(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112513063 A
(43)申请公布日 2021.03.16

(21)申请号 201980046550.8
(22)申请日 2019.05.09
(30)优先权数据
62/669,663 2018.05.10 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/031483 2019.05.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/217654 EN 2019.11.14
(71)申请人 克莱尔博治疗有限公司
地址 摩纳哥摩纳哥城
申请人 墨尔本保健公司
(72)发明人 雷纳·沃尔什 S·卢卡尼尼
汉斯·内特尔 罗纳德·法科尔
(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291
代理人 黄志华 石磊
(51)Int.Cl.
C07K 7/00(2006.01)
C07K 7/64(2006.01)
C07K 17/00(2006.01)
C07K 14/02(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)

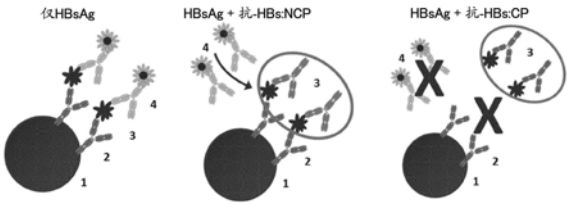
权利要求书6页 说明书44页 附图23页

(54)发明名称

用于治疗乙型肝炎感染的方法和组合物

(57)摘要

本文公开了用于治疗乙型肝炎感染(包括慢性乙型肝炎(CHB))的组合物和方法。



CN 112513063 A

1.一种重组病毒样颗粒抗原(VLP-Ag),其包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

2.根据权利要求1所述的重组VLP-Ag,其中,在环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义,其中,$X_1$是K或R,$X_2$是T或M,$X_3$是T或I,$X_4$是P T或L,$X_5$是A或V,$X_6$是N或T,并且$X_7$是F或Y;

或其中,所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义,

其中,X_8是K或R,X_9是T或M,X_{10}是T、I或S,并且X_{11}是P、T或L。

3.根据权利要求1所述的重组VLP-Ag,其中,环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义,其中,X_{12}是T或S;并且X_{13}是T或S。

4.根据权利要求1所述的重组VLP-Ag,其中,所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组:PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的VLP-Ag,其中,所述嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

6.一种核酸,其编码权利要求1至5中任一项所述的VLP-Ag。

7.一种表达载体,其包含权利要求6所述的核酸。

8.一种组合物,其包含权利要求1至5中任一项所述的VLP-Ag和药学上可接受的载体。

9.一种治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的方法,其包括向所述对象施用包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组病毒样颗粒抗原(VLP-Ag),其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

10.根据权利要求9所述的方法,其中,在环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义,其中,$X_1$是K或R,$X_2$是T或M,$X_3$是T或I,$X_4$是P T或L,$X_5$是A或V,$X_6$是N或T,并且$X_7$是F或Y;

或其中,所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义,

其中,X_8是K或R,X_9是T或M,X_{10}是T、I或S,并且X_{11}是P、T或L。

11.根据权利要求9所述的方法,其中,在环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义,其中,X_{12}是T或S;并且X_{13}是T或S。

12.根据权利要求9所述的方法,其中,所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组:PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

13.根据权利要求9至12中任一项所述的方法,其中,所述嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

14.重组病毒样颗粒抗原(VLP-Ag)在制造用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的药剂中的用途,其中,所述VLP-Ag包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:在HBsAg-S结构域的环

1区和环2区中表达的抗原表位。

15.根据权利要求14所述的用途，其中，在环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；

或其中，所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

16.根据权利要求14所述的用途，其中，环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

17.根据权利要求14所述的用途，其中，所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

18.根据权利要求14至17中任一项所述的用途，其中，所述嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

19.一种用于诱导对象中针对乙型肝炎病毒的免疫应答的方法，其包括向所述对象施用包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组病毒样颗粒抗原(VLP-Ag)，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

20.根据权利要求19所述的方法，其中，环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；

或其中，所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，

其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

21.根据权利要求19所述的方法，其中，环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

22.根据权利要求19所述的方法，其中，所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

23.根据权利要求19至22中任一项所述的方法，其中，所述嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

24.重组病毒样颗粒抗原(VLP-Ag)在制造用于诱导针对乙型肝炎的免疫应答的组合物中的用途，其中，所述VLP-Ag包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

25.根据权利要求24所述的用途，其中，在环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；

或其中，所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，

其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

26.根据权利要求24所述的用途，其中，环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列CCCTKPX$_{12}$DGNCX$_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

27.根据权利要求24所述的用途，其中，所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

28.根据权利要求24至27中任一项所述的用途，其中，所述嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

29.一种用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的试剂盒，所述试剂盒包含重组病毒样颗粒抗原(VLP-Ag)，其中，所述VLP-Ag包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

30.根据权利要求29所述的试剂盒，其中，在环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列CX$_1$TCX$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QGX$_6$SMX$_7$PC定义，其中，X_1是K或R，X_2是T或M，X_3是T或I，X_4是PT或L，X_5是A或V，X_6是N或T，并且X_7是F或Y；

或其中，所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列PCX$_8$TCX$_9$X$_{10}$X$_{11}$定义，

其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

31.根据权利要求29所述的试剂盒，其中，在环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列CCCTKPX$_{12}$DGNCX$_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

32.根据权利要求29所述的试剂盒，其中，所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

33.根据权利要求29至32中任一项所述的试剂盒，其中，所述嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

34.一种编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组mRNA，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

35.根据权利要求34所述的重组mRNA，其中，在环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列CX$_1$TCX$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QGX$_6$SMX$_7$PC定义，其中，X_1是K或R，X_2是T或M，X_3是T或I，X_4是P T或L，X_5是A或V，X_6是N或T，并且X_7是F或Y；

或其中，所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列PCX$_8$TCX$_9$X$_{10}$X$_{11}$定义，

其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

36.根据权利要求34所述的重组mRNA，其中，在环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列CCCTKPX$_{12}$DGNCX$_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

37.根据权利要求34所述的重组mRNA，其中，所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、

PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

38.根据权利要求34至37中任一项所述的重组mRNA,其中,经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

39.一种表达载体,其包含权利要求34至38中任一项所述的重组mRNA。

40.一种组合物,其包含权利要求34至38中任一项所述的重组mRNA和药学上可接受的载体。

41.一种治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的方法,其包括向所述对象施用编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组mRNA,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

42.根据权利要求41所述的方法,其中,环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义,其中,$X_1$是K或R,$X_2$是T或M,$X_3$是T或I,$X_4$是P T或L,$X_5$是A或V,$X_6$是N或T,并且$X_7$是F或Y;

或其中,所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义,

其中,X_8是K或R,X_9是T或M,X_{10}是T、I或S,并且X_{11}是P、T或L。

43.根据权利要求41所述的方法,其中,在环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义,其中,X_{12}是T或S;并且X_{13}是T或S。

44.根据权利要求41所述的方法,其中,所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组:PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

45.根据权利要求41至44中任一项所述的方法,其中,经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

46.重组mRNA在制造用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的药剂中的用途,其中,所述重组mRNA编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

47.根据权利要求46所述的用途,其中,环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义,其中,$X_1$是K或R,$X_2$是T或M,$X_3$是T或I,$X_4$是P T或L,$X_5$是A或V,$X_6$是N或T,并且$X_7$是F或Y;

或其中,所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义,

其中,X_8是K或R,X_9是T或M,X_{10}是T、I或S,并且X_{11}是P、T或L。

48.根据权利要求46所述的用途,其中,环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义,其中,X_{12}是T或S;并且X_{13}是T或S。

49.根据权利要求46所述的用途,其中,所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组:PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

50.根据权利要求46至49中任一项所述的用途,其中,所述嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白

包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

51.一种用于诱导对象中针对乙型肝炎病毒的免疫应答的方法,其包括向所述对象施用编码包含一个或多个抗原表位重复区的经修饰的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组mRNA,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

52.根据权利要求51所述的方法,其中,环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义,其中,$X_1$是K或R,$X_2$是T或M,$X_3$是T或I,$X_4$是P T或L,$X_5$是A或V,$X_6$是N或T,并且$X_7$是F或Y;

或其中,所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义,

其中,X_8是K或R,X_9是T或M,X_{10}是T、I或S,并且X_{11}是P、T或L。

53.根据权利要求51所述的方法,其中,环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义,其中,X_{12}是T或S;并且X_{13}是T或S。

54.根据权利要求51所述的方法,其中,所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组:PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

55.根据权利要求51至54中任一项所述的方法,其中,经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

56.重组mRNA在制造用于诱导针对乙型肝炎的免疫应答的组合物中的用途,其中,所述重组mRNA编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

57.根据权利要求56所述的用途,其中,环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义,其中,$X_1$是K或R,$X_2$是T或M,$X_3$是T或I,$X_4$是P T或L,$X_5$是A或V,$X_6$是N或T,并且$X_7$是F或Y;

或其中,所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义,

其中,X_8是K或R,X_9是T或M,X_{10}是T、I或S,并且X_{11}是P、T或L。

58.根据权利要求56所述的用途,其中,在环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义,其中,X_{12}是T或S;并且X_{13}是T或S。

59.根据权利要求56所述的用途,其中,所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组:PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

60.根据权利要求56至59中任一项所述的用途,其中,经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

61.一种用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的试剂盒,所述试剂盒包含重组mRNA,其中,所述重组mRNA编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

62.根据权利要求61所述的试剂盒，其中，环1中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；

或其中，所述一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，

其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

63.根据权利要求61所述的试剂盒，其中，环2中表达的所述一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

64.根据权利要求61所述的试剂盒，其中，所述一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

65.根据权利要求61至64中任一项所述的试剂盒，其中，经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在所述抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

66.一种组合物，其包含选自由以下组成的组的一种或多种肽：TCTTPAQGNSMFPSC(SEQ ID NO:17)、TCTIPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:18)、TCTTPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:19)、CTKPTDGNCT(SEQ IDNO:20)、以及CTKPSDGNCT(SEQ ID NO:21)。

67.根据权利要求66所述的组合物，其中，所述一种或多种肽缀合至载体蛋白。

68.根据权利要求67所述的组合物，其中，所述载体蛋白是钥孔戚血蓝素(KLH)。

69.根据权利要求66所述的组合物，其还包含药学上可接受的载体。

70.根据权利要求66所述的组合物，其中，所述一种或多种肽是环状的。

71.一种治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的方法，其包括向所述对象施用选自由以下组成的组的一种或多种肽：TCTTPAQGNSMFPSC(SEQ ID NO:17)、TCTIPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:18)、TCTTPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:19)、CTKPTDGNCT(SEQ ID NO:20)、以及CTKPSDGNCT(SEQ ID NO:21)。

72.根据权利要求71所述的方法，其中，所述一种或多种肽缀合至载体蛋白。

73.根据权利要求72所述的方法，其中，所述载体蛋白是钥孔戚血蓝素(KLH)。

74.根据权利要求71所述的方法，其中，所述一种或多种肽是环状的。

用于治疗乙型肝炎感染的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年5月10日提交的美国临时专利申请No.62/669,663的权益和优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本技术涉及用于治疗乙型肝炎感染(包括慢性乙型肝炎(CHB))的组合物和方法。

背景技术

[0004] 在本说明书中对任何先前出版物(或从中获得的信息)的引用或对任何已知事物的引用,都不是并且也不应被视为承认或接受或以任何形式暗示该先前出版物(或从中获得的信息)或已知事物构成本说明书所涉领域的一般常识。

[0005] 乙型肝炎是最常见的病毒性肝炎,可能危及生命,具有长期并发症,并且是全世界主要的公共卫生挑战之一。目前,疫苗是对抗乙型肝炎感染的最有效工具。尽管疫苗的可用性减少了新的乙型肝炎病毒(HBV)感染的数量,但它并没有使已经被该病毒长期感染的2.57亿人受益(WHO实情报道 2018年7月18日)。据估计,2015年至2030年之间将累计发生6300万例慢性HBV感染的新病例,并有1700万例HBV相关的死亡(Nayagam等人. Lancet Infectious Dis 2016 16:1399-1408)。

[0006] 用乙型肝炎病毒(HBV)进行的慢性感染导致肝病(包括肝硬化和肝细胞癌(HCC))的临床结果。尽管30年前引入了预防性乙型肝炎疫苗,但慢性乙型肝炎(CHB)感染仍然是全球性的健康问题(Lozano R等人.Lancet 2012;380(9859):2095-128),占世界肝癌负担的50%以上。如果不治疗,约有三分之一的慢性乙型肝炎(CHB)个体将死于严重的肝病,诸如肝硬化、肝细胞癌(HCC)和肝衰竭。从数量上看,全世界估计有2.6至3.5亿人感染这种病毒,并且每年有780,000人死于HBV相关的肝病,包括肝硬化和肝癌(Lozano R 等人.Lancet.2012;380(9859):2095-128)。目前用于CHB的核苷(酸)类似物(NA)疗法有效地靶向病毒DNA抑制(无法检测到HBV DNA),但不能清除HBV表面抗原(HBsAg),其继续表达与持续发展的HCC风险相关 (Fattovich G等人.Am J Gastroenterol.1998;93(6):896-900;Yuen MF等人. Gastroenterology 2008;135(4):1192-1199)。乙型肝炎的完全治愈是由根除病毒及其所有复制性中间体定义的(Revill P等人.Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology,2016,13(4):239-248),目前认为这是不现实的结果。HBsAg丧失和/或血清转化为抗-HBs的临床终点是CHB疗法的当前目标,但很少实现。这种清除的基础可能是有效宿主抗病毒(抗体驱动的) 响应的选择性压力。然而,已证明CHB患者的先天性免疫应答和适应性免疫应答受到损害,其特征是次优抗原呈递、抗原特异性T细胞衰竭和抗体产生不足(Wang L等人.World J Hepatol.2015,7(30):2980-91)。因此,需要开发用于CHB的其他治疗方法。

[0007] 目前,基于优越的抗病毒功效和/或高抗性屏障,优选的一线治疗选择是聚乙二醇化干扰素α-2a(pegIFN-α)、恩替卡韦和替诺福韦。然而,即使采用一线治疗方案,pegIFN-α

也仅在30％的HBeAg阳性病例和40％的HBeAg 阴性病例中有效实现持续的病毒学应答，并且通常与严重的副作用有关。另一方面，核苷(酸)类似物具有良好的耐受性，并在绝大多数接受治疗的患者中有效抑制了HBV复制。然而，即使是最有效的核苷(酸)类似物也很少诱导HBV表面抗原(HBsAg)血清转化(这是对HBV的成功免疫学应答并具有完全且持久的感染控制或“功能性治愈”的标志)。因此，需要长期且可能终生的NA治疗来连续抑制HBV复制，这可与巨大的成本负担相关并受到药物相关毒性的限制。因此，迫切需要引入更安全有效地实现功能性治愈的治疗方案。

[0008] 传染性HBV病毒体是直径为42nm的球形颗粒，其由包装了病毒DNA 基因组的二十面体核衣壳和含有三个相关的跨膜蛋白(HBsAg)的脂蛋白包膜组成，所述跨膜蛋白被称为HBsAg-大(HBsAg-L)、HBsAg-中(M)和 HBsAg-小(S)。包膜蛋白的合成在三个不同的读框内翻译起始位点开始。因此，包膜蛋白具有称为S-结构域的共享区。HBsAg-S仅由含226个氨基酸 (aa)的S结构域组成；HBsAg-M含有另外的N-末端延伸，55个氨基酸的 preS2结构域；并且HBsAg-L含有preS2结构域和另外的108或119个氨基酸(基因型依赖性)N-末端延伸，称为preS1结构域。

[0009] 在内质网(ER)上存在脂质时HBsAg-S自组装的能力导致形成不含有任何其他HBV病毒组分的可分泌亚病毒颗粒(VLP)。HBsAg-S VLP的直径为 22至25纳米(nm)，高度紧凑，并且据估计一个颗粒含有大约一百个 HBsAg-S分子。HBsAg-M也形成可分泌的VLP。HBsAg-L也形成不可完全分泌的VLP。

[0010] HBsAg颗粒形成是一个复杂的过程。颗粒形成的第一步是将蛋白质共翻译插入ER膜中，该膜带有短的管腔暴露的N-末端序列、由57aa的胞质环隔开的两个跨膜区和含有主要B-细胞表位(‘a’-决定簇)的管腔外部70aa 结构域。HBsAg-S VLP具有高度紧凑的结构，这是由于单个亚基内部和之间存在大量的分子内和分子间二硫键导致的。

[0011] VLP是领先的创新生物纳米技术载体和疫苗开发的工具，并且与传统疫苗相比，它们具有许多优势。VLP不含有病毒遗传物质，并具有病毒结构蛋白的高密度展示，有效触发B细胞和/或T细胞应答的免疫系统的关键部分(Buonaguro L等人，(2011)，Expert Rev Vaccines 10:1569-1583；Jennings GT和Bachmann MF.(2009)Annu Rev Pharmacol Toxicol.2009,49:303-326；Pushko P等人，Intervirology 2013,56:141-165)。

[0012] 已将基于衣壳蛋白(例如HBV、人乳头瘤病毒(HPV)以及Qβ噬菌体)的嵌合VLP工程化，以表达外源抗原序列(包括非病原体相关的抗原，诸如分别用于戒烟和克服高血压的烟碱和血管紧张素II)(Ambühl PM等人.J. Hypertension.2007,25:63-72；Buonaguro L等人.Exp.Rev.Vaccines 2011, 10:1569-1583；Cornuz J等人.PlosOne 2008,3:e2547)。与仅由蛋白质亚基组成的衣壳VLP相比，基于HBV的HBsAg-S VLP由包膜蛋白和脂质组成，ER是组装的细胞位置。为了将抗原序列呈递给免疫系统，HBsAg-S VLP 已经被修饰以携带外源表位(Delpeyroux F等人.Science 1986,233:472-475； Eckhart L.等人.J.Gen.Virology 1996,77:2001-2008；Fomsgaard A.等人. Scand.J.Immunol.1998,47:289-295；Phogat S.等人.Virology 2008, 373:72-84；Netter HJ等人.J.Virology 2001, 75:2130-2141)。开发由HBsAg-L 组成的VLP作为基因和药物的递送系统至人肝细胞(Yamada T等人. Nature Biotechnology 2003,21:885-890)。鸭乙型肝炎病毒包膜蛋白和其他嗜肝DNA病毒(hepadnaviral)包膜蛋白已经被修饰，以表达目标抗原，作为 VLP的一部

分。

[0013] 由来自HBV的小包膜蛋白(HBsAg-S)组成的VLP是成功的保护性疫苗的抗原组分(Jilg W等人.Lancet ii 1984,1174-1175;Zuckerman JN.J Med Virology 2006,78:169-177)。然而,即使有疫苗的可用性,乙型肝炎仍然是巨大的健康问题。

[0014] 疫苗开发中的重要问题是老化的免疫系统的能力下降和免疫衰老与老年人疫苗效力下降有关(Derhovanessian E和Pawelec G.Microbial Biotechnology 2012,5:226-232;Pera A等人.Maturitas 2015,82:50-55)。

[0015] 在血清转化为抗-HBs的不存在下或存在下HBsAg丧失的终点与血清中不可检测水平的HBV DNA结合是当前CHB疗法的目标,但很少实现。这种清除的基础大概是有效的宿主抗病毒(抗体驱动的)应答的选择性压力。然而,已证明CHB患者中的先天性免疫应答和适应性免疫应答受到损害,其特征是次优抗原呈递、抗原特异性T细胞衰竭和不足抗体产生(Wang L 等人.World J Hepatology 2015,7(30):2980-2991)。

[0016] 需要开发用于治疗CHB的有效的B细胞疫苗。特别地,需要开发能够实现功能性治愈的治疗方案。

发明内容

[0017] 在一方面,本公开提供了包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA 病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组病毒样颗粒抗原(VLP-Ag),其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0018] 在一些实施方式中,环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义,其中,$X_1$是K或R,$X_2$是T或M,$X_3$是T或I,$X_4$是P T或L,$X_5$是A或V,$X_6$是N或T,并且$X_7$是F或Y;或其中,一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义,其中, X_8是K或R,X_9是T或M,X_{10}是T、I或S,并且X_{11}是P、T或L。

[0019] 在一些实施方式中,环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义,其中,X_{12}是T或S;并且X_{13}是T或S。

[0020] 在一些实施方式中,一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组:PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0021] 在一些实施方式中,嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0022] 在一方面,本公开提供了编码本技术的VLP-Ag的核酸。在一方面,本公开提供了包含该核酸的表达载体。

[0023] 在一方面,本公开提供了包含本技术的VLP-Ag和药学上可接受的载体的组合物。

[0024] 在一方面,本公开提供了治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的方法,其包括向对象施用包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜 HBsAg-S融合蛋白的重组VLP-Ag,其中,所述抗原表位重复区选自由以下组成的组:HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0025] 在一些实施方式中,环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列

$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0026] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0027] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0028] 在一些实施方式中，嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0029] 在一方面，本公开提供了重组VLP-Ag在用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的药剂的制造中的用途，其中，VLP-Ag包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0030] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0031] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0032] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0033] 在一些实施方式中，嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0034] 在一方面，本公开提供了用于诱导对象中的针对乙型肝炎病毒的免疫应答的方法，其包括向对象施用包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组VLP-Ag，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0035] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0036] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0037] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)

TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0038] 在一些实施方式中，嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0039] 在一方面，本公开提供了重组VLP-Ag在制造用于诱导针对乙型肝炎的免疫应答的组合物中的用途，其中，VLP-Ag包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0040] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0041] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原包膜重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0042] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0043] 在一些实施方式中，嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0044] 在一方面，本公开提供了用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的试剂盒，所述试剂盒包含重组VLP-Ag，其中，VLP-Ag包含含有一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0045] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0046] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0047] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0048] 在一些实施方式中，嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0049] 在一方面，本公开提供了编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA 病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组mRNA，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0050] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0051] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0052] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0053] 在一些实施方式中，经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0054] 在一方面，本公开提供了包含本技术的重组mRNA的表达载体。在一方面，本公开提供了包含重组mRNA和药学上可接受的载体的组合物。

[0055] 在一方面，本公开提供了治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的方法，其包括向对象施用编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜 HBsAg-S融合蛋白的重组mRNA，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0056] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0057] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0058] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0059] 在一些实施方式中，经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0060] 在一方面，本公开提供了重组mRNA在制造用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的药剂中的用途，其中，重组mRNA编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0061] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0062] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列

CCCTKPX$_{12}$DGNCX$_{13}$定义，其中，X$_{12}$是T或S；并且X$_{13}$是T或S。

[0063] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0064] 在一些实施方式中，嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0065] 在一方面，本公开提供了用于诱导对象中针对乙型肝炎病毒的免疫应答的方法，其包括向对象施用编码包含一个或多个抗原表位重复区的经修饰的嗜肝 DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白的重组mRNA，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0066] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列CX$_1$TCX$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QGX$_6$SMX$_7$PC定义，其中，X$_1$是K或R，X$_2$是T或M，X$_3$是T或I，X$_4$是P T或L，X$_5$是A或V，X$_6$是N或T，并且X$_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列PCX$_8$TCX$_9$X$_{10}$X$_{11}$定义，其中，X$_8$是K或R，X$_9$是T或M，X$_{10}$是T、I或S，并且X$_{11}$是P、T或L。

[0067] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列CCCTKPX$_{12}$DGNCX$_{13}$定义，其中，X$_{12}$是T或S；并且X$_{13}$是T或S。

[0068] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0069] 在一些实施方式中，经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0070] 在一方面，本公开提供了重组mRNA在制造用于诱导针对乙型肝炎的免疫应答的组合物中的用途，其中，重组mRNA编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0071] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列CX$_1$TCX$_2$X$_3$X$_4$X$_5$QGX$_6$SMX$_7$PC定义，其中，X$_1$是K或R，X$_2$是T或M，X$_3$是T或I，X$_4$是P T或L，X$_5$是A或V，X$_6$是N或T，并且X$_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列PCX$_8$TCX$_9$X$_{10}$X$_{11}$定义，其中，X$_8$是K或R，X$_9$是T或M，X$_{10}$是T、I或S，并且X$_{11}$是P、T或L。

[0072] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列CCCTKPX$_{12}$DGNCX$_{13}$定义，其中，X$_{12}$是T或S；并且X$_{13}$是T或S。

[0073] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0074] 在一些实施方式中，经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0075] 在一方面，本公开提供了用于治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的试剂盒，所述试剂盒包含重组mRNA，其中，重组mRNA编码包含一个或多个抗原表位重复区的嗜肝DNA病毒包膜HBsAg-S融合蛋白，其中，所述抗原表位重复区选自由以下组成的组：HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位。

[0076] 在一些实施方式中，环1中表达的一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$定义，其中，$X_1$是K或R，$X_2$是T或M，$X_3$是T或I，$X_4$是P T或L，$X_5$是A或V，$X_6$是N或T，并且$X_7$是F或Y；或其中，一个或多个抗原表位重复区由氨基酸序列$PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$定义，其中，X_8是K或R，X_9是T或M，X_{10}是T、I或S，并且X_{11}是P、T或L。

[0077] 在一些实施方式中，环2中表达的一个或多个抗原表位重复区由共有氨基酸序列$CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$定义，其中，X_{12}是T或S；并且X_{13}是T或S。

[0078] 在一些实施方式中，一个或多个抗原表位重复区选自由以下组成的组：PCKTCTTP、PCRTCTTP、CTKPTDGNC、CKTCTTPAQGNSMFPS、CTKP(T/S)TDGNC、PC(K/R)TC(T/M)TP、C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS、PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC、以及PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC。

[0079] 在一些实施方式中，经修饰的嗜肝DNA病毒包膜融合蛋白包含在抗原表位重复区和包膜蛋白之间的间隔子结构域。

[0080] 在一方面，本公开提供了包含选自由以下组成的组的一种或多种肽的组合物：TCTTPAQGNSMFPSC(SEQ ID NO:17)、TCTIPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO: 18)、TCTTPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:19)、CTKPTDGNCT(SEQ I DNO:20)、以及CTKPSDGNCT(SEQ ID NO:21)。

[0081] 在一些实施方式中，其中，所述一种或多种肽缀合至载体蛋白。在一些实施方式中，所述载体蛋白是钥孔戚血蓝素(KLH)。在一些实施方式中，所述一种或多种肽是环状的。在一些实施方式中，所述组合物还包含药学上可接受的载体。

[0082] 在一方面，本公开提供了治疗有需要的对象中的乙型肝炎感染的方法，其包括向对象施用选自由以下组成的组的一种或多种肽：TCTTPAQGNSMFPSC (SEQ ID NO:17)、TCTIPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:18)、TCTTPAQGTSMFPSC (SEQ ID NO:19)、CTKPTDGNCT(SEQ I DNO:20)、以及CTKPSDGNCT(SEQ ID NO:21)。

[0083] 在一些实施方式中，所述一种或多种肽缀合至载体蛋白。在一些实施方式中，所述载体蛋白是钥孔戚血蓝素(KLH)。在一些实施方式中，所述一种或多种肽是环状的。

附图说明

[0084] 图1是显示HBsAg表位占据率试验的图形表示。1.磁珠；2.捕获Ab:小鼠抗-HBs单克隆抗体(mAb)至HBsAg外部区；3.参考HBsAg样品。仅Ag vs与抗-HBs样品结合的Ag；4.报告Ab:PE缀合的多克隆抗-HBs。NCP:非清除特性；CP:清除特性。

[0085] 图2是功能性CHB治愈(测定1)和免疫Ab应答活性(测定2)的预测性生物标志物的图形表示。测定1(上图)：1.磁珠；2.捕获Ab:多重小鼠抗-HBs mAb 至HBsAg‘外部区’；3.患者HBsAg样品；4.报告Ab:PE缀合的多克隆抗-HBs。测定2(下图)：1.磁珠；2.捕获Ab:二重小鼠抗-HBs mAb至HBsAg‘外部区’； 3.患者样品:复合的抗-HBs(含HBsAg)；4.报告Ab:HRP缀合的山羊抗-人IgG Fc结构域。

[0086] 图3是显示展示HBsAg清除特性(CP)的CHB治愈患者的图形表示。CHB:慢性乙型肝

炎。

[0087] 图4是显示展示HBsAg非清除特性(NCP)的非治愈/非应答患者的图形表示。RFU:相对荧光单位。

[0088] 图5是显示小的乙型肝炎表面(包膜)抗原(HBsAg-S)(226个氨基酸长和ayw 亚型(基因型D))的提出的结构的综述的示意图。放大HBsAg-S的氨基酸100和 160之间的外部抗原环区:每个氨基酸由灰色圆圈表示,半胱氨酸残基显示为黑色圆圈,潜在的-S-S-二硫键突出显示。位置146处的糖基化位点(天冬酰胺)以白色显示,并且指示聚糖结构。用于插入外源序列的位置位于氨基酸127和128 处。

[0089] 图6是显示BNP 1、BNP 2、BNP 3和BNP 4的226个氨基酸长的HBsAg-S 蛋白的提出的折叠的示意图。放大HBsAg-S的氨基酸100与160之间的外部抗原环区:每个氨基酸由灰色圆圈表示,半胱氨酸残基显示为黑色圆圈,潜在的 -S-S-二硫键突出显示。位置146处的糖基化位点(天冬酰胺)以白色显示,并且指示聚糖结构。用于插入外源序列的位置位于氨基酸127和128处,HBsAg-S序列亚型ayw用作亲本模板。将另外的HBsAg-S来源的抗原序列在位置127和128 处插入亲本模板中。右图显示BNP 1、BNP 2、BNP 3和BNP 4(SEQ ID NO:41-44,以出现的顺序)的治愈相关的环序列,HBsAg-S-特异性抗原序列呈粗体,“GSGS”接头呈斜体并且加下划线。BNP-1是具有三聚体PCKTCTTP(SEQ ID NO:28)插入物(环1,基因型A特异性,血清型adw)的‘ayw’亲本模版;BNP-2是具有三聚体PCRTCTTP(SEQ ID NO:33)插入物(环1,基因型B/C,血清型ayw)的‘ayw’亲本模板;BNP-3是具有环2序列CTKPTDGNC(SEQ ID NO:34)(源自血清型‘adw’)的三聚体插入物的‘ayw’亲本模板;BNP-4是具有延伸的环1序列CKTCTTPAQGNSMFPS(SEQ ID NO:35)(血清型‘adw’)的插入物(二聚体)的‘ayw’亲本模板。

[0090] 图7是显示BNP 5的226个氨基酸长的HBsAg-S蛋白的提出的折叠的示意图。放大HBsAg-S的氨基酸100至160的外部抗原环区:每个氨基酸由灰色圆圈表示,半胱氨酸残基显示为黑色圆圈,潜在的-S-S-二硫键突出显示,“GSGS”接头由条纹圆圈显示。位置146处的糖基化位点(天冬酰胺)以白色显示,并且指示聚糖结构。将两条另外的环2序列添加至野生型环以生成重复结构。将环2 CTKP(T/S)TDGNC(SEQ ID NO:36)序列重复加框。右图显示序列(SEQ ID NO: 45),HBsAg-S-特异性抗原序列呈粗体,“GSGS”接头呈斜体,并且加下划线。BNP-5是亲本‘ayw’,具有三聚体环2区的亲本模板。将‘ayw’环2序列延伸另外两条‘adw’环2序列。

[0091] 图8是显示BNP 6的226个氨基酸长的HBsAg-S蛋白的提出的折叠的示意图。放大HBsAg-S的氨基酸100至160的外部抗原环区:每个氨基酸由灰色圆圈表示,半胱氨酸残基显示为黑色圆圈,潜在的-S-S-二硫键突出显示,“GSGS”接头由条纹圆圈显示。位置146处的糖基化位点(天冬酰胺)以白色显示,并且指示聚糖结构。在相应的环序列内添加两条另外的环1PC(K/R)TC(T/M)TP(SEQ ID NO:37)序列和环2CTKP(T/S)TDGNC(SEQ ID NO:36)序列。将环1和环2 序列重复加框。右图显示延伸的序列(SEQ ID NO:46和47,以出现的顺序),HBsAg-S-特异性抗原序列呈粗体,“GSGS”接头呈斜体并加下划线。插入两条另外的环1序列(血清型adw),然后是亲本模板的原始环1序列(血清型ayw)。原始环2序列(亲本血清型ayw),然后是两条插入的环2序列,血清型adw。

[0092] 图9是显示BNP 7的226个氨基酸长的HBsAg-S蛋白的提出的折叠的示意图。放大HBsAg-S的氨基酸100和160之间的外部抗原环区:每个氨基酸由灰色圆圈表示,半胱氨酸残

基显示为黑色圆圈，潜在的-S-S-二硫键突出显示，“GSGS”接头由条纹圆圈显示。位置146处的糖基化位点(天冬酰胺)以白色显示，并且指示聚糖结构。在环1序列内添加两条另外的环1 C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS(SEQ ID NO:38)序列。将环1重复加框。野生型HBsAg-S序列的原始氨基酸位置未改变，并且将另外的氨基酸用‘和“标记。右图显示延伸的序列(SEQ ID NO:52、48和49，以出现的顺序)，HBsAg-S-特异性抗原序列呈粗体，“GSGS”接头呈斜体并且加下划线。插入两条延伸的环1序列(血清型adw)，氨基酸序列121至136，然后是原始的环1序列(血清型ayw)。

[0093] 图10是显示BNP 8的226个氨基酸长的HBsAg-S蛋白的提出的折叠的示意图。放大HBsAg-S的氨基酸100和160之间的外部抗原环区：每个氨基酸由灰色圆圈表示，半胱氨酸残基显示为黑色圆圈，潜在的-S-S-二硫键突出显示，“GSGS”接头由条纹圆圈显示。位置146处的糖基化位点(天冬酰胺)以白色显示，并且指示聚糖结构。重复环1区和环2区。野生型HBsAg-S序列的原始氨基酸位置未改变，并且重复的环1和环2的另外氨基酸用‘标记。BNP-8含有原始的环1区和环2区(‘ayw’，氨基酸(aa)120-147)，然后是另外的环1和环2‘adw’序列(aa 120-147)。

[0094] 图11是显示CP-BNP 1、CP-BNP 2、CP-BNP 3和CP-BNP 4制备物及CP-BNP 1+3、CP-BNP 1+3+4和CP-BNP 3+4制剂的HBsAg表位曲线(bioplex平台)分析的图。CP-BNP掺入展示的环1(CP-BNP 1、CP-BNP 2、CP-BNP 4)或环2(CP-BNP 3)特异性“清除”表位插入物以在免疫之后诱导靶向的“清除”抗-HBs抗体应答。HBsAg表位曲线分析指示在所有测试的CP-BNP制备物和制剂中，将跨过环1 和环2两者的表位保留(在+/-0.5倍的正常范围内)和/或增强(>0.5倍)，表明正确且完整地展示出对靶“清除”表位的抗原性，其最强/最宽的表位保留在BNP制剂中实现。

[0095] 图12是显示对环状肽生成的衍生的且经纯化的单克隆抗体分析的图。该图显示了在用环1或环2泛-基因型/血清型环化肽制剂免疫之后，抗-HBs抗体诱导的所选的生成的单克隆抗体的CP曲线(bioplex平台)分析。分析了所生成的单克隆抗-HBs抗体n＝8在与参考VLP抗原一起预孵育之后IndCP的诱导(例如，丧失环1和环2表位处的表位识别)，指示“清除”或CP-相关的抗-HBs曲线。

[0096] 图13A至图13D是显示CP-BNP抗原免疫后的抗-HBs抗体反应性分析的图表。在用CP-BNP 1+3、CP-BNP 1+3+4和CP-BNP 3+4制剂的CP-BNP 1、CP-BNP 2、CP-BNP 3和CP-BNP 4制备物n＝3次免疫之后，对动物血液(血液1-4，或对所有血液取平均值)进行血清的标准酶免疫测定(EIA)分析。分析经诱导的抗体应答的对以下的特异性：重组WT HBsAg(VLP)(图13A)；HBsAg环1特异性环化肽(图13B)；以及HBsAg环2特异性环化肽(图13C)。图13D报告了对 WT-BNP、环1肽和环2肽抗原的抗-Hbs反应性。观察到了递送环1和环2(环形)的靶“清除”表位的CP-BNP制剂1+3+4、1+4+5、5+7和5的最强、最快速、最广泛或最保守的(对VLP及环1肽和环2肽两者)抗-HBs抗体免疫原性应答。

[0097] 图14是显示在用CP-BNP 1、CP-BNP 3、CP-BNP 4、CP-BNP 5和CP-BNP 7制备物的单个或组合免疫接种之后，对选定血清应答的抗-HBs抗体诱导的CP 特性(bioplex平台)分析的图表。用CP-BNP制备物和制剂n＝3次免疫方案之后，对终末血液血清进行抗-HBs抗体特性分析。评估了参考VLP抗原+/-与来自免疫原性研究的抗-HBs阳性个体小鼠血清预孵育的HBsAg表位曲线由于血清中的“清除”或CP-相关的抗-HBs而对CP的诱导。这种靶向的“清除”

表位抗-HBs 发展在接受CP-BNP 1+4+5、CP-BNP 1+3+4、CP-BNP 5、或CP-BNP 5+7制剂免疫接种的小鼠(9-5、13-2、16-5和17-3)中最一致地观察到。

[0098] 图15A至图15C是显示在CHB感染的鼠模型中各种CP-BNP组合的治疗性疫苗接种后,HBV DNA(log10 IU/mL)水平相对于基线(W10)的变化的图。0.5 μg剂量的CP-BNP 1+4+5相对于相同剂量的安慰剂或WT-BNP具有HBV DNA 的最快速和绝对持续的降低。其他CP-BNP组合也降低了HBV DNA水平,但与CP-BNP 1+4+5相比,其以更慢的速率和较不绝对的下降来降低HBV DNA水平。

[0099] 图16A至图16C是显示在CHB感染的鼠模型中各种CP-BNP组合的治疗性疫苗接种之后相对于基线(W10)的HBsAg(log10 IU/mL)水平变化的图。0.5μg 剂量的CP-BNP 1+4+5相对于相同剂量的安慰剂或WT-BNP具有最快且绝对持续的HBsAg下降。其它CP-BNP组合也降低了HBV DNA水平,但与CP-BNP 1+4+5相比,其以更慢的速率和较不绝对的下降来降低HBV DNA水平。

[0100] 图17A至图17B是显示在体外转录和转染至HEK293T(图17A)和Huh7(图 17B)细胞系中之后,从RNA的WT-BNP和CP-BNP 4的HBsAg BNP表达的蛋白质分析的图。使用抗-HBsAg抗体,HBsAg条带(+/-糖基化,～50％)在WT-BNP (24或27kDa)和CP-BNP 4(29或32kDa)中检测到,在转染适当的mRNA至两个细胞系中之后产生。未处理和试剂试验对照转染对于HBsAg是阴性的。对照包括来自在转染WT-BNP DNA(具有Flag标签,25或28kD)之后的经纯化的HBsAg(具有Flag标签,25或28kD)和样品。mRNA转录物在Flag标签的不存在下编码WT-BNP或BNP4-特异性HBsAg亚基。

具体实施方式

[0101] 应当理解,下面以各种详细程度描述了本技术的某些方面、模式、实施方式、变化和特征,以便提供对本技术的实质理解。下面提供了本说明书中使用的某些术语的定义。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语通常具有与本技术所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0102] I.概要

[0103] 功能性乙型肝炎治愈被定义为在有或没有血清转化为抗-HBsAg抗体(“抗-HBs”)的情况下的HBsAg丧失,同时维持血清HBV DNA不可检测性(Revill P等人.Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology.2016,13(4):239-248))。本文描述了掺入增强的清除特性(CP)-相关的表位的抗原展示的HBsAg生物纳米颗粒(BNP)以模拟CP的选择性压力并促进有效且特异性的B细胞抗-HBs免疫应答用于HBsAg清除。BNP的免疫原性最初在正常BALB/c小鼠中得到验证,然后在新开发并验证的CBA Carter J(CBA/CaJ)鼠CHB模型中评价治疗性疫苗接种结果以驱动HBsAg清除和血清转化(参见,例如Chen HH等人.PNAS 112(7):2175-2180(2015))。在一些实施方式中,CP-表达性BNP治疗疫苗当递送至CHB患者时的目的是加速并驱动功能性乙型肝炎治愈。在一些实施方式中, CP-表达性BNP的治疗功能还可以通过以下来增强:高度糖基化修饰以增强并加速B细胞应答并促进HBsAg血清转化,和/或修饰BNP递送主链以诱导CHB 患者中的BNP的“隐秘”状态至潜在预存的、中和的、但未清除的循环抗-HBs 抗体。

[0104] II.定义

[0105] 本文使用以下术语,仅提供其定义用于指导。

[0106] 如在本说明书中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个方面,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一个特性”包括单个特性,以及两个或多个特性;提及“一个表位”包括单个表位,以及两个或多个表位,“一个抗体”包括单个抗体,以及两个或多个抗体;提及“本公开”包括本公开教导的单个和多个方面;以此类推。

[0107] 术语“约”和通常使用的范围(无论是否由术语约限定)意味着所理解的数字不限于本文所述的确切数字,并且旨在指代基本上在所引用范围内的范围,而不偏离本技术的范围。如本文所用,“约”将被本领域普通技术人员所理解,并且在其使用的上下文中会有所不同。如果在给定使用上下文的情况下存在对本领域普通技术人员而言不清楚的术语使用,则“约”表示特定术语的正或负10%。

[0108] 术语“抗原”在本文中以其最广泛的含义使用,是指能够在免疫应答中反应和/或诱导免疫应答的物质。提及“抗原”包括抗原决定簇或表位。

[0109] “抗原决定簇”或“表位”意指抗原分子中的特定免疫应答所针对的部分,并且包括半抗原。通常,在动物中,抗原同时呈递几个或甚至许多抗原决定簇。“半抗原”是可以与抗体特异性结合但不能或仅较差地诱导免疫应答、除非与载体结合的物质。半抗原通常包含单个抗原决定簇或表位。

[0110] 如本文所用,术语“生物纳米颗粒”或“BNP”是指已经修饰以包含或呈递一种或多种靶插入物表位的病毒样颗粒(VLP)。出于本公开的目的,术语“生物纳米颗粒”或“BNP”也是指“重组病毒样颗粒抗原”或“VLP-Ag”。

[0111] 如本文所用,术语“有效量”或“治疗有效量”或“药学上有效量”是指足以实现所期望的生物学、治疗和/或预防作用的量,例如导致预防疾病、疾患和/或其症状的量。在治疗或预防应用的上下文中,施用给对象的组合物的量将取决于疾病的类型和严重性以及个体的特征,诸如总体健康状况、年龄、性别、体重和对组合物药物的耐受性。它还将取决于疾病或疾患的程度、严重性和类型。技术人员将能够根据这些和其他因素确定适当的剂量。在一些实施方式中,施用多个剂量。另外地或替选地,在一些实施方式中,施用多种治疗性组合物或化合物(例如,免疫原性组合物,诸如疫苗)。

[0112] 如本文所用,术语“功能性治愈”是指CHB的功能性治愈,并且定义为在存在或不存在天然存在的或引入的抗-HBsAg抗体(在本文中也称为“抗 -HBs抗体”或“抗-HBs”)的情况下可检测的HBsAg丧失,其包括选择性结合至HBsAg上的选定表位的抗体群,其当被抗-HBs抗体占据时,导致HBsAg 和最终HBV的清除。在完全治愈的对象中无法检测到HBV。

[0113] 术语“免疫原性组合物”在本文中用于指代将在已经暴露于组合物的哺乳动物中引发免疫应答的组合物。在一些实施方式中,免疫原性组合物包含八种CP-BNP(例如,BNP 1、BNP 2、BNP 3、BNP 4、BNP 5、BNP 6、 BNP 7、BNP 8)和/或CP表位环状肽中的至少一种。

[0114] 在一些实施方式中,本文所述的免疫原性组合物可以多种方式配制以用于施用。例如,在一些实施方式中,制备免疫原性组合物以用于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、经口、经鼻或局部施用。还可配制组合物以用于特定剂型。例如,在一些实施方式中,可将免疫原性组合物配制为液体、凝胶剂、气雾剂、软膏剂、乳膏剂、冻干制剂、粉剂、蛋糕、片剂或胶囊剂。在其他实施方式中,将免疫原性组合物配制为控制释放制剂、延迟释放制剂、延缓释放制剂、脉动释放制剂和混合立即释放制剂。在一些实施方式中,提供呈液体的免疫原性组合

物。在其他实施方式中，提供呈冻干形式的免疫原性组合物。

[0115] 如本文所用，术语“感染的”是指携带疾病或病原体，诸如病毒。感染可以是有意的，诸如通过施用病毒或病原体(例如，通过疫苗接种)，或者是无意的，诸如通过从一个生物体天然转移病原体至另一个生物体，或从受污染的表面至生物体。在一些实施方式中，通过使用流体动力注射方法在体内转染可复制的DNA，从而在模型生物体(例如鼠模型)中诱导感染。

[0116] 如本文所用，“对象”和“患者”可互换使用并是指动物，例如任何脊椎动物物种的成员。在一些实施方式中，对象是人。

[0117] 如本文所用，术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“缓解(alleviation)”是指治疗性治疗，其中，目的是减少、缓解或减慢目标病理学疾患或病症的进展或推进，和/或逆转目标病理学疾患或病症的进展。例如，成功“治疗”对象的现存和/或持续的乙型肝炎感染，包括慢性乙型肝炎(CHB)感染，如果在接受治疗量的本技术的组合物之后，根据本文所述的方法，对象显示了可观察的和/ 或可测量的清除HBsAg的抗体的诱导，和/或可检测的HBsAg丧失，和/或降低水平的HBsAg和/或HBV DNA。

[0118] 本文使用的术语“疫苗”是指施用给对象以产生或增加对特定疾病的免疫力的组合物。在一些实施方式中，疫苗包含药学上可接受的佐剂和/或药学上可接受的载体。

[0119] 如本文所用，“BNP 1”或“CP-BNP 1”是指SEQ ID NO:1，编码SEQ ID NO 1中所示的氨基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:9所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:1的病毒样颗粒(VLP)或生物纳米颗粒(BNP)，包含SEQ ID NO:1的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:1的疫苗。

[0120] 如本文所用，“BNP 2”或“CP-BNP 2”是指SEQ ID NO:2，编码SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:10所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:2的VLP或BNP，包含SEQ ID NO:2的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:2的疫苗。

[0121] 如本文所用，“BNP 3”或“CP-BNP 3”是指SEQ ID NO:3，编码SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:11所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:3的VLP或BNP，包含SEQ ID NO:3的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:3的疫苗。

[0122] 如本文所用，“BNP 4”或“CP-BNP 4”是指SEQ ID NO:4，编码SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:12所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:4的VLP或BNP，包含SEQ ID NO:4的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:4的疫苗。

[0123] 如本文所用，“BNP 5”或“CP-BNP 5”是指SEQ ID NO:5，编码SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:13所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:5的VLP或BNP，包含SEQ ID NO:5的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:5的疫苗。

[0124] 如本文所用，“BNP 6”或“CP-BNP 6”是指SEQ ID NO:6，编码SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:14所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:6的VLP或BNP，包含SEQ ID NO:6的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:6的疫苗。

[0125] 如本文所用，“BNP 7”或“CP-BNP 7”是指SEQ ID NO:7，编码SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:15所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:7的VLP或BNP，包含SEQ ID NO:7的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:7的疫苗。

[0126] 如本文所用，“BNP 8”或“CP-BNP 8”是指SEQ ID NO:8，编码SEQ ID NO:8所示的氨

基酸序列的核苷酸序列，诸如SEQ ID NO:16所示的核苷酸序列，包含SEQ ID NO:8的VLP或BNP，包含SEQ ID NO:8的免疫原性组合物，或包含SEQ ID NO:8的疫苗。

[0127] 如本文所用，“清除特性(CP)表位环状肽1”是指SEQ ID NO:17。如本文所用，“CP表位环状肽2”是指SEQ ID NO:18。如本文所用，“CP表位环状肽3”是指SEQ ID NO:19。如本文所用，“CP表位环状肽4”是指SEQ ID NO:20。如本文所用，“CP表位环状肽5”是指SEQ ID NO:21。

[0128] 如本文所用，导致功能性治愈的抗-HBs应答内的抗体被称为“清除抗体”。这些抗体定义了靶向特定HBsAg表位并最终导致HBsAg清除和功能性治愈的抗体的“清除特性”。表位也被称为“清除表位”，意指一旦在宿主对象中被抗体占据，则对象将产生或可能产生功能性治愈。因此，“清除特性”可以是指HBsAg上不可获得表位的指纹，或者指占据这些表位并且当它们的确占据表位时预测实现了功能性治愈的一套或一群个体抗体的指纹。HBsAg上的抗体或表位的清除特性代表接受治疗的对象将实现功能性治愈的潜能或可能性的生物标志物。提及功能性治愈的“可能性”通常意指可能性为100％，也就是说，一旦检测到抗体的清除特性，对象将达到功能性治愈状态或在没有循环HBsAg的情况下已经实现了功能性治愈。然而，如同在任何生物系统中一样，可变性会发生。因此，出于本技术的目的，提及功能性治愈的“可能性”意指具有抗体清除特性的对象将达到功能性治愈的至少80％概率。“至少80％”意指80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、 87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％。

[0129] HBsAg上的“表位的清除特性(clearance profile of epitopes)”或“表位的 CP”是HBsAg上存在具有待被清除抗体占据的潜能的可用或不可用的表位。当HBsAg上表位的清除特性不包含可用于结合的表位时，则认为表位是“不可用的”，并且这意味着表位被抗体占据并且将可能发生功能性治愈。或者，如果未检测到HBsAg，也未检测到任何循环的HBV DNA，则已经实现了功能性治愈，并且仅存在抗体的清除特性(或可以在暴露于HBV之后的免疫应答中被诱导)。

[0130] 术语“标准化的”还涵盖HBsAg或HBsAg-Ab复合物的水平的“归一化”，并且代表用于测定的HBsAg或HBsAg-Ab复合物的最佳水平。“血液-来源的样品”包括血清。

[0131] III.慢性乙型肝炎(CHB)功能性治愈

[0132] 血清HBsAg的清除和/或血清转化为抗-HBs以及无法检测到的血清 HBV DNA被认为是CHB的功能性治愈，因为它不仅允许停止疗法，而且还与肝硬化比率和肝细胞癌(HCC)发生率显著降低以及总存活率增加相关 (Fattovich G等人.Am J Gastroenterol.1998;93(6):896-900;Yuen MF等人. Gastroenterology 2008,135(4):1192-1199;Simonetti J等人.Hepatology 2010, 51:1531-1537)。在急性乙型肝炎感染的自发消退过程中，HBV-特异性T细胞和B细胞的协同相互作用消除了感染的肝细胞，经由非溶细胞途径抑制了病毒复制，并通过产生病毒特异性抗体(抗-HBs)中和了病毒体。慢性感染表示宿主免疫应答无法控制HBV复制，并且HBsAg的自发清除很少见且发现仅在1％至2％的患者中发生。目前的抗病毒疗法并未提高该比率，但是与这种自发性丧失相关的关键因素是HBsAg的低血清水平<100IU/ml (Tseng TC等人.Gastroenterology 2011,141(2):517-525,25e1-2)，并且经设计达到该水平的策略将成为治疗全部设备的一部分。尚不清楚与HBsAg损失和/或血清转化有关的一种或多种机制，但已证明，有效的B细胞应答对于维持功能性乙型肝炎治愈至关重

要,并且B-细胞耗竭疗法(例如利妥昔单抗,抗-CD 20)与HBV再活化相关,从而导致肝功能衰竭和死亡(Shouval D. Semin Liver Dis.2013;33(2):167-177)。临床和诊断观察表明,在CHB患者中存在编码与同源HBsAg亲和力低的抗-HBs的B细胞克隆(Gerlich WH. Clin Infect Dis.2007;44(9):1170-1172)。HBsAg-阳性的CHB患者中同时表达的抗-HBs进一步表明,抗-HBs应答在数量和/或质量上不足够或不充分 (弱)以克服慢性感染,但确实表明并未完全抑制特异性抗体产生(Zhang JM 等人.Clin Infect Dis.2007;44(9):1161-1169)。

[0133] IV.慢性乙型肝炎(CHB)疾病

[0134] 慢性乙型肝炎(CHB)是一种传染病,涵盖五个可识别且独立的阶段:阶段1是免疫耐受(IT)阶段,涵盖从感染和建立慢性感染到活跃疾病的最初体征的时间。它通常是无症状的(无明显肝病),并且这些个体在出生时或此后不久就获得了感染,并且他们是HBeAg阳性的。阶段2或免疫清除(IC) 阶段是一种在人的肝病中具有显著进展的疾病活跃期。这些患者也是 HBeAg阳性的。在阶段3或非复制阶段(NR)中,几乎没有或没有活跃肝病的证据;可以鉴定出低水平的病毒,并且人是HBeAg阴性的。阶段4是肝病活性和病毒复制的复发或再发作,并且该阶段也称为HBeAg阴性疾病。这个阶段往往会最终自行消失,然后患者通常具有肝硬化。最后阶段、即阶段5,被鉴定为HBsAg丧失和抗-HBs血清转化。这也被认为是功能性治愈(FC)阶段。

[0135] CHB包含至少4种不同的基于HBV基因型的疾病。因此,可以将 CHB归类为亚洲CHB(基因型B和C)、欧洲CHB(基因型A-2和D)、非洲 CHB(基因型A-1和E)和拉丁美洲CHB(基因型F和H),并且这4个组中的每者分别都有不同的种族(亚洲人对比欧洲人/高加索人对比非洲人对比拉丁美洲人)、获得的年龄(围产期对比幼儿期对比成年早期)和传播模式(母亲至婴儿、儿童至儿童、文化上的割痕、医源性/胃肠外和性的)。不同基因型 (例如,A和D,或B和C)之间的重组不是常见的。可以根据HBeAg和疾病状况进一步将CHB分类;HBeAg阳性或HBeAg阴性,患有或不患有肝病。

[0136] FC-P与FC相关联,并通过外部环区内的环1和环2的表位识别丧失来证明,其包括在使用mAb 5、mAb 6、mAb 7和mAb 8时HBsAg的“a”

[0137] 决定簇(参见图1和图2)。治愈结果后的抗-HBs应答“诱导”针对参考HBsAg 样品的FC-P。在本文所述的一些实施方式中,使用包含FC-P相关的表位(环 1+环2)的BNP平台的疫苗接种产生与FC-P相关的抗-HBs应答,从而增加治愈机会。

[0138] V.HBsAg、抗-HBs和CP/F-CP

[0139] 测量患者血液中循环的HBV的包膜蛋白(HBsAg)的表位曲线是对病毒的直接量度;它包括检测患者血液中发现的外来抗原。CP中发展出的逻辑或论点是,感染者将对病毒发起免疫应答,并且可以测量免疫应答选择压力对病毒的影响。可以通过在该人的病毒包膜上改变HBsAg表位来证明其效果。在多重报告组上测量CP(图2)。据报道,FC-P对施加至墨尔本圣文森特医院的自然史群组的4重组有反应性,其中患者是HBeAg阴性的,并且具有最小疾病活性或无疾病活性,处于阶段4并过渡至阶段5,而感染的基因型不受限制(即,基因型A、B、C或D)。相比之下,患者制造的抗体的量度是宿主对病毒的意义的应答的直接量度;发现其也在患者血液中循环。FC-P中发展出的逻辑或观点是,已经治愈CHB的人已成功引发抗体应答,可以测量其效果。可以通过此抗体诱导HBV组的外源供应的 HBsAg上的表位变化的

能力来证明该效果;也就是说,患者的抗体“诱导”表位曲线对供应的外源抗原的应答。“诱导的”FC-P适用于4/5阶段、HBeAg 阴性、基因型不受限的CHB患者的自然史群组,其基于4重报告组。

[0140] VI.HBsAg、VLP和BNP

[0141] HBV编码形成病毒包膜的三种HBsAg蛋白;小(S)、中(M)和大(L)(Carman WF等人.J Hepatol.1999;31(2):195-201;Seeger C等人.Hepadnaviruses.2013)。所有共享常见的226-残基HBsAg-S结构域(Seeger C等人.Hepadnaviruses.在 Fields Virology”中,2013,第6版.第2180-2221页),而M和L的N-末端延伸分别编码PreS2和PreS1结构域。HBsAg包膜蛋白是关键病毒抗原;在感染过程中,S、M和L在宿主细胞的ER膜中表达并共同包装,以形成感染性HBV 颗粒的包膜。S蛋白是乙型肝炎疫苗的唯一抗原组分,其能够诱导主要针对外部环区(残基99-169)主要抗原‘a’决定簇的保护性抗体。S蛋白易于自组装成脂质相关的VLP并形成当前重组疫苗的基础,其在酵母中制备且未糖基化。S蛋白尚未结晶,但被认为是构象动力学蛋白,其含有大量半胱氨酸和脯氨酸残基,预计在免疫优势‘a’决定簇内形成离散的环结构域(环1:aa 107-135;环2:aa 139-149)(Stirk HJ等人.Intervirology.1992,33(3):148-158)。编码S蛋白的cDNA 序列在SEQ ID NO:22中示出。编码具有AgeI限制性位点和FLAG标签的S 蛋白的cDNA序列在SEQ ID NO:23中示出。‘a’决定簇内的改变(变体和抗体占据率)可以修饰HBsAg拓扑结构并直接影响HBV中和表型(Carman WF等人.J Hepatol.1999;31(2):195-201)。

[0142] 编码具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HBsAg-S蛋白的cDNA序列示于SEQ ID NO:22。编码具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的S蛋白的cDNA 序列示于SEQ ID NO:23。HBsAg-S cDNA和氨基酸序列在下表A中提供。

[0143] 表A.HBsAg-S cDNA和氨基酸序列

[0144]

编码小型乙型肝炎表面抗原的 cDNA (SEQ ID NO: 22) 起始 ATG 和终止密码子 TAA 呈粗体 将编码外部环区(氨基酸 100-160)的序列加下划线 **ATG**GAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCTCGTGTTACAGGCGGGGTTT TTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCT CTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACC TCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGT CTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTG GTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATCCTCA ACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACT*ACCGGT*CAAGGAACCTCTATG TATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATC CCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCC TGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTT TGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTG AGTCCCTTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATT**TAA**
编码小型乙型肝炎表面抗原的 cDNA,具有引入的 AgeI 限制性位点,以及编码标签“FLAG”的 cDNA 序列(SEQ ID NO: 23) 起始 ATG 和终止密码子 TAA 呈粗体 FLAG-特异性 DNA 序列(以灰色突出显示)

[0145]

引入的 *AgeI* 限制性位点呈*斜体*
将编码外部环区(氨基酸 100-160)的序列加下划线

ATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCC
CTTCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAG
AGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTT
GGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCCTCCAACT
TGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTG
CTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTT
TGTCCTCTAATTCCAGGATCCTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATG
ACT*ACCGGT*CAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGAC
GGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGG
GAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGG
TTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGG
GGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTT
TGTCTTTGGGTATACATT**TAA**

乙型肝炎表面抗原 S (HBsAg-S)蛋白(SEQ ID NO: 50)
将 100 至 160 个氨基酸位置之间的外部环区加下划线

MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPT
SNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLD*YQGMLPVCPLIPGSS*
*TTSTGPCRTCMTTGQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGK*FLWEWASARFS
WLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI*

乙型肝炎表面抗原 S (HBsAg-S)蛋白和 FLAG 标签(SEQ ID NO: 51)
FLAG 序列(以灰色突出显示)
100 至 160 个氨基酸位置之间的外部环区加下划线

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCL
GQNSQSPTSNHSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPV
CPLIPGSSTTSTGPCRTCMTTGQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSWAFGKFLW
EWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFF
CLWVYI*

[0146] HBsAg VLP非常紧凑,这是因为各个亚基内部和之间大量的分子内和分子间二硫键(Seeger C等人.Hepadnaviruses..在"Fields Virology"中,2013,第6 版.第2180-2221页;Mangold CM等人.Arch Virol.1997,142(11):2257-2267),并且已经建立可以被成功修饰以展示经插入的外源抗原和医学相关序列作为生物纳米颗粒(BNP)递送平台的临床试验(Beaumont E等人.Vaccine.2015, 33(8):973-976;Buonaguro L等人.Expert Rev Vaccines.2011,10(11):1569-1583; Cheong WS等人.Antiviral Res.2009,81(2):113-122;Moffat JM等人.Vaccine. 2013,31(18):2310-2316;Netter HJ等人.J Virology 2001;75(5):2130-2141;Phogat S等人.Virology.2008,373(1):72-84)。

[0147] VII.HBsAg环1和环2的清除表位

[0148] HBsAg上的清除表位是那些在对象中被抗体占据时可能的结果是功能性治愈的清除表位。表位位于HBsAg-S的环1和环2的每一个上。关于该测定,选择单克隆抗体(mAb)用于多重测定,其靶向HBsAg-S上的一系列表位。一组命名为mAb5和mAb6的mAb靶向环1表位。筛选由以下共有氨基酸序列定义的两个环1表位:

[0149] $CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$(SEQ ID NO:24),其中:

[0150] X_1是sK122(基因型A1、A2、A6、B1、B2、B3、B6、C、F、G、 H、I)或sR122(基因型A3、A4、A5、B3、B4、B5、B7、B8、B9、C2、 C4、D、E);

[0151] X_2是sT125(基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I)或sM125(基因型D3、D5);

[0152] X_3是sT126(基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I)或sI126(基因型C)；

[0153] X_4是sP127(基因型A、B、E、C、D、G、I)或sT127(基因型C4、D2、D5)或sL127(基因型E、F、H)；

[0154] X_5是sA128(A、B、C、D、E、F、G、H、I)或sV128(D2)；

[0155] X_6是sN131(基因型A、G、I)或sT131(基因型B、C、D、E、F、H)；

[0156] X_7是sF134(基因型A、B、C、E、F、H)或sY134(基因型D、G、I)；

[0157] 以及mAb 10结合的共有氨基酸序列$PCX_8TCX_9X10X_{11}$(SEQ ID NO:25)，其中：

[0158] X_8是sK122(基因型A1、A2、A6、B1、B2、B3、B6、C、F、G、H、I)或sR122(基因型A3、A4、A5、B3、B4、B5、B7、B8、B9、C2、C4、D、E)；

[0159] X_9是sT125(基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I)或sM125(基因型D3、D5)；

[0160] X_{10}是sT126(基因型A、B、C、D、E、F、G、H、I)或sI126(基因型C)或sS126或sA126(常见变体)；

[0161] X_{11}是sP127(基因型A、B、E、C、D、G、I)或sT127(基因型C4、D2、D5)或sL127(基因型E、F、H)；

[0162] 另一组mAb(命名为mAb、7、8、11、12、16和17)靶向由以下共有氨基酸序列定义的环2上的表位：

[0163] $CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$(SEQ ID NO:26)

[0164] 其中：

[0165] X_{12}是sT140(基因型A、B、C、D、G、H、I)或sS140(基因型E或F)；和

[0166] X_{13}是sT143(基因型A、B)或sS143(基因型C、D、E、F、G、H、I)。

[0167] 不希望受理论的束缚，本文提出当环1的任何一个表位被占据时，当环2的表位被占据时，或当环1的任何一个表位与环2的表位一起被占据时，则已实现抗体的清除特性，导致功能性清除。

[0168] 在实施方式中，经占据的表位是CKTCTTPAQGNSMFPSC(SEQ ID NO:27)；和/或PCKTCTTP(SEQ ID NO:28)；和CCCTKPTDGNCT(SEQ ID NO:29)。

[0169] 在实施方式中，经占据的表位是CKTCTIPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:30)；和/或PCKTCTTP(SEQ ID NO:28)；和CCTKPSDGNCT(SEQ ID NO:31)。

[0170] 在实施方式中，经占据的表位是CRTCTTPAQGTSMFPSC(SEQ ID NO:32)；和/或PCKTCTTP(SEQ ID NO:28)；和CCTKPSDGNCT(SEQ ID NO:31)。

[0171] VIII.清除特性-生物纳米颗粒(CP-BNP)治疗性疫苗制剂

[0172] 本技术的公开内容涉及开发8种CP-BNP(SEQ ID NO:1-8)，其涵盖了泛-基因型/血清型环1和环2HBsAg靶表位，连同对照野生型(WT)BNP。BNP主链由HBsAg-S包膜蛋白非感染性亚病毒颗粒(病毒样颗粒，或VLP，其不含有完整病毒的所有组分)组成。在一些实施方式中，HBV基因型是基因型A、A1、A2、A3、A4、A5、A6、B、B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、C、C1、C2、C4、D、D2、D3、D5、E、F、G、H或I。在一些实施方式中，HBV基因型是基因型D。在一些实施方式中，血清型是ayw或adw。在一些实施方式中，血清型是ayw。将VLP修饰为生物纳米颗粒(BNP)以递送靶插入物表位代表了一种主动方法，它刺激免疫系统以诱导能够治疗或治愈(清除)持续性乙型肝炎病毒感染的应答。将生成能够诱导治愈现有且持续性乙型肝炎感染的抗体。CP表位靶(插入物)序列在下表1中列出。产生并纯化BNP(无内源性)，并在考虑环

1和环2靶表位组合的制剂中分别评估免疫原性。下表2列出了所分析的制剂。

[0173] 表1.靶HBsAg CP表位

CP-BNP	CP 表位名称	插入物 CP 表位序列	插入物表位数	BNP 中的插入物位置
1	微型环 1 (adw, 基因型 A/C)	PCKTCTTP (残基 120-127) (SEQ ID NO: 28)	三聚体	AgeI 位点 (aa126-128)
2	微型环 1 (ayw, 基因型 B/D)	PCRTCTTP (残基 120-127) (SEQ ID NO: 33)	三聚体	AgeI 位点 (aa126-128)
3	环 2 (adw/ayw)	CTKPTDGNC (残基 139-147) (SEQ ID NO: 34)	三聚体	AgeI 位点 (aa126-128)
4	延伸的环 1 (adw/ayw)	CKTCTTPAQGNSMFPS (残基 121-136) (SEQ ID NO: 35)	二聚体	AgeI 位点 (aa126-128)
5	环 2 (adw/ayw)	CTKP(T/S)TDGNC (残基 139-147) (SEQ ID NO: 36)	三聚体	原有位点, 环 2
6	微型环 1 (adw, 基因型 A-D) 环 2 (adw, 基因型 A-D)	PC(K/R)TC(T/M)TP (残基 120-127) (SEQ ID NO: 37) CTKP(T/S)TDGNC (残基 139-147) (SEQ ID NO: 36)	三聚体 三聚体	原有位点, 环 1 原有位点, 环 2
7	延伸的环 1 (adw/ayw)	C(K/R)TC(T/M)T(P/T)AQG(N/T)SM(F/Y)PS (残基 121-136) (SEQ ID NO: 38)	三聚体	原有位点, 环 1
8	环 1+环 2 (adw/ayw)	PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC (残基 120-147) (SEQ ID NO: 39) PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNC (残基 120-147) (SEQ ID NO: 40)	二聚体	原有位点

[0174]

[0175] 表2.CP-BNP制剂

CP-BNP 制剂	环 1 表位保留	环 2 表位保留	抗原性	抗-HBs CP-相关的 (诱导的 CP)
1	Y	Y	Y	N
2	Y	Y	Y	N
3	Y	Y	Y	Y
4	Y	Y	Y	N
1+3	Y	Y	Y	Y
1+3+4	Y	Y	Y	Y
3+4	Y	Y	Y	Y
5	Y	Y	Y	Y
6	Y	Y	Y	Y
7	Y	Y	Y	NT
8	Y	Y	Y	Y
5+7	NT	NT	Y	Y
1+4+5	Y	Y	Y	Y
WT	Y	Y	Y	N

[0176]

[0177] 8种CP-BNP构建体的氨基酸序列提供于表3中,构建体1(BNP 1) (SEQ ID NO:1)、

构建体2(BNP 2)(SEQ ID NO:2)、构建体3(BNP 3)(SEQ ID NO:3)、构建体4(BNP 4)(SEQ ID NO:4)、构建体5(BNP 5)(SEQ ID NO: 5)、构建体6(BNP 6)(SEQ ID NO:6)、构建体7(BNP 7)(SEQ ID NO:7)和构建体8(BNP 8)(SEQ ID NO:8)。

[0178] 表3.CP-BNP构建体氨基酸序列

[0179]

基因名称: 构建体 1 (BNP 1) (SEQ ID NO: 1) 亲本(载体序列): HBsAg 小, 基因型 D, 血清型 ayw 经由 *Age*I 限制性位点插入 插入: 微型环 1 120-PCKTCTTP-127 (三聚体): 基因型 A-特异性插入片段, adw, (呈粗体) 接头: GSGS (加下划线和斜体) FLAG-标签(加下划线) MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMT T*GSGS*PCKTCTTP*GSGS*PCKTCTTP*GSGS*PCKTCTTP*GSGS*TGQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPI PSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIF FCLWVYI*
基因名称: 构建体2 (BNP 2) (SEQ ID NO: 2) 亲本(载体序列): HBsAg 小, 基因型 D, 血清型 ayw 经由 *Age*I 限制性位点插入 插入: 微型环 1 PCRTCTTP (三聚体): 基因型 B/C-特异性插入物, ayw (呈粗体) 接头: GSGS (加下划线和斜体) FLAG-标签(加下划线)

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMT
TGSGSPCRTCTTPGSGSPCRTCTTPGSGSPCRTCTTPGSGSTGQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCIPI
PSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIF
FCLWVYI*

基因名称：构建体3 (BNP 3) (SEQ ID NO: 3)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
经由 *Age*I 限制性位点插入
插入：环 2 139-CTKPTDGNC-147 (三聚体) (呈粗体)
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMT
TGSGSCTKPTDGNCGSGSCTKPTDGNCGSGSCTKPTDGNCGSGSTGQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTC
IPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLL
PIFFCLWVYI*

基因序列：构建体4 (BNP 4) (SEQ ID NO: 4)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
经由 *Age*I 限制性位点插入
插入：环 1 121-CKTCTTPAQGNSMFPS-136 (二聚体)，adw (呈粗体)
起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
[0180] 接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMT
TGSGSCKTCTTPAQGNSMFPSGSGSCKTCTTPAQGNSMFPSGSGSTGQGTSMYPSCCCTKPSDGNCT
CIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPL
LPIFFCLWVYI*

基因序列：构建体5 (BNP 5) [天然环境中的环2序列] (SEQ ID NO: 5)
亲本(载体序列)：HBsAg小，基因型D，血清型ayw
设计：环2区-原始序列(呈粗体)和两条另外的插入物(呈粗体和突出显示)中的三个重复序列编码139-CTKPSDGNC-147(ayw)的环2原始序列，未改变(呈粗体)，然后两条另外的环2序列(adw) 139-CTKPTDGNC-147 (二聚体) (呈粗体和突出显示)
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMT
TGQGTSMYPSCCCTKPSDGNCGSGSCTKPTDGNCGSGSCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWAS
ARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI*

基因序列：构建体6 (BNP 6) [环1和环2二聚体] (SEQ ID NO: 6)
亲本(载体序列)：HBsAg小，基因型D，血清型ayw
设计：
环1和环2重复序列 (总计三聚体)；除了原始的ayw环1和ayw环2序列之外，添加两条adw

环1 (二聚体)和环2 (二聚体)序列。
环 1 区(原始 ayw 序列呈粗体，以及两条另外的 adw 环 1 序列，呈粗体和突出显示)。微型环 1 120-PCKTCTTP-127 (二聚体，血清型 adw)，然后原始的 120-PCRTCMTT-127 (血清型 ayw)

环2区(放大的字体):
环2原始序列139-CTKPSDGNC-147 (ayw) (呈粗体)，然后是adw二聚体
139-CTKPTDGNC-147 (呈粗体和突出显示)

接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTT
P*GSGS*PCKTCTTP*GSGS*PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC*GSGS*CTKPTDGNC*GSGS*CT
KPTDGNCTCIPIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLY
SILSPFLPLLPIFFCLWVYI*

基因序列：构建体7 (BNP 7) (SEQ ID NO: 7)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw

设计:
环 1，adw，二聚体。121-CKTCTTPAQGNSMFPS-136 (呈粗体和突出显示)
[0181] 环 1 ayw，单体。121-PCRTCMTTAQGTSMYPS-136 (呈粗体)
起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCKTCTT
PAQGNSMFPSC*GSGS*CKTCTTPAQGNSMFPSC*GSGS*PCRTCMTTAQGTSMYPSCCCTKPSDGNCTCI
PIPSSWAFGKFLWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLP
IFFCLWVYI*

基因序列：构建体8 (BNP 8) (完全环区120-147 ayw和adw存在) (SEQ ID NO: 8)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
设计:
原始 ayw 环呈粗体
添加 adw 来源的环序列，呈粗体和突出显示

接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

MDYKDDDDKENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSLDSWWTSLNFLGGTTVCLGQNSQSPTSN
HSPTSCPPTCPGYRWMCLRRFIIFLFILLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRTCMT
TAQGTSMYPSCCCTKPSDGNC*GSGS*PCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFGKF
LWEWASARFSWLSLLVPFVQWFVGLSPTVWLSVIWMMWYWGPSLYSILSPFLPLLPIFFCLWVYI*

[0182] 编码8种CP-BNP氨基酸构建体的示例性核苷酸序列提供于表4中。

[0183] 表4.CP-BNP构建体示例性核苷酸序列

[0184]

基因名称：构建体 1 (BNP 1) (SEQ ID NO: 9)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
经由 *Age*I 限制性位点(ACCGGT)插入
插入：微型环 1 120-PCKTCTTP-127 (三聚体)：基因型 A-特异性插入物，adw (呈粗体)
起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACC*GGTTCCGGTTCA*CCCTGCAAAACCTGTACTAC
CCCA*GGTTCCGGATCA*CCCTGCAAAACCTGTACTACCCCA*GGTTCCGGATCA*CCCTGCAAAACCTGTACTACCCC
A*GGTTCCGGATCA*ACCGGTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTG
CACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTG
GCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGAT
GATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCT
TTGGGTATACATTTAACTCGAG

基因名称：构建体2 (BNP 2) (SEQ ID NO: 10)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
经由 *Age*I 限制性位点 (ACCGGT)插入
插入：微型环 1 PCRTCTTP (三聚体)：基因型 B/C-特异性插入物，ayw (呈粗体)
起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACC*GGTTCCGGTTCA*CCCTGCCGGACCTGTACTAC
CCCA*GGTTCCGGATCA*CCCTGCCGGACCTGTACTACCCCA*GGTTCCGGATCA*CCCTGCCGGACCTGTACTACCCC
A*GGTTCCGGATCA*ACCGGTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTG
CACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTG
GCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGAT
GATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCT
TTGGGTATACATTTAACTCGAG

基因名称：构建体3 (BNP 3) (SEQ ID NO: 11)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
经由 *Age*I 限制性位点 (ACCGGT)插入
插入：环 2 139-CTKPTDGNC-147 (三聚体)
起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACC*GGTTCCGGTTCA*TGTACTAAACCAACCGACGG
AAATTGC*GGTTCCGGTTCA*TGTACTAAACCAACCGACGGAAATTGC*GGTTCCGGTTCA*TGTACTAAACCAACCGA

CGGAAATTGC*GGTTCCGGTTCA*ACCGGTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGA
CGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCG
TTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGT
TATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTT
CTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAACTCGAG

基因序列：构建体4 (BNP 4) (SEQ ID NO: 12)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
经由 *Age*I 限制性位点 (ACCGGT)插入
插入：环 1 121-CKTCTTPAQGNSMFPS-136 (二聚体)，adw (呈粗体)
起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTA*CCGGTTCCGGTTCA*TGTAAAACTTGCACTACCCC
AGCTCAAGGAAATTCTATGTTCCCTTCC*GGTTCCGGATCA*TGTAAAACTTGCACTACCCCAGCTCAAGGAAATTC
TATGTTCCCTTCC*GGTTCCGGATCA*ACCGGTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTC
GGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGC
CCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTC
AGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAAT
TTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAACTCGAG

基因序列：构建体5 (BNP 5) [环2序列，在天然背景中] (SEQ ID NO: 13)
亲本(载体序列)：HBsAg小，基因型D，血清型ayw
设计：环2区-原始序列(呈粗体)和两个另外的插入物(呈粗体和突出显示)中的三个重复序列编码139-CTKPSDGNC-147 (ayw)，未改变(呈粗体)，然后两条另外的环2序列(adw) 139-CTKPTDGNC-147 (二聚体) (呈粗体和突出显示)的环2原始序列
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

[0185]

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACCGGTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTG
CTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGC*GGTTCCGGTTCA*TGTACTAAACCAACCGACGGAAATTGC*GGTTCCGG*
*TTCA*TGTACTAAACCAACCGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCT
ATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTC
CCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTT
TTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAACTCGAG

基因序列：构建体6 (BNP 6) (SEQ ID NO: 14)
亲本(载体序列)：HBsAg小，基因型D，血清型ayw
设计：
环1和环2重复序列(总计三聚体)；除了原始的ayw环1和ayw环2序列之外，添加两条adw环1 (二聚体)和环2 (二聚体)序列。
环 1 区(原始 ayw 序列呈粗体，和两条另外的 adw 环 1 序列，呈粗体和突出显示)。微型环 1 120-PCKTCTTP-127 (二聚体，血清型 adw)，然后是原始 120-PCRTCMTT-127 (血清型 ayw)

环2区(放大的字体):
环2原始序列139-CTKPSDGNC-147 (ayw) (呈粗体)，然后是adw二聚体

139-CTKPTDGNC-147 (呈粗体和突出显示)

起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCAAAACCTGTACTACCCCAGGTTCCGGATCACCATGCAAAACCTGTACTAC
CCCAGGTTCCGGATCACCATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCT
GTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCGGTTCCGGTTCATGTACTAAACCAACCGACGGAAATTGCGGTT
CCGGTTCATGTACTAAACCAACCGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGG
AAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGT
AGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTT
GAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAACTCGAG

基因序列：构建体7 (BNP 7) (SEQ ID NO: 15)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw

设计：
环 1，adw，二聚体。121-CKTCTTPAQGNSMFPS-136 (呈粗体和突出显示)
环 1 原始 ayw，单体。121-PCRTCMTTAQGTSMYPS-136 (呈粗体)
起始 ATG 和终止密码子：放大的字体
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

[0186]

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCAAAACCTGCACCACTCCAGCGCAAGGAAATTCTATGTTTCCCTCCTGTGG
TTCCGGTTCATGCAAAACCTGCACCACTCCAGCGCAAGGAAATTCTATGTTTCCCTCCTGTGGTTCCGGTTCACC
ATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGG
AAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTT
CTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTAT
ATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTT
TTGTCTTTGGGTATACATTTAACTCGAG

基因序列：构建体8 (BNP 8) (完全环区120-147 ayw和adw存在) (SEQ ID NO: 16)
亲本(载体序列)：HBsAg 小，基因型 D，血清型 ayw
设计：
原始的 ayw 环呈粗体
添加的 adw 来源的环序列，呈粗体和突出显示
接头：GSGS (加下划线和斜体)
FLAG-标签(加下划线)

GAGCTCGCCACCATGGACTATAAAGACGACGATGACAAAGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTTCT
CGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC
TCTCAATTTTCTAGGGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAAC
CTCTTGTCCTCCAACTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCTGCT
GCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTAATTCCAGGATC
CTCAACAACCAGCACGGGACCATGCCGGACCTGCATGACTACTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTG
CTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCGGTTCCGGTTCACCATGCAAAACCTGTACTACCCCAGCGCAAGGAAA
TTCTATGTTTCCCTCCTGCTGTTGCACTAAACCAACCGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATCCTG
GGCTTTCGGAAAATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCA

[0187]

GTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTA
CAGCATCTTGAGTCCCTTTTTACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTAACTCGAG

[0188] IX.CP-肽治疗性疫苗

[0189] 基于表1中所述的将其掺入CP-BNP治疗性疫苗中的HBsAg CP表位，还开发了这些

表位疫苗作为泛-基因型/血清型环状肽疫苗的可替代递送。本技术的CP表位环状肽列于表5中。

[0190] 表5.CP表位特异性环化肽/制剂

[0191]

	CP表位环状肽	环	序列
环化肽(环1)	1	1	TCTTPAQGNSMFPSC (SEQ ID NO: 17)
	2	1	TCTIPAQGTSMFPSC (SEQ ID NO: 18)
	3	1	TCTTPAQGTSMFPSC (SEQ ID NO: 19)
环化肽(环2)	4	2	CTKPTDGNCT (SEQ ID NO: 20)
	5	2	CTKPSDGNCT (SEQ ID NO: 21)

[0192] 免疫原性研究表明,先导环状肽疫苗是与钥孔戚血蓝素(KLH)缀合的环状肽CTKPTDGNCT(SEQ ID NO:20)和CTKPSDGNCT(SEQ ID NO:21) 的等摩尔制剂。施用该疫苗给小鼠具有抗原性,引起与CP一致的抗-HBs Ab 应答,表明“清除”了抗-HBs Ab。分析涉及ELISA(免疫肽、对照肽、VLP 抗原)、诱导型CP分析、免疫沉淀和蛋白质印记。

[0193] X.mRNA疫苗

[0194] 在一些实施方式中,本公开涉及mRNA构建体引发存在和/或持续的乙型肝炎(包括慢性乙型肝炎(CHB))中的免疫应答的用途。在一些实施方式中,mRNA编码来自在HBsAg-S结构域的环1区和环2区中表达的抗原表位的抗原表位重复区。在一些实施方式中,mRNA编码BNP 1、2、3、4、 5、6、7或8。在一些实施方式中,mRNA编码CP表位环状肽,诸如表5 中提供的那些。

[0195] XI.施用模式和有效剂量

[0196] 如本文公开的免疫原性组合物(例如,疫苗)可以通过任何常规使用的或推荐用于疫苗的途径(例如肠胃外途径)施用,并且可以以多种形式(例如注射液)施用。可以通过注射器或通过用于肌内、皮下或皮内注射的无针注射器施用疫苗。

[0197] 根据本技术,免疫原性组合物的“有效量”是足以实现所期望生物作用的有效量。应理解,在一些实施方式中,有效剂量将取决于接受者的年龄、性别、健康情况和重量、当前治疗的种类(如果存在的话)、治疗频率及所需作用的性质。以下提供的有效剂量的范围不意在受限并表示示例性剂量范围。因此,在一些实施方式中,如本领域技术人员所理解和确定的,剂量将针对个体对象量身定制。用于哺乳动物(例如人)成年的CP-BNP、CP表位环状肽或mRNA疫苗的剂量可以为0.01μg至10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是0.10μg至10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是1μg至10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是2μg至10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是3μg至10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是4μg至10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是5μg至10,000μg 或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是10μg至10,000μg 或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是15μg至10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中,剂量可以是20μg至10,000μg 或其中的任何范

围或值。在一些实施方式中，剂量可以是25μg至10,000μg 或其中的任何范围或值。在一些实施方式中，剂量可以是50μg至10,000μg 或其中的任何范围或值。在一些实施方式中，剂量可以是100μg至10,000 μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中，剂量可以是500μg至10,000 μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中，剂量可以是1,000μg至 10,000μg或其中的任何范围或值。在一些实施方式中，剂量可以是5,000μg 至10,000μg或其中的任何范围或值。

[0198] XII.治疗方法

[0199] 以下讨论仅以示例的方式给出，并无意于是限制性的。

[0200] 本技术的一方面包括治疗诊断为患有或疑似患有乙型肝炎感染的对象中现有和/或持续的乙型肝炎(包括慢性乙型肝炎(CHB))的方法。在治疗应用中，将包含本技术的CP-BNP、CP表位环状肽和/或mRNA构建体的组合物或药剂以足以治愈或至少部分遏制疾病症状的量施用给疑似或已经患有乙型肝炎感染的对象。

[0201] XIII.确定本技术的CP-BNP、CP表位环状肽或mRNA的生物作用

[0202] 根据本文所述的HBsAg免疫测定的结果，已经实现或将要实现功能性治愈时，临床医生便可以决定停止治疗。因此，本文所述的HBsAg免疫测定可以监测治疗以确定个体是否将达到功能性治愈，确定个体是否已实现功能性治愈以及确定个体是否已通过自然防御机制实现治愈。

[0203] 可以改变方案而不脱离本技术的实质。关键终点是确定HBsAg上已被个体抗体应答占据的表位指纹。如果环1和环2的表位的指纹已被占据，则可以预期功能性治愈。如果具有结合至该指纹的能力的抗体存在或者在暴露于HBV后具有指示性、但无法检测到HBsAg，则可以实现功能性治愈。在那时，治疗可以停止。

[0204] 实施例

[0205] 以下实施例仅通过说明的方式而不是限制的方式来提供。本领域技术人员将容易地认识到可以改变或修改以产生基本相同或相似结果的各种非关键参数。如所附权利要求所定义的，所述实施例绝不应解释为限制本技术的范围。

[0206] 实施例1:开发清除特性测定

[0207] 基于多重(“Bioplex”)珠粒的流式细胞术平台用于开发HBsAg表位测定，并建立和绘制构成HBsAg表位清除特性的表位的HBsAg特性(参见图 2)。“表位的清除特性”是由个体抗体靶向的表位的特性。当所有表位都与由个体产生的抗体结合时，可以预期HBsAg的清除。测定来源于Lim等人. (2014)Hepatology 60(1)增刊:1623,980A的测定。简而言之，HBsAg多重免疫测定包括一组荧光鉴定的珠粒，每个珠粒各自缀合至结合至HBsAg的不同抗-HBs抗体，然后是多克隆藻红蛋白(PE)-缀合的检测抗体。HBsAg 多重组包含针对HBsAg外部环区的单克隆抗体(mAb)，包括‘a’决定簇和跨越HBsAg残基99-226的C-末端结构域表位。将HBsAg表位归类至以下结构域(具有结合至那些结构域的单克隆抗体):N-末端(mAb 1);环1(mAb 5、6、10);环2(mAb 7、8、11、12、16、17、19);环1/2组合的(mAb 13、14、15);C-末端(mAb 2、3、4);和构象的(mAb 9、18)。与每种珠粒缔合的PE的强度提供了样品内特定HBsAg表位的抗体识别的灵敏量度。与匹配的HBV株主链相比的HBsAg上的表位曲线已被表达为在生物信息学数据分析之后抗体结合或表位识别的倍数改变。已经将表位识别相对于参考主链的变化的正常范围的95%CI确定为+/-0.5倍变化。表位获得识别对应于正倍数变

化(>0.5倍),而负倍数变化(>-0.5倍)对应于表位结合的丧失或减少。测定的图示示于图1中。

[0208] 实施例2:选择mAb

[0209] 选择和获得HBsAg多重测定(图2上图)中利用的抗-HBs mAb,以提供广泛覆盖的对HBsAg抗原和C-末端结构域(残基99-226)具有反应性的表位(覆盖连续和不连续的表位两者),以及经受高可变性和还有保守识别的表位区。由mAb提供的高水平的表位覆盖使得能够根据作图的表位可用性对 HBsAg特性进行分析,并根据表位区报告:N-末端(mAb 1);环1(mAb 5、 6、10);环2(mAb 7、8、11、12、16、17、19);环1/2组合的(mAb 13、 14、15);C-末端(mAb 2、3、4);和构象的(mAb 9、18)。对HBV株(基因型A-G)的询问鉴定了抗-HBs mAb表现出保守的表位识别模式(即表示跨基因型和血清型的保守HBsAg指纹),其是mAb 3和4(C-末端)、mAb 15(环 1/2组合的)和mAb 18(构象的)。与基因型A2、血清型adw2疫苗株相比,其余的抗-HBs mAb对HBsAg特性的变化灵敏,所述变化通过HBV株之间的表位识别模式改变来确定。

[0210] 实施例3:优化测定/动力学

[0211] 使用HBV A2 adw2株HBsAg(其形成了大多数通用HBV疫苗的通用基础,并因此代表了相关基线或主链以用于比较HBsAg表位识别)对HBsAg 特性测定进行开发和优化。HBsAg来源主要为HBsAg患者血清,通过HBV 测序确认为野生型A2 adw2(与共有序列相比),并使用来自细胞培养上清液的重组野生型A2 adw2 HBsAg确认。初始测定开发基于在实验室良好表征的两种抗-HBs mAb(包括通过蛋白质印记、Elisa和荧光)的对HBsAg的反应性,其是mAb 10(环1)和18(构象的)。将用一系列浓度的mAb标记的制备的珠粒组与一系列浓度的HBsAg一起孵育。这些浓度代表HBsAg的标准化。鉴定了与舒适的荧光读出(在10000-20000RFU的范围内)相对应的条件,而不会导致珠粒/mAb-HBsAg复合物超载和聚集。确定HBsAg的测定浓度约为16IU/孔(标准化水平),检测到的HBsAg低至1IU/孔并且高至达100IU/孔。在8、16和32IU/孔的测定中掺入了样品稀释系列的HBsAg,以解释HBsAg浓度诊断测定中的任何轻微误差。将标记至珠粒的抗-HBs mAb的最佳浓度优化为mAb浓度,导致在仪器的动态范围下的荧光反应性 (15000-18000RFU),并且这是针对每种mAb专门/凭经验确定的。通过依次添加与珠粒缀合的单个抗-HBs mAb,建立了测定的多重性,从而允许鉴定由于mAb部分共享的表位而导致的表位竞争。为避免测量mAb之间的表位竞争(即正确记录HBsAg表位曲线),建立了三组多重抗-HBs珠粒/mAb 为4重、5重和10重。使用这些复合物对HBsAg样品平行分析(在同一板上),并将所得的数据组合以实现HBsAg特性的多重读出(图2上图)。

[0212] 实施例4:在HBV株上的测定验证/HBsAg特性

[0213] 针对HBsAg A2 adw2(对应于常见的HBV疫苗株)开发了测定,并因此反映了该测定中多重抗-HBs mAb的表位识别的HBsAg特性。验证了针对以下的测定:来自野生型离体血清HBsAg的HBsAg A2 adw2和来自体外细胞培养物的重组HBsAg以确认A2 adw2的HBsAg特性,其形成疫苗株背景以用于比较其他HBV株(基因型和血清型)(其可以是疫苗错配的),和具有疫苗逃逸潜能的经报告的HBsAg变体(例如,sG145R/A、sP120T/L、 sD144E/A)。进一步针对源自患者血清和重组上清液两者的不同基因型(A-G) 和血清型的HBsAg验证了测定,其与疫苗株(A2 adw2)背景相比,确定了每株的HBsAg特性。建立了代表每种HBV株的参考血清

组,以将其作为研究群组中的对照数据点持续纳入测定之中。常见基因型(A,B,C,D)之间的HBsAg特性的基因型特异性变化在环1(mAb6)和环2(mAb8)表位是显著的,而血清型在环2(mAb7)表位是显著的。与疫苗株(C4、E和F)差异更大的HBV株在表位识别的HBsAg特性中显示出与疫苗株相比更大的变化。

[0214] 实施例5:表征与'清除'抗-HBs应答相关的清除特性

[0215] 图1显示了实施例1中描述的测定的应用以表征清除特性(CP)-与导致功能性治愈的抗体相关。使用mAb组,测定确定了HBsAg表位占据率,其中mAb 5和mAb 6靶向以下环1中的共有序列:

[0216] $CX_1TCX_2X_3X_4X_5QGX_6SMX_7PC$(SEQ ID NO:24)

[0217] 其中:

[0218] X_1是K或R;

[0219] X_2是T或M;

[0220] X_3是T或I;

[0221] X_4是P、T或L;

[0222] X_5是A或V;

[0223] X_6是N或T;并且

[0224] X_7是F或Y。

[0225] mAb 10结合至共有序列的氨基酸120至127内的另一个表位环1:

[0226] $PCX_8TCX_9X_{10}X_{11}$(SEQ ID NO:25)

[0227] 其中:

[0228] X_8是K或R;

[0229] X_9是T或M

[0230] X_{10}是T、I或S;并且

[0231] X_{11}是P、T或L。

[0232] mAb 7、mAb 8、mAb 11、mAb 12、mAb 16和mAb 17结合至环2 中共有序列SEQ ID NO:26的氨基酸137至147内的表位,其中共有序列为:

[0233] $CCCTKPX_{12}DGNCX_{13}$(SEQ ID NO:26)

[0234] 其中:

[0235] X_{12}是T或S;和

[0236] X_{13}是T或S。

[0237] 提出了既占据SEQ ID NO:24和/或SEQ ID NO:25并且又占据SEQ ID NO:26的抗体群代表了指示功能性治愈的抗体的清除特性。

[0238] 实施例6:功能性CHB治愈的预测性生物标志物

[0239] 图2描述了一种检测带有被占据的表位的HBsAg的测定(上图)和一种检测与抗-HBs抗体复合的HBsAg的测定(下图)。该测定采用多重免疫测定,其检测在环1(共有序列SEQ ID NO:24和25)和在环2(共有序列SEQ ID NO:26)的表位的占据率。

[0240] 实施例7:CHB治愈中的HBsAg清除特性

[0241] 图3和图4是显示在CHB治愈中HBsAg清除特性(CP)的图形表示。在图3中,功能性治愈患者产生了清除感染的抗体应答。在图4中,非治愈/非应答患者不携带经占据的HBsAg表

位。术语HBsAgCP意指HBsAg 表位的清除特性。HBsAg-非清除特性被称为HBsAg-NCP。

[0242] 实施例8:CHB治愈中的HBsAg清除特性

[0243] 记录每种测定mAb对HBsAg表位的识别为识别倍数变化;涉及增强或改善的HBsAg表位识别的正倍数变化,未变或正常范围表位识别(在+/- 0.5倍内),以及由负倍数变化指示的降低的HBsAg表位识别。HBsAg CP 通过在环1和环2HBsAg表位两者的降低的HBsAg表位识别(例如,由于表位占据导致)来指示。

[0244] 实施例9:鉴定预测性清除特性生物标志物

[0245] HBsAg特性测定.bioplex上的多重抗-HBs组测定(图2,上图) 最初是根据诊断监测CHB患者的HBsAg变化的概念而开发的。例如,该测定可用于其中无法检测到HBV DNA但HBsAg仍为阳性的接受核苷酸类似物(NA)疗法的患者,并用于寻找治疗抗性突变或疫苗逃逸变体的发展。另外,该测定可用于试图了解在CHB疾病阶段期间发生的HBsAg特性和改变,即CHB疾病的预测生物标志物。实现CHB功能性治愈的患者群组(来自自然史群组)与CP生物标志物鉴定有关,并且下面将进一步详述。

[0246] 来自HBsAg特性测定的结果导致开发CP生物标志物(即在测定中通过抗-HBs Ab的子集识别HBsAg)。来自这些测定的结果提供了一种理解,即:(a)功能性治愈与抗-HBs应答有关;(b)“清除”抗-HBs应答特异性地靶向测定中的环1和环2特异性抗-HBs Ab的表位/内的表位;(c)患者有许多不同的抗-HBs Ab,但只有靶向这两个环1和环2表位(CP表位)的那些与实现功能性治愈相关;以及(d)这些CP相关表位的增强且靶向的展示驱动CP 相关的“清除”抗-HBs Ab的产生。

[0247] 自然史/功能性治愈群组:进行抗-HBs分析。这项研究涉及在圣文森特研究(自然史群组)中鉴定的六名CHB患者,这些患者符合功能性治愈(FC)的病例定义。所有六名患者均已停用抗病毒疗法,并且无法检测到HBsAg,并且已成功血清转换抗-HBs。所有六名自然史群组患者在其血清样品中是抗-HBs阳性的 (血清转换后),然后当与参考HBsAg一起孵育时,分析此抗-HBs状态以“诱导”FC-P(功能性治愈清除特性;基于功能性治愈患者抗-HBs分析和4重测定组) 的能力(参见图1)。FC-P被定义为使用四种mAb:mAb 5、mAb 6、mAb 7和mAb 8:(mAb 5和mAb 6识别环1中的表位;mAb 7和mAb 8识别环2中的表位),外部环区(包括HBsAg的“a”决定簇)中的环1和环2两者处丧失表位结合(参见图2,上图)。六名自然史患者中有一名以前获得的血清样本仍为HBsAg-阳性。使用Bioplex平台上的4重抗-HBs Abs,对HBsAg-阳性样品表位作图,并满足FC-特性(FC-P)的病例定义。

[0248] 4重环1或环2抗-HBs Abs识别的衍生HBsAg表位(详见表1)已作为多个重复序列插入HBsAg VLP疫苗递送平台中,以生成BNP/FC-P (CP-BNP)。这些BNP/FC-P疫苗以单一表位递送形式或多种表位混合物形式制备,其以免疫接种方式施用给小鼠。分析与参考HBsAg孵育时所得抗 -HBs应答诱导FC-P的能力,并针对覆盖环1表位和环2表位两者的BNP 免疫混合物鉴定了FC-P。这些BNP/FC-P免疫制剂包含表2中详述的构建体。迄今为止测试的这些疫苗包含环1和环2表位两者,并导致生成了FC-P 相关的抗体。

[0249] 实施例10:VLP/BNP产生

[0250] 在哺乳动物细胞系中的蛋白质产生以及经由超速离心、亲和力和凝胶过滤纯化的纯化的方法是标准方案,并在下文以及Hyakumura等人.Journal of Virology 2015,89(22):11312-11322(2015)中描述。

[0251] 简而言之,为了产生VLP或BNP,使用聚乙烯亚胺(PEI)(Polysciences,美国沃灵顿)或FectoPRO(PolyPlus Transfection USA),将在补充有GlutaMax-1 (Gibco-BRL)、10%胎牛血清(FCS)、青霉素和链霉素(Gibco-BRL)的杜尔贝科氏改良的伊戈尔培养基DMEM(Gibco-BRL,纽约州格兰德岛)中生长的HEK293-T 细胞用表达构建体转染。在转染后5至8天从细胞培养上清液中收获VLP/BNP。将包含N-末端Flag标签的VLP/BNP从收集的组织培养物上清液中进行亲和纯化,在抗-Flag亲和树脂柱(CSIRO,澳大利亚)上进行亲和纯化。将融合蛋白用重组 Flag肽(0.4mgml;CSIRO,澳大利亚)在PBS中竞争性地从抗Flag亲和柱上洗脱。然后在Superdex 200或Superose 6凝胶过滤柱(GE Healthcare)上通过尺寸排阻对在PBS中亲和纯化的VLP/BNP制备物峰纯化。对最终的VLP/BNP纯化的制备物进行内毒素测试(Endosafe Test,美国查尔斯河),并使用Amicon 50kDa截止离心浓缩仪设备进行旋转浓缩至<1ml。替选地,使用台式离心机通过旋转澄清从收集的组织培养物上清液中纯化VLP/BNP,然后将上清液转移到超速离心管中,用20%蔗糖垫覆盖,并通过超速离心使颗粒沉淀。丢弃上清液,并将成团的VLP 重悬于STE缓冲液(100mM NaCl,10mM Tris,pH8,1mM EDTA)中出于疫苗接种。通过以下方法评估VLP/BNP制备物收率纯度:i)使用经计算的VLP消光系数为37.26进行A260/280光谱图;ii)定量HBsAg血清学(Elecsys HBsAG II试剂盒;Roche);iii)SDS-PAGE,然后进行考马斯染色和使用抗-HBs和抗Flag检测抗体的蛋白质印记(WB);iv)Bioplex平台上的HBsAg表位曲线测定分析(内部测定);以及v)标准ELISA技术和通过抗-HBs抗体的检测(内部测定)。

[0252] 实施例11:CP-BNP表位滞留

[0253] 在BNP产生和纯化以及BNP制备物的收率和纯度的质量保证分析后,将CP-BNP作为单独的BNP制备物和还作为BNP制剂针对HBsAg表位曲线 (Bioplex平台)分析,以在有必要时评估环1和环2表位呈递滞留(即,展示或呈递环1和环2表位)在递送时的抗原性。如图11所示,CP-BNP制剂保留了本技术的表位插入物。

[0254] 实施例12:CP表位环状肽产生

[0255] 环化CP表位肽.环化肽经设计以模拟HBsAg中鉴定出的环1和环 2靶“清除”表位,类似于CP-BNP中递送的CP表位插入物。这些表位内的序列变体取决于天然存在的HBV基因型和HBsAg血清型变体,并基于此考虑设计多种环状肽,从而产生环1或环2 CP表位环化肽的泛-基因型/泛-血清型等摩尔制剂以在免疫原性研究中作为免疫抗原进行递送,以用于开发CP相关的“清除”抗-HBs抗体。订购经设计的肽以由Mimotopes(澳大利亚)生产为具有N端游离胺、C端游离酸并通过原有序列半胱氨酸残基处的二硫键环化。生产是通过 HPLC和通过质谱特性分析确定的纯度>85%。将环化的肽经由戊二醛接头偶联至KLH(钥孔戚血蓝蛋白)用于免疫接种,或偶联至BSA(牛血清白蛋白)用于筛选测定。在上面的表5中列出了本技术的示例性环状肽。

[0256] 产生CP-相关的抗-HBs的免疫原性研究包括用环1混合物环状肽或环2 混合物环状肽制剂的免疫,对于每种肽制剂施用至n=2只BALB/c和n=2只 C57/B6小鼠。用3x 2ug剂量的肽混合物免疫小鼠。

[0257] 通过标准ELISA方案筛选收获的融合前血清中重组HBsAg(VLP)和 HBsAg环1或环2肽环化肽(单个肽和汇集的肽制剂配方)特异性的抗体应答。还将血清分析,以在Bioplex平台上生成抗-HBs抗体诱导的CP特性测定分析(内部测定)。该数据用于告知应选择哪些小鼠

用于脾脏收获和融合以开发单克隆抗 -HBs特异性抗体。

[0258] 最初,通过标准ELISA方案筛选融合后上清液的针对重组HBsAg(VLP) 以及对环1和环2环化肽(单个肽和汇集的肽制剂配方)特异性的抗体应答。在 SDS-PAGE和蛋白质印记之后,进一步分析克隆上清液以检测HBsAg,以确定对线性表位的亲和力。与孵育前的泛基因型/血清型HBsAg相比,在Bioplex 平台上分析克隆上清液的生成抗-HBs抗体诱导的CP特性测定分析(内部测定)。该数据用于确定应选择哪些克隆用于另外轮次的单克隆抗体开发,并在每一轮中分析克隆上清液,并包括分析最终选择的单克隆抗-HBs抗体(表6;图12)。

[0259] 表6.融合后克隆选择用于单克隆抗体系产生

[0260]

	ELISA (肽环 1)	ELISA (肽环 2)	ELISA (VLP)	蛋白质印记	经诱导的 CP
环 1 肽 项目	1C1, 4G4, 9E4, 8H4#	8H4#	1C1#, 4G4#, 9E4#	1C1, 2E12	4F1, 6A7, 8E6
环 2 肽 项目	2F4, 6F12, 5D4, 10D9	2F4, 6F12, 5D4, 4G2, 3D2, 10D9	2F4, 6F12, 5D4, 3D2, 10D9	5B6#	4G2, 6H12, 7F4, 10D9, 2F4

[0261] 选定的克隆呈粗体和加下划线

[0262] #表示弱应答/反应性

[0263] 实施例13:CP-BNP和CP表位环状肽免疫原性研究

[0264] 该实施例证明了本技术的CP-BNP和CP表位环状肽的免疫原性。通过 BALB/c品系小鼠的免疫,评估了展示靶环1、环2或环1&2“清除”表位的CP-BNP和CP-BNP制剂的免疫原性(参见上表2)。在第一轮BNP免疫原性研究中评估了CP-BNP 1-4及其制剂(与WT-BNP背景对照相比)。在第二次免疫原性研究中,将再评估这些及评估CP-BNP 5-8及其制剂。

[0265] 免疫原性研究#1结合了CP-BNP 1-4和表2中所示的制剂(与WT-BNP和 PBS安慰剂对照相比),而免疫原性研究IMM001重复了在原始研究中进行的评估,并另外评估了CP-BNP 5-8及制剂1+3+4和5+7的性能。以两周的间隔用3 x 2ug剂量的经纯化的CP-BNP抗原免疫六周龄BALB/c小鼠(每组最多5只)。每次施用抗原前均抽血,然后每隔一周免疫一次,持续5周。在最后的时间点处死小鼠,并收集末端血液。通过以下方法分析每个出血时间点收获的血清,以研究抗-HBs抗体对CP-BNP免疫的应答:i)使用诊断血清学测试(Elecsys Anti-HBs试剂盒,Roche)测定抗-HBs抗体滴度(IU/L);ii)用于检测WT-VLP或 HBsAg环1或环2肽的标准ELISA方法;以及iii)在Bioplex平台上的抗-HBs 抗体诱导的CP特性测定分析(内部测定)。该表中报告的环1和环2反应性是通过HBsAg特性测定报告CP-BNP或制剂的分析,以确定与清除相关的一个或多个HBsAg CP表位的保留展示(即“清除”抗-HBs应答的靶表位)。

[0266] 图13A显示了CP-BNP制备物和制剂的抗-HBs抗体免疫原性应答。图 13B和图13C分别显示了对CP表位环状肽的环1和环2的抗-HBs抗体免疫原性应答。图13D报告了对WT-BNP、环1肽和环2肽抗原的抗-Hbs反应性。总之,这些结果表明,本技术的CP-BNP和CP表位环状肽引发了HBV-特异性免疫应答,并且在诱导产生抗-HBs的方法中有用。

[0267] 实施例14:CP-BNP诱导CHB清除特性

[0268] 该实施例证实了本技术的CP-BNP能够在经免疫的对象中诱导清除特性。

[0269] 分析遵循用CP-BNP制备物(CP-BNP 1-8)和制剂(CP-BNP 1+3、1+3+4、 1+4、WT+4、5

+7或1+4+5)进行的n＝3次的免疫程序的末端血液血清的抗-HBs 抗体特性。图14中显示的结果证明了本技术的CP-BNP诱导了清除特性(例如,丧失环1和环2表位的表位识别)。因此,这些结果表明,包含本技术的CP-BNP 的组合物可用于治疗慢性乙型肝炎的方法。

[0270] 实施例15:编码CP-BNP和CP表位环状肽的mRNA诱导CHB清除特性

[0271] 该实施例将证明编码本技术的CP-BNP和CP表位环状肽的mRNA能够在经免疫的对象中诱导清除特性。

[0272] 六周龄BALB/c小鼠(每组5只)以两周的间隔用3x 2ug剂量的经纯化的编码CP-BNP或CP表位环状肽的mRNA免疫。每次抗原施用前抽血,然后在免疫接种之后以每周一次的间隔持续5周抽血。在最后的时间点处死小鼠并收集最终的血液。通过以下方法分析每个出血时间点采集的血清,以研究抗-HBs 抗体对CP-BNP免疫的应答:i)使用诊断性血清学测试(Elecsys Anti-HBs试剂盒, Roche)测定抗-HBs抗体滴度(IU/L);ii)用于检测WT-VLP或HBsAg环1或环2 肽的标准ELISA方法;以及iii)在Bioplex平台上的抗-HBs抗体诱导的CP特性测定分析(内部测定)。

[0273] 结果将表明,本技术的mRNA构建体在经免疫的小鼠中诱导清除特性(例如,在环1和环2表位的表位识别丧失)。因此,这些结果将证明包含本技术的 mRNA构建体的组合物可用于治疗慢性乙型肝炎的方法。

[0274] 实施例16:CP-BNP降低了慢性乙型肝炎(CHB)鼠模型中的HBV DNA和HBsAg水平

[0275] 用于产生测试疫苗候选物(CP-BNP 1、3、4、5、7)的材料和方法用于在鼠CHB模型中测试.将含有HBsAgS-特异性的cDNA插入物(WT或如表 3和表4中所述的各种插入物)的质粒克隆至pCAGGS(带有N末端FLAG标签) 中,并如前文所述使用聚乙烯亚胺(PEI)转染HEK293T细胞(Longo,2013)。功能性HBsAgS蛋白(包括带有插入的其他序列的嵌合HBsAgS蛋白)组装成可分泌的病毒样颗粒、生物纳米颗粒(BNP)。转染后五天,收获细胞培养基并离心以除去细胞碎片。将细胞培养基在20％蔗糖垫上高速离心(超速离心)以成团并部分纯化BNP,然后重悬于氯化钠(NaCl)-Tris-EDTA(STE)缓冲液中。BNP的进一步纯化是通过使用STE中的蔗糖(20％-50％)梯度的超速离心来进行的。收集含VLP的级分,汇集(根据需要),交换缓冲液并在PBS中浓缩(Hyakumura,2015; Cheong,2009;Patzer,1986),并于-80℃储存直至使用。如先前所述,通过ELISA 或蛋白质印记确认了HBsAg VLP。

[0276] 鼠CHB模型.CBA/caJ CHB小鼠模型是通过水动力注射HBV复制子(pAAV/HBV1.2)的HDI)开发的,其允许通过静脉内注射至尾静脉中将DNA 递送到肝细胞中(Kim,2013;Yang,2002;Huang,2006)。这种体内转染模式是必要的,因为乙型肝炎病毒(HBV)不自然感染小鼠。含有可复制HBV DNA的质粒的单个HDI诱导稳定的HBV,这取决于所用的小鼠品系(对于CBA小鼠,持续>6个月并产生肝特异性HBV病毒标志物(长达32周))。HBV在携带小鼠中的长期表达不引起肝损害,这可以通过正常水平的肝损害指标(丙氨酸氨基转移酶,ALT)来证明。HDI后,在小鼠血清中测量HBV DNA,以确认建立了HBV 持久性。然后将具有持续性HBV的小鼠用于免疫研究,以测试具有清除特性- 特异性表位重复序列(CP-BNP)的嵌合BNP诱导能够干扰和/或从肝脏清除HBV 的治疗性免疫信用的能力。

[0277] 建立慢性乙型肝炎后(约第10周)之后,用安慰剂(佐剂对照)、对照颗粒 (Engerix B(在酵母细胞中生产的市售HBV疫苗)、野生型BNP(WT-BNP]))或测试疫苗候选物(CP-BNP 1-7,以等摩尔比与最终浓度进行各种组合,如图15A 至图15C和图16A至图16C列出)处理6

至8只CBA/caJ小鼠的组。处理时间表包括佐以氢氧化铝的不同嵌合BNP的混合物。皮下给予三剂疫苗，每剂之间间隔2周。直到HDI后至26周，每2周进行一次颌下出血，测试以确定血清HBV DNA负荷(Sitnik,2010)和HBsAg水平(根据制造商推荐的方案;qHBsAg Elecsys)。

[0278] 鼠CHB模型结果-HBV DNA水平.以下描述的HBV DNA水平结果示于图15A至图15C中。安慰剂(组1)在整个研究持续期间并未显著改变HBV DNA水平。将WT-BNP以0.05μg(组2)、0.1μg(组3)或0.5μg(组4和12)给药。0.05μg(组2)剂量的WT-BNP对HBV DNA水平没有影响，而0.1μg(组 3)或0.5μg(组4和12)剂量展现出HBV DNA水平的剂量依赖性降低。0.5μg(组8和13)的CP-BNP 1+4+5的组合展示出HBV DNA的最快且最陡降低，其从W12(第一剂量之后两周)直至研究结束(W26)都有持续的作用。用0.5μg的 CP-BNP 1+4+5观察到最大降低，展示出HBV DNA相对于基线W10有3log 降低并且从W12开始HBV DNA相对于WT-BNP(在相同剂量下)还有至少2log 降低(W14开始观察到最大降低)(>3log降低)。使用小于0.5μg的剂量，CP-BNP 1+4+5还展示出HBV DNA的剂量依赖性降低，但是更低剂量的0.05μg(组6) 或0.1μg(组7)相对于相同剂量的WT-BNP具有更高的HBV DNA。还在该模型中测试了CP-BNP的其他组合，并且发现其比CP-BNP 1+4+5较不有效。例如，0.5μg的CP-BNP 1+3+4的组合和减少的组合(CP-BNP 3+4(组9)，CP-BNP 4+5(组10)，CP-BNP 5+7(组11))也在HBV DNA水平方面得以降低，但以更缓慢的速率和更不绝对的下降也是如此，其在W12开始实现>1log降低并在整个研究持续时间得以维持。图15A至图15C中呈现的数据也以表格形式分别在表 7、表8和表9中显示为各个值、平均值和相对于基线的平均值变化。

[0279] 表7.各个HBV DNA数据.

[0280]

	W10 (BL)	W12	W14	W16	W18	W20	W22	W24	W26
组 1 安慰剂	5.62	5.12	5.44	5.62	5.65	5.85	5.73	5.69	5.66
	5.84	5.60	6.03	6.08	6.17	6.64	6.08	6.06	6.49
	6.29	5.90	5.68	6.09	6.30	6.71	6.57	6.57	6.28
	4.84	5.60	5.85	6.04	6.13	6.24	6.96	6.96	6.38
	5.81	5.62	5.85	6.14	6.28	6.51	6.42	6.43	6.32
	6.23	6.50	6.54	6.50	6.44	6.54	6.70	6.69	6.50
组 2 WT BNP 0.05ug	5.75	5.57	5.88	6.10	6.42	6.54	6.87	6.87	6.58
	5.73	5.50	5.48	5.96	6.13	6.16	6.00	5.98	5.82
	5.49	5.05	5.22	5.56	5.54	5.59	5.66	5.61	5.24
	6.35	5.93	6.26	6.60	6.81	6.91	6.84	6.84	6.51
	5.68	5.55	5.88	5.93	6.31	6.46	6.44	6.43	4.36
	6.36	6.05	6.05	6.81	6.56	6.53	7.14	7.14	7.61
组 3 WT BNP 0.1ug	6.03	5.82	6.14	6.37	6.29	6.53	6.73	6.73	6.21
	5.92	6.01	6.19	6.53	6.64				
	5.09	5.00	5.00	4.62	4.47	4.35	3.84	2.48	5.06
	5.13	2.48	2.48	2.32	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	4.82	2.48	2.48	2.52	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
组 4 WT BNP 0.5ug	5.95	4.10	3.00	3.02	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	6.02	2.48	2.48	2.53	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.28	2.48	2.48	2.53	2.48	3.65			
	6.05	5.83	5.77	6.69	6.64	6.83	6.72	6.71	6.56
	6.26	5.65	5.91	6.51	6.27	5.83	5.50	5.43	5.50
	5.39	5.25	5.50	5.91	5.95	6.38			
组 5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug	5.99	5.42	5.12	4.07	3.21	2.48	2.90	2.48	3.73
	4.52	4.33	4.42	2.89	2.48	5.37			
	5.92	5.98	5.95	5.73	6.10	6.49	6.69	6.68	6.43
	5.98	5.90	5.80	3.57	2.16	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.91	4.78	2.47	3.37	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.92	5.66	6.27	6.28	6.77	6.62	7.22	7.22	6.75
	5.75	5.95	6.37	6.20	6.77	8.24			
组 6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug	5.60	5.74	6.02	6.16	6.41	6.34	6.55	6.54	6.19
	5.99	5.87	6.22	6.19	6.69	6.66	6.95	6.95	6.37
	6.06	6.27	6.50	6.63	6.96	6.86	7.13	7.13	6.30
	4.70	5.13	5.18	5.47	4.94	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.45	5.52	5.96	5.97	6.06	5.96	5.93	5.91	5.18
	6.05	6.06	6.38	6.34	6.81	6.74	6.71	6.71	6.51

[0281]

	5.64	5.63	6.15	6.14	6.40	6.20	6.38	6.37	6.57
组 7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug	5.64	5.61	5.87	6.18	6.09	6.24	6.37	6.36	6.56
	5.96	5.43	4.82	3.45	2.48	2.48	2.48	2.48	3.41
	4.37	4.30	2.48	2.40	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	6.27	6.02	6.55	6.37	6.58	6.81	6.93	6.93	6.12
	6.06	6.16	6.61	6.34	6.73	6.78	7.33	7.33	6.55
	6.11	5.90	6.36	6.30	6.79	6.89	6.77	6.77	7.37
	6.43	6.21	6.30	6.24	6.74	6.46	6.87	6.86	6.31
组 8 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	5.53	2.48	3.31	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.99	5.82	2.48	2.48	2.48	2.48			
	5.98	2.47	3.01	2.97	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	6.62	2.48	2.48	2.88	2.48	2.97	2.48	2.48	2.48
	6.69	2.48	2.48	2.57	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.57	4.00	2.48	3.33	2.48	1.73	2.48	2.48	2.48
	6.17	2.26	2.48	2.48	2.48	2.48			
组 9 CP-BNP 3+4 0.5ug	5.86	4.12	3.61	2.55	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.71	5.96	6.21	6.49	6.35	6.49	6.40	6.39	5.87
	5.84	3.99	3.71	3.53	2.51	3.24	2.23	2.48	4.96
	5.67	3.34	2.48	3.15	2.48	2.48	2.48	2.48	4.09
	6.01	5.56	6.09	6.16	6.28	6.32	6.81	6.81	6.43
	5.66	2.48	2.54	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.38	5.55	5.53	4.93	4.08	4.35	3.68	2.48	5.95
组 10 CP-BNP 4+5 0.5ug	5.65	5.53	3.56	**2.48**	2.48	2.48	2.48	2.48	3.12
	5.96	5.99	6.00	6.05	5.84	6.42	5.06	4.83	2.48
	5.64	5.38	5.47	5.30	2.48	2.48	2.21	2.48	2.48
	4.96	2.48	3.02	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	4.68	3.06	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.90	5.40	5.58	5.37	5.82	5.79	5.64	5.59	6.15
	5.88	5.14	5.84	5.72	5.96	6.11	6.28	6.27	6.00
组 11 CP-BNP 5+7 0.5ug	4.57	2.38	3.01	2.41	2.50	2.70	2.60	2.48	4.39
	5.33	5.23	5.77	5.59	5.57	5.39	5.18	5.02	5.07
	5.16	4.80	5.27	4.81	2.21	2.87	2.48	2.48	2.48
	5.95	5.55	3.74	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.71	4.90	5.82	5.99	6.25	6.29	6.71	6.71	6.66
	5.93	5.70	5.64	5.42	5.55	5.44	5.18	5.02	5.10
	4.38	3.58	4.16	4.37	4.52	4.69	3.93	2.48	5.36
组 12 WT-BNP 0.5ug	6.20	5.86	5.96	2.48	2.48	2.48			
	6.25	5.95	4.62	4.41	4.59	4.60			
	6.13	5.65	6.45	6.31	3.77	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.72	2.48	2.48	3.07	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	4.90	4.27	2.38	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48	3.53
	5.70	5.51	6.12	6.17	6.40	6.33	6.50	6.49	5.90
组 13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	5.72	5.18	2.48	2.43	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.20	4.79	4.86	2.92	2.48	2.23			
	5.60	3.59	2.48	2.48	2.34	2.47	2.48	2.48	2.48
	5.35	3.49	2.48	2.48	2.23	2.48			
	4.46	3.03	2.48	2.59	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
	5.42	4.75	2.48	2.53	2.48	2.47	2.48	2.48	2.48

[0282] 表8.平均HBV DNA数据.

[0283]

	平均值												
组	W2	W4	W6	W8	W10 (BL)	W12	W14	W16	W18	W20	W22	W24	W26
组 1 安慰剂	6.21	6.34	6.31	5.73	5.77	5.72	5.90	6.08	6.16	6.41	6.41	6.40	6.27
组 2 WT BNP 0.05ug	6.01	6.18	6.11	5.66	5.89	5.61	5.80	6.16	6.29	6.36	6.49	6.48	6.02
组 3 WT BNP 0.1ug	5.81	5.78	5.96	5.64	5.40	4.36	4.46	4.47	4.47	3.96	3.88	3.54	4.05
组 4 +12WT BNP 0.5ug	6.07	6.07	6.14	5.71	5.82	4.62	4.43	4.34	4.04	4.04	3.89	3.88	3.92
组 5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug	6.01	6.14	6.19	5.65	5.71	5.43	5.20	4.59	4.28	4.88	4.35	4.27	4.37
组 6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug	6.23	6.35	6.35	5.83	5.64	5.75	6.06	6.13	6.32	5.89	6.02	6.01	5.66
组 7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug	6.11	6.31	6.32	5.76	5.83	5.66	5.57	5.33	5.41	5.45	5.60	5.60	5.54
组 8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	6.04	6.23	6.26	5.82	5.71	3.60	2.76	2.66	2.45	2.44	2.48	2.48	2.48
组 9 CP-BNP 3+4 0.5ug	6.04	6.11	6.08	5.71	5.73	4.43	4.31	4.18	3.81	3.98	3.79	3.65	4.61
组 10 CP-BNP 4+5 0.5ug	5.90	5.92	5.85	5.55	5.53	4.71	4.56	4.27	3.93	4.03	3.80	3.80	3.60
组 11 CP-BNP 5+7 0.5ug	6.00	5.96	6.04	5.50	5.29	4.59	4.77	4.44	4.15	4.27	4.08	3.81	4.50

[0284] 表9.相对于基线HBV DNA数据的平均值变化.

[0285]

	相对于基线(W10)的平均值变化								
组	W10 (BL)	W12	W14	W16	W18	W20	W22	W24	W26
组 1 安慰剂	0.00	-0.05	0.13	0.31	0.39	0.64	0.64	0.63	0.50
组 2 WT BNP 0.05ug	0.00	-0.28	-0.10	0.27	0.40	0.47	0.60	0.59	0.13
组 3 WT BNP 0.1ug	0.00	-1.04	-0.94	-0.93	-0.93	-1.44	-1.52	-1.86	-1.34
组 4+12 WT BNP 0.5ug	0.00	-1.20	-1.39	-1.48	-1.78	-1.78	-1.93	-1.95	-1.90
组 5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug	0.00	-0.28	-0.51	-1.13	-1.43	-0.83	-1.36	-1.45	-1.34
组 6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug	0.00	0.10	0.42	0.49	0.68	0.25	0.38	0.37	0.02
组 7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug	0.00	-0.17	-0.26	-0.51	-0.42	-0.38	-0.23	-0.23	-0.29
组 8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	0.00	-2.11	-2.95	-3.05	-3.27	-3.28	-3.24	-3.24	-3.24
组 9 CP-BNP 3+4 0.5ug	0.00	-1.30	-1.42	-1.55	-1.93	-1.76	-1.94	-2.08	-1.12
组 10 CP-BNP 4+5 0.5ug	0.00	-0.81	-0.96	-1.26	-1.60	-1.49	-1.72	-1.73	-1.93
组 11 CP-BNP 5+7 0.5ug	0.00	-0.70	-0.52	-0.85	-1.14	-1.03	-1.21	-1.48	-0.79

[0286] 鼠CHB模型结果-HBsAg水平.下文所述的HBsAg水平结果示于图16A至图16C中。在整个研究持续期间,安慰剂(组1)并未显著改变HBsAg 水平。将WT-BNP以0.05μg(组2)、0.1μg(组3)或0.5μg(组4和12)给药。 WT-BNP 0.05μg(组2)剂量对HBsAg水平没有影响,而0.1μg(组3)或0.5μg(组 4和12)剂量展示出HBsAg水平的剂量依赖性降低。0.5μg的CP-BNP 1+4+5的组合(组8和13)展示出HBsAg的最快且最陡降低,其从W12(第一剂量之后两周)直至研究结束(W26)都有持续的作用。用0.5μg的CP-BNP 1+4+5观察到最大降低,展现出相对于基线W10的HBsAg的3log降低,并且还有相对于从 W12开始的相同剂量的WT-BNP的HBsAg的>1log降低,在W14开始观察到最大降低。使用小于0.5μg的剂量,CP-BNP 1+4+5还展示出HBsAg的剂量依赖性降低,但更低剂量的0.05μg(组6)类似于相同剂量的WT-BNP,或0.1μg(组 7)相对于相同剂量的WT-BNP具有更高的HBsAg。其他CP-BNP组合还在该模型中进行了测试,并且发现与CP-BNP 1+4+5更不有效,但以更缓慢的速率和更不绝对的下降也是如此,其在W12开始实现>0.5log降低并在整个研究持续时间得以维持。

[0287] 图16A至图6C中表示的数据也以表格形式分别在表10、表11和表12中显示为各个值、平均值和相对于基线的平均值变化。

[0288] 表10.各个HBsAg数据.

[0289]

	W10 (BL)	W12	W14	W16	W18	W20	W22	W24	W26
组 1 安慰剂	3.04	2.96	2.18	2.50	2.53	2.57	2.56	2.35	2.60
	3.35	3.17	3.09	3.18	3.13	3.18	3.08	3.03	3.14
	3.23	3.26	2.95	2.95	3.09	3.12	3.11	3.17	3.20
	3.19	3.09	2.99	3.06	3.06	3.04	2.96	3.02	3.12
	2.72	2.94	2.78	2.92	2.99	2.87	2.95	2.93	3.08
	3.45	3.53	3.57	3.55	3.45	3.43	3.26	3.26	3.39
组 2 WT BNP 0.05ug	2.83	2.96	2.88	2.89	2.93	3.00	2.87	2.92	2.98
	2.66	2.76	2.82	2.68	2.40	2.41	2.27	2.13	2.29
	2.38	2.04	1.95	1.82	1.90	1.77	1.82	1.66	1.40
	3.42	3.46	3.39	3.36	3.41	3.35	3.28	3.13	3.30
	3.03	3.03	2.94	3.08	3.00	2.99	2.86	2.53	1.30
	3.18	3.38	3.25	3.46	3.41	3.30	3.38	3.21	3.44
组 3 WT BNP 0.1ug	2.99	3.11	3.05	2.88	2.97	2.99	2.86	2.73	2.71
	3.38	3.31	3.32	3.36	3.35				
	1.53	2.07	2.00	1.49	1.19	1.00	0.98	2.77	0.71
	2.66	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.15	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.59	0.00
组 4 WT BNP 0.5ug	3.24	2.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.21	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.04
	1.84	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00			
	3.03	3.14	3.07	3.20	3.15	3.18	2.99	3.03	3.12
	3.34	2.79	2.98	3.24	3.22	2.80	2.44	2.29	2.02
	2.34	2.67	2.31	2.64	2.78	2.72			
组 5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug	3.26	2.80	2.57	1.34	0.63	0.35	0.28	0.13	0.15
	1.57	1.83	1.35	0.68	0.35	0.38			
	3.02	2.90	2.74	2.62	2.65	2.61	2.70	2.55	2.66
	2.75	2.91	2.63	0.71	0.00	0.00	0.00	0.70	0.00
	2.66	2.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.29	2.92	3.07	3.11	3.09	2.96	3.03	2.98	3.09
	3.09	3.15	3.30	3.32	3.39	3.60			
组 6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug	3.51	3.12	3.11	3.04	3.06	3.05	3.00	3.05	3.05
	3.47	3.56	3.55	3.46	3.53	3.45	3.43	3.34	3.40
	3.84	3.28	3.32	3.42	3.37	3.06	3.30	3.06	3.16
	2.08	2.57	2.40	2.35	1.69	0.00	0.00	1.51	0.00
	3.07	2.91	2.89	2.81	2.91	2.80	2.57	1.88	1.68
	3.21	3.18	3.21	3.15	3.05	3.04	3.02	2.98	2.97
	3.02	3.22	3.26	3.17	3.16	3.03	3.03	3.03	3.16
组 7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug	2.32	2.57	2.64	2.69	2.71	2.60	2.62	2.61	2.59

[0290]

	3.14	3.11	1.90	0.45	0.06	0.00	0.00	0.62	0.00
	2.30	1.69	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.89	3.50	3.41	3.42	3.32	3.18	3.28	3.15	3.00
	3.28	3.34	3.37	3.31	3.31	3.34	3.33	3.39	3.47
	3.30	3.11	3.21	3.13	3.11	3.18	3.14	3.22	3.29
	3.42	3.39	3.29	3.41	3.46	3.34	3.18	3.17	3.23
组 8 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	2.61	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.50	3.15	0.05	0.00	0.00	0.00			
	3.69	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.68	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.72	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.50	1.85	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.87	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00			
组 9 CP-BNP 3+4 0.5ug	2.27	1.67	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.17	2.93	2.98	3.12	3.06	2.80	2.79	2.80	2.74
	3.61	1.78	0.75	0.47	0.22	0.17	0.06	0.38	0.07
	2.80	1.00	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.04	2.63	2.78	2.67	2.77	2.71	2.54	2.68	2.79
	3.10	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.51	2.71	2.45	1.91	1.45	1.16	1.08	1.06	1.05
组 10 CP-BNP 4+5 0.5ug	2.62	2.52	0.62	**0.00**	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.78	3.06	2.87	3.10	2.92	2.90	0.00	0.00	0.00
	3.36	2.94	2.68	2.54	-0.06	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.34	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.94	1.44	-0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.17	3.23	2.96	2.90	2.83	2.72	2.50	2.73	2.82
	3.14	2.81	2.54	2.54	2.35	2.23	2.36	2.22	2.60
组 11 CP-BNP 5+7 0.5ug	2.82	1.21	0.44	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.46	2.53	2.52	2.56	2.28	2.00	1.84	1.99	1.92
	2.93	2.55	2.36	1.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3.44	2.87	1.26	1.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
	3.30	2.75	2.84	2.95	3.00	2.89	2.78	2.93	3.29
	3.03	2.82	2.87	2.18	2.19	2.12	1.56	2.02	2.05
	2.18	1.71	1.48	1.42	1.37	1.21	1.09	1.26	1.41
组 12 WT-BNP 0.5ug	3.04	3.13	2.75	0.00	0.00	0.00			
	3.31	3.22	1.94	1.68	1.50	1.48			
	3.01	2.95	2.94	3.23	1.18	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.98	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.56	1.68	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.99	2.80	2.81	2.82	2.71	2.87	2.55	2.34	2.44
组 13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	3.23	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
	3.32	2.68	2.01	0.00	0.00	0.00			
	2.91	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.88	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00			
	2.26	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	2.43	2.76	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12

[0291] 表11.平均HBsAg数据.

[0292]

	平均值												
组	W2	W4	W6	W8	W10 (BL)	W12	W14	W16	W18	W20	W22	W24	W26
组 1 安慰剂	3.12	3.14	3.19	3.01	3.16	3.16	2.93	3.03	3.04	3.03	2.98	2.96	3.09
组 2 WT BNP 0.05ug	2.90	2.82	2.88	2.90	2.92	2.94	2.87	2.88	2.84	2.81	2.75	2.60	2.45
组 3 WT BNP 0.1ug	2.69	2.44	2.63	2.67	2.54	1.70	1.75	1.54	1.50	1.00	0.96	1.52	0.86
组 4+12 WT BNP 0.5ug	2.85	2.81	2.87	2.89	2.91	2.03	1.63	1.40	1.21	1.09	1.00	0.96	1.08
组 5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug	3.03	2.87	2.92	2.84	2.66	2.72	2.24	1.68	1.44	1.41	1.20	1.27	1.18
组 6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug	3.06	3.10	3.09	3.12	3.17	3.12	3.11	3.06	2.97	2.63	2.62	2.69	2.49
组 7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug	3.02	2.95	3.00	3.06	3.09	2.96	2.56	2.34	2.28	2.23	2.22	2.31	2.23
组 8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	2.90	2.96	2.99	2.93	3.05	0.80	0.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
组 9 CP-BNP 3+4 0.5ug	2.74	2.71	2.70	3.00	2.93	1.82	1.36	1.17	1.07	0.98	0.92	0.99	0.95
组 10 CP-BNP 4+5 0.5ug	2.33	2.83	2.81	2.93	2.91	2.29	1.67	1.58	1.15	1.12	0.70	0.71	0.77
组 11 CP-BNP 5+7 0.5ug	2.84	2.79	2.75	2.69	2.88	2.35	1.97	1.84	1.26	1.17	1.04	1.17	1.24

[0293] 表12.相对于基线HBsAg数据的平均值变化.

[0294]

	相对于基线(W10)的平均值变化								
组	W10 (BL)	W12	W14	W16	W18	W20	W22	W24	W26
组 1 安慰剂	0.00	0.00	-0.24	-0.13	-0.12	-0.13	-0.18	-0.21	-0.08
组 2 WT BNP 0.05ug	0.00	0.02	-0.04	-0.04	-0.08	-0.11	-0.17	-0.32	-0.47
组 3 WT BNP 0.1ug	0.00	-0.84	-0.79	-1.00	-1.04	-1.54	-1.58	-1.02	-1.69
组 4+12 WT BNP 0.5ug	0.00	-0.88	-1.28	-1.51	-1.70	-1.82	-1.91	-1.95	-1.83
组 5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug	0.00	0.05	-0.43	-0.98	-1.22	-1.25	-1.46	-1.39	-1.48
组 6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug	0.00	-0.05	-0.06	-0.11	-0.20	-0.54	-0.55	-0.48	-0.68

[0295]

组 7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug	0.00	-0.14	-0.53	-0.75	-0.81	-0.86	-0.87	-0.78	-0.87
组 8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug	0.00	-2.24	-2.75	-3.05	-3.05	-3.05	-3.05	-3.05	-3.03
组 9 CP-BNP 3+4 0.5ug	0.00	-1.11	-1.57	-1.76	-1.86	-1.95	-2.00	-1.94	-1.98
组 10 CP-BNP 4+5 0.5ug	0.00	-0.62	-1.23	-1.33	-1.76	-1.79	-2.21	-2.20	-2.13
组 11 CP-BNP 5+7 0.5ug	0.00	-0.53	-0.91	-1.04	-1.62	-1.71	-1.84	-1.71	-1.64

[0296] 图15A至图15C和图16A至图16C中所示的结果表明,本技术的CP-BNP 在CHB模型中有效降低HBV DNA病毒载量和HBsAg水平。因此,这些结果表明,包含本技术的CP-BNP的组合物可用于治疗慢性乙型肝炎的方法中。

[0297] 实施例17:在转染编码BNP的核酸至哺乳动物细胞中之后从mRNA和蛋白质表达产生候选疫苗

[0298] 从mRNA产生WT和CP-BNP4候选疫苗.将含WT或BNP4编码序列的 pBluescript II SK(+)质粒用EcoRV-HF限制酶线性化、纯化并经由标准分子生物学技术确认。线性化的质粒用作使用体外转录试剂盒根据制造商(Life Technologies)推荐的mRNA产生的模板,然后纯化(Life Technologies,Thermo Fisher)。将所得转录物储存在-80℃下直至备用。使用Lipofectamine MessengerMAX试剂(ThermoFisher)进行转染至HEK293T或Huh7细胞中持续5 天。然后,收集培养基,并使用上述的蔗糖超速离心方法处理。替选地,使用 NP-40裂解缓冲液处理细胞裂解物,并使细胞碎片成团。如前所述,将样品通过蛋白质印记评估。

[0299] 将BNP编码核酸(mRNA和DNA)转染至哺乳动物细胞系后的蛋白质表达结果.如通过使用抗-HBsAg抗体的蛋白质印记分析所测量的,在两种不同的细胞系(HEK293T和Huh7)中成功实现了来自mRNA转染的HBsAg BNP表达 (图17A至图17B)。蛋白质印记鉴定出多个条带,包括预期尺寸的单体(WT-BNP, 24kD;CP-BNP 4,29kD)和糖基化变体(WT-BNP,27kD;CP-BNP 4,32kD)。此外,在用表达WT-BNP(带有flag标签15和28kDa)的DNA构建体转染后,检测到HBsAg。

[0300] 这些结果证明,本技术的mRNA构建体能够表达功能性HBsAg-S亚基,如其分泌到细胞培养上清液中的能力所证明的,这是BNP形成的指示。通过RNA转染产生的本技术的CP-BNP可用于治疗慢性乙型肝炎的组合物中。

[0301] 等效方案

[0302] 本技术不受本申请中描述的特定实施方式的限制,这些特定实施方式旨在作为本技术的各个方面的单个说明。如本领域技术人员将显而易见的,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下对本技术进行许多修改和变化。除了本文列举的方法和装置之外,根据前述说明,对于本领域技术人员而言,在本技术范围内的功能等效的方法和装置对于本领域技术人员而言是显而易见的。此类修改和变化旨在落入所附权利要求的范围内。本技术仅由所附权利要求书以及这些权利要求书所赋予的等效物的全部范围来限制。应当理解,本技术不限于特定的方法、试剂、化合物组成或生物系统,它们当然可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,而无意于进行限制。

[0303] 另外,在根据马库什组描述本公开的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,由此也根据马库什组的成员的任何单个成员或子组描述本发明。

[0304] 如本领域技术人员将理解的,出于任何目的和所有目的,特别是在提供书面描述方面,本文公开的所有范围也涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出的范围都可以容易地识别为充分描述,并且可以将相同范围分解为至少相等的二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之几等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域的技术人员也将理解,所有语言,诸如“最多”、“至少”、“大于”、“小于”等包括引用的数字,并且是指可以随后分解为如上所讨论的子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的成员。因此,例如,具有1个至3个单元的组是指具有1、2或3个单元的组。类似地,具有1个至5个单元的组是指具有1、2、3、4或5个单元的组,依此类推。

[0305] 本文所提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物,包括所有附图和表

格,都通过引用全文并入,只要它们与本说明书的明确教导不矛盾。

[0306] 在以下权利要求书内阐述了其他实施方式。

[0307] 参考文献

[0308] WHO实情报道,2018年7月18日

[0309] Nayagam等人.(2016)Lancet Infectious Dis 2016 16:1399-1408

[0310] Block等人.(2013)Antiviral Res.98(1):27-34

[0311] Cheong WS等人.Chimeric virus-like particles for the delivery of an inserted conserved influenzy A-specific CTL epitope.2009 Antiviral Res 81(2):113-122.

[0312] Chothia等人.(1987)J.Mol.Biol.196:901

[0313] Coligan等人.Current Protocols in Immunology,1991-1997

[0314] Gefter等人.(1977)Somatic Cell Genet.3:231-236

[0315] Huang LR等人.An immunocompetent mouse model for the tolerance of human chronic hepatitis B virus infection.2006 PNAS 103(47):17862-17867

[0316] Hyakumura M等人.Modification of asparagine-linked glycan density for the design of hepatitis V virus virus-like particles with enhanced immunogenicity. 2015 J Virol 89(22):11312-11322

[0317] Jones等人.(1986)Nature 321:522-525

[0318] Kim和Ahituv.The hydrodynamic tail vein assay as a tool for the study of liver promoters and enhancers.2013 Methods Mol Biol;1015:279-289

[0319] Kohler等人.(1975)Nature 256:495-499

[0320] Kohler等人.(1976)Eur.J.Immunol.6(7):511-519

[0321] Kozbor等人.(1986)Methods in Enzymology 121:140

[0322] Lim等人.(2014)Hepatology 60(1)supplement:1623,980A

[0323] Liu等人.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:3439-3443

[0324] Longo PA等人.Transient mammalian cell transfection with polylethylenimine(PEI).2013 Methods Enzymol 529:227-240

[0325] Patzer EJ等人.Cell culture derived recombinant HBsAg is highly immunogenic and protects chimpanzees from infection with hepatitis B virus. 1986 Nature Biotechnol 4:630-636

[0326] qHBsAg Elecsys from Roche Diagnostics.Immunoassay for the qualitative determination of hepatitis B surface antigen(HBsAg)(diagnostics.roche.com)

[0327] Richmann等人.(1988)Nature 332:323-327

[0328] Shulman等人.(1978)Nature 276:269-270

[0329] Sitnik R.等人.A real-time quantitative assay for hepatitis B DNA virus (HBV)developed to detect all HBV genotypes.2010 Rev Inst Med Trop Sao Paulo 52(3):119-124

[0330] Toyama等人.(1987)Monoclonal Antibody,Experiment Manual,Kodansha Scientific Trowbridge出版(1982)J.Exp.Med.148(1):220-227

[0331] Verhoeyen等人.(1988)Science 239:1534-1536

[0332] Volk等人.(1982)J.Virol.42(1):220-227

[0333] Volz等人.(2015)国际会议,乙型肝炎病毒分子生物学,会议IX:抗病毒疗法O-205,德国

[0334] Yang PL等人.Hydrodynamic injection of viral DNA:A mouse model of acute hepatitis B virus infection.2002 PNAS 99(21):13825-13830。

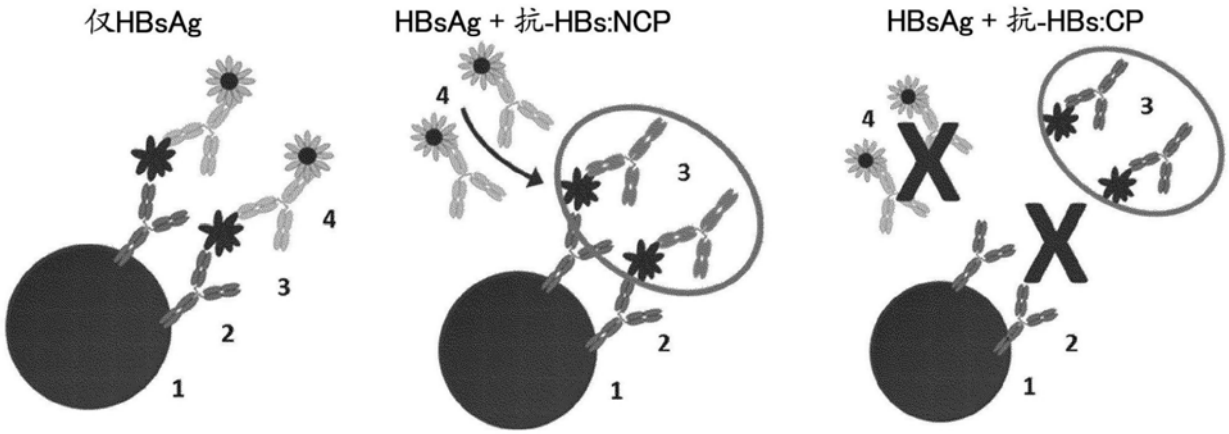

仅HBsAg
HBsAg + 抗-HBs:NCP
HBsAg + 抗-HBs:CP
1
2
3
4

图1

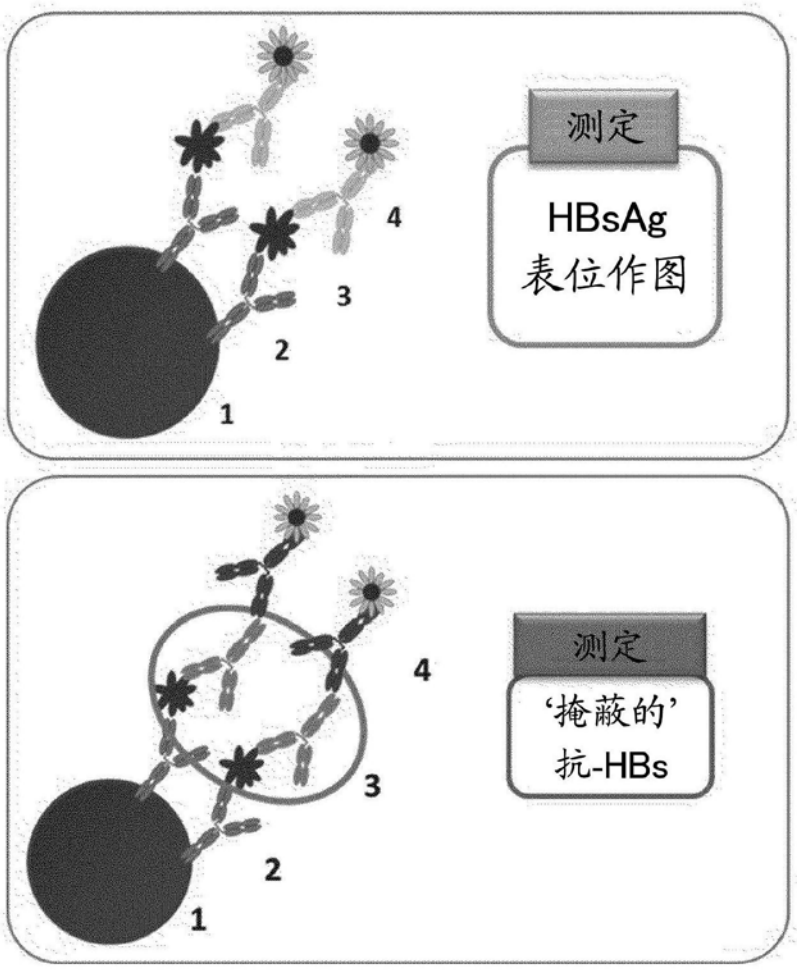

测定
HBsAg
表位作图
测定
'掩蔽的'
抗-HBs
1
2
3
4

图2

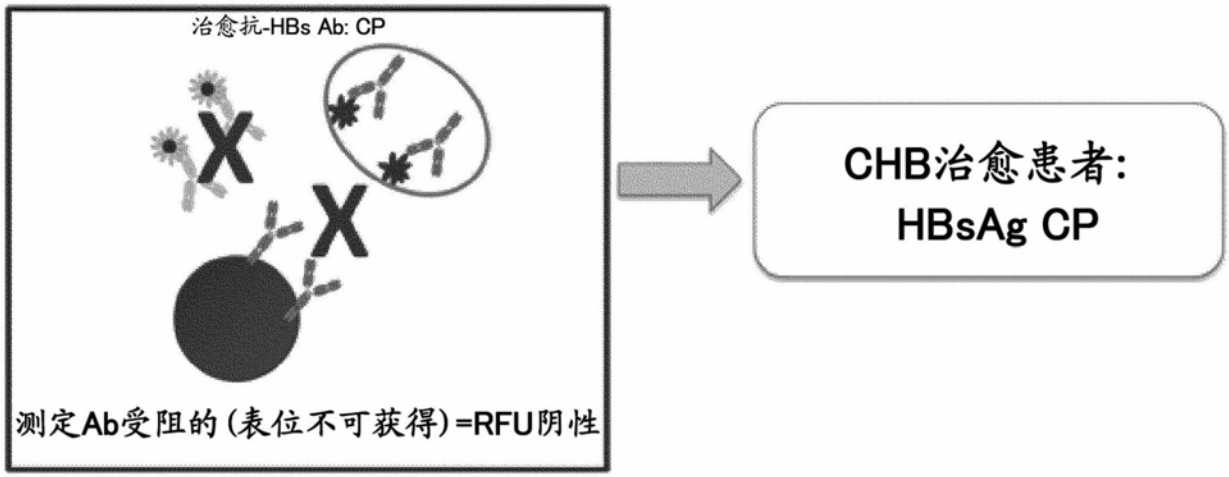

治愈抗-HBs Ab: CP
测定Ab受阻的(表位不可获得)=RFU阴性
CHB治愈患者:
HBsAg CP

图3

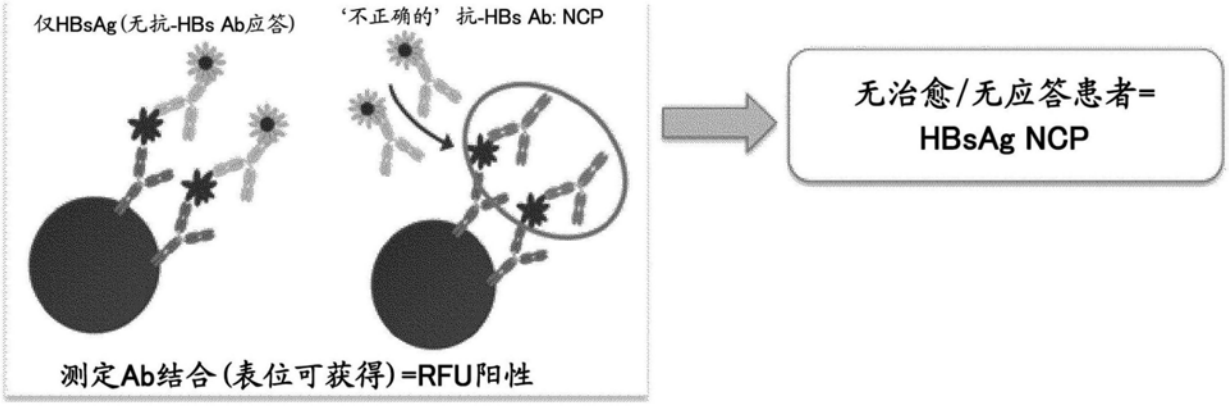

仅HBsAg(无抗-HBs Ab应答)
'不正确的' 抗-HBs Ab: NCP
测定Ab结合(表位可获得)=RFU阳性
无治愈/无应答患者=
HBsAg NCP

图4

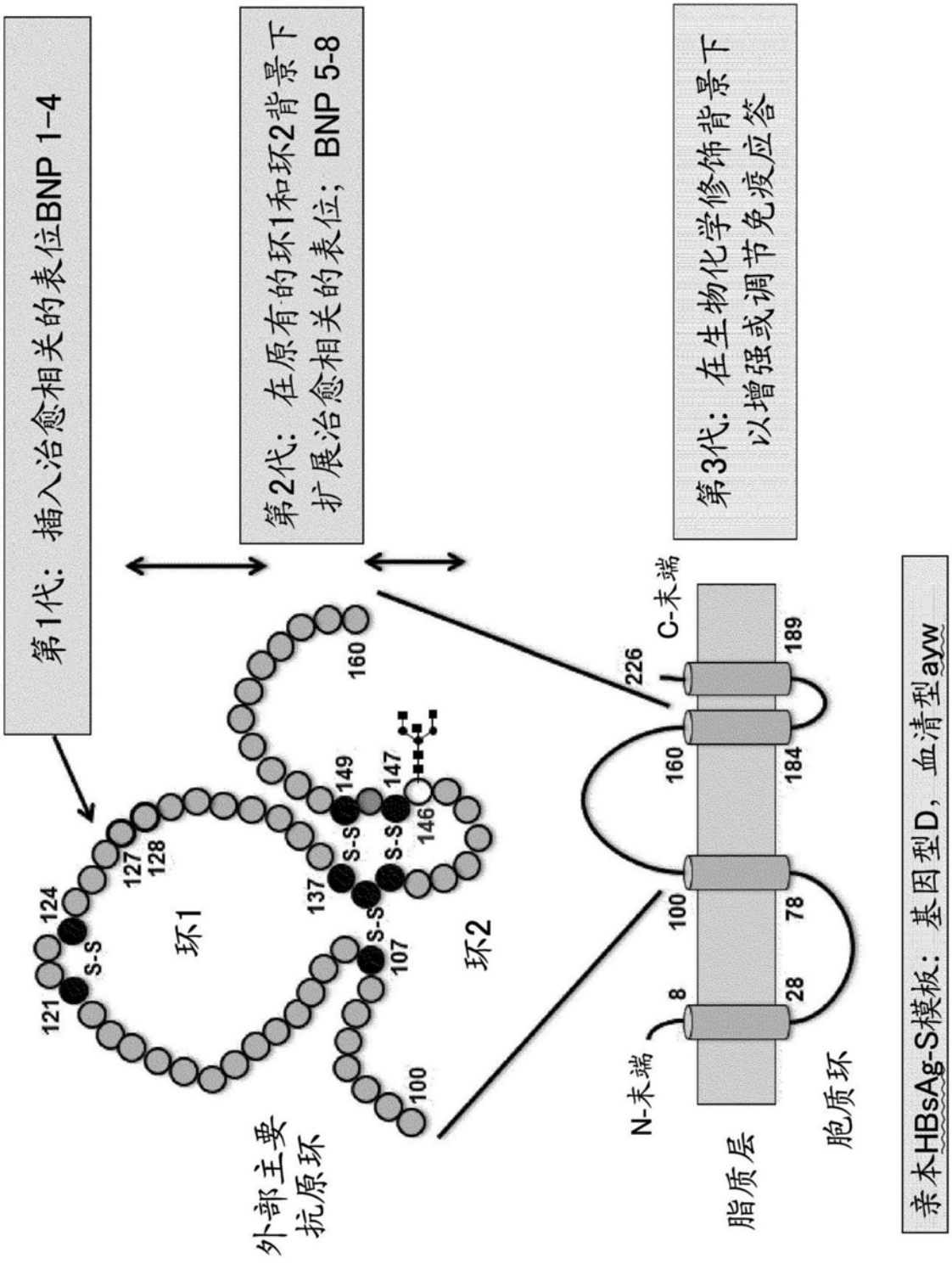

第1代：插入治愈相关的表位BNP 1-4
第2代：在原有的环1和环2背景下扩展治愈相关的表位；BNP 5-8
第3代：在生物化学修饰背景下以增强或调节免疫应答
121
124
S-S
127
128
环1
137
S-S
149
147
S-S
146
160
S-S
107
环2
100
外部主要抗原环
N-末端
8
100
160
C-末端
226
28
78
184
189
脂质层
胞质环
亲本HBsAg-S模板：基因型D，血清型ayw

图5

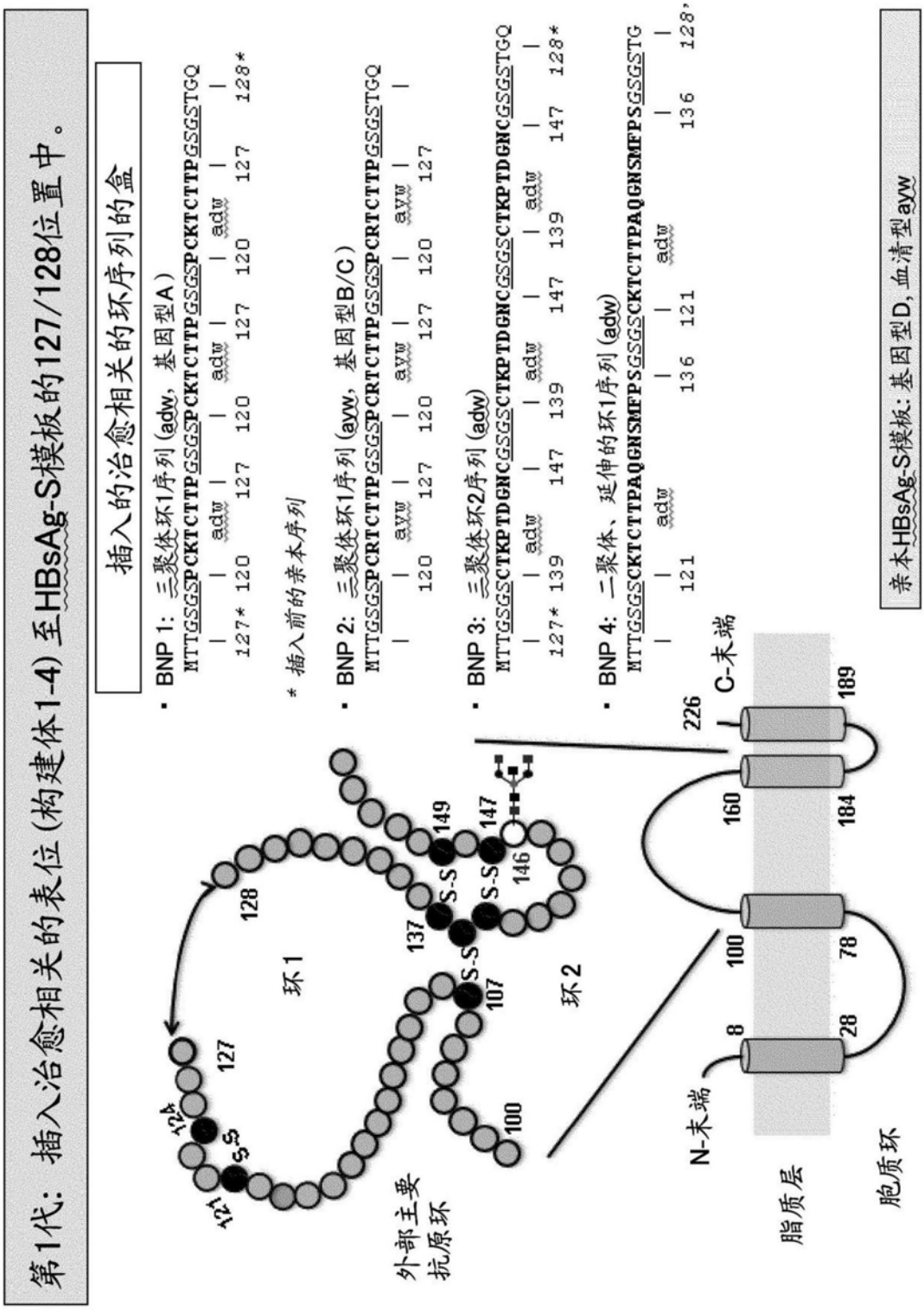

第1代：插入治愈相关的表位(构建体1-4)至HBsAg-S模板的127/128位置中。
插入的治愈相关的环序列的盒
BNP 1: 三聚体环1序列(adw，基因型A)
MTTGSGSPCKTCTTPGSGSPCKTCTTPGSGSPCKTCTTPGSGSTGQ
adw
127* 120 127 120 127 120 127 128*
* 插入前的亲本序列
BNP 2: 三聚体环1序列(ayw，基因型B/C)
MTTGSGSPCRTCTTPGSGSPCRTCTTPGSGSPCRTCTTPGSGSTGQ
ayw
120 127 120 127 120 127
BNP 3: 三聚体环2序列(adw)
MTTGSGSCTKPTDGNCGSGSCTKPTDGNCGSGSCTKPTDGNCGSGSTGQ
adw
127* 139 147 139 147 139 147 128*
BNP 4: 二聚体、延伸的环1序列(adw)
MTTGSGSCKTCTTPAQGNSMFPSGSGSCKTCTTPAQGNSMFPSGSGSTG
adw
121 136 121 136 128,
环1
环2
外部主要抗原环
N-末端
C-末端
脂质层
胞质环
S-S
亲本HBsAg-S模板：基因型D，血清型ayw

图6

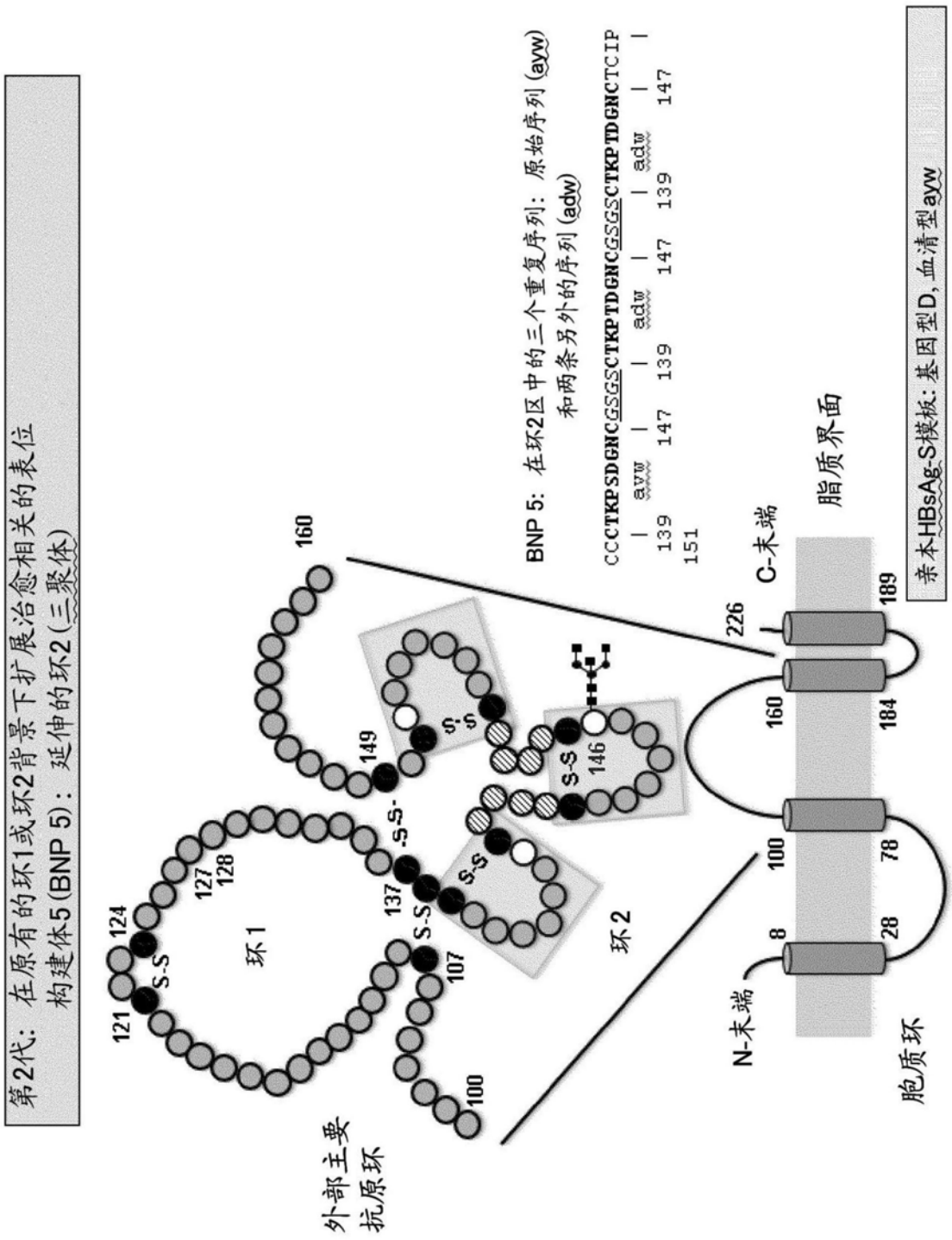

第2代：在原有的环1或环2背景下扩展治愈相关的表位
构建体5(BNP 5)：延伸的环2(三聚体)
BNP 5：在环2区中的三个重复序列：原始序列(ayw)
和两条另外的序列(adw)
CCCTKPSDGNCGSGSCTKPTDGNCGSGSCTKPTDGNCTCIP
ayw
adw
adw
139 147 139 147 139 147
151
亲本HBsAg-S模板：基因型D，血清型ayw
环 1
环 2
外部主要
抗原环
脂质界面
N-末端
C-末端
胞质环
S-S
100
107
121
124
127
128
137
146
149
160
8
28
78
100
160
184
189
226

图7

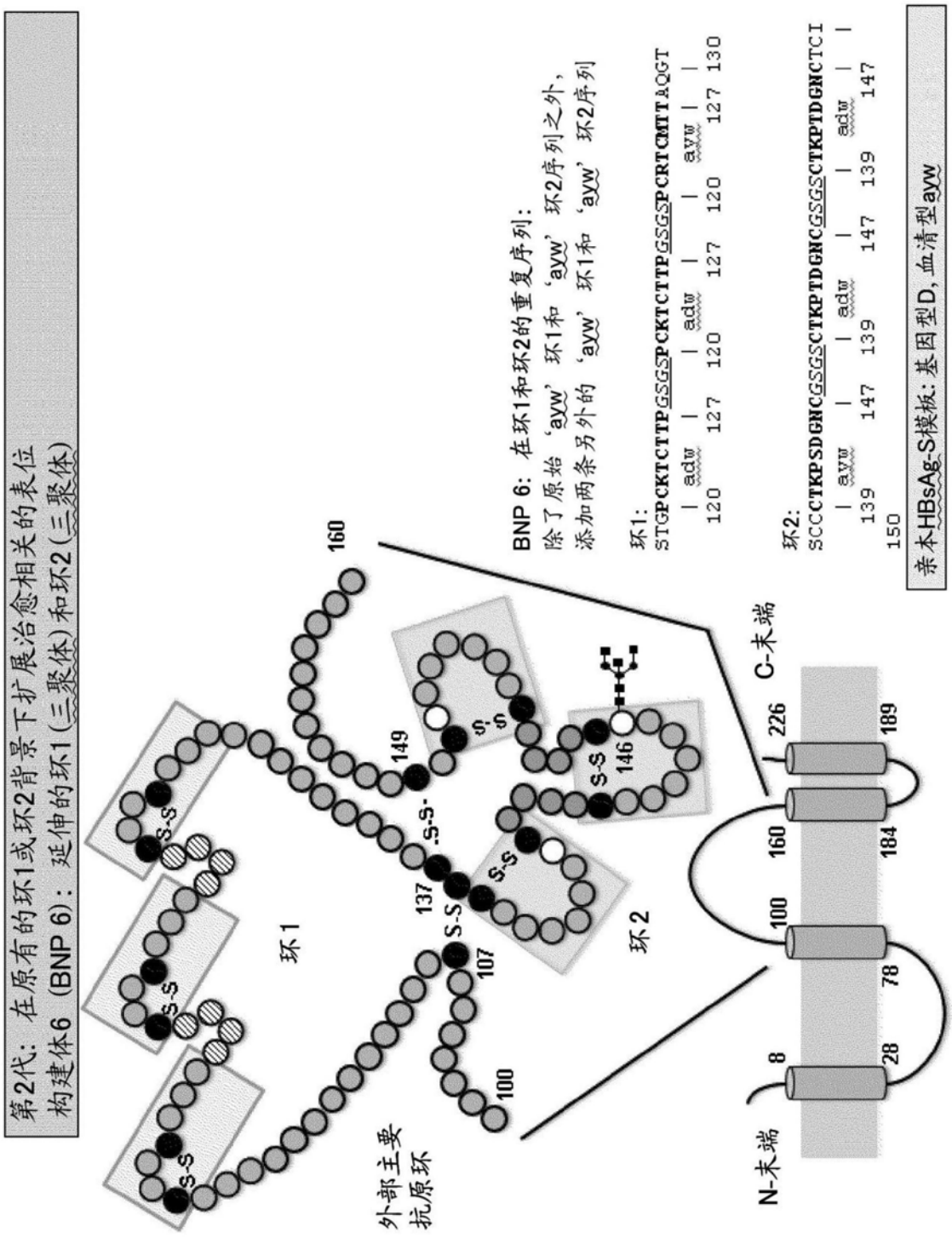

第2代：在原有的环1或环2背景下扩展治愈相关的表位
构建体6 (BNP 6)： 延伸的环1(三聚体)和环2(三聚体)
BNP 6：在环1和环2的重复序列：
除了原始 'ayw' 环1和 'ayw' 环2序列之外，
添加两条另外的 'ayw' 环1和 'ayw' 环2序列
环1:
STGPCKTCTTPGSGSPCKTCTTPGSGSPCRTCMTTAQGT
adw adw ayw
120 127 120 127 120 127 130
环2:
SCCCTKPSDGNCGSGSCTKPTDGNCGSGSCTKPTDGNCTCI
ayw adw adw
139 147 139 147 139 147
150
亲本HBsAg-S模板：基因型D，血清型ayw
环 1
环 2
外部主要
抗原环
N-末端
C-末端
S-S
8
28
78
100
107
137
146
149
160
184
189
226

图8

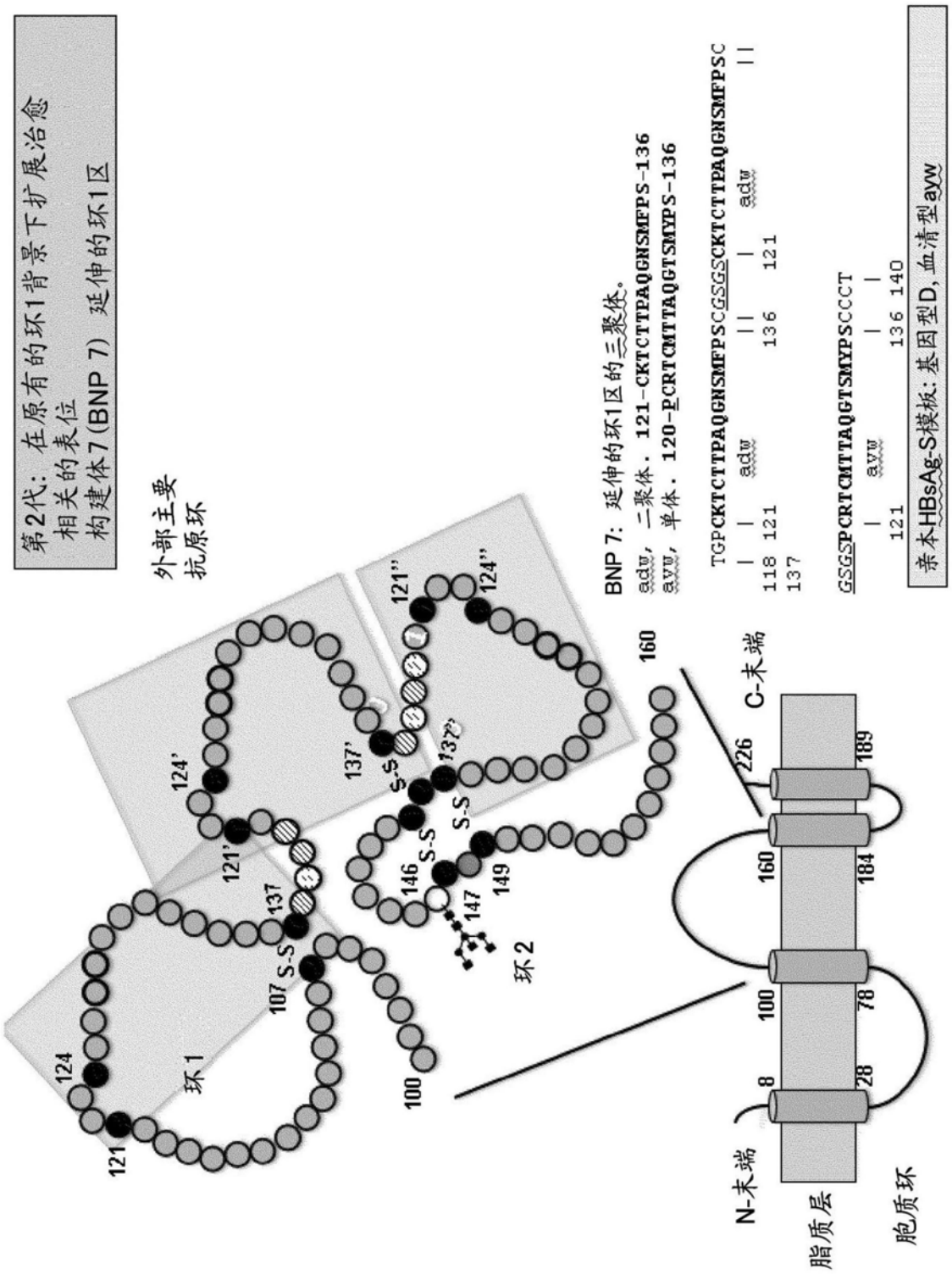

第2代：在原有的环1背景下扩展治愈相关的表位
构建体7(BNP 7) 延伸的环1区
外部主要抗原环
BNP 7：延伸的环1区的三聚体。
adw，二聚体．121-CKTCTTPAQGNSMFPS-136
ayw，单体．120-PCRTCMTTAQGTSMYPS-136
TGPCKTCTTPAQGNSMFPSCGSGSCKTCTTPAQGNSMFPSC
GSGSPCRTCMTTAQGTSMYPSCCCT
亲本HBsAg-S模板：基因型D，血清型ayw
环1
环2
N-末端
C-末端
脂质层
胞质环

图9

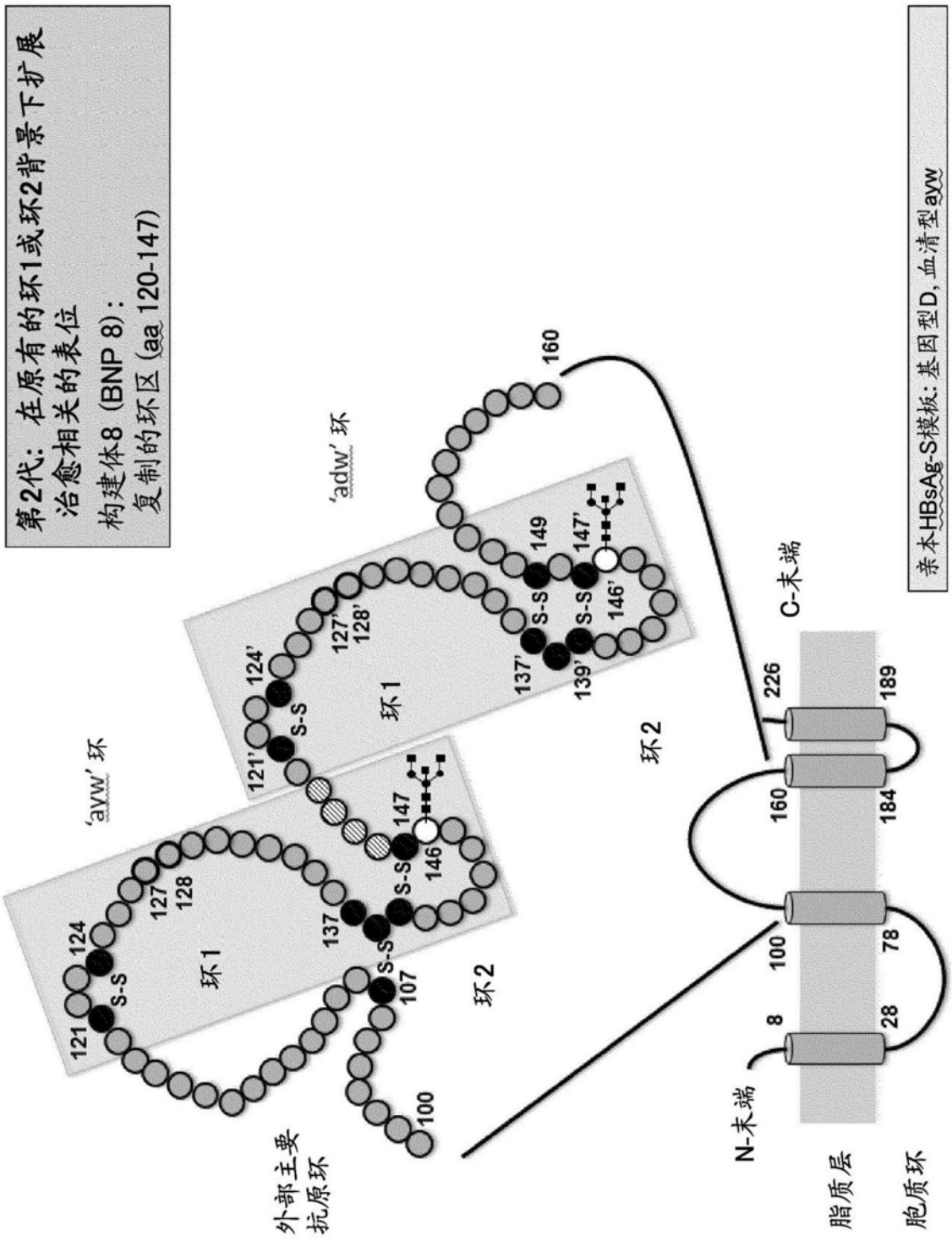

第2代：在原有的环1或环2背景下扩展
治愈相关的表位
构建体8 (BNP 8)：
复制的环区 (aa 120-147)
'ayw' 环
'adw' 环
环1
环2
S-S
121
124
127
128
137
146
147
107
100
121'
124'
127'
128'
137'
139'
146'
147'
149
160
外部主要
抗原环
N-末端
C-末端
脂质层
胞质环
8
28
78
100
160
184
189
226
亲本HBsAg-S模板：基因型D，血清型ayw

图10

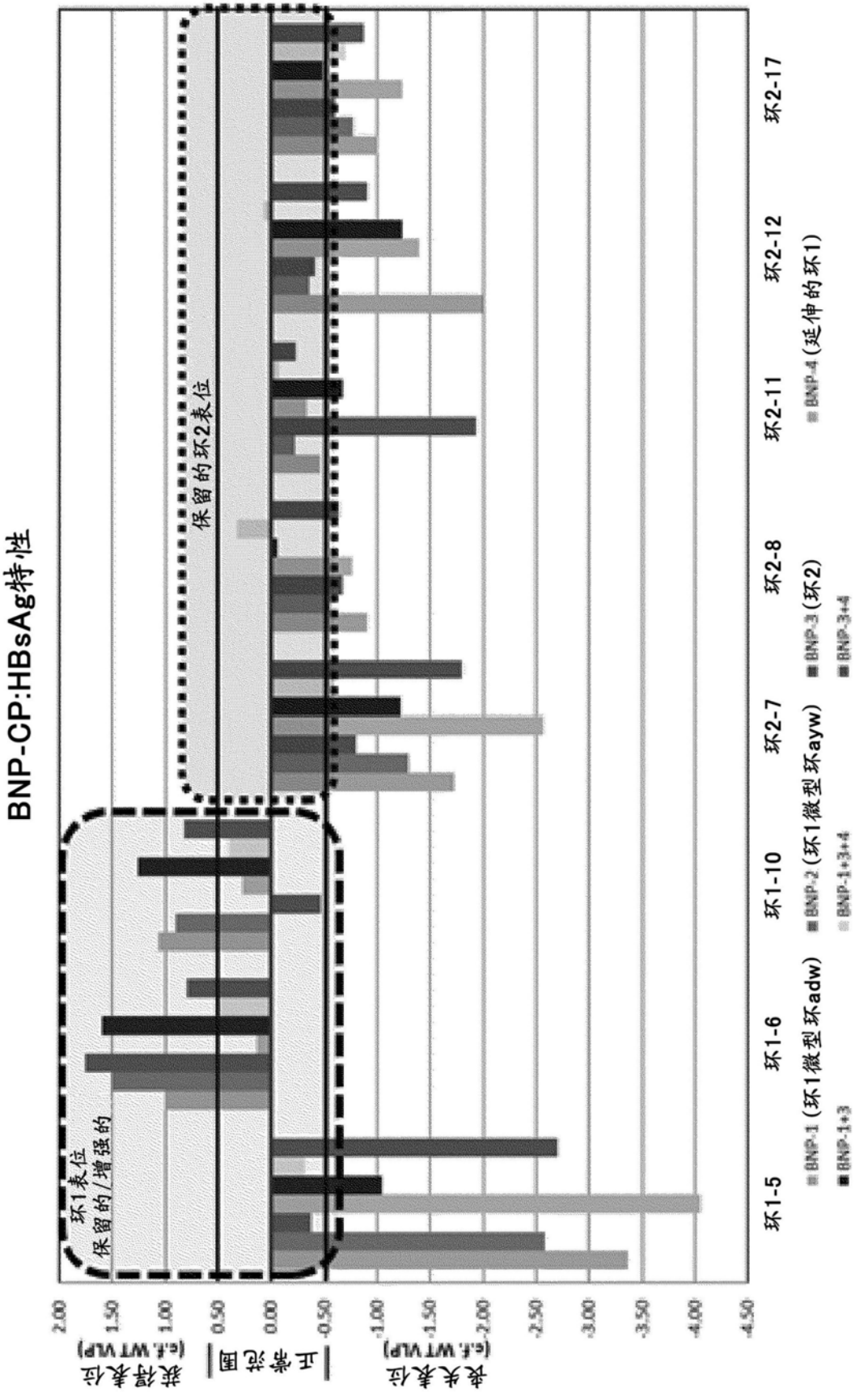

BNP-CP:HBsAg特异性
环1表位
保留的/增强的
保留的环2表位
获得表位
(e.f. WT VLP)
正常范围
丧失表位
(e.f. WT VLP)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
-4.50
环1-5
环1-6
环1-10
环2-7
环2-8
环2-11
环2-12
环2-17
BNP-1 (环1微型环adw)
BNP-2 (环1微型环ayw)
BNP-3 (环2)
BNP-4 (延伸的环1)
BNP-1+3
BNP-1+3+4
BNP-3+4

图11

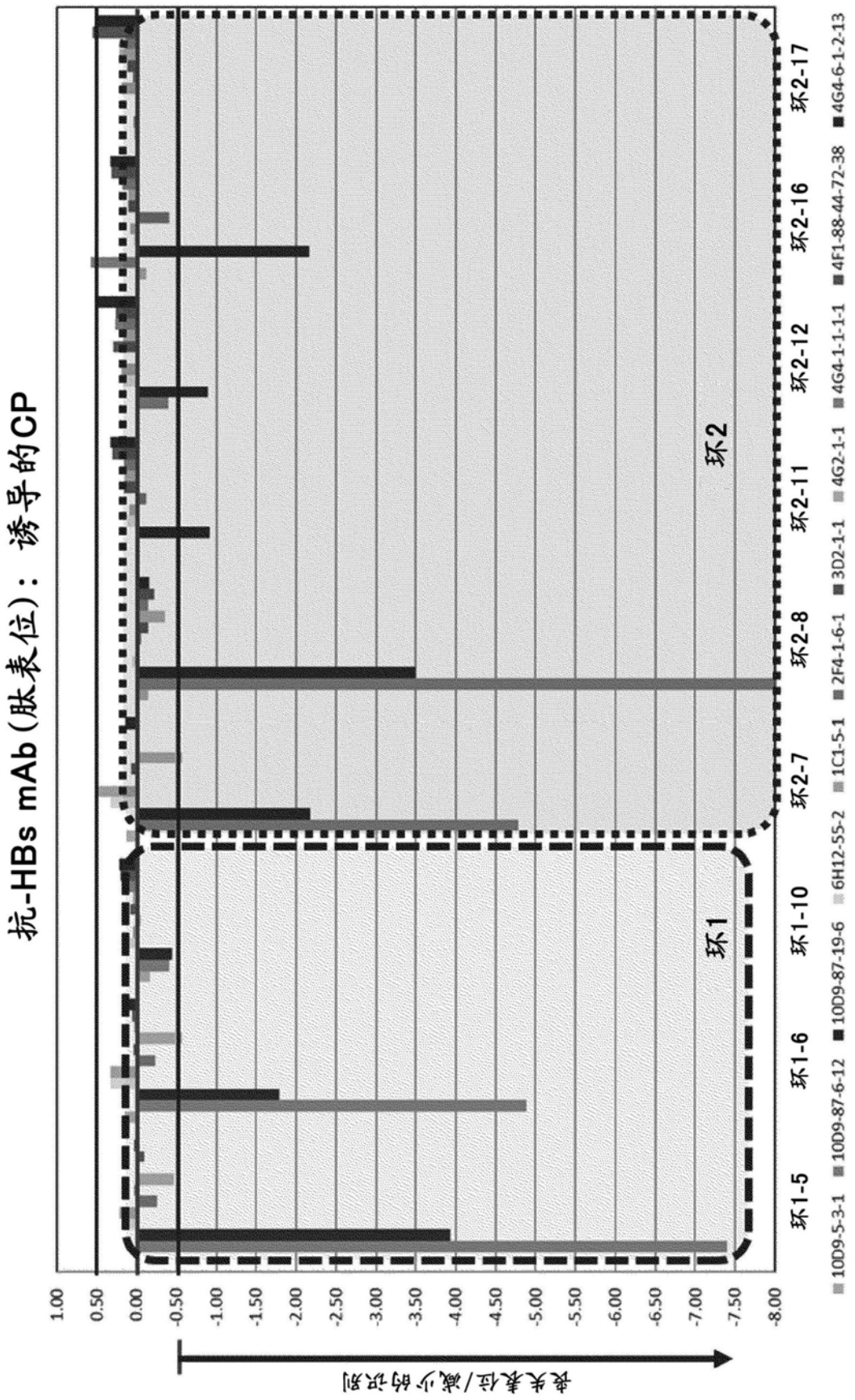

抗-HBs mAb(肽表位)：诱导的CP
丧失表位/减少的识别
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
-4.50
-5.00
-5.50
-6.00
-6.50
-7.00
-7.50
-8.00
环1
环2
环1-5
环1-6
环1-10
环2-7
环2-8
环2-11
环2-12
环2-16
环2-17
10D9-5-3-1
10D9-87-6-12
10D9-87-19-6
6H12-55-2
1C1-5-1
2F4-1-6-1
3D2-1-1
4G2-1-1
4G4-1-1-1-1
4F1-88-44-72-38
4G4-6-1-2-13

图12

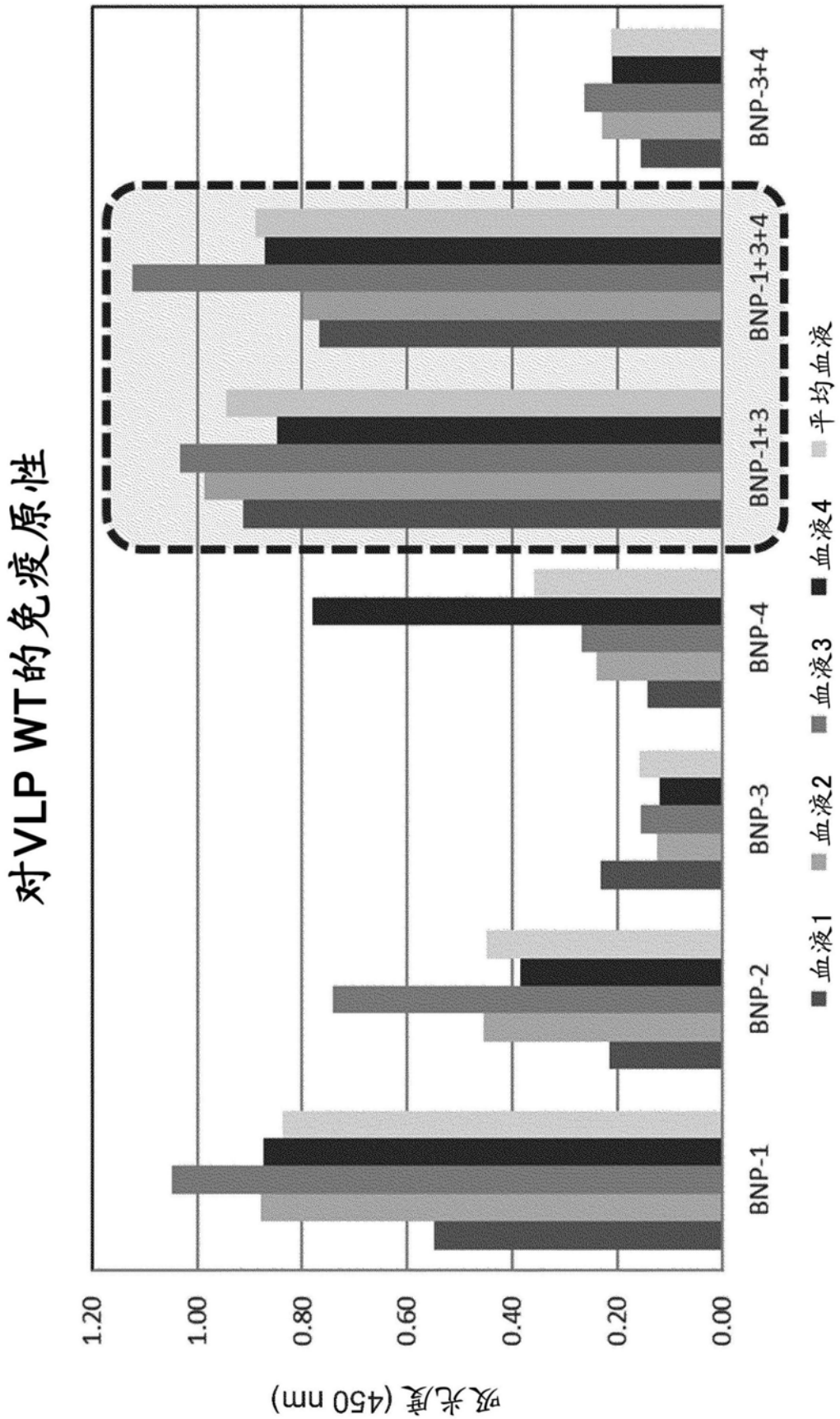

对VLP WT的免疫原性
吸光度 (450 nm)
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
BNP-1
BNP-2
BNP-3
BNP-4
BNP-1+3
BNP-1+3+4
BNP-3+4
血液1
血液2
血液3
血液4
平均血液

图13A

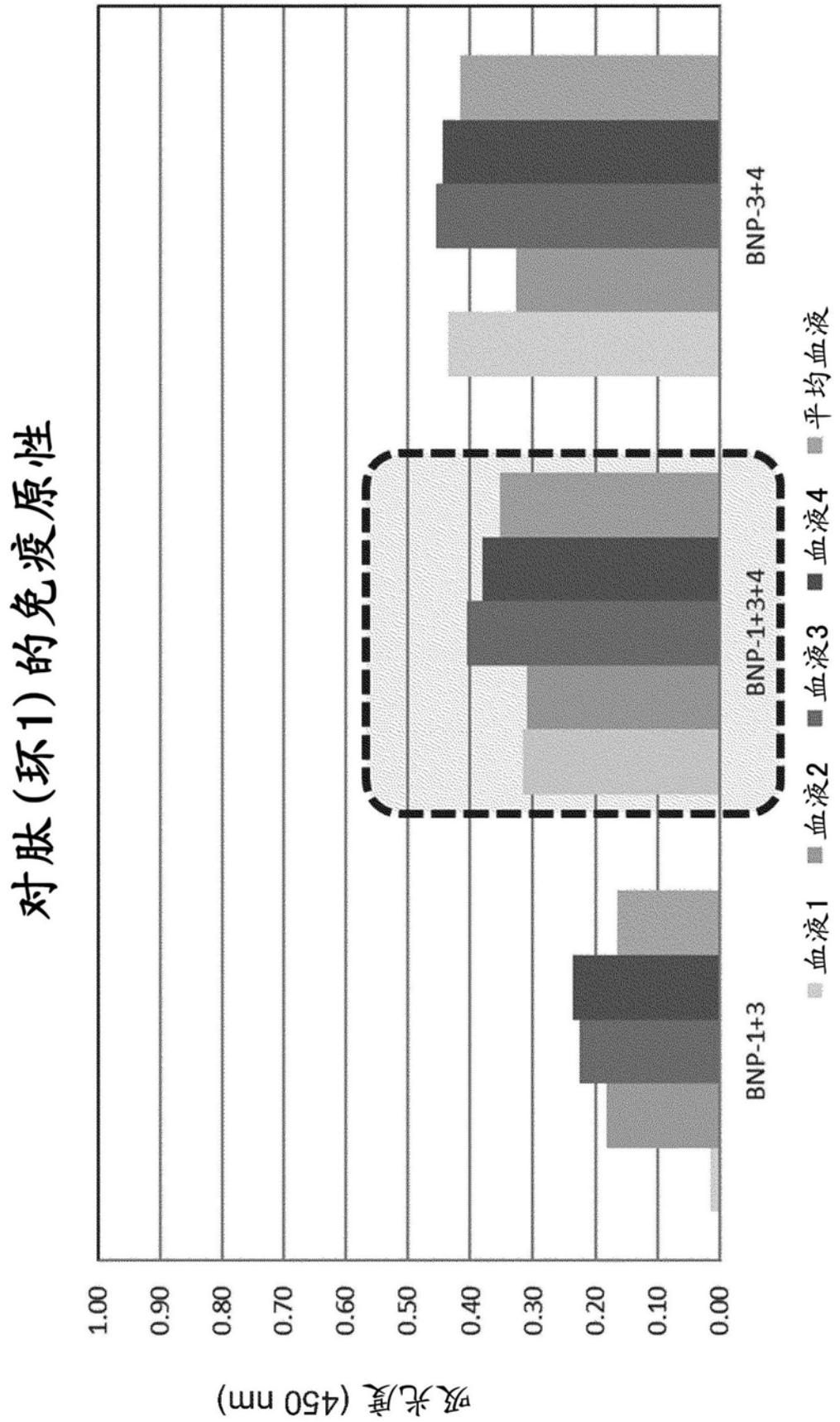

对肽(环1)的免疫原性
吸光度 (450 nm)
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
BNP-1+3
BNP-1+3+4
BNP-3+4
血液1
血液2
血液3
血液4
平均血液

图13B

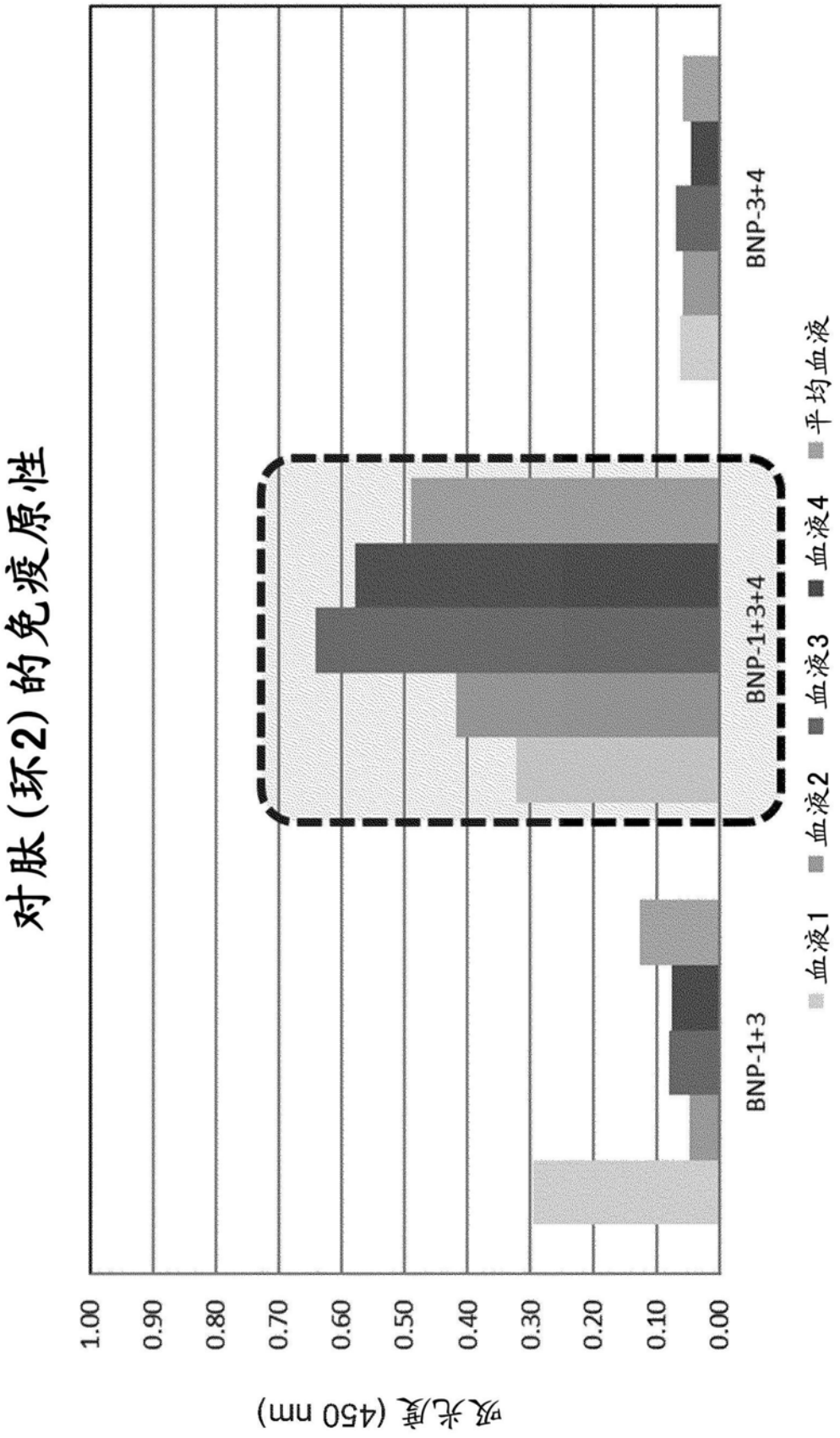

对肽(环2)的免疫原性
吸光度 (450 nm)
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
BNP-1+3
BNP-1+3+4
BNP-3+4
血液1
血液2
血液3
血液4
平均血液

图13C

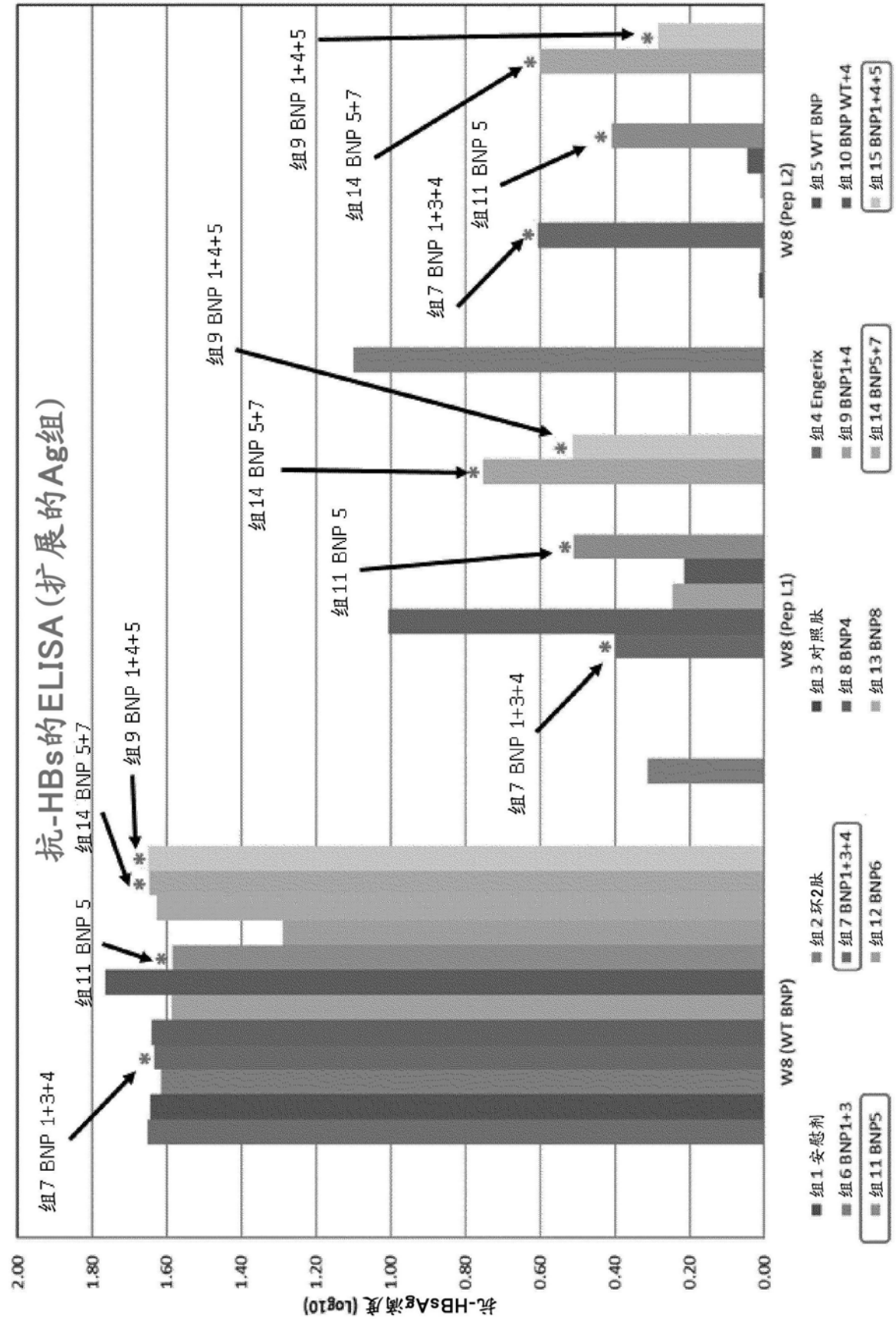

抗-HBs的ELISA(扩展的Ag组)
抗-HBsAg滴度 (log10)
2.00
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
组7 BNP 1+3+4
组11 BNP 5
组14 BNP 5+7
组9 BNP 1+4+5
W8 (WT BNP)
W8 (Pep L1)
W8 (Pep L2)
组1 安慰剂
组6 BNP1+3
组11 BNP5
组2 环2肽
组7 BNP1+3+4
组12 BNP6
组3 对照肽
组8 BNP4
组13 BNP8
组4 Engerix
组9 BNP1+4
组14 BNP5+7
组5 WT BNP
组10 BNP WT+4
组15 BNP1+4+5

图13D

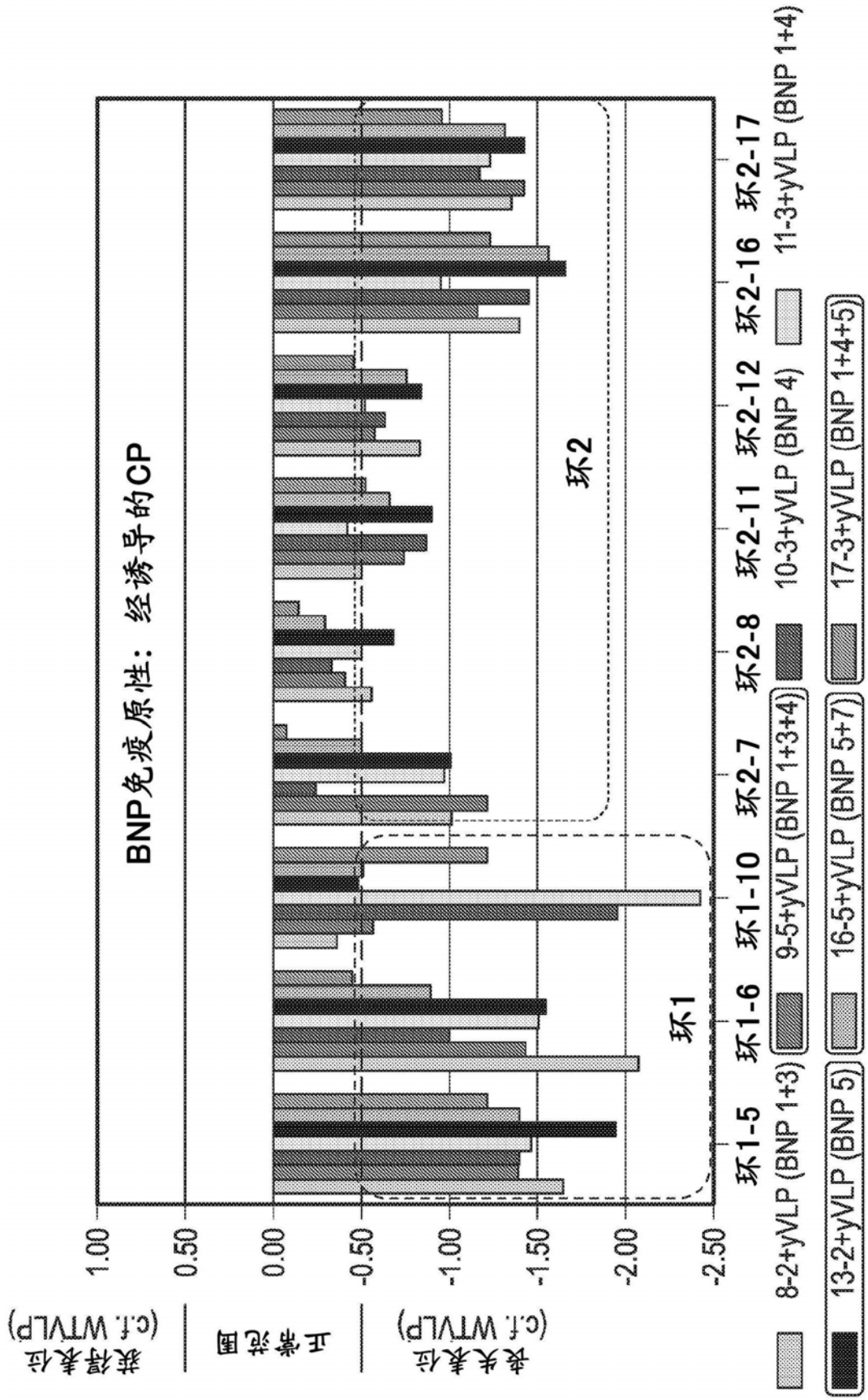

BNP免疫原性：经诱导的CP
环1
环2
环1-5
环1-6
环1-10
环2-7
环2-8
环2-11
环2-12
环2-16
环2-17
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
8-2+yVLP (BNP 1+3)
13-2+yVLP (BNP 5)
9-5+yVLP (BNP 1+3+4)
16-5+yVLP (BNP 5+7)
10-3+yVLP (BNP 4)
17-3+yVLP (BNP 1+4+5)
11-3+yVLP (BNP 1+4)
表达表位 (c.f. WTVLP)
正常范围
获得表位 (c.f. WTVLP)

图14

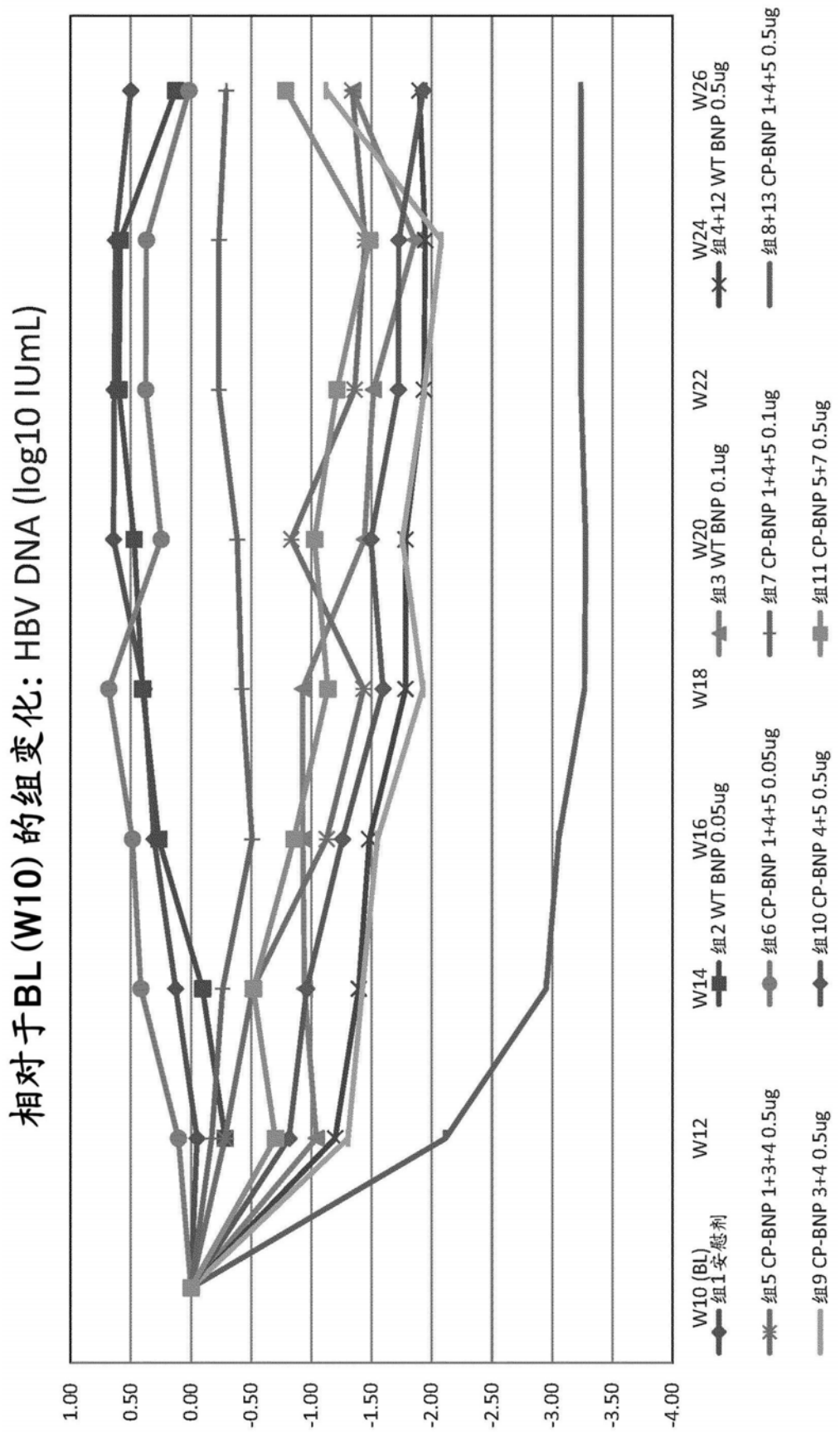

相对于BL (W10) 的组变化：HBV DNA (log10 IUmL)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
W10 (BL)
W12
W14
W16
W18
W20
W22
W24
W26
组1安慰剂
组2 WT BNP 0.05ug
组3 WT BNP 0.1ug
组4+12 WT BNP 0.5ug
组5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug
组6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug
组7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug
组8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug
组9 CP-BNP 3+4 0.5ug
组10 CP-BNP 4+5 0.5ug
组11 CP-BNP 5+7 0.5ug

图15A

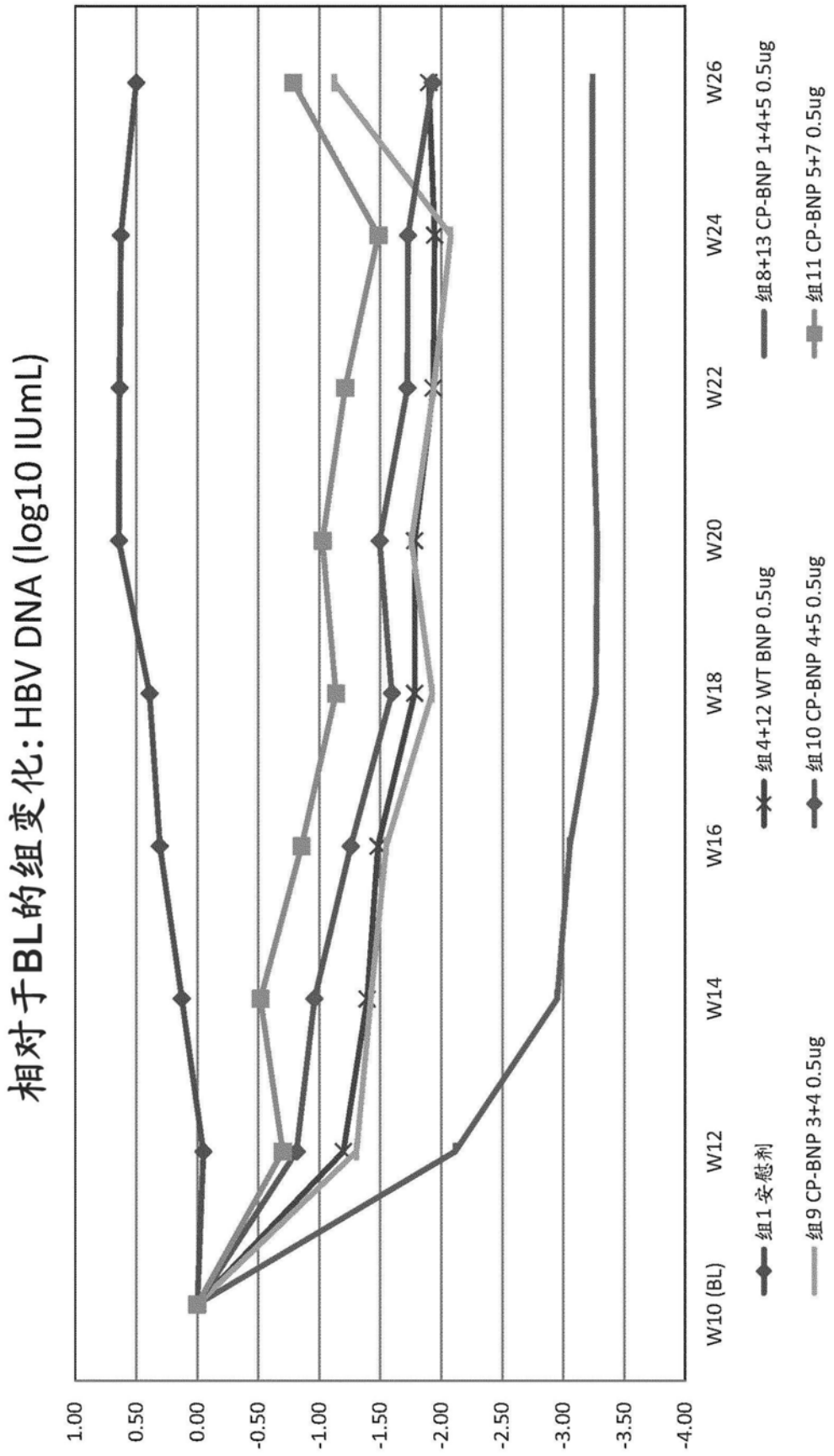

相对于BL的组变化：HBV DNA (log10 IUmL)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
W10 (BL)
W12
W14
W16
W18
W20
W22
W24
W26
组1 安慰剂
组4+12 WT BNP 0.5ug
组8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug
组9 CP-BNP 3+4 0.5ug
组10 CP-BNP 4+5 0.5ug
组11 CP-BNP 5+7 0.5ug

图15B

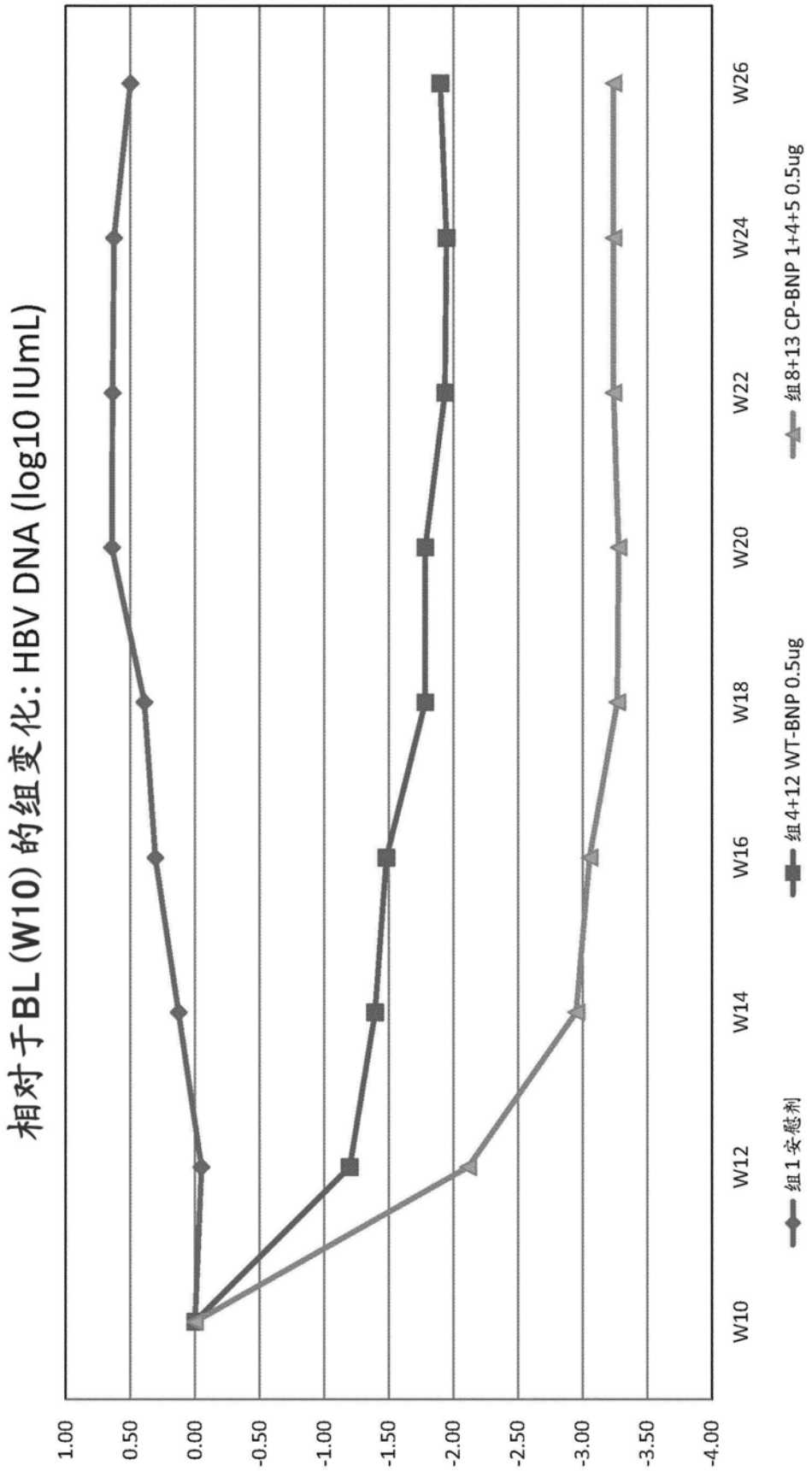

相对于BL (W10) 的组变化: HBV DNA (log10 IUmL)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
W10
W12
W14
W16
W18
W20
W22
W24
W26
组1安慰剂
组4+12 WT-BNP 0.5ug
组8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug

图15C

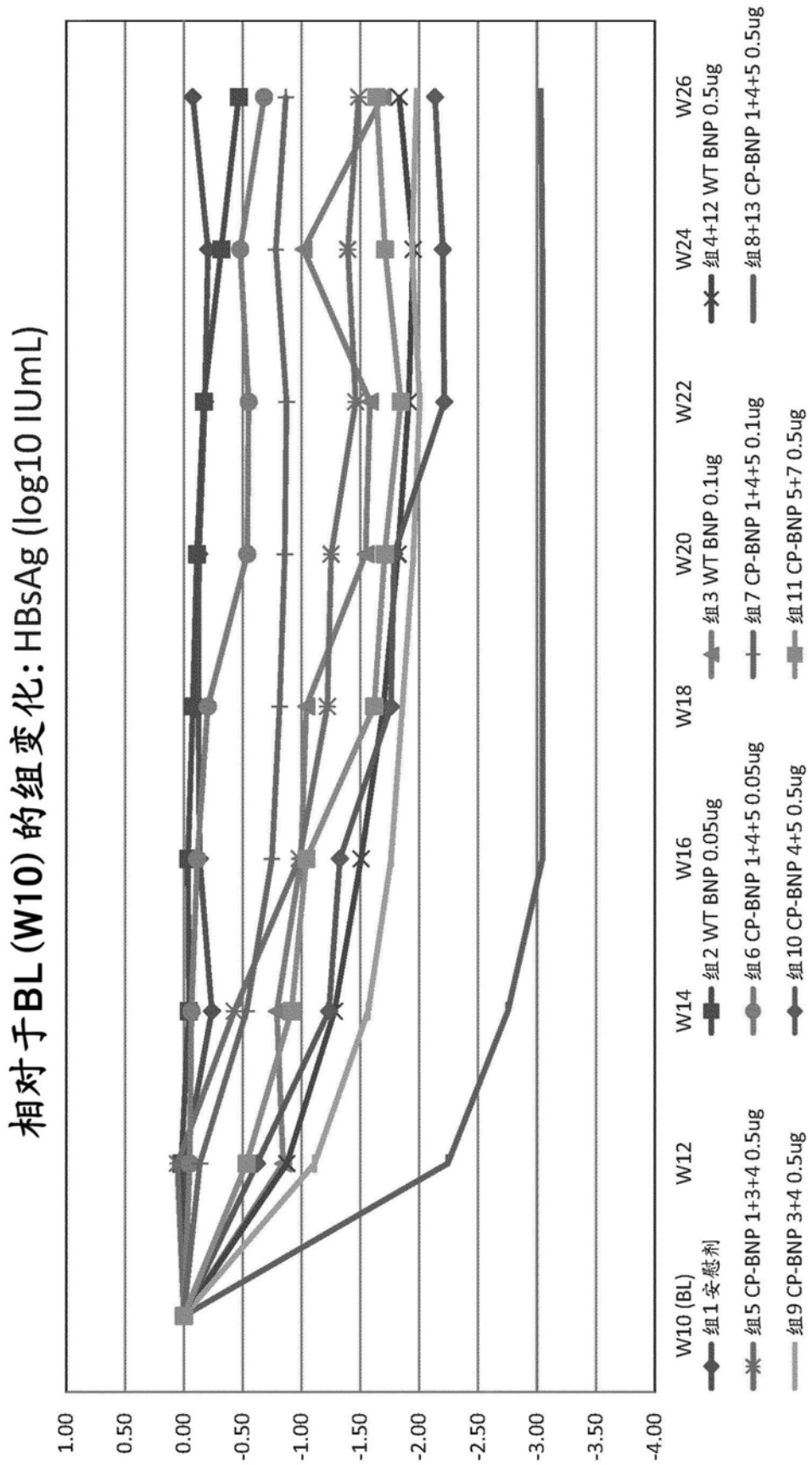

相对于BL (W10) 的组变化：HBsAg (log10 IUmL)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
W10 (BL)
W12
W14
W16
W18
W20
W22
W24
W26
组1 安慰剂
组2 WT BNP 0.05ug
组3 WT BNP 0.1ug
组4+12 WT BNP 0.5ug
组5 CP-BNP 1+3+4 0.5ug
组6 CP-BNP 1+4+5 0.05ug
组7 CP-BNP 1+4+5 0.1ug
组8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug
组9 CP-BNP 3+4 0.5ug
组10 CP-BNP 4+5 0.5ug
组11 CP-BNP 5+7 0.5ug

图16A

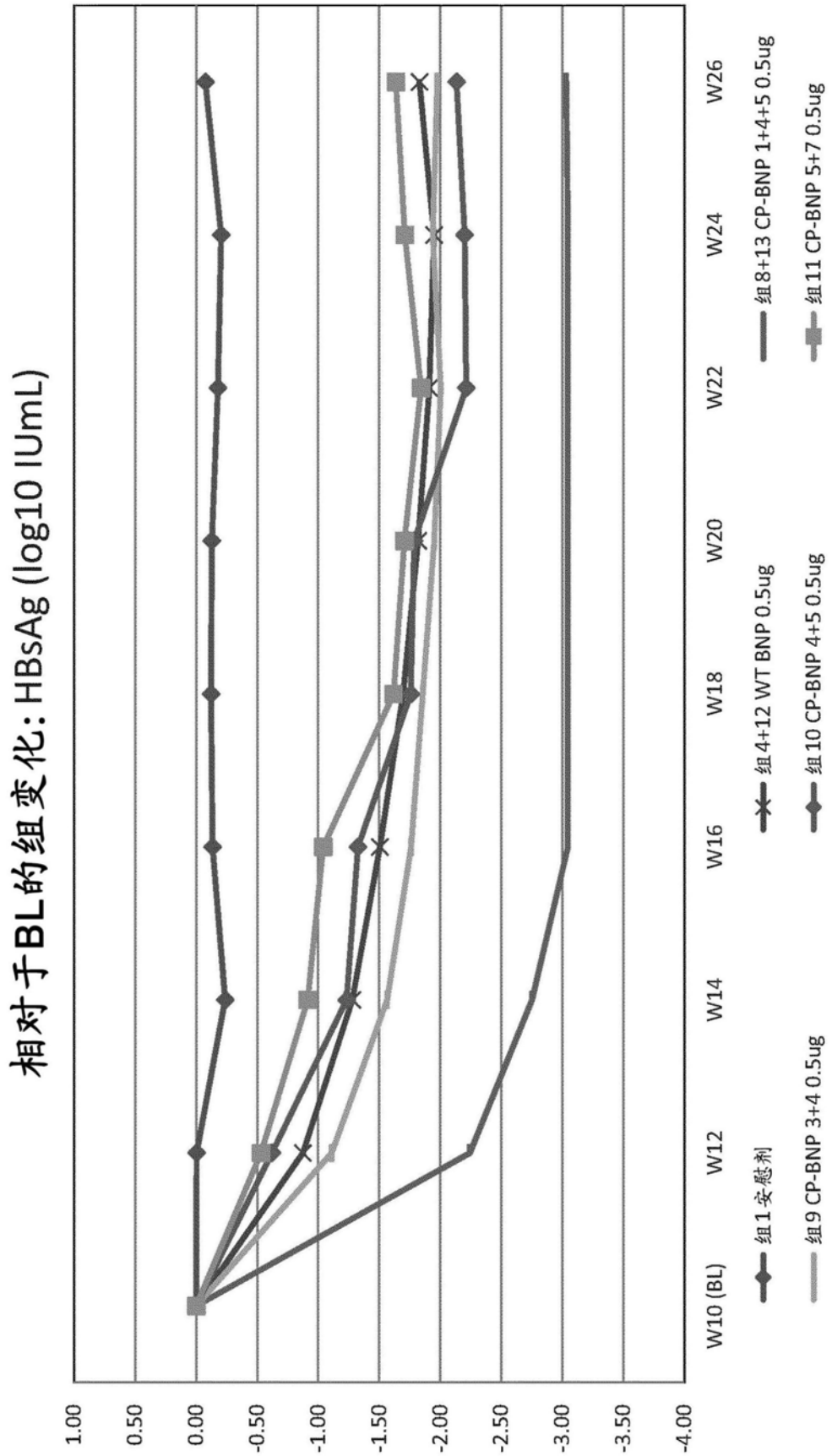

相对于BL的组变化：HBsAg (log10 IUmL)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
W10 (BL)
W12
W14
W16
W18
W20
W22
W24
W26
组1 安慰剂
组4+12 WT BNP 0.5ug
组8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug
组9 CP-BNP 3+4 0.5ug
组10 CP-BNP 4+5 0.5ug
组11 CP-BNP 5+7 0.5ug

图16B

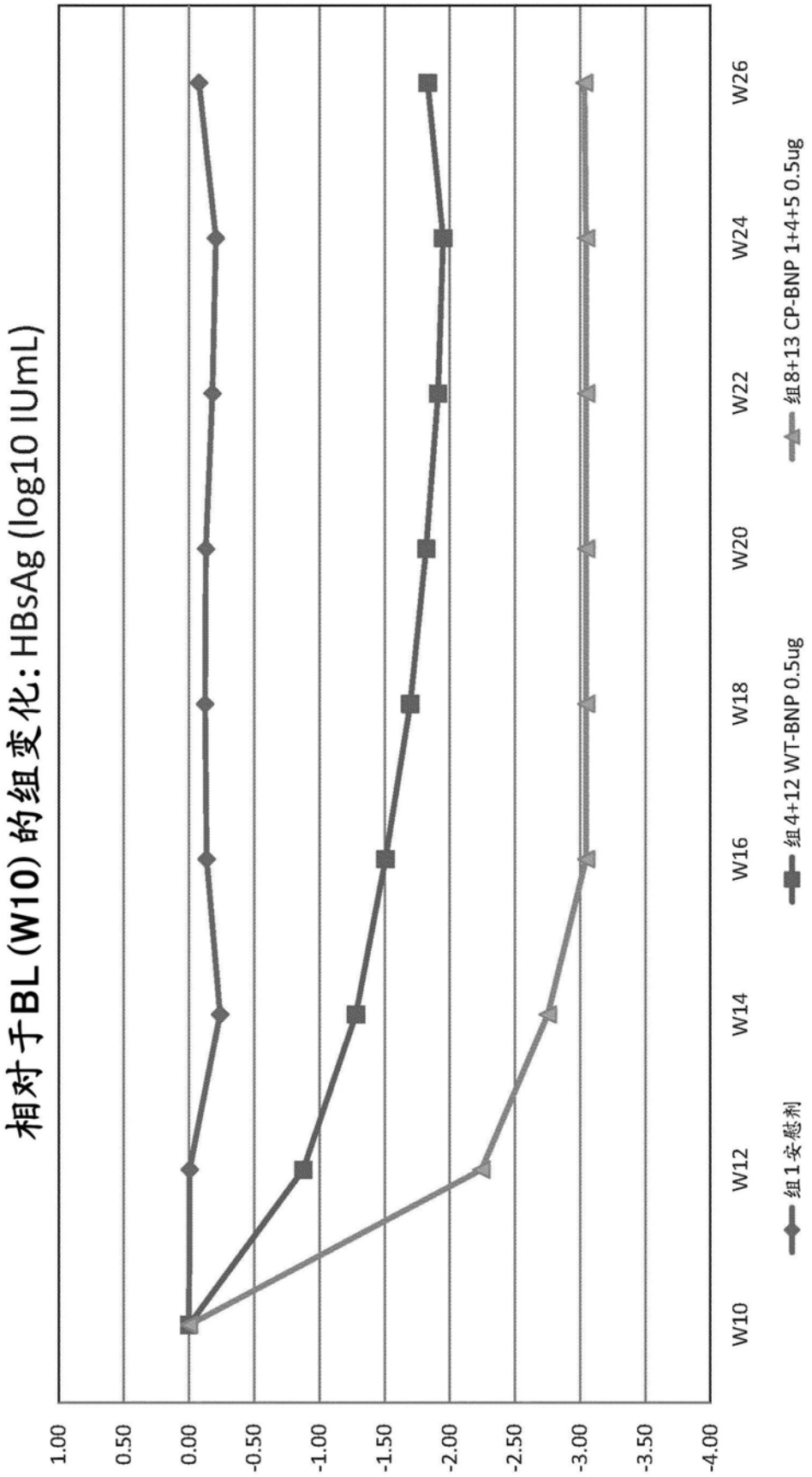
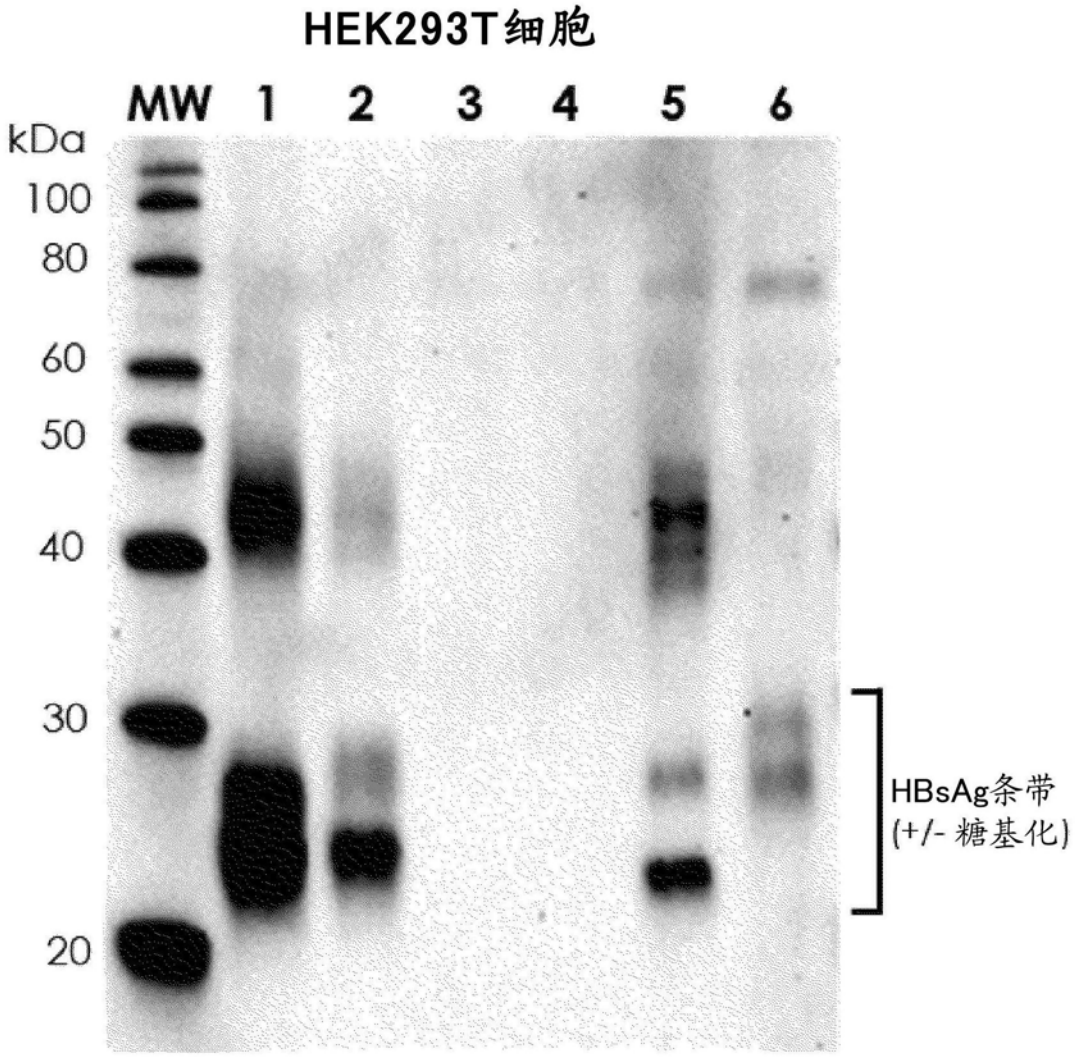
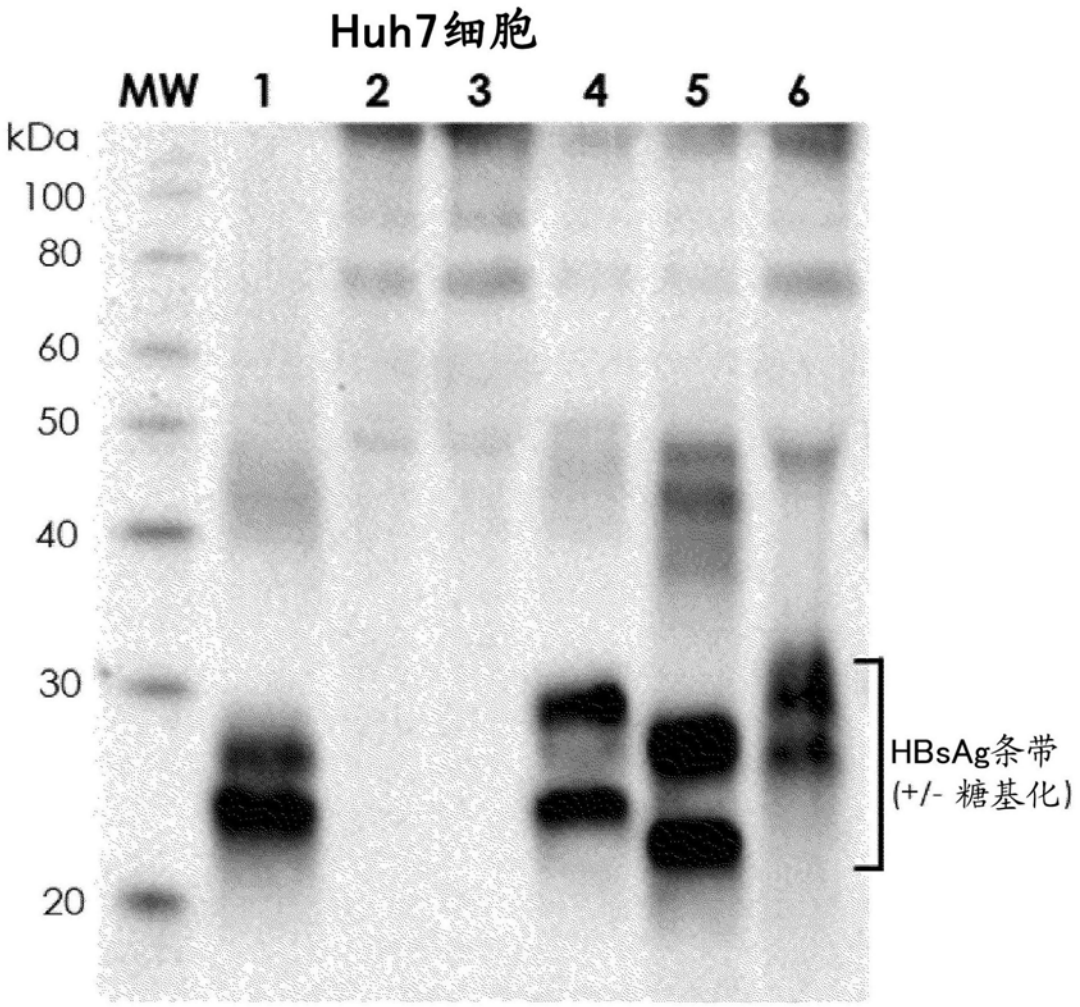

相对于BL (W10) 的组变化: HBsAg (log10 IUmL)
1.00
0.50
0.00
-0.50
-1.00
-1.50
-2.00
-2.50
-3.00
-3.50
-4.00
W10
W12
W14
W16
W18
W20
W22
W24
W26
组1安慰剂
组4+12 WT-BNP 0.5ug
组8+13 CP-BNP 1+4+5 0.5ug

图16C



1. WT-BNP(带有flag标记)经纯化的蛋白,1:400
2. WT-BNP DNA(带有flag标记)转染对照,1:100
3. 未处理的对照,1:4
4. 仅试剂对照,1:4
5. WT-BNP(无flag标记)mRNA转染,纯的
6. CP-BNP4(无flag标记)mRNA转染,纯的

图17A



1. WT-BNP(带有flag标记)经纯化的蛋白,1:400
2. 未处理的对照,纯的
3. 仅试剂对照,纯的
4. WT-BNP DNA(带有flag标记)转染对照,1:4
5. WT-BNP(无flag标记)mRNA转染,1:4
6. CP-BNP4(无flag标记)mRNA转染,纯的

图17B