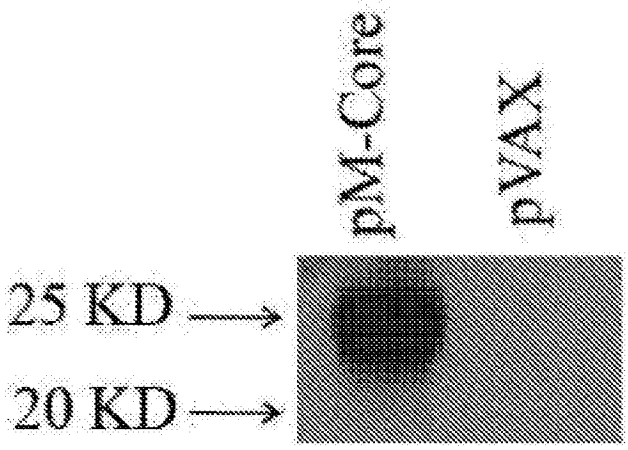

pM-Core
pVAX
25 KD
20 KD

图2A

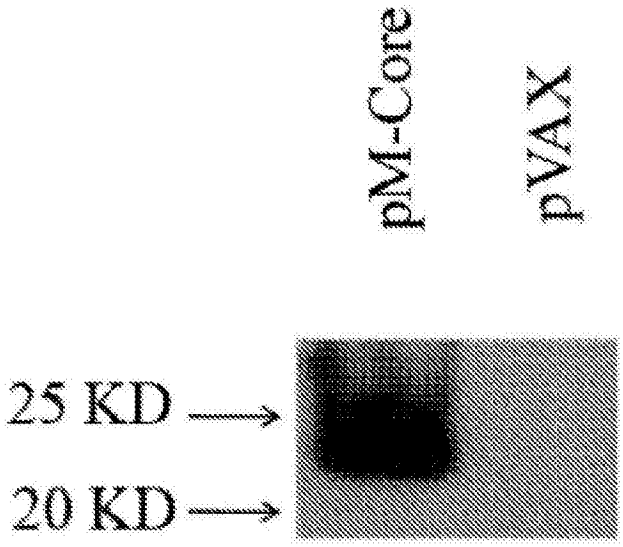


图2B

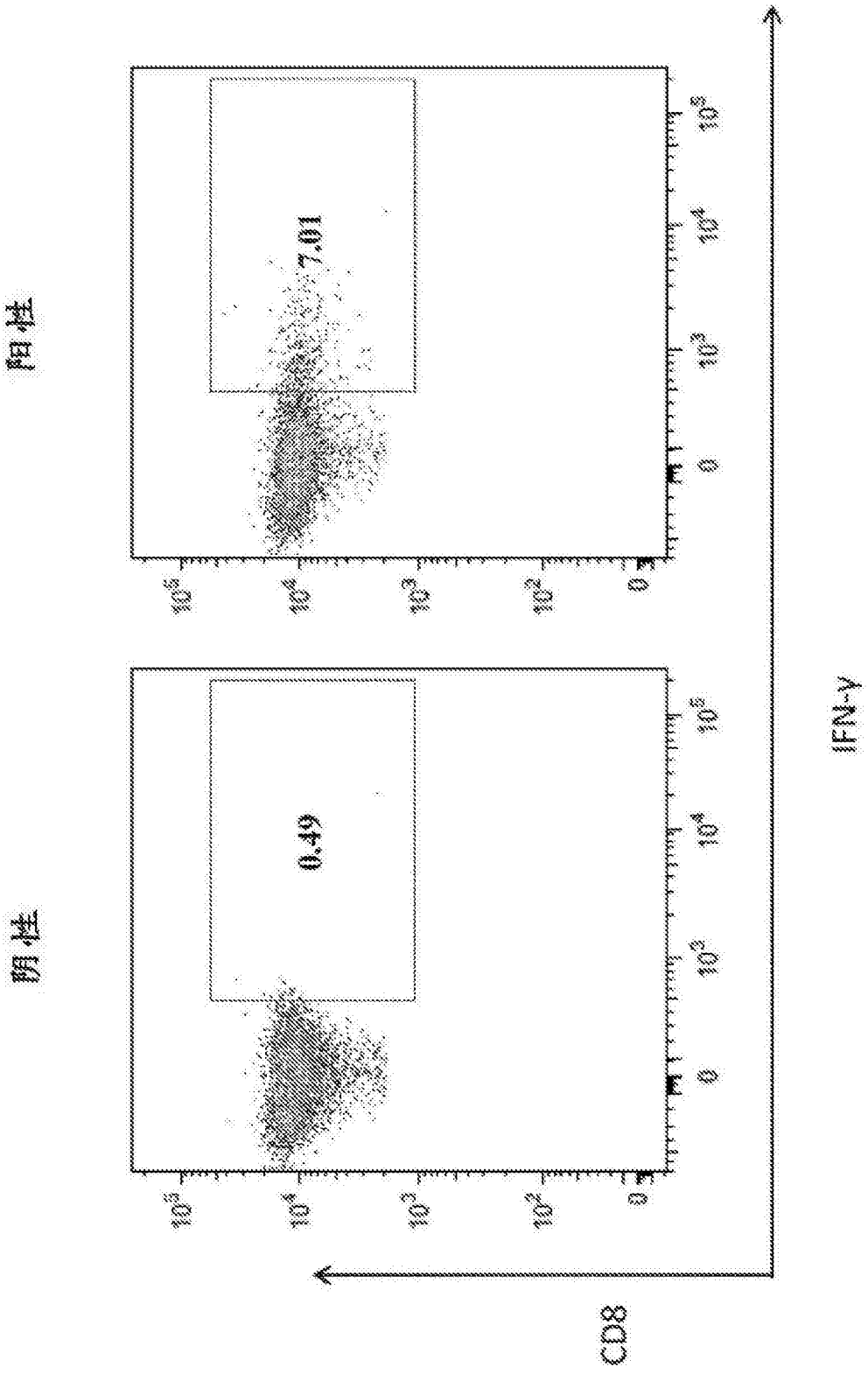


图3A

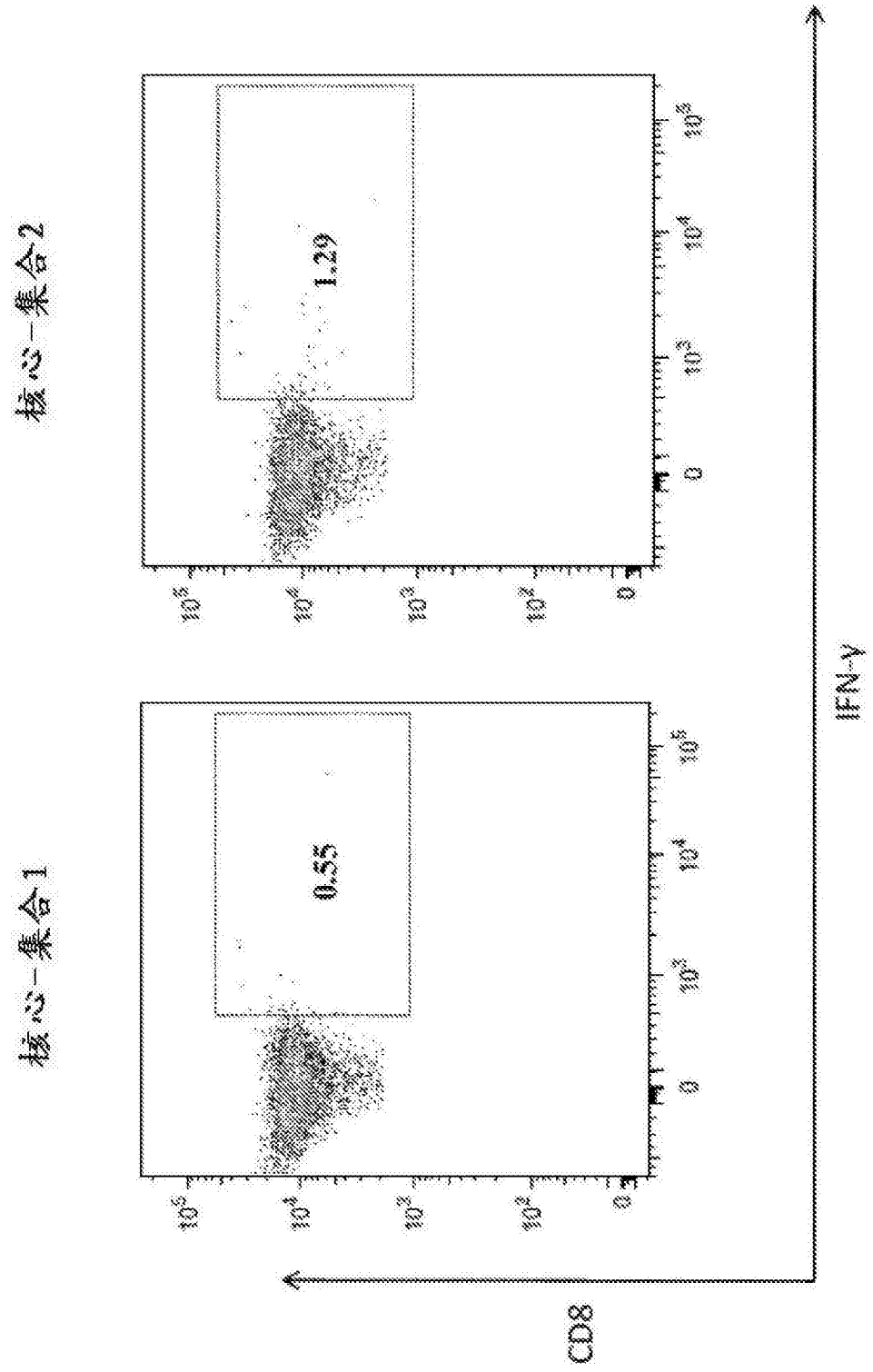
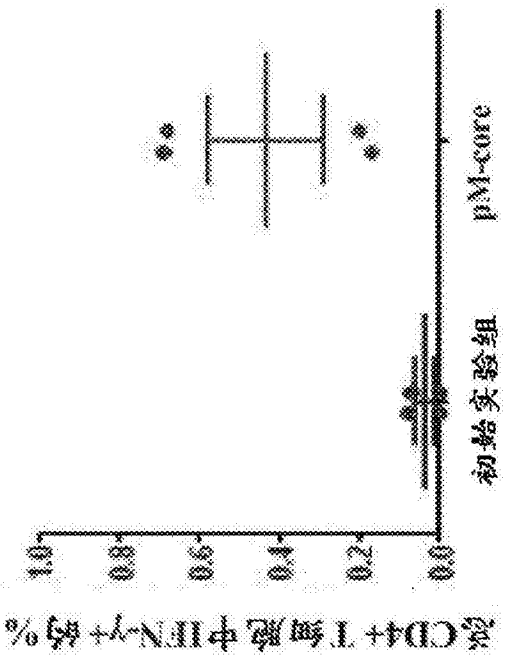


图3A,续


总CD4+ T细胞中IFN-γ+的%
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
初始实验组
pM-core

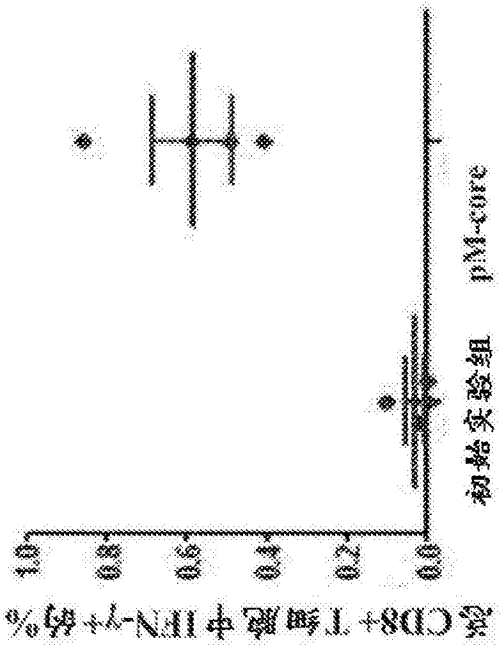

总CD8+ T细胞中IFN-γ+的%
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
初始实验组
pM-core

图3B

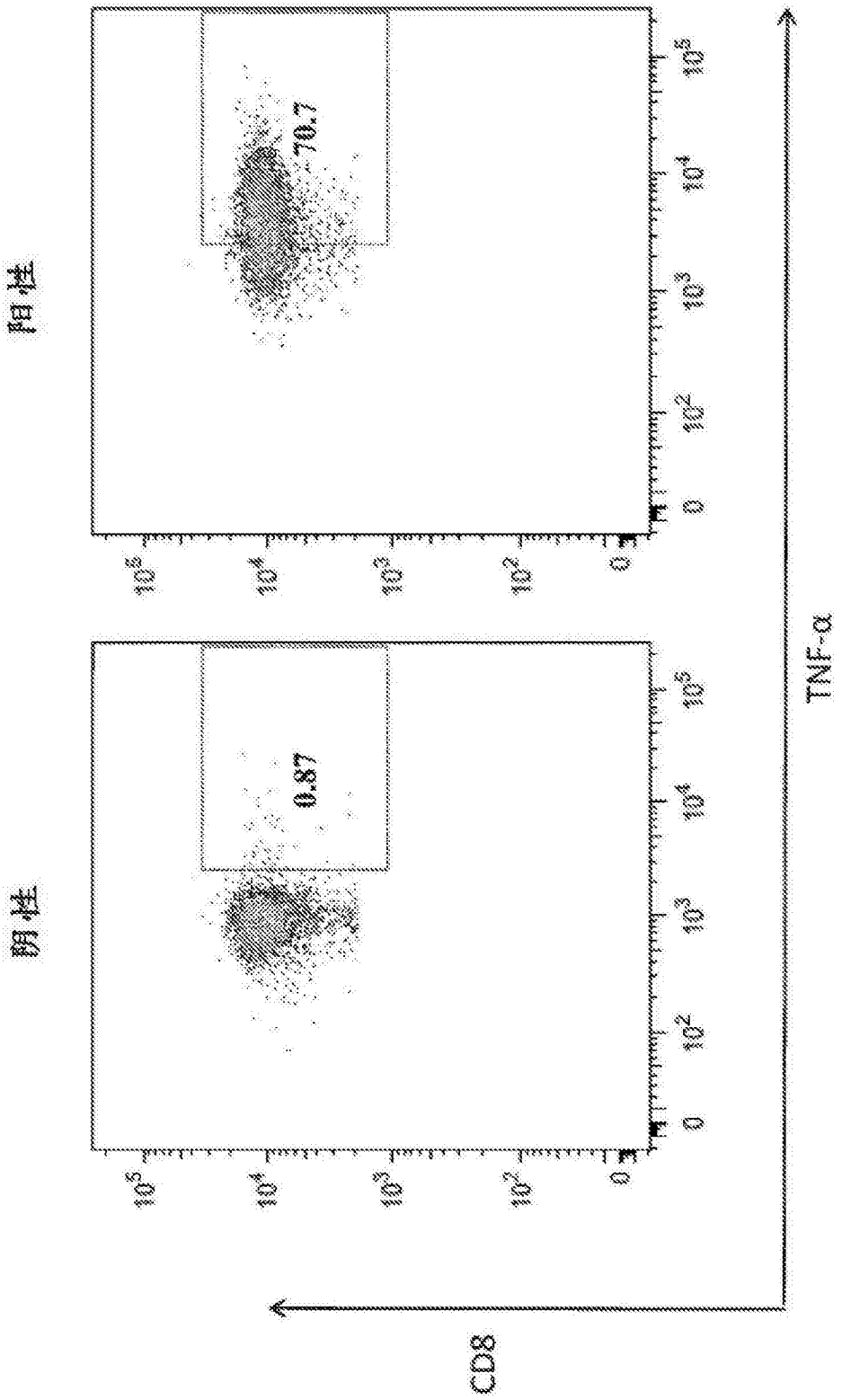


图4A

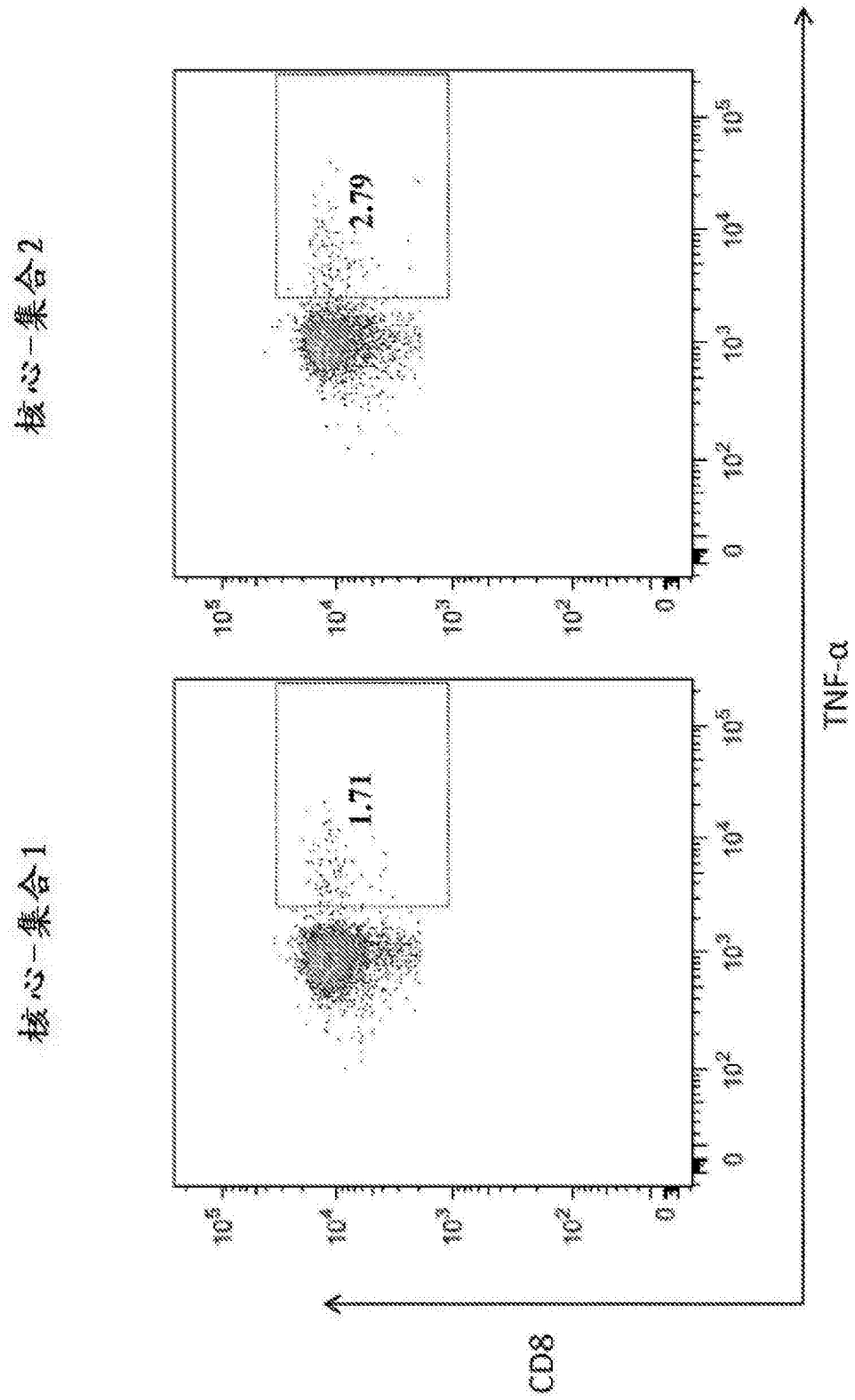
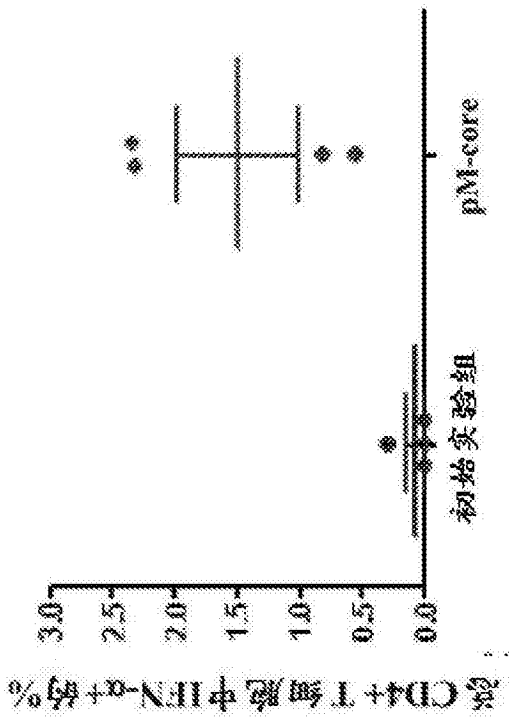


图4A,续


总 CD4+ T 细胞中 IFN-α+ 的%
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
初始实验组
pM-core

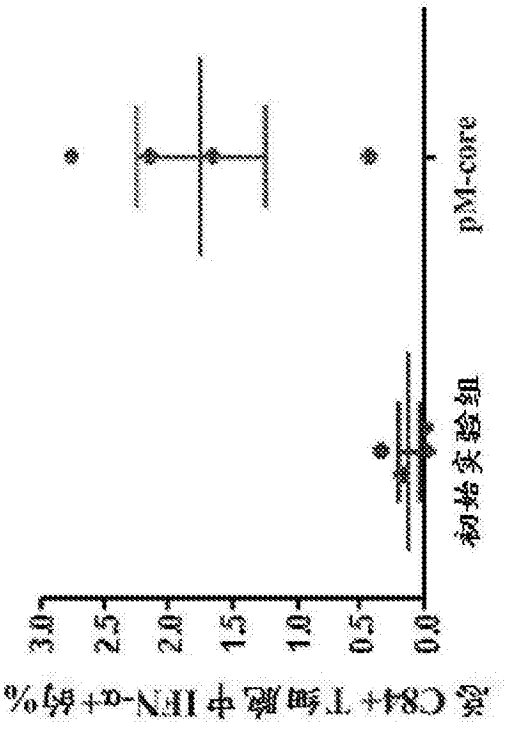

总 CD8+ T 细胞中 IFN-α+ 的%
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
初始实验组
pM-core

图4B

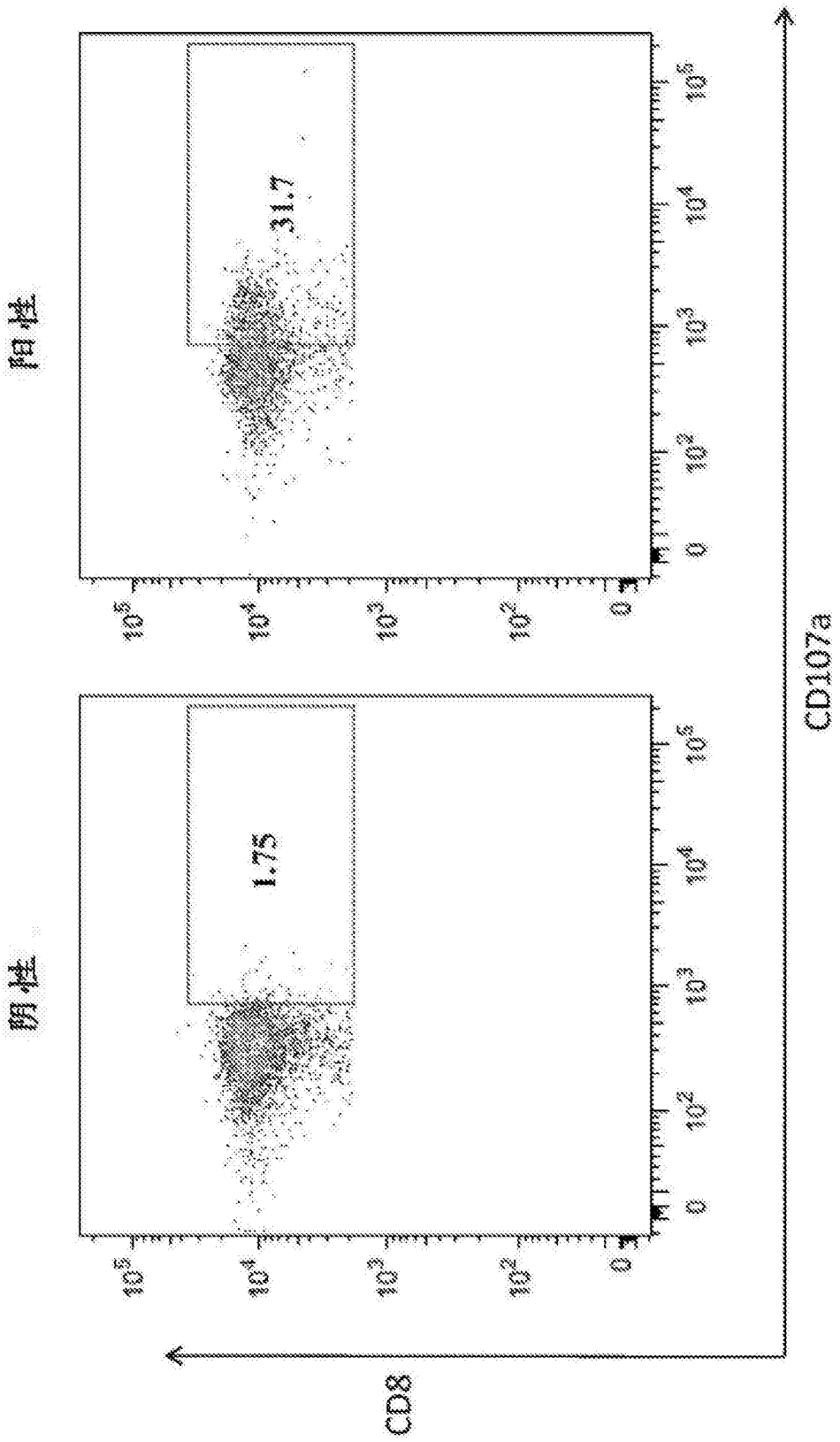


图5A

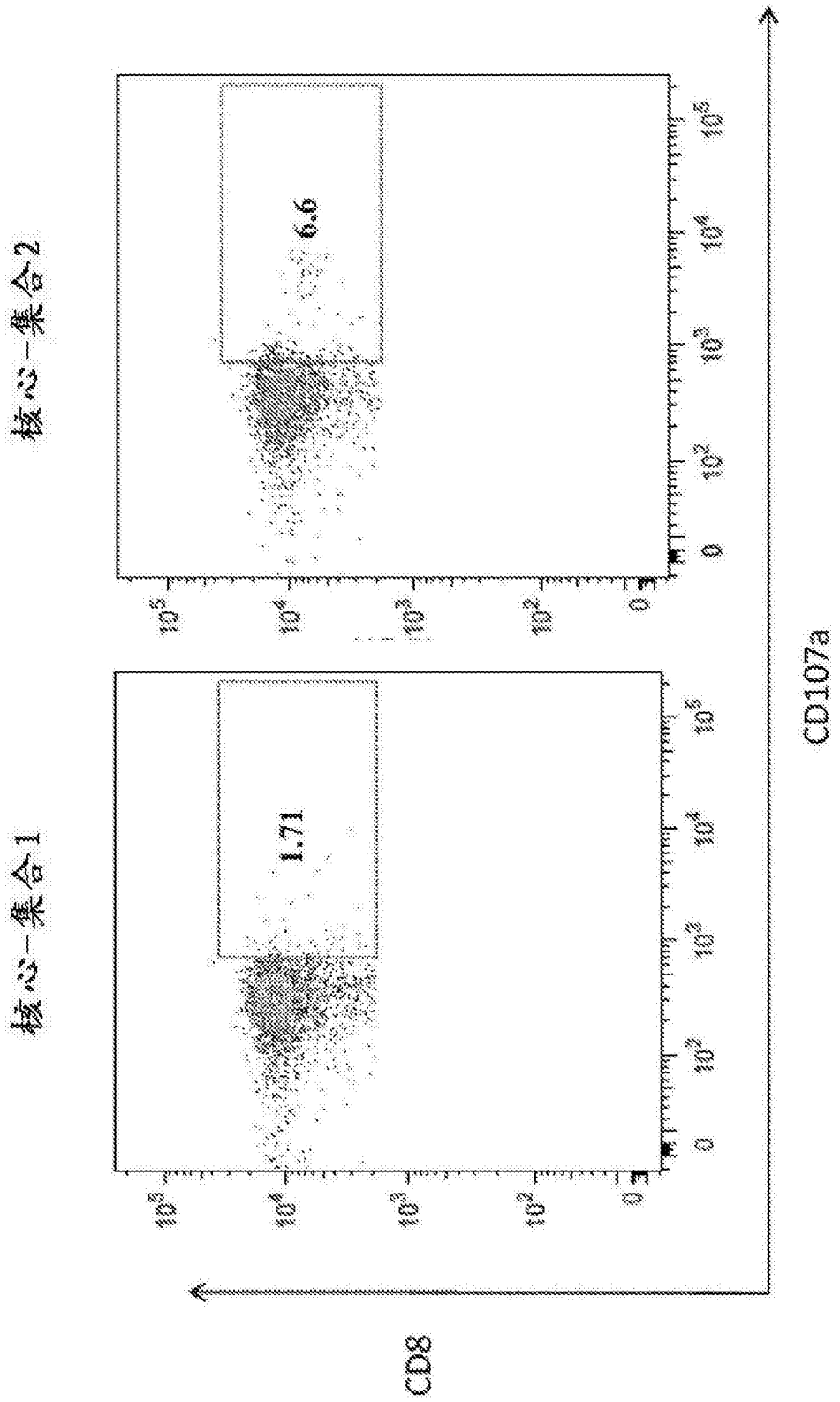
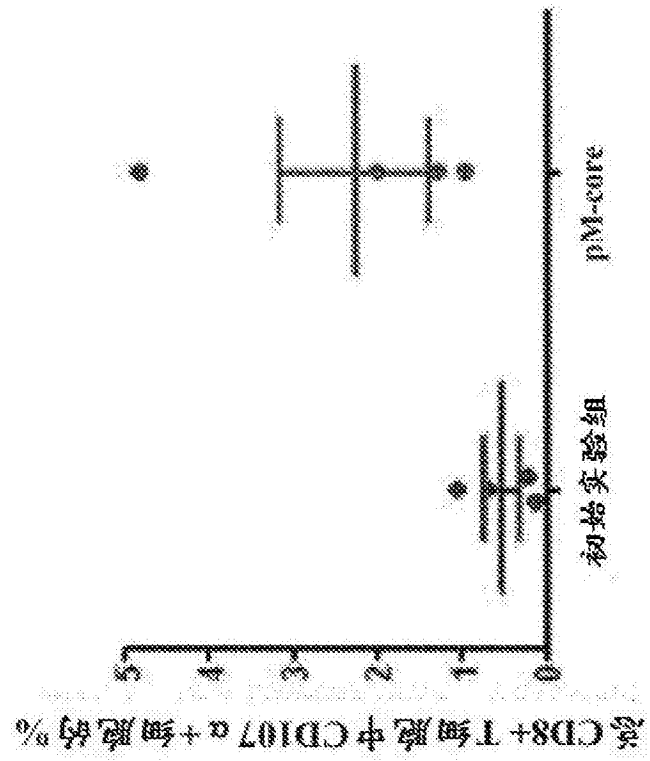


图5A,续


总 CD8+ T 细胞中 CD107 α + 细胞的 %
0
1
2
3
4
5
初始实验组
pM-core

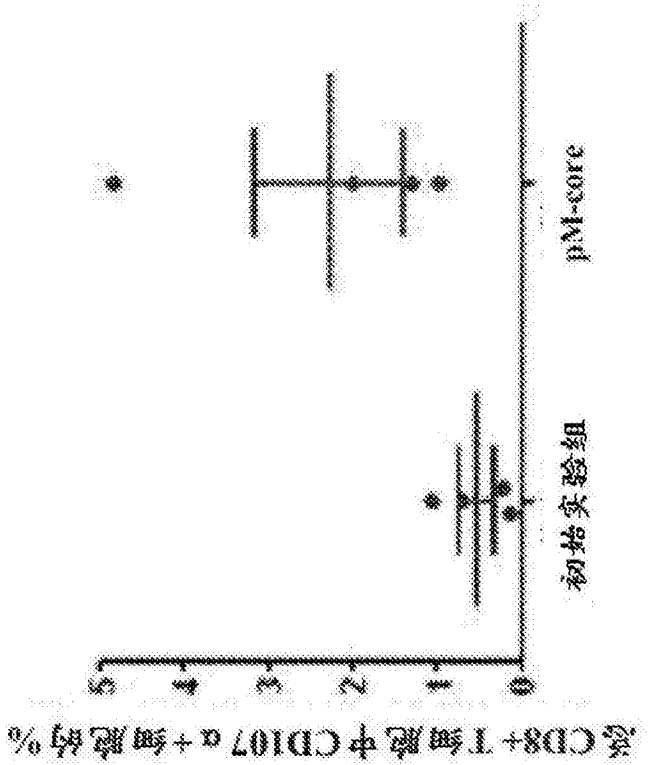

总 CD8+ T 细胞中 CD107 α + 细胞的 %
0
1
2
3
4
5
初始实验组
pM-core

图5B

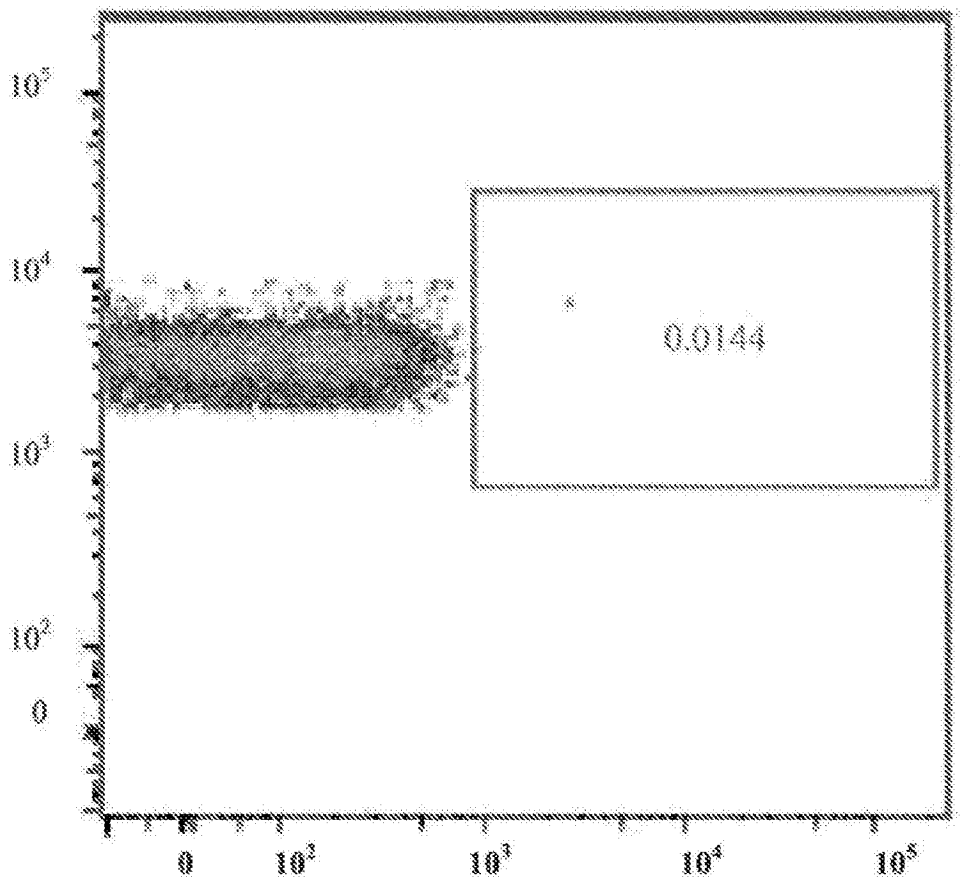


图6A

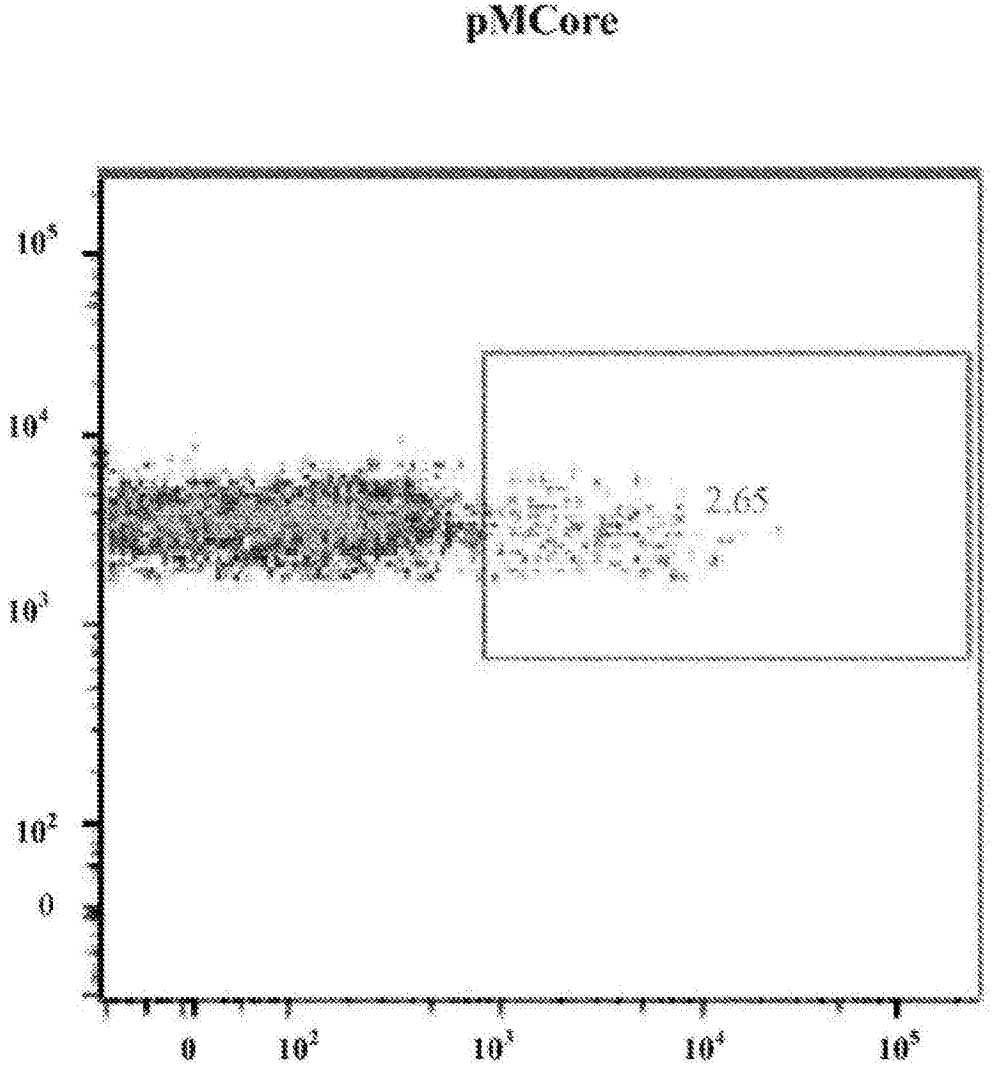


图6A,续

阳性对照

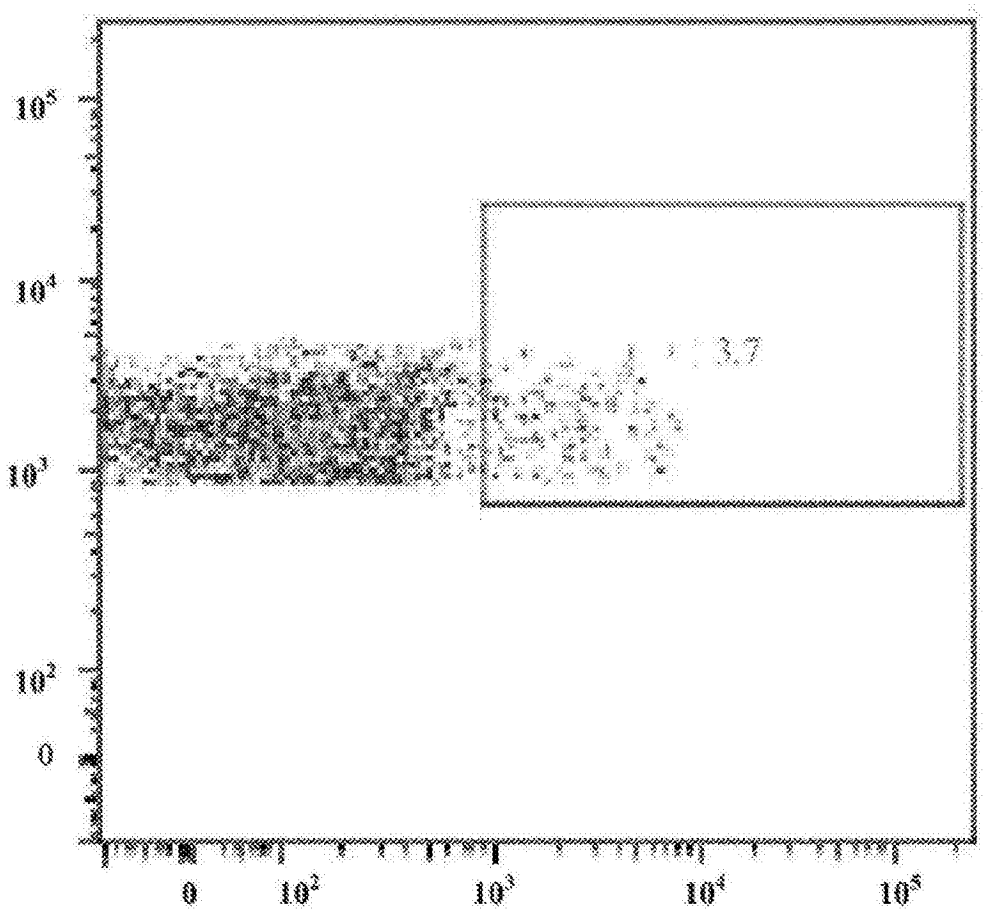
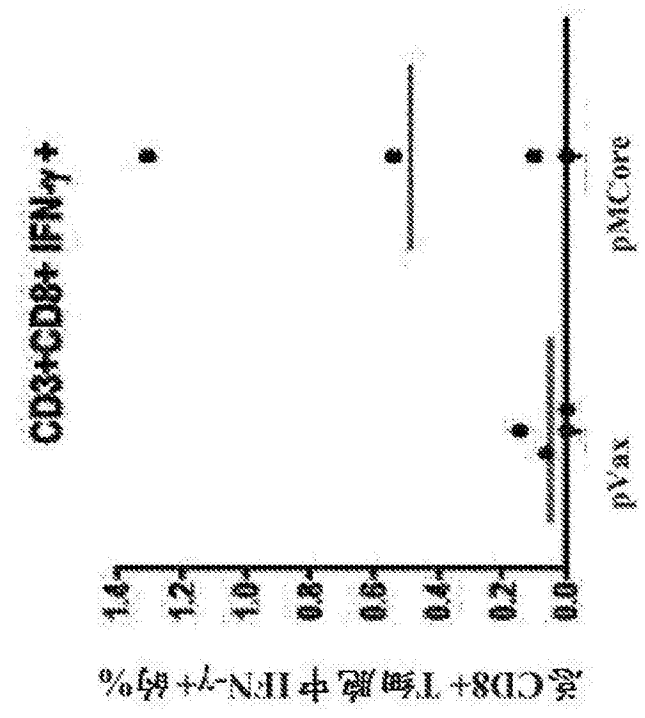


图6A,续


总CD8+T细胞中IFN-γ+的%
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
CD3+CD8+ IFN-γ+
pVax
pMCore

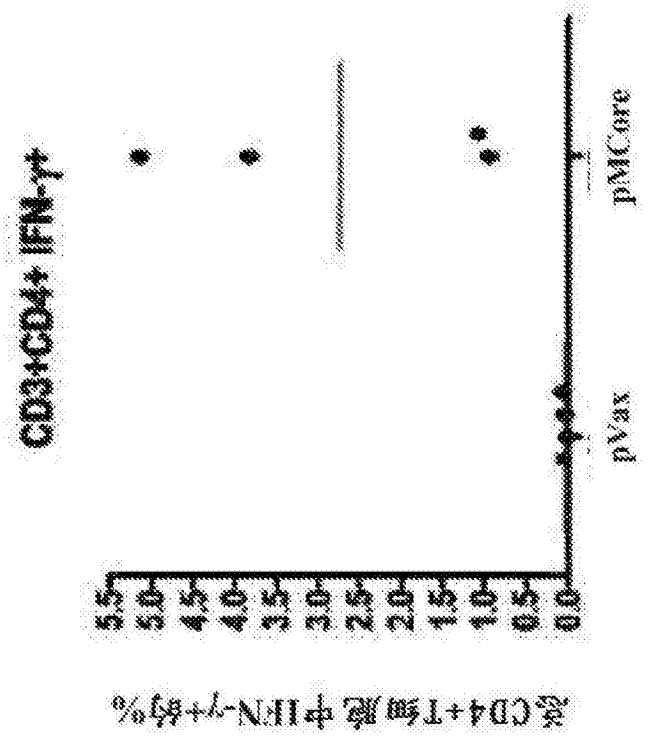

总CD4+T细胞中IFN-γ+的%
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CD3+CD4+ IFN-γ+
pVax
pMCore

图6B

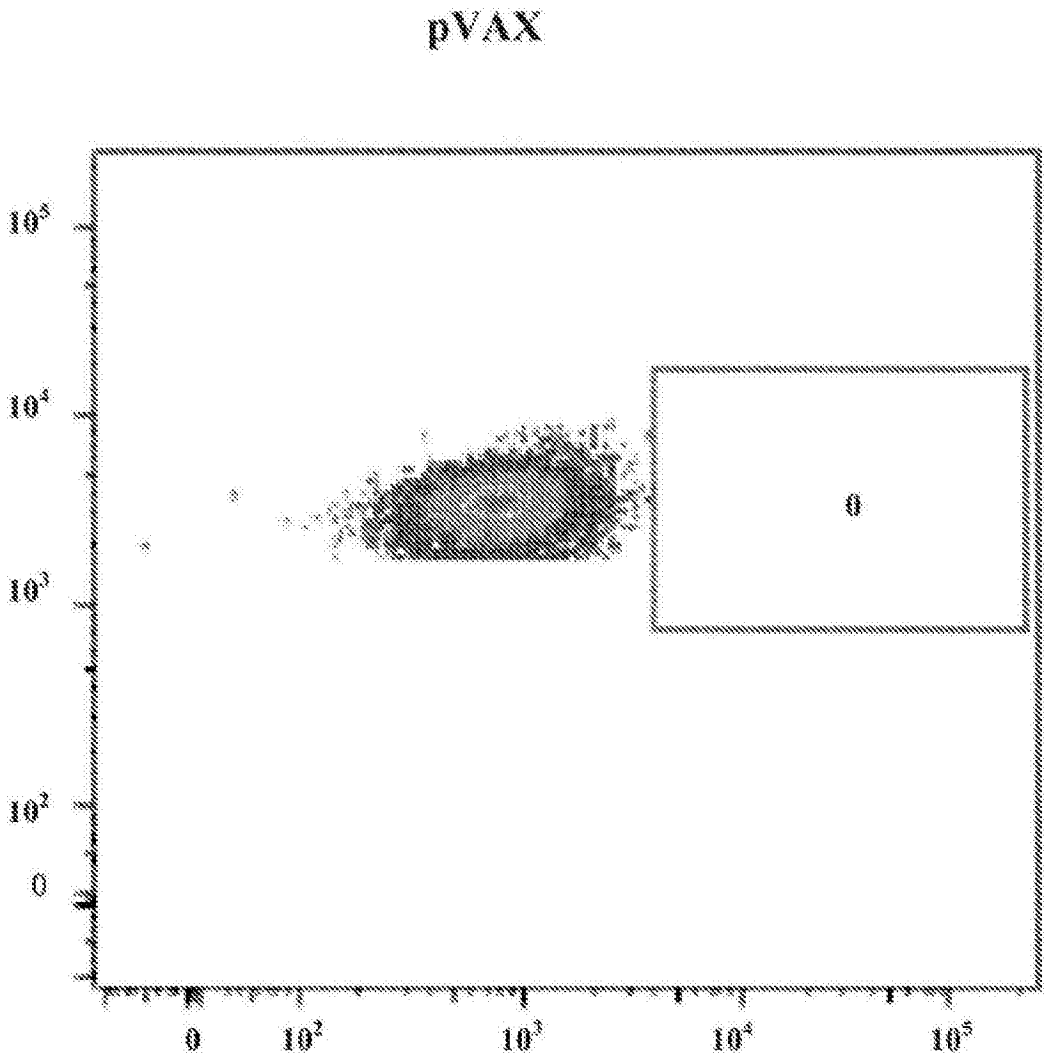


图7A

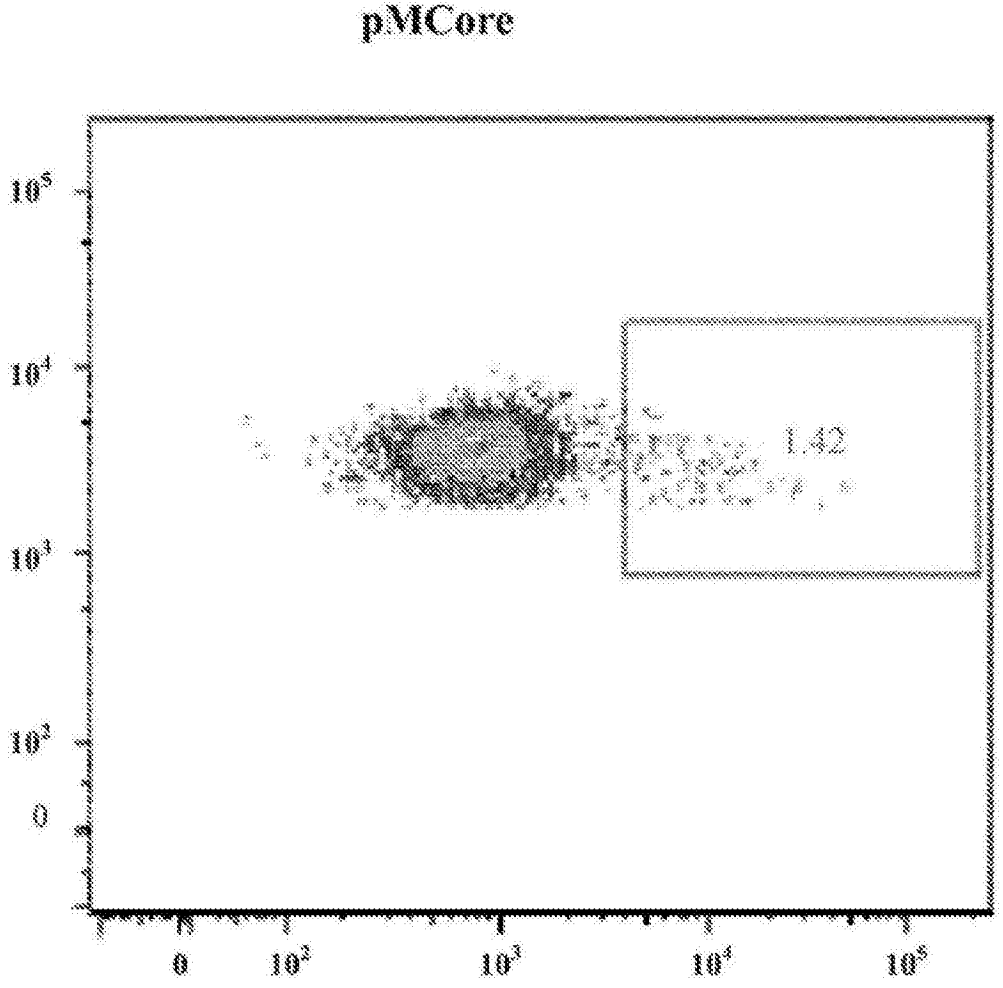


图7A,续

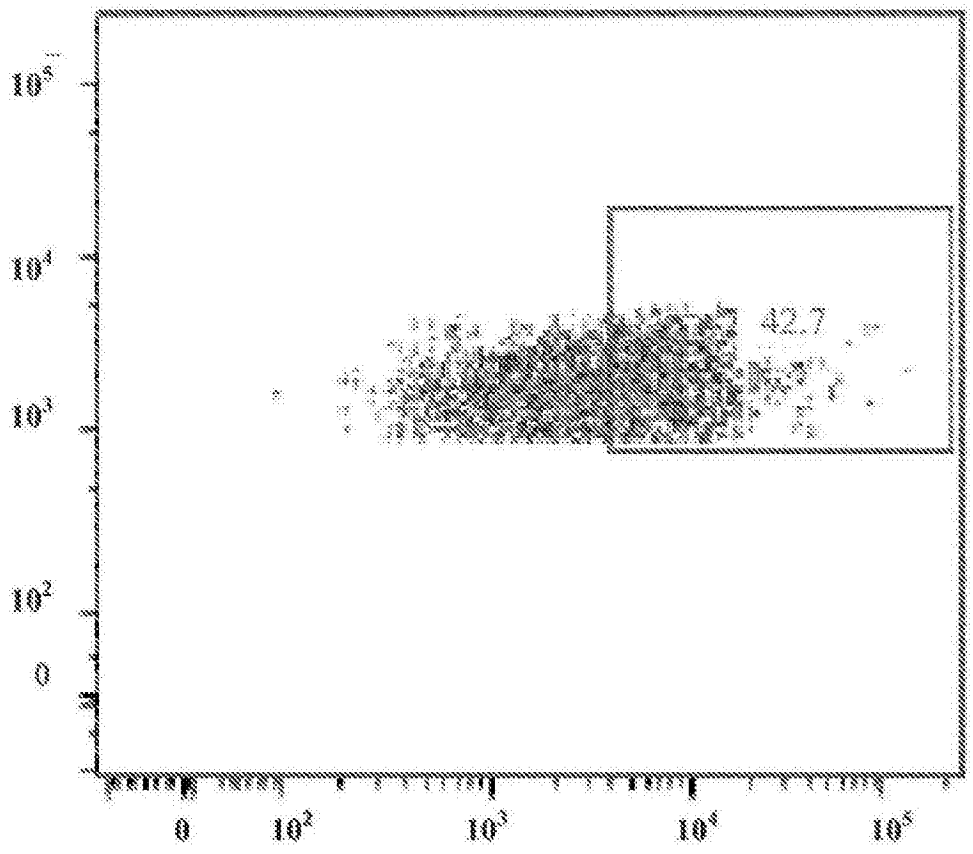


图7A,续

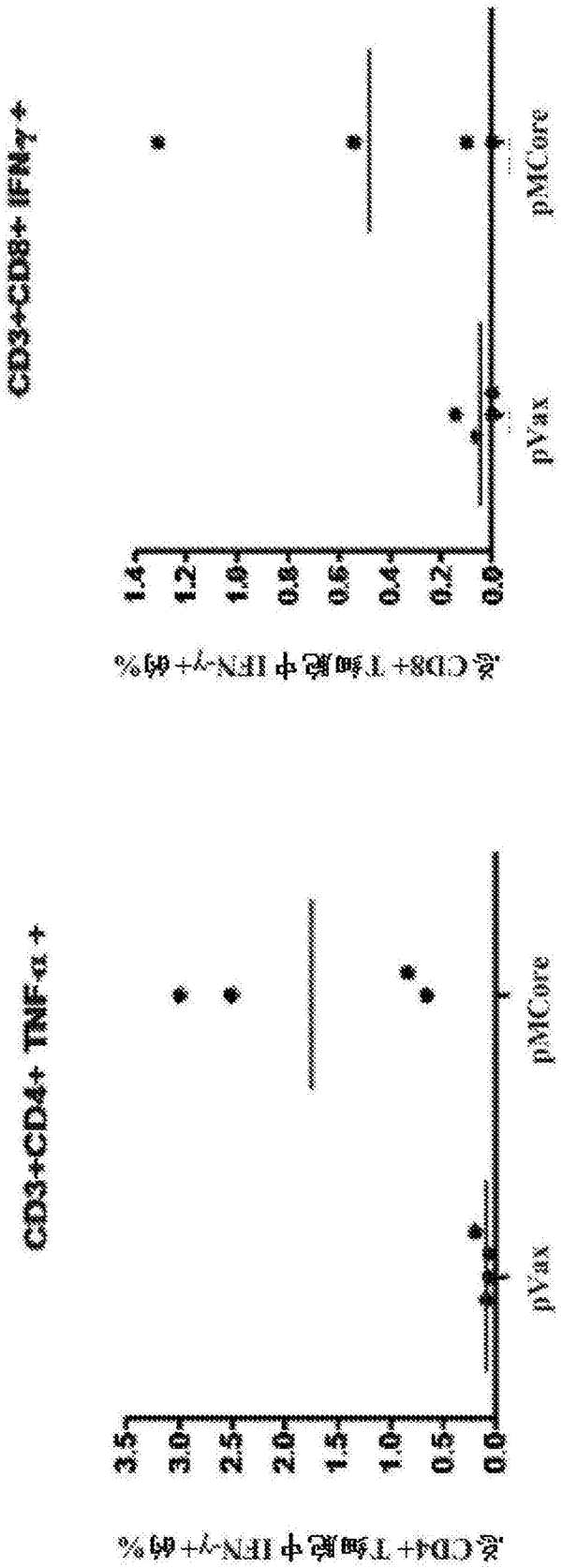

CD3+CD8+ IFN-γ +
pMCore
pVax
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
总CD8+ T细胞中IFN-γ+的%
CD3+CD4+ TNF-α +
pMCore
pVax
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
总CD4+ T细胞中IFN-γ+的%

图7B

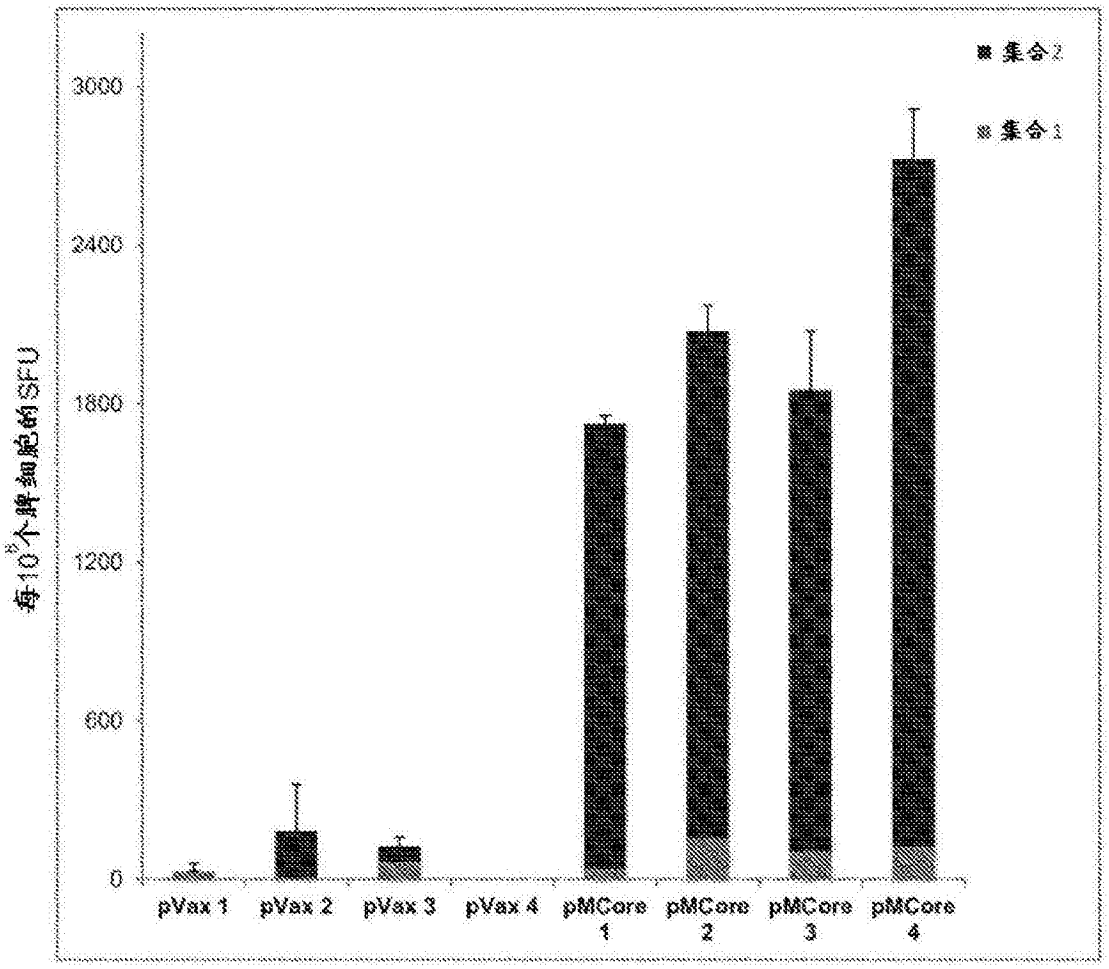

集合2
集合1
每10^6个脾细胞的SFU
3000
2400
1800
1200
600
0
pVax 1
pVax 2
pVax 3
pVax 4
pMCore 1
pMCore 2
pMCore 3
pMCore 4

图8

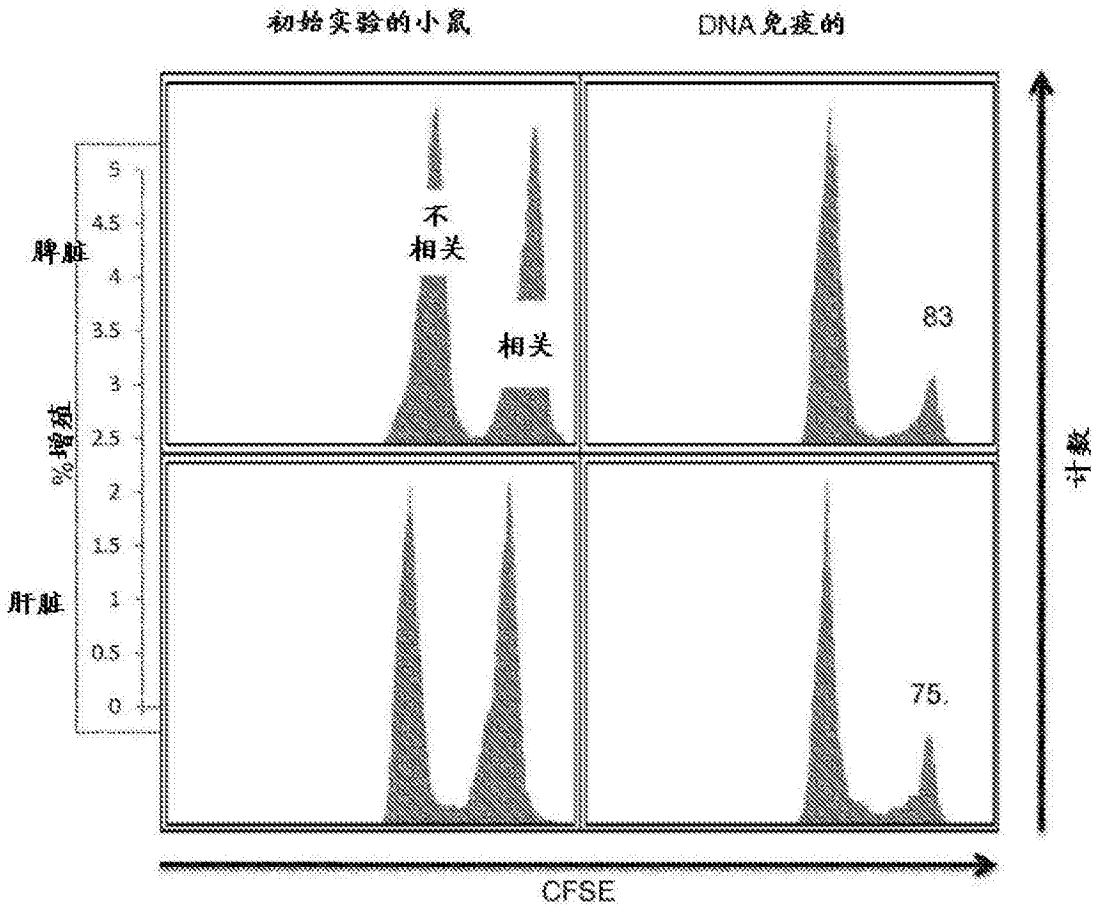

初始实验的小鼠
DNA免疫的
脾脏
肝脏
%增殖
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
不
相关
相关
83
75.
计数
CFSE

图9

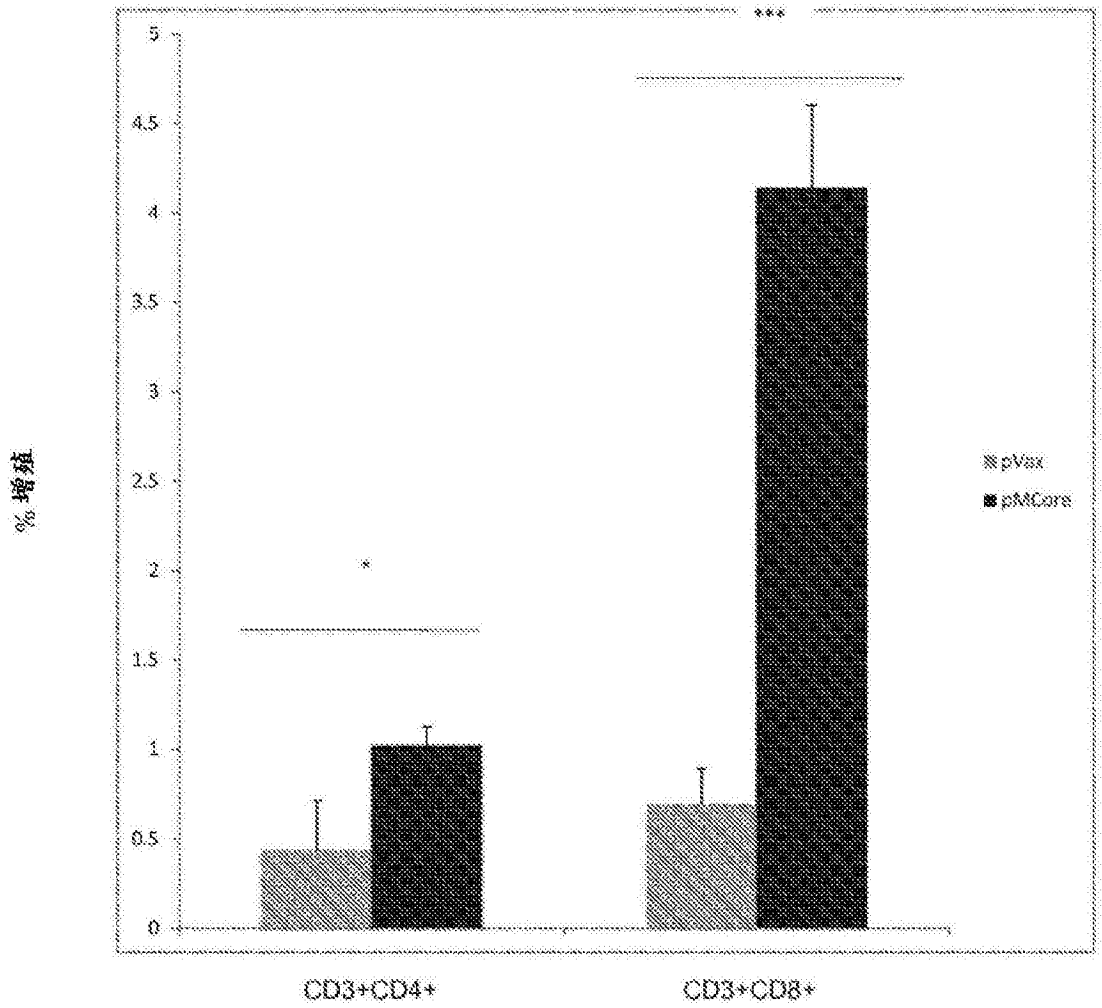

***
*
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
% 增殖
pVax
pMCore
CD3+CD4+
CD3+CD8+

图10

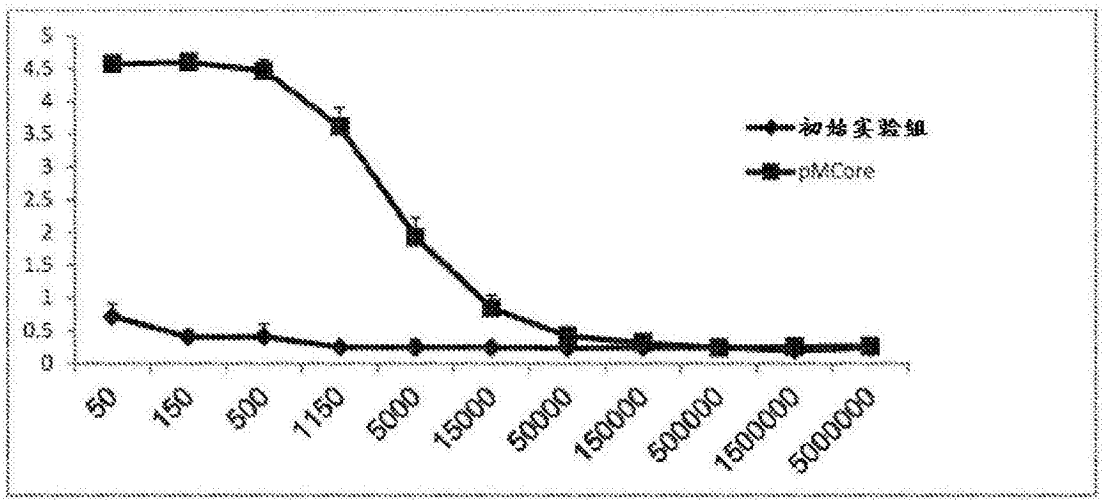

5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
初始实验组
pMCore
50
150
500
1150
5000
15000
50000
150000
500000
1500000
5000000

图11A

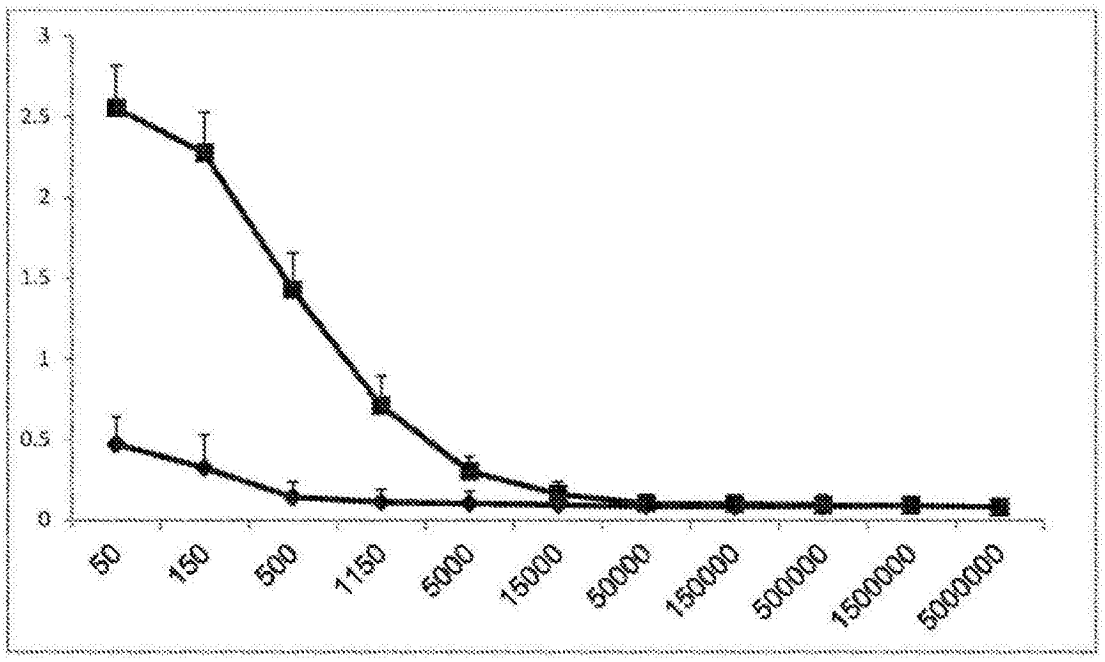

3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50
150
500
1150
5000
15000
50000
150000
500000
1500000
5000000

图11B

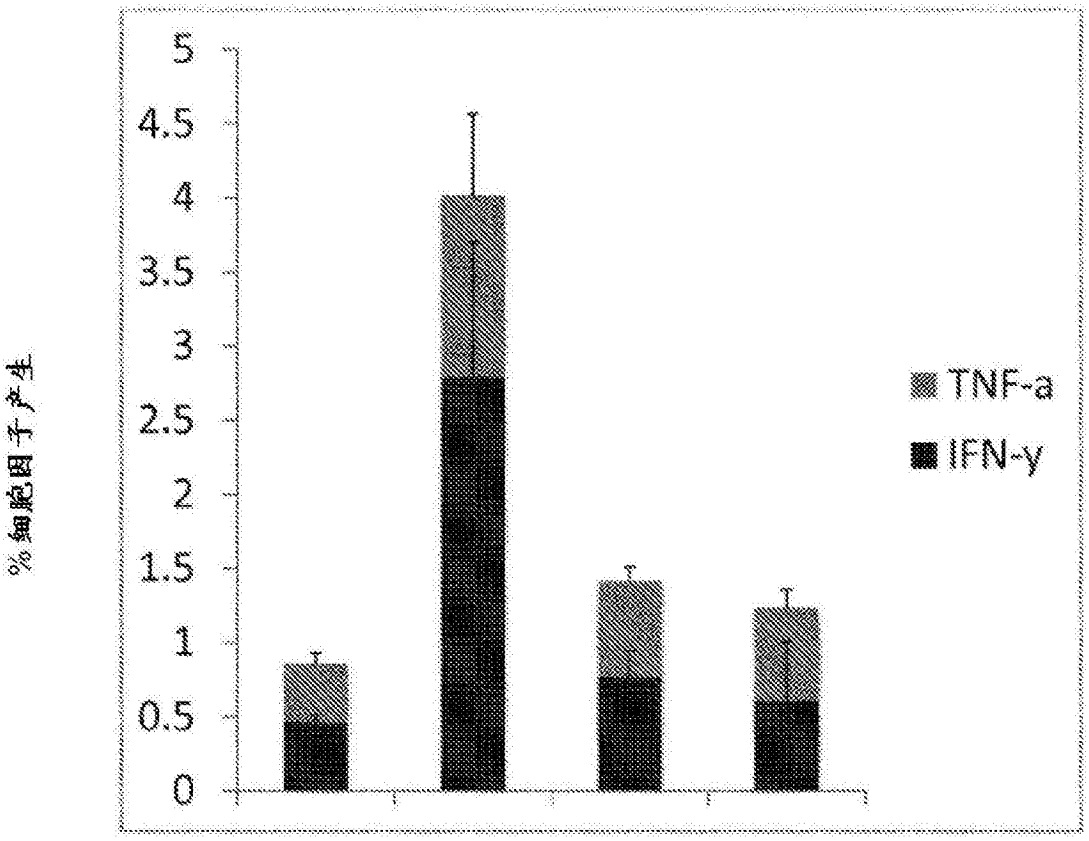

% 细胞因子产生
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
TNF-a
IFN-y

图12

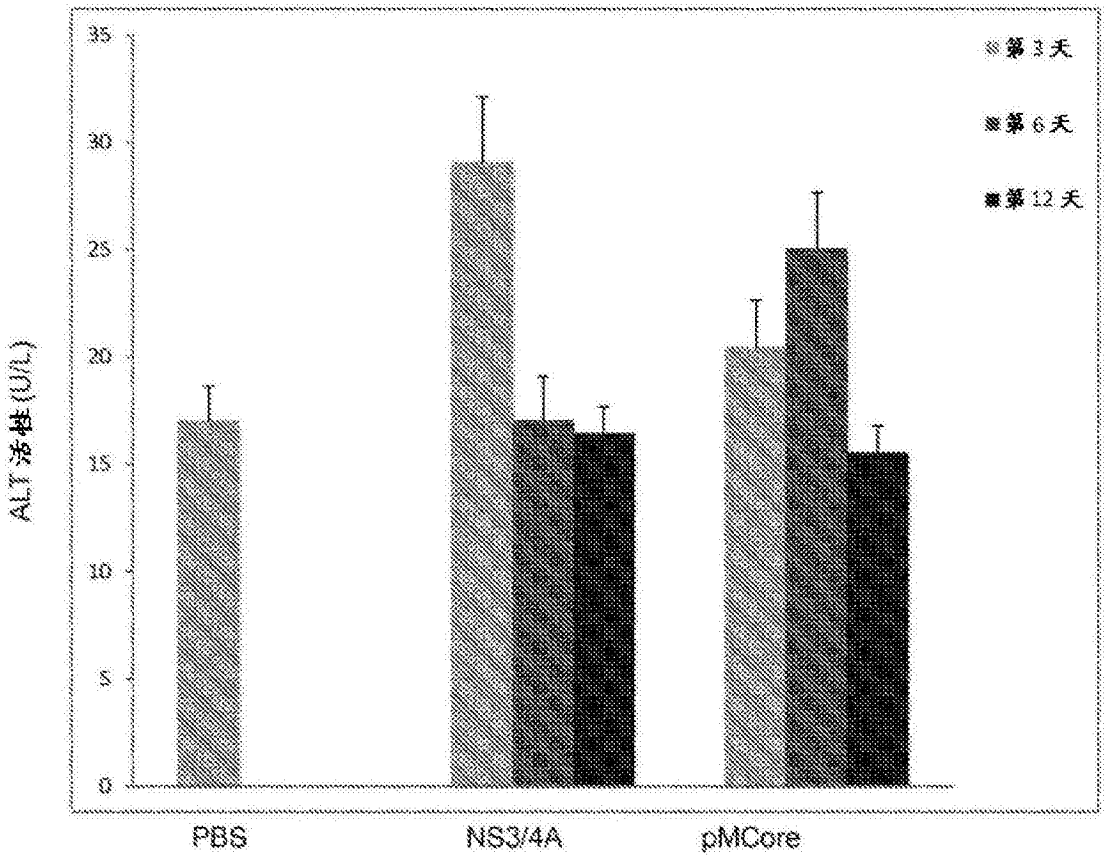


图13