



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012107671/15, 06.08.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.08.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
07.08.2009 EP 09305742.0

(43) Дата публикации заявки: 20.09.2013 Бюл. № 26

(45) Опубликовано: 10.07.2015 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2008/020656 A1, 21.02.2008. WO 2007/147529 A2, 27.12.2007. DEPLA E., et al., Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. J.Virol. 2008 Jan;82(1):435-50. Epub 2007 Oct 17. US 2008/0317717 A1, 25.12.2008. BARTENSCHLAGER R., et al., The P gene product of hepatitis B (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 07.03.2012

(86) Заявка РСТ:
EP 2010/061492 (06.08.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/015656 (10.02.2011)

Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ"

(72) Автор(ы):

МАРТЕН Перрин (FR),
ЭНШОСП Женеви́ев (FR),
СИЛЬВЕСТР Натали (FR),
ШМИТТ Дорис (FR)

(73) Патентообладатель(и):

ТРАНСГЕН СА (FR)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА В

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается иммуногенной композиции, которая содержит комбинацию следующих частей: (i) полимеразной части, содержащей по меньшей мере 450 аминокислотных остатков полимеразного белка, полученного из первого HBV-вируса; (ii) сердцевинной части, содержащей по меньшей мере 100 аминокислотных остатков сердцевинного белка, полученного из второго

HBV-вируса; и (iii) оболочечной части, содержащей одну или более иммуногенную область из 20-100 последовательных аминокислотных остатков белка HBsAg, полученного из третьего HBV-вируса; или комбинацию нуклеиновокислотных молекул, кодирующих указанную полимеразную часть, указанную сердцевинную часть и указанную оболочечную часть. Группа изобретений также

касается нуклеиновокислотной молекулы для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV; вектора для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV, содержащего одну или более нуклеиновокислотную молекулу; инфекционной вирусной частицы для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV; способа лечения или профилактики HBV-

инфекции или HBV-связанного заболевания или патологического состояния; набора для применения в лечении HBV-инфекции. Группа изобретений обеспечивает стабильность и сохранение высокой иммуногенности векторов, используемых в композиции. 10 н. и 41 з.п. ф-лы, 7 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):

virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. J Virol. 1990 Nov;64(11): 5324-32. WO 2007/101657 A1, 13.09.2007. LI L., et al., [The immunization effects of HBV core antigen and surface antigen fusion protein in mice] [Article in Chinese] Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2009 Apr; 17(4):275-9

R U 2 5 5 5 3 4 6 C 2

R U 2 5 5 5 3 4 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 555 346** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/29 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2012107671/15, 06.08.2010**

(24) Effective date for property rights:
06.08.2010

Priority:

(30) Convention priority:
07.08.2009 EP 09305742.0

(43) Application published: **20.09.2013 Bull. № 26**

(45) Date of publication: **10.07.2015 Bull. № 19**

(85) Commencement of national phase: **07.03.2012**

(86) PCT application:
EP 2010/061492 (06.08.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/015656 (10.02.2011)

Mail address:

197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT"

(72) Inventor(s):

**MARTEN Perrin (FR),
EhNShOSP Zhenev'ev (FR),
SIL'VESTR Natali (FR),
ShMITT Doris (FR)**

(73) Proprietor(s):

TRANSGEN SA (FR)

(54) COMPOSITION FOR TREATING HEPATITIS B VIRUS INFECTIONS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and deals with immunogenic composition, which contains combination of the following parts: (i) polymerase part, which contains at least 450 amino acid residues of polymerase protein, obtained from first HBV-virus; (ii) core part, which contains at least 100 amino acid residues of heart-shaped protein, obtained from second HBV-virus; and (iii) envelope part, which contains one or more immunogenic area from 20-100 successive amino acid residues of HBsAg protein, obtained from third HBV-virus; or combination of nucleic acid molecules, coding said polymerase part, said core part and said envelope part. Group of

inventions also deals with nucleic acid molecule for stimulation or increase of immune response to HBV; vector for stimulation or increase of immune response to HBV, containing one or more nucleic acid molecule; infectious viral particle for stimulation or increase of immune response to HBV; method of treatment or prevention of HBV-infections or HBV-associated disease or pathological condition; set for application in treatment of HBV-infection.

EFFECT: group of inventions ensures stability and preservation of high immunogenicity of vectors, applied in composition.

51 cl, 7 dwg, 2 ex

Данное изобретение относится к иммуногенным композициям с компонентом (компонентами) вируса гепатита В (HBV), которые могут быть основаны на нуклеиновой кислоте или полипептиде. Указанные иммуногенные композиции могут быть использованы для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV с целью обеспечения защитного или терапевтического эффекта против HBV-инфекции и любого состояния или заболевания, вызванного или связанного с инфекцией HBV. Данное изобретение также относится к экспрессионному вектору для экспрессии такого HBV-компонента(ов) и его терапевтического или профилактического применения. Изобретение представляет особый интерес в области иммунотерапии и, в частности, для лечения пациентов, инфицированных HBV, особенно хронически инфицированных.

Уровень техники

Гепатит В является одной из основных проблем общественного здравоохранения с более чем 350 миллионами хронически инфицированных людей во всем мире, при этом от 20 до 40% имеют риск развития хронического заболевания печени, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Несмотря на наличие эффективных профилактических вакцин, инфекция вирусом гепатита В (HBV) по-прежнему процветает в многих странах, даже в развитых, с оценкой 4,5 миллионов новых случаев заражения в год по всему миру. В отличие от рекомендации ВОЗ, по которой должна осуществляться всеобщая вакцинация, охват полным курсом профилактической вакцинации колеблется от 25% в Азии до 75-90% в Европе. В настоящее время гепатит В является десятой по счету причиной смертности (примерно 1 миллион смертей/год) и HBV-связанной карциномы печени, пятым среди наиболее распространенных раков. Географическое распространение HBV-инфекции неравномерно с распространенностью менее 1% в западных странах и более 10% в юго-восточных странах, большей части Африки и Экваториальной Южной Америки. В областях с высокой распространенностью хронических носителей HBV вертикальная передача от инфицированной матери новорожденному является наиболее частым способом заражения и почти всегда приводит к хроническому гепатиту (90% случаев). Этот показатель может быть снижен до 15% путем профилактической вакцинации инфицированных детей сразу после рождения. В западных странах заражение происходит чаще всего во взрослом возрасте путем горизонтальной передачи через жидкости организма, например через кровь, сперму, слюну, что приводит к острой и самостоятельно восстанавливающейся инфекции у 85% пациентов, но, тем не менее, к хронической инфекции в 15% случаев.

Вирус гепатита В (HBV) является членом *Hepadnaviridae* и в первую очередь поражает печень, реплицируясь в гепатоцитах. Инфекционные частицы являются так называемыми частицами Дейна размером 42-45 нм, которые состоят из внешней липопротеиновой оболочки, которая содержит три различных поверхностных белка (HBs), и внутреннего нуклеокапсида, основным структурным белком которого является сердцевинный белок (HBcAg). В нуклеокапсиде имеется одна копия генома HBV, связанная с вирусным полимеразным белком (P). В дополнение к вирионам размером 42-45 нм кровь HBV-инфицированных пациентов содержит сферы размером 20 нм из HBsAg и липидов хозяина, которые выделяются из инфицированных клеток. Эти сферы численно превосходят вирионы с коэффициентом 10^4 - 10^6 .

HBV-геном является релаксированной (открытой) кольцевой, частично двухцепочечной ДНК примерно с 3200 нуклеотидов, состоящей из минус-нити полной длины и более короткой плюс-нити. Он содержит четыре перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF), C, S, P и X. ORF C кодирует сердцевинный белок (или HBcAg), белок длиной 183 аминокислоты, который составляет нуклеокапсид HBV, и второй

белок, содержащийся в сыворотке крови больных во время репликации вируса, известный как HBsAg, который содержит М-концевое удлинение в области пресоре и часть HBsAg. С-конец сердцевинного белка очень прост и состоит из четырех Arg-богатых областей, которые, по прогнозам, связываются с нуклеиновыми кислотами, а также многочисленных сайтов фосфорилирования (состояние фосфорилирования сердцевинны связано с конформационными изменениями в капсидной частице, как описано в Yu and Sommers, 1994, J. Virol. 68:29650. ORF S кодирует три поверхностных белка, которые имеют одинаковый С-конец, но различаются по N-концу в -связи с наличием трех старт-кодонов ATG в рамке считывания, которые разделяют ORF S на три области, S (226 аминокислот), preS2 (55 аминокислот) и preS1 (108 аминокислот), соответственно. Большой антигенный белок поверхности (L) продуцируется после инициации трансляции на первом старт-кодоне ATG и включает 389 аминокислотных остатков (preS1-preS2-S). Средний антигенный белок поверхности (M) получается при трансляции области S и области pre-S2 со второго старт-кодона ATG, в то время как малый антигенный белок поверхности из 226 аминокислот (S, также обозначаемый как HBsAg) получается при трансляции области S с третьего старт-кодона ATG. Поверхностные белки HBV являются гликопротеинами с углеводными боковыми цепями (гликанами), которые присоединяются путем N-гликозидных связей. ORF P кодирует вирусную полимеразу, а ORF X содержит белок, известный как белок X, который считается активатором транскрипции.

После входа вирионов в гепатоциты через неизвестные пока рецепторы нуклеокапсиды переносят геномную ДНК HBV в ядро, где релаксированная кольцевая ДНК превращается в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК, cccDNA). кзкДНК функционирует в качестве матрицы для транскрипции четырех вирусных РНК, которые переносятся в цитоплазму и используются как мРНК для трансляции HBV-белков. Самая длинная (прегеномная) РНК также функционирует как матрица для репликации HBV, которая происходит в нуклеокапсидах в цитоплазме. Некоторые из ДНК HBV и содержащие полимеразу капсиды затем переносятся в ядро, где они высвобождают вновь образованную релаксированную кольцевую ДНК для формирования дополнительной кзкДНК. Со временем полужизни больше, чем у гепатоцитов, кзкDNA отвечает за сохранение HBV. Другие капсиды окружаются оболочкой путем почкования в эндоплазматический ретикулум и секретируются после прохождения через комплекс Гольджи.

Большое число доклинических и клинических исследований подчеркивают важность CD4+ и CD8+ Т-клеточных иммунных реакций для эффективного противовирусного ответа (Ferrari et al., 1990, J Immunol 145:3442; Penna et al., 1996, J Clin Invest, 98:1185; Penna et al., 1997, Hepatology, 25:1022). Т.е. у пациентов, естественным образом поправившихся после гепатита В, установлены полиспецифичные и замедленные ответы, опосредованные Т-хелперами (Т_H) и цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), которые легко обнаруживаются в периферической крови. При распознавании вирусных пептидов CTL приобретают способность или вылечить HBV-инфицированные клетки через нецитопатическое цитокин-опосредованное ингибирование репликации HBV и/или убить их через пути, опосредованные перфорин-Fas-лигандом и ФНО α . И эффекторные функции, наблюдаемые при разрешении острого гепатита В, и этот ответ Т-клеток 1 типа (Th1) сохраняются и после клинического восстановления. Оно часто совпадает с повышением уровней сывороточной аланинаминотрансферазы (АЛТ) и с появлением HBsAg-специфических IgM и IgG. Антитела анти-HBe и анти-HBs появляются позже и указывают на благоприятный исход инфекции. HBsAg-специфические антитела являются

нейтрализующими, опосредуют иммунитет и сохраняются после клинического выздоровления на всю жизнь. Тем не менее, хроническая HBV-инфекция редко разрешается иммунной системой. Когда это происходит, вирусный клиренс связан с повышенной активностью CTL и повышенными уровнями АЛТ, вызванными разрушением инфицированных гепатоцитов иммунной системой. Тем не менее, подавляющее большинство хронически инфицированных пациентов демонстрируют слабый и временный CD4+ и CD8+ Т-клеточный иммунный ответ, который-антигенно ограничен и неэффективен в плане выведения вирусной инфекции, хотя отдельные HBV-специфичные Т-клеточные клоны были выделены из биоптата печени. Причина этого изменения эффекторных функций клеточного иммунного ответа при хроническом гепатите В в настоящее время не известна. Тем не менее, было показано, что функциональные Т-клеточные ответы могут быть частично восстановлены у некоторых пациентов при вирусной нагрузке ниже порога в 10^6 МЕ/мл (Webster et al., 2004, J. Virol. 78:5707). Эти данные явно обнадеживают и подчеркивают необходимость иммуномодуляторных стратегий, способных индуцировать эффективный Т-клеточный ответ.

В идеале, лечение хронического вирусного гепатита В прежде всего должно позволить ингибировать репликацию HBV до необратимого повреждения печени, таким образом, чтобы избавиться от вируса, предотвратить прогрессирование заболевания в цирроз или рак печени и улучшить выживаемость пациентов. Стандартное лечение хронического гепатита В включает пегилированный интерферон-альфа (IFN α) и нуклеозидные/нуклеотидные аналоги (NUC), такие как ламивудин, а в последнее время энтекавир, телбивудин, адефовир и тенофовир (EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B, 2009). IFN α является мощной противовирусной молекулой, приводящей к ингибированию репликации вируса, которая, тем не менее, вызывает серьезные побочные эффекты у 25-30% пациентов. NUC выступают в качестве конкурентных ингибиторов полимеразы HBV, направленных на подавление обратной транскрипции прегеномной РНК в минус-нить ДНК, а затем в двухцепочечную вирусную ДНК. Они ограничивают формирование новых вирионов, но неэффективны в устранении суперскрученной кзкДНК, скрытой в ядрах инфицированных гепатоцитов, которая является источником новых потомств вируса. Этим можно объяснить, почему эффективность NUC носит временный характер, и вирусная нагрузка возникает сразу после прекращения лечения, требуя оставлять пациентов на пожизненном лечении. Кроме того, долгосрочная эффективность также ограничена в связи с появлением устойчивых мутантов HBV (более 24% после одного года и примерно 66% после четырех лет лечения ламивудином, как описано в Leung et al., 2001, Hepatology 33:1527), хотя новые NUC (энтекавир, телбивудин и тенофовир) демонстрируют гораздо меньше случаев лекарственно-устойчивых мутантов HBV при увеличении подавления ДНК HBV. Тем не менее, данные по длительному лечению этими новыми лекарствами ограничены, и эта более высокая эффективность не коррелирует с существенно более высоким уровнем HBs-сероконверсии.

Помимо противовирусной терапии в настоящее время прикладываются усилия по разработке дополнительной терапии, направленной на улучшение иммунного ответа хозяина, особенно того, который опосредован цитотоксическими Т-лимфоцитами и хелперными Т-лимфоцитами. Подавляющее большинство существующих подходов иммунотерапии сосредоточено на применении поверхностного белка(белков) HBV, S, preS1 и/или preS2 (Smith et al., 1983, Nature 302:490; Luoek et al., 1989, Proc. Natl Acad, Sci. USA 86:6763; Adkins et al., 1998, BioDrugs 10:137; Loirat et al., 2000, J. Immunol. 165:

4748; Funuy-Ren et al. 2003, J. Med. Viral. 71:376; Kasaks et al., 2004, J. Gen, Viral. 85:2665; Xiangming Li et al., 2005, Intern. Irnrnunol. 17:1293; Mancini-Bourguine et al., 2006, Vaccine 24:4482; Vandepapeliere et al., 2007, Vaccine 25:8585). Обнадеживающие результаты были получены по меньшей мере по отношению к стимуляции иммунных ответов. Например, Mancini-Bourguine et al. (2006, Vaccine 24:4482) сообщили об индукции и/или возвращении Т-клеточного ответа у хронически HBV-инфицированных пациентов, которым вводили ДНК-вакцину, кодирующую preS2-S, что является хорошим признаком того, что иммунная система все еще действует у этих пациентов.

HBcAg также используется как иммуноген (Yi-Ping Xing et al., 2005, World J, Gastro, 11:4583), также как и химерные HBcAg-капсиды, несущие чужеродные эпитопы на своей поверхности (WO 92/11368; WOOO/32625; Koletzki et al., 1997, J. Gen, Virol. 78:2049). Наиболее перспективной локализацией для вставки эпитопов с точки зрения иммуногенности, по-видимому, является место внешней петли, которое, по прогнозам, находится на поверхности HBcAg вблизи позиции 80 (Argos et al, 1988, 10 EMBO J. 7: 819). Schodel et al. (1992, J. Virol. 66:106) и Borisova et al. (1993, J. Virol, 67:3696) смогли вставить эпитопы preSI и HBsAg в эту область и сообщили об успешной иммунизации химерными частицами.

Также были исследованы претенденты на многовалентные вакцины, нацеленные одновременно на несколько HBV-антигенов. Примечательно, было показано, что полиэпитопная ДНК-вакцина, кодирующая гибридный полипептид множества эпитопов цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) и хелперных Т-лимфоцитов (HTL), присутствующих в оболочечном, сердцевинном и полимеразном белках, вызывает многочисленные CTL- и HTL-ответы на доклинических мышинных моделях (Depla et al, 2008, J. Virol. 82:435). Некоторые вакцинные составы на основе смеси ДНК-плазмид, кодирующих HBsAg, HBcAg и HBV-полимеразу, были разработаны (WO 2005/056051; WO 2008/020656) и показали специфический анти-HBV клеточный и гуморальный ответ на трансгенной мышинной модели хронического гепатита В (Спае Young Kirn et al., 2008, Exp.Mol. Medicine 40:669). Фаза I клинических испытаний была начата в Южной Корее на носителях HBV в комбинации с лечением ламивудином (Yang et al., 2006, Gene Ther. 13:1110).

Соответственно, все еще существует необходимость в альтернативных иммунотерапевтических подходах для индукции иммунного ответа более мощным и эффективным образом, особенно клеточно-опосредованного иммунного ответа, у лиц, нуждающихся в этом, например у пациентов, хронически инфицированных HBV. Кроме того, существует необходимость обеспечения композицией на основе вектора, способного экспрессировать HBV-антиген стабильным и устойчивым образом.

Эта техническая задача решается путем предоставления воплощений, определенных в формуле изобретения.

Другие и дополнительные аспекты, особенности и преимущества данного изобретения станут понятны из последующего описания предпочтительных воплощений изобретения. Эти воплощения приведены для раскрытия изобретения.

Сущность изобретения

Соответственно, в первом аспекте данное изобретение предусматривает иммуногенную композицию, включающую по меньшей мере один полипептид или нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую указанный по меньшей мере один полипептид, где указанный по меньшей мере один полипептид выбран из группы, состоящей из:

(i) полимеразной части, включающей по меньшей мере 450 аминокислотных остатков

полимеразного белка, полученного из первого вируса HBV;

(ii) сердцевинной части, включающей по меньшей мере 100 аминокислотных остатков сердцевинного белка, полученного из второго вируса HBV; и

(iii) оболочечной части, включающей один или более иммуногенный домен от 15 до 100 последовательных аминокислотных остатков белка HBsAg, полученного из третьего вируса HBV; или

любой комбинации указанных полимеразной части, сердцевинной части, оболочечной части, указанной нуклеиновокислотной молекулы, кодирующей указанную полимеразную часть, указанной нуклеиновокислотной молекулы, кодирующей указанную сердцевинную часть, и/или указанной нуклеиновокислотной молекулы, кодирующей указанную оболочечную часть.

Определения

Используемые в данное заявке термины в единственном числе применяются в значении «по меньшей мере один», «по меньшей мере первый», «один или более» или «множество» упоминаемых соединений или этапов, если контекст ясно не указывает иное. Например, термин «клетка» включает множество клеток, содержащихся в их смеси.

Термин «и/или», используемый в данном документе, включает значение «и», «или» или «все или любые комбинации элементов, связанных с указанным термином».

Термины «примерно» или «приблизительно», используемые в данном документе, означают в пределах 10%, предпочтительно в пределах 8% и более предпочтительно в пределах 5% данного значения.

Используемые в данной заявке для обозначения продуктов, композиций и способов термины «содержащий» (и его любые формы, в т.ч. «содержит» или «содержат»), «имеющий» (и его любые формы, в т.ч. «имеет» или «имеют»), «включающий» (и его любые формы, в т.ч. «включает» и «включают») или «состоящий из» (и его любые формы, в т.ч. «состоит из» или «состоят из») не являются ограничивающими и не исключают дополнительные, не упоминаемые элементы или этапы способа. Выражение «содержащий по существу» будет означать исключение других компонентов или этапов любого существенного значения. Таким образом, композиция, состоящая преимущественно из упоминаемых компонентов, не будет исключать следы контаминантов и фармацевтически приемлемых носителей. Выражение «состоящий из» будет означать исключение более чем следовых элементов других компонентов или этапов. Например, полипептид «состоит из» аминокислотной последовательности, когда полипептид не содержит никаких аминокислот не упоминаемой аминокислотной последовательности. Полипептид «состоит по существу» из аминокислотной последовательности, когда такая аминокислотная последовательность присутствует в конечном итоге только с несколькими дополнительными аминокислотными остатками. Полипептид «содержит» аминокислотную последовательность, когда аминокислотная последовательность является по меньшей мере частью конечной аминокислотной последовательности полипептида. Такой полипептид может иметь от нескольких до нескольких сотен дополнительных аминокислотных остатков.

Термины «аминокислоты», «остатки» и «аминокислотные остатки» являются синонимами и охватывают природные аминокислоты, а также аналоги аминокислот (например, неприродные, синтетические и модифицированные аминокислоты, в том числе D- или L-оптические изомеры).

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислотных остатков, которые

состоят из девяти или более аминокислот, связанных посредством пептидных связей. Полимер может быть линейным, разветвленным или циклическим, может включать природные аминокислоты и/или аминокислотные аналоги и может быть прерван не аминокислотами. В качестве общего указания, если аминокислотный полимер длинный (например, более 50 аминокислотных остатков), то предпочтительно его называть полипептидом или белком, а если его длина 50 аминокислот или меньше, он называется «пептидом».

В контексте данного изобретения термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновокислотная молекула», «полинуклеотид» и «нуклеотидная последовательность» используются как синонимы и обозначают полимер любой длины или полидезоксирибонуклеотидной (ДНК) (например, кДНК, геномной ДНК, плазмид, векторов, вирусных геномов, выделенных ДНК, зондов, праймеров и любой их смеси) или полирибонуклеотидной (РНК) молекул (например, мРНК антисмысловой РНК) или смешанной полирибо-полидезоксирибонуклеотидной молекулы. Они охватывают одно- или двухцепочечные, линейные или кольцевые, природные или синтетические полинуклеотиды. Кроме того, полинуклеотид может содержать неприродные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги (см. US 5525711, US 4711955 или ЕРА 302175 в качестве примеров модификаций), и может быть прерван ненуклеотидными компонентами. При наличии изменений в нуклеотиде они могут быть сделаны до или после полимеризации.

Используемый в данном документе термин «иммуногенная композиция» относится к составу, который содержит 1, 2, 3, 4 или более компонентов, описанных далее (например, полимеразную часть, сердцевинную часть, оболочечную часть, нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую полимеразную часть, нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую сердцевинную часть, и/или нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую оболочечную часть), и, возможно, другие компоненты (например, адъювант, носитель, разбавитель и т.д.). Иммуногенная композиция данного изобретения, как правило, находится в форме, которая может быть введена в организм хозяина и индуцирует защитный или терапевтический иммунный ответ, достаточный, чтобы индуцировать или стимулировать анти-HBV-иммунитет, давая терапевтические преимущества, такие как профилактика HBV-инфекции, сокращение и/или улучшение по меньшей мере одного состояния, вызванного или связанного с HBV-инфекцией (например, снижение вирусной нагрузки, уменьшение или отдаление риска поражения печени, такого как цирроз или рак печени, улучшение качества жизни и т.д.), и/или уменьшение сывороточных уровней HBcAg, HBsAg или обоих, и/или индукция сероконверсии HBe, сероконверсии HBs или обеих, и/или повышение эффективности других подходов к лечению и профилактике HBV. После введения в организм хозяина иммуногенная композиция данного изобретения может вызвать иммунный ответ, в том числе, но не ограничиваясь этим, продукцию антител и/или цитокинов и/или активацию цитотоксических Т-клеток, В-, Т-лимфоцитов, антиген-представляющих клеток, хелперных Т-клеток, дендритных клеток, НК-клеток, что приводит к развитию врожденного иммунного ответа и/или специфического гуморального и/или клеточного иммунного ответа по меньшей мере против одного антигена/эпитопа HBV.

Понятие «иммуногенный домен» относится к структурной части белка HBV, которая может быть связана антителом или Т-клеточным рецептором. Как правило, такой иммуногенный домен содержит один или более В- и/или Т-эпитоп(ы), в частности. CTL или T_H или оба эпитопа участвуют в распознавании конкретным антителом, или, в

контексте МНС (главный комплекс гистосовместимости), Т-клеточным рецептором. Понятие «эпитоп» соответствует минимальному пептидному мотиву (как правило, набору из 9-11 аминокислотных остатков), которые вместе образуют сайт, распознаваемый антителом, Т-клеточным рецептором или HLA-молекулой. Такие

5 остатки могут быть последовательными (линейный эпитоп) или непоследовательными (конформационный эпитоп, который включает остатки, не расположенные в непосредственной близости друг к другу). Распознавание Т-клеточного эпитопа Т-клеткой, как правило, происходит через механизм, в котором Т-клетки распознают пептидные фрагменты антигенов, которые связаны с молекулами МНС 1 класса или

10 II класса, экспрессированными на антиген-представляющих клетках.

Используемые в данном документе понятия «HBV» и «вирус гепатита В» являются взаимозаменяемыми и относятся к любому члену семейства *Hepadnaviridae* (см., например, Ganem and Schneider in *Hepadnaviridae* (2001) "The viruses and their replication" (pp2923-2969), Knipe DM et al., eds. *Fields Virology*, 4th ed. 5 Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, или последующие издания). Обширные филогенетические анализы привели к классификации вирусов гепатита В на 8 основных генотипов (от А до Н), которые демонстрируют расхождения в последовательности по меньшей мере 8%. Различные генотипы HBV демонстрируют различное географическое распределение и могут отображать симптомы и/или клинические результаты гетерогенных заболеваний.

20 Разнообразные HBV были классифицированы на девять различных подтипов (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr_q+ и adr_q-) в связи с HBsAg-связанной серологией (см. обзор Marrsum-AI Mahtab et. al., 2008, *Hepatobiliary Pancreas Dis Int* 5:457; Schaeffer, 2007, *World Gastroenterol.* 7:14; Nordor et al., 1993, *J. Gen Virol.* 74:1341). Каждый генотип и серотип охватывает различные штаммы и изоляты HBV. Изолят соответствует

25 конкретному вирусу, выделенному из определенного источника HBV (например, из образца от пациента или из другого биологического резервуара HBV), в то время как штамм охватывает различные изоляты, которые очень близки друг к другу с точки зрения геномных последовательностей.

В данной области, особенно в Genbank, было описано большое число HBV, подходящих для применения в контексте данного изобретения. Типичные HBV генотипа А включают, но не ограничиваясь ими, изолят HB-J1444AF и штамм HB-J1444A (регистрационный номер AP 007263). Типичные HBV генотипа В включают, но не ограничиваясь ими, клон pJDW233 (регистрационный номер D00329), изолят HBV/14611 (регистрационный номер AF 121243), HBV-B1, выявленный в 2001 году Нои et al.

35 (регистрационный номер GenBank AF282917.1), штамм HBV Whutj-37 (регистрационный номер GenBank AY 2933309.1), выявленный Zhang et al. (2005, *Arch. Virol.* 150, 721-741), китайский штамм HBV GDH1, выявленный He et al. (регистрационный номер GenBank AY 766463.1), и изолят HBV 57-1 подтипа adw, выявленный Jiang et al. (регистрационный номер GenBank AYS 18556.1). Типичные HBV генотипа С включают, но не ограничиваясь ими, изолят AN-1-ON980424 (регистрационный номер AB 113879), штамм HCC-3-TT (регистрационный номер AB 113877), изолят HBV SWT3.3, выявленный Fang et al. (регистрационный номер GenBank EU 916241.1), изолят HBV H85, выявленный Zhu et al. (регистрационный номер GenBank AY 306136.1), штамм HBV C1248, выявленный Tu et al. (регистрационный номер GenBank DQ 975272.1), изолят HBV CHN-H155

40 (регистрационный номер GenBank DQ 478901.1), выявленный Wang et al. (2007, *j. Viral Hepat* 14, 426-434) и изолят HBV GZ28-1, выявленный Zhou et al. (регистрационный номер GenBank EF 688062). Типичные HBV генотипа D включают, но не ограничиваясь ими, изолят КАМШАТКА27 (регистрационный номер AB 188243), ALTAY36

(регистрационный номер AB 188245) и Y07587, описанный Stoll-Becker et al. (1997, J. ViroL 71:5399) и доступный в Genbank под регистрационным номером Y07587, а также
 5 изолят HBV, описанный под регистрационным номером AB 267090. Типичные HBV
 генотипа E включают, но не ограничиваясь ими, изолят HB-J1411F и штамм HB-J1411
 (регистрационный номер AP 007262). Типичные HBV генотипа F включают, но не
 ограничиваясь ими, изоляты HBV-BL597 (регистрационный номер AB 214516) и HBV-
 BL592 (регистрационный номер AB 166850). Типичные HBV генотипа G включают, но
 не ограничиваясь ими, изолят HB-J1444GF и штамм HB-J1444G (регистрационный номер
 10 AP 007264). Типичные HBV генотипа H включают, но не ограничиваясь ими, изолят
 HBV ST0404 (регистрационный номер AB 298362) и изолят HB-J1260F и штамм HB-J1260
 (регистрационный номер AP 007261). Тем не менее, данное изобретение не
 ограничивается этими типичными HBV. Действительно, нуклеотидные и аминокислотные
 15 последовательности могут варьировать в различных изолятах и генотипах HBV, и эта
 природная генетическая изменчивость входит в рамки изобретения, как и неприродные
 модификации, такие как описаны ниже.

Используемое в данном документе понятие «нативный белок HBV» относится к
 белку, полипептиду или пептиду (например, полимеразному белку, сердцевинному
 белку или HBsAg, и т.д.), которые можно найти, выделить, получить из источника HBV
 в природе, в отличие от искусственно модифицированных или измененных человеком
 20 в лабораторных условиях. Таким образом, этот термин будет включать природные
 белки, полипептиды или пептиды HBV, если не указано иное. Такими природными
 источниками являются биологические образцы (например, крови, плазмы, сыворотки
 крови, спермы, слюны, срезов тканей, биопсии и т.д.), взятые у субъекта,
 инфицированного или подвергнутого воздействию HBV, культивируемые клетки
 25 (например, HepG2.2.15, HuH6-C15 (Sureau et al., 1986, Cell 47:37; Sells et al., 1987, Proc.
 Natl. Acad. Sci. 84(4): 1005); HuH7.TA61 или HuH7.TA62 (Sun et al., 2006, J Hepatol. 45(5):
 636), культуры тканей, а также рекомбинантные материалы. Рекомбинантные материалы
 включают, но не ограничиваясь ими, изоляты HBV (например, имеющиеся в депозитных
 учреждениях), геном HBV, библиотеки геномной РНК или кДНК, плазмиды, содержащие
 30 геном HBV или его фрагмент(ы), или любой вектор, используемый в данной области
 для включения таких элементов.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие различные белки HBV, можно
 найти в специализированных банках данных (например, упомянутых выше) и в
 литературе (см. например, Valenzuela et al., 1980, The nucleotide sequence of the hepatitis B
 35 viral genome and the identification of the major viral genes (pp57~7G) в "Animal Vims Genetics";
 eds B. Fields, et al.; Academic Press Inc., New-York and Vaudin et al., 1988, J. Gen. ViroL 69:
 1383). Типичные примеры природных полимеразного, сердцевинного и HBsAg-
 полипептидов приведены в SEQ ID №1-3, соответственно (SEQ ID №1 предусматривает
 аминокислотную последовательность нативного полимеразного белка изолята HBV
 40 Y07587, SEQ ID №2 предусматривает аминокислотную последовательность нативного
 сердцевинного белка изолята HBV Y07587, а SEQ ID №3 предусматривает
 аминокислотную последовательность нативного оболочечного белка (HBsAg) изолята
 HBV Y07587). Нуклеотидные последовательности, кодирующие нативный полимеразный,
 сердцевинный и HBsAg из HBV Y07587, показаны с иллюстративной целью в SEQ ID
 45 №4, 5 и 6, соответственно. Тем не менее, как уже говорилось выше, HBV-белки не
 ограничиваются этими типичными последовательностями, и генетические вариации
 входят в рамки изобретения.

Используемый в данном документе термин «часть» (например полимеразная,

сердцевинная и/или оболочечная части) относится к белку, полипептиду или пептиду, который получен из нативного белка, полипептида или пептида HBV после того, как он был искусственно модифицирован или изменен человеком в лаборатории, как описано в данном документе. Термин «модифицированный» включает удаление, замену или добавление одного или более нуклеотидного/аминокислотного остатка(ов), любую комбинацию этих возможностей (например, дегенерацию нативной нуклеотидной последовательности для уменьшения гомологии между последовательностями HBV, кодируемыми композицией изобретения, введение соответствующих сайтов рестрикции), а также неприродные механизмы (например, слияние двух или более белков, полипептидов и пептидов HBV или части/частей). Когда предусмотрено несколько модификаций, они могут касаться последовательных остатков и/или непоследовательных остатков. Модификация (модификации) может быть получена разными способами, известными специалистам в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез (например, с помощью системы мутагенеза *in vitro* Sculptor™ от Amersham, Лес-Улис, Франция), ПЦР-мутагенез, перемешивание ДНК и синтетические химические методики (например, дающие синтетические нуклеиновокислотные молекулы). Модификация(и), предусмотренная данным изобретением, включает молчащие модификации, которые не изменяют аминокислотную последовательность закодированных полипептидов HBV, а также модификации, которые будут транслироваться в закодированный полипептид, образуя модифицированную аминокислотную последовательность по сравнению с соответствующей нативной. Термин «образует» (или образующий) используется для определения первоначального источника молекулы, но не предназначен для ограничения способа, посредством которого делают молекулу, который может быть, например, химическим синтезом или рекомбинантным средством.

Предпочтительно каждая из частей HBV, используемых в данном изобретении, сохраняет высокую степень идентичности аминокислотной последовательности с соответствующим нативным белком HBV, с белком полной длины или с его частью (частями). Процент идентичности двух полипептидов зависит от числа одинаковых позиций, общих для последовательностей, с учетом ряда пробелов, которые должны быть введены для оптимального выравнивания, и длины каждого пробела. Для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей в данной области доступны различные компьютерные программы и математические алгоритмы, такие как, например, программа Blast (например, Altschul et al., 1997, *Nucleic Acid Res.* 25:3389; Altschul et al., 2005, *FEES J*, 5 272:5101), доступная в NCBI. То же самое может быть применено для нуклеотидных последовательностей. Программы для определения гомологии нуклеотидных последовательностей также доступны в специализированной базе данных (Genbank или Wisconsin Sequence Analysis Package), например программы BESTFIT, FASTA и GAP.

Например, в дополнение к модификациям, описанным ниже (например, сниженной ферментативной активности и т.д.), любая или все части HBV, содержащиеся или кодирующиеся композицией изобретения, могут быть модифицированы таким образом, чтобы представлять конкретный генотип, и, следовательно, включают аминокислотную последовательность, соответствующую консенсусной или неконсенсусной последовательности, которая обычно определяется после выравнивания последовательностей различных полипептидов HBV определенного генотипа.

Термин «комбинация», используемый в данном документе, относится к любой комбинации по меньшей мере двух компонентов, содержащихся или кодирующихся иммуногенной композицией изобретения и любой возможной компоновкой различных

компонентов с определенным предпочтением 2 или 3 из указанных компонентов. Он охватывает смесь двух или более полипептидов, смесь двух или более нуклеиновокислотных молекул/векторов, смесь одного или более полипептида(ов) и одной или более нуклеиновокислотной молекулы/вектора, а также слияние двух или более нуклеиновокислотных молекул, так чтобы получить единую полипептидную цепь, несущую две или более части HBV (например, неприродная компоновка).

В предпочтительном воплощении иммуногенная композиция изобретения содержит комбинацию по меньшей мере двух из указанных полимеразной части, сердцевинной части, оболочечной части или по меньшей мере двух из указанных нуклеиновокислотной молекулы, кодирующей указанную полимеразную часть, нуклеиновокислотной молекулы, кодирующей указанную сердцевинную часть, и/или нуклеиновокислотной молекулы, кодирующей указанную оболочечную часть. Особенно предпочтительная композиция изобретения выбрана из группы, состоящей из (i) композиции, содержащей комбинацию полимеразной части и сердцевинной части, определенных в данном документе, или комбинацию нуклеиновокислотных молекул, кодирующих указанную полимеразную часть и указанную сердцевинную часть; (ii) композиции, содержащей комбинацию сердцевинной части и оболочечной части, определенных в данном документе, или комбинацию нуклеиновокислотных молекул, кодирующих указанную сердцевинную часть и указанную оболочечную часть; (iii) композиции, содержащей комбинацию полимеразной части, сердцевинной части и оболочечной части, определенных в данном документе, или комбинацию нуклеиновокислотных молекул, кодирующих указанную полимеразную часть, указанную сердцевинную часть и указанную оболочечную часть.

Термины «слияние» или «гибридный белок», используемые в данном документе, относятся к комбинации друг с другом по меньшей мере двух полипептидов (или их фрагментов) в одну полипептидную цепь. Предпочтительно слияние различных полипептидов осуществляется с помощью генетических средств, т.е. путем слияния в рамке считывания нуклеотидных последовательностей, кодирующих каждый из указанных полипептидов. Под выражением «слиты в рамке считывания» подразумевается, что экспрессия слитых кодирующих последовательностей дает один белок без какого-либо терминатора трансляции между каждым из слитых полипептидов. Слияние может быть прямым (т.е. без каких-либо дополнительных аминокислотных остатков между ними), либо через линкер. Наличие линкера может способствовать правильному формированию, сворачиванию и/или функционированию гибридного белка. Данное изобретение не ограничивается формой, размером или количеством используемых линкерных последовательностей, и на стыке между слитыми полипептидами может быть вставлено множество копий линкерной последовательности. Подходящие линкеры в соответствии с изобретением имеют от 3 до 30 аминокислот в длину и состоят из повторов аминокислотных остатков, таких как глицин, серин, треонин, аспарагин, аланин и/или пролин (см., например, Wiederrecht et al., 1988, Cell 54, 841; Aumailly et al., 1990 FEBS Lett. 262, 82; и Dekker et al., 1993, Nature 362, 852), например, линкер Ser-Gly-Ser или Gly-Ser-Gly-Ser-Gly.

Используемый в данном документе термин «гетерологичная гидрофобная последовательность» относится к пептиду гидрофобной природы (который содержит большое количество остатков гидрофобных аминокислот, таких как остатки Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr и Trp). Понятие «гетерологичный» относится к последовательности, чужеродной для нативного белка, полипептида или пептида HBV, из которой получают выбранную часть HBV. Это может быть пептид, чужеродный вирусу HBV (например,

пептид из вируса кори или вируса бешенства), или пептид из HBV-вируса, но в позиции, в которой он обычно не встречается в вирусном геноме. Гетерологичная гидрофобная последовательность может быть слита в рамке считывания на N-конце, на C-конце или в пределах части HBV, и может играть роль, среди прочего, в переносе полипептида, облегчении продукции или очистки полипептида, удлинении периода полувыведения. Подходящие гетерологичные гидрофобные последовательности в соответствии с изобретением имеют от 15 до 100 аминокислот в длину и содержат высоко гидрофобный домен.

Термин «вектор», используемый в данном документе, относится и к экспрессионным, и к неэкспрессионным векторам, и включает вирусные, а также невирусные векторы, в том числе внехромосомные векторы (например, многокопийные плазмиды) и интегрирующие векторы, предназначенные для включения их в принимающую хромосому(ы). Особенно важными в контексте данного изобретения являются векторы для переноса нуклеиновокислотных(ой) молекул(ы) в вирусный геном (так называемые векторы для переноса), векторы для применения в иммунотерапии (т.е. которые способны доставлять нуклеиновокислотные молекулы в организм хозяина), а также экспрессионные векторы для применения в различных экспрессионных системах или в организме хозяина.

Используемый в данном документе термин «вирусный вектор» охватывает векторную ДНК, а также вирусные частицы, образованные ею. Вирусные векторы могут быть репликативно-компетентными, либо могут быть генетически неполноценными, т.е. могут быть репликативно-дефектными или репликативно-ослабленными. Термин «репликативно-компетентный», используемый в данном документе, включает селективно-репликативные и условно-репликативные вирусные векторы, которые спроектированы для лучшей или селективной репликации в конкретных клетках-хозяевах (например, опухолевых клетках).

Используемый в данном документе термин «регуляторная последовательность» относится к любой последовательности, которая позволяет, способствует или модулирует экспрессию нуклеиновокислотной молекулы в данной клетке-хозяине или организме, включая репликацию, дубликацию, транскрипцию, сплайсинг, трансляцию, стабильность и/или транспорт нуклеиновой кислоты или одного из ее производных (например, мРНК) в клетку-хозяина или организм.

Используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» следует понимать в широком смысле без всяких ограничений, касающихся конкретной организации ткани, органа или выделенных клеток. Такие клетки могут быть уникальным типом клеток или группой различных типов клеток и включают бактерии, низшие и высшие эукариотические клетки, а также культивируемые клеточные линии, первичные клетки и пролиферативные клетки. Этот термин включает клетки, которые могут быть или были реципиентами композиции(й), нуклеиновокислотных молекул(ы), вектора(ов) или инфекционных вирусных частиц(ы) изобретения, а также потомство таких клеток.

Термин «организм-хозяин» относится к позвоночным, в частности, к представителям видов млекопитающих, и особенно к домашним животным, сельскохозяйственным животным, спортивным животным и приматам, включая человека. Предпочтительно организм-хозяин является пациентом, страдающим от хронической HBV-инфекции. Инфицирующий HBV может быть того же генотипа или серотипа, что и по меньшей мере один из первого, второго или третьего HBV, используемых в данном изобретении.

Используемый в данном документе термин «выделенный» относится к белку, полипептиду, пептиду, нуклеиновокислотной молекуле, клетке-хозяину или вирусу,

который был выделен из своей природной среды (например, отделен по меньшей мере от одного компонента(ов), с которым он природно связан).

Используемое в данном документе понятие «терапевтически эффективное количество» является дозой, достаточной для облегчения одного или более симптома, обычно связанного с HBV-инфекцией или заболеванием или состоянием, вызванным или связанным с HBV-инфекцией. При профилактическом применении этот термин означает дозу, достаточную для предотвращения или отсрочки появления HBV-инфекции.

«Терапевтические» композиции разработаны для введения в организм хозяина, уже инфицированного HBV, с целью сокращения или смягчения по меньшей мере одного заболевания или состояния, вызванного или связанного с указанной HBV-инфекцией, в конечном счете в сочетании с одним или более традиционным терапевтическим подходом, описанным выше (например, лечением нуклеозидными или нуклеотидными аналогами). Например, терапевтически эффективное количество для индукции иммунного ответа может быть таким количеством, которое необходимо для активации иммунной системы (например, приводящей к развитию анти-HBV-реакции). Термин «рак» охватывает любые раковые состояния, включая диффузные или локализованные опухоли, метастазы, раковые полипы, а также предраковые поражения (например, цирроз печени).

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» предназначен для включения любого и всех носителей, растворителей, разбавителей, эксципиентов, адъювантов, дисперсных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, а также агентов, задерживающих абсорбцию, и т.п., совместимых с фармацевтическим введением.

В соответствии с данным изобретением указанные полимеразная, сердцевинная и/или оболочечная части, содержащиеся или кодируемые композицией изобретения, могут происходить независимо из любого генотипа, штамма и изолята HBV, определенного в настоящее время, такого как описанные выше в связи с термином «HBV». Кроме того, каждая из полимеразной, сердцевинной и/или оболочечной частей может происходить из нативного соответствующего белка HBV или из модифицированного полипептида HBV (т.е. измененного таким образом, чтобы быть представителем конкретного генотипа). Таким образом, первый, второй и третий HBV-вирусы, из которых происходят полимеразная, сердцевинная и/или оболочечная части, содержащиеся или кодируемые композицией данного изобретения, могут быть независимо из одного и того же или из разных генотипов, серотипов и/или изолятов. Например, с помощью HBV-частей, полученных из двух или трех различных генотипов HBV, можно обеспечить защиту против широкого диапазона генотипов HBV.

В одном воплощении может быть интересно адаптировать иммуногенную композицию изобретения к конкретной географической области, используя по меньшей мере одну часть HBV из генотипа(ов) HBV, эндемичного для этой области. Для наглядности, генотипы А и С являются наиболее распространенными в США, в то время как пациенты из стран Западной Европы заражаются, главным образом, генотипами А и D, а в бассейне Средиземного моря генотипом D. Ограниченные данные из Индии подтверждают, что генотипы А и D являются наиболее распространенными в Индии. С другой стороны, генотипы В и С являются наиболее распространенными в Китае. Например, композиция изобретения, предназначенная для европейских стран, может содержать полимеразную часть, которая произошла из генотипа А, и сердцевинную и оболочечную части, которые произошли из генотипа D, или наоборот. Кроме того, полимеразная и сердцевинная части могут быть из генотипа А, а

оболочечная часть из генотипа D. В качестве другого примера, композиция изобретения, предназначенная для европейских стран и США, может включать полимеразную, сердцевинную и оболочечную части, которые независимо произошли из генотипов А, С и D. С другой стороны, композиция изобретения, предназначенная для Китая, может

5 включать или кодировать полимеразную, сердцевинную и оболочечную части, которые независимо друг от друга произошли из генотипа В и/или С.

Можно также адаптировать иммуногенную композицию изобретения к популяции пациентов, подлежащих лечению. Например, генотип А чаще встречается среди американских белых и афро-американцев и получивших HBV-инфекцию половым путем,

10 тогда как генотипы В и С, с другой стороны, распространены среди американцев азиатского происхождения, пациентов, родившихся в Азии, и получивших HBV-инфекцию путем передачи от матери ребенку. HBV-генотипы также связаны с различными клиническими исходами (Schaeffer et al, 2005, J. Viral, Hepatitis 12:111), при этом генотипы D и F связаны с более серьезным прогрессированием заболевания и

15 худшим прогнозом, чем генотип А (Sanchez-Tapias et al., 2002, Gastroenterology 123:1848). Специалисты в данной области смогут адаптировать композицию изобретения в соответствии с рассматриваемым населением и/или географической областью путем выбора соответствующих генотипов, серотипов, штаммов и/или изолятов HBV.

В соответствии с предпочтительным воплощением по меньшей мере два из первого, второго и третьего HBV, а предпочтительно все, имеют один и тот же HBV-генотип, и

20 в частности генотип D. Независимо друг от друга они могут происходить из одного и того же изолята, при этом с особым предпочтением первый, второй и третий вирусы HBV взяты из HBV-изолята Y07587. Предпочтительно, полимеразная часть, используемая в данном изобретении, включает аминокислотную последовательность,

25 которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №1, или с ее частью(частями), включающей не менее 450

30 аминокислотных остатков. Альтернативно или в сочетании, сердцевинная часть, используемая в данном изобретении, включает аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более

35 предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №2, или ее частью (частями), включающей не менее 100 аминокислотных остатков. Альтернативно или в сочетании одна или более иммуногенная область оболочечной части, используемая в данном изобретении, включает аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей

40 мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с частью(частями) длиной в 15-100 аминокислотных остатков из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №3.

45 Полимеразная часть

В соответствии с одним воплощением полимеразная часть, содержащаяся или кодируемая композицией изобретения, модифицирована по сравнению с соответствующей нативной HBV-полимеразой.

Соответствующая модификация представляет собой отсечение по меньшей мере 20 аминокислотных остатков и максимум 335 аминокислотных остатков, обычно присутствующих на М-конце нативной HBV-полимеразы. Эта модификация особенно важна для композиции изобретения, которая также включает второй полипептид для

5 уменьшения или удаления перекрывающихся частей между полимеразной и сердцевинной частями. Специалист в данной области сможет адаптировать усечение для композиции изобретения в диапазоне от по меньшей мере 20 аминокислотных остатков до максимум 335 аминокислотных остатков. Что касается нативной HBV-полимеразы, полимеразная часть, используемая в контексте данного изобретения, является предпочтительно

10 усеченной по меньшей мере на 30 аминокислотных остатков и не более чем на 200 аминокислотных остатков, предпочтительно по меньшей мере на 35 аминокислот и не более чем на 100 аминокислотных остатков, предпочтительно по меньшей мере на 40 аминокислотных остатков и не более чем на 60 аминокислотных остатков, и более предпочтительно по меньшей мере на 45 и не более чем на 50 аминокислотных остатков,

15 при этом особое предпочтение имеет усечение, включающее первые 47 или 46 аминокислотных остатков после инициаторного остатка Met, расположенного на М-конце нативной HBV-полимеразы. Предпочтительно усечение простирается от позиции 1 (инициатор Met) или 2 до позиции 47 в SEQ ID №1.

Предпочтительное воплощение направлено на полимеразную часть, включающую

20 аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с частью аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №1, простираясь от

25 приблизительно 48 позиции до приблизительно 832 позиции; еще более предпочтительно полимеразная часть включает аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно

30 100% идентичность с частью аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №7.

Альтернативно или в сочетании, полимеразная часть, используемая в изобретении, модифицирована таким образом, чтобы демонстрировать сниженную обратнотранскриптазную (ОТазную) ферментативную активность по сравнению с нативной

35 HBV-полимеразой. Преимущественно указанное снижение ОТазной активности обеспечивается одной или более мутацией (мутациями) в области, ответственной за ОТазную ферментативную активность.

Структурная и функциональная организация HBV-полимераз была исследована почти 20 лет назад (см., например, Radziwill et al., 1990, J. Virol. 64:613). Они представляют

40 собой многофункциональные белки с тремя функциональными областями, которые катализируют основные этапы репликации HBV (праймнинг, синтез ДНК и удаление РНК-матриц), и не основными разделителями, которые расположены в следующем порядке:

- первая область, которая продолжается от позиции 1 приблизительно до позиции
- 45 177, является ответственной за концевую активность белка HBV,
- разделитель, расположенный приблизительно от 178 позиции приблизительно до 335 позиции,
- ДНК-полимеразная область, которая продолжается приблизительно от позиции

336 приблизительно до позиции 679, несет ответственность за ОТазную активность, и - область РНКазы Н приблизительно от позиции 680 до С-конца (приблизительно позиция 832) участвует в активности РНКазы Н.

Четыре остатка вовлечены в ОТазную активность, формируя мотив «YMDD» (для остатков Туг, Met, Asp и Asp), обычно присутствующий приблизительно от позиции 538 приблизительно до позиции 541 нативной HBV-полимеразы (например, соответствующий позициям 538, 539, 540 и 541 в SEQ ID №1 и позициям 492, 493, 494 и 495 в SEQ ID №7), и данное изобретение охватывает любые мутации в этом мотиве или в другом месте ОТазной области, которые коррелируют со значительным сокращением (т.е. сокращением по меньшей мере в 10 раз) или удалением ОТазной активности при сохранении иммуногенных свойств. Типичные примеры подходящих ОТаз-дефицитных полимеразных мутантов описаны в литературе, например, в Radziwill et al. (1990, J. Virol. 64:613), в Bartenschlager et al. (1990, J. Virol, 64:5324) и в Jeong et al. (1996, Biochem Bioph Res Commun. 223(2):264). Предпочтительно полимеразная часть, используемая в данном изобретении, включает замену первого остатка Asp из мотива YMDD (который соответствует позиции 540 в SEQ ID №1 и позиции 494 в SEQ ID №7) или аминокислотного остатка, который находится в эквивалентной позиции в нативной HBV-полимеразе, на любой аминокислотный остаток, кроме Asp, при этом особо предпочтительна замена на остаток His (мутация D540H). Уменьшение или удаление ОТазной активности можно выявить с помощью анализов, хорошо известных в данной области (например, эндогенных полимеразных анализов, описанных в Radziwill et al., 1990, J Virol. 64:613).

Альтернативно или в сочетании, полимеразная часть, используемая в изобретении, модифицирована таким образом, чтобы демонстрировать сниженную ферментативную активность РНКазы Н по сравнению с нативной HBV-полимеразой. Преимущественно указанное снижение активности РНКазы Н обеспечивается одной или более мутациями (мутациями) в области, ответственной за ферментативную активность РНКазы Н. Как уже говорилось выше, функциональная область, вовлеченная в активность РНКазы Н, была спроецирована на С-концевую часть HBV-полимеразы, более конкретно с позиции 680 до С-концевой позиции 832, и данное изобретение охватывает любые мутации в этой области, которые коррелируют со значительным сокращением (т.е. сокращением по меньшей мере в 10 раз) или удалением активности РНКазы Н при сохранении иммуногенных свойств. Типичные примеры подходящих РНКазы Н-дефицитных полимеразных мутантов описаны в литературе, например, в Radziwill et al. (1990, J. Virol. 64:613), в Bartenschlager et al. (1990, J. Virol, 64:5324). Предпочтительно полимеразная часть, используемая в данном изобретении, включает замену остатка Glu, соответствующего позиции 718 в SEQ ID №1 и позиции 672 в SEQ ID №7, или аминокислотного остатка, который находится в эквивалентной позиции в нативной HBV-полимеразе, на любой аминокислотный остаток, кроме Glu, при этом особо предпочтительна замена на остаток His (мутация E718H). Уменьшение или удаление активности РНКазы Н может выявить с помощью анализов, хорошо известных в данной области (например, анализов активности РНКазы Н in vitro или анализа тандемной молекулы ДНК-РНК, описанного в Radziwill et al., 1990, J Virol, 64:613 или в Lee et al., 1997, Biochem. Bioph. Res, Commun. 233(2):401).

Предпочтительно полимеразная часть, используемая в изобретении, мутирована таким образом, чтобы уменьшить или удалить и ОТазную, и РНКазную активность, и включает модификации, описанные выше в связи с этими ферментативными функциями, с особым предпочтением мутаций D540H и E718H.

Предпочтительное воплощение данного изобретения направлено на полимеразную часть, включающую, альтернативно состоящую по существу или же альтернативно состоящую из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №8, или с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №7, с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His.

В другом и предпочтительном воплощении полимеразная часть, используемая в данном изобретении, слита в рамке считывания с гетерологичной гидрофобной последовательностью (последовательностями) для улучшения синтеза и/или стабильности и/или презентации на поверхности экспрессирующей клетки-хозяина и/или презентации антигена хозяйским МНС класса I и/или МНС класса II. Подходящие гетерологичные гидрофобные последовательности включают последовательности, такие как сигнальные и/или трансмембранные пептиды, которые позволяют направлять полимеразную часть на секреторный путь. Такие пептиды известны в данной области. Вкратце, сигнальные пептиды, как правило, присутствуют на М-конце представленных на мембране или секретированных полипептидов, и инициируют их переход в эндоплазматический ретикулум (ER). Они включают от 15 до 35 существенно гидрофобных аминокислот, которые затем удаляются определенной ER-расположенной эндопептидазой, образуя зрелый полипептид. Трансмембранные пептиды в природе обычно являются высоко гидрофобными и служат для закрепления полипептидов в клеточной мембране (см., например, Brandon and Tooze, 1991, в Introduction to Protein Structure p.202-214, NY Garland; WO 99/03885). Выбор трансмембранного и/или сигнального пептидов, которые могут быть использованы в контексте данного изобретения, огромен. Они могут быть получены из любого заякоренного в мембране и/или секретированного полипептида (например, клеточного или вирусного полипептида), такого как иммуноглобулины, тканевой активатор плазминогена, инсулин, гликопротеин вируса бешенства, оболочечный гликопротеин ВИЧ или F-белок вируса кори, или могут быть синтетическими. Предпочтительным местом вставки сигнального пептида является М-конец после кодона инициации трансляции, а трансмембранного пептида - С-конец, например, непосредственно перед стоп-кодоном. Кроме того, пептидный линкер может быть использован для связывания сигнального и/или трансмембранного пептидов с полимеразной частью.

В контексте изобретения может быть использована другая гидрофобная последовательность(и), такая как те, которые обычно присутствуют в белках, связанных с оболочкой или мембраной, в том числе HBsAg. Особый интерес в контексте данного изобретения представляет слияние полимеразной части с одной или более иммуногенной областью, описанной в данном документе (env1, env2, env3 и/или env4), которая имеет гидрофобную природу. Одна или более гидрофобная область может быть слита в рамке считывания на М-конце, на С-конце или в полимеразной части.

В контексте изобретения предпочтительно полимеразная часть, используемая в изобретении, слита в рамке считывания с сигнальным и трансмембранным пептидами гликопротеина вируса бешенства. Как показано в прилагаемом разделе с примерами, указанная сигнальная последовательность из вируса бешенства слита в рамке считывания с N-концом, а указанная трансмембранная последовательность из вируса бешенства слита в рамке считывания с С-концом указанной полимеразной части.

Наиболее предпочтительное воплощение направлено на полимеразную часть, которая включает, альтернативно состоит по существу или же альтернативно состоит из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №9.

Сердцевинная часть

Альтернативно или в сочетании с композицией, описанной выше, данное изобретение также предусматривает композицию, включающую сердцевинную часть, происходящую из второго HBV. Как описано в данном документе в связи с вирусом HBV, сердцевинная часть, используемая в изобретении, происходит из HBV, который является таким же или отличается от вируса HBV, из которого берет начало полимеразная часть.

Предпочтительно, сердцевинная и полимеразная части происходят из HBV генотипа D, при этом особое предпочтение отдается HBV-изоляту Y07587 или, альтернативно, из генотипа HBV, распространенного в Китае (например, генотипа В или С).

В соответствии с одним воплощением сердцевинная часть, используемая в данном изобретении, может быть нативной сердцевинной частью HBV (например, приведенной в SEQ ID №2) или сердцевинной частью, модифицированной по сравнению с

соответствующей нативной сердцевинной частью HBV, которая сохраняет по меньшей мере 100 аминокислотных остатков сердцевинного белка, при этом особое предпочтение отдается сердцевинной части, содержащей от 120 до 180 аминокислотных остатков, предпочтительно от 125 до 148 аминокислотных остатков, и предпочтительно от 130 до 143 аминокислотных остатков (например, приблизительно 140 аминокислотных остатков).

Соответствующей модификацией является усечение. Предпочтительно усечение охватывает по меньшей мере 10 аминокислотных остатков и не более 40 аминокислотных остатков, обычно присутствующих на С-конце нативной сердцевинной части HBV или в С-концевой части (т.е. части, охватывающей последние 40 аминокислотных остатков).

Эта модификация особенно важна для композиций изобретения, которые также включают полимеразную часть, для уменьшения или удаления перекрывающейся части между полимеразной и сердцевинной частями. Она также может иметь значение для удаления NLS (сигнала ядерной локализации) в этой сердцевинной области и/или для подавления взаимодействия с HBV-полимеразой. Специалисты смогут адаптировать усечение для композиции изобретения в упоминаемом диапазоне по меньшей мере от 10 аминокислотных остатков и до 40 аминокислотных остатков. Соответствующие усечения включают 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 последовательных аминокислотных остатков, обычно присутствующих на С-конце нативной сердцевины HBV или в С-концевой части.

Что касается нативной сердцевины HBV, сердцевинная часть, используемая в контексте данного изобретения, предпочтительно усечена по меньшей мере на 20 аминокислотных остатков и не более чем на 40 аминокислотных остатков, предпочтительно по меньшей мере на 30 аминокислотных остатков и не более чем на 38 аминокислотных остатков, и более предпочтительно по меньшей мере на 34 аминокислотных остатка и не более чем на 37 аминокислотных остатков, расположенных на С-конце нативного HBV или в С-концевой части, при этом особым предпочтением пользуется усечение, включающее последние 35 аминокислотных остатков нативной сердцевины HBV (в других терминах, усечение простирается приблизительно от позиции 149 до С-конца сердцевинного

полипептида).

Особый интерес представляет сердцевинная часть, включающая аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность, и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №2, простирающейся с позиции 1 предпочтительно до позиции 148, и даже более предпочтительной является сердцевинная часть, включающая аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность, и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №10.

Альтернативно или в сочетании, сердцевинная часть модифицирована таким образом, чтобы демонстрировать сниженное распознавание и/или взаимодействие с белком оболочки HBV по сравнению с нативной HBV-сердцевинной. Преимущественно указанное снижение распознавания/взаимодействия обеспечивается одной или более мутацией (мутациями) в области, расположенной вблизи от остатка 80, которая, по-видимому, формирует внешнюю петлю, доступную на поверхности сердцевинных частиц (Argos et al., 1988, EMBO J. 7:819). Уменьшение или удаление распознавания или взаимодействия с оболочечным белком можно выявить с помощью анализов, хорошо известных в данной области (например, электронной микроскопии, анализа формирования нуклеокапсидов в клетках, секретированных вирионов после временной трансфекции в HuH7, как описано в Seitz et al., 2007, EMBO J., 26:416 или в Ponsel et al, 2003, J. Virol. 77 (1):416).

Предпочтительная модификация включает удаление одного или более аминокислотного остатка в области сердцевинной, продолжающееся приблизительно от позиции 75 приблизительно до позиции 85 (соответствующее остаткам 75-85 из SEQ ID №2 и SEQ ID №10), с особо предпочтительным удалением части сердцевинной, продолжающимся от приблизительно 77 позиции до приблизительно 84 позиции (соответствующим остаткам 77-84 SEQ ID №2 и SEQ ID №10). Предпочтительно сердцевинная часть включает, альтернативно состоит по существу или же альтернативно состоит из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №11, или аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID №2, в которой отсутствуют остатки 77-84.

Оболочечная часть

Альтернативно или в сочетании с композицией, описанной выше, данное изобретение также предусматривает композицию, содержащую оболочечную часть. Указанная оболочечная часть состоит из одной или более иммуногенной области (областей) по меньшей мере из 15 последовательных аминокислотных остатков, присутствующих в белке HBs, полученном из третьего вируса гепатита. Предпочтительно, каждая из указанных иммуногенных областей соответствует части по меньшей мере из 20 аминокислот и максимум 100 аминокислот, присутствующих в белке HBsAg в нативной или модифицированной форме (например, модифицированной таким образом, чтобы представлять конкретный генотип). Все иммуногенные области могут происходить из

одного и того же или разных вирусов HBV, которые могут быть такими же или могут отличаться от вирусов HBV, из которых получены сердцевинная и полимеразная части. Предпочтительно, все иммуногенные области оболочечной части получены из генотипа D HBV, и особенно из изолята вируса гепатита Y07587 или, альтернативно, из генотипа HBV, распространенного в Китае (например, генотипа В или С).

Преимущественно каждая из одной или более иммуногенных областей включает Т-клеточные эпитопы, специфичные для Т-хелперных клеток (Т_H) и/или цитотоксических Т-клеток (CTL), которые могут быть ограничены различными антигенами МНС класса I и/или класса II (например, A2, A24, DR, DP и т.д.). Такие эпитопы были описаны в данной области (W093/03764; W094/19011; Desombere et al., 2000, Clin. Exp. Immunol 122: 390; Loirat et al., 2000, J. Immunol, 165:4748; Schirmbeck et al., 2002, J. Immunol 168:6253; Depla et al., 2008, J. Virol 82:435), и специалист сможет разработать подходящую иммуногенную область (области), описанную выше, в диапазоне от 15 до 100 аминокислотных остатков, включающую В-, Т_H- и/или CTL-эпитопы из нативного оболочечного белка (например, приведенного в SEQ ID №3). Предпочтительно, оболочечная часть, содержащаяся или кодируемая композицией изобретения, не содержит иммуногенную область (области), происходящую из областей preS1 и preS2.

Данное изобретение предусматривает оболочечную часть, содержащую одну иммуногенную область, а также содержащую две, три или более.

Предпочтительно, одна или более иммуногенная область (области), используемая в данном изобретении, выбрана из группы, состоящей из:

- части оболочечного белка (HBsAg), продолжающейся от позиции 14 до 51 (область env1);
- части оболочечного белка (HBsAg), продолжающейся от позиции 165 до 194 (область env2);
- части оболочечного белка (HBsAg), продолжающейся от позиции 81 до 106 (область env3);
- части оболочечного белка (HBsAg), продолжающейся от позиции 202 до 226 (область env4); а также
- их любых комбинаций.

Особенно подходящая иммуногенная область (области), используемая в данном изобретении, включает, альтернативно по существу состоит из или же состоит из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность, и даже более предпочтительно 100% идентичность с любой из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID №12-15.

В контексте изобретения сочетание иммуногенных областей может быть в форме смеси отдельных иммуногенных областей в композиции изобретения или в форме слияния в рамке считывания двух или более иммуногенных областей в любом возможном порядке (например, слияние или смесь env1-env2, env2-env1, env1-env3, env3-env1, env1-env4, env4-env1, env2-env3, env3-env2, env2-env4, env4-env2, env3-env4, env4-env3, env1-env2-env3, env2-env1-env3, env1-env2-env4 и т.д.). Кроме того, сочетание может включать одну копию или несколько копий (например, env1-env2-env1, env1-env4-env1 и т.д.). Слияние всех иммуногенных областей может быть прямым или через линкер.

Оболочечные части, представляющие особый интерес в контексте изобретения, включают слияние двух или трех иммуногенных областей, приведенных в SEQ ID №12-15, с особым предпочтением слияния env1-env2, включающего, альтернативно по

существом состоящего из или же состоящего из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более

5 предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №16, или слияния env1-env2-env4, включающего, альтернативно по существом состоящего из или же состоящего из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность,

10 более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №17.

В соответствии с предпочтительным воплощением полимеразная, сердцевинная и/или оболочечная части, содержащиеся или кодируемые композицией изобретения, могут

15 быть слиты в рамке считывания попарно или все вместе. Например, может быть предусмотрено слияние полимеразной и оболочечной части в единую полипептидную цепь. Альтернативно, сердцевинная и оболочечная части могут быть слиты в рамке считывания в единую полипептидную цепь. Опять же, кодирующие нуклеиновокислотные последовательности могут быть слиты либо непосредственно,

20 либо через линкер. Предпочтительно, оболочечная часть слита в рамке считывания с С-концом сердцевинной или полимеразной части.

Предпочтительные примеры гибридных полипептидов сердцевинной части с оболочечной частью выбраны из группы, состоящей из:

- полипептида, включающего, альтернативно по существом состоящего или же

25 состоящего из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №18 (core*t-env1);

- 30 - полипептида, включающего, альтернативно по существом состоящего или же состоящего из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с

35 аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №19 (core*t-env1-env2);

- и

 - полипептида, включающего, альтернативно по существом состоящего или же состоящего, из аминокислотной последовательности, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность, предпочтительно по меньшей мере 85% идентичность,

40 предпочтительно по меньшей мере 90% идентичность, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичность и даже более предпочтительно 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №20 (core-env1-env2-env4), или частью аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 251 (core-env1-env2), или частью

45 аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 221 (core-env1); или с его делецированной версией, в которой отсутствуют остатки 77-84 в сердцевинной части.

В контексте изобретения полимеразная, сердцевинная и/или оболочечная части,

содержащиеся или кодируемые композицией изобретения, могут также содержать дополнительные модификации. Подходящими модификациями являются те, которые положительно влияют на синтез, процессинг, стабильность и растворимость полученного полипептида (например, те, которые направлены на изменение потенциальных сайтов расщепления, потенциальных сайтов гликозилирования и/или мембранного

5 заякоривания, как описано выше), а также те, которые являются выгодными для иммуногенности полученной композиции (например, включение или слияние с одним или более соединением, способным повышать иммуногенные свойства). Такие соединения, способные повышать иммуногенные свойства, были описаны в литературе

10 и включают, но не ограниваясь ими, калретикулин (Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108: 669), белок теплового шока 70 (HSP70) *Mycobacterium tuberculosis* (Chen et al., 2000, Cancer Res. 60:1035), убиквитин (Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71:8497), бактериальный токсин, такой как транслоцированная область экзотоксина А (ETA(dIII)) *Pseudomonas aeruginosa* (Hung et al., 2001 Cancer Res. 61:3698), а также Т-хелперный эпитоп(ы), такой как пептид

15 Pan-Dr (Sidney et al., 1994, Immunity 1:751), эпитоп pstS1 GCG (Vordermeier et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22:2631), дифтерийно-столбнячные пептиды P2TT (Panina-Bordignon et al., 1989, Eur. J. Immunol. 19:2237) и P3OTT (Demote et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23:425), эпитоп вируса гриппа (Lamb et al., 1982, Nature 300:66) и гемагглютининовый эпитоп (Rothbard et al., 1989, Int. Immunol. 1:479).

20 Нуклеиновокислотная молекула

Данное изобретение также предусматривает выделенные нуклеиновокислотные молекулы, кодирующие независимо или в сочетании полимеразную, сердцевинную и/или оболочечную части, используемые в данном изобретении, а также композиции, содержащие такие нуклеиновокислотные молекулы. Особый интерес представляют:

25 - нуклеиновокислотные молекулы, которые кодируют полимеразные части, описанные выше, с особым предпочтением тех, которые содержат любую из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID №7, 8, 9, или аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №7, с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His;

30 - нуклеиновокислотные молекулы, которые кодируют сердцевинные части, описанные в данном документе, с особым предпочтением тех, которые содержат аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №10 или 11;

- нуклеиновокислотные молекулы, которые кодируют оболочечные части, описанные в данном документе, с особым предпочтением тех, которые содержат аминокислотную

35 последовательность, приведенную в SEQ ID №12-17; и

- нуклеиновокислотные молекулы, которые кодируют слитые сердцевинную и оболочечную части, описанные в данном документе, с особым предпочтением тех, которые содержат аминокислотную последовательность, приведенную в любой из SEQ ID №18, 19, 20, или часть аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID

40 №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 251 (core-env1-env2), или часть аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 221 (core-env1); или их депонированные версии, в которых отсутствуют сердцевинные остатки 77-84 из SEQ ID №20.

Предпочтительно, нуклеиновокислотные молекулы изобретения могут быть

45 оптимизированы для обеспечения высокого уровня экспрессии в конкретной клетке-хозяине или организме, например, млекопитающего, дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* или *Pichia pastoris*) или бактерий (например, *E. coli*, *Bacillus subtilis* или *Listeria*). В самом деле, было отмечено, что когда более чем один кодон

доступен для кодирования данной аминокислоты, модели частоты использования кодонов у организмов очень неслучайны (см., например, Wad a et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111), и использование кодонов может существенно отличаться у различных хозяев (см., например, Nakamura et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24:214). Так как нуклеотидные последовательности, используемые в изобретении, имеют в основном вирусное происхождение (HBV), они могут иметь неподходящие модели частоты использования кодонов для эффективной экспрессии в клетках хозяина, таких как бактериальные, высшие или низшие эукариотические клетки. Как правило, оптимизация кодонов осуществляется путем замены одного или более «нативного» (например, HBV) кодона, соответствующего кодону, редко используемому в интересующей клетке-хозяине, на один или более кодон, кодирующий ту же аминокислоту, который используется чаще. Не обязательно заменять все нативные кодоны, соответствующие нечасто используемым кодонам, так как повышенная экспрессия может быть достигнута даже с частичной заменой. Более того, некоторые отклонения от строгого соблюдения оптимизированного использования кодонов можно сделать для того, чтобы ввести сайт(ы) рестрикции в полученную нуклеиновокислотную молекулу.

В дополнение к оптимизации кодонов, экспрессия в клетке-хозяине или организме может также быть улучшена за счет дополнительных изменений в нуклеотидной последовательности. Например, нуклеиновокислотная молекула изобретения может быть модифицирована таким образом, чтобы предотвратить кластеризацию редких, неоптимальных кодонов, присутствующих в концентрированных областях, и/или подавить или изменить, по меньшей мере частично, отрицательные элементы последовательности, которые, по-видимому, отрицательно влияют на уровни экспрессии. Такие отрицательные элементы последовательности включают, но не ограничиваясь ими, области с очень высоким (>80%) или очень низким (<30%) содержанием GC; АТ-богатые или GC-богатые участки последовательности; нестабильные прямые или инвертированные повторные последовательности; вторичные структуры РНК и/или внутренние скрытые регуляторные элементы, такие как внутренние ТАТА-боксы, χ -сайты, сайты посадки рибосомы и/или донорные/акцепторные сайты сплайсинга. Другое воплощение изобретения относится к фрагментам нуклеиновокислотной молекулы изобретения, например, к фрагментам, образуемым с помощью рестриктаз и ПЦР. Такие фрагменты могут быть использованы в качестве зондов, праймеров или фрагментов, кодирующих иммуногенную часть первого и/или второго полипептида.

Предпочтительная нуклеиновокислотная молекула в соответствии с изобретением выбрана из группы, состоящей из:

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №21 (кодирующей усеченную Pol SEQ ID №7);

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №22 (кодирующей усеченную Pol SEQ ID №8);

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №21, с заменой нуклеотида G в позиции 1480 на C, нуклеотида G в позиции 2014 на C и нуклеотида A в позиции 2016 на T (кодирующей усеченную Pol SEQ ID №7 с мутациями D540H и E718H);

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №23 (кодирующей усеченную и мутированную Pol-TMR SEQ ID №9);

5 - нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №24 (кодирующей core*t-env1 SEQ ID №18);

10 - нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №25 (кодирующей core*t-env1-env2 SEQ ID №19); и

15 - нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №26 (кодирующей core*t-env1-env2-env4 SEQ ID №20), или с частью нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID №26, начиная с нуклеотида 1 и заканчивая нуклеотидом 753 (кодирующей core*t-env1-env2), или с частью нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID №26, начиная с нуклеотида 1 и заканчивая нуклеотидом 663 (кодирующей core*t-env1); или
20 с их депонированными версиями, в которых отсутствует часть от G в позиции 229 до A в позиции 252 SEQ ID №26 (что соответствует удалению остатков 77-84 в сердцевинной части).

Нуклеиновокислотные молекулы данного изобретения могут быть созданы с помощью данных последовательности, доступных в данной области, и информации о
25 последовательности, приведенной в данном документе. Последовательность ДНК, кодирующая каждый из полипептидов HBV, может быть выделена непосредственно из HBV-содержащих клеток, библиотек кДНК и геномных библиотек, вирусных геномов или любых имеющихся векторов, о которых известно, что они включают ее, с помощью обычных методик молекулярной биологии или ПЦР, и может быть изменена (например,
30 как описано в данном документе). Кроме того, нуклеиновокислотная молекула изобретения также может быть получена путем химического синтеза в автоматизированном процессе (например, собрана из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов, как описано, например, в Edge, 1981, Nature 292, 756; Nambair et al., 1984, Science 223:1299; Jay et al., 1984, J. Biol. Chem. 259:6311).

35 Кроме того, данным изобретением предусмотрены векторы, содержащие одну или более нуклеиновокислотную молекулу изобретения, а также композиции, содержащие такой вектор(ы).

В контексте данного изобретения могут быть использованы различные системы векторов-хозяев, в том числе бактериофаговые, плазмидные или космидные векторы,
40 адаптированные к экспрессии в прокариотическом организме-хозяине, таком как бактерии (например, *E. coli*, *Bacillus subtilis* или *Listeria*); векторы, адаптированные к экспрессии в дрожжах (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*); вирусные экспрессионные векторы (например, бакуловирусные), адаптированные к экспрессии в клеточных системах насекомых (например, клетках Sf
45 9); вирусные или плазмидные экспрессионные векторы (например, Ti-плазмида, вирус мозаики цветной капусты CaMV; вирус табачной мозаики TMV), адаптированные к экспрессии в системах растительных клеток; а также плазмидные и вирусные векторы, адаптированные к экспрессии в клетках или организмах высших эукариотов. Такие

векторы в основном описаны в литературе и коммерчески доступны (например, от Stratagene, Amersham Biosciences, Promega и т.д.). Типичные примеры подходящих плазмидных векторов включают, но не ограничиваясь ими, pREP4, pCER4 (Invitrogene), PCI (Promega), pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840) и pMT2PC (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6:187), pVAX и pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76:12735). В контексте данного изобретения также может быть использовано большое количество вирусных векторов, полученных из различных вирусов (например, ретровируса, аденовируса, AAV, поксвируса, вируса герпеса, вируса кори, пенистого вируса, альфавируса, вируса везикулярного стоматита и т.п.).

Особый интерес представляют аденовирусные векторы, которые обладают целым рядом хорошо задокументированных преимуществ для генного переноса или рекомбинантной продукции (см. обзор в *Adenoviral vectors for gene therapy*, 2002, Ed D, Curiel and J. Douglas, Academic Press). Аденовирусные векторы для применения в соответствии с данным изобретением могут быть получены из разнообразных источников человеческого или животного происхождения (например, аденовирус собак, овец, обезьян и т.д.). Может быть использован любой серотип с особым предпочтением человеческих аденовирусов и особенно с предпочтением аденовирусов подрода С, таких как Ad2 (Ad2), 5 (Ad5), 6 (Ad6), подрода В, таких как 11 (Ad11), 34 (Ad34) и 35 (Ad35), и подрода D, таких как 19 (Ad 19), 24 (Ad24), 48 (Ad48) и 49 (Ad49). Также может быть выгодным применение Ad животных с особым предпочтением Ad шимпанзе, таким как Ad3 шимпанзе (Peruzzi et al., 2009, Vaccine 2.7:1293) и Ad63 шимпанзе (Dudareva et al., 2009, vaccine 27:3501). Упомянутые аденовирусы доступны из Американской коллекции типовых культур (АТСС, Роквилл, штат Мэриленд) или были объектом многочисленных публикаций, описывающих их последовательность, организацию и способы производства, что позволяет производителям их применять (см., например, US 6133028; US 6110735; WO 02/40665; WO 00/50573; EP 1016711; Vogels et al., 2003, J. Viral. 77:8263; WO 00/70071; WO 02/40665; WO 2004/001032; WO 2004/083418; WO 2004/097016; WO 2005/010149).

В одном воплощении аденовирусной вектор данного изобретения является репликативно-дефектным. Предпочтительными репликативно-дефектными аденовирусными векторами являются EI-дефектные (см., например, US 6136594 и US 6013638) с EI-делецией, которая простирается от приблизительно позиции 459 до 3328 или от приблизительно позиции 459 до 3510 (со ссылкой на последовательность человеческого аденовируса типа 5, раскрытую в GeneBank под номером M 73260 и в Chroboczek et al., 1992, Virol. 186:280). Мощность клонирования также может быть повышена путем удаления дополнительной части (частей) аденовирусного генома (полностью или часть несущественной области E3 или других важных областей E2, E4, как описано в WO 94/28152; Lusky et al., 1998, J. Virol 72:2022).

Нуклеиновокислотная молекула(ы) данного изобретения может быть вставлена в любое место аденовирусного генома, с особым предпочтением для вставки EI-области. Она/они могут быть расположены в смысловой или антисмысловой ориентации по отношению к природному транскрипционному направлению обсуждаемой области.

Другие подходящие вирусные векторы в контексте изобретения получены из поксвирусов (см., например, Cox et al., in "Viruses in Human Gene Therapy" Ed J.M.Bos, Carolina Academic Press). В контексте данного изобретения поксвирусный вектор может быть получен из любого члена Poxviridae, в частности вируса оспы канареек, вируса оспы кур и вируса осповакцины, причем последняя предпочтительнее. Подходящие вирусы осповакцины включают, но не ограничиваясь ими, штамм Copenhagen (Goebel

et al., 1990, Virol. 179:247 and 517;

Johnson et al., 1993, Virol. 196:381), штамм Wyeth и модифицированный штамм Анкара (MVA) (Antoine et al., 1998, Virol. 244:365). Общие условия для построения рекомбинантного поксивируса хорошо известны в данной области (см., например, EP 206 920; Mayr et al., 1975, Infection 3:6; Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10847; US 6440422). Нуклеиновокислотная молекула данного изобретения предпочтительно вставляется в поксивирусный геном в несущественных локусах. Тимидинкиназный ген является особенно подходящим для включения в векторы на основе вируса осповакцины Copenhagen (Hruby et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci USA 80: 3411; Weir et al., 1983, J. Virol. 46:530), и делеция II или III для включения в вектор MVA (Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72:1031; Sutler et al., 1994, Vaccine 12:1032).

Данное изобретение также предусматривает векторы (например, плазмидные ДНК) в комплексе с липидами или полимерами для формирования структурных частиц, таких как липосомы, липоплексы или наночастицы. Такие технологии имеются в данной области (см., например, Arango et al., 2003, Gene Ther. 10:5; Eliaz et al., 2002, Gene Ther. 9:1230 и Betageri et al., 1993, "Liposome drug delivery 5 systems", Technomic Publishing Company, Inc).

В соответствии с предпочтительным воплощением векторы изобретения содержат нуклеиновокислотную молекулу (молекулы) изобретения в форме, пригодной для экспрессии в клетке-хозяине или организме, что означает, что Нуклеиновокислотная молекула(ы) находится под контролем одной или более регуляторной последовательности, соответствующей вектору и/или клетке-хозяину. Специалисты в этой области примут во внимание, что выбор регуляторных последовательностей может зависеть от таких факторов, как клетка-хозяин, необходимый уровень экспрессии и т.д.

Промотор имеет особое значение, и подходящие промоторы, используемые в контексте данного изобретения, включают конститутивные промоторы, которые направляют экспрессию нуклеиновокислотной молекулы (молекул) во многих типах клеток-хозяев, и те, которые направляют экспрессию нуклеиновокислотной молекулы (молекул) в определенных клетках-хозяевах (например, специфичные для печени регуляторные последовательности) или в ответ на определенные события или экзогенные факторы (например, температуру, питательные добавки, гормоны или другие лиганды).

Промоторы, подходящие для конститутивной экспрессии в клетках млекопитающих, включают, но не ограничиваясь ими, цитомегаловирусный (CMV) немедленный ранний промотор (Boshart et al., 1985, Cell 41:521), промотор RSV, аденовирусный основной поздний промотор, фосфоглицерокиназный (PGK) промотор (Adra et al., 1987, Gene 60: 65) и тимидинкиназный (TK) промотор вируса простого герпеса (HSV)-1. Промоторы вируса осповакцины особенно приспособлены для экспрессии поксивирусных векторов. Типичные примеры включают, но не ограничиваясь ими, промоторы вируса осповакцины 7.5K, H5R, 11K7.5 (Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15:18), TK, p28, p11 и K1L, а также синтетические промоторы, такие как описаны в Chakrabarti et al. (1997, Biotechniques 23: 1094, в связи с промотором pSE/L), Hammond et al. (1997, J. Virological Methods 66:135) и Kumar and Boyle (1990, Virology 179:151), а также ранний/поздний химерные промоторы. Специфичные для печени промоторы включают, но не ограничиваясь ими, промоторы генов ГМГ-КоА-редуктазы (Luskey, 1987, Mol Cell. Biol 7:1881); стирол-регулирующего элемента 1 (SRE-1, Smith et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:2306); альбумина (Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1:268);

фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PEPCK) (Eisenberger et al., 1992, Mol. Cell Biol. 12:1396); человеческого С-реактивного белка (CRP) (Li et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:

4136); человеческой глюкокиназы (Tanizawa et al., 1992, Mol. Endocrinology 6:1070); холестерин-7-альфа-гидролазы (CYP-7) (Lee et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:14681), альфа-1-антитрипсина (Ciliberto et al., 1985, Cell 41:531), инсулиноподобного ростового фактора (IGFBP-1) (Babajko et al., 1993, Biochem Biophys. Res. Comm. 196:480); человеческого трансферрина (Mendelzon et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:5717); коллагена типа I (Houghlum et al., 1994, J. Clin. Invest. 94:808) и FIX (US 5814716).

Специалистам в данной области будет понятно, что регуляторные элементы, контролирующие экспрессию нуклеиновокислотной молекулы (молекул) изобретения, могут также содержать дополнительные элементы для надлежащей инициации, регуляции и/или терминации транскрипции (например, полиА-последовательности для терминации транскрипции), транспорта мРНК (например, сигнальные последовательности ядерной локализации), процессинга (например, сигналы сплайсинга), а также стабильности (например, интроны и некодирующие 5'- и 3'-последовательности), трансляции (например, инициатор Met, трехчастные лидерные последовательности, рибосом-связывающие сайты, последовательности Шайна-Дальгарно и т.д.) в клетке-хозяине или организме и на этапах очистки (например, метки).

В соответствии с данным изобретением нуклеиновокислотные молекулы данного изобретения, кодирующие указанную полимеразную часть, указанную сердцевинную часть и/или указанную оболочечную часть, могут быть осуществлены одним и тем же вектором или по меньшей мере двумя векторами (например, двумя или тремя независимыми векторами). Таким образом, данное изобретение предусматривает вектор, который несет нуклеиновокислотные молекулы, кодирующие указанную полимеразную часть, указанную сердцевинную часть и указанную оболочечную часть, а также независимые векторы, каждый из которых несет только одну или две нуклеиновокислотные молекулы, кодирующие указанную полимеразную часть указанную сердцевинную часть и/или указанную оболочечную часть. Такой вектор(ы) также предусмотрен данным изобретением, как и композиции, содержащие такой вектор(ы). При использовании различных векторов они могут иметь различное или одно и то же происхождение. Например, можно представить экспрессию одной HBV-части из дефектного поксвируса (например, MVA) и экспрессию двух других частей из другого поксвирусного вектора (например, вектора Copenhagen). В качестве другого примера можно представить композицию, включающую аденовирусный вектор, кодирующий полимеразную часть, и аденовирусный вектор, кодирующий сердцевинную часть и оболочечную часть. Кроме того, экспрессия из различных вирусных векторов (например, экспрессия полимеразной части из аденовирусного вектора и экспрессия сердцевинной и/или оболочечной части из MVA, или наоборот) также входит в контекст изобретения, как и экспрессия HBV-частей из плазмидных и вирусных векторов.

Предпочтительные воплощения изобретения направлены на векторы, выбранные из группы, состоящей из:

(i) вектора MVA, включающего нуклеиновокислотную молекулу, находящуюся под контролем промотора вируса осповакцины, такого как промотор 7.5K, и кодирующую полимеразную часть, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №7, 8 или 9 или в SEQ ID №7 с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и с заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His. Предпочтительно, указанная нуклеиновокислотная молекула вставлена в делецию III генома MVA.

(ii) вектора MVA, включающего нуклеиновокислотную молекулу, находящуюся под контролем промотора вируса осповакцины, такого как промотор рН5 г, и кодирующую сердцевинную часть и оболочечную часть, включая аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID №18 или 19. Предпочтительно, указанная нуклеиновокислотная молекула вставлена в делецию III генома MVA.

(iii) E1-дефектный Ad-вектор, содержащий вставленную вместо области E1 нуклеиновокислотную молекулу, которая находится под контролем промотора CMV и кодирует полимеразную часть, включая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №7, 8 или 9 или в SEQ ID №7 с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His.

(iv) E1-дефектный Ad-вектор, содержащий вставленную вместо области E1 нуклеиновокислотную молекулу, которая находится под контролем промотора CMV и кодирует сердцевинную часть и оболочечную часть, включая аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №18, 19, 20, или часть SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 251 (core-env1-env2), или часть SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 221 (core-env1),

а также к композиции, содержащей векторы (i) и (ii) или (iii) и (iv).

При необходимости вектор или композиция изобретения может также содержать один или более трансген, например интересующий ген, который будет экспрессирован вместе с нуклеиновокислотной молекулой(ами) изобретения в клетке-хозяине или организме-хозяине. Предпочтительно, экспрессия трансгена имеет терапевтическую или защитную активность по отношению к HBV-инфекции или заболеванию или состоянию, вызванному или связанному с HBV-инфекцией, или способна повышать иммуногенность композиции изобретения. Подходящие трансгены включают, но не ограничиваясь ими, один или более дополнительный HBV-полипептид/пептид или кодирующую нуклеиновокислотную молекулу(ы), например белок X или его фрагмент, иммуномодуляторы, такие как цитокины (например, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN γ), гибридные цитокины (такие как описаны в WO 2005/14642) и кодирующие их нуклеиновокислотные молекулы, а также продукты суицидальных генов или кодирующих нуклеиновокислотных молекул, особенно используемых в контексте лечения карциномы печени (например, цитозиндезаминазу (CDase), урацилфосфорибозилтрансферазу (UPRTase), продукт гена FCU-1 (описан в WO 99/54481) и его производные (описаны в WO 2006/048768), которые используют с предшественником 5-фторцитозином (5-FC). Если используется трансген, он может быть экспрессирован в форме, слитой с любой нуклеиновокислотной молекулой изобретения, или может быть экспрессирован самостоятельно под контролем соответствующих регуляторных элементов. Кроме того, он может быть вставлен в любое место в векторе изобретения или в независимый вектор, который используется в комбинации с вектором(ами) или композицией изобретения.

В другом аспекте данное изобретение предусматривает инфекционные вирусные частицы, содержащие нуклеиновокислотные молекулы или векторы данного изобретения, а также композиции, содержащие такие инфекционные вирусные частицы.

Как правило, такие вирусные частицы получают в процессе, включающем следующие этапы:

(а) введение вирусного вектора изобретения в подходящую клеточную линию,
(б) культивирование указанной клеточной линии в условиях, подходящих для продукции указанной инфекционной вирусной частицы,

(в) восстановление полученной инфекционной вирусной частицы из культуры указанной клеточной линии, и

(г) возможно, очистка указанной восстановленной инфекционной вирусной частицы.

Когда вирусный вектор является дефектным, инфекционные частицы, как правило,

производятся в комплементационной клеточной линии или через применение вируса-помощника, который поставляет *in trans* нефункциональные вирусные гены. Например, подходящие клеточные линии для дополнения аденовирусного вектора с E1-делецией включают клетки 293 (Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36, 59-72), а также клетки HER-96 и PER-C6 (например, Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917; WO 97/OQ326). Клетки, подходящие для размножения поксвирусных векторов, являются птичьими клетками, и наиболее предпочтительны первичные фибробласты куриного эмбриона (CEF), изготовленные из куриных эмбрионов, полученных из оплодотворенных яиц.

Инфекционные вирусные частицы могут быть восстановлены из культурального супернатанта или из клеток после лизиса. Они могут быть также очищены в соответствии со стандартными методиками (хроматография, ультрацентрифугирование в градиенте хлорида цезия, как описано, например, в WO 96/27677, WO 98/00524, WO 98/22588, WO 98/26048, WO 00/40702, EP 1016700 и WO 00/50573).

Данное изобретение также предусматривает векторы или вирусные частицы, которые были модифицированы для предпочтительного направления в конкретные клетки-мишени (см., например Wickam et al., 1997, J. Virol. 71, 8221-8229; Arnberg et al., 1997, Virol. 227, 239-2.44; Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660-668; WO 94/10323; WO 02/96939 и EP 1146125). Характерной чертой целевых векторов и вирусных частиц изобретения является наличие на их поверхности лигандов, способных распознавать и связывать клеточные и поверхностно-экспонированные компоненты, такие как клеточный специфический маркер (например, на HBV-инфицированных клетках), тканеспецифический маркер (например, печеночный специфический маркер), а также вирусные (например, HBV) антигены. Примеры подходящих лигандов включают антитела или их фрагменты, направленные на антигенный домен HBV. Нацеливание клеток может быть осуществлено путем генетической вставки лиганда в полипептид, представленный на поверхности вируса (например, аденовирусные волокна, пентон, pIX или продукт гена p14 вируса осповакцины).

Данное изобретение также предусматривает клетки-хозяева, которые содержат нуклеиновокислотные молекулы, векторы или инфекционные вирусные частицы изобретения, а также композиции, содержащие такие клетки-хозяева. В контексте изобретения клетки-хозяева включают прокариотические клетки, низшие эукариотические клетки, такие как дрожжи, и другие эукариотические клетки, такие как клетки насекомых, растений и млекопитающих (например, человеческие или нечеловеческие), а также дополняющие клетки, способные дополнять по меньшей мере одну дефектную функцию репликативно-дефектного вектора изобретения (например, аденовирусного вектора), такие как клетки 293 и PERC.6.

В соответствии с конкретным воплощением изобретения клетки-хозяева также могут быть инкапсулированы. Технологии клеточной инкапсуляции были описаны ранее (Tresco et al., 1992, ASAIJ 38, 17-23; Aebischer et al., 1996, Human Gene Ther. 7.851-860).

Еще одним аспектом данного изобретения является способ получения рекомбинантной полимеразной, сердцевинной и/или оболочечной части с использованием векторов, инфекционных вирусных частиц и/или клеток-хозяев изобретения. Способ данного изобретения включает (а) введение вектора или инфекционной вирусной частицы изобретения в подходящую клетку-хозяина для получения трансфицированной или инфицированной клетки-хозяина, (б) культивирование *in vitro* указанной трансфицированной или инфицированной клетки-хозяина в условиях, подходящих для роста клетки-хозяина, (в) восстановление полимеразной, сердцевинной и/или оболочечной части из культуры клеток, и (г)

возможно, очистку восстановленного полипептида(ов).

Ожидается, что специалисты в данной области хорошо осведомлены о многочисленных доступных экспрессионных системах для продукции HBV-части (частей) в соответствующих клетках-хозяевах и о способах введения вектора или инфекционной вирусной частицы в клетку-хозяина. Такие способы включают, но не ограничиваясь ими, микроинъекцию (Sapochi et al., 1980, Cell 22:479), CaPO_4 -опосредованную трансфекцию (Chen and Qkayama, 1987, Mol. Cell Biol. 7:2745), DEAE-декстран-опосредованную трансфекцию, электропорацию (Chu et al., 1987, Nucleic Acid Res. 15: 1311), липофекцию/липосомное слияние (Feigner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413), бомбардировку частицами (Yang et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9568), генные пушки, трансдукцию, вирусное инфицирование, а также прямое введение в организм-хозяин с помощью различных средств.

Векторы изобретения для облегчения введения вектора в клетку-хозяина могут быть использованы в сочетании с реагентами для трансфекции, такими как поликатионные полимеры (например, хитозан, полиметакрилат, PEI (полиэтиленимин) и т.д.) и катионные липиды (например, DC-Chol/DOPE, липофектамин для трансфекции Transfectam, теперь доступный от Promega). Кроме того, как уже говорилось выше, технологии рекомбинантной ДНК могут быть использованы для повышения экспрессии нуклеиновокислотной молекулы (молекул) в клетке-хозяине или организме-хозяине, например, с помощью высококопийных векторов, замены или изменения одной или более транскрипционной регуляторной последовательности (например, промотора, энхансера и т.п.), оптимизации частоты использования кодонов в нуклеиновокислотной молекуле (молекулах) в клетке-хозяине, и супрессии негативных последовательностей, которые могут дестабилизировать траскрипт.

Клетки-хозяева данного изобретения можно культивировать в обычных ферментативных биореакторах, флаконах и, чашках Пети. Культивирование может осуществляться при температуре, рН и содержании кислорода, подходящем для данной клетки-хозяина. В данном документе не будет дано подробного описания различных способов, известных для продукции белков в прокариотических и эукариотических клетках.

HBV-часть (части) может быть очищена с помощью хорошо известных способов очистки, включая осаждение сульфатом аммония, экстракцию кислотой, гель-электрофорез; фильтрацию и хроматографические способы (например, обратно-фазовую, гель-проникающую, ионнообменную, аффинную, фосфоцеллюлозную, гидрофобных взаимодействий, гидроксиапатитную или высокоэффективную жидкостную хроматографию). Используемые условия и технология будут зависеть от таких факторов, как результирующий заряд, молекулярная масса, гидрофобность, гидрофильность, и будут очевидны специалистам в данной области. Кроме того, уровень очистки будет зависеть от предполагаемого применения.

В другом аспекте данное изобретение предусматривает композицию, содержащую по меньшей мере одну из полимеразной, сердцевинной и/или оболочечной частей, кодирующие нуклеиновокислотные молекулы, вектор(ы), инфекционные вирусные частицы или клетку-хозяина изобретения (также называемую в данном документе «активным агентом») или любую их комбинацию (например, комбинацию полипептидов или векторов/вирусных частиц, кодирующих различные HBV-части, описанные в данном документе, или комбинацию различных генотипов).

Предпочтительно, композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель в дополнение к эффективному

количеству активного агента(ов).

Соответственно, композиция изобретения включает разбавитель, подходящий для применения у человека или животного. Предпочтительно он является изотоническим, гипотоническим или слабо гипертоническим и имеет относительно низкую ионную
 5 силу. Типичные примеры включают стерильную воду, физиологический раствор (например, хлорид натрия), раствор Рингера, растворы глюкозы, трегалозы или сахарозы, раствор Хэнка и другие водные физиологически сбалансированные солевые растворы (см., например, последнее издание Remington: The Science and Practice of
 10 Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins). Композиция изобретения соответствующим образом буферизована, чтобы подходить для применения у человека, до физиологического или слабощелочного pH (например, от приблизительно pH 7 до приблизительно pH 9). Подходящие буферы включают, но не ограничиваясь ими, фосфатный буфер (например, PBS), бикарбонатный буфер и/или Трис-буфер.

Композиция также может содержать другие фармацевтически приемлемые
 15 эксципиенты для обеспечения предпочтительных фармацевтических или фармакодинамических свойств, включая, например, изменение или поддержание pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, стерильности, стабильности, скорости растворения состава, изменение или поддержание высвобождения или абсорбции в организм человека или животного, помощь в транспорте через барьер или в
 20 проникновении в тот или иной орган (например, печень). Подходящие эксципиенты включают аминокислоты.

Фармацевтически приемлемые носители, включенные в композицию изобретения, должны также позволять сохранять стабильность в условиях производства и
 25 длительного хранения (например, по меньшей мере в течение одного месяца) при замораживании (например, при -70°C, -20°C), охлаждении (например, при 4°C) или при температуре окружающей среды. В связи с этим составы, которые особенно адаптированы к композиции изобретения, включают:

- 1М сахарозу, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 54 мг/л Твина 80, 10 мМ Трис с pH 8,5 (особенно если активным агентом является аденовирусный вектор), и
- 30 - 10 мг/мл маннитола, 1 мг/мл HSA, 20 мМ Трис с pH 7,2 и 150 мМ NaCl,
- физиологический раствор.

Кроме того, композиция изобретения может включать один или более адъювант, подходящий для применения у человека системно или на слизистой. Предпочтительно адъювант способен стимулировать иммунитет к композиции изобретения, особенно Т-
 35 клеточный иммунитет, например через Toll-подобные рецепторы (TLR), такие как TLR-7, TLR-8 и TLR-9. Типичные примеры используемых адъювантов включают, но не ограничиваясь ими, алюминий, эмульсии минеральных масел, такие как полный и неполный адъювант Фрейнда (IFA), липополисахарид или его производное (Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY,
 40 p407-419), сапонины, такие как QS21 (Sumino et al., 1998, J.Virol. 72:4931; WO 98/56415), имидазо-хинолиновые соединения, такие как Imiquimod (Suader, 2000, J. Am Acad Dermatol. 43:S6), S-27609 (Smorlesi, 2005, Gene Ther. 12:1324) и родственные соединения, такие как описанные в WO 2007/147529, цитозин-фосфат-гуанозин олигодезоксинуклеотиды, такие как CpG (Chu et al., 1997, J. Exp.Med. 186:1623; Tritel et al., 2003, J. Immunol. 171:
 45 2358), и катионные пептиды, такие как 1C-31 (Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci 822:263).

Композиция данного изобретения подходит для различных режимов введения, в том числе системного, местного и локализованного введения. Инъекция может быть

выполнена с помощью любого средства, например путем подкожной, внутрисосудистой, внутримышечной, внутривенной, внутрибрюшинной, внутрипухоловой, внутрисосудистой, внутриартериальной инъекции или путем прямого введения в артерию (например, путем инфузии в печеночную артерию) или печеночную вену (например, путем инъекции в воротную вену). Инъекции могут быть выполнены с помощью обычных шприцев и игл, или с помощью любых других соответствующих устройств, доступных в данной области. Кроме того, композиция данного изобретения может быть введена через слизистую, например перорально/алиментарно, интраназально, интратрахеально, внутрилегочно, интравагинально или ректально. Введение в дыхательные пути может осуществляться посредством распыления или аэрозолизации капель, спрея или сухих порошковых композиций с помощью напорных емкостей (например, с подходящим пропеллентом, таким как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п.) или ненапорных дозаторов. Местное введение также может быть выполнено с использованием трансдермальных средств (например, пластырей и т.п.). В контексте изобретения предпочтительная композиция составлена для внутримышечного и подкожного путей.

Композиция изобретения может быть в различных формах, например твердой, жидкой или замороженной. Твердые (например, сухие порошковые или лиофилизированные) композиции могут быть получены в процессе, включающем вакуумную сушку и сублимационную сушку. Для введения через слизистую композиции могут быть составлены как гастрорезистентные капсулы и гранулы для перорального приема, суппозитории для ректального или вагинального введения, наконец, в сочетании с усилителями абсорбции, используемыми для увеличения размера пор слизистых оболочек. Такие усилители абсорбции, как правило, представляют собой вещества, имеющие структурное сходство с фосфолипидными областями слизистых оболочек, например дезоксихолат натрия, гликохолат натрия, диметил-бета-циклодекстрин, лаурил-1-лизофосфатидилхолин).

Подходящая дозировка может быть адаптирована в зависимости от различных параметров, в частности, от способа введения; используемой композиции; возраста, состояния здоровья и веса организма-хозяина; характера и степени проявления симптомов; вида одновременного лечения; частоты лечения; и/или необходимости профилактики или лечения. Дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения соответствующей дозировки для лечения, проводится стандартным образом врачом с учетом соответствующих обстоятельств. В качестве общего руководства, подходящая доза композиции, содержащей вирус, варьирует от примерно 10^5 до примерно 10^{13} vp (вирусных частиц), iu (инфекционных единиц) или pfu (бляшкообразующих единиц) в зависимости от используемого вектора и методик количественной оценки. Методики, доступные для оценки количества vp, iu и pfu, присутствующих в образце, являются стандартными в этой области. Например, количество аденовирусных частиц (vp) обычно определяют путем измерения абсорбции при A260, титры iu оценивают путем количественной иммунофлуоресценции DBP, а pfu путем подсчета количества бляшек после инфицирования пермиссивных (чувствительных) клеток. Предпочтительно, соотношение vp/iu составляет менее 100 в соответствии с принципами FDA. Дозы от примерно 5×10^5 до примерно 10^9 pfu являются предпочтительными для основанной на MVA композиции, с особым предпочтением доз примерно 10^7 , примерно 5×10^7 , примерно 10^8 или примерно 5×10^8 pfu. Что касается композиций на основе Ad, предпочтительные дозы включают от 10^6

до 10^{12} вр, с особым предпочтением доз примерно 10^9 , примерно 5×10^9 , примерно 10^{10} , примерно 5×10^{10} или примерно 10^{11} вр. Композиция на основе векторных плазмид может быть введена в дозах от 10 мкг до 20 мг, предпочтительно от 100 мкг до 2 мг. Белковая композиция может быть введена в одной или более дозах от 10 нг до 20 мг, с особым предпочтением дозировки от примерно 0,1 мкг до примерно 2 мг терапевтического белка на кг массы тела. Введение можно проводить в виде разовой дозы или дозы, повторяющейся один или несколько раз через определенный промежуток времени.

Композиция изобретения может быть использована в способах лечения различных заболеваний и патологических состояний, особенно тех, которые вызваны или связаны с HBV-инфекцией. Используемый в данном документе термин «лечение» включает профилактику и/или терапию. Особенно он используется для лечения хронической HBV-инфекции и/или поражений печени у HBV-инфицированных пациентов, включая цирроз и рак печени. Предпочтительно, при введении в организм хозяина в соответствии с порядком, изложенным в данном документе, композиция изобретения обеспечивает терапевтическое улучшение для подвергающегося лечению хозяина по сравнению с состоянием до лечения. Терапевтическое улучшение может быть доказано несколькими способами, например, снижением вирусной нагрузки HBV, выявленной в крови, плазме, сыворотке или печени инфицированного субъекта, и/или выявлением анти-HBV-иммунного ответа (например, продукции анти-HBV-антител и/или Т-клеточного иммунитета), или замедлением развития симптомов, связанных с HBV-инфекцией (например, задержкой развития цирроза печени или рака), или уменьшением состояния воспаления/стеатоза/фиброза печени, обычно связанного с HBV-инфекцией, или улучшением реакции индивидуума на стандартные способы лечения.

Соответственно, данное изобретение также предусматривает применение по меньшей мере одной из HBV-частей, нуклеиновокислотных молекул, векторов, инфекционных вирусных частиц, клеток-хозяев или композиций изобретения для изготовления препарата, предназначенного для лечения или профилактики HBV-инфекции, HBV-ассоциированных заболеваний и патологических состояний в соответствии с порядком, изложенным в данном документе.

Данное изобретение также предусматривает способ лечения или профилактики HBV-инфекции, в частности хронической HBV-инфекции, HBV-ассоциированных заболеваний и патологических состояний, который включает введение в организм человека или животного, нуждающегося в этом, терапевтически эффективного количества по меньшей мере одной из HBV-частей, нуклеиновокислотных молекул, векторов, инфекционных вирусных частиц, клеток-хозяев или композиций изобретения.

Способ или применение изобретения включает одно или более введения (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и т.д.) терапевтически эффективного количества указанного активного агента (агентов), при этом указанные введения отделены друг от друга соответствующим промежутком времени и осуществляются одним и тем же или различными путями введения (например, внутримышечным и подкожным путем), в одно и то же или в разные места. Три введения, отделенные друг от друга промежутком времени от 3 до 10 дней (например, три еженедельных введения), особенно подходят для композиций и вектора (векторов) на основе MVA. За этой первой серией введений может следовать одно или более последующих введений с применением тех же активных агентов (агента), которые могут осуществляться в течение одного или нескольких месяцев, чтобы вызвать анти-HBV-иммунный ответ, начатый тремя последовательными введениями. Что касается композиций и вектора(ов) на основе Ad, предпочтительный способ или

применение включает одно введение, за которым в конце концов следует одно или два последующих введения через один месяц или шесть месяцев.

При необходимости способ или применение изобретения может быть осуществлено в сочетании с одним или более традиционным терапевтическим способом (например, радиацией, химиотерапией и/или хирургическим вмешательством). Применение множественных терапевтических подходов предусматривает пациента с более широким вмешательством. В одном воплощении способ изобретения может следовать до или после хирургического вмешательства. В другом воплощении он может следовать до или после лучевой терапии (например, гамма-излучения). Специалисты в данной области смогут легко разработать соответствующие протоколы лучевой терапии и используемые параметры (см., например, Perez and Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed, JB Lippincott Co; с использованием соответствующих адаптации и изменений, которые будут очевидны специалистам в данной области).

В еще одном воплощении способ или применение изобретения связаны с химиотерапией одним или более HBV-препаратами, которые обычно используются для лечения или профилактики HBV-инфекций, HBV-ассоциированных заболеваний и патологических состояний. Их введение может предшествовать, сопутствовать или следовать за введением активного агента, используемого в изобретении. Типичные примеры HBV-препаратов включают, но не ограничиваясь ими, ингибиторы полимеразы, ингибиторы РНКазы Н, нуклеозидные аналоги, нуклеотидные аналоги, TLR-агонисты, ингибиторы N-гликозилирования, миРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, анти-HBV-антитела, иммуномодуляторы, терапевтические вакцины и противоопухолевые агенты, которые обычно используются в лечении HBV-ассоциированных раков печени (например, адриамицин, адриамицин с липиодолом или сорафенибом). Примеры подходящих терапевтических вакцин включают, но не ограничиваясь ими, рекомбинантные антигены, вирус-подобные частицы, векторы или синтетические пептиды, основанные на HBV-белках или кодирующие их (core, preS1, preS2, S и/или полимеразы), которые особенно подходят для запуска анти-HBV гуморального иммунного ответа. Такие HBV-препараты могут быть предоставлены в виде разовой дозы или, наоборот, в множественных дозах в соответствии со стандартными протоколами, дозировками и схемами на несколько часов, дней и/или недель. Особенно подходящий способ или применение изобретения используется в сочетании со стандартной медицинской помощью, которая может следовать раньше, параллельно или последовательно со способом или применением изобретения. Хотя такой стандарт лечения может изменяться от пациента к пациенту, он обычно включает лечение цитокинами (например, IFN α , пегилированным IFN α 2) и/или нуклеотидными или нуклеозидными аналогами, такими как ламивудин, энтекавир, телбивудин, адефовир, дипивоксил или тенофовир.

В другом воплощении способ или применение изобретения осуществляется в соответствии с терапевтическим способом первого бустирования, который включает последовательное введение одной или более начальной композиции и одной или более бустирующей композиции. Как правило, начальные и бустирующие композиции используют различные носители, которые содержат или кодируют по меньшей мере антигенный домен в целом. Кроме того, начальные и бустирующие композиции могут быть введены в одно и то же место или в альтернативные места одним и тем же или различными путями. Например, композиции на основе полипептида можно вводить через слизистую, в то время как композиции на основе векторов предпочтительно вводить, например, путем подкожных инъекций для вектора МВА, внутримышечных

инъекций для ДНК-плазмид и подкожных или внутримышечных инъекций для аденовирусного вектора.

Данное изобретение также предусматривает способ индукции или стимуляции иммунного ответа против HBV в организме хозяина, включающий введение в указанный организм по меньшей мере одной из HBV-частей, нуклеиновокислотных молекул, векторов, инфекционных вирусных частиц, клеток-хозяев или композиций изобретения, таким образом индуцируя или стимулируя указанный иммунный ответ. Иммунный ответ может быть специфическим и/или неспецифическим, гуморальным и/или клеточным, и в этом контексте он может быть опосредован CD4+ или CD8+, или обоими. Иммунный ответ предпочтительно является Т-клеточным ответом, направленным против HBV-антигена.

Способность способа изобретения индуцировать или стимулировать анти-HBV иммунный ответ при введении в организм животного или человека может быть оценена *in vitro* или *in vivo* с помощью различных анализов, стандартных в данной области. Для общего описания доступных методик оценки возникновения и активации иммунного ответа, см., например, Coligan et al. (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health). Оценка клеточного иммунитета может быть выполнена путем оценки профилей цитокинов, секретируемых активированными клетками-эффекторами, в том числе произошедшими из CD4+ и CD8+ Т-клеток (т.е. путем количественной оценки IL-10-или IFN γ -продуцирующих клеток путем ELISpot), путем определения статуса активации иммунных клеток-эффекторов (например, в анализе пролиферации Т-клеток классическим поглощением [3 H]-тимидина), путем анализа на антиген-специфические Т-лимфоциты у сенсibilизированного субъекта (например, пептид-специфический лизис в анализе цитотоксичности). Способность стимулировать гуморальный ответ можно определить путем связывания антитела и/или конкуренции в связывании (см., например, Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press). Способ изобретения также может быть дополнительно подтвержден на животных моделях с соответствующими инфекционными или вызывающими опухоли агентами (например, вирусом осповакцины или бактерией *Listeria monocytogenes*, экспрессирующей генные продукты HBV), чтобы определить нейтрализацию инфекционного и вызывающего опухоль агента и, в конечном счете, частичную устойчивость к сопутствующим симптомам, отражающим индукцию или увеличение анти-HBV иммунного ответа. Тестирование и проверка композиций изобретения также показаны в прилагаемом разделе Пример.

В другом аспекте изобретение предусматривает набор для применения в лечении и профилактике HBV-инфекций, в том числе хронической HBV-инфекции, HBV-ассоциированных заболеваний и патологических состояний, в соответствии с порядком, изложенным в данном документе, и, в частности, для индукции или развития иммунного ответа у субъекта, инфицированного HBV, где указанный набор включает множество активных агентов, выбранных из группы, состоящей из HBV-частей, нуклеиновокислотных молекул, векторов, инфекционных вирусных частиц, клеток-хозяев или композиций, описанных в данном документе.

Предпочтительно, указанное множество активных агентов содержится в форме отдельных полипептидов или отдельных векторов, и введение каждого из активных агентов может происходить одновременно (в одно и то же время) или по отдельности (один после другого через определенный промежуток времени), одним и тем же или различными путями введения, в одно и то же место (или в непосредственной близости) или в различные места, и с использованием одних и тех же или различных доз.

Особый интерес в данном изобретении представляет собой набор, который включает первый вектор, содержащий нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую полимеразную часть, определенную в данном документе, и второй вектор, содержащий нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую сердцевинную и/или оболочечную части, определенные в данном документе.

В соответствии с предпочтительным воплощением указанный первый вектор является MVA-вектором, содержащим нуклеиновокислотную молекулу, которая находится под контролем промотора вируса осповакцины, такого как промотор 7.5K, и кодирует полимеразную часть, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №7, 8 или 9 или в SEQ ID №7 с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His; а указанный второй вектор является MVA-вектором, содержащим нуклеиновокислотную молекулу, которая находится под контролем промотора вируса осповакцины, такого как промотор pH5 г, и кодирует сердцевинную и/или оболочечную части, включающие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №18 или 19.

В соответствии с другим предпочтительным воплощением указанный первый вектор является аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновокислотную молекулу, которая находится под контролем подходящего промотора, такого как CMV-промотор, и кодирует полимеразную часть, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №7 или SEQ ID №8 или SEQ ID №7 с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His; а указанный второй вектор является аденовирусным вектором, содержащим нуклеиновокислотную молекулу, которая находится под контролем подходящего промотора, такого как CMV-промотор, и кодирует сердцевинную и/или оболочечную части, включающие аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID №18, 19, 20 или часть SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 251 (core-env1-env2), или часть SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 221 (core-env1).

Набор данного изобретения может также содержать третий вектор, экспрессирующий иммуномодулятор, как указано выше. Для наглядности, предпочтительные дозы каждого активного ингредиента, входящего в набор, являются дозами того же порядка, что и описанные выше в связи с композицией изобретения, с особым предпочтением дозы от 5×10^5 до 10^9 pfu для каждого поксвирусного или MVA-вектора и от 10^6 до 10^{12} vp для каждого аденовирусного вектора.

Изобретение также предусматривает антитела, которые селективно связываются с HBV-частями, используемыми в данном изобретении, или их пептидными фрагментами. Используемое в данном документе антитело селективно связывает целевой пептид, при этом он связывает целевой пептид и по существу не связывает неродственные белки. В некоторых случаях будет понятно, что антитело, связывающееся с пептидом, по-прежнему селективно, несмотря на некоторую степень перекрестной реактивности. Тем не менее, предпочтительно, чтобы антитело изобретения не связывалось с высокой аффинностью и высокой селективностью с нативным белком HBV.

Используемое в данном документе антитело определяется в соответствии с условиями, признанными в данной области. Антитела данного изобретения включают поликлональные антитела и моноклональные антитела, а также фрагменты таких антител, в том числе, но не ограничиваясь ими, Fab или F(ab)'.sub.2, и Fv-фрагменты. Антитела данного изобретения могут быть получены с использованием стандартных в данной области методик, например после введения животному эффективного количества любой из HBV-частей, описанных в данном документе, и/или их пептидного

фрагмента. Антитела предпочтительно получают из областей или дискретных фрагментов HBV-частей, включающих уникальные последовательности, такие как описанные в данном документе направленные на изменения и введенные в нативные белки HBV.

5 Антитела данного изобретения имеют множество потенциальных применений, которые входят в сферу данного изобретения. Например, такие антитела могут быть использованы (а) в качестве реагентов в анализах для обнаружения первого или второго полипептидов данного изобретения, (б) в качестве реагентов в анализах для обнаружения присутствия HBV в биологическом образце, и/или (в) в качестве инструмента для
10 восстановления рекомбинантно-полученных HBV-частей из смеси белков и других загрязняющих веществ (например, проводя очистку путем афинной хроматографии или иммунопреципитации из культивированных клеток-хозяев).

Данное изобретение также относится к способу обнаружения и/или количественной оценки вируса HBV или анти-HBV-антитела в биологическом образце (например, плазме,
15 сыворотке, ткани), взятом от индивидуума, чувствительного к заражению указанным вирусом HBV, с использованием по меньшей мере одной из HBV-частей нуклеиновокислотных молекул, векторов, инфекционных вирусных частиц, клеток-хозяев, композиций или антител изобретения.

В одном воплощении способ особенно подходит для обнаружения и/или
20 количественной оценки вируса HBV в биологическом образце и включает по меньшей мере этап контактирования указанного биологического образца по меньшей мере с одним антителом изобретения в условиях, позволяющих формировать комплекс между вирусом и антителом, и этап обнаружения и/или количественной оценки образования указанного комплекса любым подходящим способом.

В другом воплощении этот способ особенно подходит обнаружения и/или
25 количественной оценки анти-HBV-антитела в биологическом образце и включает по меньшей мере этап контактирования указанного биологического образца по меньшей мере с одной из HBV-частей, нуклеиновокислотных молекул, векторов, инфекционных вирусных частиц, клеток-хозяев, композиций изобретения в условиях, позволяющих
30 формировать комплекс между анти-HBV-антителом и HBV-частью, нуклеиновокислотной молекулой, вектором, инфекционной вирусной частицей, клеткой-хозяином, композицией, и этап обнаружения и/или количественной оценки образования указанного комплекса любым подходящим способом.

Специалисту в данной области легко будет определить количество антитела, HBV-
35 части, нуклеиновокислотной молекулы, вектора, инфекционной вирусной частицы, клетки-хозяина, композиции, которое будет использоваться в способах изобретения. Средства обнаружения и/или количественной оценки вируса являются стандартными и хорошо известны специалистам в данной области. В качестве примера можно отметить блоты, ИФА, так называемые сэндвич-методики, конкурентные методики и ПЦР-
40 методики, в частности так называемые методики «в реальном времени». Применение антитела, HBV-части, нуклеиновокислотной молекулы, вектора, инфекционной вирусной частицы, клетки-хозяина или композиции данного изобретения в качестве реагента может быть облегчено путем связывания (например, физического соединения) с обнаруживаемым веществом. Примеры обнаруживаемых веществ включают различные
45 ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу и ацетилхолинэстеразу), простерические группы (например, стрептавидин/биотин или авидин/биотин), флуоресцентные материалы (например, умбеллиферон, флуоресцеин или производные флуоресцеина), люминесцентные материалы, биолюминесцентные

материалы (например, люциферазу, люциферин или экворин) и радиоактивные материалы (например, ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S или ^3H).

Наконец, изобретение относится к применению по меньшей мере одной из HBV-частей, нуклеиновокислотных молекул, векторов, инфекционных вирусных частиц, клеток-хозяев, композиций или антител изобретения для диагностики HBV-инфекции в биологических образцах *in vitro*.

Изобретение было описано в иллюстративной манере, и необходимо понимать, что используемая терминология обозначает характер описываемого, а не ограничивает его. Очевидно, что в свете вышеизложенных учений возможны многие модификации и вариации данного изобретения. Поэтому следует понимать, что в рамках формулы изобретения изобретение может быть осуществлено другим путем, отличающимся от того, который конкретно описан в данном документе.

Все приведенные выше раскрытия патентов, публикаций и позиции в базе данных конкретно включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте в той же степени, как если бы о каждом таком отдельном патенте, публикации или позиции было конкретно и индивидуально сказано, что они включены посредством ссылки.

Графические материалы

На фиг.1 показана экспрессия HBV-полипептида клетками, инфицированными аденовирусом и MVA. Клетки A549 или фибробласты куриного эмбриона инфицировали аденовирусом с MOI 10 или 50 или MVA с MOI 0,2 или 1, и через 48 часов после инфицирования клетки лизировали. Затем проводили вестерн-блоттинг с клеточными лизатами, полученными из клеток, инфицированных различными конструкциями Ad (фиг.1А) и MVA (фиг.1 В) для обнаружения специфических HBV-белков. Полипептиды, содержащие сердцевину, обнаруживали с помощью анти-Core-антитела (C1-5 или 13A9, разведение 1/200), а полипептиды, содержащие полимеразу, с помощью анти-Po1-антитела (8D5, разведение 1/200) в качестве первичных антител, а вторичные антитела были связаны с HRP. Ожидаемый размер белков, экспрессируемых Ad TG17909 и Ad TG17910, составлял соответственно 31,6 кДа и 88,5 кДа. Ожидаемые размеры белков, экспрессируемых MVA TG17971, MVA TG17972, MVA TG17993 и MVA TG17994, составляли соответственно 20,2 кДа, 15,8 кДа, 20 кДа и 23,5 кДа. Ожидаемые размеры белков, экспрессируемых MVA TG17842 и MVA TG17843, составляли соответственно 88,5 кДа и 98,2 кДа.

На фиг.2 показана иммуногенность HBV-полипептидов, кодируемых аденовирусом, в анализе Elispots IFN γ . Пять отдельных мышей (HLA-A2-трансгенных мышей) иммунизировали один раз либо только Ad TG17909 (черные столбцы), либо только Ad TG17910 (белые столбцы), либо сочетанием (Ad TG17909 + Ad TG17910) (серые столбцы). На фиг.2А показаны специфические Т-клеточные реакции, направленные на полимеразный белок с использованием HLA-A2-рестриктированного пептида SLY (SEQ ID №55) или нерелевантного пептида (не показан). На фиг.2В показаны специфические Т-клеточные реакции, направленные на сердцевинный белок, с помощью H1-A-A2-рестриктированных пептидов FLP (SEQ ID №56) или ILC (SEQ ID №57). На фиг.2С показаны специфические Т-клеточные реакции, направленные на оболочечные области, с помощью HLA-A2-рестриктированных пептидов VLQ (SEQ ID №58), FLG (SEQ ID №59) или GLS (SEQ ID №60). Каждый столбец представляет собой отдельную вакцинированную мышь, а заштрихованные столбцы представляют собой среднее значение для каждой группы. Результаты представлены как среднее значение числа пятен, наблюдаемых на 10^6 клеток селезенки, полученных из трех повторов лунок.

Ответ считался положительным, если число пятен было больше 50 на 10^6 клеток (эта отсечка представлена как толстая черная линия).

На фиг.3 показана иммуногенность HBV-полипептидов, кодируемых аденовирусным вектором, в анализе внутриклеточного окрашивания цитокинов. Пять отдельных мышей (HLA-A2-трансгенных мышей) иммунизировали один раз либо только Ad TG17909 (фиг.3B), либо только Ad TG17910 (фиг.3A), либо сочетанием Ad TG17909 + Ad TG17910 (фиг.3C). Спленоциты культивировали в течение 5 часов с Golgi-Plug и в присутствии каждого из HLA-A2-рестриктированных пептидов (SLY для Pol, FLP, ILC для Core, VLQ, FLG и GLS для Env) или нерелевантного пептида. Процент CD8+ клеток, продуцирующих цитокины (IFN γ и/или TNF α), специфичные для каждого HLA-A2-рестриктированного эпитопа, оценивали в анализе ICS. Каждый столбец представляет собой отдельную вакцинированную мышь, при этом клетки, продуцирующие IFN γ , показаны черным столбцом, клетки, продуцирующие TNF α , показаны белым столбцом, а клетки, продуцирующие и IFN γ , и TNF α , показаны заштрихованным столбцом, и все эти клеточные популяции сложены для каждой мыши.

На фиг.4 показана способность HBV-полипептидов, кодируемых аденовирусным вектором, индуцировать CD8+ и CD4+ Т-клеточные ответы, выявляемые в анализе внутриклеточного окрашивания цитокинов. Пять отдельных мышей (HLA-A2-трансгенных мышей) иммунизировали один раз смесью Ad TG17909 и Ad TG17910. Спленоциты культивировали в течение 5 часов с Golgi-Plug и в присутствии каждого из HLA-A2-рестриктированных пептидов (SLY для Pol, FLP, ILC для Core, VLQ, FLG и GLS для Env) или пула перекрывающихся пептидов (15 аминокислотных, перекрывающихся на 11 аминокислот, 2 пула пептидов для Core и 2 пула пептидов для Env), охватывающих все области антигена, или нерелевантного пептида. Индуцированные специфические CD8+ Т-клетки, продуцирующие IFN γ и/или TNF α (фиг.4A), и индуцированные специфические CD4+ Т-клетки, продуцирующие IFN γ и/или TNF α (фиг.4B) или продуцирующие IFN γ и/или IL2 (фиг.4C), наблюдали в анализе ICS. Каждый столбец представляет собой отдельную вакцинированную мышь, при этом клетки, продуцирующие IFN γ , показаны серым столбцом, клетки, продуцирующие TNF α или IL2, показаны белым столбцом, а клетки, продуцирующие IFN γ +TNF α или IFN γ +IL2, показаны заштрихованным столбцом, и все эти клеточные популяции сложены для каждой мыши. Также показано среднее значение для каждой группы.

На фиг.5 показана способность аденовирусного вектора, кодирующего HBV-полипептиды, индуцировать *in vivo* функциональный цитолиз против клеток-мишеней, нагруженных HBV HLA-A2-рестриктированными эпитопами. Трех отдельных мышей (H1A-A2-трансгенных мышей) иммунизировали один раз сочетанием Ad TG17909 и Ad TG17910 (M1-M3), а одну мышь иммунизировали один раз пустым аденовирусным вектором в качестве отрицательного контроля (MO). CFSE-меченые спленоциты от сингенных мышей, нагруженные HBV HLA-A2-эпитопами или без них (отрицательный контроль), вводили внутривенно вакцинированным мышам. Лизис меченых клеток *in vivo* оценивали для каждой мыши через 24 часа путем проточной цитометрии и рассчитывали, как указано в разделе Материалы и методы. Среднее значение специфического лизиса, наблюдаемого для каждого пептида на трех мышах, вакцинированных AdHBV, рассчитано и показано (среднее M1-M3).

На фиг.6 показана иммуногенность HBV-полипептидов, кодируемых MVA-вектором, определяемая в анализе Elispots IFN γ . Отдельных мышей (HLA-A2-трансгенных мышей) иммунизировали три раза с недельным интервалом либо MVA TG17842, либо MVA TG17843 (фиг.6A), либо MVA TG17971 (фиг.6B), либо MVATG17972, либо отрицательным

контролем MVA TGN33.1 (данные не представлены). На фиг.6А показаны специфические Т-клеточные реакции против полимеразного белка после иммунизации MVA TG17842 (темно-серые столбцы) или MVA TG17843 (светло-серые столбцы), с использованием HLA-A2-рестриктированного пептида SLY (SEQ ID №55), пула из 8 пептидов, покрывающих С-концевую часть полимеразного белка (25 пептидов из 15 аминокислот с перекрытием на 11 аминокислот/пул), нерелевантного пептида или среды (отрицательные контроли). На фиг.6В показаны специфические Т-клеточные реакции против сердцевинного белка после иммунизации MVA TG17971, с использованием HLA-A2-рестриктированного пептида FLP (SEQ ID №56), ILC (SEQ ID №57), пептидных пулов «core 1 и core 2» (21-22 пептида из 15 аминокислот с перекрытием на 11 аминокислот/пул), нерелевантного пептида или среды (отрицательные контроли). Каждый столбец представляет собой отдельную вакцинированную мышь, а заштрихованные столбцы представляют собой среднее значение для каждой группы. Результаты представлены как среднее значение числа пятен, наблюдаемых на 10^6 клеток селезенки, полученных из трех повторов лунок. Ответ считался положительным, если число пятен было больше 50 на 10^6 клеток (эта отсечка представлена как пунктирная черная линия).

На фиг.7 показана иммуногенность HBV-полипептидов, кодируемых MVA-векторами, одновременно введенными мыши, которая определена в анализах Elispots IFN γ . Отдельных мышей (HLA-A2-трансгенных мышей) иммунизировали три раза с недельным интервалом смесью MVA TG17843 и либо MVA TG 17972 (фиг.7А), либо MVA TG17993 (фиг.7В), либо MVATG 17994 (фиг.7С), либо только MVA TG N33.1 в качестве отрицательного контроля (данные не представлены). Специфические Т-клеточные реакции против полимеразного белка выявляли с помощью HLA-A2-рестриктированного пептида SLY (SEQ ID №55), а специфические Т-клеточные реакции против оболочечных частей с помощью HLA-A2-рестриктированного пептида GLS (SEQ ID №60) или пула пептидов, охватывающих область env2 (пул из 15-аминокислотных пептидов с перекрытием на 11 аминокислот). Нерелевантный пептид и среда использовались в качестве отрицательных контролей. Каждый столбец представляет собой отдельную вакцинированную мышь, а заштрихованные столбцы представляют собой среднее значение для каждой группы. Результаты представлены как среднее значение числа пятен, наблюдаемых на 10^6 клеток селезенки, полученных из трех повторов лунок. Ответ считался положительным, если число пятен было больше 92 на 10^6 клеток (эта отсечка представлена как пунктирная черная линия).

Примеры 1. Материалы и методы

Конструкции, описанные ниже, осуществляются в соответствии с общими методиками генетической инженерии и молекулярного клонирования, которые подробно описаны в Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY), или в соответствии с рекомендациями изготовителя, если используются коммерческие наборы. Методики ПЦР-амплификации известны специалистам в данной области (см., например, PCR. protocols -A guide to methods and applications, 1990, опубликованный Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press). Рекомбинантные плазмиды, несущие ген устойчивости к ампициллину, реплицируются в E.coli C600 (Stratagene) на агаре или в жидкой среде, дополненной 100 мкг/мл антибиотика. Конструкции рекомбинантных вирусов осповакцины осуществляются в соответствии со стандартной в данной области технологией, описанной в приведенных выше документах, а также в Mackett et al. (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) и Mackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864). Ген селекции gpt (ксантин-гуанин-

фосфорибозилтрансферазы) E.coli (Falkner and Moss, 35 1988, J. Virol. 62, 1849-185) используется для облегчения отбора рекомбинантных вирусов осповакцины.

1.1. Векторные конструкции и продукция

1.1.1. Выбранные антигены и последовательность штамма HBV Векторы, приведенные
5 далее в качестве примера, были разработаны для экспрессии полимеразы, сердцевинных полипептидов и иммуногенных областей оболочечного белка. Все они происходят из штамма HBV Y07587, последовательность которого описана в международных базах данных (Genbank Y07587) и в различных публикациях. Это вирус генотипа D серотипа ауw.

10 Серцевинный полипептид является либо полипептидом дикого типа (АК 1-183), либо сердцевинным полипептидом с удалением аминокислот с 77 по 84 (т.е. сердцевинным белком, содержащим аминокислоты с 1 по 76 и с 85 по 183 и обозначенным Core*), либо усеченным с С-конца полипептидом (1-148) или усеченным с С-конца сердцевинным белком (1-148), в котором также удалены аминокислоты с 77
15 по 84 (т.е. сердцевинным белком, содержащим аминокислоты с 1 по 76 и с 85 по 148 и обозначенным core*t).

Полимеразный полипептид является либо полипептидом дикого типа, либо усеченным с М-конца полипептидом, в котором отсутствуют первые 47 аминокислот (48-832), либо усеченной с М-конца полимеразой (48-832), также мутированной в позиции 540
20 (D на H) и 718 (E на H) (позиции 450 и 718 даны по отношению к полимеразе дикого типа), либо усеченной (48-832) и мутированной полимеразой (D540H и E718H), которая слита с сигнальным пептидом и трансмембранной областью из гликопротеина вируса бешенства (Pol*ТМR).

Выбранными областями оболочечного белка являются: область из аминокислот с
25 14 по 51 S-белка (env1), область из аминокислот со 165 по 194 HBs-белка (env2) и область из аминокислот с 202 по 226 HBs-белка (env4).

1.1.2. Конструирование и продукция MVA TG 17842, экспрессирующего усеченную и мутированную HBV-полимеразу (Pol*)

Нуклеотидные последовательности, кодирующие модифицированный полипептид
30 HBV-полимеразу, синтезированы компанией Geneart с помощью синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-продуктов. Модифицированная HBV-полимераза соответствует полимеразному белку HBV Y07587 (SEQ ID №1), мутированному в позициях 540 (D в H) и 718 (E в H) для устранения активностей РНКазы H и ОТазы, которые демонстрирует нативная HBV-полимераза (полученная аминокислотная
35 последовательность показана в SEQ ID №8, а нуклеотидная последовательность показана в SEQ ID №22). Заново собранную последовательность Pol клонировали в плазмидный вектор, получив PGA15-Pol (SEQ ID №27). Усеченную версию с удалением первых 47 аминокислот, присутствующих на М-конце нативной HBV-полимеразы, амплифицировали с помощью ПЦР из плазмиды pGA15-Pol с использованием следующих
40 праймеров: OTG19037 (GAGCGATATCCACCATGAATGTTAGTATTCCTTGGAC) (SEQ ID №28) и OTG 19038 (GATCGCTAGCTCACGGTGGTCTCCATGCGAC) (SEQ ID №29). Полученный фрагмент вставляли в MVA-плазмиду для переноса по сайтам рестрикции NheI и EcoRV после промотора p7.5K (Cochran et al., 1985, J. Virol. 54:30), получая pTG 17842. Мутированная и усеченная полимеразы обозначаются в дальнейшем как pol*.

45 MVA-плазида для переноса предназначена для обеспечения вставки нуклеотидной последовательности, которую нужно перенести путем гомологичной рекомбинации в делецию III генома MVA. Она получена из плазмиды pTG1E (описанной в Braun et al., 2000, Gene Ther. 7:1447), в которую клонировали фланкирующие последовательности

(BRG3 и BRD3) по сторонам от делеции III MVA (Sutler and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847). Плазмида для переноса содержит также гибрид улучшенного зеленого флуоресцентного белка (гена eGFP, выделенного из pEGP-C1, Clontech) *Aequorea victoria* и гена ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (гена gpt) под контролем синтетического раннего/позднего промотора вируса осповакцины p11K7.5 (любезно предоставленного R. Wittek, Лозаннский университет). Синтез ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы позволяет СРТ+-рекомбинантному MVA формировать бляшки на селективной среде, содержащей микофеноловую кислоту, ксантин и гипоксантин (Falkner et al., 1988, J. Virol. 62, 1849-54), а ген eGFP позволяет визуализировать бляшки с рекомбинантным MVA. Селектируемый маркер eGFP-GPT находится между двумя гомологичными последовательностями в одинаковой ориентации. Когда клональная селекция проведена, селектируемый маркер легко устраняют путем нескольких пассажей без селекции, позволяя расти eGFP-GPT-рекомбинантному MVA.

Создание вируса MVA TG 17842 выполняли путем гомологичной рекомбинации в первичных фибробластах куриных эмбрионов (СЕР), инфицированных MVA и трансфицированных рТГ 17842 (в соответствии со стандартным осаждением ДНК фосфатом кальция). Вирусную селекцию выполняли, проводя три цикла клонирования методом бляшкообразования в селективной среде, содержащей микофеноловую кислоту, ксантин и гипоксантин. Как уже упоминалось выше, селектируемый маркер затем устраняли путем пассажа в неселективной среде. Отсутствие контаминации родительским MVA проверяли с помощью ПЦР.

Анализ экспрессии HBV-полимеразы проводили путем вестерн-блоттинга. Клетки A549 (ATCC CCL-185) инфицировали MVATG 17842 (Pol*) с MOI 1 в присутствии протеосомного ингибитора MG-132 (10 мкМ), добавленного в ростовую среду, или в его отсутствие. Через 24 часа клетки собирали. Анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Pol-антитела Нер В Pol (8D5, Санта-Крус, №sc-81591).

1.1.3. Конструирование и продукция MVA TG17843, экспрессирующего усеченную и мутированную HBV-полимеразу, слитую с заякоренной в мембране областью гликопротеина оболочки вируса бешенства (Pol*ТМR)

Затем последовательность HBV Pol* модифицировали путем слияния его N-конца с сигнальным пептидом (SS) и его C-конца с заякоренной в мембране последовательностью (TMR), полученными из гликопротеина вируса бешенства (изолят ERA; описан в Genbank №M38452). Последовательности SS и TMR амплифицировали из плазмиды рТГ8042 (описанной в WO 99/03885) путем ПЦР с использованием, соответственно, пар праймеров OTG19045 (SEQ ID №30) (GAGTGATATCCACCATGGTTCCTCAGGCTCTCCTG)/OTG 19047 (SEQ ID №31) (GTCCAAGGAATACTAATTAATAGGGAATTTCCCAAAACACAATG) и OTG 19049 (SEQ ID №32) (GTCGCATGGAGACCACCGTATGTATTACTGAGTGCAGGG/OTG 19050 (SEQ ID №33) (GAGTGCTAGCTCACAGTCTGGTCTCACCC). Последовательность Pol* амплифицировали из плазмиды рGA15-Pol путем ПЦР с использованием пары праймеров OTG19046 (SEQ ID №34) (GTTTTGGGAAATTCCTATTAAATGTTAGTATTCCTTGGACTC)/OTG 19048 (SEQ ID №35) (CTGCACTCAGTAATACATACGGTGGTCTCCATGCGACGTGC). Затем последовательность SS-Pol*-TMR собирали посредством тройной ПЦР с использованием следующих праймеров: OTG19045 (SEQ ID №30) и OTG19050 (SEQ ID №33). Полученный фрагмент вставляли в плазмиду для переноса, полученную из вируса осповакцины, по сайтам рестрикции NheI и EcoRV после промотора p7.5K (Cochran et

al., 1985, J. Virol. 54:30), получая pTG17843.

Создание вируса MVA TG 17843 выполняли в CEF путем гомологичной рекомбинации, как описано выше.

Анализ экспрессии Pol*-TMR проводили путем вестерн-блоттинга. Клетки A549
 5 инфицировали MVA TG17843 с MOI 1 в присутствии протеасомного ингибитора MG-132 (10 мкМ), добавленного в ростовую среду, или в его отсутствие. Через 24 часа клетки собирали. Анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Pol-антитела Нер В Pol (8D5, Санта-Крус, №sc-81591).

1.1.4 Конструирование и продукция MVA TG17971, экспрессирующего сердцевинный
 10 полипептид с делецией (Core*)

Core* соответствует последовательности Core от HBV Y07587 (SEQ ID №2) с удалением аминокислот с 77 по 84.

Последовательности, кодирующие Core*, создавали путем двойной ПЦР на плазмиде pGA4-Core. Эта плазида была сделана компанией Geneart. Она содержала кодирующую
 15 последовательность полной длины модифицированного гена HBV Core, который был собран из синтетических олигонуклеотидов и/или ПЦР-продуктов. Последние два кодона САА TGT кодирующей последовательности были модифицированы таким образом, чтобы избежать гомологии последовательности с Pol (SEQ ID №36).

Последовательность Core от позиции 1 до 76 амплифицировали путем ПЦР с
 20 использованием следующих праймеров: OTG19290 (SEQ ID №37) (GACTGTTAACCACCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTTG) и OTG 19292 (SEQ ID №38) (GTTGACATAACTGACTACCAAAATTACCACCCACCCAGGTAG).

Последовательность Core с позиции 85 по 183 амплифицировали путем ПЦР с
 использованием следующих праймеров: OTG19291 (SEQ ID №39)
 25 (GTGGGTGGTAATTTGGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATG) и OTG 19080 (SEQ ID №61) (GACTCTCGAGTTAGCACTGAGATTCCCGAGATTG). Двойную ПЦР проводили с использованием OTG19290 (SEQ ID №37) и OTG19080 (SEQ ID №61) и обоих полученных ампликонов. Полученный фрагмент вставляли в плазмиду для переноса, полученную из вируса осповакцины, по сайтам рестрикции XhoI и HpaI после промотора pH5R (Rosel
 30 et al., 1986, J Virol. 60:436), получая pTG17971.

Создание вируса MVA TG 17971 выполняли в CEF путем гомологичной рекомбинации, как описано выше.

Анализ экспрессии Core* проводили путем вестерн-блоттинга. Фибробласты куриного эмбриона инфицировали MVA TG17971 с MOI 0,2. Через 24 часа клетки собирали.
 35 Анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Core-антитела Мер ВcAg (13A9) (Санта-Крус, #sc-23946).

1.1.5. Конструирование и продукция MVA TG 17972, экспрессирующего усеченный сердцевинный полипептид с делецией (Core*t)

Core*t соответствует последовательности Core от HBV Y07587 (SEQ ID №2), усеченной
 40 после аминокислоты 148 и с делецией аминокислот с 77 по 84.

Последовательности, кодирующие Core*t, создавали путем двойной ПЦР из плазмиды pGA4-Core, которая содержала последовательность, кодирующую ген HBV Core полной длины, который был собран из синтетических олигонуклеотидов и/или ПЦР-продуктов, за исключением последних двух кодонов САА TGT кодирующей последовательности,
 45 которые были модифицированы таким образом, чтобы избежать гомологии последовательности с Pol (SEQ ID №36).

Последовательность Core от позиции 1 до 76 амплифицировали путем ПЦР с использованием следующих праймеров: OTG19290 (SEQ ID №37)

(GACTGTTAACCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTTG) и OTG19292 (SEQ ID №38) (GTTGACATAACTGACTACCAAAATTACCACCCACCCAGGTAG).

Последовательность Core с позиции 85 по 183 амплифицировали путем ПЦР с pGA4-Core с использованием следующих праймеров: OTG19291 (SEQ ID №39)

5 (GTGGGTGGTAATTTGGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATG) и OTG19299 (SEQ ID №40) (GACTCTCGAGTTAAACAGTAGTCTCCGGAAGTG). Двойную ПЦР проводили с использованием OTG19290 (SEQ ID №37) и OTG19299 (SEQ ID №40). Полученный фрагмент вставляли в плазмиду для переноса, полученную из вируса осповакцины, по сайтам рестрикции XhoI и HpaI после промотора pH5R (Rosel et al., 1986, J. Virol. 60:436),
10 получая pTG17972.

Создание вируса MVA TG17972 выполняли в CEF путем гомологичной рекомбинации, как описано выше.

Анализ экспрессии Core**t* проводили путем вестерн-блоттинга. Фибробласты куриного эмбриона инфицировали MVA TG17972 с MOI 0,2. Через 24 часа клетки
15 собирали. Анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Core-антитела Нер ВсAg (13A9) (Санта-Крус, №sc-23946).

1.1.6. Конструирование и продукция MVA TG17993, экспрессирующего усеченный сердцевинный полипептид с делецией, слитый с иммуногенной областью env1 (Core**t*-env1)

20 Часть Core**t* сливали с областью env1, продолжающейся с аминокислоты 14 по 51 HBs-белка.

Последовательность Core**t*-env1 создавали путем двойной ПЦР. Последовательность Core**t* амплифицировали путем ПЦР на pTG17972 с использованием следующих праймеров: OTG19317 (SEQ ID №41)

25 (GACGGGATCCACCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTTGG) и OTG19319 (SEQ ID №42) (GCCTGCTTGCAGGACAACAGTAGTCTCCGGAAGTGTTG). Последовательность env1 амплифицировали путем ПЦР на плазмиде pMK-C/E (SEQ ID №43) с использованием следующих праймеров: OTG19318 (SEQ ID №44) (CCGGAGACTACTGTTGTCCTGCAAGCAGGCTTCTTC) и OTG19320 (SEQ ID №45) (GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTACTGACCCAGGCAAACCGTGG). Двойную
30 ПЦР проводили с использованием OTG19317 (SEQ ID №41) и OTG19320 (SEQ ID №45). Полученный фрагмент вставляли в плазмиду для переноса, полученную из вируса осповакцины, по сайтам рестрикции BamHI и NotI после промотора pH5R промотора (Rosel et al., 1986, J Virol. 60:436), получая pTG17993.

35 В качестве иллюстративного примера, плазида pMK-C/E была сделана компанией Geneart и содержала химерную последовательность, содержащую вставку из трех последовательностей оболочечной области HBV в сердцевинной последовательности (SEQ ID №43). Нативные сердцевинная и оболочечная нуклеотидные последовательности были вырожденными, чтобы избежать гомологии последовательности с
40 последовательностью Pol HBV, а также нестабильности последовательности в связи с участками полиТ или полиС. Кроме того, из сердцевинной последовательности были удалены аминокислоты с 77 по 84, и она была усечена с АК 148. Выбранными оболочечными областями являются: область с аминокислоты 14 по 51 из белка S (env1), область с аминокислоты 165 по 194 из белка S (env2) и область с аминокислоты 202 по
45 226 из белка S (env4). Три области вставляли соответственно в позиции нуклеотидов 127, 222 и 416 сердцевинной последовательности. Следует отметить, что вставка этой последовательности в вектор MVA приводит к цитотоксичности в экспрессирующих клетках, подчеркивая тот факт, что разработка гибрида env-core является не прямой.

Создание вируса MVA TG17993 выполняли в CEF путем гомологичной рекомбинации, как описано выше.

Анализ экспрессии Core*t-env1 проводили путем вестерн-блоттинга. Фибробласты куриного эмбриона инфицировали MVA TG17993 с MOI 0,2. Через 24 часа клетки собирали. Анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Core-антитела Нер ВсAg (13A9) (Санта-Крус, №sc-23946).

1.1.7. Конструирование и продукция MVA TG17994, экспрессирующего усеченный сердцевинный полипептид с делецией, слитый с иммуногенными областями env1 и env2 (Core*t-env1-env2)

Полипептид Core*t-env1-env2, описанный в 1.1.5, затем сливали с двумя иммуногенными областями, продолжающимися с аминокислоты 14 по 51 (env1) и с аминокислоты 165 по 194 (env2) из HBs-белка.

Последовательность, кодирующую Core*t-env1-env2, собирали путем тройной ПЦР. Последовательность Core*t амплифицировали путем ПЦР с рTG17972 с использованием следующих праймеров: OTG19317 (SEQ ID №41) и OTG19319 (SEQ ID №42). Env1 амплифицировали с плазмиды рМК-С/Е с использованием следующих праймеров: OTG19318 (SEQ ID №44) и OTG19322 (SEQ ID №46) (GCGTGCGCTTGCCCACTGACCCAGGCAAACCGTGG). Env2 амплифицировали с плазмиды рМК-С/Е с использованием следующих праймеров: SEQ ID №47 (CGGTTTGCCTGGGTCAGTGGGCAAGCGCACGCTTTAGC) и OTG19323 (SEQ ID №48) (GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTACACGCTCAGCCACACGGTTGG). Тройную ПЦР проводили с использованием OTG19317 (SEQ ID №41) и OTG19323 (SEQ ID №48). Полученный фрагмент вставляли в плазмиду для переноса, полученную из вируса осповакцины, по сайтам рестрикции BamHI и A/of/ после промотора pH5R (Rosel et al., 1986, J Virol. 60:436), получая рTG17994.

Создание вируса MVA TG 17994 выполняли в CEF путем гомологичной рекомбинации, как описано выше.

Анализ экспрессии Core*t-env1-env2 проводили путем вестерн-блоттинга. Фибробласты куриного эмбриона инфицировали MVA TG 17994 с MOI 0,2. Через 24 часа клетки собирали. Анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Core-антитела Нер ВсAg (13A9) (Санта-Крус, №sc-23946).

1.1.8. Конструирование и продукция аденовирусного вектора Ad TG 17909, экспрессирующего Core*1-env1-env2-env4

Синтетический ген (831 нуклеотид), кодирующий гибрид Core*t-env1-env2-env4, создавали путем двойной ПЦР. Core амплифицировали путем ПЦР с рGA4-Core (описан в 1.1.4.) с использованием следующих праймеров: OTG19152 (SEQ ID №49) (GGGGGGCTAGCAAGCTTCCACCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTTG) и OTG19154 (SEQ ID №50) (GAAAGAATCCAGCTTGCAGGACGCACTGAGATTCCCGAGATTGAG).

Env1 -env2-env4 амплифицировали путем ПЦР с рGA4-env с использованием следующих праймеров: OTG19153 (SEQ ID №51) (CTCAATCTCGGGAATCTCAGTGCGTCCTGCAAGCTGGATTCTTTC) и OTG19159 (SEQ ID №52) (GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTAGATATAAACCCACAAGC). Двойную ПЦР проводили с использованием OTG19152 (SEQ ID №49) и OTG19159 (SEQ ID №52). Полученный фрагмент вставляли по сайтам рестрикции NheI и NotI в аденовирусную шаттл-плазмиду, содержащую CMV-управляемую экспрессионную кассету, окруженную аденовирусными последовательностями (аденовирусные нуклеотиды 1-454 и нуклеотиды 3513-5781, соответственно), образуя поколение векторного генома посредством

гомологичной рекомбинации (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70:4805). Полученный аденовирусный вектор pTG17909 имел делеции E3 (нуклеотиды 28593-30464) и E1 (нуклеотиды 455-3512), при этом область E1 заменена экспрессионной кассетой, содержащей, от 5' к 3', немедленный ранний энхансер/промотор CMV, химерный человеческий β -глобин/интрон IgG (такой как в векторе pCl, доступном от Promega), последовательность, кодирующую Core*t-env1-env2-env4, и поздний сигнал полиаденилирования SV40. Рекомбинантный аденовирус был создан путем трансфекции вирусных геномов, линейаризованных PacI, в E1-комплементационную клеточную линию. Размножение, очистка и титрование вируса были проведены в соответствии с описанием выше (Erbs et al., 2000, Cancer Res. 60:3813).

Экспрессию гибридного белка оценивали путем вестерн-блоттинга. 10^6 клеток A549 (ATCC CCL-185) инфицировали в течение 48 часов Ad TG17909 с MOI 10 или 50 или пустым аденовирусом в качестве отрицательного контроля. Клеточный осадок собирали и исследовали с помощью мышинового моноклонального анти-Core-антитела (C1-5, sc-23945, Санта-Крус).

1.1.9. Конструирование и продукция аденовирусного вектора Ad TG17910, экспрессирующего Pol*

Ген, кодирующий Pol*, полимеразный белок, усеченный на первые 47 аминокислот за исключением инициатора Met (с 48 по 832) и мутированный в позициях 540 (D на H) и 713 (E на H) (по сравнению с полимеразой дикого типа), вставляли в аденовирусный вектор. Ген Pol (2364 нуклеотида) амплифицировали с помощью ПЦР с pGA15-Pol (описан в 1.1.2) с использованием праймеров OTG19155 (SEQ ID №53) (GGGGGGCTAGCAAGCTTCCACCATGAATGTTAGTATTCCTTGGACTCATAG) и OTG19156 (SEQ ID №54) (GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTCACGGTGGTCTCCATGCGACGTGC).

Полученный фрагмент вставляли по сайтам рестрикции NheI и NotI в аденовирусную шаттл-плазмиду, содержащую CMV-управляемую экспрессионную кассету, окруженную аденовирусными последовательностями (аденовирусные нуклеотиды 1-454 и нуклеотиды 3513-5781, соответственно), образуя поколение векторного генома путем гомологичной рекомбинации (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70:4805). Полученный аденовирусный вектор pTG17910 имел делеции E3 (нуклеотиды 28593-30464) и E1 (нуклеотиды 455-3512), при этом область E1 заменена экспрессионной кассетой, содержащей, от 5' к 3', немедленный ранний энхансер/промотор CMV, химерный человеческий β -глобин/интрон IgG (такой как в векторе pCl, доступном от Promega), последовательность, кодирующую усеченный и мутированный Pol, и поздний сигнал полиаденилирования SV40. Рекомбинантный аденовирус был создан путем трансфекции вирусных геномов, линейаризованных PacI, в E1-комплементационную клеточную линию. Размножение, очистка и титрование вируса были проведены в соответствии с описанием выше (Erbs et al., 2000, Cancer Res. 60:3813).

Экспрессию гибридного белка оценивали в инфицированных аденовирусом клетках в анализе вестерн-блоттинг. Клетки A549 (10^6 клеток) (ATCC CCL-185) инфицировали в течение 48 часов Ad TG17910 с MOI 10 или 50, а также пустым аденовирусом в качестве отрицательного контроля. Клеточный осадок собирали и исследовали с помощью мышинового моноклонального анти-Pol-антитела (8D5, sc-81591, Санта-Крус).

7.2. Оценка иммуногенности антигена

Иммуногенность антигена оценивали *in vivo* в анализе Elispot IFN γ и путем внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) после иммунизации трансгенных мышей.

1.2.1. Мышиная модель

HLA-A2.1-трансгенные мыши, используемые в исследовании, были описаны Pascolo et al. (1997. J. Exp. Med. 185:2043). Эти мыши были нокаутными по гену H-2D^b и гену мышиног (3-микроглобулина и экспрессировали трансгенную монопептидную молекулу гистосовместимости I класса (HND-молекулы), в которой С-конец человеческого р2 т ковалентно связан с М-концом химерной тяжелой цепи (HLA-A*0201 α 1- α 2, H-2D^b α 3 трансмембранная и интрацитоплазматическая области). Иммунизировали мышей в возрасте от семи до десяти недель (самцов и самок). Средний вес мышей составлял примерно 25-30 г.

1.2.2. Протоколы иммунизации

Мышей разделяли на 4 группы; группу 1 иммунизировали Ad TG 17909 (кодирующим сердцевину HBV, слитую с иммуногенными областями env1, env2 и env4), группу 2 иммунизировали Ad TG17910 (кодирующим усеченный и мутированный Pol*), группу 3 иммунизировали обоими векторами, а группу 4 иммунизировали пустым аденовирусом (Ad TG15149) в качестве отрицательного контроля. Всех животных иммунизировали путем подкожных инъекций в основание хвоста, первая и вторая группы животных получали одну подкожную инъекцию 10^8 IU каждого аденовируса (TG 17909 или TG17910), третья группа одну подкожную инъекцию смеси, содержащей 2×10^8 IU каждого аденовируса (всего 2×10^8 IU: 10^8 IU Ad TG17 909 + 10^8 IU Ad TG17910), а отрицательные контроли получали одну подкожную инъекцию 2×10^8 IU AdTG15149. Клеточный иммунный ответ оценивали по Elispot IFN γ и по анализу внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) через две недели после иммунизации.

1.2.3. Пептиды

Пептиды, используемые для стимуляции клеток in vitro, представляли собой либо короткие пептиды длиной от 9 до 10 аминокислот, которые описаны или предсказаны как HLA-A2-рестриктурированные эпитопы, либо длинные пептиды длиной 15 аминокислот, включенные в пептидные библиотеки, охватывающие все интересующие антигены.

Короткие пептиды, соответствующие описанным или прогнозируемым HLA-A2-рестриктурированным эпитопам полимеразного белка, сердцевинного белка или оболочечных областей, были синтезированы Eurogentec (Бельгия) и растворены в 100% DMSO (Sigma, D2650) в концентрации 10 mM.

Пептидные библиотеки, охватывающие целиком полимеразный, сердцевинный и оболочечный белки, были синтезированы Prolimmune (Оксфорд, Великобритания). Библиотеки Pol, Core и env состоят из 15-мерных пептидов с перекрытием на 11 аминокислот. Каждый исходный пептид растворяли в 100% DMSO (Sigma, D2650) в концентрации 50 мг/мл. Для каждой библиотеки пептиды объединяли в концентрации по 2 мг/мл на пептид:

Белок HBV Pol покрывается 8 пулами из 24-25 пептидов из библиотеки Pol (пул 1: 24 пептида, охватывающие остатки с 45 по 151; пул 2: 24 пептида, охватывающие остатки со 140 по 251; пул 3: 24 пептида, охватывающие остатки с 241 по 347; пул 4: 24 пептида, охватывающие остатки с 337 по 447; пул 5: 24 пептида, охватывающие остатки с 437 по 543; пул 6: 24 пептида, охватывающие остатки с 533 до 639; пул 7: 24 пептида, охватывающие остатки с 629 по 735; пул 8: 25 пептидов, охватывающих остатки с 725 по 832);

Белок HBV Core покрывается 2 пулами из 21-22 пептидов из библиотеки Core (пул

1: 22 пептида, охватывающие остатки с 1 по 100; пул 2: 21 пептид, охватывающий остатки с 89 по 183);

Белок HBV env покрывается 3 пулами из 6-10 пептидов из библиотеки Env (пул 1: 10 пептидов, охватывающих HBs-остатки с 9 по 59; пул 2: 9 пептидов, охватывающих HBs-остатки со 157 по 194; пул 4: 6 пептидов, охватывающих HBs-остатки со 193 по 226).

1.2.4. Анализы ELISpot IFN γ

Собирали спленоциты от иммунизированных мышей и лизировали эритроциты (Sigma, R7757). 2×10^5 клеток на лунку культивировали в трех повторах в течение 40 ч в планшетах Multiscreen (Millipore, MSHA S4510), покрытых моноклональным антителом против мышинового IFN γ (BD Biosciences; 10 мкг/мл, 551216) в культуральной среде MEM (Gibco, 22571) с добавлением 10% FCS (Sigma, F7524, или JRH, 12003-100M), 80 ЕД/мл пенициллина/80 мкг/мл стрептомицина (PAN, P06-07-100), 2 мМ L-глутамин (Gibco, 25030), 1X заменимых аминокислот (Gibco, 11140), 10 мМ Hepes (Gibco, 15630), 1 мМ пирувата натрия (Gibco, 31350) и 50 мкМ β -меркаптоэтанола (Gibco, 31350) и в присутствии только 10 ЕД/мл рекомбинантного мышинового IL2 (Peprotech, 212-12) в качестве отрицательного контроля, или с:

- 10 мкМ одного HLA-A2-рестриктивного пептида, присутствующего в HBV-антигенах, кодируемых Ad-векторами (SLY для Pol, FLP, ILC для Core, VLQ, FLG и GLS для env), или нерелевантного пептида;

- пулом пептидов в конечной концентрации 5 мкг/мл каждого пептида;

- 5 мкг/мл конканавалина А (Sigma, C5275) для положительного контроля. IFN γ -продуцирующие Т-клетки количественно оценивали с помощью анализа ELISpot (цитокин-специфического иммуноферментного спот-анализа), как описано выше (Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76:12735). Число пятен (соответствующих IFN γ -продуцирующим Т-клеткам) в лунках с отрицательным контролем вычитали из числа пятен, обнаруженных в экспериментальных лунках, содержащих HBV-пептиды. Результаты представлены как среднее значение, полученное в трех лунках с повторами. Экспериментальный порог положительных наблюдаемых реакций (или отсекабель) определяли путем расчета порогового значения, которое соответствует среднему значению пятен, наблюдаемых только для среднего ± 2 стандартных отклонения для 10^6 клеток. Техническое отсечение, связанное с CTL ELISpot-ридером, также определяли как 50 пятен/ 10^6 клеток (это значение, выше которого CV ридера систематически составляло менее 20%). Наибольшее значение между техническим пороговым значением и экспериментальным порогом, рассчитанным для каждого эксперимента, учитывали для определения порогового значения в каждом эксперименте. Статистический анализ ответов ELISpot проводили с помощью теста Манна-Уитни. Значение p, равное или ниже 0,05, считалось значимым.

1.2.5. Анализы внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS)

ICS выполняли на спленоцитах от каждого животного в каждой группе. После лизиса эритроцитов с помощью литического буфера (Sigma, R7757) 2×10^6 клеток на лунку в плоскодонном 96-луночном планшете инкубировали в полной культуральной среде альфа-MEM (Gibco BRL, 22571) или в присутствии только 10 ЕД/мл мышинового рекомбинантного IL-2 (Peprotech, 212-12) в качестве отрицательного контроля, или с 10 мкМ специфического HBV-пептида, или с пулом пептидов в конечной концентрации 5 мкг/мл каждого пептида, или с 10 мкМ нерелевантного пептида. GolgiPlug (BD Biosciences, 555029) немедленно добавляли в конечной концентрации 1 мкл/мл на 5 часов. Затем клетки собирали в 96-луночные планшеты с V-образным дном лунок и

промывали 1% FCS-PBS. Окрашивание проводили с использованием моноклональных антител против CD3 (хомячковое МКА анти-CD3е-PE, разведение 1/200), CD8 (крысиное МКА анти-CD8а-APC, разведение 1/600) и CD4 (крысиное МКА анти-CD4-PerCP, разведение 1/600) (все от BD Biosciences, 553063, 553035 и 553052 соответственно) в 50 мкл 1% FCS-PBS в течение 15 мин при комнатной температуре. После промывания клетки фиксировали и пермеабелизировали с помощью Cytotfix/Cytoperm и промывали раствором Perm/Wash (BD Biosciences, 554714). Затем антимышьиные IFN γ -PE-антитела (BD Biosciences, 554412557724) и антимышьиные ФНО α -Alexa488 антитела (BD Biosciences, 557719) или антимышьиные IFN γ -PE-антитела (BD Biosciences 554412557724) и антимышьиные IL-2-Alexa488 антитела (BD Biosciences, 557719) добавляли на 15 мин при комнатной температуре, и после промывания Perm/Wash клетки ресуспендировали в 1% FCS-PBS и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием FACSCalibur (Becton Dickinson), Клетки CD3е+, CD8а+ или клетки CD3е+, CD4+ гейтировали для определения процентов IFN γ + CD8+ или IFN γ + CD4+ Т, или TNF α + CD8+, или TNF α + CD4+ Т, или IL2+ CD8+, или IL2 CD4+ Т, или IFN γ + TNF α + CD8+, или IFN γ + TNF α + CD4+, или IFN γ + IL2+ CD8+, или IFN γ + IL2+ CD4+ Т-клеточной популяции. Процент, полученный только со средой, считали фоном.

1.2.6. Анализы CTL in vivo

CTL-анализы in vivo проводили, как было описано (Fournillier et al., 2007). Суспензии спленоцитов получали из селезенки сингенных мышей и доводили до 20×10^6 клеток/мл после лизиса эритроцитов. Третью часть клеток инкубировали с одним из HBV-специфических пептидов, вторую треть клеток инкубировали с другим HBV-пептидом, все с конечной концентрацией 10 мкМ, в течение 1 часа при температуре 37°C, а последнюю часть оставляли без воздействия. 5(6)-карбоксифлуоресцеина диацетат сукцинимидил эфир (CFSE) (Molecular probes, C1157) на 10 мин добавляли в концентрации 16 мкМ (CFSE высокий) к клеткам без воздействия, 4 мкМ (CFSE средний) к клеткам, на которые воздействовали пептидом ILC или VLQ, и 1 мкМ (CFSE низкий) к клеткам, на которые воздействовали пептидом SLY или FLP. После промывания PBS три популяции (клетки без воздействия, клетки, на которые воздействовали пептидом ILC и SLY или без воздействия, клетки, на которые воздействовали пептидом FLP и ILC) смешивали, и общее количество клеток 30×10^6 вводили мышам под наркозом в ретроорбитальные вены (с использованием смеси кетамина-ксилазина-PBS (Ketamine Virbac, Centravet KET204, конечная концентрация 25 мг/мл; Xylazine hydrochloride Rompun Bayer, Centravet, конечная концентрация 5 мг/мл)). Таким образом, популяции с низким и средним CFSE представляли конкретные цели, которые должны быть лизированы цитотоксическими Т-клетками, а популяция с высоким CFSE была внутренним контролем, позволяющим нормировать анализ. Спленоциты от реципиентных мышей анализировали через 24 часа с помощью проточной цитометрии для определения CFSE-меченых клеток. После гейтирования на лимфоцитах (SSC/FSC) второе гейтирование выполняли на основе количества событий/CFSE-флуоресценции (FL1), которое демонстрирует три пика, первый из которых соответствует клеткам с низким CFSE, второй соответствует клеткам со средним CFSE, а третий соответствует клеткам с высоким CFSE. Для каждого животного рассчитывали соотношение CFSE+целей с обработкой пептидом и CFSE + целей без обработки пептидом ($R = \text{число клеток с низким CFSE} / \text{число клеток с высоким CFSE}$). Двух наивных мышей использовали для определения контроля R. Процент специфического лизиса для каждого животного определяли по следующей формуле: $\% \text{ лизиса} = (1 - R_{\text{мышь}} / R_{\text{контрольный}}) \times 100$. Ответ считался положительным, если процент специфического лизиса был выше 10% (отсечение).

2. Результаты 2.1 Экспрессия антигена вирусными векторами

2.1.1 Экспрессия антигенов из аденовирусных конструкций Ad TG 17909 и Ad TG17910

Экспрессию гибридного белка core-env1-env2-env4 оценивали в анализе вестерн-

блоттинг. Клетки A549 (10^6 клеток) инфицировали в течение 48 часов Ad TG17909 с MOI 10 или 50 или пустым аденовирусом в качестве отрицательного контроля. Клеточные осадки собирали и исследовали с помощью анти-core мышинового моноклонального антитела (C1-5, sc-23 945, Санта-Крус). Как показано на фиг.1А., главную полосу с ожидаемой молекулярной массой (31,6 кДа) обнаружили в образце клеток, инфицированных Ad TG17909.

Экспрессию полипептида Pol* оценивали в вестерн-блоттинге после инфицирования Ad TG17910 A549-клеток. Затем клеточные осадки собирали и исследовали с анти-Pol мышинным моноклональным антителом (8D5, sc-81591, Санта-Крус). Как показано на фиг.1А, полосу с ожидаемой молекулярной массой (88,5 кДа) обнаружили в образце клеток, инфицированных Ad TG17910, вместе с некоторыми субпродуктами (частичными полимеразными белками).

2.1.2 Экспрессия антигенов из MVA-конструкций

Анализ экспрессии Pol*, Pol*-TMR, Core*t, Core*t-env1, Core*t-env1-env2 выполняли в анализе вестерн-блоттинг. Клетки A549 или СЕР инфицировали с MOI 1 или 0,2 MVA TG17842, MVA TG17843, MVA TG17971, MVA TG17972, MVA TG17993 и MVA TG17994, соответственно, в присутствии или в отсутствие протеасомного ингибитора MG-132 (10 мкМ), добавленного в ростовую среду для MVA TG17842 и MVA TG17843. Через 24 часа клетки собирали.

Для MVA TG17842 анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Pol-антитела Нер В Pol (8D5, Санта-Крус, №sc-81591). Как показано на фиг.1В, экспрессию белка с кажущейся молекулярной массой 88,5 кДа обнаружили только в присутствии MG-132. Эта полоса имела ожидаемую молекулярную массу белка Pol*.

Для MVA TG17843 анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Pol-антитела Нер В Pol (8D5, Санта-Крус, №sc-81591). Как показано на фиг.1В, экспрессию белка с кажущейся молекулярной массой 98,2 кДа обнаружили только в присутствии MG-132. Эта полоса имела ожидаемую молекулярную массу белка Pol*-TMR. Следует отметить, что в присутствии MG132 было обнаружено больше продукта и дополнительный продукт с высокой молекулярной массой более 200 кДа.

Для MVA TG17971 анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Core-антитела Нер В cAg (13A9) (Санта-Крус, №sc-23946). Как показано на фиг.1В, была обнаружена экспрессия белка Core* с молекулярной массой 21 кДа, что соответствовало ожидаемой молекулярной массе.

Для MVA TG17972 анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Core-антитела Нер В cAg (13A9) (Санта-Крус, №sc-23946). Как показано на фиг.1В, была обнаружена экспрессия белка Core*t с молекулярной массой 15,8 кДа, что соответствовало ожидаемой молекулярной массе.

Для MVA TG 17993 и 17994 MVA TG анализ вестерн-блоттинг проводили с использованием коммерческого моноклонального анти-Core-антитела Нер В cAg (13A9) (Санта-Крус, №sc-23946). Как показано на фиг.1В, была обнаружена экспрессия белков с молекулярными массами 19,9 и 23,4 кДа, соответственно. Эти полосы имели ожидаемую молекулярную массу белков Core*t-env1 и Core*t-env1-env2.

2.2. Иммуногенность антигенов, экспрессированных из аденовирусных векторов Ad

TG17909 и Ad TG17910

Иммуногенность HBV-полипептидов, экспрессированных аденовирусными векторами, оценивали на HLA-A2-трансгенных мышах, иммунизированных либо Ad TG17909 или Ad TG17910 в одиночку, либо смесью двух аденовирусов. Специфичные Т-клеточные реакции, индуцированные после одной подкожной инъекции, оценивали с помощью ELISpot IFN γ , ICS и анализов цитолиза *in vivo* с использованием известных (описанных как мишени специфических Т-клеточных реакций у пациентов) HLA-A2-эпитопов, присутствующих в полимеразной, сердцевинной или оболочечной областях и/или в пулах перекрывающихся пептидов, покрывающих HBV-антигены интереса.

2.2.1 Оценка HBV-специфичных IFN γ -продуцирующих клеток в анализах ELISpot

Анализы ELISpot IFN γ показали, что Ad TG17910 может индуцировать IFN γ -продуцирующие клетки, специфичные по HLA-A2-рестриктивному эпитопу (SLYADSPSV) (SEQ ID №55, расположенному в HBV-полимеразе в позициях 816-824) (фиг.2A). Иммунизация Ad TG17909 также приводила к высокой частоте индукции IFN γ -продуцирующих клеток, специфичных для двух сердцевинных HLA-A2-рестриктиванных эпитопов (FLPSDFFPSV в позициях 18-27 (SEQ ID №56) и ILCWGELMTL в позициях 99-108 (SEQ ID №57), а также для трех оболочечных HLA-A2-рестриктиванных эпитопов (VLQAGFFLL (SEQ ID №58) в позициях 14-22 и FLGGTTVCL (SEQ ID №59) в позициях 41-49 (оба присутствуют в env1) и GLSPTVWLSV (SEQ ID №60) в позициях 185-194 (присутствует в env2) (фиг.2B и C). Иммунизация смесью Ad TG17909 и Ad TG17910 также индуцировала сопоставимый уровень специфических IFN γ -продуцирующих клеток, нацеленных на одни и те же эпитопы в трех антигенах, т.е. на эпитоп SLY, присутствующий в Pol, эпитопы FLP и ILC в сердцевинном белке и три эпитопа оболочечных областей (VLQ, FLG и GLS) (фиг.2A, B и C). Частота Т-клеточных реакций, выявляемых после иммунизации одним Ad или смесью двух, была сопоставима, и это показывает, что среди трех антигенов, экспрессированных из описанных векторов, нет ни одного крупного иммунодоминирующего.

2.2.2. Оценка HBV-специфичных IFN γ /TNF α -продуцирующих клеток в анализах внутриклеточного окрашивания

Количество CD8+ Т-клеток, способных продуцировать либо только IFN γ , либо IFN γ +TNF α , нацеленных на HLA-A2-рестриктиванные эпитопы, присутствующие в полимеразной (SLY), сердцевинной (FLP and ILC) и оболочечной областях (VLQ, FLG и GLS), оценивали с помощью анализа ICS. Все эти эпитопы были мишенями двойных и простых секретирующих клеток. Полученные результаты представлены на фиг.3. Животные, иммунизированные Ad TG17909 отдельно или в сочетании с Ad TG17910, примерно соответствовали Core- и env-специфическим CD8+ Т-клеточным реакциям (те же проценты специфических CD8+ Т-клеток, продуцирующих IFN γ или IFN γ +TNF α после повторной стимуляции пептидами FLP, ILC, VLQ, FLG и GLS, как показано на фиг.3B и 3C). С другой стороны, что касается полимеразного специфического CD8+ Т-клеточного ответа (SLY-эпитоп), очень высокий процент CD8+ клеток, продуцирующих IFN γ или IFN γ + TNF α , был обнаружен у мышей, получавших Ad TG1710, экспрессирующий Pol* (фиг.3A), а также у мышей, иммунизированных смесью Ad TG17910 и Ad TG17909, хотя на более низком уровне (фиг.3C).

2.2.3. Оценка HBV-специфичных IFN γ /TNF α -продуцирующих CD8+ и CD4+ Т-клеток после иммунизации смесью аденовирусных векторов путем анализов внутриклеточного окрашивания

Проценты CD8+ и CD4+ Т-клеток, способных продуцировать либо только IFN γ , либо

IFN γ +TNF α , либо IFN γ +IL2, нацеленных на HLA-A2-рестриктурированные эпитопы, присутствующие в полимеразной (SLY), сердцевинной (FLP и ILC) и оболочечной областях (VLQ, FLG и GLS) или в пулах перекрывающихся пептидов, покрывающих

5 анализируемые HLA-A2-рестриктурированные эпитопы были мишенью клеток, секретирующих один и два цитокина (IFN γ и IFN γ +TNF α), и некоторые пулы перекрывающихся пептидов также были мишенью клеток, секретирующих один и два цитокина (IFN γ и IFN γ +TNF и IFN γ +IL2). Результаты показаны на фиг.4. Пять HLA-A2-трангенных мышей иммунизировали смесью Ad TG17909 и Ad TG17910, а трех HLA-
10 A2-трангенных мышей иммунизировали Ad TG15149 (отрицательный контроль).

Животные, иммунизированные Ad TG15149, не демонстрировали HBV-специфичных Т-клеточных реакций (данные не представлены). Животные, иммунизированные Ad TG17909 в сочетании с Ad TG17910, демонстрировали сильный CD8+ Т-клеточный ответ, специфичный к целевым антигенам HBV (фиг.4А), с высоким процентом клеток,
15 продуцирующих один (IFN γ) и два цитокина (IFN γ +TNF α), специфичных к HLA-A2-эпитопам, находящимся в полимеразной, сердцевинной и оболочечной областях, и специфичных к пулу пептидов «Core 1» и к пулу пептидов, покрывающих области env1 и env2. Как показано на фиг.4В и 4С, эти вакцинированные мыши также демонстрировали CD4+ Т-клеточные ответы, специфичные к HBV-антигенам, в частности
20 к клеткам, секретирующим один (IFN γ) и два цитокина (IFN γ +TNF α и IFN γ +IL2), специфичным к пулу пептидов «Core 2» и к пулу пептидов, покрывающих env2.

2.2.4. Индукция цитолиза *in vivo*, измеряемая в CTL-анализах *in vivo* Способность аденовирусных векторов Ad TG17909 и Ad TG17910 индуцировать *in vivo* цитолиз клеток, несущих HLA-A2-эпитопы, оценивали в CTL-анализах *in vivo*. Было протестировано
25 четыре HLA-A2-эпитопа, соответственно SLY (Pol), FLP и ILC (Core) и VLQ (область env 1). Шесть животных иммунизировали смесью Ad TG17909 + Ad TG17910, и двух животных иммунизировали Ad TG15149 (отрицательный контроль). Половину каждой группы (трех мышей, иммунизированных Ad TG17909 + Ad TG17910, и одну мышью, иммунизированную Ad TG15149) анализировали на способность лизировать *in vivo*
30 клетки, на которые воздействовали SLY-пептидом, и клетки, на которые воздействовали ILC-пептидом. Другую половину анализировали на способность вакцинированных животных лизировать *in vivo* клетки, на которые воздействовали FLP-пептидом, и клетки, на которые воздействовали VLQ-пептидом. Полученные результаты представлены на фиг.5. Как и ожидалось, у мышей, иммунизированных Ad TG15149,
35 было обнаружено отсутствие HBV-специфического цитолиза *in vivo* (данные не представлены). *In vivo* цитолиз против двух сердцевинных эпитопов FLP и ILC был слабым у мышей, иммунизированных Ad TG17909 + Ad TG17910. Тем не менее, напротив, животные, иммунизированные смесью Ad TG17909 и Ad TG17910, демонстрировали сильный *in vivo* цитолиз против полимеразного эпитопа SLY (фиг.5А) и env1-эпитопа
40 VLQ (фиг.5В), достигая более 50% специфического лизиса в обоих случаях.

Интересно, что сочетание Ad-векторов, экспрессирующих части pol, core и env, позволяет индуцировать специфические Т-клеточные реакции, нацеленные на три HBV-антигена при совместном введении. Индуцированные Т-клетки способны продуцировать один или два цитокина и лизировать *in vivo* клетки, нагруженные некоторыми HBV-
45 пептидами. Все вместе эти данные свидетельствуют об иммуногенной активности описанных композиций и об их способности индуцировать CD8+ и CD4+ Т-клеточные реакции, когда они векторизованы Ad.

2.3. Иммуногенность антигенов, экспрессированных из MVA-векторов MVA TG17842,

MVA TG17843, MVA TG17971, MVA TG17972, MVA TG 17993 и MVA TG17994

Иммуногенную активность композиций на основе MVA оценивали на HLA-A2-трансгенных мышах, иммунизированных одним из MVA-векторов, описанных в примерах с 1.1.2 по 1.1.7 (MVA TG17842, MVA TG17843, MVA TG17971 или MVA TG17972 поодиночке), либо смесью двух MVA (MVA TG17843 + MVA TG17972, MVA TG17843 + MVA TG17993 или MVA TG17843 + MVA TG17994). Мышей иммунизировали путем трех подкожных инъекций с интервалом в одну неделю, и оценивали специфические Т-клеточные реакции в ELISpot IFN γ и ICS с использованием описанных выше HLA-A2-эпитопов, присутствующих в полимеразной, сердцевинной или оболочечной областях и/или в пулах перекрывающихся пептидов, покрывающих HBV-антигены интереса.

2.3.1. Оценка HBV-специфических IFN γ -продуцирующих клеток в анализах ELISpot после иммунизации MVA, экспрессирующим полимеразу.

Трех мышей иммунизировали либо MVA TG17842, экспрессирующим усеченный и мутированный полимеразный антиген, либо MVA TG17843, экспрессирующим нацеленную на мембрану версию той же усеченной и мутированной полимеразы, или MVA N33.1 (отрицательный контроль). Полимеразо-специфический Т-клеточный ответ оценивали в анализах IFN γ ELISpot с использованием HLA-A2-ограниченного эпитопа SLY и пула пептидов, покрывающих полимеразу. У мышей, иммунизированных MVA N33.1 и MVA TG17842, не было обнаружено HBV-специфического Т-клеточного ответа (данные не представлены). Тем не менее, как показано на фиг.6А, IFN γ -продуцирующие клетки были индуцированы после иммунизации MVA TG17843, который является специфическими для HLA-A2-ограниченного эпитопа SLY и пептидного пула 8, покрывающего С-концевую часть полимеразы (отсутствие специфического ответа против других пептидных пулов 1-7 может быть обнаружено в экспериментальных условиях испытания). Эти данные подчеркивают преимущество экспрессии полимеразы в качестве связанного с мембраной антигена, по меньшей мере в композициях на основе MVA.

2.3.2. Оценка HBV-специфических IFN γ -продуцирующих клеток в анализах ELISpot после иммунизации MVA, экспрессирующим сердцевинный белок.

Восьмерых мышей иммунизировали либо MVA TG17971, экспрессирующим сердцевинную часть с удаленными остатками 77-84, либо MVA TG 17972, экспрессирующим ее усеченный вариант (С-концевое усечение с остатка 149) или MVA N33.1 (отрицательный контроль). Специфические Т-клеточные ответы к сердцевинному белку определяли в анализах ELISpot IFN γ с использованием HLA-A2-ограниченных эпитопов (пептиды FLP и ILC) и описанных выше пептидных пулов Core 1 и Core 2. Как показано на фиг.6В, иммунизация MVA TG17971 может вызвать спорадические специфические Т-клеточные реакции против HLA-A2-ограниченных пептидов FLP и ILC и двух пептидных пулов, охватывающих сердцевинный антиген (фиг.6В). Отсутствие специфических Т-клеточных реакций против сердцевинного белка может быть обнаружено у мышей, иммунизированных MVA TG17972 с использованием тестируемых пептидов и в тестируемых экспериментальных условиях (данные не представлены).

2.3.3. Оценка HBV-специфических IFN γ -продуцирующих клеток в анализах ELISpot после иммунизации комбинацией векторов MVA

Трех мышей, иммунизированных смесью MVA TG17843 и либо MVA TG17972, либо MVA TG17993, либо MVA TG17994, и HBV-специфические Т-клеточные реакции оценивали способом ELISpot IFN γ с использованием описанных выше пептидов.

- специфические Т-клеточные реакции против полимеразы были обнаружены у подавляющего большинства животных, вакцинированных сочетанием MVA TG17843

+ MVA TG17972 (положительные реакции у 2/3 животных, как показано на фиг.7), MVA TG17843 + MVA TG17993 (положительные реакции у 3/3 животных, как показано на фиг.7B) и MVA TG17843 + MVA TG17994 (положительные реакции у 2/3 животных, как показано на фиг.7C). Частота IFN γ -продуцирующих клеток кажется сравнимой с той, которая наблюдается при введении MVA TG17843 в одиночку (фиг.6A), что показывает, что комбинация векторов не приносит вреда иммунному ответу.

- Отсутствие специфической реакции против сердцевинной части может быть обнаружено в тестируемых экспериментальных условиях у любого из вакцинированных животных с использованием HLA-A2 или пула пептидов (данные не представлены).

- Отсутствие специфической реакции против оболочечной части может быть обнаружено в тестируемых экспериментальных условиях у любого из животных, вакцинированных MVA TG17993-содержащей комбинацией, с использованием env1 HLA-A2 или пептидных пулов (данные не представлены).

- У 2 из 3 животных, иммунизированных MVA TG17994-содержащей комбинацией, как показано на фиг.7C, были обнаружены специфические Т-клеточные реакции против env2, которые были направлены как против HLA-A2-ограниченного эпитопа GLS, так и против env2-охватывающего пептидного пула (отсутствие Т-клеточной реакции против env1-области можно было наблюдать в этих экспериментальных условиях; данные не приведены).

ICS-анализы, проведенные в тех же условиях, подтвердили результаты, наблюдаемые в анализах ELISpot (данные не представлены).

Интересно, что комбинация MVA-векторов, экспрессирующих части pol, core и env, позволяет индуцировать специфические Т-клеточные реакции, направленные на антигены pol и env2 при совместном введении.

Все вместе, эти данные свидетельствуют об иммуногенной активности описанных композиций и об их способности индуцировать Т-клеточные реакции против основных HBV-антигенов.

Формула изобретения

1. Иммуногенная композиция, которая содержит комбинацию следующих частей:
 (i) полимеразной части, содержащей по меньшей мере 450 аминокислотных остатков полимеразного белка, полученного из первого HBV-вируса;
 (ii) сердцевинной части, содержащей по меньшей мере 100 аминокислотных остатков сердцевинного белка, полученного из второго HBV-вируса; и
 (iii) оболочечной части, содержащей одну или более иммуногенную область из 20-100 последовательных аминокислотных остатков белка HBsAg, полученного из третьего HBV-вируса;

или комбинацию нуклеиновокислотных молекул, кодирующих указанную полимеразную часть, указанную сердцевинную часть и указанную оболочечную часть.

2. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанные первый, второй и третий HBV-вирусы имеют разные генотипы.

3. Иммуногенная композиция по п. 1, где по меньшей мере два из указанных первого, второго и третьего HBV-вирусов имеют один и тот же HBV-генотип и предпочтительно указанные первый, второй и третий HBV-вирусы имеют один и тот же генотип.

4. Иммуногенная композиция по п. 3, где первый, второй и третий HBV-вирусы имеют генотип D и предпочтительно представляют собой HBV-изолят Y07587.

5. Иммуногенная композиция по п. 3, где указанные первый, второй и третий HBV-вирусы имеют генотип В или С.

6. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная полимеразная часть модифицирована путем усечения по меньшей мере 20 аминокислотных остатков и не более 335 аминокислотных остатков, обычно присутствующих на N-конце нативной HBV-полимеразы, и предпочтительно первых 47 или 46 аминокислотных остатков после инициаторного остатка Met, расположенного на N-конце нативной HBV-полимеразы.

7. Иммуногенная композиция по п. 6, где указанная полимеразная часть включает аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №7.

8. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная полимеразная часть модифицирована таким образом, что демонстрирует сниженную обратнотранскриптазную (ОТазную) ферментативную активность по сравнению с нативной HBV-полимеразой, и предпочтительно включает замену остатка Asp, соответствующего позиции 540 в SEQ ID №1 и позиции 494 в SEQ ID №7, на любой аминокислотный остаток, отличный от Asp, и предпочтительно на остаток His.

9. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная полимеразная часть модифицирована таким образом, что демонстрирует сниженную ферментативную активность РНКазы Н по сравнению с нативной HBV-полимеразой, и предпочтительно включает замену остатка Glu, соответствующего позиции 718 в SEQ ID №1 и позиции 672 в SEQ ID №7, на любой аминокислотный остаток, отличный от Glu, и предпочтительно на остаток His.

10. Иммуногенная композиция по п. 9, где указанная полимеразная часть включает аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №8, или с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №7, с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и с заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His.

11. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная полимеразная часть слита в рамке считывания с гетерологичной гидрофобной последовательностью и предпочтительно в рамке считывания с сигнальным и трансмембранным пептидами гликопротеина вируса бешенства, и где указанная сигнальная последовательность вируса бешенства слита в рамке считывания с N-концом, а указанная трансмембранная последовательность вируса бешенства слита в рамке считывания с С-концом указанной полимеразной части.

12. Иммуногенная композиция по п. 11, где указанная полимеразная часть содержит аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №9.

13. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная сердцевинная часть модифицирована путем усечения по меньшей мере 10 аминокислотных остатков и не более 40 аминокислотных остатков, которые обычно присутствуют на С-конце нативной сердцевины HBV, и предпочтительно 35 аминокислотных остатков нативной сердцевины HBV.

14. Иммуногенная композиция по п. 13 где указанная сердцевинная часть включает аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №10.

15. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная сердцевинная часть модифицирована таким образом, что демонстрирует сниженное распознавание и/или взаимодействие с белком оболочки HBV по сравнению с нативной сердцевиной HBV, и предпочтительно содержит аминокислотную последовательность, которая

демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №11.

16. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная одна или более иммуногенная область, используемая в данном изобретении, выбрана из группы, состоящей из:

- части оболочечного белка (HBsAg), которая продолжается от позиции 14 до 51 (область env1),
- части оболочечного белка (HBsAg), которая продолжается от позиции 165 до 194 (область env2);
- части оболочечного белка (HBsAg), которая продолжается от позиции 81 до 106 (область env3);
- части оболочечного белка (HBsAg), которая продолжается от позиции 202 до 226 (область env4); а также
- любой их комбинации.

17. Иммуногенная композиция по п. 16, где указанная иммуногенная область(области) содержит аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с любой из аминокислотных последовательностей, приведенных в SEQ ID №12-15.

18. Иммуногенная композиция по п. 17, где указанная оболочечная часть содержит аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №16 или SEQ ID №17.

19. Иммуногенная композиция по п. 1, где указанная полимеразная, сердцевинная и/или оболочечная части слиты в рамке считывания в единую полипептидную цепь попарно или все вместе.

20. Иммуногенная композиция по п. 19, где указанная оболочечная часть слита в рамке считывания с С-концом сердцевинной части.

21. Иммуногенная композиция по п. 20, где указанный гибридный полипептид с сердцевинной и оболочечной частями выбран из группы, состоящей из:

- полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №18;
- полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №19; и

- полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID №20, или с частью аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 251, или, альтернативно, с частью аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 221; или с их делецированными версиями, в которых отсутствуют остатки 77-84 в SEQ ID №20.

22. Нуклеиновокислотная молекула для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV, кодирующая комбинацию полимеразной части, определенной в любом из пп. 1 и 6-12, сердцевинной части, определенной в любом из пп. 1 и 13-15, и оболочечной части, определенной в любом из пп. 1 и 16-21.

23. Нуклеиновокислотная молекула по п. 22, где указанная нуклеиновокислотная молекула содержит нуклеиновокислотную молекулу, выбранную из группы, состоящей из:

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №21;

5 - нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №22;

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №21, с заменой нуклеотида G в позиции 10 1480 на C, нуклеотида G в позиции 2014 на C и нуклеотида A в позиции 2016 на T;

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №23;

15 - нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №24;

- нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №25; и

20 - нуклеиновокислотной молекулы, содержащей нуклеотидную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 80% идентичность с нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID №26, или с частью нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID №26, начиная с 1 нуклеотида и заканчивая 753 нуклеотидом, или с частью нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ 25 ID №26, начиная с 1 нуклеотида и заканчивая 663 нуклеотидом, или с их делецированными версиями, в которых отсутствует часть, продолжающаяся от G в позиции 229 до A в позиции 252 SEQ ID №26.

24. Вектор для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV, содержащий одну или более нуклеиновокислотную молекулу по п. 22 или 23.

30 25. Вектор по п. 24, который представляет собой плазмидный вектор.

26. Вектор по п. 24, который представляет собой вирусный вектор.

27. Вектор по п. 26, где указанный вирусный вектор является репликативно-дефектным аденовирусным вектором и предпочтительно аденовирусным вектором, который содержит указанную нуклеиновокислотную молекулу, вставленную вместо 35 E1-области.

28. Вектор по п. 26, где указанный вирусный вектор является поксвирусным вектором и, в частности, получен из вируса оспы канареек, вируса оспы кур или вируса осповакцины, при этом указанный вирус осповакцины предпочтительно является модифицированным штаммом Анкара (MVA).

40 29. Вектор по любому из пп. 24-28, который несет нуклеиновокислотные молекулы, кодирующие указанную полимеразную часть, указанную сердцевинную часть и указанную оболочечную часть.

30. Вектор по любому из пп. 24-28, который несет только одну или две нуклеиновокислотные молекулы, кодирующие указанную полимеразную часть, 45 указанную сердцевинную часть и указанную оболочечную часть.

31. Вектор по п. 30, который выбран из группы, состоящей из:

(i) MVA-вектора, содержащего нуклеиновокислотную молекулу, находящуюся под контролем промотора вируса осповакцины, такого как промотор 7.5 K, и кодирующую

полимеразную часть, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №7, 8 или 9 или в SEQ ID №7 с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и с заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His;

(ii) MVA-вектора, содержащего нуклеиновокислотную молекулу, находящуюся под контролем промотора вируса осповакцины, такого как промотор pH5г, и кодирующую сердцевинную часть и оболочечную часть, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №18 или 19;

(iii) E1-дефектного Ad-вектора, содержащего вставленную вместо E1-области нуклеиновокислотную молекулу, находящуюся под контролем CMV-промотора и кодирующую полимеразную часть, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №7, 8 или 9 или в SEQ ID №7 с заменой остатка Asp в позиции 494 на остаток His и с заменой остатка Glu в позиции 672 на остаток His; и

(iv) E1-дефектного Ad-вектора, содержащего вставленную вместо E1-области нуклеиновокислотную молекулу, находящуюся под контролем CMV-промотора и кодирующую сердцевинную часть и оболочечную часть, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №18, 19 или 20, или часть SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 251, или часть SEQ ID №20, начиная с остатка 1 и заканчивая остатком 221.

32. Инфекционная вирусная частица для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV, содержащая нуклеиновокислотную молекулу по любому из пп. 22-23 или вектор по любому из пп. 24-31.

33. Инфекционная вирусная частица по п. 32, которая получена в процессе, включающем следующие этапы:

(а) введение вирусного вектора изобретения в подходящую клеточную линию;

(б) культивирование указанной клеточной линии в соответствующих условиях для получения указанной инфекционной вирусной частицы,

(в) восстановление полученной инфекционной вирусной частицы из культуры указанной клеточной линии, и

(г) возможно, очистка указанной восстановленной инфекционной вирусной частицы.

34. Композиция для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV, содержащая нуклеиновокислотную молекулу по любому из пп. 22-23, вектор по любому из пп. 24-31 или инфекционную вирусную частицу по п. 32 или 33 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Композиция по п. 34, которая также содержит один или более адъювант, подходящий для системного применения или применения на слизистой у людей.

36. Композиция по п. 34 или 35, которая разработана для внутримышечного или подкожного введения.

37. Композиция по п. 34 или 35, которая содержит от примерно 10^5 до примерно 10^{13} инфекционных единиц вирусного вектора или инфекционной вирусной частицы.

38. Иммуногенная композиция для стимуляции или повышения иммунного ответа на HBV, содержащая комбинацию по меньшей мере двух независимых векторов, вместе кодирующих полимеразную часть, сердцевинную часть и оболочечную часть, определенных в пп. 1 и 2-7.

39. Применение по меньшей мере одной иммуногенной композиции по любому из пп. 1-21, нуклеиновокислотной молекулы по любому из пп. 22-23, вектора по любому из пп. 24-31, инфекционной вирусной частицы по п. 32 или 33 или композиции по любому из пп. 34-38 для изготовления лекарственного препарата, предназначенного для лечения или профилактики HBV-инфекции или HBV-связанного заболевания или патологического

состояния.

40. Применение по п. 39, где лекарственный препарат предназначен для лечения пациента с хронической инфекцией вирусом гепатита В.

41. Способ лечения или профилактики HBV-инфекции или HBV-связанного заболевания или патологического состояния, который включает введение в организм человека или животного, который нуждается в этом, эффективного количества по меньшей мере одной иммуногенной композиции по любому из пп. 1-21, нуклеиновокислотной молекулы по любому из пп. 22-23, вектора по любому из пп. 24-31, инфекционной вирусной частицы по п. 32 или 33 или композиции по любому из пп. 34-38.

42. Способ лечения по п. 41, где HBV-инфекция представляет собой хроническую инфекцию вируса гепатита В.

43. Способ или применение по любому из пп. 39-42, которое проводится в комбинации со стандартной медицинской помощью.

44. Способ или применение по п. 43, где стандартная медицинская помощь включает цитокины и/или нуклеотидные или нуклеозидные аналоги, выбранные из группы, состоящей из ламивудина, энтекавира, телбивудина, адефовира, дипивоксила и тенофовира.

45. Способ индукции или стимуляции иммунного ответа против HBV в организме хозяина, включающий введение в указанный организм по меньшей мере одной иммуногенной композиции по любому из пп. 1-21, нуклеиновокислотной молекулы по любому из пп. 22-23, вектора по любому из пп. 24-31, инфекционной вирусной частицы по п. 32 или 33 или композиции по любому из пп. 34-38.

46. Способ индукции или стимуляции иммунного ответа по п. 45, где иммунный ответ представляет собой CD4+ и/или CD8+ - опосредованный ответ.

47. Набор для применения в лечении HBV-инфекции, который включает множество активных агентов, выбранных из группы, состоящей из иммуногенной композиции по любому из пп. 1-21, нуклеиновокислотной молекулы по любому из пп. 22-23, вектора по любому из пп. 24-31, инфекционной вирусной частицы по п. 32 или 33 или композиции по любому из пп. 34-38.

48. Набор по п. 47, который включает первый вектор, содержащий нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую полимеразу часть, которая определена в любом из пп. 1 и 6-12, и второй вектор, содержащий нуклеиновокислотную молекулу, кодирующую сердцевинную и оболочечную часть, которые определены в любом из пп. 1 и 13-21.

49. Набор по п. 48, где первый указанный вектор является MVA-вектором, который определен в п. 31(i), а указанный второй вектор является MVA-вектором, который определен в п. 31(ii).

50. Набор по п. 48, где указанный первый вектор является Ad-вектором, который определен в п. 31(iii), а указанный второй вектор является Ad-вектором, который определен в п. 31(iv).

51. Набор по любому из пп. 48-50, также включающий третий вектор, экспрессирующий иммуномодулятор.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> TRANSGENE S.A.

<120> Composition for treating HBV infection

<130> TG200

<160> 61

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 832

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 1

Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg Leu Leu Leu Leu Asp Asp
 1 5 10 15

Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly
 20 25 30

Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val
 35 40 45

Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp Lys Thr Pro Ser Phe Pro
 65 70 75 80

Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys Lys Cys Glu Gln Phe Val
 85 90 95

Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Gln Leu Ile Met Pro
 100 105 110

Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly
 115 120 125

Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr
 130 135 140

Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg
 145 150 155 160

Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu
 165 170 175

Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe His Gln Gln Ser Ser Gly
 180 185 190

Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser Lys His Arg
 195 200 205

Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg
 210 215 220

Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gly Ile His Pro Thr Ala
 225 230 235 240

Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Asn
 245 250 255

Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Gln Ser Pro Val Arg Lys
 260 265 270

Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser Ser Ser Gly
 275 280 285

His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln
 290 295 300

Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser
 305 310 315 320

Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu
 325 330 335

Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro
 340 345 350

Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn
 355 360 365

Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe
 370 375 380

Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn
 385 390 395 400

Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser
 405 410 415

RU 2 555 346 C2

Leu	Asp	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Tyr	His	Leu	Pro	Leu	His	Pro	Ala	Ala	420	425	430	
Met	Pro	His	Leu	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Arg	Tyr	Val	Ala	435	440	445	
Arg	Leu	Ser	Ser	Asn	Ser	Arg	Ile	Phe	Asn	Tyr	Gln	His	Gly	Thr	Met	450	455	460	
Gln	Asn	Leu	His	Asp	Ser	Cys	Ser	Arg	Asn	Leu	Tyr	Val	Ser	Leu	Leu	465	470	475	480
Leu	Leu	Tyr	Gln	Thr	Phe	Gly	Arg	Lys	Leu	His	Leu	Tyr	Ser	His	Pro	485	490	495	
Ile	Ile	Leu	Gly	Phe	Arg	Lys	Ile	Pro	Met	Gly	Val	Gly	Leu	Ser	Pro	500	505	510	
Phe	Leu	Leu	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Ala	Ile	Cys	Ser	Val	Val	Arg	Arg	515	520	525	
Ala	Phe	Pro	His	Cys	Leu	Ala	Phe	Ser	Tyr	Met	Asp	Asp	Val	Val	Leu	530	535	540	
Gly	Ala	Lys	Ser	Val	Gln	His	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Ala	Val	Thr	545	550	555	560
Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Ile	His	Leu	Asn	Pro	Asn	Lys	Thr	Lys	565	570	575	
Arg	Trp	Gly	Tyr	Ser	Leu	His	Phe	Met	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Cys	Tyr	580	585	590	
Gly	Ser	Leu	Pro	Gln	Asp	His	Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Glu	Cys	Phe	595	600	605	
Arg	Lys	Leu	Pro	Val	Asn	Arg	Pro	Ile	Asp	Trp	Lys	Val	Cys	Gln	Arg	610	615	620	
Ile	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Pro	Phe	Thr	Gln	Cys	Gly	Tyr	625	630	635	640
Pro	Ala	Leu	Met	Pro	Leu	Tyr	Ala	Cys	Ile	Gln	Ser	Lys	Gln	Ala	Phe	645	650	655	

RU 2 555 346 C2

Thr	Phe	Ser	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Cys	Lys	Gln	Tyr	Leu	Asn
			660					665					670		
Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Cys	Gln	Val	Phe	Ala
		675					680					685			
Asp	Ala	Thr	Pro	Thr	Gly	Trp	Gly	Leu	Val	Met	Gly	His	Gln	Arg	Met
	690					695					700				
Arg	Gly	Thr	Phe	Leu	Ala	Pro	Leu	Pro	Ile	His	Thr	Ala	Glu	Leu	Leu
705					710					715					720
Ala	Ala	Cys	Phe	Ala	Arg	Ser	Arg	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr
				725					730					735	
Asp	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser	Phe	Pro	Trp	Leu
			740					745					750		
Leu	Gly	Cys	Ala	Ala	Asn	Trp	Ile	Leu	Arg	Gly	Thr	Ser	Phe	Val	Tyr
		755					760						765		
Val	Pro	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Thr	Asp	Asp	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Leu
	770					775					780				
Gly	Leu	Ser	Arg	Pro	Leu	Leu	Arg	Leu	Pro	Phe	Arg	Pro	Thr	Thr	Gly
785					790					795					800
Arg	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Ser	His	Leu	Pro
				805					810					815	
Asp	Arg	Val	His	Phe	Ala	Ser	Pro	Leu	His	Val	Ala	Trp	Arg	Pro	Pro
			820					825					830		
<210>	2														
<211>	183														
<212>	PRT														
<213>	Hepatitis B virus														
<400>	2														
Met	Asp	Ile	Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp
			20					25					30		

RU 2 555 346 C2

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
165 170 175

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180

<210> 3
<211> 226
<212> PRT
<213> Hepatitis B virus

<400> 3

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
35 40 45

RU 2 555 346 C2

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60

Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 215 220

Tyr Ile
225

<210> 4
<211> 2499
<212> DNA
<213> Hepatitis B virus

<400> 4
atgcccttat cttatcaaca cttccggaga ctactgttgt tagacgacga ggcaggtccc 60
ctagaagaag aactccctcg cctcgcagac gaaggtctca atcgccgcgt cgcagaagat 120
ctcaatctcg ggaatctcaa tgtagtatt ccttggaactc ataaggtggg aaactttacg 180

gggcttttatt cttctactgt acctgtcttt aaccctcatt ggaaaacacc ctcttttcct	240
aatatacatt tacaccaaga cattatcaaa aaatgtgaac aatttgtagg cccactcaca	300
gtcaatgaga aaagaagact gcaattgatt atgcctgcta ggttttatcc aaatgttacc	360
aaatatttgc cattggataa ggggtattaaa ctttattatc cagaacatct agttaatcat	420
tacttccaaa ccagacatta tttacacact ctatggaagg cgggtatatt atataagaga	480
gaaacaacac atagtgcctc attttgtggg tcaccatatt cttggaaca aaagctacag	540
catggggcag aatctttcca ccagcaatcc tctgggattc tttcccgacc accagttgga	600
tccagccttc agagcaaaca ccgcaaatcc agattgggac ttcaatccca acaaggacac	660
ctggccagac gccaacaagg taggagctgg agcattcggg ctgggattca ccccaccgca	720
cggaggtctt ttgggggtgga gccctcaggc tcagggcatt ctacaaacct tgccagcaaa	780
tccgcctcct gcctctacca atcgccagtc aggaaggcag cctaccccgc tgtctccacc	840
tttgagaaac actcatcctc aggccatgca gtggaactcc acaaccttcc accaaactct	900
gcaagatccc agagtgagag gcctgtattt cctgctggt ggctccagtt caggaacagt	960
aaacctgtt ccgactactg tctctcccat atcgtcaatc ttctcgagga ttggggaccc	1020
tgcgctgaac atggagaaca tcacatcagg attcctagga cccctgctcg tgttacaggc	1080
gggggttttc ttgttgacaa gaatcctcac aataccgcag agtctagact cgtgggtggac	1140
ttctctcaat tttctagggg gaactaccgt gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac	1200
ctccaatcac tcaccaacct cctgtcctcc aacctgtcct ggttatcgct ggatgtgtct	1260
gcggcgtttt atcatcttcc tcttcacct gctgctatgc ctcatcttct tgttggttct	1320
tctggactat caaggatatgt tgcccgtttg tcctctaatt ccaggatctt caactaccag	1380
cacgggacca tgcagaacct gcacgactcc tgctcaagga acctctatgt atccctcctg	1440
ttgctgtacc aaaccttcgg acggaaattg cacctgtatt cccatcccat catcctgggc	1500
tttcggaaaa ttcctatggg agtgggcctc agcccgtttc tcctggctca gtttactagt	1560
gccatttggt cagtgggtcg tagggctttc cccactgtt tggctttcag ttatatggat	1620
gatgtggtat tggggggcaa gtctgtacag catcttgagt ccctttttac cgctgttacc	1680
aattttcttt tgtctttggg tatacattta aaccctaaca aaacaaaaag atgggggttac	1740
tctttacatt tcatgggcta tgtcattgga tgttatgggt cattgccaca agatcacatc	1800
atacaaaaaa tcaaagaatg ttttcgaaaa cttcctgtta acagacctat tgattggaaa	1860
gtctgtcaac gtattgtggg tcttttgggt tttgctgccc cttttacaca atgtggttat	1920
cctgctttta tgcccttgta tgcattgtatt cagtccaagc aggcttttac tttctcgcca	1980

acttacaagg cctttctgtg taaacaatac ctgaaccttt accccgttgc ccggcaacgg 2040
ccaggtctgt gccaaagtgt tgctgacgca acccccactg gctggggctt ggcatgggc 2100
catcagcgca tgcgtggaac ctttctggct cctctgccga tccatactgc ggaactccta 2160
gccgcttggt ttgctcgag caggtctgga gcaaacattc tcgggacgga taactctgtt 2220
gttctctccc gcaaataac atcgtttcca tggctgctag gctgtgctgc caactggatc 2280
ctgcgcggga cgtcctttgt ttacgtcccg tcggcgctga atcccacgga cgacccttct 2340
cggggctcgt tggggctctc tcgtcccctt ctccgtctac cgtttcgacc gaccacgggg 2400
cgcacctctc ttacgcgga ctcccgtct gtgccttctc atctgccgga ccgtgtgcac 2460
ttcgcttcac ctctgcacgt cgcattggaga ccaccgtga 2499

<210> 5
<211> 552
<212> DNA
<213> Hepatitis B virus

<400> 5
atggacattg atccttataa agaatttggg gctactgtgg agttactctc ttttttgcct 60
tctgacttct ttccttcagt acgtgatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa 120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttggg agatccaata 240
tccaggggacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gcctaaagtt ccggcaacta 300
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga atatttggtg 360
tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaagtc ccctatctta 420
tcaacacttc cgagactac tgttggtaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact 480
ccctgcctc gcagacgaag gtctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa 540
tctcaatggt aa 552

<210> 6
<211> 681
<212> DNA
<213> Hepatitis B virus

<400> 6
atggagaaca tcacatcagg attcctagga cccctgctcg tggtacaggc ggggtttttc 60
ttgttgacaa gaatcctcac aataccgag agtctagact cgtgggtggac ttctctcaat 120
tttctagggg gaactaccgt gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac 180
tcaccaacct cctgtcctcc aacctgtcct gggtatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt 240

atcatcttcc tcttcatect gctgctatgc ctcatcttct tgttggttct tctggactat 300
 caaggtatgt tgcccgtttg tcctctaatt ccaggatctt caactaccag cacgggacca 360
 tgcagaacct gcacgactcc tgctcaagga acctctatgt atccctcctg ttgctgtacc 420
 aaaccttcgg acggaaattg cacctgtatt cccatcccat catcctgggc tttcggaanaa 480
 ttcctatggg agtgggcctc agcccgtttc tcctggetca gtttactagt gccatttggt 540
 cagtggttcg tagggctttc cccactgtt tggctttcag ttatatggat gatgtggtat 600
 tgggggcca gtctgtacag catcttgagt ccctttttac cgctgttacc aattttcttt 660
 tgtctttggg tatacattta a 681

<210> 7
 <211> 786
 <212> PRT
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> N-terminally truncated HBV polymerase (48-832)
 <400> 7

Met Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu
 1 5 10 15

Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp Lys Thr Pro Ser
 20 25 30

Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys Lys Cys Glu Gln
 35 40 45

Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Gln Leu Ile
 50 55 60

Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp
 65 70 75 80

Lys Gly Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe
 85 90 95

Gln Thr Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr
 100 105 110

Lys Arg Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser
 115 120 125

Trp Glu Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe His Gln Gln Ser

130	135	140
Ser Gly Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser Lys 145 150 155 160		
His Arg Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln Gly His Leu Ala 165 170 175		
Arg Arg Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gly Ile His Pro 180 185 190		
Thr Ala Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Ser 195 200 205		
Thr Asn Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Gln Ser Pro Val 210 215 220		
Arg Lys Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser Ser 225 230 235 240		
Ser Gly His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg 245 250 255		
Ser Gln Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg 260 265 270		
Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu 275 280 285		
Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile Arg 290 295 300		
Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp 305 310 315 320		
Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser 325 330 335		
Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val 340 345 350		
Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp 355 360 365		
Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro		

370					375					380					
Ala	Ala	Met	Pro	His	Leu	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Arg	Tyr
385					390					395					400
Val	Ala	Arg	Leu	Ser	Ser	Asn	Ser	Arg	Ile	Phe	Asn	Tyr	Gln	His	Gly
			405						410					415	
Thr	Met	Gln	Asn	Leu	His	Asp	Ser	Cys	Ser	Arg	Asn	Leu	Tyr	Val	Ser
			420					425					430		
Leu	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Thr	Phe	Gly	Arg	Lys	Leu	His	Leu	Tyr	Ser
		435					440					445			
His	Pro	Ile	Ile	Leu	Gly	Phe	Arg	Lys	Ile	Pro	Met	Gly	Val	Gly	Leu
	450					455					460				
Ser	Pro	Phe	Leu	Leu	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Ala	Ile	Cys	Ser	Val	Val
465					470					475					480
Arg	Arg	Ala	Phe	Pro	His	Cys	Leu	Ala	Phe	Ser	Tyr	Met	Asp	Asp	Val
				485					490					495	
Val	Leu	Gly	Ala	Lys	Ser	Val	Gln	His	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Ala
			500					505					510		
Val	Thr	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Ile	His	Leu	Asn	Pro	Asn	Lys
		515					520					525			
Thr	Lys	Arg	Trp	Gly	Tyr	Ser	Leu	His	Phe	Met	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly
	530					535					540				
Cys	Tyr	Gly	Ser	Leu	Pro	Gln	Asp	His	Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Glu
545					550					555					560
Cys	Phe	Arg	Lys	Leu	Pro	Val	Asn	Arg	Pro	Ile	Asp	Trp	Lys	Val	Cys
				565					570					575	
Gln	Arg	Ile	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Pro	Phe	Thr	Gln	Cys
			580					585					590		
Gly	Tyr	Pro	Ala	Leu	Met	Pro	Leu	Tyr	Ala	Cys	Ile	Gln	Ser	Lys	Gln
		595					600					605			
Ala	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Cys	Lys	Gln	Tyr

610	615	620
Leu Asn Leu Tyr Pro Val Ala Arg Gln Arg Pro Gly Leu Cys Gln Val		
625	630	635 640
Phe Ala Asp Ala Thr Pro Thr Gly Trp Gly Leu Val Met Gly His Gln		
	645	650 655
Arg Met Arg Gly Thr Phe Leu Ala Pro Leu Pro Ile His Thr Ala Glu		
	660	665 670
Leu Leu Ala Ala Cys Phe Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ala Asn Ile Leu		
	675	680 685
Gly Thr Asp Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro		
	690	695 700
Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe		
705	710	715 720
Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu Asn Pro Thr Asp Asp Pro Ser Arg Gly		
	725	730 735
Arg Leu Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr		
	740	745 750
Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His		
	755	760 765
Leu Pro Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg		
	770	775 780
Pro Pro		
785		
<210> 8		
<211> 832		
<212> PRT		
<213> artificial sequence		
<220>		
<223> mutated polymerase deficient in RTase and RNase H activities		
<400> 8		
Met Pro Leu Ser Tyr Gln His Phe Arg Arg Leu Leu Leu Leu Asp Asp		
1	5	10 15

Glu Ala Gly Pro Leu Glu Glu Glu Leu Pro Arg Leu Ala Asp Glu Gly
 20 25 30

Leu Asn Arg Arg Val Ala Glu Asp Leu Asn Leu Gly Asn Leu Asn Val
 35 40 45

Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro His Trp Lys Thr Pro Ser Phe Pro
 65 70 75 80

Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile Ile Lys Lys Cys Glu Gln Phe Val
 85 90 95

Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys Arg Arg Leu Gln Leu Ile Met Pro
 100 105 110

Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr Lys Tyr Leu Pro Leu Asp Lys Gly
 115 120 125

Ile Lys Pro Tyr Tyr Pro Glu His Leu Val Asn His Tyr Phe Gln Thr
 130 135 140

Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg
 145 150 155 160

Glu Thr Thr His Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu
 165 170 175

Gln Lys Leu Gln His Gly Ala Glu Ser Phe His Gln Gln Ser Ser Gly
 180 185 190

Ile Leu Ser Arg Pro Pro Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser Lys His Arg
 195 200 205

Lys Ser Arg Leu Gly Leu Gln Ser Gln Gln Gly His Leu Ala Arg Arg
 210 215 220

Gln Gln Gly Arg Ser Trp Ser Ile Arg Ala Gly Ile His Pro Thr Ala
 225 230 235 240

Arg Arg Ser Phe Gly Val Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Ser Thr Asn
 245 250 255

Leu Ala Ser Lys Ser Ala Ser Cys Leu Tyr Gln Ser Pro Val Arg Lys
 260 265 270

Ala Ala Tyr Pro Ala Val Ser Thr Phe Glu Lys His Ser Ser Ser Gly
 275 280 285

His Ala Val Glu Leu His Asn Leu Pro Pro Asn Ser Ala Arg Ser Gln
 290 295 300

Ser Glu Arg Pro Val Phe Pro Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser
 305 310 315 320

Lys Pro Cys Ser Asp Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu
 325 330 335

Asp Trp Gly Pro Cys Ala Glu His Gly Glu His His Ile Arg Ile Pro
 340 345 350

Arg Thr Pro Ala Arg Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn
 355 360 365

Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe
 370 375 380

Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn
 385 390 395 400

Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser
 405 410 415

Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala
 420 425 430

Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala
 435 440 445

Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile Phe Asn Tyr Gln His Gly Thr Met
 450 455 460

Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu
 465 470 475 480

Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro
 485 490 495

Ile	Ile	Leu	Gly	Phe	Arg	Lys	Ile	Pro	Met	Gly	Val	Gly	Leu	Ser	Pro			
			500					505					510					
Phe	Leu	Leu	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Ala	Ile	Cys	Ser	Val	Val	Arg	Arg			
		515					520					525						
Ala	Phe	Pro	His	Cys	Leu	Ala	Phe	Ser	Tyr	Met	His	Asp	Val	Val	Leu			
	530					535					540							
Gly	Ala	Lys	Ser	Val	Gln	His	Leu	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Ala	Val	Thr			
545					550					555					560			
Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Ile	His	Leu	Asn	Pro	Asn	Lys	Thr	Lys			
				565					570					575				
Arg	Trp	Gly	Tyr	Ser	Leu	His	Phe	Met	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Cys	Tyr			
			580					585					590					
Gly	Ser	Leu	Pro	Gln	Asp	His	Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Glu	Cys	Phe			
		595					600					605						
Arg	Lys	Leu	Pro	Val	Asn	Arg	Pro	Ile	Asp	Trp	Lys	Val	Cys	Gln	Arg			
	610					615					620							
Ile	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Pro	Phe	Thr	Gln	Cys	Gly	Tyr			
625					630					635					640			
Pro	Ala	Leu	Met	Pro	Leu	Tyr	Ala	Cys	Ile	Gln	Ser	Lys	Gln	Ala	Phe			
				645					650					655				
Thr	Phe	Ser	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Cys	Lys	Gln	Tyr	Leu	Asn			
			660					665					670					
Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Cys	Gln	Val	Phe	Ala			
		675					680					685						
Asp	Ala	Thr	Pro	Thr	Gly	Trp	Gly	Leu	Val	Met	Gly	His	Gln	Arg	Met			
	690					695					700							
Arg	Gly	Thr	Phe	Leu	Ala	Pro	Leu	Pro	Ile	His	Thr	Ala	His	Leu	Leu			
705					710					715					720			
Ala	Ala	Cys	Phe	Ala	Arg	Ser	Arg	Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr			
				725					730					735				

Asp Asn Ser Val Val Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu
740 745 750

Leu Gly Cys Ala Ala Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr
755 760 765

Val Pro Ser Ala Leu Asn Pro Thr Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu
770 775 780

Gly Leu Ser Arg Pro Leu Leu Arg Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly
785 790 795 800

Arg Thr Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val Pro Ser His Leu Pro
805 810 815

Asp Arg Val His Phe Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro
820 825 830

<210> 9

<211> 874

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> truncated and mutated HBV polymerase fused to the transmembrane domain of rabies glycoprotein (TMR)

<400> 9

Met Val Pro Gln Ala Leu Leu Phe Val Pro Leu Leu Val Phe Pro Leu
1 5 10 15

Cys Phe Gly Lys Phe Pro Ile Val Ser Ile Pro Trp Thr His Lys Val
20 25 30

Gly Asn Phe Thr Gly Leu Tyr Ser Ser Thr Val Pro Val Phe Asn Pro
35 40 45

His Trp Lys Thr Pro Ser Phe Pro Asn Ile His Leu His Gln Asp Ile
50 55 60

Ile Lys Lys Cys Glu Gln Phe Val Gly Pro Leu Thr Val Asn Glu Lys
65 70 75 80

Arg Arg Leu Gln Leu Ile Met Pro Ala Arg Phe Tyr Pro Asn Val Thr
85 90 95

Lys	Tyr	Leu	Pro	Leu	Asp	Lys	Gly	Ile	Lys	Pro	Tyr	Tyr	Pro	Glu	His	
			100					105						110		
Leu	Val	Asn	His	Tyr	Phe	Gln	Thr	Arg	His	Tyr	Leu	His	Thr	Leu	Trp	
			115					120						125		
Lys	Ala	Gly	Ile	Leu	Tyr	Lys	Arg	Glu	Thr	Thr	His	Ser	Ala	Ser	Phe	
			130					135						140		
Cys	Gly	Ser	Pro	Tyr	Ser	Trp	Glu	Gln	Lys	Leu	Gln	His	Gly	Ala	Glu	
						150						155			160	
Ser	Phe	His	Gln	Gln	Ser	Ser	Gly	Ile	Leu	Ser	Arg	Pro	Pro	Val	Gly	
						165					170				175	
Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Lys	His	Arg	Lys	Ser	Arg	Leu	Gly	Leu	Gln	Ser	
			180					185						190		
Gln	Gln	Gly	His	Leu	Ala	Arg	Arg	Gln	Gln	Gly	Arg	Ser	Trp	Ser	Ile	
			195					200						205		
Arg	Ala	Gly	Ile	His	Pro	Thr	Ala	Arg	Arg	Ser	Phe	Gly	Val	Glu	Pro	
			210					215						220		
Ser	Gly	Ser	Gly	His	Ser	Thr	Asn	Leu	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Ser	Cys	
								230					235		240	
Leu	Tyr	Gln	Ser	Pro	Val	Arg	Lys	Ala	Ala	Tyr	Pro	Ala	Val	Ser	Thr	
						245					250				255	
Phe	Glu	Lys	His	Ser	Ser	Ser	Gly	His	Ala	Val	Glu	Leu	His	Asn	Leu	
						260					265				270	
Pro	Pro	Asn	Ser	Ala	Arg	Ser	Gln	Ser	Glu	Arg	Pro	Val	Phe	Pro	Cys	
						275					280			285		
Trp	Trp	Leu	Gln	Phe	Arg	Asn	Ser	Lys	Pro	Cys	Ser	Asp	Tyr	Cys	Leu	
						290						300				
Ser	His	Ile	Val	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Trp	Gly	Pro	Cys	Ala	Glu	His	
						310						315			320	
Gly	Glu	His	His	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Thr	Pro	Ala	Arg	Val	Thr	Gly	
						325						330			335	

Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala Glu Ser Arg
 340 345 350

Leu Val Val Asp Phe Ser Gln Phe Ser Arg Gly Asn Tyr Arg Val Ser
 355 360 365

Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr Asn Leu Leu
 370 375 380

Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr
 385 390 395 400

His Leu Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Val Gly Ser
 405 410 415

Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Asn Ser Arg Ile
 420 425 430

Phe Asn Tyr Gln His Gly Thr Met Gln Asn Leu His Asp Ser Cys Ser
 435 440 445

Arg Asn Leu Tyr Val Ser Leu Leu Leu Leu Tyr Gln Thr Phe Gly Arg
 450 455 460

Lys Leu His Leu Tyr Ser His Pro Ile Ile Leu Gly Phe Arg Lys Ile
 465 470 475 480

Pro Met Gly Val Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser
 485 490 495

Ala Ile Cys Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe
 500 505 510

Ser Tyr Met His Asp Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His Leu
 515 520 525

Glu Ser Leu Phe Thr Ala Val Thr Asn Phe Leu Leu Ser Leu Gly Ile
 530 535 540

His Leu Asn Pro Asn Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu His Phe
 545 550 555 560

Met Gly Tyr Val Ile Gly Cys Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Asp His Ile
 565 570 575

Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Glu	Cys	Phe	Arg	Lys	Leu	Pro	Val	Asn	Arg	Pro	580	585	590	
Ile	Asp	Trp	Lys	Val	Cys	Gln	Arg	Ile	Val	Gly	Leu	Leu	Gly	Phe	Ala	595	600	605	
Ala	Pro	Phe	Thr	Gln	Cys	Gly	Tyr	Pro	Ala	Leu	Met	Pro	Leu	Tyr	Ala	610	615	620	
Cys	Ile	Gln	Ser	Lys	Gln	Ala	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	625	630	635	640
Phe	Leu	Cys	Lys	Gln	Tyr	Leu	Asn	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Arg	Gln	Arg	645	650	655	
Pro	Gly	Leu	Cys	Gln	Val	Phe	Ala	Asp	Ala	Thr	Pro	Thr	Gly	Trp	Gly	660	665	670	
Leu	Val	Met	Gly	His	Gln	Arg	Met	Arg	Gly	Thr	Phe	Leu	Ala	Pro	Leu	675	680	685	
Pro	Ile	His	Thr	Ala	His	Leu	Leu	Ala	Ala	Cys	Phe	Ala	Arg	Ser	Arg	690	695	700	
Ser	Gly	Ala	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr	Asp	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ser	Arg	705	710	715	720
Lys	Tyr	Thr	Ser	Phe	Pro	Trp	Leu	Leu	Gly	Cys	Ala	Ala	Asn	Trp	Ile	725	730	735	
Leu	Arg	Gly	Thr	Ser	Phe	Val	Tyr	Val	Pro	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Thr	740	745	750	
Asp	Asp	Pro	Ser	Arg	Gly	Arg	Leu	Gly	Leu	Ser	Arg	Pro	Leu	Leu	Arg	755	760	765	
Leu	Pro	Phe	Arg	Pro	Thr	Thr	Gly	Arg	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	770	775	780	
Pro	Ser	Val	Pro	Ser	His	Leu	Pro	Asp	Arg	Val	His	Phe	Ala	Ser	Pro	785	790	795	800
Leu	His	Val	Ala	Trp	Arg	Pro	Pro	Tyr	Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Gly	Ala	805	810	815	

Leu Thr Ala Leu Met Leu Ile Ile Phe Leu Met Thr Cys Cys Arg Arg
820 825 830

Val Asn Arg Ser Glu Pro Thr Gln His Asn Leu Arg Gly Thr Gly Arg
835 840 845

Glu Val Ser Val Thr Pro Gln Ser Gly Lys Ile Ile Ser Ser Trp Glu
850 855 860

Ser His Lys Ser Gly Gly Glu Thr Arg Leu
865 870

<210> 10
<211> 148
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> truncated core (1-148)

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Thr Thr Val
145

<210> 11
<211> 140
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> truncated and deleted HBV core (1-76 and 85-148)

<400> 11

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

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

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

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

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Val Val Ser Tyr
65 70 75 80

Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His
85 90 95

Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val
100 105 110

Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn
115 120 125

Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val
130 135 140

<210> 12
<211> 39
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> HBV immunogenic domain Env1 (14-51)

<400> 12

Met Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10 15

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly
20 25 30

Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln
35

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> HBV immunogenic domain Env2 (165-194)

<400> 13

Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val
1 5 10 15

Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
20 25 30

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> HBV immunogenic domain Env 3 (81-106)

<400> 14

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
1 5 10 15

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val
20 25

<210> 15

<211> 25

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> HBV immunogenic domain Env 4 (202-226)

<400> 15

Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro
1 5 10 15

Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
20 25

<210> 16
<211> 69
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> fusion of HBV immunogenic domains Env1-Env2

<400> 16

Met Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10 15

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly
20 25 30

Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu
35 40 45

Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
50 55 60

Val Trp Leu Ser Val
65

<210> 17
<211> 94
<212> PRT
<213> artificial sequences

<220>
<223> fusion of HBV immunogenic domains Env1-Env2-Env4

<400> 17

Met Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
1 5 10 15

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly
20 25 30

Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu
35 40 45

Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr
50 55 60

Val Trp Leu Ser Val Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe
65 70 75 80

Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
85 90

<210> 18

<211> 179

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> fusion of truncated and deleted core (1-76 85-148) with HBV immunogenic domain Env 1

<400> 18

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

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

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

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

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Val Val Ser Tyr
65 70 75 80

Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His
85 90 95

Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val
100 105 110

Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn
115 120 125

Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Met Val Leu Gln
130 135 140

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

```

145                               150                               155                               160
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
      165                               170                               175

Leu Gly Gln

<210> 19
<211> 208
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> fusion of truncated and deleted core (1-76 85-148) with HBV
      immunogenic domains Env1 and Env2

<400> 19

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

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

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

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

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Val Val Ser Tyr
65      70      75      80

Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His
      85      90      95

Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val
      100      105      110

Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn
      115      120      125

Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Leu Gln Ala
      130      135      140

Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp
145      150      155      160

```

Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu
165 170 175

Gly Gln Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro
180 185 190

Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
195 200 205

<210> 20

<211> 276

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> fusion of core with HBV immunogenic domains Env1, Env2 and Env4

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
165 170 175

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu
180 185 190

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser
195 200 205

Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Trp Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe
225 230 235 240

Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Gly Pro Ser Leu Tyr
245 250 255

Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu
260 265 270

Trp Val Tyr Ile
275

<210> 21
<211> 2361
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> nucleotide sequence encoding HBV truncated polymerase (48-832)

<400> 21
atgggttagta ttccttggac tcataaggtg ggaaacttta cggggcttta ttcttctact 60
gtacctgtct ttaaccctca ttggaaaaca ccctcttttc ctaatataca ttacaccaa 120
gacattatca aaaaatgtga acaatttgta ggccactca cagtcaatga gaaaagaaga 180
ctgcaattga ttatgcctgc taggttttat ccaaagtta ccaaataatt gccattggat 240
aagggtatta aaccttatta tccagaacat ctagttaatc attacttcca aaccagacat 300
tatttacaca ctctatggaa ggcgggtata ttatataaga gagaaacaac acatagtgcc 360
tcattttgtg ggtcaccata ttcttgggaa caaaagctac agcatggggc agaattcttc 420
caccagcaat cctctgggat tctttcccga ccaccagttg gatccagcct tcagagcaaa 480

caccgcaa at ccagattggg acttcaatcc caacaaggac acctggccag acgccaacaa 540
ggtaggagct ggagcattcg ggctgggatt caccaccacg cacggaggtc ttttgggggtg 600
gagccctcag gctcagggca ttctacaaac cttgccagca aatccgcctc ctgcctctac 660
caatcgccag tcaggaaggc agcctacccc gctgtctcca cctttgagaa acactcatcc 720
tcaggccatg cagtggaaact ccacaacctt ccaccaaact ctgcaagatc ccagagttag 780
aggcctgtat ttccctgctg gtgggtccag ttcaggaaca gtaaaccctg ttccgactac 840
tgtctctccc atatcgtcaa tcttctcgag gattggggac cctgcgctga acatggagaa 900
catcacatca ggattcctag gaccctgct cgtgttacag gcggggtttt tcttggtgac 960
aagaatcctc acaataccgc agagtctaga ctctgggtgg acttctctca attttctagg 1020
gggaactacc gtgtgtcttg gccaaaattc gcagtcccca acctccaatc actcaccaac 1080
ctcctgtcct ccaacctgtc ctggttatcg ctggatgtgt ctgcggcggt ttatcatctt 1140
cctcttcac cctgtgctat gcctcatctt cttgttggtt cttctggact atcaaggat 1200
gttgcccggt tgcctctaa ttccaggatc ttcaactacc agcacgggac catgcagaac 1260
ctgcacgact cctgctcaag gaacctctat gtatccctcc tgttgctgta ccaaaccttc 1320
ggacggaaat tgcacctgta ttcccatccc atcatcctgg gctttcgga aattcctatg 1380
ggagtgggccc tcagcccggt tctcctggct cagtttacta gtgccatttg ttcagtgggt 1440
cgtagggcct tccccactg tttggctttc agttatatgg atgatgtggt attggggggc 1500
aagtctgtac agcatcttga gtcccttttt accgctgtta ccaattttct tttgtcttg 1560
ggtatacatt taaaccctaa caaaacaaaa agatgggggtt actctttaca tttcatgggc 1620
tatgtcattg gatgttatgg gtcattgcca caagatcaca tcatacaaaa aatcaaagaa 1680
tgttttcgaa aacttctgt taacagacct attgattgga aagtctgtca acgtattgtg 1740
ggtcttttgg gttttgctgc cctttttaca caatgtgggt atcctgcttt aatgccttg 1800
tatgcatgta ttcagtcgaa gcaggctttt actttctcgc caacttaca ggcctttctg 1860
tgtaaacaat acctgaacct ttaccccggt gcccggaac ggccaggctt gtgccaagt 1920
tttgctgacg caacccccac tggctggggc ttgggtcatg gccatcagcg catgcgtgga 1980
acctttctgg ctctctgccc gatccatact gcggaactcc tagccgcttg ttttgctcgc 2040
agcaggctctg gagcaaacat tctcgggacg gataactctg ttgttctctc ccgcaaatat 2100
acatcgtttc catggctgct aggctgtgct gccaaactgga tctgcgcgg gacgtccttt 2160
gtttacgtcc cgtcggcgct gaatcccacg gacgaccctt ctcggggtcg cttggggctc 2220
tctcgtcccc ttctccgtct accgtttcga ccgaccacgg ggcgcacctc tctttacgcg 2280

gactccccgt ctgtgccttc tcatctgccg gaccgtgtgc acttcgcttc acctctgcac 2340
gtcgcacatgga gaccaccgtg a 2361

<210> 22
<211> 2499
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> nucleotide sequence encoding a mutated HBV polymerase deficient
for RTase and RNase activities

<400> 22
atgcccttat cttatcaaca cttccggaga ctactgttgt tagacgacga ggcagggtccc 60
ctagaagaag aactccctcg cctcgcagac gaaggctctca atcgccgcgt cgcagaagat 120
ctcaatctcg ggaatctcaa tgttagtatt ccttggactc ataagggtggg aaacttttacg 180
gggctttatt cttctactgt acctgtcttt aaccctcatt ggaaaacacc ctcttttcct 240
aatatacatt tacaccaaga cattatcaaa aaatgtgaac aatttgtagg cccactcaca 300
gtcaatgaga aaagaagact gcaattgatt atgcctgcta ggttttatcc aaatgttacc 360
aaatattttgc cattggataa ggggtattaaa ccttattatc cagaacatct agttaatcat 420
tacttccaaa ccagacatta tttacacact ctatggaagg cgggtatatt atataagaga 480
gaaacaacac atagtgcctc attttgtggg tcaccatatt cttgggaaca aaagctacag 540
catggggcag aatctttcca ccagcaatcc tctgggattc tttcccgacc accagttgga 600
tccagccttc agagcaaaca ccgcaaatcc agattgggac ttcaatccca acaaggacac 660
ctggccagac gccacaagg taggagctgg agcattcggg ctgggattca cccaccgca 720
cggagggtctt ttgggggtgga gccctcaggc tcagggcatt ctacaaacct tgccagcaaa 780
tccgcctcct gcctctacca atcgccagtc aggaaggcag cctaccccg c tgtctccacc 840
tttgagaaac actcatcctc aggccatgca gtggaactcc acaaccttcc accaaactct 900
gcaagatccc agagtgagag gcctgtatct ccctgctggt ggctccagtt caggaacagt 960
aaaccctgtt ccgactactg tctctcccat atcgtcaatc ttctcgagga ttgggggaccc 1020
tgcgctgaac atggagaaca tcacatcagg attcctagga cccctgctcg tgttacaggc 1080
gggggtttttc ttgttgacaa gaatcctcac aataccgcag agtctagact cgtgggtggac 1140
ttctctcaat tttctagggg gaactaccgt gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac 1200
ctccaatcac tcaccaacct cctgtcctcc aacctgtcct ggttatcgct ggatgtgtct 1260
gcggcggtttt atcatcttcc tcttcatcct gctgctatgc ctcatcttct tgttggttct 1320

tctggactat caaggtatgt tgcccgtttg tctcttaatt ccaggatctt caactaccag 1380
 cacgggacca tgcagaacct gcacgactcc tgctcaagga acctctatgt atccctcctg 1440
 ttgctgtacc aaaccttcgg acggaaattg cacctgtatt cccatcccat catcctgggc 1500
 tttcggaaaa ttcctatggg agtgggcctc agcccgtttc tcttggtca gtttactagt 1560
 gccatttgtt cagtggttcg tagggctttc cccactgtt tggttttcag ttatatgcat 1620
 gatgtggtat tgggggccaa gtctgtacag catcttgagt ccctttttac cgctgttacc 1680
 aattttcttt tgtctttggg tatacattta aaccctaaca aaacaaaaag atgggggttac 1740
 tctttacatt tcatgggcta tgtcattgga tggtatgggt cattgccaca agatcacatc 1800
 atacaaaaaa tcaaagaatg ttttcgaaaa cttcctgtta acagacctat tgattggaaa 1860
 gtctgtcaac gtattgtggg tcttttgggt ttgctgccc cttttacaca atgtgggttat 1920
 cctgctttaa tgcctttgta tgcattgtatt cagtgaagc aggcctttac tttctcgcca 1980
 acttacaagg cctttctgtg taaacaatac ctgaaccttt accccgttgc ccggcaacgg 2040
 ccaggctctgt gccaaagtgt tgctgacgca accccactg gctggggctt ggtcatgggc 2100
 catcagcgca tgcgtggaac ctttctggct cctctgcga tccatactgc gcatctccta 2160
 gccgcttggt ttgctcgcag caggctctgga gcaaaccattc tcgggacgga taactctggt 2220
 gttctctccc gcaaataac atcgtttcca tggctgctag gctgtgctgc caactggatc 2280
 ctgcgcggga cgtcctttgt ttacgtcccg tcggcgctga atcccacgga cgacccttct 2340
 cggggtcgt tggggctctc tcgtcccctt ctccgtctac cgtttcgacc gaccacgggg 2400
 cgcacctctc tttacgcgga ctccccgtct gtgccttctc atctgccgga ccgtgtgcac 2460
 ttcgcttcac ctctgcacgt cgcattggaga ccaccgtga 2499

<210> 23

<211> 2628

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> nucleotide sequence encoding HBV truncated and mutated Pol fused to the transmembrane domain of the rabies glycoprotein (TMR)

<400> 23

atggttctc aggctctcct gtttgtacc cttctggtt ttccattgtg ttttgggaaa 60
 ttccctattg ttagtattcc ttggactcat aagggtgggaa actttacggg gctttattct 120
 tctactgtac ctgtctttaa ccctcattgg aaaacacct cttttcctaa tatacattta 180
 caccaagaca ttatcaaaaa atgtgaacaa tttgtaggcc cactcacagt caatgagaaa 240
 agaagactgc aattgattat gcctgctagg ttttatccaa atgttaccaa atatttgcca 300

ttggataagg	gtattaaacc	ttattatcca	gaacatctag	ttaatcatta	cttccaaacc	360
agacattatt	tacacactct	atggaaggcg	ggtatattat	ataagagaga	aacaacacat	420
agtgcctcat	tttgtgggtc	accatattct	tgggaacaaa	agctacagca	tggggcagaa	480
tctttccacc	agcaatcctc	tgggattctt	tcccgaccac	cagttggatc	cagccttcag	540
agcaaacacc	gcaaatccag	attgggactt	caatcccaac	aaggacacct	ggccagacgc	600
caacaaggta	ggagctggag	cattcgggct	gggattcacc	ccaccgcacg	gaggtctttt	660
ggggtggagc	cctcaggctc	agggcattct	acaaaccttg	ccagcaaadc	cgcctcctgc	720
ctctaccaat	cgccagtcag	gaaggcagcc	taccccgctg	tctccacctt	tgagaaacac	780
tcctcctcag	gcatgcagt	ggaactccac	aaccttccac	caaactctgc	aagatcccag	840
agtgagaggc	ctgtatttcc	ctgctgggtg	ctccagttca	ggaacagtaa	accctgttcc	900
gactactgtc	tctcccatat	cgtcaatctt	ctcgaggatt	ggggaccctg	cgctgaacat	960
ggagaacatc	acatcaggat	tcctaggacc	cctgctcgtg	ttacaggcgg	ggtttttctt	1020
gttgacaaga	atcctcacia	taccgcagag	tctagactcg	tgggtggactt	ctctcaattt	1080
tctaggggga	actaccgtgt	gtcttggcca	aaattcgcag	tccccaacct	ccaatcactc	1140
accaacctcc	tgtcctccaa	cctgtcctgg	ttatcgtcgg	atgtgtctgc	ggcgttttat	1200
catcttccct	ttcatcctgc	tgtatgcct	catcttcttg	ttggttcttc	tggactatca	1260
aggtatgttg	cccgtttgtc	ctctaattcc	aggatcttca	actaccagca	cgggaccatg	1320
cagaacctgc	acgactcctg	ctcaaggaac	ctctatgtat	ccctcctggt	gctgtaccaa	1380
accttcggac	ggaaattgca	cctgtattcc	catcccatca	tcctgggctt	tcggaaaatt	1440
cctatgggag	tgggcctcag	cccgtttctc	ctggctcagt	ttactagtgc	catttggtca	1500
gtggttcgta	gggctttccc	ccactgtttg	gctttcagtt	atatgcatga	tgtggtattg	1560
ggggccaagt	ctgtacagca	tcttgagtcc	ctttttaccg	ctgttaccaa	ttttcttttg	1620
tctttgggta	tacattttaa	ccctaacaaa	acaaaaagat	ggggttactc	tttacatttc	1680
atgggctatg	tcattggatg	ttatgggtca	ttgccacaag	atcacatcat	acaaaaaatc	1740
aaagaatggt	ttcgaaaact	tcctgttaac	agacctattg	attggaaagt	ctgtcaacgt	1800
attgtgggtc	ttttgggttt	tgttgcccct	tttacacaat	gtggttatcc	tgttttaatg	1860
cctttgtatg	catgtattca	gtcgaagcag	gcttttactt	tctcgccaac	ttacaaggcc	1920
tttctgtgta	aacaatacct	gaacctttac	cccgttgccc	ggcaacggcc	aggtctgtgc	1980
caagtgtttg	ctgacgcaac	ccccactggc	tggggcttgg	tcatgggcca	tcagcgcacg	2040
cgtggaacct	ttctggctcc	tctgccgatc	catactgcgc	atctcctagc	cgcttgtttt	2100

gctcgcagca ggtctggagc aaacattctc gggacggata actctgttgt tctctcccg 2160
 aaatatacat cgtttccatg gctgctaggc tgtgctgcca actggatcct gcgcggggacg 2220
 tcctttgttt acgtcccgtc ggcgctgaat cccacggacg acccttctcg gggtcgcttg 2280
 gggctctctc gtcccccttct ccgtctaccg tttcgaccga ccacggggcg cacctctctt 2340
 tacgcggact ccccgctctgt gccttctcat ctgccggacc gtgtgcactt cgcttcacct 2400
 ctgcacgtcg catggagacc accgtatgta ttactgagtg caggggccct gactgccttg 2460
 atgttgataa ttttctgat gacatgttgt agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa 2520
 cacaatctca gagggacagg gagggaggtg tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata 2580
 tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt gagaccagac tgtgatga 2628

<210> 24
 <211> 537
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> nucleotide sequence encoding the HBV truncated and deleted core
 (1-76 85-148) fused to HBV immunogenic domain Env 1

<400> 24
 atggacattg atccttataa agaatttgga gctactgtgg agttactctc ttttttgcct 60
 tctgacttct ttccttcagt acgtgatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa 120
 gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
 tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttgga agtcagttat 240
 gtcaacacta atatgggcct aaagttccgg caactattgt ggtttcacat ttcttgtctc 300
 acttttggaa gagaaacagt tatagaatat ttggtgtctt tcggagtgtg gattcgcact 360
 cctccagctt atagaccacc aaatgccct atcttatcaa cacttccgga gactactgtt 420
 gtcctgcaag caggcttctt cctgctgacc cgtattctga ccattccaca aagcctggat 480
 agctggtgga ccagcctgaa cttcctgggt ggcaccacgg ttgcctggg tcagtaa 537

<210> 25
 <211> 627
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> nucleotide sequence encoding the HBV truncated and deleted core
 (1-76 85-148) fused with HBV immunogenic domains Env1 and Env2

<400> 25
 atggacattg atccttataa agaatttgga gctactgtgg agttactctc ttttttgcct 60

```

tctgacttct ttccttcagt acgtgatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa 120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttgga agtcagttat 240
gtcaacacta atatgggcct aaagttccgg caactattgt ggtttcacat ttcttgtctc 300
acttttgga gagaaacagt tatagaatat ttggtgtctt tcggagtgtg gattcgcact 360
cctccagctt atagaccacc aaatgcccct atcttatcaa cacttccgga gactactgtt 420
gtcctgcaag caggcttctt cctgctgacc cgtattctga ccattccaca aagcctggat 480
agctggtgga ccagcctgaa cttcctgggt ggcaccacgg tttgctggg tcagtgggca 540
agcgcacgct ttagctggct gagcctgctg gttccgttcg tgcaatgggt tgtgggtctg 600
agcccaaccg tgtggctgag cgtgtaa 627

```

```

<210> 26
<211> 828
<212> DNA
<213> artificial sequence

```

```

<220>
<223> nucleotide sequence encoding HBV core (1-183) fused to HBV
immunogenic domains Env1-Env2 and Env4

```

```

<400> 26
atggacattg atccttataa agaatttgga gctactgtgg agttactctc ttttttgcct 60
tctgacttct ttccttcagt acgtgatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa 120
gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttgga agatccaata 240
tccagggaacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gcctaaagtt ccggcaacta 300
ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga atatttggtg 360
tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaagtc ccctatctta 420
tcaacacttc cgagactac tgttggtaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact 480
ccctcgctc gcagacgaag gtctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa 540
tctcagtgcg tctgcaagc tggattcttt cttctcacca ggattttgac cattccacaa 600
tctcttgata gctgggtggac aagtttgaac ttccttggag gcacaactgt ctgcctcgga 660
cagtgggcaa gtgctcgctt ttcttggttg agcttgctcg ttcccttcgt gcaatggttt 720
gttggaactc ctccaacagt ctggttgctc gtcggacctg gcctttatag tattctcagc 780
ccattcttgc cactcttgcc tatcttcttc tgcttggtggg tttatatc 828

```

<210> 27
 <211> 2499
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> nucleotide sequence present in the plasmid pGA-15pol

<400> 27
 atgcccctat cttatcaaca cttccggaga ctactgttgt tagacgacga ggcaggtccc 60
 ctagaagaag aactccctcg cctcgagac gaaggtctca atcgccgcgt cgcagaagat 120
 ctcaatctcg ggaatctcaa tgtagtatt ccttgactc ataaggtggg aaactttacg 180
 gggctttatt cttctactgt acctgtcttt aaccctcatt ggaaaacacc ctcttttcct 240
 aatatacatt tacaccaaga cattatcaaa aaatgtgaac aattttagg cccactcaca 300
 gtcaatgaga aaagaagact gcaattgatt atgcctgcta ggttttatcc aaatgttacc 360
 aaatatttgc cattggataa gggattaaa ccttattatc cagaacatct agttaatcat 420
 tacttccaaa ccagacatta ttacacact ctatggaagg cgggtatatt atataagaga 480
 gaaacaacac atagtgcctc attttgtggg tcaccatatt ctgggaaca aaagctacag 540
 catggggcag aatctttcca ccagcaatcc tctgggattc tttcccgacc accagttgga 600
 tccagccttc agagcaaaca ccgcaaatcc agattgggac ttcaatccca acaaggacac 660
 ctggccagac gccaacaagg taggagctgg agcattcggg ctgggattca cccaccgca 720
 cggaggtctt ttgggggtgga gccctcaggc tcagggcatt ctacaaacct tgccagcaaa 780
 tccgcctcct gcctctacca atcgccagtc aggaaggcag cctaccccgc tgtctccacc 840
 tttgagaaac actcatcctc aggccatgca gtggaactcc acaaccttcc accaaactct 900
 gcaagatccc agagtgaag gctgtatctt ccctgctggg ggctccagtt caggaaacagt 960
 aaaccctggt ccgactactg tctctcccat atcgtcaatc ttctcgagga ttggggaccc 1020
 tgcgctgaac atggagaaca tcacatcagg attcctagga cccctgctcg tggtacaggc 1080
 ggggtttttc ttgttgacaa gaatcctcac aataccgcag agtctagact cgtgggtggac 1140
 ttctctcaat tttctagggg gaactaccgt gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac 1200
 ctccaatcac tcaccaacct cctgtcctcc aacctgtcct gggtatcgct ggatgtgtct 1260
 gcggcgtttt atcatcttcc tcttcactcct gctgctatgc ctcatcttct tggttggtct 1320
 tctggactat caaggatatg tggccgtttg tcctctaatt ccaggatctt caactaccag 1380
 cacgggacca tgcagaacct gcacgactcc tgctcaagga acctctatgt atccctcctg 1440
 ttgctgtacc aaaccttcgg acggaaattg cacctgtatt cccatcccat catcctgggc 1500

```

tttcggaaaa ttcctatggg agtgggcctc agcccgtttc tcctggctca gtttactagt 1560
gccatttggt cagtggttcg tagggctttc cccactggtt tggctttcag ttatatgcat 1620
gatgtggtat tgggggccaa gtctgtacag catcttgagt ccctttttac cgctgttacc 1680
aattttcttt tgtctttggg tatacattta aaccctaaca aaacaaaaag atgggggttac 1740
tctttacatt tcatgggcta tgtcattgga tgttatgggt cattgccaca agatcacatc 1800
atacaaaaaa tcaaagaatg ttttcgaaaa ctctctgtta acagacctat tgattggaaa 1860
gtctgtcaac gtattgtggg tcttttgggt tttgctgccc cttttacaca atgtgggttat 1920
cctgctttta tgcctttgta tgcattgtatt cagtccaagc aggcctttac tttctcgcca 1980
acttacaagg cctttctgtg taaacaatac ctgaaccttt accccgttgc ccggcaacgg 2040
ccaggctctgt gccaagtgtt tgctgacgca accccactg gctggggctt ggtcatgggc 2100
catcagcgca tgcgtggaac ctttctggct cctctgccga tccatactgc gcatctccta 2160
gccgcttggt ttgctcgag caggctctgga gcaaacttc tcgggacgga taactctggt 2220
gttctctccc gcaaataac atcgtttcca tggctgctag gctgtgctgc caactggatc 2280
ctgcgcggga cgtcctttgt ttacgtcccg tcggcgctga atcccacgga cgacccttct 2340
cggggtcgct tggggctctc tcgtcccctt ctccgtctac cgtttcgacc gaccacgggg 2400
cgcaacctct tttacgcgga ctccccgtct gtgccttctc atctgccgga ccgtgtgcac 2460
ttcgcttcac ctctgcacgt cgcattggaga ccaccgtga 2499

```

<210> 28
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 28
 gagcgatatc caccatgaat gttagtattc cttggac 37

<210> 29
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 29
 gatcgctagc tcacgggtgggt ctccatgcga c 31

<210> 30

<211> 35
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 30
 gagtgatata caccatgggt cctcaggctc tcctg 35

 <210> 31
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 31
 gtccaaggaa tactaacatt aatagggaat ttcccaaaac acaatg 46

 <210> 32
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 32
 gtcgcatgga gaccaccgta tgtattactg agtgcaggg 39

 <210> 33
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 33
 gagtgctagc tcacagtctg gtctcaccc 29

 <210> 34
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

 <220>
 <223> primer

 <400> 34
 gttttgggaa attccctatt aatgtagta ttccttggac tc 42

 <210> 35

<211> 41
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 35
 ctgcactcag taatacatat ggtggtctcc atgcgacgtg c 41

<210> 36
 <211> 552
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> Core-encoding nucleotide sequence present in pGA4-core plasmide

<400> 36
 atggacattg atccttataa agaatttgga gctactgtgg agttactctc ttttttgcct 60
 tctgacttct ttccttcagt acgtgatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa 120
 gccttagagt ctctgagca ttgttcacct caccatactg ctctcaggca agcaattctg 180
 tgctgggggg aactaatgac tctagctacc tgggtgggtg gtaatttgga agatccaata 240
 tccagggacc tagtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gcctaaagtt ccggcaacta 300
 ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga atatttggtg 360
 tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaagtc ccctatctta 420
 tcaacacttc cgagactac tgttggtaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact 480
 ccctcgcttc gcagacgaag gtctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa 540
 tctcagtgtc aa 552

<210> 37
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 37
 gactgttaac caccatggac attgacctt ataaagaatt tg 42

<210> 38
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 38
 gttgacataa ctgactacca aattaccacc caccaggta g 41

<210> 39
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 39
 gtgggtgta atttggtagt cagttatgtc aacactaata tg 42

<210> 40
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 40
 gactctcgag ttaaacagta gtctccggaa gtg 33

<210> 41
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 41
 gacgggatcc accatggaca ttgatcctta taaagaattt gg 42

<210> 42
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 42
 gcctgcttgc aggacaacag tagtctccgg aagtgttg 38

<210> 43
 <211> 702
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> core and env-encoding nucleotide sequence present in pMK-C/E

plasmid

<400> 43
 atggacattg atccttataa agaatttgga gctactgtgg agttactctc tttcttgccct 60
 tctgacttct ttccttcagt acgtgatctt ctagatacag cctcagctct gtatcgggaa 120
 gccttagtcc tgcaagcagg cttcttcctg ctgaccgta ttctgacat tccacaaagc 180
 ctggatagct ggtggaccag cctgaacttc ctgggtggca ccacggttg cctgggtcag 240
 gagtctcctg agcattgttc acctcaccat actgctctca ggcaagcaat tctgtgctgg 300
 ggagaactaa tgactctagc tacctgggtg ggtgggtggg caagcgcacg ctttagctgg 360
 ctgagcctgc tggttccgtt cgtgcaatgg tttgtgggtc tgagcccaac cgtgtggctg 420
 agcgtgaatt tggtagtcag ttatgtcaac actaatatgg gactaaagtt ccgacaacta 480
 ttgtggtttc acatttcttg tctcactttt ggaagagaaa cagttataga atatttggtg 540
 tctttcggag tgtggattcg cactcctcca gcttatagac caccaaagc accgatactg 600
 agcaccctgc cagaaaccac cgtgggtccg agcttatatt ctatactgag cccattcctg 660
 ccattactgc cgatcttctt ctgcctgtgg gtgtatatct ga 702

<210> 44
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 44
 ccggagacta ctgttgctct gcaagcaggc ttcttc 36

<210> 45
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 45
 gagtcattct cgacttgagg ccgcttactg acccaggcaa accgtgg 47

<210> 46
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 46
 gcgtgcgctt gccactgac ccaggcaaac cgtgg 35

<210> 47
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 47
 cggtttgcct gggtcagtgg gcaagcgcac gcttttagc 38

<210> 48
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 48
 gagtcattct cgacttgagg ccgcttacac gctcagccac acggttgg 48

<210> 49
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 49
 ggggggctag caagcttcca ccatggacat tgatccttat aaagaatttg 50

<210> 50
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 50
 gaaagaatcc agcttgcagg acgcactgag attcccgaga ttgag 45

<210> 51
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 51
ctcaatctcg ggaatctcag tgcgtcctgc aagctggatt ctttc 45

<210> 52
<211> 44
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 52
gagtcattct cgacttgcgg ccgcttagat ataaaccac aagc 44

<210> 53
<211> 52
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 53
ggggggctag caagcttcca ccatgaatgt tagtattcct tggactcata ag 52

<210> 54
<211> 49
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 54
gagtcattct cgacttgcgg ccgctcacgg tggctccat gcgacgtgc 49

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>
<223> peptide

<400> 55

Ser Leu Tyr Ala Asp Ser Pro Ser Val
1 5

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 56

Phe	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val
1				5					10

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 57

Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu	Leu	Met	Thr	Leu
1				5					10

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 58

Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Phe	Phe	Leu	Leu
1				5				

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 59

Phe	Leu	Gly	Gly	Thr	Thr	Val	Cys	Leu
1				5				

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> peptide

<400> 60

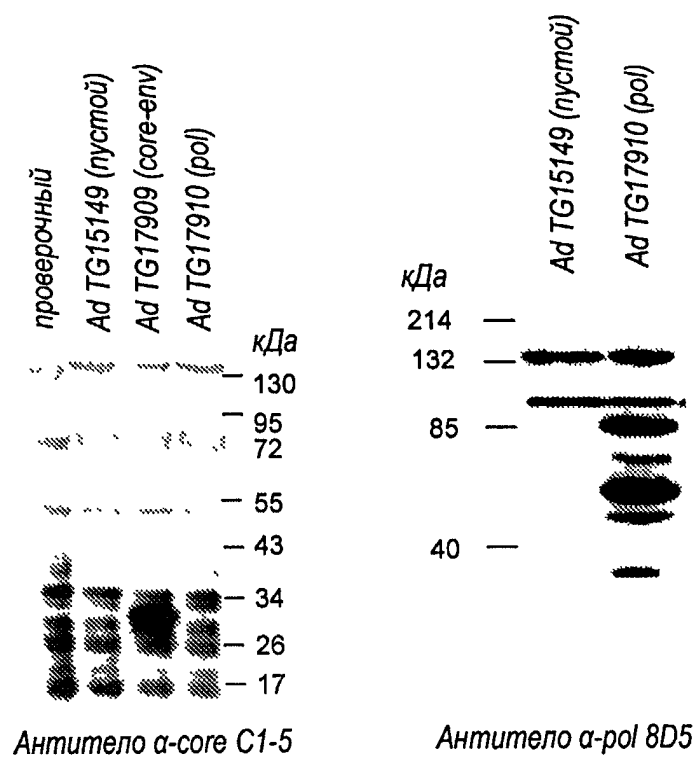
Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
1 5 10

```
<210> 61
<211> 34
<212> DNA
<213> artificial sequence
```

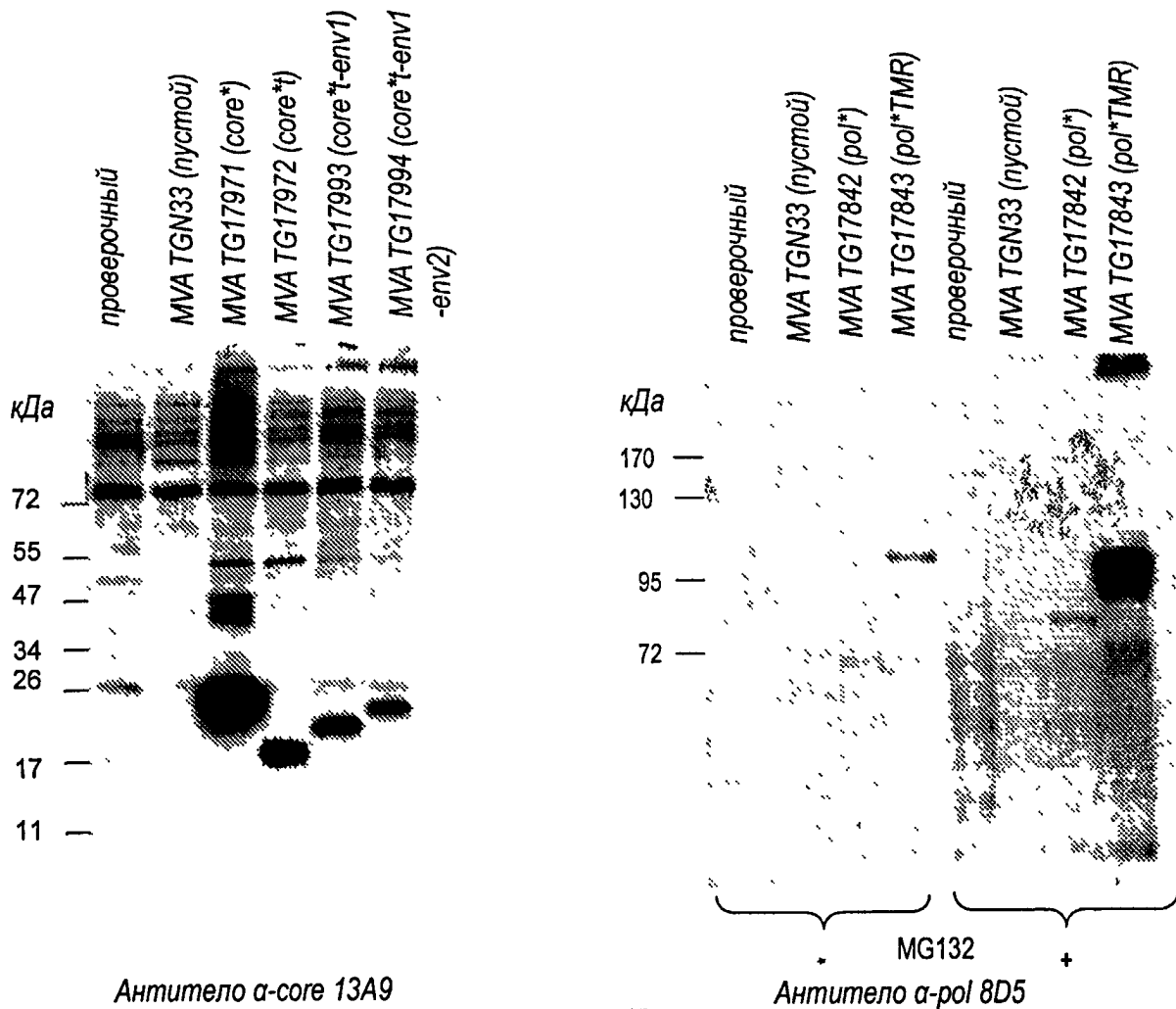
```
<220>
<223> primer
```

<400> 61
gactctcgag ttagcactga gattcccgag attg

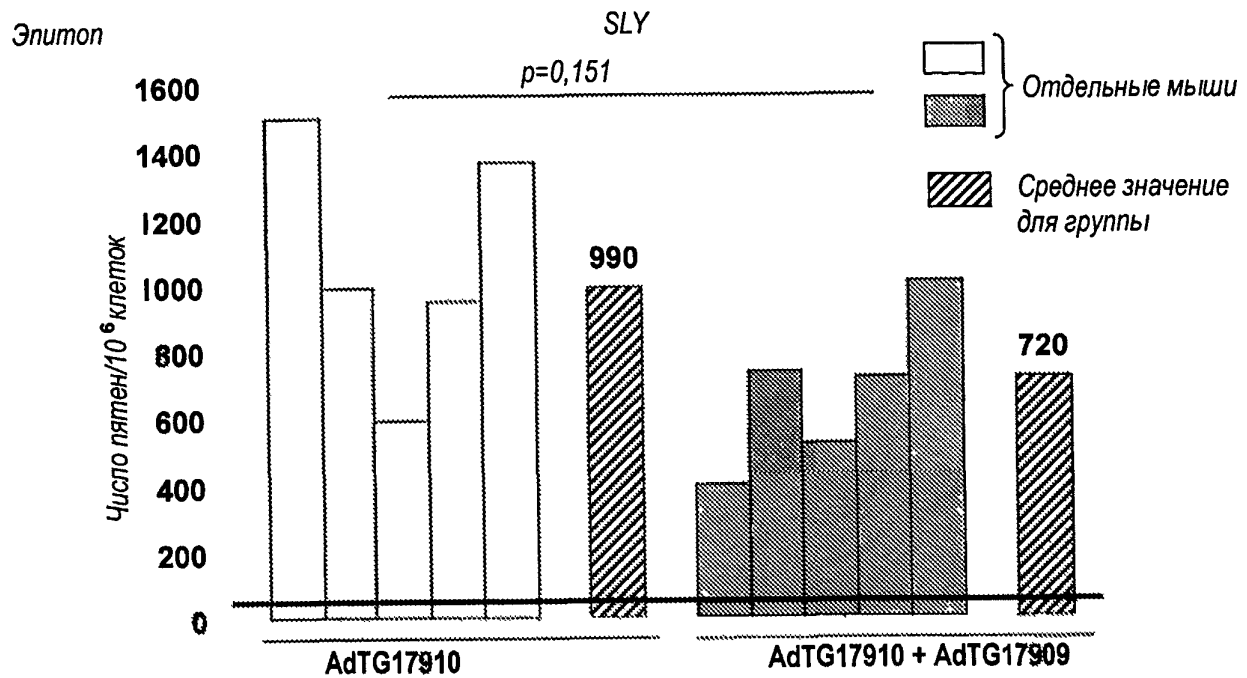
34



Фиг. 1А



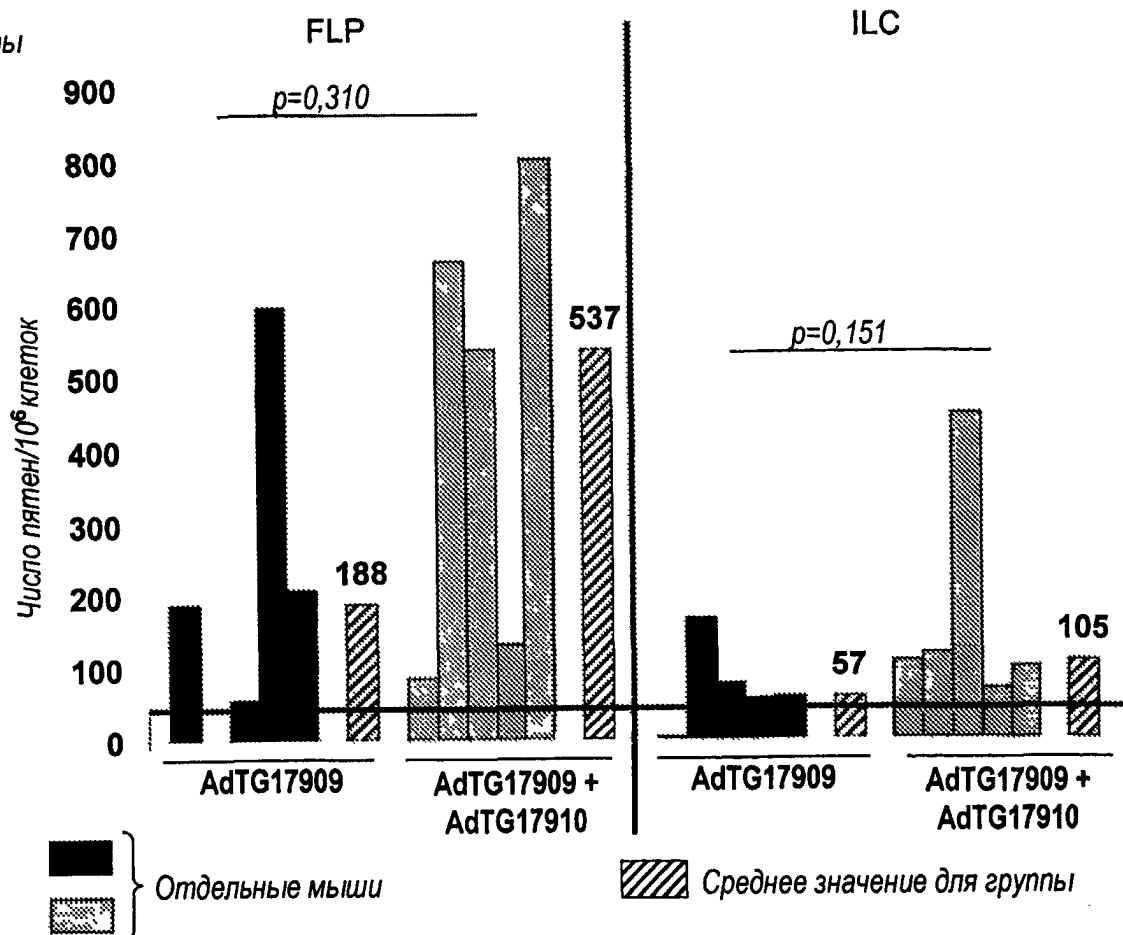
Специфические Т-клеточные реакции, направленные против белка Pol



Фиг. 2А

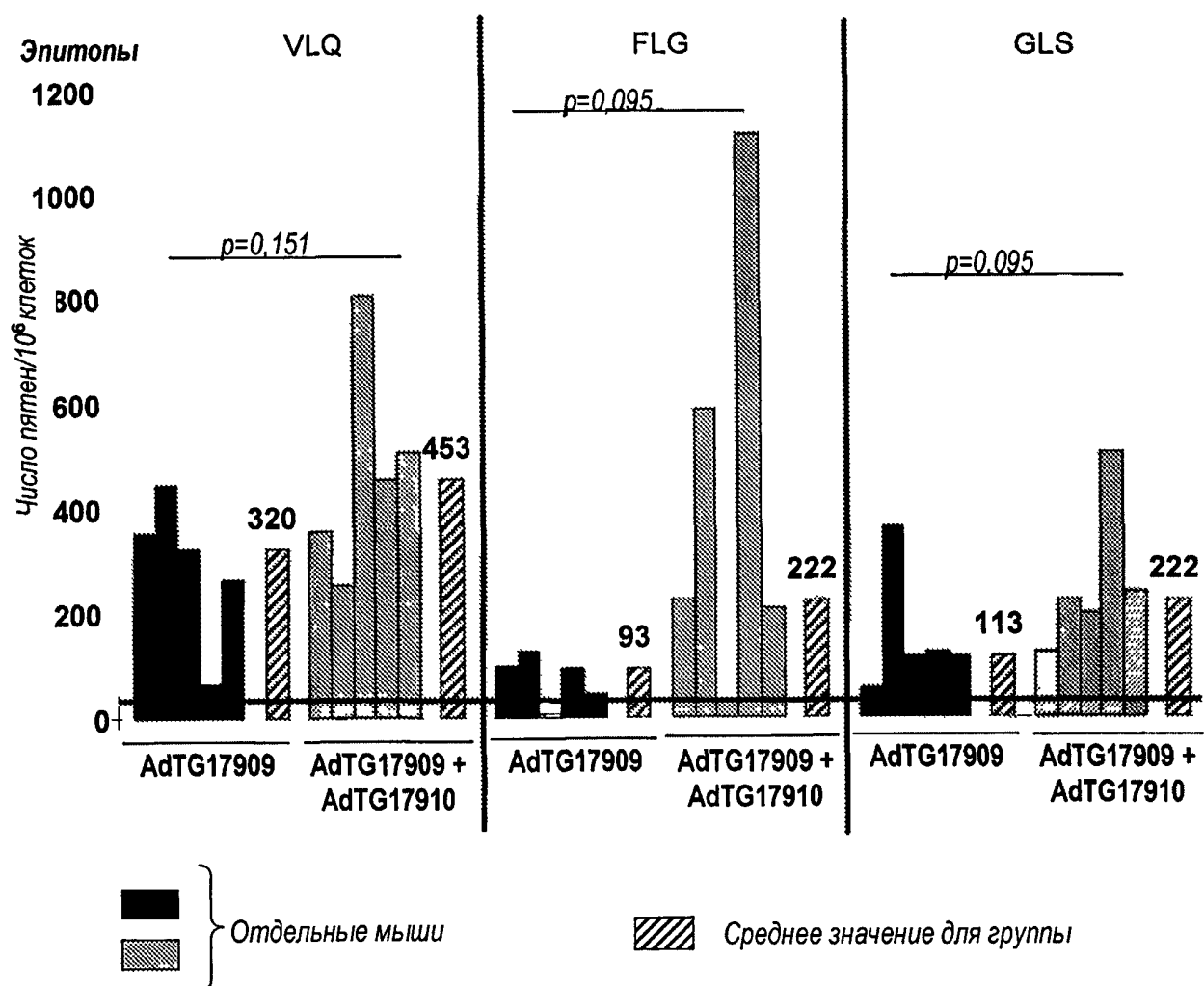
Специфические Т-клеточные реакции, направленные против белка Core

Эпитопы



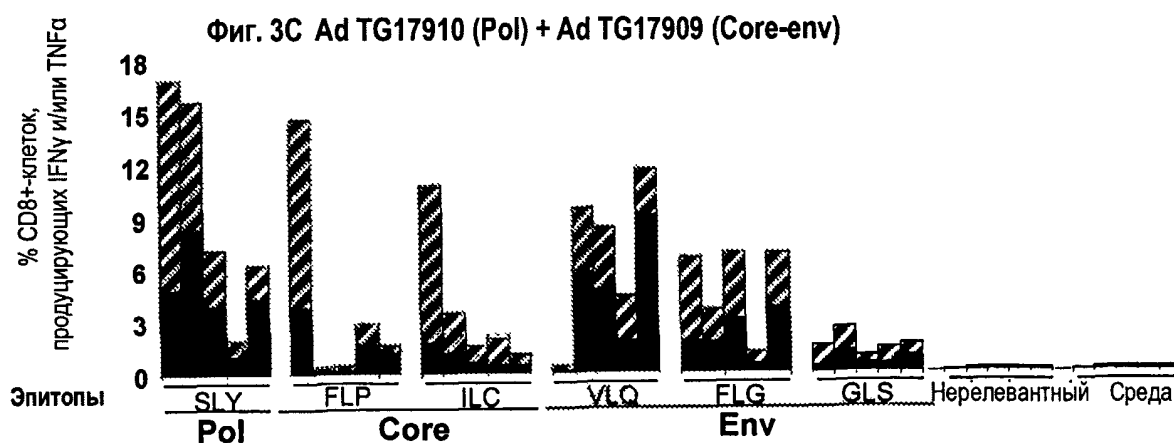
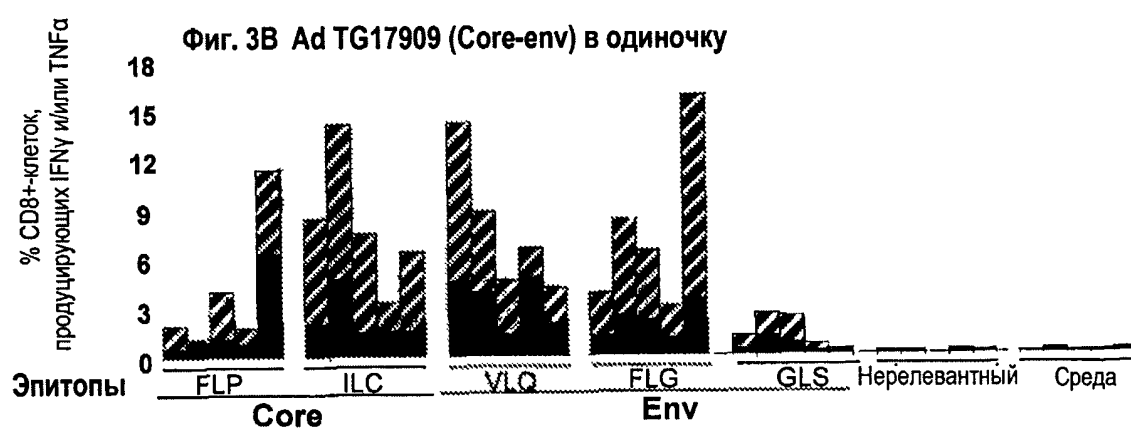
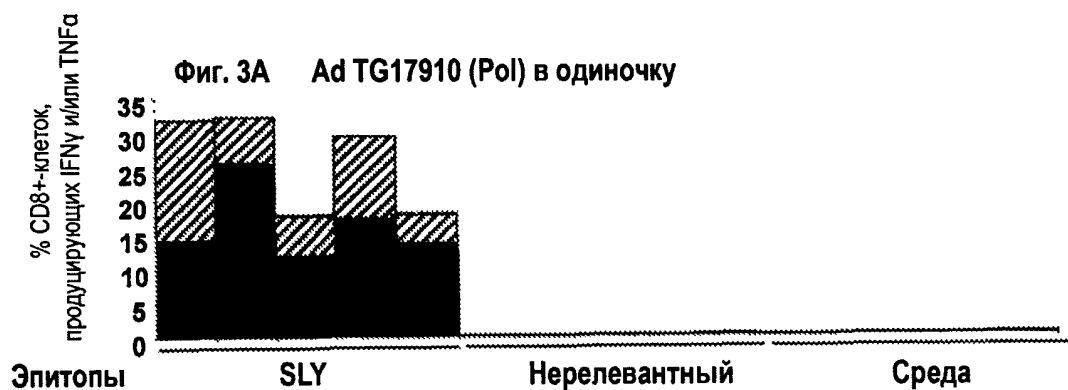
Фиг. 2 В

Специфические Т-клеточные реакции, направленные против областей Env

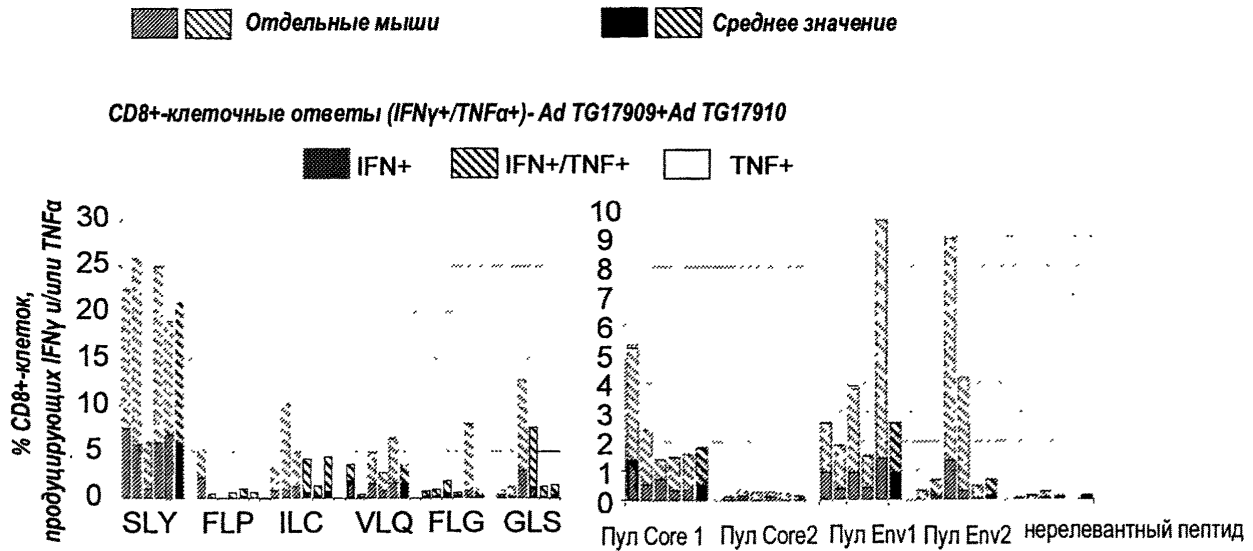


Фиг. 2С

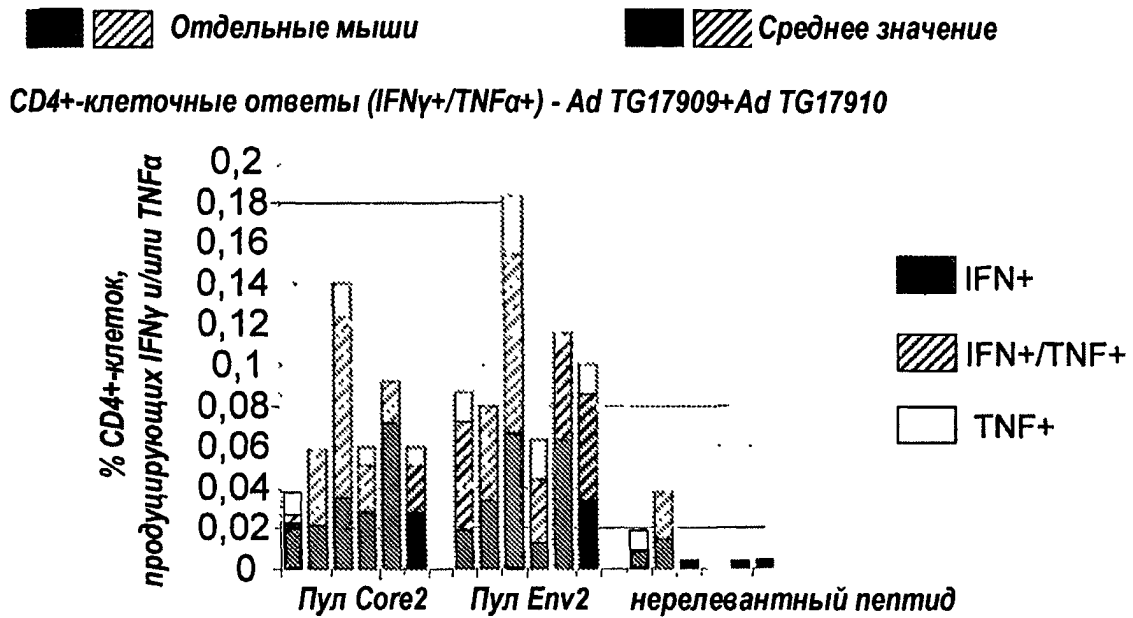
■ IFN γ CD8+-продуцирующие клетки ▨ IFN γ + TNF α CD8+-продуцирующие клетки □ TNF α CD8+-продуцирующие клетки



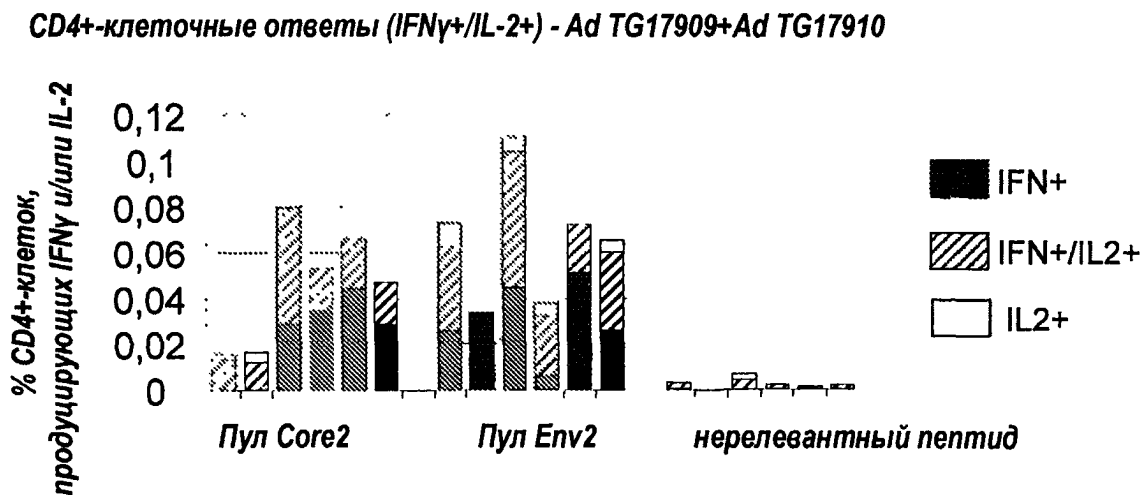
Фиг. 3



Фиг. 4А

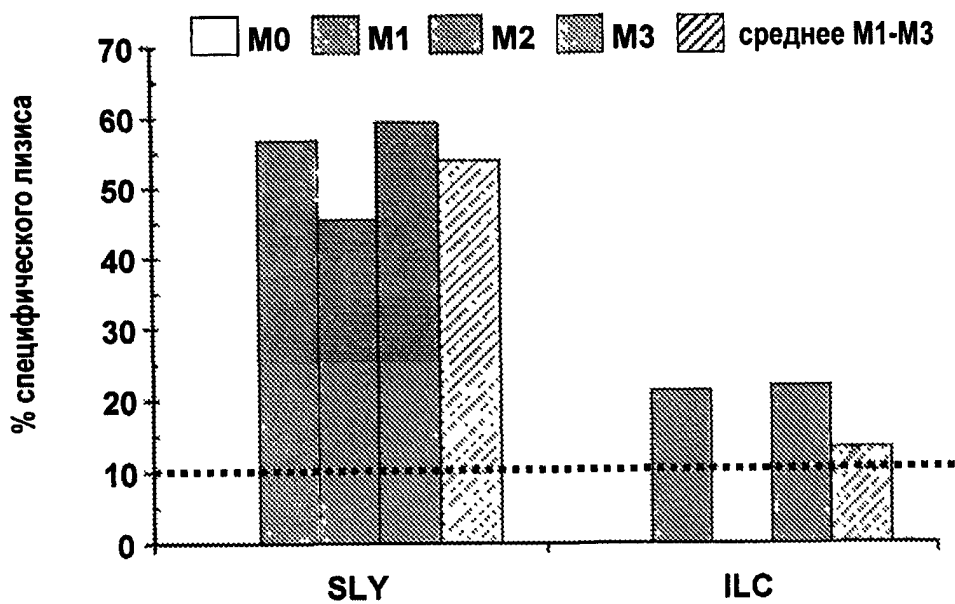


Фиг. 4В

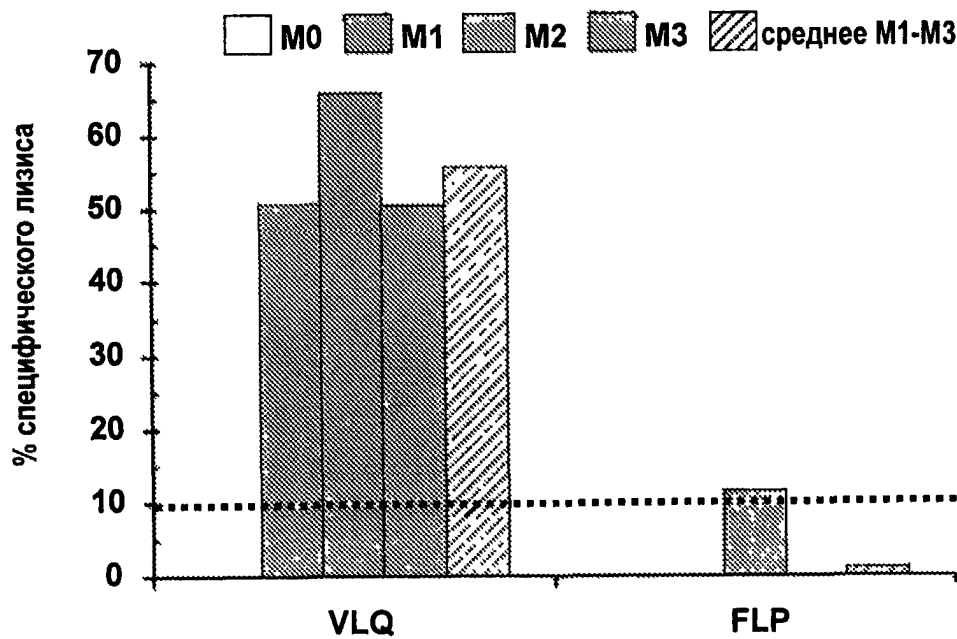


Фиг. 4С

Фиг. 4

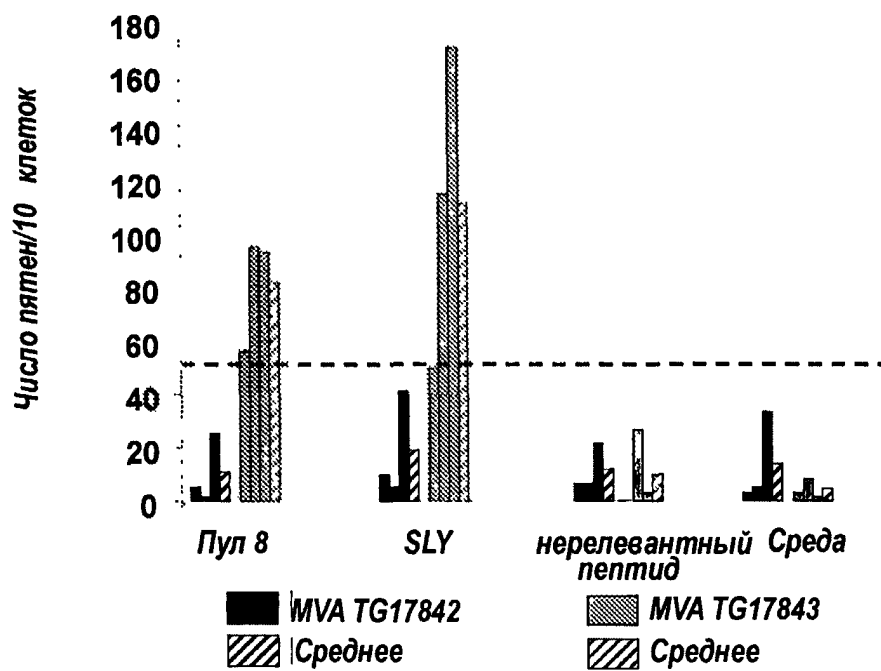
Ad TG17909+Ad TG17910. Лизис *in vivo* против пептидов SLY и ILC

Фиг. 5A

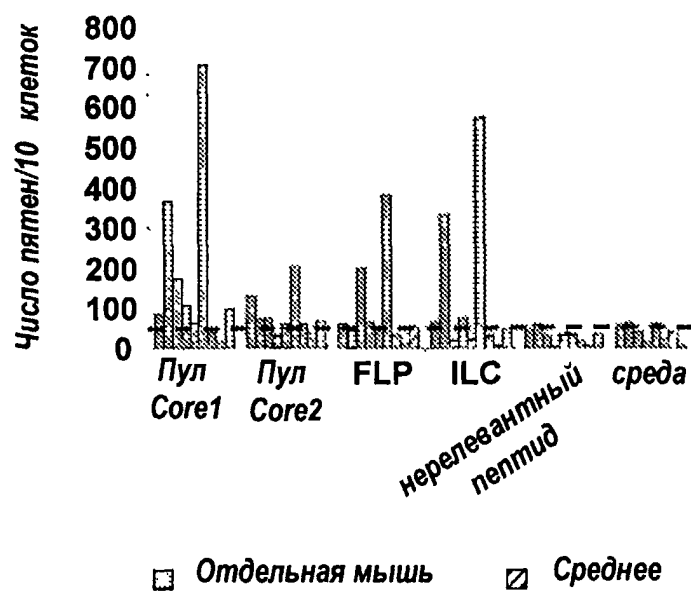
Ad TG17909+Ad TG17910. Лизис *in vivo* против пептидов FLP и VLQ

Фиг. 5B

Фиг. 5

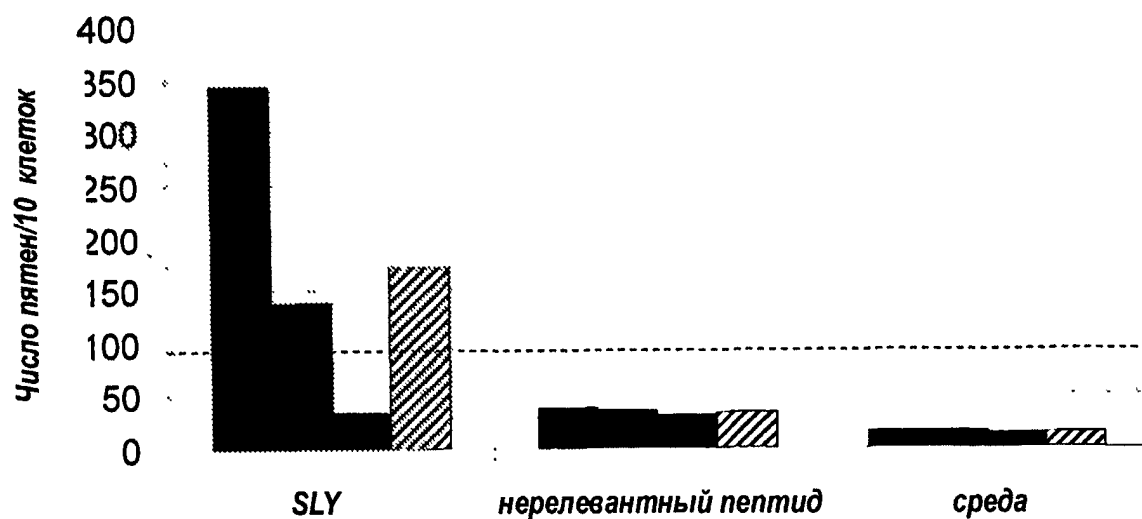
MVA TG17842 или MVA TG17843

Фиг. 6A

MVA TG17971

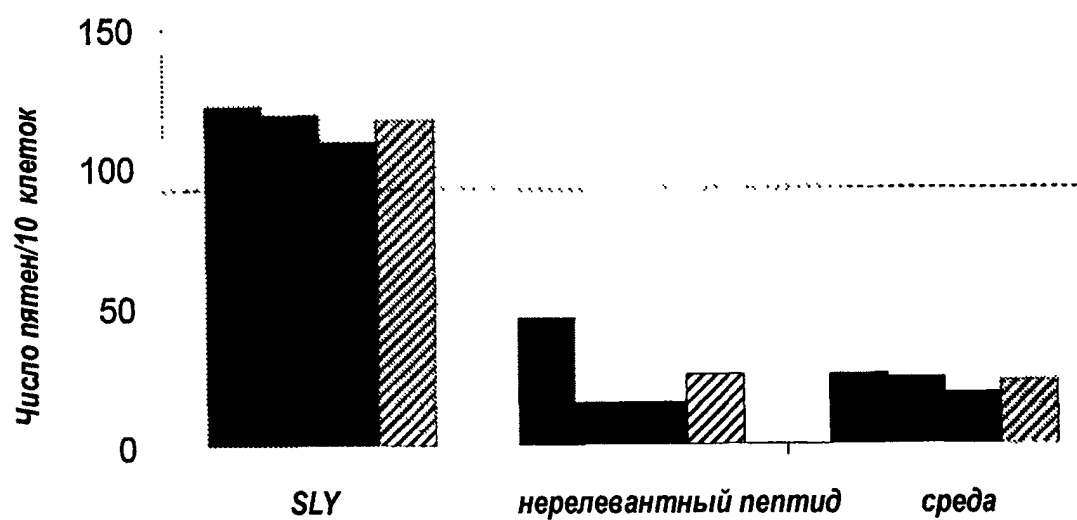
Фиг. 6B

MVA TG17972 + MVA TG17843



Фиг. 7А

MVA TG17993 + MVA TG17843



Фиг. 7В

