

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7696909号
(P7696909)

(45)発行日 令和7年6月23日(2025.6.23)

(24)登録日 令和7年6月13日(2025.6.13)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00 Z N A
C 1 2 N	15/36 (2006.01)	C 1 2 N	15/36
C 0 7 K	14/02 (2006.01)	C 0 7 K	14/02
C 1 2 N	15/861 (2006.01)	C 1 2 N	15/861 Z
		請求項の数	48 (全95頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-542413(P2022-542413)	(73)特許権者	522275876
(86)(22)出願日	令和3年1月8日(2021.1.8)		ビリオン セラピューティクス, リミテ
(65)公表番号	特表2023-510544(P2023-510544 A)		イド ライアビリティ カンパニー
(43)公表日	令和5年3月14日(2023.3.14)		アメリカ合衆国, デラウェア 1 9 7 1
(86)国際出願番号	PCT/US2021/012630		1, ニューアーク, クリーク ベンド コ
(87)国際公開番号	WO2021/142212	(73)特許権者	516142001
(87)国際公開日	令和3年7月15日(2021.7.15)		ザ ウィスター インスティテュート オブ
審査請求日	令和5年10月23日(2023.10.23)		アナトミー アンド バイオロジー
(31)優先権主張番号	62/958,809		アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 フィ
(32)優先日	令和2年1月9日(2020.1.9)		ラデルフィア スプリース ストリート
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	3 6 0 1
(31)優先権主張番号	62/958,827		100099759
(32)優先日	令和2年1月9日(2020.1.9)		弁理士 青木 篤
最終頁に続く		(74)代理人	100123582
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヘルペスウイルス糖タンパク質Dと融合したB型肝炎ウイルス抗原をコードするアデノウイルスベクター及びその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】
配列番号178のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメインをコードする核酸配列、
配列番号179のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメインをコードする核酸配列、及び
配列番号180のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質、
をコードする核酸配列を含む、核酸分子。

【請求項2】
配列番号174のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項3】
N末端HSV gD配列、
C末端HSV gD配列、
又はその両方、
をコードする核酸配列をさらに含む、請求項1又は2に記載の核酸分子。

【請求項4】
N末端HSV gD配列をコードする核酸配列、
配列番号178のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、
配列番号179のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び

配列番号 180 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質、
を含む HBV 融合タンパク質をコードする核酸配列、並びに、
C 末端 H S V g D 配列をコードする核酸配列、
を含む、請求項 3 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記核酸配列は、配列番号 174 のアミノ酸配列を含む HBV 融合タンパク質をコードする、請求項 4 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記核酸配列は、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む N 末端 H S V g D 配列をコードする、請求項 5 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記核酸配列は、配列番号 12 のアミノ酸残基 26 ～ 269 を含む N 末端 H S V g D 配列をコードする、請求項 5 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記核酸配列は、H S V g D の膜貫通ドメインを含む C 末端 H S V g D 配列をコードする、請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記核酸配列は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C 末端 H S V g D 配列をコードする、請求項 8 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

配列番号 12 のアミノ酸残基 26 ～ 269 を含む N 末端 H S V g D 配列をコードする核酸配列

配列番号 178 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン、
配列番号 179 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン、及び
配列番号 180 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質、
を含む HBV 融合タンパク質をコードする核酸配列、
配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C 末端 H S V g D 配列をコードする核酸配列、
を含む、請求項 4 ～ 9 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 11】

前記核酸配列は、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む N 末端 H S V g D 配列をコードする、請求項 10 に記載の核酸分子。

【請求項 12】

前記核酸配列は、配列番号 174 のアミノ酸配列を含む HBV 融合タンパク質をコードする、請求項 10 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記核酸配列は、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする、請求項 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 14】

配列番号 176 の核酸配列を含む、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 15】

配列番号 184 の核酸配列を含む、請求項 13 に記載の核酸分子。

【請求項 16】

配列番号 178 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン、
配列番号 179 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン、及び
配列番号 180 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質
を含む、融合タンパク質。

【請求項 17】

配列番号 174 のアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

N 末端 H S V g D 配列、C 末端 H S V g D タンパク質配列、又は両方をさらに含む、

10

20

30

40

50

請求項 16 又は 17 に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

N 末端 H S V g D 配列、

配列番号 178 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン、配列番号 179 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン、及び配列番号 180 のアミノ酸配列を含む H B V コアタンパク質を含む H B V 配列、及び

C 末端 H S V g D タンパク質配列を含む、

請求項 18 に記載の融合タンパク質。

【請求項 20】

前記 H B V 配列は、配列番号 174 のアミノ酸配列を含む、請求項 19 に記載の融合タンパク質。

【請求項 21】

前記 N 末端 H S V g D 配列は、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む、請求項 18～20 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

前記 N 末端 H S V g D 配列は、配列番号 12 のアミノ酸残基 26～269 を含む、請求項 18～20 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 23】

前記 C 末端 H S V g D 配列は、H S V g D の膜貫通ドメインを含む、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

前記 C 末端 H S V g D 配列は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む、請求項 18～23 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

前記融合タンパク質は、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む、請求項 18～24 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 26】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むウイルス。

【請求項 27】

前記ウイルスは、アデノウイルスである、請求項 26 に記載のウイルス。

【請求項 28】

前記アデノウイルスは、A d C 6 又は A d C 7 である、請求項 27 に記載のウイルス。

【請求項 29】

請求項 26～28 のいずれか一項に記載のウイルスを含むワクチン。

【請求項 30】

請求項 1～15 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 16～25 のいずれか一項に記載の融合タンパク質、請求項 26～28 のいずれか一項に記載のウイルス、又は請求項 29 に記載のワクチンを含有する、被験体の H B V に対する免疫応答を誘導するための医薬組成物。

【請求項 31】

前記ワクチンは、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする核酸分子を有する A d C 6 ベクターを含む、請求項 30 に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

前記被験体に、前記 A d C 6 ベクターを含むワクチンを含有する医薬組成物が提供された後に、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする核酸分子を有する A d C 7 ベクターを含むワクチンを含有する医薬組成物がさらに提供されることを特徴とする、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

前記ワクチンは、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする核酸分子を有する A d C 7 ベクターを含む、請求項 30 に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

前記被験体に、前記 A d C 7 ベクターを含むワクチンを含有する医薬組成物が提供された後に、配列番号 1 8 5 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする核酸分子を有する A d C 6 ベクターを含むワクチンを含有する医薬組成物がさらに提供されることを特徴とする、請求項 3 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

配列番号 1 8 5 のアミノ酸配列は、N 末端の 2 5 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない、請求項 3 0 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 6】

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を含む、H B V ポリメラーゼ N 末端ドメインをコードする核酸配列を含む核酸分子。

10

【請求項 3 7】

配列番号 1 7 6 の核酸 1 ～ 5 1 0 の核酸配列を含む、請求項 3 6 に記載の核酸分子。

【請求項 3 8】

配列番号 1 7 8 のアミノ酸配列を含む、H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン。

【請求項 3 9】

配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を含む、H B V ポリメラーゼ C 末端ドメインをコードする核酸配列を含む核酸分子。

【請求項 4 0】

配列番号 1 7 6 の核酸 5 1 1 ～ 8 8 5 の核酸配列を含む、請求項 3 9 に記載の核酸分子。

20

【請求項 4 1】

配列番号 1 7 9 のアミノ酸配列を含む、H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン。

【請求項 4 2】

配列番号 1 8 0 のアミノ酸配列を含む、H B V コアタンパク質をコードする塩基配列を含む核酸分子。

【請求項 4 3】

配列番号 1 7 6 の核酸 8 8 6 ～ 1 1 4 0 の核酸配列を含む、請求項 4 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4 4】

配列番号 1 8 0 のアミノ酸配列を含む、H B V コアタンパク質。

30

【請求項 4 5】

請求項 3 6、3 7、3 9、4 0、4 2 又は 4 3 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 4 6】

前記ベクターが、アデノウイルスベクターである、請求項 4 5 に記載のベクター。

【請求項 4 7】

前記アデノウイルスベクターが、A d C 6 ベクター又は A d C 7 ベクターである、請求項 4 6 に記載のベクター。

【請求項 4 8】

請求項 4 5 ～ 4 7 のいずれか一項に記載のベクターを含む、ワクチン。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、各々の開示の全体を参照により本明細書に援用される、2 0 2 0 年 1 月 9 日に
出願された米国仮特許出願第 6 2 / 9 5 8 , 8 0 9 号、2 0 2 0 年 1 月 9 日に
出願された米国仮特許出願第 6 2 / 9 5 8 , 8 2 7 号、2 0 2 0 年 1 月 2 9 日に
出願された米国仮特許出願第 6 2 / 9 6 7 , 2 4 2 号、2 0 2 0 年 1 月 2 9 日に
出願された米国仮特許出願第 6 2 / 9 6 7 , 1 0 4 号、2 0 2 0 年 8 月 1 2 日に
出願された米国仮特許出願第 6 3 / 0 6 4 , 5 0 6 号、2 0 2 0 年 8 月 1 2 日に
出願された米国仮特許出願第 6 3 / 0 6 4 , 5

50

71号、2020年11月11日に出願された米国仮特許出願第63/112,202号、2020年11月11日に出願された米国仮特許出願第63/112,219号の優先権を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体を参照により本明細書に援用される。2021年1月7日に作成されたASCIIコピーは、111876__000035__SL.txtと命名され、サイズは151,446バイトである。

【0003】

本明細書には、B型肝炎ウイルス(HBV)コアタンパク質、HBVポリメラーゼN末端ドメイン、及びHBVポリメラーゼC末端ドメインの非自然起源の変異体、並びにその免疫原性断片及びそれを含む融合タンパク質が開示される。

【背景技術】

【0004】

世界保健機関は、2015年には、2億5700万人の人々が慢性B型肝炎感染症(B型肝炎表面抗原陽性として定義される)にかかって生活していて、B型肝炎により、主に肝硬変及び肝細胞癌(すなわち、原発性肝癌)を原因として推定88万7000人が死亡したと推定している。生殖年齢の女性が世界人口の25.3%を占めると仮定すると(国連のデータ)、慢性的に感染した成人は、潜在的にHBVを子供に伝染させることができる6500万人の妊娠可能年齢の女性を含むことができる(WHO Global Hepatitis Report 2017. Available at: [apps_who_int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=D78616700ED7322D4109CA4541FB94EA?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf;jsessionid=D78616700ED7322D4109CA4541FB94EA?sequence=1))。2016年の全発症率は、人口10万人あたり1.0症例だった(Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hepatitis Surveillance—United States, 2017. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2019. Available at: [www_cdc_gov/hepatitis/statistics/2017surveillance/index.htm](http://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2017surveillance/index.htm))。2017年単独でも、総計3,407症例の急性B型肝炎がアメリカ疾病対策予防センター(CDC)に報告された。

【0005】

HBV予防ワクチンの利用可能性にもかかわらず、慢性HBV感染症の負荷は、最適以下の治療選択及び発展途上世界のほとんどの地域での新規感染数の持続的な割合のため、重要な未だ対処されていない世界的な医学的問題であり続けている。

【発明の概要】

【0006】

本明細書には、配列番号6のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むB型肝炎ウイルス(HBV)コアタンパク質が提供される。

【0007】

配列番号8のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメインも提供される。

【0008】

配列番号10のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメインも開示される。

【0009】

N末端単純ヘルペスウイルス(HSV)糖タンパク質(gD)配列又はその変異体、開

10

20

30

40

50

示されるHBVコアタンパク質、HBVポリメラーゼN末端ドメイン、HBVポリメラーゼC末端ドメイン、又はこれらの免疫原性断片、及びC末端HSVgD配列又はその変異体を含む融合タンパク質も提供される。

【0010】

本明細書には、N末端単純ヘルペスウイルス(HSV)糖タンパク質(gD)配列又はその変異体、開示されるHBVコアタンパク質、HBVポリメラーゼN末端ドメイン、HBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び／又はそれらの免疫原性断片の組み合わせ、及びC末端HSVgD配列又はその変異体を含む融合タンパク質も提供される。

【0011】

開示されるタンパク質又は融合タンパク質をコードする核酸分子、核酸分子を含むベクター、及び開示されるベクターを含むワクチンが本明細書に開示される。

10

【0012】

本明細書には、被験体にHBVに対する免疫応答を誘導する方法であって、この方法は、この被験体に有効量の開示される融合タンパク質、核酸分子、ベクター、又はワクチンのいずれかを提供してそれによりHBVに対する免疫応答を誘導することを含む、方法も提供される。

【0013】

この要約、並びに以下の詳細な説明は、添付の図面と共に読まれる場合、さらに理解される。開示されるタンパク質、ワクチン、及び方法を説明する目的で、図面中にタンパク質、ワクチン、及び方法の好ましい実施形態が示されるが、このタンパク質、ワクチン、及び方法は、開示される特定の実施形態に限定されるものではない。図面中。

20

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、エピトープ最適化されたコアアミノ酸の頻度を示す。アミノ酸残基をX軸に示し、解析された全てのゲノム中の配列類似性の割合Y軸に示す。

【図2A】図2A、図2B、図2C、図2D、図2E、及び図2Fは、指示量の：gDと遺伝的に融合したエピトープ最適化されたコア配列（配列番号15）を含むチンパンジー血清型6の複製欠損のアデノウイルスベクター（AdC6）（AdC6-gDCore）（図2A及び図2D）；gDと遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼC末端ドメイン配列（配列番号19）を含むAdC6（AdC6-gDPoLC）（図2B及び図2E）；及びgDと遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼN末端ドメイン配列（配列番号17）を含むAdC6（AdC6-gDPoLN）（図2C及び図2F）を筋肉内（i.m.）注射した後のC57BL/6マウスのワクチン挿入断片特異的T細胞頻度を示す。注射後14日目にマウスを出血させ、各種HBV挿入断片に対するT細胞の頻度を、細胞をHBV配列を表す重複ペプチドで刺激した時のインターフェロン（IFN） γ に対する細胞内サイトカイン染色（ICS）により分析した。コントロール細胞をペプチドなしで培養した。グラフは、直線によって示された中央値を有する個別のマウスについての結果を示す。図2A～2Cは、挿入断片特異的CD8+T細胞頻度を示し、図2D～2Fは、挿入断片特異的CD4+T細胞頻度を示す。

30

【図2B】図2A、図2B、図2C、図2D、図2E、及び図2Fは、指示量の：gDと遺伝的に融合したエピトープ最適化されたコア配列（配列番号15）を含むチンパンジー血清型6の複製欠損のアデノウイルスベクター（AdC6）（AdC6-gDCore）（図2A及び図2D）；gDと遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼC末端ドメイン配列（配列番号19）を含むAdC6（AdC6-gDPoLC）（図2B及び図2E）；及びgDと遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼN末端ドメイン配列（配列番号17）を含むAdC6（AdC6-gDPoLN）（図2C及び図2F）を筋肉内（i.m.）注射した後のC57BL/6マウスのワクチン挿入断片特異的T細胞頻度を示す。注射後14日目にマウスを出血させ、様々なHBV挿入断片に対するT細胞頻度を、細胞をHBV配列を表す重複ペプチドで刺激した時のインターフェロン（IFN） γ の細胞内サイトカイン染色（ICS）により分析した。コントロール細胞

40

50

は、ペプチド無しで培養した。グラフは、直線によって示された中央値を有する個別のマウスについての結果を示す。図 2 A～2 C は、挿入断片特異的 C D 8 + T 細胞頻度を示し、図 2 D～2 F は、挿入断片特異的 C D 4 + T 細胞頻度を示す。

【図 2 C】図 2 A、図 2 B、図 2 C、図 2 D、図 2 E、及び図 2 F は、指示量の：g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたコア配列（配列番号 15）を含むチンパンジー血清型 6 の複製欠損のアデノウイルスベクター（A d C 6）（A d C 6－g D C o r e）（図 2 A 及び図 2 D）；g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端ドメイン配列（配列番号 19）を含む A d C 6（A d C 6－g D P o l C）（図 2 B 及び図 2 E）；及び g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ N 末端ドメイン配列（配列番号 17）を含む A d C 6（A d C 6－g D P o l N）（図 2 C 及び図 2 F）を筋肉内（i . m .）注射した後の C 5 7 B l / 6 マウスのワクチン挿入断片特異的 T 細胞頻度を示す。注射後 14 日目にマウスを出血させ、様々な H B V 挿入断片に対する T 細胞頻度を、細胞を H B V 配列を表す重複ペプチドで刺激した時のインターフェロン（I F N） γ の細胞内サイトカイン染色（I C S）により分析した。コントロール細胞は、ペプチド無しで培養した。グラフは、直線によって示された中央値を有する個別のマウスについての結果を示す。図 2 A～2 C は、挿入断片特異的 C D 8 + T 細胞頻度を示し、図 2 D～2 F は、挿入断片特異的 C D 4 + T 細胞頻度を示す。

【図 2 D】図 2 A、図 2 B、図 2 C、図 2 D、図 2 E、及び図 2 F は、指示量の：g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたコア配列（配列番号 15）を含むチンパンジー血清型 6 の複製欠損のアデノウイルスベクター（A d C 6）（A d C 6－g D C o r e）（図 2 A 及び図 2 D）；g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端ドメイン配列（配列番号 19）を含む A d C 6（A d C 6－g D P o l C）（図 2 B 及び図 2 E）；及び g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ N 末端ドメイン配列（配列番号 17）を含む A d C 6（A d C 6－g D P o l N）（図 2 C 及び図 2 F）を筋肉内（i . m .）注射した後の C 5 7 B l / 6 マウスのワクチン挿入断片特異的 T 細胞頻度を示す。注射後 14 日目にマウスを出血させ、様々な H B V 挿入断片に対する T 細胞頻度を、細胞を H B V 配列を表す重複ペプチドで刺激した時のインターフェロン（I F N） γ の細胞内サイトカイン染色（I C S）により分析した。コントロール細胞は、ペプチド無しで培養した。グラフは、直線によって示された中央値を有する個別のマウスについての結果を示す。図 2 A～2 C は、挿入断片特異的 C D 8 + T 細胞頻度を示し、図 2 D～2 F は、挿入断片特異的 C D 4 + T 細胞頻度を示す。

【図 2 E】図 2 A、図 2 B、図 2 C、図 2 D、図 2 E、及び図 2 F は、指示量の：g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたコア配列（配列番号 15）を含むチンパンジー血清型 6 の複製欠損のアデノウイルスベクター（A d C 6）（A d C 6－g D C o r e）（図 2 A 及び図 2 D）；g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端ドメイン配列（配列番号 19）を含む A d C 6（A d C 6－g D P o l C）（図 2 B 及び図 2 E）；及び g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ N 末端ドメイン配列（配列番号 17）を含む A d C 6（A d C 6－g D P o l N）（図 2 C 及び図 2 F）を筋肉内（i . m .）注射した後の C 5 7 B l / 6 マウスのワクチン挿入断片特異的 T 細胞頻度を示す。注射後 14 日目にマウスを出血させ、様々な H B V 挿入断片に対する T 細胞頻度を、細胞を H B V 配列を表す重複ペプチドで刺激した時のインターフェロン（I F N） γ の細胞内サイトカイン染色（I C S）により分析した。コントロール細胞は、ペプチド無しで培養した。グラフは、直線によって示された中央値を有する個別のマウスについての結果を示す。図 2 A～2 C は、挿入断片特異的 C D 8 + T 細胞頻度を示し、図 2 D～2 F は、挿入断片特異的 C D 4 + T 細胞頻度を示す。

【図 2 F】図 2 A、図 2 B、図 2 C、図 2 D、図 2 E、及び図 2 F は、指示量の：g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたコア配列（配列番号 15）を含むチンパンジー血清型 6 の複製欠損のアデノウイルスベクター（A d C 6）（A d C 6－g D C o r e）（図 2 A 及び図 2 D）；g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端ドメイン配列（配列番号 19）を含む A d C 6（A d C 6－g D P o l C）（図 2 B

10

20

30

40

50

及び図 2 E) ; 及び g D と遺伝的に融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ N 末端ドメイン配列 (配列番号 17) を含む A d C 6 (A d C 6 - g D P o l N) (図 2 C 及び図 2 F) を筋肉内 (i . m .) 注射した後の C 5 7 B l / 6 マウスのワクチン挿入断片特異的 T 細胞頻度を示す。注射後 14 日目にマウスを出血させ、様々な H B V 挿入断片に対する T 細胞頻度を、細胞を H B V 配列を表す重複ペプチドで刺激した時のインターフェロン (I F N) γ の細胞内サイトカイン染色 (I C S) により分析した。コントロール細胞は、ペプチド無しで培養した。グラフは、直線によって示された中央値を有する個別のマウスについての結果を示す。図 2 A ~ 2 C は、挿入断片特異的 C D 8 + T 細胞頻度を示し、図 2 D ~ 2 F は、挿入断片特異的 C D 4 + T 細胞頻度を示す。

【図 3 A】図 3 A、図 3 B、及び図 3 C は、示される H B V 配列を表すペプチドのプールに対する異なるマウス系統 (A : C 5 7 B l / 6 マウス ; B : B A L B / c マウス ; C : H L A - A 2 遺伝子導入 (t g) マウス) の T 細胞頻度を示す。結果は、免疫化後 4 週目に収集された脾細胞を用いて得られ、I F N - γ を I C S によって調べた。ペプチドは、2 個のプールの認識により 1 個のペプチドが同定されるよう行列状に配置された。グラフは、異なるプールに対する応答を示し、全てのペプチドを含むプールに対する応答は右側に示される。ペプチド無しで得られたバックグラウンド頻度を減算した。応答を誘発するとみなされたプール及び異なるプールに応答して同定されたペプチドを各図面の下部に列挙した。B A L B / c マウスの C D 8 + T 細胞及び C D 4 + T 細胞応答を示し、ヒト M H C クラス I 分子を保有するが、マウス M H C クラス I I 分子を保有しない、H L A - A 2 t g マウスの C D 8 + T 細胞応答を示す。T 細胞を活性化 C D 4 4 + 細胞上にゲートした。継続的に番号付けされた各「ペプチド」は、C o r e、P o l N、又は P o l C 配列の 1 番目、6 番目、11 番目などのアミノ酸で始まる 15 個のアミノ酸から成る。したがって例えば、C o r e のペプチド 1 は、配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 15 に対応し (すなわち、エピトープ最適化された C o r e アミノ酸配列)、C o r e のペプチド 2 は、配列番号 6 のアミノ酸 6 ~ 20 に対応し、C o r e のペプチド 3 は、配列番号 6 のアミノ酸 11 ~ 25 に対応する。同様に、P o l N のペプチド 1 は、配列番号 8 のアミノ酸 1 ~ 15 に対応し (すなわち、エピトープ最適化された P o l N アミノ酸配列)、P o l N のペプチド 2 は、配列番号 8 のアミノ酸 6 ~ 20 に対応し、P o l N のペプチド 3 は、配列番号 8 のアミノ酸 11 ~ 25 に対応する。同様に、P o l C のペプチド 1 は、配列番号 10 のアミノ酸 1 ~ 15 に対応し (すなわち、エピトープ最適化された P o l C アミノ酸配列)、P o l C のペプチド 2 は、配列番号 10 のアミノ酸 6 ~ 20 に対応し、P o l C のペプチド 3 は、配列番号 10 のアミノ酸 11 ~ 25 に対応する。

【図 3 B】図 3 A、図 3 B、及び図 3 C は、示される H B V 配列を表すペプチドのプールに対する異なるマウス系統 (A : C 5 7 B l / 6 マウス ; B : B A L B / c マウス ; C : H L A - A 2 遺伝子導入 (t g) マウス) の T 細胞頻度を示す。結果は、免疫化後 4 週目に収集された脾細胞を用いて得られ、I F N - γ を I C S によって調べた。ペプチドは、2 個のプールの認識により 1 個のペプチドが同定されるよう行列状に配置された。グラフは、異なるプールに対する応答を示し、全てのペプチドを含むプールに対する応答は右側に示される。ペプチド無しで得られたバックグラウンド頻度を減算した。応答を誘発するとみなされたプール及び異なるプールに応答して同定されたペプチドを各図面の下部に列挙した。B A L B / c マウスの C D 8 + T 細胞及び C D 4 + T 細胞応答を示し、ヒト M H C クラス I 分子を保有するが、マウス M H C クラス I I 分子を保有しない、H L A - A 2 t g マウスの C D 8 + T 細胞応答を示す。T 細胞を活性化 C D 4 4 + 細胞上にゲートした。継続的に番号付けされた各「ペプチド」は、C o r e、P o l N、又は P o l C 配列の 1 番目、6 番目、11 番目などのアミノ酸で始まる 15 個のアミノ酸から成る。したがって例えば、C o r e のペプチド 1 は、配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 15 に対応し (すなわち、エピトープ最適化された C o r e アミノ酸配列)、C o r e のペプチド 2 は、配列番号 6 のアミノ酸 6 ~ 20 に対応し、C o r e のペプチド 3 は、配列番号 6 のアミノ酸 11 ~ 25 に対応する。同様に、P o l N のペプチド 1 は、配列番号 8 のアミノ酸 1 ~ 15 に対応し (すなわち、エピトープ最適化された P o l N アミノ酸配列)、P o l N のペプチド

10

20

30

40

50

2は、配列番号8のアミノ酸6～20に対応し、P o l Nのペプチド3は、配列番号8のアミノ酸11～25に対応する。同様に、P o l Cのペプチド1は、配列番号10のアミノ酸1～15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたP o l Cアミノ酸配列）、P o l Cのペプチド2は、配列番号10のアミノ酸6～20に対応し、P o l Cのペプチド3は、配列番号10のアミノ酸11～25に対応する。

【図3C】図3A、図3B、及び図3Cは、示されるHBV配列を表すペプチドのプールに対する異なるマウス系統（A：C57BL/6マウス；B：BALB/cマウス；C：HLA-A2遺伝子導入（tg）マウス）のT細胞頻度を示す。結果は、免疫化後4週目に収集された脾細胞を用いて得られ、IFN-γをICSによって調べた。ペプチドは、2個のプールの認識により1個のペプチドが同定されるよう行列状に配置された。グラフは、異なるプールに対する応答を示し、全てのペプチドを含むプールに対する応答は右側に示される。ペプチド無しで得られたバックグラウンド頻度を減算した。応答を誘発するとみなされたプール及び異なるプールに応答して同定されたペプチドを各図面の下部に列挙した。BALB/cマウスのCD8+T細胞及びCD4+T細胞応答を示し、ヒトMHCI分子を保有するが、マウスMHCI分子を保有しない、HLA-A2tgマウスのCD8+T細胞応答を示す。T細胞を活性化CD44+細胞上にゲートした。継続的に番号付けされた各「ペプチド」は、Core、PolN、又はPolC配列の1番目、6番目、11番目などのアミノ酸で始まる15個のアミノ酸から成る。したがって例えば、Coreのペプチド1は、配列番号6のアミノ酸1～15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたCoreアミノ酸配列）、Coreのペプチド2は、配列番号6のアミノ酸6～20に対応し、Coreのペプチド3は、配列番号6のアミノ酸11～25に対応する。同様に、PolNのペプチド1は、配列番号8のアミノ酸1～15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolNアミノ酸配列）、PolNのペプチド2は、配列番号8のアミノ酸6～20に対応し、PolNのペプチド3は、配列番号8のアミノ酸11～25に対応する。同様に、PolCのペプチド1は、配列番号10のアミノ酸1～15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolCアミノ酸配列）、PolCのペプチド2は、配列番号10のアミノ酸6～20に対応し、PolCのペプチド3は、配列番号10のアミノ酸11～25に対応する。

【図4A】図4A、図4B及び図4Cは、各種用量の指示されたベクターで免疫化されたC57BL/6マウスにAdC6-gDCore（A）、AdC6-gDPolC（B）、及びAdC6-gDPolN（C）をブースター接種した時のIFN-γ応答を示す。左のグラフは、AdC6ベクターを初回接種した後2週目に血液から調べられた応答を示す。マウスに8週後に同一の挿入断片を発現する同一の用量のAdC7ベクターをブースター接種した。右のグラフは、ブースター接種後2週目の血液中の応答を示す。

【図4B】図4A、図4B及び図4Cは、各種用量の指示されたベクターで免疫化されたC57BL/6マウスにAdC6-gDCore（A）、AdC6-gDPolC（B）、及びAdC6-gDPolN（C）をブースター接種した時のIFN-γ応答を示す。左のグラフは、AdC6ベクターを初回接種した後2週目に血液から調べられた応答を示す。マウスに8週後に同一の挿入断片を発現する同一の用量のAdC7ベクターをブースター接種した。右のグラフは、ブースター接種後2週目の血液中の応答を示す。

【図4C】図4A、図4B及び図4Cは、各種用量の指示されたベクターで免疫化されたC57BL/6マウスにAdC6-gDCore（A）、AdC6-gDPolC（B）、及びAdC6-gDPolN（C）をブースター接種した時のIFN-γ応答を示す。左のグラフは、AdC6ベクターを初回接種した後2週目に血液から調べられた応答を示す。マウスに8週後に同一の挿入断片を発現する同一の用量のAdC7ベクターをブースター接種した。右のグラフは、ブースター接種後2週目の血液中の応答を示す。

【図5A】図5A、図5B、及び図5Cは、示されるHBV配列を表すペプチドのプールに対する異なるマウス系統（A：C57BL/6マウス；B：BALB/cマウス；C：HLA-A2tgマウス）のT細胞頻度を示す。マウスに3種類の挿入断片（すなわち、Core、PolC、又はPolN）のいずれかを発現するAdC6ベクターを初回接種

10

20

30

40

50

し、8週後同一の挿入断片を発現するAdC7ベクターでブースター接種した。結果は、免疫化後4週目に収集された脾細胞を用いて得られ、IFN- γ をICSによって調べた。ペプチドは、2個のプールの認識により1個のペプチドが同定されるよう行列状に配置された。グラフは、異なるプールに対する応答を示し、全てのペプチドを含むプールに対する応答は右側に示される。ペプチド無しで得られたバックグラウンド頻度を減算した。応答を誘発するとみなされたプール及び異なるプールに応答して同定されたペプチドを各図面の下部に列挙した。BALB/cマウスのCD8+T細胞及びCD4+T細胞応答を示し、ヒトMHCクラスII分子を保有するが、マウスMHCクラスII分子を保有しない、HLA-A2tgマウスのCD8+T細胞応答を示す。T細胞を活性化CD44+細胞上にゲートした。継続的に番号付けされた各「ペプチド」は、Core、PolN、又はPolC配列の1番目、6番目、11番目などのアミノ酸で始まる15個のアミノ酸から成る。したがって例えば、Coreのペプチド1は、配列番号6のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたCoreアミノ酸配列）、Coreのペプチド2は、配列番号6のアミノ酸6~20に対応し、Coreのペプチド3は、配列番号6のアミノ酸11~25に対応する。同様に、PolNのペプチド1は、配列番号8のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolNアミノ酸配列）、PolNのペプチド2は、配列番号8のアミノ酸6~20に対応し、PolNのペプチド3は、配列番号8のアミノ酸11~25に対応する。同様に、PolCのペプチド1は、配列番号10のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolCアミノ酸配列）、PolCのペプチド2は、配列番号10のアミノ酸6~20に対応し、PolCのペプチド3は、配列番号10のアミノ酸11~25に対応する。

【図5B】図5A、図5B、及び図5Cは、示されるHBV配列を表すペプチドのプールに対する異なるマウス系統（A：C57BL/6マウス；B：BALB/cマウス；C：HLA-A2tgマウス）のT細胞頻度を示す。マウスに3種類の挿入断片（すなわち、Core、PolC、又はPolN）のいずれかを発現するAdC6ベクターを初回接種し、8週後同一の挿入断片を発現するAdC7ベクターでブースター接種した。結果は、免疫化後4週目に収集された脾細胞を用いて得られ、IFN- γ をICSによって調べた。ペプチドは、2個のプールの認識により1個のペプチドが同定されるよう行列状に配置された。グラフは、異なるプールに対する応答を示し、全てのペプチドを含むプールに対する応答は右側に示される。ペプチド無しで得られたバックグラウンド頻度を減算した。応答を誘発するとみなされたプール及び異なるプールに応答して同定されたペプチドを各図面の下部に列挙した。BALB/cマウスのCD8+T細胞及びCD4+T細胞応答を示し、ヒトMHCクラスII分子を保有するが、マウスMHCクラスII分子を保有しない、HLA-A2tgマウスのCD8+T細胞応答を示す。T細胞を活性化CD44+細胞上にゲートした。継続的に番号付けされた各「ペプチド」は、Core、PolN、又はPolC配列の1番目、6番目、11番目などのアミノ酸で始まる15個のアミノ酸から成る。したがって例えば、Coreのペプチド1は、配列番号6のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたCoreアミノ酸配列）、Coreのペプチド2は、配列番号6のアミノ酸6~20に対応し、Coreのペプチド3は、配列番号6のアミノ酸11~25に対応する。同様に、PolNのペプチド1は、配列番号8のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolNアミノ酸配列）、PolNのペプチド2は、配列番号8のアミノ酸6~20に対応し、PolNのペプチド3は、配列番号8のアミノ酸11~25に対応する。同様に、PolCのペプチド1は、配列番号10のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolCアミノ酸配列）、PolCのペプチド2は、配列番号10のアミノ酸6~20に対応し、PolCのペプチド3は、配列番号10のアミノ酸11~25に対応する。

【図5C】図5A、図5B、及び図5Cは、示されるHBV配列を表すペプチドのプールに対する異なるマウス系統（A：C57BL/6マウス；B：BALB/cマウス；C：HLA-A2tgマウス）のT細胞頻度を示す。マウスに3種類の挿入断片（すなわち、Core、PolC、又はPolN）のいずれかを発現するAdC6ベクターを初回接種

し、8週後同一の挿入断片を発現するAdC7ベクターでブースター接種した。結果は、免疫化後4週目に収集された脾細胞を用いて得られ、IFN- γ をICSによって調べた。ペプチドは、2個のプールの認識により1個のペプチドが同定されるよう行列状に配置された。グラフは、異なるプールに対する応答を示し、全てのペプチドを含むプールに対する応答は右側に示される。ペプチド無しで得られたバックグラウンド頻度を減算した。応答を誘発するとみなされたプール及び異なるプールに応答して同定されたペプチドを各図面の下部に列挙した。BALB/cマウスのCD8+T細胞及びCD4+T細胞応答を示し、ヒトMHCクラスII分子を保有するが、マウスMHCクラスII分子を保有しない、HLA-A2tgマウスのCD8+T細胞応答を示す。T細胞を活性化CD44+細胞上にゲートした。継続的に番号付けされた各「ペプチド」は、Core、PolN、又はPolC配列の1番目、6番目、11番目などのアミノ酸で始まる15個のアミノ酸から成る。したがって例えば、Coreのペプチド1は、配列番号6のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたCoreアミノ酸配列）、Coreのペプチド2は、配列番号6のアミノ酸6~20に対応し、Coreのペプチド3は、配列番号6のアミノ酸11~25に対応する。同様に、PolNのペプチド1は、配列番号8のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolNアミノ酸配列）、PolNのペプチド2は、配列番号8のアミノ酸6~20に対応し、PolNのペプチド3は、配列番号8のアミノ酸11~25に対応する。同様に、PolCのペプチド1は、配列番号10のアミノ酸1~15に対応し（すなわち、エピトープ最適化されたPolCアミノ酸配列）、PolCのペプチド2は、配列番号10のアミノ酸6~20に対応し、PolCのペプチド3は、配列番号10のアミノ酸11~25に対応する。

【図6】図6は、AAV-1.3HBV曝露時の血清中のHBVゲノムコピー数に対するワクチン接種の効果を示す。3匹のマウスのグループに 1×10^{10} 、 1×10^{11} 又は 1.5×10^{11} ウイルスゲノム(vg)のAdeno随伴ウイルス8(AAV8)-1.3HBVベクターを曝露し、8週後にAdC6-gDPolNをワクチン接種した。ワクチン接種後8週目にウイルス力価を調べ、ワクチン接種前の力価と比較した。各治療グループのベースラインからのウイルス量変化を示す。

【図7A】図7A、図7B、図7C、図7D、及び図7Eは、例示的なHBVエピトープ変化実験を示す。図7A-マウスをAdC6-gDPolNワクチンで免疫化した。4週後、脾細胞のPolN配列を表すペプチドプールに対するIFN- γ 応答を細胞内サイトカイン染色により調べた。刺激後のT細胞をT細胞マーカーについて染色した。図7B-結果は、 1×10^{10} vgのAAV8-1.3-HBVに曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4週後マウスにワクチン接種し、10週後脾臓のT細胞応答を調べた。図7C-結果は、 1.5×10^{11} vgのAAV8-1.3-HBVに曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4週後マウスにワクチン接種し、10週後脾臓のT細胞応答を調べた。図7A、7B、及び7Cは、全てのCD44+CD8+T細胞中のIFN- γ 産生CD44+CD8+T細胞の頻度を示す。ペプチドプール無しでインキュベートされた脾細胞により得られたバックグラウンド応答を減算した。図7D-ペプチドプール。図7E-個別のペプチド配列。図7Eでは、出現の順序で、それぞれ配列番号55~68及び189~233を開示する。

【図7B】図7A、図7B、図7C、図7D、及び図7Eは、例示的なHBVエピトープ変化実験を示す。図7A-マウスをAdC6-gDPolNワクチンで免疫化した。4週後、脾細胞のPolN配列を表すペプチドプールに対するIFN- γ 応答を細胞内サイトカイン染色により調べた。刺激後のT細胞をT細胞マーカーについて染色した。図7B-結果は、 1×10^{10} vgのAAV8-1.3-HBVに曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4週後マウスにワクチン接種し、10週後脾臓のT細胞応答を調べた。図7C-結果は、 1.5×10^{11} vgのAAV8-1.3-HBVに曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4週後マウスにワクチン接種し、10週後脾臓のT細胞応答を調べた。図7A、7B、及び7Cは、全てのCD44+CD8+T細胞中のIFN- γ 産生CD44+CD8+T細胞の頻度を示

す。ペプチドプール無しでインキュベートされた脾細胞により得られたバックグラウンド応答を減算した。図 7 D－ペプチドプール。図 7 E－個別のペプチド配列。図 7 E では、出現の順序で、それぞれ配列番号 55～68 及び 189～233 を開示する。

【図 7 C】図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D、及び図 7 E は、例示的な HBV エピトープ変化実験を示す。図 7 A－マウスを AdC6－gDPoLN ワクチンで免疫化した。4 週後、脾細胞の PoLN 配列を表すペプチドプールに対する IFN- γ 応答を細胞内サイトカイン染色により調べた。刺激後の T 細胞を T 細胞マーカーについて染色した。図 7 B－結果は、 1×10^{10} v g の AAV8-1.3-HBV に曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4 週後マウスにワクチン接種し、10 週後脾臓の T 細胞応答を調べた。図 7 C－結果は、 1.5×10^{11} v g の AAV8-1.3-HBV に曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4 週後マウスにワクチン接種し、10 週後脾臓の T 細胞応答を調べた。図 7 A、7 B、及び 7 C は、全ての CD44+CD8+T 細胞中の IFN- γ 産生 CD44+CD8+T 細胞の頻度を示す。ペプチドプール無しでインキュベートされた脾細胞により得られたバックグラウンド応答を減算した。図 7 D－ペプチドプール。図 7 E－個別のペプチド配列。図 7 E では、出現の順序で、それぞれ配列番号 55～68 及び 189～233 を開示する。

【図 7 D】図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D、及び図 7 E は、例示的な HBV エピトープ変化実験を示す。図 7 A－マウスを AdC6－gDPoLN ワクチンで免疫化した。4 週後、脾細胞の PoLN 配列を表すペプチドプールに対する IFN- γ 応答を細胞内サイトカイン染色により調べた。刺激後の T 細胞を T 細胞マーカーについて染色した。図 7 B－結果は、 1×10^{10} v g の AAV8-1.3-HBV に曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4 週後マウスにワクチン接種し、10 週後脾臓の T 細胞応答を調べた。図 7 C－結果は、 1.5×10^{11} v g の AAV8-1.3-HBV に曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4 週後マウスにワクチン接種し、10 週後脾臓の T 細胞応答を調べた。図 7 A、7 B、及び 7 C は、全ての CD44+CD8+T 細胞中の IFN- γ 産生 CD44+CD8+T 細胞の頻度を示す。ペプチドプール無しでインキュベートされた脾細胞により得られたバックグラウンド応答を減算した。図 7 D－ペプチドプール。図 7 E－個別のペプチド配列。図 7 E では、出現の順序で、それぞれ配列番号 55～68 及び 189～233 を開示する。

【図 7 E】図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D、及び図 7 E は、例示的な HBV エピトープ変化実験を示す。図 7 A－マウスを AdC6－gDPoLN ワクチンで免疫化した。4 週後、脾細胞の PoLN 配列を表すペプチドプールに対する IFN- γ 応答を細胞内サイトカイン染色により調べた。刺激後の T 細胞を T 細胞マーカーについて染色した。図 7 B－結果は、 1×10^{10} v g の AAV8-1.3-HBV に曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4 週後マウスにワクチン接種し、10 週後脾臓の T 細胞応答を調べた。図 7 C－結果は、 1.5×10^{11} v g の AAV8-1.3-HBV に曝露したマウス由来の脾細胞を使用する同一のアッセイにより得られた。4 週後マウスにワクチン接種し、10 週後脾臓の T 細胞応答を調べた。図 7 A、7 B、及び 7 C は、全ての CD44+CD8+T 細胞中の IFN- γ 産生 CD44+CD8+T 細胞の頻度を示す。ペプチドプール無しでインキュベートされた脾細胞により得られたバックグラウンド応答を減算した。図 7 D－ペプチドプール。図 7 E－個別のペプチド配列。図 7 E では、出現の順序で、それぞれ配列番号 55～68 及び 189～233 を開示する。

【図 8 A】図 8 A、図 8 B、及び図 8 C は、図 7 に上述した同一の実験からのデータを示す。ペプチドプールに対する応答に基づいて、どの個別のペプチド（プールとペプチドの両方は図 7 に示される）が陽性かを決定した。グラフは、ペプチドの全てに対する応答を示す。各ペプチドは、2 個のプールに存在し、したがって各ペプチドに対して 2 個の頻度値が得られ、低いデータポイントのみをこの図面に示す。

【図 8 B】図 8 A、図 8 B、及び図 8 C は、図 7 に上述した同一の実験からのデータを示す。ペプチドプールに対する応答に基づいて、どの個別のペプチド（プールとペプチドの両方は図 7 に示される）が陽性かを決定した。グラフは、ペプチドの全てに対する応答を

10

20

30

40

50

示す。各ペプチドは、2個のプールに存在し、したがって各ペプチドに対して2個の頻度値が得られ、低いデータポイントのみをこの図面に示す。

【図8C】図8A、図8B、及び図8Cは、図7に上述した同一の実験からのデータを示す。ペプチドプールに対する応答に基づいて、どの個別のペプチド（プールとペプチドの両方は図7に示される）が陽性かを決定した。グラフは、ペプチドの全てに対する応答を示す。各ペプチドは、2個のプールに存在し、したがって各ペプチドに対して2個の頻度値が得られ、低いデータポイントのみをこの図面に示す。

【図9A】図9A、図9B、及び図9Cは、様々な用量の例示的なAdC6-gDCore、AdC6-gDPoLN、又はAdC6-gDPoLCベクターを注射し、第1の注射の2か月後に同一の挿入断片を含むAdC7ベクター（すなわち、AdC7-gDCore、AdC7-gDPoLN、又はAdC7-gDPoLCベクター）をブースター接種したC57BL/6マウス（グループあたりn=5）に対して実行された例示的な免疫原性実験の結果を示す。図9Aは、抗原免疫原性を示し、図9Bは、応答期間を示し、そして図9Cは、プライムブースト応答を示す。

10

【図9B】図9A、図9B、及び図9Cは、様々な用量の例示的なAdC6-gDCore、AdC6-gDPoLN、又はAdC6-gDPoLCベクターを注射し、第1の注射の2か月後に同一の挿入断片を含むAdC7ベクター（すなわち、AdC7-gDCore、AdC7-gDPoLN、又はAdC7-gDPoLCベクター）をブースター接種したC57BL/6マウス（グループあたりn=5）に対して実行された例示的な免疫原性実験の結果を示す。図9Aは、抗原免疫原性を示し、図9Bは、応答期間を示し、そして図9Cは、プライムブースト応答を示す。

20

【図9C】図9A、図9B、及び図9Cは、様々な用量の例示的なAdC6-gDCore、AdC6-gDPoLN、又はAdC6-gDPoLCベクターを注射し、第1の注射の2か月後に同一の挿入断片を含むAdC7ベクター（すなわち、AdC7-gDCore、AdC7-gDPoLN、又はAdC7-gDPoLCベクター）をブースター接種したC57BL/6マウス（グループあたりn=5）に対して実行された例示的な免疫原性実験の結果を示す。図9Aは、抗原免疫原性を示し、図9Bは、応答期間を示し、そして図9Cは、プライムブースト応答を示す。

【図10】図10は、AdC6-gDPoLNの初回接種及びAdC7-gDPoLNのブースター接種によるワクチン接種後のBALB/c、C57BL/6、及びHLA-A2遺伝子導入マウスのPoLNエピトープのCD8+T細胞ペプチド認識を示す。CD8+T細胞ペプチド認識は、初回接種又はブースター接種のいずれかの2週後に認識された陽性のペプチド数をPoLN由来の重複した8個のペプチドの総数（合計59ペプチド）で割った分数として計算された。

30

【図11A】図11A及び図11Bは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウスの肝臓中のワクチンで誘導されたHBV特異的CD8+T細胞応答を示す。*0.01~0.05のp値、***0.0001~0.001のp値、1元配置分散分析による。

【図11B】図11A及び図11Bは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウスの肝臓中のワクチンで誘導されたHBV特異的CD8+T細胞応答を示す。*0.01~0.05のp値、***0.0001~0.001のp値、1元配置分散分析による。

40

【図12A】図12A、図12B、図12C、図12D、図12E、及び図12Fは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウス由来の肝臓サンプルのヘマトキシリン&エオシン染色を示す。拡大率20倍。矢印は、リンパ球浸潤物の領域を示す。

【図12B】図12A、図12B、図12C、図12D、図12E、及び図12Fは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウス由来の肝臓サンプルのヘマトキシリン&エオシン染色を示す。拡大率20倍。矢印は、リンパ球浸潤物の領域を示す。

【図12C】図12A、図12B、図12C、図12D、図12E、及び図12Fは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウス由来の肝臓サンプルのヘマトキシリン&エオシン染色を示す。拡大率20倍。矢印は、リンパ球浸潤物の領域を示す。

【図12D】図12A、図12B、図12C、図12D、図12E、及び図12Fは、示

50

されるベクターを注射したC57BL/6マウス由来の肝臓サンプルのヘマトキシリン&エオシン染色を示す。拡大率20倍。矢印は、リンパ球浸潤物の領域を示す。

【図12E】図12A、図12B、図12C、図12D、図12E、及び図12Fは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウス由来の肝臓サンプルのヘマトキシリン&エオシン染色を示す。拡大率20倍。矢印は、リンパ球浸潤物の領域を示す。

【図12F】図12A、図12B、図12C、図12D、図12E、及び図12Fは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウス由来の肝臓サンプルのヘマトキシリン&エオシン染色を示す。拡大率20倍。矢印は、リンパ球浸潤物の領域を示す。

【図13A】図13A及び図13Bは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウスの肝臓中のワクチンで誘導されたCD8+T細胞活性化/消耗のマーカーを示す。*
0.001~0.01のp値、***0.0001~0.001のp値、1元配置分散分析による。

10

【図13B】図13A及び図13Bは、示されるベクターを注射したC57BL/6マウスの肝臓中のワクチンで誘導されたCD8+T細胞活性化/消耗のマーカーを示す。*
0.001~0.01のp値、***0.0001~0.001のp値、1元配置分散分析による。

【図14A】図14A及び図14Bは、例示的なAdC6-gDPoLNベクターを注射したC57BL/6マウスのHBVウイルス動態を示す。4週目のHBV DNA VL/mlの中央値-7.3 log₁₀ cps/mlを提供する。n=7で、1匹のマウスはデータ欠損により除外した。

20

【図14B】図14A及び図14Bは、例示的なAdC6-gDPoLNベクターを注射したC57BL/6マウスのHBVウイルス動態を示す。4週目のHBV DNA VL/mlの中央値-7.3 log₁₀ cps/mlを提供する。n=7で、1匹のマウスはデータ欠損により除外した。

【図15A】図15A及び図15Bは、最初に10¹⁰又は10¹¹vgのAAV-1.3HBVを注射し、4週後10¹⁰vpの例示的なAdC6-gDPoLNベクターをブースター接種したC57BL/6マウスのCD8+T細胞応答に対するAAVで誘導されたHBVの影響を示す。図15Bでは、各スライスは、大きさが全体の割合を示す、個別のエピトープを表し、0.1%を超える応答のみを含めた。引き抜きは、AAV8-1.3HBVで感染させたマウスでのみ認識されたエピトープを表す。

30

【図15B】図15A及び図15Bは、最初に10¹⁰又は10¹¹vgのAAV-1.3HBVを注射し、4週後10¹⁰vpの例示的なAdC6-gDPoLNベクターをブースター接種したC57BL/6マウスのCD8+T細胞応答に対するAAVで誘導されたHBVの影響を示す。図15Bでは、各スライスは、大きさが全体の割合を示す、個別のエピトープを表し、0.1%を超える応答のみを含めた。引き抜きは、AAV8-1.3HBVで感染させたマウスでのみ認識されたエピトープを表す。

【図16】図16は、10¹⁰vgのAAV8-1.3HBVベクターを静脈内に注射し、4週後5×10⁹vpのAdC6-gDPoLNベクターをワクチン接種し、2か月後に同一の用量のAdC7-gDPoLNワクチンをブースター接種した個別のC57BL/6マウスのIFN-γ産生CD8+T細胞の頻度を示す。コントロールマウスは、ワクチンのみを受けた。未処置のマウスは、追加のコントロールとして働いた。

40

【図17A】図17A及び図17Bは、A) 個別のマウスの肝臓のリンパ性浸潤物内のCD8+T細胞の割合、及びB) 同一の浸潤物内のPoLN-四量体+CD8+T細胞の頻度を示す。C57BL/6マウスに10¹⁰又は10¹¹vgのAAV8-1.3HBVベクターを静脈内に注射し、4週後5×10⁹vpのAdC6-gDPoLNベクターをワクチン接種し、2か月後同一の用量のAdC7-gDPoLNワクチンをブースター接種した。コントロールマウスは、ワクチンのみを受けた。未処置のマウスは、追加のコントロールとして働いた。

【図17B】図17A及び図17Bは、A) 個別のマウスの肝臓のリンパ性浸潤物内のCD8+T細胞の割合、及びB) 同一の浸潤物内のPoLN-四量体+CD8+T細胞の頻度を

50

示す。C57BL/6マウスに 10^{10} 又は 10^{11} v gのAAV8-1.3HBVベクターを静脈内に注射し、4週後 5×10^9 v pのAdC6-gDPolNベクターをワクチン接種し、2か月後同一の用量のAdC7-gDPolNワクチンをブースター接種した。コントロールマウスは、ワクチンのみを受けた。未処置のマウスは、追加のコントロールとして働いた。

【図18A】図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、及び図18Fは、示されるマーカーの平均蛍光強度(MFI)で分析した未処理の(すなわち、四量体 $CD44^+CD8^+$) T細胞と比較した浸潤性四量体 $CD8^+$ T細胞の表現型を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

10

【図18B】図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、及び図18Fは、示されるマーカーの平均蛍光強度(MFI)で分析した未処理の(すなわち、四量体 $CD44^+CD8^+$) T細胞と比較した浸潤性四量体 $CD8^+$ T細胞の表現型を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

【図18C】図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、及び図18Fは、示されるマーカーの平均蛍光強度(MFI)で分析した未処理の(すなわち、四量体 $CD44^+CD8^+$) T細胞と比較した浸潤性四量体 $CD8^+$ T細胞の表現型を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

20

【図18D】図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、及び図18Fは、示されるマーカーの平均蛍光強度(MFI)で分析した未処理の(すなわち、四量体 $CD44^+CD8^+$) T細胞と比較した浸潤性四量体 $CD8^+$ T細胞の表現型を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

【図18E】図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、及び図18Fは、示されるマーカーの平均蛍光強度(MFI)で分析した未処理の(すなわち、四量体 $CD44^+CD8^+$) T細胞と比較した浸潤性四量体 $CD8^+$ T細胞の表現型を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

30

【図18F】図18A、図18B、図18C、図18D、図18E、及び図18Fは、示されるマーカーの平均蛍光強度(MFI)で分析した未処理の(すなわち、四量体 $CD44^+CD8^+$) T細胞と比較した浸潤性四量体 $CD8^+$ T細胞の表現型を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

40

【図19A】図19A、図19B、図19C、図19D、図19E、及び図19Fは、示されるマーカーについて Tet^+ 又は未処理の $CD8^+$ T細胞陽性の割合を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

【図19B】図19A、図19B、図19C、図19D、図19E、及び図19Fは、示されるマーカーについて Tet^+ 又は未処理の $CD8^+$ T細胞陽性の割合を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) p

50

≤ 0.0001 。

【図19C】図19A、図19B、図19C、図19D、図19E、及び図19Fは、示されるマーカーについてTet⁺又は未処理のCD8⁺T細胞陽性の割合を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

【図19D】図19A、図19B、図19C、図19D、図19E、及び図19Fは、示されるマーカーについてTet⁺又は未処理のCD8⁺T細胞陽性の割合を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

10

【図19E】図19A、図19B、図19C、図19D、図19E、及び図19Fは、示されるマーカーについてTet⁺又は未処理のCD8⁺T細胞陽性の割合を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

【図19F】図19A、図19B、図19C、図19D、図19E、及び図19Fは、示されるマーカーについてTet⁺又は未処理のCD8⁺T細胞陽性の割合を示す。上の星付きの線は、多重t検定による有意な差を示す。(*) $p \leq 0.05 \sim 0.01$ 、(**) $p \leq 0.01 \sim 0.001$ 、(***) $p \leq 0.001 \sim 0.0001$ 、(****) $p \leq 0.0001$ 。

20

【図20A】図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、及び図20Fは、P o l N配列に及ぶ個別のペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を示す。全プルー全てのP o l Nペプチドの混合物に対する応答；未処置—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する未処置のマウスの応答。図20A及び図20Dは、AdC6-gDP o l Nワクチンのみを受けたマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20B及び図20Eは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に10¹⁰ v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20C及び図20Fは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に10¹¹ v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20A、20B及び20Cは、図7Dに示されるペプチドプール及び図7Eを使用して認識された個別のペプチド配列を使用する個別のエピトープによる免疫応答の幅を計算するために使用することができる。

30

【図20B】図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、及び図20Fは、P o l N配列に及ぶ個別のペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を示す。全プルー全てのP o l Nペプチドの混合物に対する応答；未処置—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する未処置のマウスの応答。図20A及び図20Dは、AdC6-gDP o l Nワクチンのみを受けたマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20B及び図20Eは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に10¹⁰ v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20C及び図20Fは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に10¹¹ v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20A、20B及び20Cは、図7Dに示されるペプチドプール及び図7Eを使用して認識された個別のペプチド配列を使用する個別のエピトープによる免疫応答の幅を計算するために使用することができる。

40

【図20C】図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、及び図20Fは、P o l N配列に及ぶ個別のペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を示す。全プルー全てのP o l Nペプチドの混合物に対する応答；未処置—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する未処置のマウスの応答。図20A及び図20Dは、AdC6-gDP o l Nワクチンのみを受けたマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20B及び図20Eは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に10¹⁰ v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20C及び図20Fは、AdC6-gDP o l Nでの

50

ワクチン接種の4週前に 10^{11} v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20A、20B及び20Cは、図7Dに示されるペプチドプール及び図7Eを使用して認識された個別のペプチド配列を使用する個別のエピトープによる免疫応答の幅を計算するために使用することができる。

【図20D】図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、及び図20Fは、P o l N配列に及ぶ個別のペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を示す。全プール—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する応答；未処置—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する未処置のマウスの応答。図20A及び図20Dは、AdC6-gDP o l Nワクチンのみを受けたマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20B及び図20Eは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に 10^{10} v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20C及び図20Fは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に 10^{11} v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20A、20B及び20Cは、図7Dに示されるペプチドプール及び図7Eを使用して認識された個別のペプチド配列を使用する個別のエピトープによる免疫応答の幅を計算するために使用することができる。

10

【図20E】図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、及び図20Fは、P o l N配列に及ぶ個別のペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を示す。全プール—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する応答；未処置—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する未処置のマウスの応答。図20A及び図20Dは、AdC6-gDP o l Nワクチンのみを受けたマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20B及び図20Eは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に 10^{10} v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20C及び図20Fは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に 10^{11} v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20A、20B及び20Cは、図7Dに示されるペプチドプール及び図7Eを使用して認識された個別のペプチド配列を使用する個別のエピトープによる免疫応答の幅を計算するために使用することができる。

20

【図20F】図20A、図20B、図20C、図20D、図20E、及び図20Fは、P o l N配列に及ぶ個別のペプチドに対するCD8⁺T細胞応答を示す。全プール—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する応答；未処置—全てのP o l Nペプチドの混合物に対する未処置のマウスの応答。図20A及び図20Dは、AdC6-gDP o l Nワクチンのみを受けたマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20B及び図20Eは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に 10^{10} v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20C及び図20Fは、AdC6-gDP o l Nでのワクチン接種の4週前に 10^{11} v gのAAV8-1.3HBVを注射したマウスのCD8⁺T細胞応答を示す。図20A、20B及び20Cは、図7Dに示されるペプチドプール及び図7Eを使用して認識された個別のペプチド配列を使用する個別のエピトープによる免疫応答の幅を計算するために使用することができる。

30

【図21A】図21A及び図21Bは、マウスの脾臓又は肝臓のP o l N特異的CD8⁺T細胞を示す。図21Aの左のパネルは、その後 5×10^{10} v pのAdC6-gDP o l Nワクチンを受けた又は受けなかったAAV8-1.3HBVを注射したマウスの脾臓のCD8⁺T細胞応答を示す。図21Aの中央のパネルは、異なる用量のAAV8-1.3HBVで処置し、プライムブースト計画のワクチンを受けたマウスの肝臓のCD8⁺T細胞頻度を示す。図21Aの右のパネルは、同一の実験由来のP o l N特異的CD8⁺T細胞又は未処理のCD8⁺T細胞のT o x - 1発現レベルを示す。図21Bは、I F N - γ + CD8⁺T細胞の割合を示す。

40

【図21B】図21A及び図21Bは、マウスの脾臓又は肝臓のP o l N特異的CD8⁺T細胞を示す。図21Aの左のパネルは、その後 5×10^{10} v pのAdC6-gDP o l Nワクチンを受けた又は受けなかったAAV8-1.3HBVを注射したマウスの脾臓のCD8⁺T細胞応答を示す。図21Aの中央のパネルは、異なる用量のAAV8-1.3HBVで処置し、プライムブースト計画のワクチンを受けたマウスの肝臓のCD8⁺T細胞

50

頻度を示す。図 2 1 A の右のパネルは、同一の実験由来の P o l N 特異的 C D 8⁺ T 細胞又は未処理の C D 8⁺ T 細胞の T o x - 1 発現レベルを示す。図 2 1 B は、I F N - γ + C D 8⁺ T 細胞の割合を示す。

【図 2 2 A】図 2 2 A 及び図 2 2 B は、A) 示される A d C 6 ベクターを注射したマウスの血液中の C D 8⁺ T 細胞頻度、及び B) 四量体 + C D 8⁺ T 細胞の頻度を示す。

【図 2 2 B】図 2 2 A 及び図 2 2 B は、A) 示される A d C 6 ベクターを注射したマウスの血液中の C D 8⁺ T 細胞頻度、及び B) 四量体 + C D 8⁺ T 細胞の頻度を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、示される A d C 7 ベクターを注射したマウスの血液中の C D 8⁺ T 細胞頻度を示す。

【図 2 4 A】図 2 4 A、図 2 4 B、図 2 4 C、図 2 4 D、図 2 4 E、及び図 2 4 F は、示される A d C 7 ベクターを注射し（「初回接種後」）、対応する A d C 6 ベクターをブースター接種した（「ブースター接種後」）マウスの血液中の g D H B V 2 及び g D H B V 3 挿入断片に対する C D 8⁺（図 2 4 A ~ 図 2 4 C）及び C D 4⁺（図 2 4 D ~ 図 2 4 F）T 細胞頻度を示す。グラフは、I F N - γ を産生する T 細胞の頻度、T N F - α を産生する T 細胞の頻度、及びいずれかのサイトカインを産生する T 細胞の頻度の合計を示す。

【図 2 4 B】図 2 4 A、図 2 4 B、図 2 4 C、図 2 4 D、図 2 4 E、及び図 2 4 F は、示される A d C 7 ベクターを注射し（「初回接種後」）、対応する A d C 6 ベクターをブースター接種した（「ブースター接種後」）マウスの血液中の g D H B V 2 及び g D H B V 3 挿入断片に対する C D 8⁺（図 2 4 A ~ 図 2 4 C）及び C D 4⁺（図 2 4 D ~ 図 2 4 F）T 細胞頻度を示す。グラフは、I F N - γ を産生する T 細胞の頻度、T N F - α を産生する T 細胞の頻度、及びいずれかのサイトカインを産生する T 細胞の頻度の合計を示す。

【図 2 4 C】図 2 4 A、図 2 4 B、図 2 4 C、図 2 4 D、図 2 4 E、及び図 2 4 F は、示される A d C 7 ベクターを注射し（「初回接種後」）、対応する A d C 6 ベクターをブースター接種した（「ブースター接種後」）マウスの血液中の g D H B V 2 及び g D H B V 3 挿入断片に対する C D 8⁺（図 2 4 A ~ 図 2 4 C）及び C D 4⁺（図 2 4 D ~ 図 2 4 F）T 細胞頻度を示す。グラフは、I F N - γ を産生する T 細胞の頻度、T N F - α を産生する T 細胞の頻度、及びいずれかのサイトカインを産生する T 細胞の頻度の合計を示す。

【図 2 4 D】図 2 4 A、図 2 4 B、図 2 4 C、図 2 4 D、図 2 4 E、及び図 2 4 F は、示される A d C 7 ベクターを注射し（「初回接種後」）、対応する A d C 6 ベクターをブースター接種した（「ブースター接種後」）マウスの血液中の g D H B V 2 及び g D H B V 3 挿入断片に対する C D 8⁺（図 2 4 A ~ 図 2 4 C）及び C D 4⁺（図 2 4 D ~ 図 2 4 F）T 細胞頻度を示す。グラフは、I F N - γ を産生する T 細胞の頻度、T N F - α を産生する T 細胞の頻度、及びいずれかのサイトカインを産生する T 細胞の頻度の合計を示す。

【図 2 4 E】図 2 4 A、図 2 4 B、図 2 4 C、図 2 4 D、図 2 4 E、及び図 2 4 F は、示される A d C 7 ベクターを注射し（「初回接種後」）、対応する A d C 6 ベクターをブースター接種した（「ブースター接種後」）マウスの血液中の g D H B V 2 及び g D H B V 3 挿入断片に対する C D 8⁺（図 2 4 A ~ 図 2 4 C）及び C D 4⁺（図 2 4 D ~ 図 2 4 F）T 細胞頻度を示す。グラフは、I F N - γ を産生する T 細胞の頻度、T N F - α を産生する T 細胞の頻度、及びいずれかのサイトカインを産生する T 細胞の頻度の合計を示す。

【図 2 4 F】図 2 4 A、図 2 4 B、図 2 4 C、図 2 4 D、図 2 4 E、及び図 2 4 F は、示される A d C 7 ベクターを注射し（「初回接種後」）、対応する A d C 6 ベクターをブースター接種した（「ブースター接種後」）マウスの血液中の g D H B V 2 及び g D H B V 3 挿入断片に対する C D 8⁺（図 2 4 A ~ 図 2 4 C）及び C D 4⁺（図 2 4 D ~ 図 2 4 F）T 細胞頻度を示す。グラフは、I F N - γ を産生する T 細胞の頻度、T N F - α を産生する T 細胞の頻度、及びいずれかのサイトカインを産生する T 細胞の頻度の合計を示す。

【図 2 5 A】図 2 5 A 及び図 2 5 B は、 1×10^9 v g の A A V 8 - 1 . 3 H B V を曝露し、4 週後 1×10^{10} v p の A d C 6 - g D P o l N（「g D P o l N」）、A d C 6 - g D H B V 2（「g D H B V 2」）、A d C 6 - g D H B V 3（「g D H B V 3」）、又は g D 無しの A d C 6 - H B V 2（「H B V 2」）をワクチン接種した C 5 7 B l / 6 マウスの H B V D N A ウイルス力価を示し、A A V で感染させ、ワクチン接種していない動物

10

20

30

40

50

(「未処置」)、及び AAV で感染させず、ワクチン接種していない動物 (データを示さず) はコントロールとして働いた。図 25 A は、AAV 曝露後 4 週目及び 8 週目の各グループのウイルス力価を示し、図 25 B は、AAV 曝露後 4 週目及び 8 週目の個別のマウスの結果を示す。

【図 25 B】図 25 A 及び図 25 B は、 1×10^9 v g の AAV8-1.3 HBV を曝露し、4 週後 1×10^{10} v p の AdC6-gDPoLN (「gDPoLN」)、AdC6-gDHBV2 (「gDHBV2」)、AdC6-gDHBV3 (「gDHBV3」)、又は gD 無しの AdC6-HBV2 (「HBV2」) をワクチン接種した C57BL/6 マウスの HBVDNA ウイルス力価を示し、AAV で感染させ、ワクチン接種していない動物 (「未処置」)、及び AAV で感染させず、ワクチン接種していない動物 (データを示さず) はコントロールとして働いた。図 25 A は、AAV 曝露後 4 週目及び 8 週目の各グループのウイルス力価を示し、図 25 B は、AAV 曝露後 4 週目及び 8 週目の個別のマウスの結果を示す。

【図 26 A】図 26 A、図 26 B、図 26 C、及び図 26 D は、示される構築物を使用した初回接種後 2 週目及び 8 週目並びにブースター接種後 2 週目及び 4 週目の親の IFN- γ 及び/又は TNF- α 産生 CD8⁺T 細胞 (図 26 A)、CD44+CD8⁺T 細胞 (図 26 B)、CD4⁺T 細胞 (図 26 C) 又は CD44+CD4⁺T 細胞 (図 26 D) の割合 (平均として) を示す。

【図 26 B】図 26 A、図 26 B、図 26 C、及び図 26 D は、示される構築物を使用した初回接種後 2 週目及び 8 週目並びにブースター接種後 2 週目及び 4 週目の親の IFN- γ 及び/又は TNF- α 産生 CD8⁺T 細胞 (図 26 A)、CD44+CD8⁺T 細胞 (図 26 B)、CD4⁺T 細胞 (図 26 C) 又は CD44+CD4⁺T 細胞 (図 26 D) の割合 (平均として) を示す。

【図 26 C】図 26 A、図 26 B、図 26 C、及び図 26 D は、示される構築物を使用した初回接種後 2 週目及び 8 週目並びにブースター接種後 2 週目及び 4 週目の親の IFN- γ 及び/又は TNF- α 産生 CD8⁺T 細胞 (図 26 A)、CD44+CD8⁺T 細胞 (図 26 B)、CD4⁺T 細胞 (図 26 C) 又は CD44+CD4⁺T 細胞 (図 26 D) の割合 (平均として) を示す。

【図 26 D】図 26 A、図 26 B、図 26 C、及び図 26 D は、示される構築物を使用した初回接種後 2 週目及び 8 週目並びにブースター接種後 2 週目及び 4 週目の親の IFN- γ 及び/又は TNF- α 産生 CD8⁺T 細胞 (図 26 A)、CD44+CD8⁺T 細胞 (図 26 B)、CD4⁺T 細胞 (図 26 C) 又は CD44+CD4⁺T 細胞 (図 26 D) の割合 (平均として) を示す。

【図 27 A】図 27 A、図 27 B、及び図 27 C は、示される構築物 (PoLN=gDPoLN; HBV2=gDHBV2; HBV3=gDHBV3) で初回接種後 4 週目 (図 27 A); ブースター接種後 2 週目 (図 27 B); 及びブースター接種後 4 週目 (図 27 C) の複数の時点での CD8⁺T 細胞を示す。グラフは、ICS により評価された IFN- γ を産生する CD8⁺T 細胞の全体の頻度を示す。

【図 27 B】図 27 A、図 27 B、及び図 27 C は、示される構築物 (PoLN=gDPoLN; HBV2=gDHBV2; HBV3=gDHBV3) で初回接種後 4 週目 (図 27 A); ブースター接種後 2 週目 (図 27 B); 及びブースター接種後 4 週目 (図 27 C) の複数の時点での CD8⁺T 細胞を示す。グラフは、ICS により評価された IFN- γ を産生する CD8⁺T 細胞の全体の頻度を示す。

【図 27 C】図 27 A、図 27 B、及び図 27 C は、示される構築物 (PoLN=gDPoLN; HBV2=gDHBV2; HBV3=gDHBV3) で初回接種後 4 週目 (図 27 A); ブースター接種後 2 週目 (図 27 B); 及びブースター接種後 4 週目 (図 27 C) の複数の時点での CD8⁺T 細胞を示す。グラフは、ICS により評価された IFN- γ を産生する CD8⁺T 細胞の全体の頻度を示す。

【図 28 A】図 28 A、図 28 B、及び図 28 C は、示される構築物 (PoLN=gDPoLN; HBV2=gDHBV2; HBV3=gDHBV3) で初回接種後 4 週目、(図

10

20

30

40

50

28A) ; ブースター接種後2週目 (図28B) ; 及びブースター接種後4週目 (図28C) の複数の時点での、ICSによって評価されたサイトカイン産生CD4+T細胞を示す。破線は、未処置のマウスからの結果に基づく陽性応答のカットオフを示す。

【図28B】図28A、図28B、及び図28Cは、示される構築物 (POLN = gDPOLN ; HBV2 = gDHBV2 ; HBV3 = gDHBV3) で初回接種後4週目、(図28A) ; ブースター接種後2週目 (図28B) ; 及びブースター接種後4週目 (図28C) の複数の時点での、ICSによって評価されたサイトカイン産生CD4+T細胞を示す。破線は、未処置のマウスからの結果に基づく陽性応答のカットオフを示す。

【図28C】図28A、図28B、及び図28Cは、示される構築物 (POLN = gDPOLN ; HBV2 = gDHBV2 ; HBV3 = gDHBV3) で初回接種後4週目、(図28A) ; ブースター接種後2週目 (図28B) ; 及びブースター接種後4週目 (図28C) の複数の時点での、ICSによって評価されたサイトカイン産生CD4+T細胞を示す。破線は、未処置のマウスからの結果に基づく陽性応答のカットオフを示す。

【図29A】図29A及び図29Bは、示される構築物 (POLN = gDPOLN ; HBV2 = gDHBV2) で初回接種後4週目のCD8+T細胞 (図29A) 又はCD44+CD8+T細胞 (図29B) にゲートされた四量体染色の結果を示す。

【図29B】図29A及び図29Bは、示される構築物 (POLN = gDPOLN ; HBV2 = gDHBV2) で初回接種後4週目のCD8+T細胞 (図29A) 又はCD44+CD8+T細胞 (図29B) にゲートされた四量体染色の結果を示す。

【図30A】図30A、図30B、図30C、図30D、図30E、及び図30Fは、示される抗体に結合した色素の平均蛍光強度として示される四量体+CD8+T細胞の表現型を示す。図30A-BV605と結合した抗PD1抗体、図30B-BV650と結合した抗LAG3抗体、図30C-Pe-Cy7-Aと結合した抗TIM3抗体；図30D-PE-Aと結合した抗CTLA4抗体；図30E-AF488と結合した抗EOMES抗体；及び図30F-BV786と結合した抗Tbet抗体。

【図30B】図30A、図30B、図30C、図30D、図30E、及び図30Fは、示される抗体に結合した色素の平均蛍光強度として示される四量体+CD8+T細胞の表現型を示す。図30A-BV605と結合した抗PD1抗体、図30B-BV650と結合した抗LAG3抗体、図30C-Pe-Cy7-Aと結合した抗TIM3抗体；図30D-PE-Aと結合した抗CTLA4抗体；図30E-AF488と結合した抗EOMES抗体；及び図30F-BV786と結合した抗Tbet抗体。

【図30C】図30A、図30B、図30C、図30D、図30E、及び図30Fは、示される抗体に結合した色素の平均蛍光強度として示される四量体+CD8+T細胞の表現型を示す。図30A-BV605と結合した抗PD1抗体、図30B-BV650と結合した抗LAG3抗体、図30C-Pe-Cy7-Aと結合した抗TIM3抗体；図30D-PE-Aと結合した抗CTLA4抗体；図30E-AF488と結合した抗EOMES抗体；及び図30F-BV786と結合した抗Tbet抗体。

【図30D】図30A、図30B、図30C、図30D、図30E、及び図30Fは、示される抗体に結合した色素の平均蛍光強度として示される四量体+CD8+T細胞の表現型を示す。図30A-BV605と結合した抗PD1抗体、図30B-BV650と結合した抗LAG3抗体、図30C-Pe-Cy7-Aと結合した抗TIM3抗体；図30D-PE-Aと結合した抗CTLA4抗体；図30E-AF488と結合した抗EOMES抗体；及び図30F-BV786と結合した抗Tbet抗体。

【図30E】図30A、図30B、図30C、図30D、図30E、及び図30Fは、示される抗体に結合した色素の平均蛍光強度として示される四量体+CD8+T細胞の表現型を示す。図30A-BV605と結合した抗PD1抗体、図30B-BV650と結合した抗LAG3抗体、図30C-Pe-Cy7-Aと結合した抗TIM3抗体；図30D-PE-Aと結合した抗CTLA4抗体；図30E-AF488と結合した抗EOMES抗体；及び図30F-BV786と結合した抗Tbet抗体。

【図30F】図30A、図30B、図30C、図30D、図30E、及び図30Fは、示

10

20

30

40

50

される抗体に結合した色素の平均蛍光強度として示される四量体+CD8+T細胞の表現型を示す。図30A-BV605と結合した抗PD1抗体、図30B-BV650と結合した抗LAG3抗体、図30C-Pe-Cy7-Aと結合した抗TIM3抗体；図30D-PE-Aと結合した抗CTLA4抗体；図30E-AF488と結合した抗EOMES抗体；及び図30F-BV786と結合した抗T-bet抗体。

【図31】図31は、 5×10^{10} v p AdC7-gDHBV2での初回ワクチン接種に続けて2か月後 5×10^{10} v p AdC6-gDHBV2をワクチン接種した後のCD8⁺T細胞応答を示す。X軸上の数は、本明細書に提供される配列番号に対応する。

【図32】図32は、 5×10^9 v p AdC7-gDHBV2での初回ワクチン接種に続けて2か月後 5×10^9 v p AdC6-gDHBV2をワクチン接種した後のCD8+T細胞応答を示す。X軸上の数は、本明細書に提供される配列番号に対応する。

10

【図33】図33は、 5×10^{10} v p AdC7-gDHBV3での初回ワクチン接種に続けて2か月後 5×10^{10} v p AdC6-gDHBV3をワクチン接種した後の免疫原性を示す。X軸上の数は、本明細書に提供される配列番号に対応する。

【図34】図34は、本明細書に提供される配列番号（X軸）に対応するAdC6-gDHBV2及びAdC7-gDHBV2ワクチンの免疫原性を示す。両HBV2構築物のCore、PolC、及びPolN領域は、免疫原性だった。

【図35】図35は、本明細書に提供される配列番号（X軸）に対応するAdC6-gDHBV3及びAdC7-gDHBV3ワクチンの免疫原性を示す。両HBV3構築物のCore、PolC、及びPolN領域は、免疫原性だった。

20

【発明を実施するための形態】

【0015】

開示されるタンパク質、ワクチン、及び方法は、本開示の一部を形成する添付の図面に關して考慮された以下の詳細な説明を参照することにより容易に理解されてよい。開示されるタンパク質、ワクチン、及び方法は、本明細書に記載及び／又は示される特定のタンパク質、ワクチン、及び方法に限定されず、本明細書に用いられる専門用語は、例として特定の実施形態を説明する目的のためにすぎず、請求されるタンパク質、ワクチン、及び方法に限定することを意図されるものではないと理解されるべきである。

【0016】

別段の具体的な記載がない限り、動作の可能性のある機構若しくはモード、又は改善した理由に関するいずれの説明も例示のみを意図されており、開示されるタンパク質、ワクチン、及び方法は、いずれのこのような提案された動作の機構若しくはモード又は改善した理由の正確さ又は不正確さによって強制されるべきでない。

30

【0017】

本文を通じて、説明は、タンパク質及びこのタンパク質の使用方法に関する。本開示がタンパク質に関連する特徴又は実施形態を記載し、又は主張する場合、このような特徴又は実施形態はタンパク質の使用方法にも同様に適用できる。同様に、本開示がこのタンパク質の使用方法に関する特徴又は実施形態を記載し、又は主張する場合、このような特徴又は実施形態は、タンパク質にも同様に適用できる。

【0018】

数値範囲が明細書中に記載され、又は設定された場合、この範囲には、その端点及び全ての個々の整数並びにこの範囲内の有理数が含まれ、そしてこれらの狭い範囲の各々が明示的に記載されるかのように、定められた範囲内の大きなグループの値の下位グループを同じ程度に形成するためにそれらの端点及び内部の整数並びに有利数の全ての様々な可能な組み合わせによって形成されるこれらの中の狭い範囲の各々も含まれる。数値範囲が定められた値より大きいように本明細書に定められる場合、この範囲はやはり有限であり、本明細書に記載される本発明の文脈内で使用可能な値によって上端に接する。数値範囲が定められた値より小さいように本明細書に定められる場合、この範囲はやはり非ゼロ値により下端に接する。範囲を定義する場合、本発明の範囲が記載される特定の値に限定されることを意図するものではない。全ての範囲は包括的であり、そして結合することができ

40

50

る。

【0019】

先行する語「約」の使用により、値が近似値として表現される場合、特定の値は別の実施形態を形成すると理解されるだろう。特定の数値に対する参照は、文脈で明確な別段の規定がない限り、少なくともその特定の値を含む。

【0020】

明確にするために、別個の実施形態の文脈で本明細書に記載される、開示されるタンパク質、ワクチン、及び方法の特定の特徴はまた、単一の実施形態に組み合わせて提供されてよいと理解されるべきである。逆に、簡潔にするために、単一の実施形態の文脈で記載される、開示されるタンパク質、ワクチン、及び方法の様々な特徴はまた、別個に又は任意のサブ組み合わせて提供されてもよい。

10

【0021】

本明細書で用いる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「1つの(the)」は、複数形を含む。

【0022】

説明の態様に関連する各種用語を本明細書及び特許請求の範囲を通じて用いる。このような用語は、別段の指定がない限り、当該技術分野における通常の意味を与えられるべきである。他の具体的に規定された用語は、本明細書に提供される定義と一致するように解釈されるべきである。

【0023】

本明細書で用いる場合、「その免疫原性断片」とは、被験体に免疫応答を引き起こすことができる開示されるHBVコア(Core)、HBVポリメラーゼN-末端ドメイン(Po1N)、又はHBVポリメラーゼC-末端ドメイン(Po1C)の一部を指す。

20

【0024】

本明細書で用いる場合、「被験体に提供すること」及び同様の用語は、融合タンパク質、核酸分子、ベクター、又はワクチンを、被験体の身体の標的細胞、組織又は区域が融合タンパク質、核酸分子、ベクター、又はワクチンと接触するように、被験体に送達する方法を示す。「被験体に提供すること」は、非経口及び経口の投与経路を含む。

【0025】

用語(承認された参照製品/生物学的製剤、すなわち、参照リスト薬の)「バイオ後続品」とは、参照製品が認可され、使用されることが意図される及び免許交付がバイオ後続品を探索するためである1つ又は複数の適切な使用条件で安全性、純度、及び効力を実証するのに十分な、(a)生物由来物質が臨床的に不活性な成分の小さな差異にもかかわらず、参照製品と非常に類似すると実証する分析研究、(b)動物試験(毒性評価を含む)、及び/又は(c)1つ又は複数の臨床試験(免疫原性及び薬物動態又は薬力学)に由来するデータに基づいて、臨床的に不活性な成分の小さな差異にもかかわらず、安全性、純度、及び効力に関してバイオ後続品と参照製品との間に臨床的に有意義な差異がない、参照製品と非常に類似する生物由来物質を指す。バイオ後続品は、処方医療専門家の介入なしに薬局で参照製品に対して置き換えてよい互換性製品であってよい。互換性のさらなる基準に見合うためには、バイオ後続品は、任意の一定の患者に参照製品と同一の臨床成績をもたらすことが想定されるべきであり、バイオ後続品が個人に1回より多く投与されたら、バイオ後続品と参照製品の使用を交替する又は切り換える安全性又は有効性の減少に関するリスクは、このような交替又は切り替えなしに参照製品を使用するリスクより高くない。バイオ後続品は、参照製品について機構が知られている程度の提案される使用条件について同一の作用機序を利用する。バイオ後続品について提案されたラベリングにおいて処方され、推奨され、又は提案された1つ又は複数の使用条件は、参照製品について以前承認されている。バイオ後続品の投与経路、剤形、及び/又は強度は、参照製品ものと同じであり、バイオ後続品は、バイオ後続品が安全で、純粋で、そして強力であり続けることを保証するよう設計された基準に合う施設で製造され、加工され、包装され、そして保持される。バイオ後続品は、参照製品と比較する場合、バイオ後続品の性能を変化する

30

40

50

ことが予想されないN末端又はC末端の削除などの、アミノ酸配列の小さな修飾を含んでよい。開示されるタンパク質及び融合タンパク質のバイオ後続品は、本開示の範囲内に含まれる。

【0026】

本明細書で用いる場合、用語「被験体」とは、任意の動物、特に哺乳類を表すことを意図する。本明細書にはマウスにおける免疫応答の誘導が例示されるが、開示される方法を用いていかなる種類の哺乳類を治療することができる。したがって、本方法は、好ましくはマウス及びヒト、最も好ましくはヒトで用いられるが、ヒト及び非ヒト動物に適用できる。

【0027】

用語「含む (comprising)」とは、用語「から本質的に成る (consisting essentially of)」及び「から成る (consisting of)」によって包含される例を含むことを意図し、同様に用語「から本質的に成る (consisting essentially of)」とは、用語「から成る (consisting of)」によって包含される例を含むことを意図する。

【0028】

本明細書において以下の略語を用いる。B型肝炎ウイルス (HBV) ; アデノウイルス (Ad) ; 単純ヘルペスウイルス (HSV) ; 糖タンパク質 (gD) 、及びウイルスゲノム (vg) 。

【0029】

本明細書では、B型肝炎ウイルス (HBV) コアタンパク質の非自然起源の変異体を提供する。開示されるHBVコアタンパク質は、配列番号6のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むことができる。配列番号6の例示的な免疫原性断片としては、以下の表3に提供される配列番号20～54が挙げられる。いくつかの実施形態において、HBVコアタンパク質の免疫原性断片は、配列番号180のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HBVコアタンパク質の免疫原性断片は、配列番号183のアミノ酸配列を含む。

【0030】

HBVコアタンパク質又はその免疫原性断片をコードする核酸分子も提供される。核酸分子は、配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質をコードすることができる。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号7の核酸配列を含む。核酸分子は、表3に提供されるコア断片をコードすることができる。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号180のアミノ酸配列をコードすることができる。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号183のアミノ酸配列をコードすることができる。

【0031】

HBVコアタンパク質又はその免疫原性断片をコードする核酸分子を含むベクターも提供される。適したベクターとしては、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスレプリコン、ヘルペスウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、及びラブドウイルスベクターなどのウイルスベクターが挙げられる。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。アデノウイルスベクターは、チンパンジー由来のアデノウイルスベクターとすることができる。いくつかの態様において、ベクターは、Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, Marsh J, Ertl HC, Wilson JM. "Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus." J Virol. 2001 Dec; 75 (23) : 11603-13に記載されるAdC68ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、Reyes-Sandoval A, Fitzgerald JC, Grant R, Roy S, Xiang ZQ, Li Y, Gao GP, Wilson JM, Ertl HC. "Human immunodeficiency

10

20

30

40

50

y virus type 1-specific immune responses in primates upon sequential immunization with adenoviral vaccine carriers of human and simian serotypes" J Virol. 2004 Jul; 78 (14): 7392-9に記載されるAdC7ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、Pinto AR, Fitzgerald JC, Giles-Davis W, Gao GP, Wilson JM, Ertl HC. "Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers" J Immunol. 2003 Dec 15; 171 (12): 6774-9に記載されるAdC6ベクターである。

10

【0032】

いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号7の核酸配列を含む核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号7の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC6ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号7の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC7ベクターである。

【0033】

いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号180のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、AdC6ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、AdC7ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、配列番号183のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、AdC6ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、AdC7ベクターである。

20

【0034】

HBVコアタンパク質又はその免疫原性断片をコードする核酸分子を含むベクターを含むワクチンも開示される。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号7の核酸配列を含む核酸分子を含むベクターを含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号7の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC6ベクターを含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号7の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC7ベクターを含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号180のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むAdC6ベクターを含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号180のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むAdC7ベクターを含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号183のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むAdC6ベクターを含む。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号183のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むAdC7ベクターを含む。

30

【0035】

ワクチンはさらに、薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。本明細書で用いる場合、「薬学的に許容される担体」又は「薬学的に許容される賦形剤」は、開示される融合タンパク質、核酸、又はベクターと組み合わせる場合、この融合タンパク質、核酸、又はベクターに生物活性を保持させ、被験体の免疫系とは非反応性である、任意の物質を含む。例としては、限定されないが、リン酸緩衝食塩水、水などの標準的な医薬品担体、油／水乳濁液などの乳濁液、及び様々な種類の湿潤剤のいずれかが挙げられる。噴霧剤又は非経口投与用の好ましい希釈剤は、リン酸緩衝食塩水又は通常の(0.9%)食塩水である。このような担体を含む組成物は、周知の通常の方法(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000)により処方される。

40

50

【0036】

また本明細書には、HBVポリメラーゼN末端ドメイン（PolN）及びHBVポリメラーゼC末端ドメイン（PolC）の非自然起源の変異体も開示される。開示されるHBVポリメラーゼN末端ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むことができる。配列番号8の例示的な免疫原性断片は、以下の表4に提供される配列番号55～113を含む。いくつかの実施形態において、HBV PolNの免疫原性断片は、配列番号178のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HBV PolNの免疫原性断片は、配列番号181のアミノ酸配列を含む。開示されるHBVポリメラーゼC末端ドメインは、配列番号10のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むことができる。配列番号10の例示的な免疫原性断片は、以下の表5に提供される配列番号114～172を含む。いくつかの実施形態において、HBV PolCの免疫原性断片は、配列番号179のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、HBV PolCの免疫原性断片は、配列番号182のアミノ酸配列を含む。

10

【0037】

HBVポリメラーゼN末端ドメイン若しくはその免疫原性断片、又はHBVポリメラーゼC末端ドメイン若しくはその免疫原性断片をコードする核酸分子も提供される。核酸分子は、配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメインをコードすることができる。いくつかの実施形態において、HBVポリメラーゼN末端ドメインをコードする核酸分子は、配列番号9の核酸配列を含む。核酸分子は、表4に提供されるHBVポリメラーゼN末端ドメイン断片をコードすることができる。核酸分子は、配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメインをコードすることができる。いくつかの実施形態において、HBVポリメラーゼC末端ドメインをコードする核酸分子は、配列番号11の核酸配列を含む。核酸分子は、表5に提供されるHBVポリメラーゼC末端ドメイン断片をコードすることができる。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号178のアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号181のアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号179のアミノ酸配列をコードする。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号182のアミノ酸配列をコードする。

20

【0038】

HBVポリメラーゼN末端ドメイン若しくはその免疫原性断片又はC末端ドメイン若しくはその免疫原性断片をコードする核酸分子を含むベクターも提供される。適したベクターには、上述したものが含まれる。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号9の核酸配列を含む核酸分子を含む。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号11の核酸配列を含む核酸分子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、アデノウイルスベクターである。適したアデノウイルスベクターとしては、例えば、AdC6ベクター又はAdC7ベクターが挙げられる。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号9の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC6ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号9の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC7ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号11の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC6ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号11の核酸配列を含む核酸分子を含むAdC7ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号178のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、AdC6ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、AdC7ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号181のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、AdC6ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、AdC7ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号179のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含む。いくつかの態様において、ベクターは、AdC6ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、AdC7ベクターである。いくつかの実施形態において、ベクターは、配列番号182のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含

30

40

50

む。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 6 ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 7 ベクターである。

【0039】

H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン若しくはその免疫原性断片又は H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン若しくはその免疫原性断片をコードする核酸分子を含むベクターを含むワクチンも開示される。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号 9 の核酸配列を含む核酸分子を含むベクターを含む。ワクチンは、配列番号 9 の核酸配列を含む核酸分子を含む A d C 6 ベクターを含むことができる。ワクチンは、配列番号 9 の核酸配列を含む核酸分子を含む A d C 7 ベクターを含むことができる。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号 11 の核酸配列を含む核酸分子を含むベクターを含む。ワクチンは、配列番号 11 の核酸配列を含む核酸分子を含む A d C 6 ベクターを含むことができる。ワクチンは、配列番号 11 の核酸配列を含む核酸分子を含む A d C 7 ベクターを含むことができる。ワクチンはさらに、上に開示した薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号 178 のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むベクターを含む。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 6 ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 7 ベクターである。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号 181 のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むベクターを含む。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 6 ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 7 ベクターである。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号 179 のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むベクターを含む。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 6 ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 7 ベクターである。いくつかの実施形態において、ワクチンは、配列番号 182 のアミノ酸配列をコードする核酸分子を含むベクターを含む。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 6 ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、A d C 7 ベクターである。

【0040】

本明細書では、開示される H B V コアタンパク質若しくはその免疫原性断片、H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン若しくはその免疫原性断片、及び／又は H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン若しくはその免疫原性断片の組み合わせを含む融合タンパク質も提供される。例えば、融合タンパク質は、

(1) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H B V コアタンパク質又はその免疫原性断片及び配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン又はその免疫原性断片、

(2) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H B V コアタンパク質の 1 つ又は複数の免疫原性断片及び配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメインの 1 つ又は複数の免疫原性断片。例えば、表 3 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 20 ~ 54 (配列番号 6 の免疫原性断片) 及び表 4 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 55 ~ 113 (配列番号 8 の免疫原性断片)、

(3) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H B V コアタンパク質又はその免疫原性断片及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン又はその免疫原性断片、

(4) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む H B V コアタンパク質の 1 つ又は複数の免疫原性断片及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメインの 1 つ又は複数の免疫原性断片。例えば、表 3 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 20 ~ 54 (配列番号 6 の免疫原性断片) 及び表 5 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 114 ~ 172 (配列番号 10 の免疫原性断片)、

(5) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン又はその免疫原性断片及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン又はその免疫原性断片、

(6) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメインの 1 つ又は

複数の免疫原性断片及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメインの 1 つ又は複数の免疫原性断片。例えば、表 4 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 55 ～ 113 （配列番号 8 の免疫原性断片）及び表 5 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 114 ～ 172 （配列番号 10 の免疫原性断片）、

（7）配列番号 6 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質又はその免疫原性断片、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン又はその免疫原性断片、

（8）配列番号 6 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質の 1 つ又は複数の免疫原性断片、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメインの 1 つ又は複数の免疫原性断片、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメインの 1 つ又は複数の免疫原性断片。例えば、表 3 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 20 ～ 54 （配列番号 6 の免疫原性断片）、表 4 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 55 ～ 113 （配列番号 8 の免疫原性断片）、及び表 5 に提供される 1 つ又は複数の配列番号 114 ～ 172 （配列番号 10 の免疫原性断片）、

（9）配列番号 178 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン又はその免疫原性断片、配列番号 179 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び配列番号 180 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質又はその免疫原性断片、又は

（10）配列番号 181 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン又はその免疫原性断片、配列番号 182 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び配列番号 183 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質又はその免疫原性断片を含むことができる。

【0041】

融合タンパク質は、配列番号 178 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン又はその免疫原性断片、配列番号 179 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び配列番号 180 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質又はその免疫原性断片を含むことができる。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号 174 のアミノ酸配列を含む。

【0042】

融合タンパク質は、配列番号 181 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン又はその免疫原性断片、配列番号 182 のアミノ酸配列を含む HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン又はその免疫原性断片、配列番号 183 のアミノ酸配列を含む HBV コアタンパク質又はその免疫原性断片を含むことができる。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、配列番号 175 のアミノ酸配列を含む。

【0043】

本明細書では、単純ヘルペスウイルス（HSV）糖タンパク質（gD）配列及び開示される HBV コアタンパク質、HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン、HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン、又はこれらの各種組み合わせを含む融合タンパク質も提供される。

【0044】

HSV gD は、HSV の受容体結合糖タンパク質である。gD 外部ドメインは、2 個の構造的に、機能的に区別される領域に組織化され、すなわちシグナル配列及び受容体結合部位を含むアミノ末端、並びに前駆融合ドメイン及び膜貫通ドメインを含むカルボキシ末端である。gD は、ヘルペスウイルス侵入メディエーター（HVEM）受容体及びネクチン受容体と相互作用する。gD とこれらの受容体との相互作用により、HVEM 受容体と、T 細胞上に発現する免疫抑制分子である BTLA 又は CD160 との結合が減少する。いくつかの実施形態において、gD 及び開示される HBV コアタンパク質、HBV ポリメラーゼ N 末端ドメイン、HBV ポリメラーゼ C 末端ドメイン（それぞれ「gD Core」、「gD Pol N」又は「gD Pol C」と呼ばれる）、又はこれらの組み合わせを含

10

20

30

40

50

む開示される融合タンパク質は、HBVコア及び／又はポリメラーゼ抗原単独（すなわちgDがない）と比較してより大きな程度までHBVに対する被験体の免疫応答を強化すると予想される。

【0045】

開示される融合タンパク質での使用に適したHSV gDタンパク質は、1) 抗原に対するCD8+T細胞応答の刺激を増加する、及び／又は2) HVEM-BTLA経路活性化を妨害する能力を保持する野生型又は変異gDを含む。

【0046】

融合タンパク質は、本明細書に開示されるHBVコアタンパク質若しくはその免疫原性断片、HBVポリメラーゼN末端ドメイン若しくはその免疫原性断片、HBVポリメラーゼC末端ドメイン若しくはその免疫原性断片、又はこれらの任意の組み合わせ、N末端HSV gDタンパク質配列、及びC末端HSV gDタンパク質配列を含むことができる。HBVコアタンパク質、HBVポリメラーゼN末端ドメイン、及びHBVポリメラーゼC末端ドメインは、表9に提供されるもの又は表3～5に提供される免疫原性断片とすることができる。HBVコアタンパク質、HBVポリメラーゼN末端ドメイン、HBVポリメラーゼC末端ドメイン、又はこれらの免疫原性断片をN末端HSV gDタンパク質配列とC末端HSV gDタンパク質配列の間に挿入することができる。いくつかの態様において、N末端HSV gDタンパク質配列は、配列番号12のアミノ酸配列を含み、C末端HSV gDタンパク質配列は、配列番号13のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、N末端HSV gDタンパク質配列は、配列番号12のアミノ酸残基26～269を含む。

【0047】

融合タンパク質は、
N末端HSV gD配列又はその変異体、
配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質又はその免疫原性断片、及び
C末端HSV gD配列又はその変異体
を含むことができる。

【0048】

HBVコアタンパク質の免疫原性断片は、配列番号20～54、180、又は183のいずれか1つを含むことができる。

【0049】

融合タンパク質は、
N末端HSV gD配列又はその変異体、
配列番号180又は配列番号183のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質、及び
C末端HSV gD配列又はその変異体
を含むことができる。

【0050】

融合タンパク質は、
N末端HSV gD配列又はその変異体、
配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び
C末端HSV gDタンパク質配列又はその変異体
を含むことができる。

【0051】

HBVポリメラーゼN末端ドメインの免疫原性断片は、配列番号55～113、178、又は181のいずれか1つを含むことができる。

【0052】

融合タンパク質は、
N末端HSV gD配列又はその変異体、
配列番号178又は配列番号181のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ド

10

20

30

40

50

メイン、及び

C末端H S V g Dタンパク質配列又はその変異体を含むことができる。

【0053】

融合タンパク質は、

N末端H S V g D配列又はその変異体、

配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び

C末端H S V g Dタンパク質配列又はその変異体を含むことができる。

【0054】

HBVポリメラーゼC末端ドメインの免疫原性断片は、配列番号114～172、179、又は182のいずれか1つを含むことができる。

【0055】

融合タンパク質は、

N末端H S V g D配列又はその変異体、

配列番号179又は配列番号182のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び

C末端H S V g Dタンパク質配列又はその変異体を含むことができる。

【0056】

融合タンパク質は、

N末端H S V g D配列又はその変異体、

(1) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質又はその免疫原性断片及び配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン又はその免疫原性断片、

(2) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質の1つ又は複数の免疫原性断片及び配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメインの1つ又は複数の免疫原性断片。例えば、表3に提供される1つ又は複数の配列番号20～54（配列番号6の免疫原性断片）及び表4に提供される1つ又は複数の配列番号55～113（配列番号8の免疫原性断片）、

(3) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質又はその免疫原性断片及び配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン又はその免疫原性断片、

(4) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質の1つ又は複数の免疫原性断片及び配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン。例えば、表3に提供される1つ又は複数の配列番号20～54（配列番号6の免疫原性断片）及び表5に提供される1つ又は複数の配列番号114～172（配列番号10の免疫原性断片）、

(5) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン又はその免疫原性断片及び配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン又はその免疫原性断片、

(6) 配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメインの1つ又は複数の免疫原性断片及び配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメインの1つ又は複数の免疫原性断片。例えば、表4に提供される1つ又は複数の配列番号55～113（配列番号8の免疫原性断片）及び表5に提供される1つ又は複数の配列番号114～172（配列番号10の免疫原性断片）、

(7) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質又はその免疫原性断片、配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン又はその

10

20

30

40

50

免疫原性断片、又は

(8) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質の1つ又は複数の免疫原性断片、配列番号8のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメインの1つ又は複数の免疫原性断片、配列番号10のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメインの1つ又は複数の免疫原性断片。例えば、表3に提供される1つ又は複数の配列番号20～54(配列番号6の免疫原性断片)、表4に提供される1つ又は複数の配列番号55～113(配列番号8の免疫原性断片)、表5に提供される1つ又は複数の配列番号114～172(配列番号10の免疫原性断片)、

(9) 配列番号178のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン又はその免疫原性断片、配列番号179のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び配列番号180のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質又はその免疫原性断片、又は

(10) 配列番号181のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン又はその免疫原性断片、配列番号182のアミノ酸配列を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン又はその免疫原性断片、及び配列番号183のアミノ酸配列を含むHBVコアタンパク質又はその免疫原性断片、

を含むHBV配列、及び

C末端HSVgDタンパク質配列又はその変異体を含むことができる。

【0057】

いくつかの実施形態において、N末端HSVgD配列は、HSVgDの少なくともアミノ酸1～269を含むことができる。N末端HSVgD配列は、例えば、配列番号12のアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、N末端HSVgD配列は、配列番号12のアミノ酸残基26～269を含む。

【0058】

いくつかの実施形態において、C末端HSVgD配列は、HSVgDの膜貫通ドメインを含む。C末端HSVgD配列は、例えば、配列番号13のアミノ酸配列を含むことができる。

【0059】

融合タンパク質は、配列番号14のアミノ酸配列(gDCoreに対応する)又はその免疫原性断片を含むことができる。融合タンパク質は、配列番号16のアミノ酸配列(gDPoLNに対応する)又はその免疫原性断片を含むことができる。融合タンパク質は、配列番号18のアミノ酸配列(gDPoLCに対応する)又はその免疫原性断片を含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号14、16、又は18のいずれか1つのアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N末端の25個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

【0060】

融合タンパク質は、配列番号185のアミノ酸配列(gDHBV2)を含むことができる。融合タンパク質は、配列番号187のアミノ酸配列(gDHBV3)を含むことができる。

【0061】

開示される融合タンパク質のいずれかをコードする核酸分子も提供される。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号15の核酸配列(gDCoreに対応する)を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号17の核酸配列(gDPoLNに対応する)を含む。いくつかの実施形態において、核酸分子は、配列番号19の核酸配列(gDPoLCに対応する)を含む。

【0062】

核酸分子は、配列番号184の核酸配列(gDHBV2)を含むことができる。核酸分子は、配列番号186の核酸配列(gDHBV3)を含むことができる。

【0063】

10

20

30

40

50

融合タンパク質をコードする核酸分子を含むベクターも開示される。適したベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクターを含む上述したものを含む。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターは、A d C 6 ベクターである。いくつかの実施形態において、アデノウイルスベクターは、A d C 7 ベクターである。ベクターは、配列番号 1 8 4 の核酸配列 (g D H B V 2) を含むことができる。いくつかの態様において、ベクターは、配列番号 1 8 4 の核酸配列 (g D H B V 2) を含む A d C 6 ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、配列番号 1 8 4 の核酸配列 (g D H B V 2) を含む A d C 7 ベクターである。ベクターは、配列番号 1 8 6 の核酸配列 (g D H B V 3) の核酸配列を含むことができる。いくつかの態様において、ベクターは、配列番号 1 8 6 の核酸配列 (g D H B V 3) を含む A d C 6 ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、配列番号 1 8 6 の核酸配列 (g D H B V 3) を含む A d C 7 ベクターである。

10

【0064】

開示されるベクターのいずれかを含むワクチンも提供される。ワクチンはさらに、上述した薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。ワクチンは、配列番号 1 8 4 の核酸配列 (g D H B V 2) を含むベクターを含むことができる。いくつかの態様において、ワクチンは、配列番号 1 8 4 の核酸配列 (g D H B V 2) を含む A d C 6 ベクターを含む。いくつかの態様において、ワクチンは、配列番号 1 8 4 の核酸配列 (g D H B V 2) を含む A d C 7 ベクターを含む。ワクチンは、配列番号 1 8 6 の核酸配列 (g D H B V 3) を含むベクターを含むことができる。いくつかの態様において、ワクチンは、配列番号 1 8 6 の核酸配列 (g D H B V 3) を含む A d C 6 ベクターを含む。いくつかの態様において、ワクチンは、配列番号 1 8 6 の核酸配列 (g D H B V 3) を含む A d C 7 ベクターを含む。

20

【0065】

本明細書には、被験体に H B V に対する免疫応答を誘導する方法であって、この方法は、この被験体に有効量の開示される融合タンパク質のいずれか、開示される核酸分子のいずれか、開示されるベクターのいずれか、又は開示されるワクチンのいずれかを提供してそれにより H B V に対する免疫応答を誘導することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態において、この方法は、この被験体に、有効量の開示される融合タンパク質のいずれかを提供してそれにより H B V に対する免疫応答を誘導することを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、この被験体に、有効量の開示される核酸分子のいずれかを提供してそれにより H B V に対する免疫応答を誘導することを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、この被験体に、有効量の開示されるベクターのいずれかを提供してそれにより H B V に対する免疫応答を誘導することを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、この被験体に、有効量の開示されるワクチンのいずれかを提供してそれにより H B V に対する免疫応答を誘導することを含む。

30

【0066】

この方法は、この被験体に、A d C 6 ベクターを含む有効量のワクチンを提供することを含み、この A d C 6 ベクターは、配列番号 1 4、1 6、又は 1 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む。いくつかの実施形態において、この方法はさらに、この被験体に、A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供した後に、配列番号 1 4、1 6、又は 1 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することを含む。このようなプライムブースト方法は、

40

この被験体に、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 1 4 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 2 5 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

この被験体に、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断

50

片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 16 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

この被験体に、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 18 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

10

【0067】

この方法は、この被験体に、A d C 7 ベクターを含む有効量のワクチンを提供することを含み、この A d C 7 ベクターは、配列番号 14、16、又は 18 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む。いくつかの実施形態において、この方法はさらに、この被験体に、A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供した後に、配列番号 14、16、又は 18 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することを含む。このようなプライムブースト方法は、

この被験体に、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 14 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

20

この被験体に、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 16 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

30

この被験体に、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 18 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 18 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

【0068】

この方法は、この被験体に A d C 6 ベクターを含む有効量のワクチンを提供することであって、A d C 6 ベクターは、配列番号 185 又は 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む、提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、この方法はさらに、この被験体に、この A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供した後、配列番号 185 又は 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することを含む。このようなプライムブースト方法は、

40

この被験体に、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 185 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ

50

酸シグナルペプチドを含まない、又は

この被験体に、配列番号 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 187 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

【0069】

この方法は、この被験体に A d C 7 ベクターを含む有効量のワクチンを提供することであって、A d C 7 ベクターは、配列番号 185 又は 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む、提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、この方法はさらに、この被験体に、この A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供した後、配列番号 185 又は 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することを含む。このようなプライムブースト方法は、

この被験体に、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 185 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない、又は、

この被験体に、配列番号 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供すること、及び続けてこの被験体に、配列番号 187 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質又はその免疫原性断片を含む A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することを含むことができる。いくつかの実施形態において、配列番号 187 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N 末端の 25 個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない。

【0070】

開示される方法により誘導される免疫応答としては、限定されないが、T 細胞応答、B 細胞応答、又は両方が挙げられる（すなわち、細胞性及び／又は液性免疫応答）。免疫応答は、一次免疫応答又は二次免疫応答とすることができる。開示される方法は、H B V コア及び／又はポリメラーゼ抗原単独（すなわち g D が無い）と比較してより大きな程度まで H B V に対する被験体の免疫応答を誘導することができる。

【0071】

開示される方法を、治療処置と予防（*prophylactic*）又は予防（*preventative*）処置の両方に用いることができ、症状の重症度及び／又は頻度を低減する、症状及び／又は症状の根底にある原因を除去する、症状及び／又はその根底にある原因の頻度又は可能性を低減する、及び H B V によって直接的又は間接的に起こる傷害を改善又は治療することができる。処置はまた、処置を受けていない被験体の予想される生存時間と比較して生存時間を延長することを含む。治療される被験体には、H B V を有するもの並びに H B V を有する傾向があるもの又は H B V を予防すべきものが含まれる。

【0072】

これにより H B V に対する免疫応答を誘導するために必要とされる開示される融合タンパク質、核酸分子、ベクター、又はワクチンの量（例えば、「有効量」）は、被験体の病期、年齢、性別、及び体重などの因子、及び融合タンパク質、核酸分子、ベクター、又はワクチンが被験体に所望の応答を引き起こす能力によって変化してよい。有効量の例示的な指標としては、例えば、被験体の改善された幸福、H B V 症状の低減、除去又は予防が挙げられる。

【0073】

被験体の H B V に対する免疫応答を誘導するための薬物の製造における開示される融合

10

20

30

40

50

タンパク質、核酸分子、ベクター、又はワクチンのいずれかの使用も提供される。

【0074】

被験体にHBVに対する免疫応答を誘導するのに使用するための開示される融合タンパク質、核酸分子、ベクター、又はワクチンも提供される。

【実施例】

【0075】

本明細書に開示される実施形態の一部をさらに説明するために以下の実施例を提供する。実施例は、例示することを意図され、開示される実施形態を限定することは意図されない。

【0076】

エピトープ最適化されたCore配列の生成

B型肝炎ウイルス（HBV）を、系統学的集団形成に基づいて、いくつかの遺伝子型に分類することができる。慢性感染症の患者用の複数の遺伝子型のHBVワクチンのための抗原インサートの開発を支援するために、遺伝子型A、B、C及びDにわたるHBV Core及びHBVポリメラーゼをコードする遺伝子の予備的バイオインフォマティクス評価を行った。

【0077】

4種類の主要なHBVクレード由来のCoreアミノ酸配列を、B型肝炎ウイルスデータベース（HBVdb）（リリースバージョン45.0、最終アップデート2018年8月2日）からの整列されたClustalW配列としてダウンロードした。これらのアミノ酸配列は、以下の表に要約されるような、ヨーロッパ中の利用者が入力した何千ものHBVゲノムを表す。

【表1】

表1. 解析される固有なCoreゲノムの数

遺伝子型	HBV遺伝子	固有なゲノム解析
HBV 遺伝子型A	Core	1,482
HBV 遺伝子型B		2,800
HBV 遺伝子型C		2,768
HBV 遺伝子型D		1,579

【0078】

各アミノ酸の位置での変異及び頻度を計算する、ロスアラモス国立研究所（www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ENTROPY/entropy）によって提供されるShannon Entropy toolを使用して各遺伝子型について「共通」Core配列を最初に同定した。各遺伝子型に対してこれらの計算を繰り返し、解析された各遺伝子型のものである、4個の「共通」Core配列を生成した（配列番号1～4）。

遺伝子型A 共通配列（配列番号1）

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFFPSVRDLLDTASALYRE
 ALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGNNLeDPA
 SRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLV
 SFGVWIRTTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRRDRGRSPRR
 RTPSPRRRRRSQSPRRRRRSQSRESQC-

遺伝子型B 共通配列（配列番号2）

MDIDpYKEFGASvELLSFLPSDFFFPSiRDLLDTAsALYRE
 ALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLeDPA

S R E L V V s Y V N V N M G L K i R Q L L W F H I S C L T F G R E T V L E Y L V
S F G V W I R T P p A Y R P p N A P I L S T L P E T T V V R R R G R S P R R R T
P S P R R R R S Q S P R R R R S Q S R E s Q C -

遺伝子型C 共通配列（配列番号3）M D I D p Y K E F G A S V E L L S F L P S D F
F P S I R D L L D T A S A L Y R E A L E S P E H C S P H H T A L R Q A I L C W G
E L M N L A T W V G S N L E D P A S R E L V V s Y V N V N M G L K i R Q L L W F
H I S C L T F G R E T V L E Y L V S F G V W I R T P p A Y R P P N A P I L S T L
P E T T V V R R R G R S P R R R T P S P R R R R S Q S P R R R S Q S R E S Q C -
遺伝子型D 共通配列（配列番号4）

M D I D P Y K E F G A t V E L L S F L P s D F F P S V R D L L D T A S A L Y R e
A L E S P E H C S P H H T A L R Q A I L C W G e L M t L A T W V G g N L E D P a
S R D L V V S Y V N T N m G L K F R Q L L W F H I S C L T F G R e T V i E Y L V
S F G V W I R T P p A Y R P P N A P I L S T L P E T T V v R R R G R S P R R R T
P S P R R R R S Q S P R R R R S Q S R E S Q C -

（太字で下線を引いた残基は、90%未満の頻度を有するアミノ酸を表す）。

【0079】

上の「共通」Core配列を組み合わせ、エピトープ最適化されたCore配列を生成した。保存されたアミノ酸を、各遺伝子型（A、B、C及びD）のCoreタンパク質の各アミノ酸残基で同定し、遺伝子型ゲノムの与えられたサンプル内部の頻度及び変異を決定した。変異部位でのアミノ酸を選択するために、複数のHLAタイプ中のエピトープ予測アルゴリズムを使用して各変異を調べ、免疫原性が最も高い配列を選択した。具体的には、

（1）4個の遺伝子型を通じて同一である各残基を維持した。変異についてこれらの配列を整列するために、適用可能な場合は、スパーサーを加えた可変性を特徴づけるために、ゲノム重み付き頻度も計算した。

（2）4個の遺伝子型を通じて同一でない残基を同定し、アミノ酸の変異を記録した（表2を参照）。4個の遺伝子型を通じて同一でない残基をX₁～X₁₁と標識し、90%未満の頻度を有する残基を太字で下線を引いたフォントで表した、初期のコア配列（配列番号5）を以下に提供する。

M D I D P Y K E F G A X₁ V E L L S F L P S D F F P S X₂ D L L D T A S A L Y R E
A L E S P E H C S P H H T A L R Q A I L C W G E L M X₃ L A T W V G X₄ N L e D P
A S R X₅ L V V X₆ Y V N X₇ N M G L K X₈ R Q L L W F H I S C L T F G R E T V X₉
E Y L V S F G V W I R T P P A Y R P P N A P I L S T L P E T T V V R R R X₁₀ X₁₁
G R S P R R R T P S P R R R R S Q S P R R R R S Q S R E S Q C

【表2】

表2. 4個の遺伝子型を通じて同一でない残基

残基 #	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁
遺伝子型A コンセンサス	T	V	T	N	D	N	T	I	L	D	R
A-コンセンサス 頻度	95.4%	98.2%	96.0%	94.0%	99.5%	98.9%	98.3%	98.8%	98.2%	95.8%	99.5%
遺伝子型B コンセンサス	S	i	N	S	E	s	V	i	L	-	-
B-コンセンサス 頻度	97.1%	89.7%	93.5%	90.1%	91.5%	75.2%	93.6%	80.1%	99.4%	-	-
遺伝子型C コンセンサス	S	I	N	S	E	s	V	i	L	-	-
C-コンセンサス 頻度	99.4%	90.3%	97.3%	96.3%	97.0%	83.7%	97.8%	78.7%	98.8%	-	-
遺伝子型D コンセンサス	t	V	t	g	D	S	T	F	i	-	-
D-コンセンサス 頻度	75.7%	97.0%	87.5%	58.7%	98.4%	93.7%	96.5%	99.1%	77.8%	-	-

10

20

30

40

50

(3) これらの位置での最終的なアミノ酸を決定する目的で、適切なアミノ酸を選択するためにエピトープ予測アルゴリズムを使用した。遺伝子型間で変異を示すアミノ酸については、これらの遺伝子型のうち3個に存在するアミノ酸を選択するか、又は免疫原性が最も高いアミノ酸を選択するためにMHCクラスIエピトープ予測ソフトウェアを使用した。この手法を用いると最大数のHLAタイプを通じた潜在的な免疫原性が最大化される。全ての遺伝子型を通じて及び遺伝子型内部でのエピトープが最適化されたCore配列を以下に示す(配列番号6)。

```
didpykefgatvellslflpsdffpsirdlldtasalyrea  
lespehcsphhtalrqailcwgelmtlatwvgsnledpas  
relvvsvynvnmglikirqlwfhiscldtfgrtvielylvs  
fgvwirtppayrppnapilstlpettvvrrrdrgsprrr  
tprprrrrsqsprrrrsqsresqc  
【0080】
```

10

解析されるクレード特異的ゲノムの数によって重み付けられた、全てのゲノムを通じた各部位での平均変異を計算し、面積及び保存が高く大きい残基を示した。図1。

【0081】

エピトープ最適化されたポリメラーゼ配列の生成

エピトープ最適化されたポリメラーゼ配列を、Core配列について上で論じたように4種類の主要なHBVクレードから生成した。ポリメラーゼは長いので、2個の断片—N末端断片(ここから遺伝子型間の可変性が高いセグメントを除去した)及びC末端断片を生成した。両断片は、約300アミノ酸長である。エピトープ最適化されたポリメラーゼアミノ酸配列を以下及び表9に示す。

20

エピトープ最適化されたHBVポリメラーゼN末端アミノ酸配列(配列番号8)

```
plsyqhfrkllddeagpleeelprladeglnrrvaedl  
nlglnlvnsipwthkvgnftglysstvpvfnpewqtpsfpk  
ihlqedivdrckqfvgpltvnekrklklimparfypnvtk  
ylpldkgikpyypehavnhyfqttrhyhlhtlwkgilykre  
ttrsasfscgspysweqelqhgscwwlqfrnskcpcseyclt  
hlvnlledwgpdcdehgehhiriprtparvtggvflvdknp  
hntaesrlvvdfsqfsrgitrsvwpkfavpnlqsltnlls  
snlswlsldvsaafyhiplhpaamp
```

30

エピトープ最適化されたHBVポリメラーゼC末端アミノ酸配列(配列番号10)

```
hllvgssglsryvarlssnsriinhqhggtmqnlhdscsrn  
lyvsllyllyktfgrklhlyshpiilktkrwgyslnfmgyv  
igswgslpqdhiiqkikecfrklpvnrpidwkvqcqrivgl  
lgfaapftqcgypalmplyaciqskqaftfsptykaflsk  
qylnlypvvarqrpqlcqvfadatptgwglamghqrmrgtf  
vaplpihtaelaacfarsrsgakilgtdnsvvlsrkyts  
fpwllgcaanwilrgtsfvvypsalnpadpsrgrlglsr  
pllrllpfrpttgrtslyavspsv
```

40

【0082】

エピトープ最適化されたCore及びポリメラーゼ配列を発現するAdC6及びAdC7ベクターの生成

エピトープ最適化されたCore及びポリメラーゼアミノ酸配列をコードする遺伝子を、CMVプロモーターの制御下単純ヘルペスウイルス(HSV)糖タンパク質D(gD)配列を含む導入ベクターにクローニングした。この遺伝子をついで、E1欠失、E3ORF3、4、5、6、及び7欠失複製欠損アデノウイルスベクター(PCT/US2017/043315に記載される)にクローニングして以下のベクターを生成した。

・gDと融合したエピトープ最適化されたCore配列を含むAdC6(AdC6-gDCore)、

50

- ・ g D と融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ N 末端配列を含む A d C 6 (A d C 6 - g D P o l N) 、
- ・ g D と融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端配列を含む A d C 6 (A d C 6 - g D P o l C) 、
- ・ g D と融合したエピトープ最適化された C o r e 配列を含む A d C 7 (A d C 7 - g D C o r e) 、
- ・ g D と融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ N 末端配列を含む A d C 7 (A d C 7 - g D P o l N) 、 及び
- ・ g D と融合したエピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端配列を含む A d C 7 (A d C 7 - g D P o l C) 。

10

【0083】

妥当なクローンを、制限酵素消化により同定し、クローニング部位を配列決定した。ベクターをレスキューし、HEK 293 細胞中に増やし、塩化セシウム (CsCl) 勾配遠心分離により精製し、分光光度測定によりベクター濃度 (vp) を測定した。ベクターを HEK 293 細胞中系列希釈で増やすとき感染性ユニットに対して滴定し、その後 RNA を分離及び逆転写し、ネステッドヘキソン特異的 PCR 反応を行った。ベクターの遺伝的完全性を、制限酵素消化及びその後の精製したウイルス DNA のゲル電気泳動により決定した。タンパク質発現は、g D 特異的抗原を用いるウエスタンブロット法により測定した。遺伝的安定性は、HEK 293 細胞中のベクターの連続継代 (12 ~ 15 回) 及びその後の精製したウイルス DNA の制限酵素消化及びゲル電気泳動により決定した。

20

【0084】

マウス中のワクチンの免疫原性試験

C57BL/6、BALB/c、及び HLA-A2 tg マウス (グループあたり n = 5) に様々な濃度の上のベクターの各々を注射した。未処置のマウスはコントロールとして働いた。注射後の様々な時間にマウスを出血させ、挿入断片特異的な CD8+ 及び CD4+ T 細胞の頻度を IFN-γ の細胞内サイトカイン染色 (ICS) により測定した。第 1 の注射の 2 か月後、AdC6 免疫マウスに同じ挿入断片を発現する異種ベクター (AdC7) でブースター接種した。HBV 特異的 T 細胞の頻度を再度試験した。初回接種後の結果を図 2A ~ 2F 及び図 3A (C57BL/6 マウス)、図 3B (BALB/c マウス) 及び図 3C (HLA-A2 マウス) に示す。ブースター接種後の結果を図 4A ~ 4C 及び 5A ~ 5B に示す。

30

【0085】

C57BL/6 マウスは、エピトープ最適化されたポリメラーゼ N 末端配列に対して非常に口バストな CD8+ T 細胞応答を示し、エピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端配列及びエピトープ最適化された Core 配列に対して低い応答を示した一方、CD4+ 応答はエピトープ最適化されたコア配列及びエピトープ最適化されたポリメラーゼ C 末端配列に対しては良好だった (図 2A ~ 図 2F)。C57BL/6 マウスのエピトープマッピングから、PolC より PolN に対して高く幅広い応答が示された (図 3A)。PolN 内では総計 14 個のペプチドが CD8+ T 細胞によって認識された一方、PolC 内では、1 つのエピトープを最も示すようである、たった 2 個の隣接するペプチドが認識された。CD4+ T 細胞は、PolN 又は PolC に対しては応答しなかった。このパターンは、BALB/c マウスに大部分は写され、CD8+ T 細胞応答は 12 個のペプチドを認識して PolN に対して最も高く、ついで 4 個のペプチドを認識して PolC に対して高かった (図 3B)。コアに対する応答は低かったが、10 個のペプチドを認識して驚くほど幅広かった (図 3B)。BALB/c CD4+ T 細胞は、15 個のペプチドを認識して Core に対して最も良く応答し、PolC (4 個のペプチド) 又は PolN (2 個のペプチド) の認識は低かった。CD8+ T 細胞応答を HLA-A2 tg マウスでも試験し、PolN は再び 12 個のペプチドに関与して最も高い応答の引き金を引いた (図 3C)。PolC に対する応答は、低い幅広かった (16 個のペプチド) 一方、コアのたった 1 個のペプチドのみが検出された (図 3C)。初回刺激実験で試験されたペプチドの配列

40

50

を表3 (Coreペプチド)、表4 (PolNペプチド)、及び表5 (PolCペプチド) に提供する。初回接種実験のペプチドプールのペプチド組成を表6～8に提供する。これらのデータ全体から、多くの場合において検出可能なT細胞応答を誘発する挿入断片は、各配列内の複数のエピトープに向けられることが示される。

【表3】

表3. エピトープ最適化されたCoreペプチド

ペプチド	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	Prime
1	DIDPYKEFGATVELL	20	CD8 (B/c)
2	KEFGATVELLSFLPS	21	CD8 (B/c)
3	TVELLSFLPSDFFPS	22	CD8 (B/c)
4	SFLPSDFFPSIRDLL	23	CD8 (B/c)
5	DFFPSIRDLLDTASA	24	CD8 (B/c)
6	IRDLLDTASALYREA	25	
7	DTASALYREALESPE	26	CD4 (B/c)
8	LYREALESPEHCSPH	27	CD4 (BI/6); CD4 (B/c)
9	LESPEHCSPHHTALR	28	CD4 (B/c)
10	HCSPHHTALRQAILC	29	CD4 (B/c)
11	HTALRQAILCWGELM	30	CD4 (B/c)
12	QAILCWGELMTLATW	31	
13	WGELMTLATWVGSNL	32	CD8 (B/c); CD4 (B/c); CD8 (HLA)
14	TLATWVGSNLEDPAS	33	CD8 (B/c); CD4 (B/c)
15	VGSNLEDPASRELVV	34	CD8 (B/c); CD4 (B/c)
16	EDPASRELVVSYVNV	35	CD8 (B/c); CD4 (B/c)
17	RELVVSYVNVNMGLK	36	CD8 (B/c); CD4 (B/c)
18	SYVNVNMGLKIRQLL	37	
19	NMGLKIRQLLWFHIS	38	CD4 (B/c)
20	IRQLLWFHISCLTFG	39	CD4 (B/c)
21	WFHISCLTFGRETVI	40	CD4 (B/c)
22	CLTFGRETVEYLVVS	41	CD4 (B/c)
23	RETVIEYLVVSFGVWI	42	CD4 (B/c)
24	EYLVVSFGVWIRTPPA	43	
25	FGVWIRTPPAYRPPN	44	
26	RTPPAYRPPNAPILS	45	CD8 (BI/6)
27	YRPPNAPILSTLPET	46	
28	APILSTLPETTIVRR	47	CD4 (BI/6)
29	TLPETTVVRRRDRGR	48	CD8 (BI/6)
30	TVVRRRDRGRSPRRR	49	
31	RDRGRSPRRRTPSPR	50	
32	SPRRRTPSPRRRRSQ	51	
33	TPSPRRRRSQSPRRR	52	
34	RRRSQSPRRRRRSQSR	53	
35	SPRRRRRSQSRESQC	54	

B/c=BALB/c; BI/6=C57BI/6; HLA=HLA-A2

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表4. エピトープ最適化されたPoINペプチド

ペプチド	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	Prime
1	PLSYQHFRKLLLLLDE	55	
2	HFRKLLLLLDEEAGPL	56	
3	LLLDEEAGPLEEELP	57	
4	EAGPLEEELPRLADE	58	
5	EEELPRLADEGLNRR	59	
6	RLADEGLNRRVAEDL	60	
7	GLNRRVAEDLNLGNL	61	
8	VAEDLNLGNLNVSI	62	
9	NLGNLNVSIPTWTHKV	63	
10	NVSIPTWTHKVGNTG	64	CD4 (B/c)
11	WTHKVGNTGLYSST	65	
12	GNFTGLYSSTVPVFN	66	
13	LYSSTVPVFNPEWQT	67	
14	VPVFNPEWQTSPFK	68	CD4 (B/c)
15	PEWQTSPFKIHKLQE	69	
16	PSFKIHKLQEDIVDR	70	
17	IHKLQEDIVDRCKQFV	71	
18	EDIVDRCKQFVGPLTV	72	
19	RCKQFVGPLTVNEKRR	73	
20	VGPLTVNEKRRLKLIM	74	
21	VNEKRRLKLIMPARFY	75	
22	RLKLIMPARFYPNVTK	76	
23	MPARFYPNVTKYLPLD	77	
24	YPNVTKYLPLDKGIKP	78	
25	KYLPLDKGIKPYYPEH	79	
26	DKGIKPYYPEHAVNHY	80	
27	PYYPEHAVNHYFQTRH	81	
28	HAVNHYFQTRHYLHTL	82	
29	YFQTRHYLHTLWKAGI	83	
30	HYLHTLWKAGILYKRE	84	
31	LWKAGILYKRETTTSA	85	
32	ILYKRETTTSASFSGS	86	
33	ETTSASFSGSPYSWE	87	
34	ASFSGSPYSWEQELQH	88	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
35	SPYSWEQELQHGSCWW	89	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
36	EQELQHGSCWWLQFRN	90	
37	HGSCWWLQFRNSKPCS	91	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

ペプチド	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	Prime
38	WLQFRNSKPCSEYCLT	92	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
39	NSKPCSEYCLTHLVNL	93	CD8 (BI/6)
40	SEYCLTHLVNLLEDWG	94	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
41	THLVNLLEDWGPCDEH	95	
42	LLEDWGPCDEHGEHHI	96	
43	GPCDEHGEHHIRIPRT	97	
44	HGEHHIRIPRTPARVT	98	
45	IRIPRTPARVTGGVFL	99	
46	TPARVTGGVFLVDKNP	100	
47	TGGVFLVDKNPHNTAE	101	
48	LVDKNPHNTAESRLVV	102	
49	PHNTAESRLVDFSQF	103	
50	ESRLVDFSQFSRGIT	104	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
51	VDFSQFSRGITRVSWP	105	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
52	FSRGITRVSWPKFAVP	106	
53	TRVSWPKFAVPNLQSL	107	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
54	PKFAVPNLQSLTNLLS	108	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
55	PNLQSLTNLLSSNLSW	109	CD8 (BI/6)
56	LTNLLSSNLSWLSLDV	110	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
57	SSNLSWLSLDVSAAFY	111	
58	WLSLDVSAAFYHIPLH	112	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)
59	VSAAFYHIPLHPAAMP	113	CD8 (BI/6); CD8 (B/c); CD8 (HLA)

B/c=BALB/c; BI/6=C57BI/6; HLA=HLA-A2

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表5. エピトープ最適化されたPolCペプチド

ペプチド	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	Prime
1	HLLVGSSGLSRYVAR	114	
2	SSGLSRYVARLSSNSR	115	
3	RYVARLSSNSRIINHQ	116	
4	LSSNSRIINHQHGTMQ	117	
5	RIINHQHGTMQNLHDS	118	
6	QHGTMQNLHDSCSRNL	119	
7	QNLHDSCSRNLVVSLL	120	
8	SCSRNLVVSLLLLYKT	121	
9	LYVSLLLLYKTFGRKL	122	
10	LLLYKTFGRKLHLYSH	123	CD8 (HLA)
11	TFGRKLHLYSHPIILK	124	
12	LHLYSHPIILKTKRWG	125	CD8 (B/c); CD8 (HLA)
13	HPIILKTKRWGYSLNF	126	CD8 (HLA)
14	KTKRWGYSLNFMGYVI	127	
15	GYSLNFMGYVIGSWG	128	CD8 (HLA)
16	FMGYVIGSWGSLPQDH	129	
17	IGSWGSLPQDHIIQKI	130	
18	SLPQDHIIQKIKECFR	131	
19	HIIQKIKECFRKLVPN	132	
20	IKECFRKLVPNRPIDW	133	
21	RKLPVNRPIDWKVCQR	134	
22	NRPIDWKVCQRIVGLL	135	
23	WKVCQRIVGLLGFAAP	136	
24	RIVGLLGFAAPFTQCG	137	
25	LGFAAPFTQCGYPALM	138	
26	PFTQCGYPALMPLYAC	139	CD8 (HLA)
27	GYPALMPLYACIQSKQ	140	
28	MPLYACIQSKQAFTFS	141	CD8 (B/c); CD8 (HLA)
29	CIQSKQAFTFSPTYKA	142	CD8 (HLA)
30	QAFTFSPTYKAFLSKQ	143	
31	SPTYKAFLSKQYLNLY	144	CD8 (BI/6); CD8 (HLA)
32	AFLSKQYLNLYPVARQ	145	CD8 (BI/6)
33	QYLNLYPVARQRPGLC	146	
34	YPVARQRPGLCQVFAD	147	CD8 (HLA)
35	QRPGLCQVFADATPTG	148	CD4 (B/c)
36	CQVFADATPTGWGLAM	149	CD8 (B/c); CD8 (HLA)
37	DATPTGWGLAMGHQRM	150	CD8 (HLA)

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

ペプチド	アミノ酸配列	SEQ ID NO:	Prime
38	GWGLAMGHQRMRGTFV	151	
39	MGHQRMRGTFVAPLPI	152	CD4 (B/c); CD8 (HLA)
40	MRGTFVAPLPIHTAEL	153	
41	VAPLPIHTAELLAACF	154	
42	IHTAELLAACFARSRS	155	CD8 (HLA)
43	LLAACFARSRS GAKIL	156	
44	FARSRS GAKILGTDNS	157	CD8 (B/c); CD8 (HLA)
45	SGAKILGTDNSVLSR	158	CD8 (HLA)
46	LGTDNSVLSRKYTSF	159	
47	SVVLSRKYTSFPWLLG	160	
48	RKYTSFPWLLGCAANW	161	CD8 (HLA)
49	FPWLLGCAANWILRGT	162	
50	GCAANWILRGTSFVYV	163	
51	WILRGTSFVYVPSALN	164	CD4 (B/c)
52	TSFVYVPSALNPADDP	165	
53	VPSALNPADDP SRGRL	166	
54	NPADDP SRGRLGLSRP	167	
55	PSRGRLGLSRPLLRLP	168	CD4 (B/c)
56	LGLSRPLLRLPFRPTT	169	
57	PLLRLPFRPTTGRTSL	170	
58	PFRPTTGRTSLYAVSP	171	
59	TGRTSLYAVSPSV	172	

B/c=BALB/c; BI/6=C57BI/6; HLA=HLA-A2

【表 6】

表6. エピトープ最適化されたCoreプール

Core マトリックス	A	B	C	D	E	F
G	1	2	3	4	5	6
H	7	8	9	10	11	12
I	13	14	15	16	17	18
J	19	20	21	22	23	24
K	25	26	27	28	29	30
L	31	32	33	34	35	

【表 7】

表7. エピトープ最適化されたPolNプール

PolN マトリックス	A	B	C	D	E	F	G	H
I	1	2	3	4	5	6	7	8
J	9	10	11	12	13	14	15	16
K	17	18	19	20	21	22	23	24
L	25	26	27	28	29	30	31	32
M	33	34	35	36	37	38	39	40
N	41	42	43	44	45	46	47	48
O	49	50	51	52	53	54	55	56
P	57	58	59					

10

【表 8】

表8. エピトープ最適化されたPolCプール

PolC マトリックス	A	B	C	D	E	F	G	H
I	1	2	3	4	5	6	7	8
J	9	10	11	12	13	14	15	16
K	17	18	19	20	21	22	23	24
L	25	26	27	28	29	30	31	32
M	33	34	35	36	37	38	39	40
N	41	42	43	44	45	46	47	48
O	49	50	51	52	53	54	55	56
P	57	58						

20

【0086】

30

C57BL/6、BALB/c及びHLA-A2 tgマウスで試験されたブースター接種後、応答の増加は初回接種時に最適以下の応答を誘導するベクター投与量で挿入断片に対して、すなわち、 1×10^9 vpベクター投与量で試験されたCoreに対して主に見られた（図4A～4C）。高い投与量でベクターを注射してもブースター免疫化はPolN又はPolCに対する応答を増加できなかったが、ブースター接種はそれにもかかわらず、T細胞応答を広げた（図5A～5C）。

【0087】

免疫原性の要約

上の結果から、

- ・ワクチンは免疫原性であり、CD8+T細胞についてはPolN>PolC>Coreであり、CD4+T細胞応答についてはCore>PolC>PolNである。
 - ・異種ワクチンキャリアによって免疫応答をブースター接種することができる。
 - ・免疫応答は幅広い、そして
 - ・ブースター接種後、T細胞応答の幅は広がる、
- ということが示される。

40

【0088】

低用量AAV-1.3HBV曝露時のHBV力価に対するワクチン接種の効果

3匹のマウスのグループに 1×10^{10} 、 1×10^{11} 又は 1.5×10^{11} vgのAAV-1.3HBVを投与し、8週間後AdC6-gDPolNをワクチン接種した。ワクチン接種の8週間後ウイルス力価を調べ、ワクチン接種前の力価と比較した。図6は、各治療

50

グループについてのベースラインからのウイルス量変化を示す。

【0089】

エピトープ変化

HBV抗原に対するCD8+T細胞は、慢性HBV感染症中に消耗した。CD8+T細胞の消耗までの進行は、準優位なエピトープと比べて優位なエピトープの方が迅速で明白だった。根底にある理由は、消耗がT細胞受容体を通じた圧倒的な抗原によって駆動される刺激によって駆り立てられ、そして優位なエピトープは、拘束分子に対する結合活性が低い準優位なエピトープよりも抗原提示細胞によって発現されるMHCクラスI抗原上に高レベルで存在することである。典型的なワクチン法では主に、有意なエピトープに対する免疫応答を誘導する。治療ワクチンは、慢性ウイルス性感染症中の優位なエピトープに対するT細胞の減少を考慮すべきであり、準優位なエピトープに対するCD8+T細胞の増殖を好むよう設計されるべきであり、こうすると疾患により駆動される消耗に抵抗し、優れた疾患管理に転換する可能性が高い。

10

【0090】

単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dと融合したHBVポリメラーゼN末端ドメイン（PoLN）をコードする核酸配列を含むアデノウイルスベクター（「AdC6-gDPoLN」、gDPoLNのアミノ酸配列は、配列番号16である）で免疫化した未処置のマウスのエピトーププロファイルを決定した。AAV8-1.3HBVベクターで事前に処置されていないマウスの応答を、AdC6-gDPoLNでワクチン接種する前に1.3HBVゲノムを発現するAAV8ベクターで感染したマウスから得られたものと比較した。AAV8-1.3HBVベクターは、血清中に高い力価のHBVを誘導し、CD8+T細胞の消耗を駆り立てる可能性があった。

20

【0091】

第1の一連の実験においては、AdC6-gDPoLNベクターでワクチン接種したがAAV8-1.3HBVベクターに曝露していないマウスのエピトープを同定するためにペプチドプールマトリックスを使用した。これらの未処置のマウスにおいてタンパク質応答を誘発した領域の数を同定した（例えば、1%超のIFN- γ を産生するCD8+CD44+T細胞）。図7A及び図8A。第2の実験においては、マウスに 1×10^{10} ウイルスゲノム（vg）のAAV8-1.3HBVベクターを曝露し、4週間後に最初の実験における曝露していないマウスと同一のHBVポリメラーゼ配列（gDPoLN）を発現するAdC6ベクターでワクチン接種し、それから10週間後、ワクチン接種前に曝露されているマウス由来の脾細胞上のペプチドプールマトリックスを用いてHBV PoLN特異的CD8+T細胞エピトーププロファイルを決定した。図7B及び図8B。マウスに 1.5×10^{11} vg用量のAAV8-1.3HBVベクターを曝露することにより、緊縮条件を使用して実験を繰り返した。4週間後マウスに再度ワクチン接種し、ワクチン接種後約10週間でペプチドプールマトリックスに対するCD8+T細胞応答を試験した。図7C及び図8C。両実験において、ワクチン接種していないマウスから取得された結果と比較すると、AAV8-1.3HBVで感染したマウスのエピトーププロファイルに変化が観察され、ワクチン接種時にはml血清あたり $10^7 \sim 10^9$ vgの高いウイルス負荷があった。この効果は、高用量のAAV8-1.3HBVベクターに曝露したマウスでより明白だった。両実験において、応答の低下が観察された。そのうえ、高用量のAAV8-1.3HBVに曝露したマウスにおいて特に、この結果から、未感染でワクチン接種したマウスにおいて免疫優性を示したエピトープの多くに対するCD8+T細胞の減少（例えば、ペプチド50～59によって表される領域内、図8）、準優位なエピトープ（ペプチド2～8によって表される領域内のものなど）並びにペプチド10～29によって表される領域内などの新規なエピトープの良好な保存が示された。これらのデータから、優位なエピトープの認識から準優位なエピトープの認識への変化が確認される。

30

40

【0092】

これらのデータに基づいて、新規なHBVポリメラーゼN末端ドメイン挿入断片（HBV PoLN v2）が生成された（配列番号173）。

50

HFRKLLLLDEEAGPLEEEELPRLADEGLNRRVAEDLNLGNL
PEWQTPSFPKIHLEQEDIVDRCKQFVGPLTVNEKRRLKLIM
PARFYPNVTKYLP LDKGIKPYYPEHAVNHYFQTRHYLHTL
WKAGILYKRETTTRSASF CGSPYSWEQELQHGS CWWLQFRN
SKPCSEYCLTHLVNLL EDWGPCDEHGEHHIRIPRTPARVT

この挿入断片は、HBVウイルス負荷が高いマウスにおける応答を無傷にしたまま主に準優位なエピトープに対するCD8+T細胞応答を誘導した。

【0093】

gDCore、gDPoLN、及びgDPoLCワクチンの免疫原性及び有効性

AAV8-HBVマウスモデルにおけるAdC6-gDCore、AdC6-gDPoLN、AdC6-gDPoLC、AdC7-gDCore、AdC7-gDPoLN、及びAdC7-gDPoLCワクチンの免疫原性及び有効性を分析した。

【0094】

方法—免疫原性

C57BL/6マウス（グループあたりn=5）に様々な用量のAdC6-gDCore（配列番号15に対応するgDCore核酸配列）；AdC6-gDPoLN（配列番号17に対応するgDPoLN核酸配列）；又はAdC6-gDPoLC（配列番号19に対応するgDPoLC核酸配列）を注射した。第1の注射の2か月後、AdC6ベクターで免疫化されたマウスを同一の挿入断片（例えば、AdC7-gDCore、AdC7-gDPoLN、又はAdC7-gDPoLC）を含むAdC7ベクターでブースター接種した。注射後14日目及び56日目にマウスを出血させ、各種HBV挿入断片に対するT細胞の頻度を、細胞をHBV配列を表す重複ペプチドで刺激した時のインターフェロン（IFN） γ に対する細胞内サイトカイン染色（ICS）により分析した。コントロール細胞をペプチドなしで培養した。PoLN内の1つの免疫優性エピトープに対するCD8+T細胞の頻度及び表現型を、MHC I四量体で染色することにより試験した。標的配列内の個々のペプチドに対するCD8+T細胞応答の幅及び特異性を、脾細胞のエピトープマッピングにより実行した（CD8+T細胞のIFN- γ をICSによって試験した）。

【0095】

肝臓中のCD8+T細胞を評価するために、C57BL/6マウス（グループあたりn=8）は、尾静脈を介して 1×10^{10} ウイルスゲノム（vg）のAAV8-1.3HBVの静脈内投与、 1×10^{11} vgのAAV8-1.3HBVの静脈内投与を受けた、又は静脈内投与を受けず、4週間後、 5×10^9 個のウイルス粒子（vp）のAdC6-gDPoLNの単回IM注射を受けた。IM注射の8週間後、マウスを殺し、肝臓を除去し、リンパ球を分離し、T細胞マーカー及びPoLN配列に存在する免疫優性エピトープに対するT細胞受容体を認識する四量体で染色した。

【0096】

別の実験において、3グループのC57BL/6マウス（グループあたりn=4）が4週間で 5×10^9 vpのAdC6-gDPoLNの単回IM注射を受けた（-）又は4週間後 5×10^9 vpのAdC6-gDPoLNの有り無しのいずれかで尾静脈を介した 1×10^{11} ウイルスゲノム（vg）のAAV8-1.3HBVの静脈内投与を受けた。AAV8-1.3HBVの投与の約2か月後、マウスを殺し、肝臓を除去し、そして3グループの各々から肝臓切片を作製し、ヘマトキシリン及びエオシンで染色し、リンパ球浸潤物のために評価された。同じ実験から、細胞を特異的四量体及びT-bet（クローン4B10、BV785染色）に対する蛍光色素標識抗体又はPD-1（クローン29F.1A12、BF605染色）、TIM-3（クローンRMT3-23、Pe/Cy7染色）、CTLA-4（クローンUC10-4B9、PE染色）、又はLAG-3（クローンC9B7W、BV650染色）に対する抗体で染色した。細胞をフローサイトメトリーにより分析し、CD44+CD8四量体陽性細胞にゲートし、マーカーにゲートした。未処理のT細胞に対するヒストグラムの比較から、マーカー陽性細胞の割合を同定した。

【0097】

方法—有効性

AAV8-1.3HBVベクター試験—慢性的なHBVウイルス曝露に対するAdC6-gDPoLNの影響を評価するために、C57BL/6マウス（グループあたり $n=8$ ）を 1×10^{10} v gのAAV8-1.3HBVで尾静脈から静脈内に曝露し、4週間後、 5×10^9 v pのAdC6-gDPoLNの単回IM注射で免疫化した。HBVDNAウイルスカッパをqPCRにより評価し、ワクチン曝露前後のベースラインからの変化（ $\log_{10}$ copies/mL）を報告した。ウイルスゲノムコピー数をAAV8曝露後4, 6, 8, 10、及び12週間後に評価した。ウイルス動態を経時的にPCRにより評価し、mLあたりのHBVコピーの $\log_{10}$ 変化を評価した。処置後の異なる時点で1、2又は3の対数減少を示したマウスの数を評価した。

10

【0098】

CD8+T細胞抗原認識に対する慢性的なHBVウイルス曝露の経時的な影響—ワクチン誘導肝臓CD8+T細胞に対するAAV8-1.3HBVの効果を評価した。 5×10^9 v pのAdC6-gDPoLNの単回IM注射で免疫化した未処置のマウスの脾細胞のエピトーププロファイルをワクチン接種の4週間後に決定した。 1×10^{10} 及び 1.5×10^{11} v gのAAV8-1.3HBVに曝露され、その後4週間後に 5×10^9 v pのAdC6-gDPoLNをワクチン接種したマウスは、ワクチン接種後10週間（AAV注射後14週間）で実行された脾細胞中でCD8+T細胞エピトーププロファイルを有した。AAV-未処置及びAAV-処置済ワクチン接種済動物のエピトーププロファイルを比較した。肝臓からのPoLN特異的CD8+T細胞を異なるマーカーに対して分析した。

20

【0099】

結果

免疫原性—ワクチン接種は、PoLNに対するロバストで持続的なCD8+T細胞応答（全ての循環CD8+T細胞を通じた頻度の中央値：6.0%）並びにPoLC及びコアに対する低い応答（頻度の中央値：それぞれ1.0%及び0.4%、図9A及び図9B）を誘導した。8週間でのブースター接種後により、コアに対して有意な変化が観察され（ $p=0.007$ ）、全ての領域の応答が増加した（図9C）。図9A～9Cは、線によって示される中央値を有する個別のマウスについての全てのCD8+T細胞にわたるCD8+T細胞変化を示す。ワクチン接種は、CD8+T細胞により幅広いエピトープ認識を誘導し、これはブースター接種後にさらに強化された（27%から34%、図10）。

30

【0100】

AdC6-gDPoLNワクチン接種後12週間で、AAV8-1.3HBVで感染させたワクチン接種したマウスは、肝臓CD8+浸潤物の優先的な増加（図11A～11B及び図12A～12F）、ワクチンで誘導したHBV特異的CD8+T細胞の存在量の減少（図11A及び図11B）、及びT-betレベルの僅かな減少（エフェクター機能の消失を示唆）（図13A～13B）を示した。図11Aは、個別の肝臓由来の回復した全てのリンパ球を通じたCD8+T細胞変化を示す。図11Bは、四量体陽性CD8+細胞の変化を示し、これは未処置T細胞と比較したヒストグラムから同定された。しかしながら、ワクチン接種したAAV1.3HBV-感染マウスと未感染マウスの間にT細胞の消耗表現型への分化を示唆する細胞マーカーの明確なパターンは観察されなかった（図13A～13B）。

40

【0101】

有効性—AdC6-gDPoLNベクターの単回IM注射後、AAV8-1.3HBVで感染したマウスは、ワクチン接種後8週間持続した血清中のHBVDNAが複数対数減少した（図14）。ワクチン接種後、4週間及び8週間での血清HBVDNAウイルス負荷レベル減少の中央値は、それぞれ0.86及び2.69 $\log_{10}$ cps/mLだった（図14A）。8週間で、全ての動物は、 $>1 \log_{10}$ cps/mLのベースラインからの減少を有し、6/7（86%）は $>2 \log_{10}$ cps/mLのベースラインからの減少を有し、そして2/7（29%）は $>3 \log_{10}$ cps/mLのベースラインからの減少を有した（図14B）。

50

【0102】

単回A d C 6 - g D P o l Nベクター注射後、A A V - H B Vで感染させたマウスと未処置のマウスを比較すると、脾細胞においてP o l Nペプチドに対して異なるC D 8 + T細胞認識パターンが観察された。図15 A及び図15 Bは、マウスを最初にA A V - 1 . 3 H B Vで感染させ、4週間後 10^{10} v pのA d C 6 - g D P o l Nベクターでブースター接種し、免疫化後8週間で脾細胞を収集し、一連のP o l Nに及ぶ個別のペプチドで短時間生体外刺激時のI F N - γ をI C Sによって調べた。ペプチド無しで取得されたバックグラウンド頻度を減算した。図15 Aは、示された用量のA A V 8 - 1 . 3 H B Vベクターを最初に注射したものにその後A d C 6 - g D P o l Nワクチンのみを受けたマウスのペプチド認識プロフィールを示す。図15 Bの円グラフは、全てのC D 4 4 + C D 8 + 細胞の0 . 1 %の閾値に達したペプチドに対応する応答を示す（図15 Aのものに対応するデータ）。各大きさ／色は、大きさが全体の割合を示し、個別のペプチドの応答の頻度を表し、0 . 1 %を超える応答のみを含めた。引き抜きは、A A V 8 - 1 . 3 H B Vに感染させたマウスでのみ認識されたエピトープを示す。A A Vで前処理すると単回I M刺激後に認識されたエピトープの数とC D 8 + T細胞のプール中のI F N - γ 産生C D 8 + T細胞の総計としての免疫応答の大きさの両方を低減することが分かった。A A Vで事前処理するとT細胞認識を新しいエピトープへと変化させ、これは検出可能なC D 8 + T細胞応答のおよそ3分の一を表す。機能的H B V特異的C D 8 + T細胞応答の割合は、未処置のマウスで最も高かったが（4 . 4 %、図15 B）、低用量及び高用量のA A V 8 - 1 . 3 H B Vの存在量は減少した（それぞれ2 . 0 %及び0 . 6 %、図15 B）。A A V 8 - 1 . 3 H B Vで感染していない動物は、多くのエピトープに対して強いC D 8 + T細胞応答を示したが、A A V - H B Vで感染した動物では減少するか変化して新しいエピトープのT細胞認識を含んだ。

【0103】

考察

g Dを遺伝的にコードされたチェックポイント阻害剤として使用する早期のC D 8 + T細胞の活性化を標的とするH B V治療ワクチンを作製し、

- ・重要なH B V抗原に対する強力な持久性のあるC D 8 + T細胞応答を誘導する（図9）、
- ・準優位なエピトープ認識を含む（図15）非常に幅広いC D 8 + T細胞応答を刺激する（図10）、そして
- ・機能的C D 8 + T細胞が肝臓に対して優先的に輸送され（図11及び12）、A A Vマウスモデルで持続的な複数対数H B V D N Aウイルス負荷減少を達成した（図14）。

【0104】

開示されるA A V試験において、A A Vが誘導したH B V感染は、A d C 6 - g D P o l Nでのワクチン接種後、P o l Nの優勢なエピトープに対するC D 8 + T細胞認識の減少を引き起こした（図15）。理論によって拘束されることを意図するものではないが、g Dによって誘導されるC D 8 + T細胞の幅及びこの細胞の準優位なエピトープを認識する能力が持続性の免疫応答及びH B Vの複数対数抑制につながると考えられる。

【0105】

A A Vで誘導されたH B V感染動物におけるワクチン接種後の血液及び肝臓中のA d C 6 / 7 - g D P o l Nの免疫原性

既存のA A Vで誘導されたH B V感染の存在下、動物の血液、脾臓及び肝臓中のA d C 6 - g D P o l Nワクチンに対するC D 8 + T細胞応答を評価するために、以下の試験を実行した。

【0106】

実験#1 A A V 8 - 1 . 3 H B V感染マウスのC D 8 + T細胞応答：血液中の応答動態
目的—A d C 6ベクター内で発現するg D P o l N抗原に対するC D 8 + T細胞応答についてのH B V抗原の持続性力価の効果を評価すること。

【0107】

方法—C 5 7 B l / 6マウスに 10^{10} のA A V 8 - 1 . 3 H B Vベクターを静脈内に注

射した。4週間後、それらに 5×10^9 vpのAdC6-gDPoLNベクターをワクチン接種した。コントロールマウスは、AdC6-gDPoLNベクターのみを受けた。未処置のマウスは、追加のコントロールとして働いた。マウスを2か月後、同一の用量のAdC7-gDPoLNワクチンでブースター接種した。初回接種及びブースター接種後様々な時間で採血し、IFN- γ -産生CD8⁺T細胞のPBMCを調べた。

【0108】

結果—図16に示すように、マウスはワクチン接種の2週間後に、活発なPoLN特異的CD8⁺T細胞応答を開始し、これは8週目までに徐々に減少し、ブースター接種後再度上昇した。CD8⁺T細胞応答は、初回接種後よりブースター接種後に安定した。たいていの時点で、AAV8-1.3HBVベクターを注射された調べたマウスの応答は、AAVベクターを注射されなかったコントロールの応答より低かった。

【0109】

実験#2 AAV8-1.3HBV感染マウスのCD8⁺T細胞応答：肝臓における応答
目的—AAV8-1.3HBVで感染させた、ワクチン接種したマウスの肝臓中のT細胞消耗を示すマーカーを含むCD8⁺T細胞応答を評価すること。

【0110】

方法—C57BL/6マウスに 10^{10} 又は 10^{11} vgのAAV8-1.3HBVベクターを静脈内に注射した。4週間後、これらに 5×10^9 vpのAdC6-gDPoLNベクターをワクチン接種した。コントロールマウスは、AdC6-gDPoLNベクターのみを受けた。未処置のマウスは、追加のコントロールとして働いた。マウスを2か月後、同一の用量のAdC7-gDPoLNワクチンでブースター接種した。

【0111】

肝臓リンパ球を取得するために、肝臓を小断片に切断し、1時間攪拌下L15中2mg/mlコラゲナーゼP、1mg/ml DNase I (全てRoche, Basel Switzerland製) 及び2%FBS (Tissue Culture Biologicals, Tulare, CA) で処理した。肝臓断片をホモジナイズし、70 μ m濾過器によりろ過し、リンパ球をPercoll勾配遠心分離により精製し、そして10%FBSを補充したDMEMで洗浄した。リンパ球を+4°Cで、暗所で30分間、青紫色live/dead dye (Thermo Fisher Scientific)、抗CD8-APC (クローン53-6.7, BioLegend)、抗CD44-Alexa Flour 700 (クローンIM7, BioLegend)、抗EOMES-Alexa Fluor 488 (クローンDan11mag, eBioscience)、抗PD1-BV605 (クローン29F.1A12, BioLegend)、抗LAG3-BV650 (クローンC9B7W, BioLegend)、抗T-bet-BV786 (クローン4B10, BioLegend)、抗CTLA-4-PE-A (クローンUC10-4B9, BioLegend)、抗TIM-3-Pe-Cy7-A (クローンRMT3-23, BioLegend)、及びHBVポリメラーゼのアミノ酸396-404 FAVPNLQSL (配列番号188) (ペプチド55) に対応するAPC-標識MHCクラスI四量体 (NIH四量体 Facility, Emory University, Atlanta GA) で染色した。細胞を洗浄し、BD FACS Celesta (BD Biosciences, San Jose, CA) 及びDiVaソフトウェアにより解析した。取得後解析をFlowJo (TreeStar, Ashland, OR) で実行した。

【0112】

結果—リンパ球性肝臓浸潤物中のCD8⁺T細胞の頻度を解析した。リンパ球性肝臓浸潤物中のCD8⁺T細胞の頻度は、未処置のマウスと比較してワクチン接種したマウスで上昇し、ワクチン接種前にAAV8-1.3HBVベクターを注射したマウスではさらに上昇した (図17A)。PoLN挿入断片に存在するエピトープに特異的な四量体で染色することにより同定されたPoLN特異的CD8⁺T細胞の頻度は、AAV-1.3HBVを注射したマウスで減少した (図17B)。

【0113】

未処理のもの（すなわち、四量体・CD4⁺・CD8⁺T細胞）と比較した浸潤性四量体⁺CD8⁺T細胞の表現型を、ある一定の抗体に結合した色素の平均蛍光強度を測定すること（図18A～図18F）及び指示されたマーカーが陽性であるCD8⁺T細胞の割合（図19A～図19F）を評価することにより、評価した。

【0114】

CD8⁺T細胞の機能の数を制御するT-betは、ワクチンのみのグループと比較してワクチン接種前にAAV8-1.3HBVを注射したマウス由来の肝臓CD8⁺T細胞上で減少した。AAV8-1.3HBVで事前に処置したグループでは消耗マーカーは上昇せず、HBVの存在下POLN特異的CD8⁺T細胞の観察された減少は、古典的CD8⁺T細胞消耗によって起こったわけではさそうであることが示された（図18A～図18F及び図19A～図19F）。

【0115】

実験#3 AAV8-1.3HBVで感染させたマウスのPOLN特異的CD8⁺T細胞応答の幅

目的—HBVの存在が、AdCワクチンによってgD内に発現されたPOLNに対するCD8⁺T細胞応答の幅に影響を及ぼすかどうかを評価すること。

【0116】

方法—マウスに 10^{10} 又は 10^{11} vgのAAV8-1.3HBVベクターを静脈内に注射し、2か月後に対応するAdC7ベクターでブースター接種した。コントロールマウスは、AdC6-gDPOLNベクターのみを受けた。10週間後にマウスを安楽死させ、プールした脾細胞を非AAV感染動物試験のペプチドのプールに対して調べた。結果を図20A～図20Cに提供する。

【0117】

第2の実験において、マウスに 10^{10} 又は 10^{11} vgのAAV8-1.3HBVベクターを静脈内に注射した。4週間後、これらに 5×10^{10} vpのAdC6-gDPOLNベクターをワクチン接種した。コントロールマウスは、AdC6-gDPOLNベクターのみを受けた。未処置のマウスは、追加のコントロールとして働いた。6週間後、POLN配列に及ぶ個別のペプチドに応答するIFN- γ 産生CD8⁺T細胞について脾細胞を分析した。結果を図20D～図20Fに提供する。

【0118】

結果—HBVの存在、特に 10^{11} vg用量のAAV8-HBV1.3を注射した後などの高いHBVの力価は、AdC6-gDPOLNワクチンによって提示されるPOLN配列に対する全CD8⁺T細胞応答を低減するだけでなく、エピトープ認識プロフィールの移行も引き起こした。

【0119】

実験#4 -AAV8-1.3HBVで感染させたマウス中の肝臓POLN特異的CD8⁺T細胞の機能

目的—AAV8-1.3HBVで感染させたマウスの肝臓浸潤性POLN特異的CD8⁺T細胞は機能的なままかどうかを評価すること。

【0120】

方法—第1の実験において、C57BL/6マウスに 3×10^{11} vgのAAV8-1.3HBVを静脈内に注射した。あるグループは8週間後、 5×10^{10} vpのAdC6-gDPOLNベクターでワクチン接種した。他のグループは、ワクチン接種をしていないままにした。4.5か月後、マウスを安楽死させ、POLNペプチドプールに応答するCD8⁺T細胞産生IFN- γ の頻度について脾細胞を調べた。

【0121】

第2の実験において、マウスに段階的濃度のAAV8-1.3HBV（ 1×10^{10} ， 4×10^{10} ，又は 1×10^{11} ）を注射した。4週間後、全てのマウスに 5×10^{10} vpのAdC6-gDPOLNベクターをワクチン接種した。2か月後、マウスに同一の用量のA

10

20

30

40

50

d C 7 - g D P o l N ベクターをブースター接種した。2 か月後、マウスを安楽死させ、肝臓からリンパ球を分離し、P o l N ペプチドプールに反応する C D 8⁺ T 細胞産生 I F N - γ について調べた。細胞をまた、消耗した T 細胞中で増加する転写因子である、T o x に対する抗体で染色した。

【0122】

結果—図 21 に示すように、ワクチンで誘導された C D 8⁺ T 細胞は、A A V 8 - 1 . 3 H B V ベクターを注射したマウスで機能的なままだった。

【0123】

実験 # 5 —肝臓組織診断についての A A V 8 - 1 . 3 H B V で感染させたマウスのワクチン接種の効果

目的—A A V . 8 - 1 . 3 H B V でワクチン接種したマウスの A d C 6 / 7 - g D P o l N ワクチン接種は、持続性肝臓損傷を起こすかどうかを評価すること。

【0124】

方法—マウスに静脈内に与えられる 10^{10} v g の A A V 8 - 1 . 3 H B V を注射した。1 か月後、これらに 5×10^9 v p の A d C 6 - g D P o l N ベクターをワクチン接種した。2 か月後、マウスを同一の投与量で与えられる同一の用量の A d C 7 - g D P o l N ベクターでブースター接種した。2 か月後、マウスを安楽死させた。肝臓切片を収集し、10 % ホルムアルデヒドに固定した。切片（厚さ 3 μ m 以下）を調製し、ヘマトキシリン・エオシン（H & E）で染色した。これらを拡大率 20 倍の光学顕微鏡下で観察した。

【0125】

結果—A A V ベクターとワクチンの両方を受けたマウス由来の 33 枚の切片の 1 枚は、肝臓切片の周辺部分にある小さなリンパ球浸潤物を示した。

【0126】

図 21 B に示すように、H L A - A 2 - t g マウスの単回 g D P o l N ワクチン接種後、I F N - γ 産生肝臓 C D 8⁺ T 細胞の頻度は、ワクチン接種しただけのものと比較すると、A A V を受けたマウスで減少した。

結論

- ・ P o l N に対する C D 8⁺ T 細胞応答は、A A V 8 - 1 . 3 H B V で感染させたマウスで減少した。それにもかかわらず、これらは検出可能なままだった。
- ・ A A V 8 - 1 . 3 H B V で事前に処置された動物では消耗マーカーは上昇せず、H B V 存在下の P o l N 特異的 C D 8⁺ T 細胞の観察された減少は、古典的な C D 8⁺ T 細胞消耗によって起きたわけではなさそうであることが示された。
- ・ A A V で誘導された H B V 感染は、P o l N に対する C D 8⁺ T 細胞応答のエピトープ認識プロフィールを変化させた。
- ・ 以前 A A V 8 - 1 . 3 H B V ベクターで感染したマウスのワクチンで誘導された C D 8⁺ T 細胞は、機能的なままだった。
- ・ プライムブースト計画で使用されたワクチンは、H B V 陽性マウスに明白な肝臓損傷を起こさなかった。

【0127】

H B V P o l N - P o l C - C o r e 構築物の生成

2 個の複数抗原挿入断片（第 2 世代の P o l N - P o l C - C o r e 及び第 3 世代の P o l N - P o l C - C o r e）を生成した。これらの挿入断片の配列を以下に示す。第 2 世代の H B V ワクチン挿入断片（「H B V 2」）（P o l N（イタリック）- P o l C（下線）- C o r e）（配列番号 174）

Y L P L D K G I K P Y Y P E H A V N H Y F Q T R H Y L H T L W K A G I L Y K R E
T T R S A S F C G S P Y S W E Q E L Q H G S C W W L Q F R N S K P C S E Y C L T
H L V N L L E D W G P C D E H G E H H I R I P R T P A R V T G G V F L V D K N P
H N T A E S R L V V D F S Q F S R G I T R V S W P K F A V P N L Q S L T N L L S
S N L S W L S L D V Q A F T F S P T Y K A F L S K Q Y L N L Y P V A R Q R P G L
C Q V F A D A T P T G W G L A M G H Q R M R G T F V A P L P I H T A E L L A A C

10

20

30

40

50

F A R S R S G A K I L G T D N S V V L S R K Y T S F P W L L G C A A N W I L R G
T S F V Y V P S A L N P A D D V G S N L E D P A S R E L V V S Y V N V N M G L K
I R Q L L W F H I S C L T F G R E T V I E Y L V S F G V W I R T P P A Y R P P N
A P I L S T L P E T T V V R R R D R G R

第3世代のHBV ワクチン挿入断片（「HBV3」）（P o l N（イタリック）－P o l C（下線）－C o r e）（配列番号175）

H F R K L L L L D E E A G P L E E E L P R L A D E G L N R R V A E D L N L G N L
P E W Q T P S F P K I H L Q E D I V D R C K Q F V G P L T V N E K R R L K L I M
P A R F Y P N V T K Y L P L D K G I K P Y Y P E H A V N H Y F Q T R H Y L H T L
W K A G I L Y K R E T T R S A S F C G S P Y S W E Q E L Q H G S C W W L Q F R N
S K P C S E Y C L T H L V N L L E D W G P C D E H G E H H I R I P R T P A R V T
Q A F T F S P T Y K A F L S K Q Y L N L Y P V A R Q R P G L C Q V F A D A T P T
G W G L A M G H Q R M R G T F V A P L P I H T A E L L A A C F A R S R S G A K I
L G T D N S V V L S R K Y T S F P W L L G C A A N W I L R G T S F V Y V P S A L
N P A D D V G S N L E D P A S R E L V V S Y V N V N M G L K I R Q L L W F H I S
C L T F G R E T V I E Y L V S F G V W I R T P P A Y R P P N A P I L S T L P E T
T V V R R R D R G R

【0128】

第2世代のHBV（「HBV2」）挿入断片は、ワクチン接種前にAAV8-1.3HBVベクターで感染させなかったマウスから同定された免疫優性P o l Nエピトープを含む。これらのエピトープの多くは、AAV8-1.3HBVベクターを事前に投与することによりもたらされた慢性HBV感染症のマウスモデルでは減少することが分かった（上の「エピトープ変化」で定義される）。第3世代のHBV（「HBV3」）挿入断片は、HBV負荷の高いマウス（上を参照）によって優先的に認識されるP o l Nの近接領域のために選ばれる。C o r e及びP o l Cの領域を以下の一般的な処方、C57BL/6，BALBc及びHLA-A2tgマウスの初回接種（図3）かブースター接種（図5）領域のいずれかに対する最も高い免疫応答を有する領域を使用して、固有のエピトープを選択し、これらの間にスペーサー配列を挿入する代わりに大きな近接領域を選択する目的で、両構築物のために選んだ。

【0129】

第2及び第3世代のHBV挿入断片（HBV2及びHBV3）の遺伝的完全性及び安定性
ウエスタンブロットー精製した組換えウイルスベクター製剤（AdC6-gDHBV2，AdC6-gDHBV3，AdC7-gDHBV2，及びAdC7-gDHBV3）の生体外で導入遺伝子産物発現を誘発する能力を評価した。そのために、関心のあるベクターによる細胞培養感染に続いて細胞可溶化液中のgDタンパク質の発現を評価するためにウエスタンブロットアッセイを実行した。接着性HEK293細胞単層を既知の量の精製したベクターで感染させ、感染後48時間で収集し、プロテアーゼ阻害薬を含む溶菌及び抽出バッファーに再懸濁し、超音波処理により溶解した。全タンパク質抽出物を酸化還元剤としてジチオスレイトールを使用することにより変性させ、12%Bis-Trisポリアクリルアミドゲル（PAGE）中の電気泳動にかけた。SDS-PAGEによるタンパク質分離の後、サンプルを湿った電気泳動移動により活性フッ化ポリビニリデン膜上に移動させた。この膜を生理食塩水に1：1000に希釈したgDに対する一次抗体（クローンPA1-30233，Invitrogen，Carlsbad，CA）を使用してgDタンパク質を検出するために、室温で1時間、免疫染色した。室温で1時間HRP結合ヤギ抗ウサギ二次IgG（ab6721，Abcam，Cambridge UK）でインキュベートする前に膜を1XTBSTで洗浄した。これに続けてルミノールベースの化学発光基質を加えた。染色した膜をオートラジオグラフィフィルムに曝露し、自動フィルム現像機により処理した後にシグナル発光を評価した。感染したHEK293細胞可溶化液のgDタンパク質発現を記述した後、膜を取り除き、全タンパク質抽出物サンプル中のβ-アクトチンの存在を再度探索した。この染色段階を、PAGEサンプルロ

10

20

30

40

50

ードステップの一貫性を評価し、したがって組換えウイルスベクターによる g D タンパク質発現の生体外刺激の半定量的解析をより良く支援するために利用した。

【0130】

安定性—ウイルス構築物の遺伝的完全性を保証するために、各組換えウイルスベクターロットの遺伝的安定性を接着性 H E K 2 9 3 細胞培養液の連続的ウイルス継代により評価した。各遺伝子導入に起因する組換えウイルスプールを標準的な成長条件で合計 1 2 回の継代で培養した。最後の継代において、ウイルスプールを増やし、粗製収集物を塩化セシウム (C s C l) 勾配により精製した。ベクター精製後、ウイルス DNA を Q I A G E N D N e a s y B l o o d & T i s s u e K i t を使用して分離し、DNA テンプレートを異なる構築物特異的なあらかじめ定義されたバンド形成パターンに切断する 2 種類の制限酵素、A s e I 及び B g l I I を用いた制限酵素消化により評価した。消化後、サンプルを消化されたバンドの視覚化を可能にするために臭化エチジウムを含む 1 % アガロースゲル中の電気泳動にかけてその後デジタルゲルイメージングシステムを使用して結果を記述した。初期継代ウイルスのものと同一のバンド形成パターンを呈するウイルス調製を本来の分子クローン構造を維持するとみなし、したがって 1 2 回のウイルス継代の最後まで安定であるとみなした。

10

【0131】

結果—ウイルスベクター DNA のバンド形成パターンは、5 回の継代後のものと比較すると 1 2 回の継代後に安定なままであり、ベクターゲノムは安定であることが示された (データは示さない)。

20

【0132】

A d C 6 又は A d C 7 ベクターによって発現された第 2 世代及び第 3 世代の H B V 挿入断片 (H B V 2 及び H B V 3) の免疫原性

目的—A d C 6 ベクター又は A d C 7 ベクターによって発現された H B V 2 及び H B V 3 挿入断片に対する C D 8⁺ T 細胞応答を評価すること。

【0133】

方法—C 5 7 B l / 6 マウスのグループに 5×10^9 又は 5×10^{10} v p の A d C 6 - g D H B V 2 又は A d C 6 - g D H B V 3 ベクターを注射した。同一の用量の A d C 6 - g D P o l N ベクターを注射したマウスは、ポジティブコントロールとして働き、未処置のマウスはネガティブコントロールとして働いた。1 4 日後にマウスを出血させ、P B M C を、H B V 挿入断片に対応するペプチドプールに応答して I F N - γ を産生する C D 8⁺ T 細胞の頻度について調べた。4 週間後 (ワクチン接種後 6 週間)、マウスを再度出血させ、P o l N 特異的四量体で調べた。A d C 6 - g D H B V 3 で免疫化したマウスは、この挿入断片が四量体に対応するエピトープを欠如しているので、除外した。

30

【0134】

C 5 7 B l / 6 マウスのグループに 5×10^9 若しくは 5×10^{10} v p の A d C 7 - g D H B V 2 又は 5×10^{10} v p の A d C 7 - g D H B V 3 ベクターを注射した。未処置のマウスはネガティブコントロールとして働いた。1 4 日後にマウスを出血させ、P B M C を、H B V 挿入断片に対応するペプチドプールに応答して I F N - γ を産生する C D 8⁺ T 細胞の頻度について調べた。

40

【0135】

A d C 7 初回接種 / A d C 6 ブースター接種の免疫原性

マウスを 4 週間後に出血させ、P B M C を、挿入断片に関するペプチドに応答して I F N - γ 及び / 又は T N F - α を産生する C D 8⁺ T 細胞について I C S によって再度調べた。初回接種後 2 か月で、マウスを同一の挿入断片を発現する同一の用量の異種ベクターでブースター接種した。2 か月後に I C S により P B M C を調べ、ブースター接種前後の C D 8⁺ 及び C D 4⁺ T 細胞応答を比較した。初回接種後、A d C 7 - g D H B V 2 ベクターは、I F N - γ 及び / 又は T N F - α を産生する口バストな頻度の C D 8⁺ T 細胞を誘導した。頻度は A d C 6 - g D H B V 2 ブースター接種後に上昇し、これは低用量のベクター後及び I F N - γ を産生する C D 8⁺ T 細胞について特に明白だった。A d C 7 - g D H B

50

V3ベクターの免疫原性は不十分だったが、AdC6-gDHBV3ブースター接種後のCD8⁺T細胞応答は陽性になった。同様に、初回接種後のCD4⁺T細胞応答はわずかだったが、ブースター接種後増加した。HBV2又はHBV3挿入断片に対するCD4応答には顕著な差はなかった。

結論

- ・AdC6-gDHBV2及びAdC7-gDHBV2の両ベクターは、高度に免疫原性だったが（図22A、図22B、及び図23）、同一の挿入断片を発現する異種AdCベクターによるブースター接種後、応答は上昇した（図24）。
- ・AdC7-gDHBV2及びAdC7-gDHBV3ベクターは、使用されている四量体に対応するエピトープを欠如するので、これらの設計と一致する境界線の免疫原性を呈した（図22A及び図23）。
- ・AdC7-gDHBV2をAdC6-gDHBV2でブースター接種すると、CD8⁺T細胞応答が強化される。

【0136】

AdC6-gDPoLN、AdC6-gDHBV2、AdC6-gDHBV3、又はAdC6-HBV2 AAVで感染したマウスのHBV DNAウイルス力価の比較

方法

5グループのC57BL/6マウスに 1×10^9 v gのAAV8-1.3HBVを曝露し、4週間後 1×10^{10} v pのいずれかのAdC6-gDPoLN (n=10)、AdC6-gDHBV2 (n=10)、AdC6-gDHBV3 (n=10)、又はgDなしのAdC6-HBV2 (n=10)をワクチン接種し、AAVで感染し、ワクチン接種していない動物（「未処置」）(n=10)及びAAVで感染しておらず、ワクチン接種していない動物 (n=2-5)はコントロールとして働いた。AAV注射後4週間でウイルス力価を調べ（ワクチン接種前）、ワクチン接種後4週間のレベルと比較した（AAV注射後8週目）。

【0137】

結果

8週目に、HBVウイルス力価の中央値はそれぞれ、未処置のマウスで $0.98 \log_{10} \text{ cps/mL}$ 上昇し、AdC6-HBV2でワクチン接種したマウスで未変化のままであり、AdC6-gDHBV3、AdC6-gDPoLN及びAdC6-gDHBV2でワクチン接種した動物では -0.04 、 -1.09 及び $-2.13 \log_{10} \text{ cps/mL}$ 減少した（図25A）。個別のマウスの結果を図25Bに示し、全てのAdC6-gDPoLN及びAdC6-gDHBV2でワクチン接種した動物はそれぞれ、 $1 \log_{10} \text{ copies/mL}$ より大きく、 $2 \log_{10} \text{ copies/mL}$ より大きく減少したが、対照的に、未処置、AdC6-HBV2又はAdC6-gDHBV3でワクチン接種した動物は8週目に $1 \log_{10} \text{ copies/mL}$ 以上減少した。

【0138】

gDHBV2及びgDHBV3の免疫原性試験

単回初回接種注射又は同一の挿入断片を含む異種ベクターによるブースターワクチン接種が後に続く初回接種後にgDHBV2又はgDHBV3のいずれかに含まれるHBVコア及びポリメラーゼのセグメントに対するCD8⁺T細胞応答及びその幅を評価した。

【0139】

実験1

目的—C57BL/6マウスの異種チンパンジーアデノウイルスベクター（AdC6及びAdC7）によって発現されるgD-HBV2及びgD-HBV3での初回接種及びブースターワクチン接種後のIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞応答を評価する。

【0140】

方法：5匹のC57BL/6マウスの4つのグループを以下のように、(a) 5×10^{10} v p AdC7-gDHBV2、2か月後に 5×10^{10} v p AdC6-gDHBV2；(b) 5×10^9 v p AdC7-gDHBV2、2か月後に 5×10^9 v p AdC6-

g D H B V 2 ; (c) 5×10^{10} v p A d C 7 - g D H B V 3、2 か月後に 5×10^{10} v p A d C 6 - g D H B V 3 ; 又は (d) ワクチン接種しない、筋肉内注射により免疫化した。初回接種の 2 週間後及び 6 週間後、ブースター接種前、及びブースター接種の 2 週間後及び 4 週間後に血液の I F N - γ^+ C D 8⁺ T 細胞応答を I C S により評価した。

【 0 1 4 1 】

結果：調べた全ての時点で各ワクチン構築物が I F N - γ^+ C D 8⁺ T 細胞を誘導することが分かった。図 2 6 は、親の I F N - γ 及び / 又は T N F - α 産生 C D 8⁺ T 細胞 (図 2 6 A)、C D 4 4 + C D 8⁺ T 細胞 (図 2 6 B)、C D 4 + T 細胞 (図 2 6 C) 又は C D 4 4 + C D 4 + T 細胞 (図 2 6 D) の割合を示す。初回接種後 2 週間及び 8 週間、並びにブースター接種後 2 週間及び 4 週間の、個別のマウスの P B M C 由来の I C S によって評価された免疫応答の平均を示す。

10

【 0 1 4 2 】

実験 2

目的 - C 5 7 B L / 6 マウスの異種チンパンジーアデノウイルスベクター (A d C 6 及び A d C 7) を使用して異なる用量の g D - H B V 2 及び g D - H B V 3 での初回接種及びブースターワクチン接種後の I F N - γ^+ C D 8⁺ T 細胞応答を g D - P o l N でのものと比較する。

【 0 1 4 3 】

方法：C 5 7 B L / 6 マウスのグループ (n = 5 マウス / グループ) を、以下のように、g D P o l N グループ

20

(a) 5×10^9 v p A d C 6 - g D P o l N、3 か月後 5×10^9 v p A d C 7 - g D P o l N、及び (b) 5×10^{10} v p A d C 6 - g D P o l N、3 か月後 5×10^{10} v p A d C 7 - g D P o l N

g D H B V 2 グループ

(c) 5×10^9 v p A d C 6 - g D H B V 2、3 か月後 5×10^9 v p A d C 7 - g D H B V 2、及び

(d) 5×10^{10} v p A d C 6 - g D H B V 2、3 か月後 5×10^{10} v p A d C 7 - g D H B V 2

g D H B V 3 グループ

(e) 5×10^9 v p A d C 6 - g D H B V 3、3 か月後 5×10^9 v p A d C 7 - g D H B V 3、及び

30

(f) 5×10^{10} v p A d C 6 - g D H B V 3、3 か月後 5×10^{10} v p A d C 7 - g D H B V 3

処置無しはコントロールとして働いた。

のように免疫化した。

【 0 1 4 4 】

全ての処置グループについて、免疫原性 C D 8⁺ T 細胞応答は、初回接種後 2 週間及び 6 週間、ブースター接種前及びブースター接種後 2 週間及び 6 週間の I F N - γ^+ について I C S によって評価した。免疫原性をまた、初回接種後 4 週間で、H B V ポリメラーゼのアミノ酸 3 9 6 ~ 4 0 4 F A V P N L Q S L (ペプチド 5 5) に対応する A P C 標識 M H C クラス I 四量体 (N I H t e t r a m e r F a c i l i t y , E m o r y U n i v e r s i t y , A t l a n t a G A) を使用する四量体染色により評価した。H B V 3 は、F A V P N L Q S L ペプチドを含まない。

40

【 0 1 4 5 】

結果：全ての時点で、調べた各ワクチンは、I F N - γ^+ C D 8⁺ T 細胞を誘導することが分かった。g D H B V 2 ワクチンで得られた結果は、g D P o l N ワクチンで得られたものと類似し、g D H B V 3 ワクチンはあまり免疫原性でなかった。四量体染色時に、特異的 C D 8⁺ T 細胞の頻度は 2 個のワクチンの間で同等であり、多くの活性化マーカーは、g D H B V 2 免疫化グループ由来の四量体 + C D 8 + T 細胞上でより高度に発現される傾向があった。図 2 7 は、複数の時点、初回接種後 4 週間 (図 2 7 A)、ブースター接種後

50

2週間（図27B）、及びブースター接種後4週間（図27C）でのCD8⁺T細胞を示す。グラフは、ICSによって評価されるIFN- γ ⁺を産生するCD8⁺T細胞の全体の頻度を示す。

【0146】

図28は、複数の時点、初回接種後4週間（図28A）、ブースター接種後2週間（図28B）、及びブースター接種後4週間（図28C）でのICSによって評価されたサイトカイン産生CD4⁺T細胞を示す。破線は、未処置のマウスからの結果に基づく陽性応答のカットオフを示す。

【0147】

図29は、初回接種後4週間でのCD8⁺T細胞（図29A）又はCD4⁺CD8⁺T細胞（図29B）のいずれか上にゲート制御された四量体染色の結果を示す。

10

【0148】

図30は、示された抗体、図30A BV605に結合した抗PD1抗体；図30B BV650に結合した抗LAG3抗体；図30C Pe-Cy7-Aに結合した抗TIM3抗体；図30D PE-Aに結合した抗CTLA4抗体；図30E AF488に結合した抗EOMES抗体；及び図30F BV786に結合した抗T-bet抗体に結合する色素の平均蛍光強度として示される四量体+CD8⁺T細胞の表現型を示す。

【0149】

実験3

ワクチン接種したC57BL/6マウスのプールした脾細胞から応答の幅を評価し、これをHBVワクチン挿入断片に存在する個別のペプチドに対してICSにより調べた。

20

【0150】

方法：5匹のC57BL/6マウスの4つのグループを以下のように、（a） 5×10^{10} v.p. AdC7-gDHBV2、2か月後 5×10^{10} v.p. AdC6-gDHBV2；（b） 5×10^9 v.p. AdC7-gDHBV2、2か月後 5×10^9 v.p. AdC6-gDHBV2；（c） 5×10^{10} v.p. AdC7-gDHBV3、2か月後 5×10^{10} v.p. AdC6-gDHBV3；又は（3）ワクチン無し、を筋肉内注射により免疫化した。ブースター接種後8週目に動物を殺し、プールした脾細胞の個別のHBV2又はHBV3ペプチドに対するIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞応答をICSによって評価した（陽性応答のカットオフを0.1%に設定した）。

30

【0151】

結果：用量とは独立して、gDHBV2ワクチンによるプライムブースト計画は、コア及びポリメラーゼ内のいくつかのエピトープに対する応答を誘導した。図31は、 5×10^{10} v.p. AdC7-gDHBV2の初回ワクチン接種及びその2か月後の 5×10^{10} v.p. AdC6-gDHBV2によるワクチン接種後のCD8⁺T細胞応答を示す。X軸の数は、本明細書に提供される配列番号に対応する。図32は、 5×10^9 v.p. AdC7-gDHBV2の初回ワクチン接種及びその2か月後の 5×10^9 v.p. AdC6-gDHBV2によるワクチン接種後のCD8⁺T細胞応答を示す。X軸の数は、本明細書に提供される配列番号に対応する。図33は、 5×10^{10} v.p. AdC7-gDHBV3の初回ワクチン接種及びその2か月後の 5×10^{10} v.p. AdC6-gDHBV3によるワクチン接種後の免疫原性を示す。X軸の数は、本明細書に提供される配列番号に対応する。

40

【0152】

実験4

ワクチン接種したBALB/cマウスのプールした脾細胞から応答の幅を評価し、これをHBV挿入断片に存在する個別のペプチドに対してICSにより調べた。

【0153】

方法：5匹のBALB/cマウスの5つのグループを以下のように、（a） 5×10^{10} v.p. AdC6-gDHBV2；（b） 5×10^{10} v.p. AdC6-gDHBV3；（c） 5×10^{10} v.p. AdC7-gDHBV2；（d） 5×10^{10} v.p. AdC7-gDHBV3；又は（e）ワクチン無し、を筋肉内注射により免疫化した。ワクチン接種後12

50

週目に動物を 殺し、脾臓を収集し、プールした脾細胞の個別のHBV2又はHBV3ペプチドに対するIFN- γ ⁺CD8⁺T細胞応答をICSによって評価した（陽性応答のカットオフを0.1%に設定した）。

【0154】

結果：12週目で、各ワクチン構築物は、ワクチンによって送達されたコア及びポリメラーゼ遺伝子の複数の領域にわたり免疫原性であることが分かった。図34は、本明細書に提供される配列番号（X軸）に対応するAdC6-gDHBV2及びAdC7-gDHBV2ワクチンの免疫原性を示す。両HBV2構築物のCore、PolC、及びPolN領域は、免疫原性だった。図35は、本明細書に提供される配列番号（X軸）に対応するAdC6-gDHBV3及びAdC7-gDHBV3ワクチンの免疫原性を示す。両HBV3構築物のCore、PolC及びPolN領域は、免疫原性だった。

10

【0155】

実験5

方法：C57BL/6マウスの5個のグループに 1×10^9 vgのAAV8-1.3HBVを曝露し、4週間後に 1×10^{10} vpのいずれかのAdC6-gDPolN（n=10）、AdC6-gDHBV2（n=10）、AdC6-gDHBV3（n=10）、又はgD無しのAdC6-HBV2（n=10）でワクチン接種し、AAVで感染させ、ワクチン接種していない動物（n=10）及びAAVで感染させておらず、ワクチン接種していない動物（n=2~5）は、コントロールとして働いた。注射後の様々な時点でマウスを出血させ、挿入断片特異的なCD8⁺及びCD4⁺T細胞の頻度を、IFN- γ に対する細胞内サイトカイン染色（ICS）により決定し、PCRを初回ワクチン接種後2週目、6週目、及び8週目に実行し、T細胞アッセイを初回ワクチン接種後4週目に実行した。

20

【0156】

初回ワクチン接種後8週目に、マウスを初回ワクチン接種で使用した同一の抗原挿入断片を含むAdC7ベクターでブースター接種し（「ブースターワクチン接種」）、ワクチン接種後の様々な時点で以前記述したように血液及び血清のCD8⁺/CD4⁺T細胞を調べた。PCRをブースターワクチン接種後2週目、6週目、及び10週目に実行し、T細胞アッセイをブースターワクチン接種後4週目、及び12週目に実行した。

【0157】

当業者は、数値的变化及び変形を本発明の好ましい実施形態に対してなすことができ、このような変化及び変形を、本発明の精神から逸脱することなくなすことができることを理解するだろう。したがって、添付の特許請求の範囲は、本発明の真の精神及び範囲に含まれるような全ての等価な変化に及ぶことが意図される。

30

【0158】

本文書に引用される又は記載される各特許、特許出願、及び特許公開の開示は、その全体を参照により本明細書中にこれにより援用される。

40

50

【表 9 - 1】

表9.配列

	配列
遺伝子型A コンセンサス (SEQ ID NO: 1)	MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYR EALSPHCHSPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGNNLeD PASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVE YLVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRRDRGR SPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC
遺伝子型B コンセンサス (SEQ ID NO: 2)	MDIDpYKEFGASvELLSFLPSDFFPSiRDLLDTAsALYR EALSPHCHSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLeD PASRELVVsyVNVNMGLKiRQLLWFHISCLTFGRETVE YLVSGVWIRTPpAYRPPnAPILSTLPETTIVRRRGRSP RRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSREsQC
遺伝子型C コンセンサス (SEQ ID NO: 3)	MDIDpYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYR EALSPHCHSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLED PASRELVVsyVNVNMGLKiRQLLWFHISCLTFGRETVE YLVSGVWIRTPpAYRPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSP RRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSRESQC
遺伝子型D コンセンサス (SEQ ID NO: 4)	MDIDPYKEFGAtVELLSFLPsDFFPSVRDLLDTASALYR eALSPHCHSPHHTALRQAILCWGeLMtLATWVGgNLED PaSRDLVVSyVNTNmGLKfRQLLWFHISCLTFGRetViE YLVSGVWIRTPpAYRPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSP RRRTPSPRRRRSQSPRRRSQSRESQC
初期コア配列 (SEQ ID NO: 5)	MDIDpYKEFGAX ₁ VELLSFLPSDFFPSX ₂ DLDDTASALYR EALSPHCHSPHHTALRQAILCWGELMX ₃ LATWVGX ₄ NLe DPASRX ₅ LVVX ₆ YVNX ₇ NMGLKX ₈ RQLLWFHISCLTFGRET VX ₉ EYLVSGVWIRTPpAYRPPNAPILSTLPETTIVRRRX iX ₁₁ GRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC
エピトープ最適化 コアアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 6)	DIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYRE ALESPEHCHSPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGSNLED ASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVIEW LVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRRDRGRS PRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQC
エピトープ最適化 コアヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 7)	GACATCGACCCCTACAAGGAGTTCGGCGCCACCGTGGAG CTGCTGAGCTTCCTGCCAGCGACTTCTTCCCAGCATC AGGGACCTGCTGGACACCGCCAGCGCCTGTACAGGGAG GCCCTGGAGAGCCCCGAGCACTGCAGCCCCCACCACACC GCCCTGAGGCAGGCCATCCTGTGCTGGGGCGAGCTGATG ACCCTGGCCACCTGGGTGGGCAGCAACCTGGAGGACCCC GCCAGCAGGGAGCTGGTGGTGAGCTACGTGAACGTGAAC ATGGGCCCTGAAGATCAGGCAGCTGCTGTGGTTCCACATC AGCTGCCTGACCTTCGGCAGGGAGACCGTGATCGAGTAC CTGGTGAGCTTCGGCGTGTGGATCAGGACCCCCCGCC TACAGGCCCCCAACGCCCCATCCTGAGCACCCTGCCC GAGACCACCGTGGTGAGGAGGAGGACAGGGGCAGGAGC CCCAGGAGGAGGACCCCCAGCCCCAGGAGGAGGAGGAGC CAGAGCCCCAGGAGGAGGAGGAGCCAGAGCAGGGAGAGC CAGTGC

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

	配列
エピトープ最適化 ポリメラーゼN末端 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 8)	PLSYQHFRKLLLLLDEEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDL NLGNLNVSIPTWTHKVGNETGLYSSTVPVFENPEWQTPSF PKIHLQEDIVDRCKQFVGPLTVNEKRRLKLIMPARFYPNVTK YLPLDKGIKPYYPEHAVNHVFQTRHYLHTLWKAGILYKRE TTRSASFCSFPYSWEQELQHGSCWWLQFRNSKPCSEYCLT HLVNLLLEDWGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNP HNTAESRLVVDFSQF'SRGITRVSWPKFAVPNLQSLTNLLS SNLSWLSLDVSAAFYHILHPAAMP
エピトープ最適化 ポリメラーゼN末端 ヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 9)	CCCCTGAGCTACCAGCACTTCAGGAAGCTGCTGCTGCTGG ACGAGGAGGCCGCCCCCTGGAGGAGGAGCTGCCAGGCT GGCCGACGAGGGCCTGAACAGGAGGGTGGCCGAGGACCTG AACCTGGGGCAACCTGAACGTGAGCATCCCCCTGGACCCACA AGGTGGGCAACTTCACCGGCCTGTACAGCAGCACCGTGCC CGTGTTCAACCCCGAGTGGCAGACCCCGAGCTTCCCCAAG ATCCACCTGCAGGAGGACATCGTGGACAGGTGCAAGCAGT TCGTGGGCCCCCTGACCGTGAACGAGAAGAGGAGGCTGAA GCTGATCATGCCCGCCAGGTTCTACCCCAACGTGACCAAG TACCTGCCCCCTGGACAAGGGCATCAAGCCCTACTACCCCG AGCACGCCGTGAACCACTACTTCCAGACCAGGCACTACCT GCACACCCCTGTGGAAGGCCGGCATCCTGTACAAGAGGGAG ACCACCAGGAGCGCCAGCTTCTGCGGCAGCCCCCTACAGCT GGGAGCAGGAGCTGCAGCACGGCAGCTGCTGGTGGCTGCA GTTCAGGAACAGCAAGCCCTGCAGCGAGTACTGCCTGACC CACCTGGTGAACCTGCTGGAGGACTGGGGCCCCCTGCGACG AGCACGGCGAGCACCACATCAGGATCCCCAGGACCCCCGC CAGGGTGACCGGCGGCGTGTTCCTGGTGGACAAGAACCCC CACAACACCGCCGAGAGCAGGCTGGTGGTGGACTTCAGCC AGTTCAGCAGGGGCATCACCAGGGTGAGCTGGCCCAAGTT CGCCGTGCCCCAACCTGCAGAGCCTGACCAACCTGCTGAGC AGCAACCTGAGCTGGCTGAGCCTGGACGTGAGCGCCGCCT TCTACCACATCCCCCTG CACCCCGCCGCCATGCCC
エピトープ最適化 ポリメラーゼC末端 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 10)	HLLVGSSGLSRYVARLSSNSRIINHQHGTMQNLHDSCSRN LYVSLLLLYKTFGRKLHLYSHPIILKTKRWGYSLNFMGYV IGSWGSILPQDHI IQKIKECFRKL P VNRPIDWKVCQRIVGL LGFAAPFTQCGYPALMPYACIQSKQAFTEFSPTYKAFLSK QYLNLYPVARQRPGLCQVFADATPTGWGLAMGHQRMRTF VAPLPIHTAELLAACFARSRS GAKILGTDNSVVL SRKYTS FPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADDPSRGLGLSR PLLRLPFRPTTGRTSLYAVSPSV

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

	配列	
エピトープ最適化 ポリメラーゼC末端 ヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 11)	CACCTGCTGGTGGGCAGCAGCGGCCCTGAGCAGGTACGTGGCCAGGCTGAGCAG CAACAGCAGGATCATCAACCACCAGCACGGCACCATGCAGAACCTGCACGACA GCTGCAGCAGGAACCTGTACGTGAGCCTGCTGCTGCTGTACAAGACCTTCGGC AGGAAGCTGCACCTGTACAGCCACCCCATCATCCTGAAGACCAAGAGGTGGGG CTACAGCCTGAACTTCATGGGCTACGTGATCGGCAGCTGGGGCAGCCTGCCCC AGGACCACATCATCCAGAAGATCAAGGAGTGCTTCAGGAAGCTGCCCGTGAAC AGGCCCATCGACTGGAAGGTGTGCCAGAGGATCGTGGGCCTGCTGGGCTTCGC CGCCCCCTTCACCCAGTGCGGCTACCCCGCCCTGATGCCCCCTGTACGCCTGCA TCCAGAGCAAGCAGGCCTTCACCTTCAGCCCCACCTACAAGGCCTTCCTGAGC AAGCAGTACCTGAACCTGTACCCCGTGGCCAGGCAGAGGCCCGGCTGTGCCA GGTGTTCCGCCAGCCACCCCAACCGGCTGGGGCCTGGCCATGGGCCACCAGA GGATGAGGGGCACCTTCGTGGCCCCCTGCCCATCCACACCGCCGAGCTGCTG GCCGCTGCTTCGCCAGGAGCAGGAGCGGGCCCAAGATCCTGGGCACCGACAA CAGCGTGCTGCTGAGCAGGAAGTACACCAGCTTCCCCTGGCTGCTGGGCTGCG CCGCCAACCTGGATCCTGAGGGGCACCAGCTTCGTGTACGTGCCAGCGCCCTG AACCCCGCCGACGACCCAGCAGGGGCAGGCTGGGCCTGAGCAGGCCCTGCT GAGGCTGCCCTTCAGGCCACCAACCGGCAGGACCAGCCTGTACGCCGTGAGCC CCAGCGTG	10
N末端HSV gD配列 (SEQ ID NO: 12) イタリック: シグナルペプチド	MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKYALADASLKMADPNRFRGKDLFVLDQ LTDPPGVRRVYHIQAGLPDFEQPPSLPITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQI VRGASEDVRKQPYNLTIWFRMGGNCAIPITVMEYTECSYNKSLGACPIRTQP RWNYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAK GSCKYALPLRIPPSACLSFQAYQQGVTVDSIGMLPRFI PENQRTVAVYSLKIA GWHGP	20
C末端HSV gD配列 (SEQ ID NO: 13)	GPKAPYTSTLLPPELSETPNATQPELAPEDPEDSALLEDPVGTVAPQIPPNWH IPSIQDAATPYHPPATPNNMGLIAGAVGGSLLAALVICGIVYWMHRRTRKAPK RIRLPHIREDDQPSSHQPLFY	
gDコアアミノ酸配列 下線:コア (SEQ ID NO: 14) イタリック: シグナルペプチド	MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKYALADASLKMADPNRFRGKDLFVLDQ LTDPPGVRRVYHIQAGLPDFEQPPSLPITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQI VRGASEDVRKQPYNLTIWFRMGGNCAIPITVMEYTECSYNKSLGACPIRTQP RWNYYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAK GSCKYALPLRIPPSACLSFQAYQQGVTVDSIGMLPRFI PENQRTVAVYSLKIA GWHGPDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPHCS PHHTALRQAILCWGELMTLATWVGSNLEDPASRELVVSYNVNMGLKIRQLLW FHISCLTFGRETVIEYLVSEFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRDRG RSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQCGPKAPYTSTLLPPELSETPNATQ PELAPEDPEDSALLEDPVGTVAPQIPPNWHIPSIQDAATPYHPPATPNNMGLI AGAVGGSLLAALVICGIVYWMHRRTRKAPKRIRLPHIREDDQPSSHQPLFY	30
		40

【表 9 - 4】

	配列
gDコア 核酸配列 下線:コア (SEQ ID NO: 15)	atggggggggggtgccgcccaggttgggggcccgtgattttgtttgtcgtcatagt gggcctccatgggggtccgcccgaatatgccttggcggatgcctctctcaaga tggccgaccccaatcgctttcgcggaagaccttccggctcctggaccagctg accgaccctccgggggtccggcgctgtaccacatccaggcgggacctaccgga cccgttccagccccccagcctcccgatcacggtttactacgcctgtgtggagc gcgctgcccagcgtgctcctaaacgcaccgtcggaggccccccagattgtc cggggggctccgaagacgtccggaaacaacctacaacctgacctcgcttg gtttcggatgggaggcaactgtgctatccccatcacggatcatggagtacaccg aatgctcctacaacaagtctctgggggctgtcccatccgaacgcagccccgc tggaactactatgacagcttcagcgccgtcagcgaggataacctgggggttct gatgcacgcccccgctttgagaccgcggcacgtacctgcccgtcgtgaaga taaacgactggaaggagattacacagtttatcctggagcacccagaccaaggc tcctgtaagtacgcccctcccgctgcgcaccccccgtaagcctgctctcccc ccaggcctaccagcaggggtgacggtggacagcatcgggatgctgccccgct tcacccccgagaaccagcgcccgctgcgcgtatacagctgaagatcgccggg tggcacgggcccgcacatcgacccctacaaggagttcggcgccaccgtggagct gctgagcttctgcccagcgacttcttccccagcatcagggaacctgctggaca ccgcccagcgccctgtacagggaggccctggagagccccgagcactgcagcccc caccacaccgcccctgaggcaggccatcctgtgctggggcgagctgatgacct ggccacctgggtgggcagcaacctggaggacccccgcagcagggagctggtgg tgagctacgtgaacgtgaacatgggcctgaagatcaggcagctgctgtggttc cacatcagctgcctgaccttcggcagggagacccgtgatcgagtacctggtgag cttcggcgtgtggatcaggaccccccccgccctacaggcccccccaacgccccca tctcagcaccctgcccagaccaccgtggtgaggaggagggacaggggcagg agccccaggaggaggacccccagccccaggaggaggaggagccagagcccccag gaggaggaggagccagagcaggaggagccagtgcggggcccaaggccccataca cgagcaccctgctgcccccgagctgtccgagaccccccaacgcccagcagcca gaactgccccggaagacccccagagattcggccctcttgaggacccccgtggg gacggtggcgccgcaaatccaccaaaactggcacatcccgatccaggacg ccgcgacgcttaccatcccccgccacccccgaacaacatgggacctgatcgcc ggcgcggtggggcgagctcctcctggcagccctggctcatttgcggaattgtgta ctggatgcaccgcgcactcggaaagccccaaagcgcatagcctccccaca tcggggaagacgaccagcgtcctcgcaccagcccttgttttactag
gDPoIN アミノ酸配列 下線:PoIN (SEQ ID NO: 16) イタリック: シグナルペプチド	MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVGRKYALADASLKMADPNRFRGKDLPLVDQL TDPFGVRRVYHIQAGLPDPFPFSLPITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQIV RGASEDVRKQPYNLTIWFRMGGNCAIPITVMEYTECSYNKSLGACPIRTQPR WNYYSFSFVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAKG SCKYALPLRIPPSACLSPQAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVAVYSLKIAG WHGPF~~LSYQHFRKLLLLDEEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDLNLGNLNVSI~~ ~~PWTHKVGNETGLYSSTVPVFENPEWQTPSEPKIHLQEDIVDRCKQFVGPLTVNE~~ KRRCLKLIMPARFYPNVTKYLP~~LDKGIKPYYPEHAVNHYFQTRHYLHTLWKAGI~~ ~~LYKRETT~~RSASF~~CGSPYSWEQELQHGSCWWLQFRNSKPCSEYCLTHLVNLL~~ED WGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDF~~SQFSRGITR~~ VSWPKFAVPNLQSLTNLSSNLSWLSLDVSAAFYH~~IPLHPAAMP~~GPKAPYTST LLPPELSETPNATQPELAPEDPEDSALLEDPVGTVAPQIPPNWHIPSIQDAAT PYHFPATPNNMGLIAGAVGGSLLAALVICGIVYWMHRRTRKAPKRI~~RLPHIRE~~ DDQPSSHQPLFY*

10

20

30

40

50

【表 9 - 5】

	配列	
gDPoIN 核酸配列 下線: PoIN (SEQ ID NO: 17)	atggggggggtgccgccagggttgggggcccgtgattttgtttgtcgtcatagt gggcctccatggggtccgcggcaaatatgccttggcggtgcctctctcaaga tggccgaccccaatcgctttcgcggcaaacacctccgggtcctggaccagctg accgaccctccgggggtccggcgcggtgtaccacatccaggcgggcctaccgga ccggttcagccccccagcctcccgatcacggtttactacgcggtgttggagc ggcctgccgcagcgtgctcctaaacgcaccgtcggaggccccccagattgtc cgcggggcctccgaagacgtccggaaacaacctacaacctgaccatcgcttg gtttcggatgggaggcaactgtgctatcccatcacgggtcatggagtacaccg aatgtcctacaacaagtctctgggggctgtcccatccgaacgcagccccgc tggaactactatgacagcttcagcgccgtcagcgaggataacctggggttcct gatgcacgcccccggtttgagaccgcccgcacgtacctgcggtcgtgaaga taaacgactggacggagattacacagtttatcctggagcaccgagccaagggc tcctgtaagtagccctcccgctgcgcacccccgtcagcctgcctctcccc ccaggcctaccagcaggggtgacggtggacagcatcgggatgctgccccgt tcacccccgagaaccagcgcccgctcgccgtatacagcttgaagatcgccggg tggcacgggccccccctgagctaccagcacttcaggaagctgctgctgctgga cgaggaggccggccccctggaggaggagctgccaggctggccgacgagggcc tgaacaggaggggtggccgaggacctgaacctgggcaacctgaacgtgagcatc ccctggaccacacaagggtgggcaacttcaccggcctgtacagcagcaccgtgcc cgtgttcaaccccgagtggcagacccccagcttcccccaagatccacctgcagg aggacatcgtggacagggtgcaagcagttcgtgggtccctgaccgtgaacgag aaagaggaggtgaagctgatcatgcccgccagggttctaccccaacgtgaccaa gtacctgcccctggacaagggcacatcaagccctactaccccgagcagccgtga accactacttccagaccaggcactacctgcacacctgtggaaggccggcacc ctgtacaagaggggagaccaccaggagcgccagcttctgcccgcagccccctacag ctgggagcaggagctgcagcacggcagctgctggtggctgcagttcaggaaca gcaagccctgcagcgagtactgcctgacccacctggtgaacctgctggaggac tgggggtccctgcgacgagcagggcgagcaccacatcaggatccccaggacccc cgccagggtgaccggcgggcgtgttcctggtggacaagaacccccacaacccg ccgagagcaggctggtggtggacttcagccagttcagcaggggcatcaccagg gtgagctggcccaagttcgccgtgcccacacctgcagagcctgaccaacctgct gagcagcaacctgagctggctgagcctggacgtgagcgccgcttctaccaca tccccctgcacccccgcggccatgcccgggcccgaaggccccatacacgagcacc ctgctgcccccgagctgtccgagaccccccaacgccacgcagccagaactcgc ccccgaagacccccgaggattcgccctcttgaggagccccgtggggacggtgg cgccgcaaatcccacaaaactggcacatcccgctcgatccaggacgcgcgcagc ccttaccatcccccgccacccccgaacaacatgggctgatcgccggcgcggt ggcgggcagtcctcctggcagccctggtcatttgcggaattgtgtactggatgc accgcccactcggaaagccccaaagcgcatagcctccccacatccgggaa gacgaccagccgtcctcgaccagcccttgttttactag	10 20 30 40

10

20

30

40

【表 9 - 6】

	配列
gDPolCアミノ酸配列 下線: PolC (SEQ ID NO: 18) イタリック: シグナルペプチド	MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVGRKYALADASLKMADPNRFRGKDLPLVDQL TDPPGVRRVYHIQAGLPDPFQPPSLPITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQIVR GASEDVRKQPYNLTIAWFRMGGNCAIPITVMEYTECSYNKSLGACPIRTQPRWN YYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAKGSCK YALPLRIPPSACLSPOAYQQGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVAVYSLKIAGWHGP HLLVGSSGLSRVVARLSSNSRIINHOGTMONLHDSCSRNLYVSLLLLYKTFR KLHLYSHPIILKTRWGYSLNFMGYVIGSWGSLPDHIIQKIKECFRKLPNRNP IDWVCQRIVGLLGFAAPFTQCGYPALMPLYACIQSKQAFTEFSTYKAFELSKOY INLYPVARQRPGLCQVFADATPTGWGLAMGHQMRGTFFVAPLPIHTAELLAACF ARSRSGAKILGTONSVVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADD PSRGRLGLSRPLLRLPFRPTTGRISLYAVSPSVGPKAPYTSLLPPELSETPNA TQPELAPEDPEDSALLEDPVGTVAQIIPNWHIPSIQDAATPYHPPATPNMGL IAGAVGGSLLAALVICGIVYWMHRRTRKAPKRIRLPHIREDDQPSSHQPLFY
gDPolC核酸配列 下線: PolC (SEQ ID NO: 19)	atgggggggggtgcgcgcaggttggggggcgtgattttgtttgtcgtcatagtg ggcctccatgggggtccgcgcgcaaatatgccttggcggatgcctctctcaagatg gccgaccccaatcgctttcgcgcgcaaacgacctccgggtcctggaccagctgacc gacctccgggggtccgcgcggtgtaccacatccaggcgggctaccggaccgc ttccagccccccagcctcccgatcacgggtttactacgcggtgttgagcgcgcc tgccgcagcgtgctcctaaccgcacgcgtcggaggccccccagattgtccgcggg gcctccgaagacgtccggaaacaacctacaacctgacctcgcttggtttcgg atgggaggcaactgtgctatccccatcacgggtcatggagtacaccgaatgctcc tacaacaagtctctgggggcctgtcccatccgaacgcagccccgctggaactac tatgacagcttcagcgcggtcagcgcgagataacctggggttcctgatgcacgc cccgcggttgagacgcgcgcacgtacctggcgctcgtgaagataaacgactgg acggagattacacagtttatcctggagcaccgagccaagggtcctgtaagtac gccctcccgctgcgcgcacccccgtcagcctgcctctccccccaggcctaccag caggggggtgacggtggacagcatcgggatgctgccccgcttcatccccgagAAC cagcgcacccgtgcgcgtatacagcttgaagatgcgcgggtggcaccgggcccac ctgctgggtgggcagcagcgcgcctgagcaggtacgtggccaggctgagcagcaac agcaggtatcatcaaccaccagcagcgcacctgcagaacctgcacgacagctgc agcaggaacctgtacgtgagcctgctgctgtgtacaagaccttcggcaggaag ctgcacctgtacagccaccccatcatcctgaagaccaagaggtggggctacagc ctgaacttcatgggctacgtgatcggcagctggggcagcctgccccaggaccac atcatccagaagatcaaggagtgttcaggaagctgcccgtaaacaggccccatc gactggaaggtgtgcccagaggatcgtgggcctgctgggcttcgcgcgcccccttc accagtgccggtaccgcgcctgatgccctgtacgcctgcacccagagcaag caggccttcaccttcagccccacctacaaggccttcctgagcaagcagtaacctg aacctgtacccccgtggccaggcagaggccccgcctgtgccaggtgttgcgcgac gccacccccaccggtggggcctggccatgggccaccagaggatgaggggaccc ttcgtggccccctgccccatccacaccgcgcgagctgctggccgctgcttcgcc aggagcaggagcgcgcgcaagatcctgggcaccgacaacagcgtggtgctgagc aggaagtacaccagcttccctggctgctgggctgcgcgcgcaactggatcctg aggggcaccagcttcgtgtacgtgccagcgcctgaaccccgccgacgacccc agcaggggcagcgtgggctgagcagggccccctgctgagcgtgcccttcaggccc accaccgagcagaccagcctgtacgcctgagccccagcgtggggcccaaggcc ccatacacgagcaccctgctgcccccgagctgtccgagaccccccaacgcccag cagccgaactcgcgcgcggaagaccgcgaggattcggccctcttgaggagcccc gtggggcaggtggcgccgcaaatccaccaaaactggcacatccgctgatccag gacgcgcgacgccttaccatcccccgccacccccgaacaacatgggcctgac gcccgcgcggtggggcgcagctcctggcagccctggctcatttgcggaattgtg tactggtgacccgcgcgactcggaaagccccaaagcgcatagcctccccac atccgggaagacgaccagcgtcctgcaccagcccttgttttactag

10

20

30

40

50

【表 9 - 7】

	配列
HBV PoIN v2 アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 173)	HFRKLLLLDEEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLG NLPEWQTPSFPKIHLQEDIVDRCKQFVGPLTVNEKRRL KLIMPARFYFNVTKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFQTR HYLHTLWKAGILYKRETTTSASFCGSPYSWEQELQHGS CWWLQFRNSKPCSEYCLTHLVNLLDVGPCDEHGEHHI RIPRTPARVT
HBV2アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 174) (Pol N (イタリック) -Pol C (下線)-コア)	<u>YLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFQTRHYLHTLWKAGILYK</u> <u>RETTTSASFCGSPYSWEQELQHGS</u> <u>CWWLQFRNSKPCSE</u> <u>YCLTHLVNLLDVGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVF</u> <u>LVDKNPHTAESRLVVDFSQFSRGI</u> <u>TRVSWPKFAVNL</u> <u>QSLTNLLSSNLSWLSLDVQAFTFSPTYKAFLSKQYLN</u> <u>YPVARQRPGLCQVFADATPTGWGLAMGHQRMRTFVAP</u> <u>LPIHTAELLAACFARSRS</u> <u>GAKILGTDNSVLSRKYTSF</u> <u>FWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADDVGSNLEDPA</u> <u>SRELVVSYNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVIEY</u> <u>LVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRDRGR</u>
HBV3アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 175) (Pol N (イタリック) -Pol C (下線)-コア)	HFRKLLLLDEEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDNLG NLPEWQTPSFPKIHLQEDIVDRCKQFVGPLTVNEKRRL KLIMPARFYFNVTKYLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFQTR HYLHTLWKAGILYKRETTTSASFCGSPYSWEQELQHGS CWWLQFRNSKPCSEYCLTHLVNLLDVGPCDEHGEHHI RIPRTPARVTQAFTFSPTYKAFLSKQYLNLYPVARQRP GLCQVFADATPTGWGLAMGHQRMRTFVAPLPIHTAEL LAACFARSRS GAKILGTDNSVLSRKYTSF FWLLGCAANWILRGTSFVYVPSALNPADDVGSNLEDPASRELVVS YNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVIEYLVSFGVWI RTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRDRGR
HBV2核酸配列 (SEQ ID NO: 176)	tatctgccctggataaaggcattaaaccgtattatccggaacatcgcggtgaaccatta tttcagaccgccattatctgcataccctgtggaagcgggcattctgtataaacgcg aaaccaccgcagcgcgagcttttgcggcagccgtatagctgggaacagggaactg cagcatggcagctgctggtggctgagtttgcgaacagcaaacgtgcagcgaatat tgctgacccatctggtgaacctgctggaagattggggaccgtgcgalgaacatggc gaacatcatattcgattccgcgacccggcgcgctgacggcgggcgtgttctg gtggataaaaaccgcataacaccgcggaaagccgctggtggtgatttagccag tttagccgcggcattaccgcgctgagctggccgaaatttgcggtccgaacctgcag agcctgaccaacctgctgagcagcaacctgagctggctgagcctggatgtcagggc gtttaccttttagcccgacctataaagcgtttctgagcaaacagtatctgaacctgtatcc ggtggcgccgagcgcggggcctgtgccaggtgtttgcggatgcgaccccgaccg cgtggggcctggcgtggccatcagcgcatgcgcggcacccttgtggcgccgctg ccgattcataccgcggaaactgctggcgcgctgtttgcgcgagccgcagcgcgcg gaaaattctgggcaccgataacagcgtggtgctgagcgcgcaaatataccagcttccg tggctgctgggctgcgcggcgaactggattctgcgcggcaccagcttgtgtatgtgc cgagcgcgctgaaccggcgatgatggcgagcaacctggaagatccggcgag ccgcgaactgggtgagctatgtgaacgtgaacatgggcctgaaaattcgccagct gctgtggtttcatattagctgcctgacctttggccgcgaaaccgtgattgaatatctggt gagctttggcgtgtggaatgcaccccgccggcgtatcgccgccgaacgcgccgat ctgagcacctgcgggaaccaccgtggtgcgccgccgcatcggggccgc

10

20

30

40

50

【表 9 - 8】

	配列
HBV3核酸配列 (SEQ ID NO: 177)	cattttcgcaaacgtctgctgctggatgaagaagcgggaccgctggaagaagaactg ccgcgcctggcggatgaaggcctgaaccgccgctggcgggaagatctgaacctgg gcaacctgccggaatggcagaccccgagctttccgaaaatcatctgcaggaagata ttgtgatcgtgcaaacagtttggggaccgctgaccgtgaacgaaaaacgccgcc tgaactgattatgccgcgcgctttatccgaacgtgaccaaatactctccgctgat aaaggcattaaaccgtattatccggaacatcggtgaaccattatctcagaccgcc attatctgcataccctgtggaagcgggcattctgtataaacgcgaaaccaccgca gcgcgagctttgcgcagcccgatagctgggaacaggaaactgcagcatggcagct gctgtggctgcagtttcgaacagcaaacctgcagcgaatattgctgacctatct ggtgaacctgctggaagattggggaccgtgcgatgaacatggcgaacatcatattcg cattccgcgacccccggcgcgctgacccaggcgtttacctttgcccgcctataa agcgtttctgagcaaacagtatctgaacctgtatccggtgcgcgccagcgcggg cctgtgcaggtgtttgcgagtcgaccccgaccgctgggctgctgcatggcca tcagcgcatgcgcgcacctgtggcgccgctgccgattacaccggaactgct ggcgcgctgtttgcgcgagccgcagcggcgcaaaatctgggcaccgataaca gcgtgtgtgctgagccgcaaatataccagctttccgtgctgctggctgcgcgcga actgattctgcgcgcacccagctttgtgtatgccgagcgcgctgaaccggcgg atgatgtgggcagcaacctggaagatccgcgagccgcgaactggtgtgagctatg tgaactgaacatggcctgaaaattcccgagctgctgtgtttcatattagctgcctga ccttggccgcgaaaccgtgattgaatatctggtgagcttggcgtgtgattcgaccc cgccggcgtatcggccgcgaacgcgcggaftctgagcacccctgccggaaccac cgtgtgtgcgcgcgagatcgagccgc
HBV2 PoIN アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 178)	YLPLDKGIKPYYPEHAVNHYFQTRHYLHTLWKAGILYKR ETTRSASFCSFYWEQELQHGSWWLQFRNSKPCSEYC LTHLVNLEDWGPCDEHGEHHIRIPRTPARVTGGVFLVD KNPHNTAESRLVVDVSQFSRGTTRVSWPKFAVFNLSLT NLLSSNLSWLSLDV
HBV2 PoIC アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 179)	QAFTFSPTYKAFLSKQYLNLYPVARQRPGLCQVFADATP TGWGLAMGHQMRGTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSGA KILGTDNSVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVP SALNPADD
HBV2コア アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 180)	VGSNLEDPASRELVSYSYVNVNMGKIRQLLWFHISCLTF GRETVIEWLVSFVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV RRDRGR
HBV3 PoIN アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 181)	HFRKLLLLDEEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDLNLGN LPEWQTPSFPKIHLQEDIVDRCKQFVGPLTVNEKRRLKL IMPARFYPNVTKYLPPLDKGIKPYYPEHAVNHYFQTRHYL HTLWKAGILYKRETTTRSASFCSFYWEQELQHGSWWL QFRNSKPCSEYCLTHLVNLEDWGPCDEHGEHHIRIPRT PARVT
HBV3 PoIC アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 182)	QAFTFSPTYKAFLSKQYLNLYPVARQRPGLCQVFADATP TGWGLAMGHQMRGTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSGA KILGTDNSVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVP SALNPADD
HBV3コア アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 183)	VGSNLEDPASRELVSYSYVNVNMGKIRQLLWFHISCLTF GRETVIEWLVSFVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV RRDRGR

10

20

30

40

50

	配列
gD-HBV2核酸配列 (SEQ ID NO: 184)	atgggggggggctgcgcgcaggttggggggcggtgattttgtttgtcgtcata gtggggcctccatgggggtccgcggcaaatatgccttggcggatgcctctctc aagatggccgaccccaatcgctttcgcggcaaacaccttcgggtcctggac cagctgaccgacccctccgggggtccggcgcggtgtaccacatccaggcgggc ctaccggacccgttccagccccccagcctcccgatcacgggttactacgc gtgttgaggagcgcgcctgcgcgcagcgtgctcctaaacgcaccgctcggaggcc ccccagattgtccgcggggcctccgaagacgtccggaaacaaccctacaa ctgaccatcgcttgggtttcggatgggaggcaactgtgctatcccccatcacg gtcatggagtagaccgaatgctcctacaacaagtctctgggggcctgtccc atccgaacgcagccccgcgtggaactactatgacagcttcagcgcgcgtcagc gaggataaacctgggggttccgtgatgcacgccccgcgtttgagaccgcgggc acgtacctgcggctcgtgaagataaacgactggaacggagattacacagttt atcctggagcacccgagccaagggtcctgtgaagtacgcctcccgctgcgc atccccccgtcagcctgcctctccccccaggcctaccagcaggggggtgacg gtggacagcatcgggatgctgccccgccttcacccccgagaaccagcgcacc gtgcgcgtatacagcttgaagatcgccgggtggcacgggcctatctgcgc ctggataaaggcattaaaccgtattatccggaacatgcggtgaaccattat tttcagaccgcctattatctgcataccctgtggaagcgggcattctgtat aaacgcgaaaccacccgcagcgcgagcttttgcggcagcccgatatagctgg gaacaggaaactgcagcatggcagctgctgggtggctgcagtttcgcaacagc aaaccgtgcagcgaatattgcctgacccatctgggtgaacctgctggaagat tggggaccgtgcgatgaacatggcgaacatcatattcgcattccgcgcacc ccggcgcgctgacccggcgcgctgtttctgggtggataaaaaaccgcataac accgcggaagccgcgcctgggtgggtggatttttagccagtttagccgcggcatt accgcgcgtgagctggccgaaatttgcgggtgccgaacctgcagagcctgacc aacctgctgagcagcaacctgagctggctgagcctggatgtgcaggcgcttt accttttagcccgacctataaagcgtttctgagcaaacagtatctgaacctg taccgggtggcgcgcacagcgcgccgggcctgtgccagggtgtttgcggtgcg accccgaccggctggggcctggcgatgggccatcagcgcgatgcgcggcacc tttgtggcgccgctgccgattcataccgcggaactgctggcggcgctgcttt gcgcgcagccgcagcgggcgcgaaaattctgggcaccgataacagcgtggtg ctgagccgcgaatataccagctttccgtggctgctgggctgcgcggcggaac tggattctgcgcgcgaaccagctttgtgtatgtgcgcgagcgcgctgaaccgc gcggtatgatgtgggcagcaacctggaagatccggcgagccgcgaactgggtg gtgagctatgtgaacgtgaacatgggcctgaaaattcgcacagctgctgtgg tttcataattagctgcctgacctttggcgcgcgaaccggtgattgaatatctg gtgagctttggcgtgtggattcgcacccccgcggcgctatgcgccgcgcgaac gcgcgattctgagcaccttgccggaaccaccggtggtgcgcgcgcgcgat cggggccgcgggccccaaaggccccatacacgagcacccctgctgcccccgag ctgtccgagaccccccaagccacgcagccagaactgcccccggaagacc gaggaattcggccctcttggaggaccocggtggggcgccgcaaatc ccacaaaactggcacatcccgctcgatccaggacgcgcgcgccttaccat ccccgcgcacccccgaacaacatgggcctgatgcgcgcgcgggtgggcggc agtctcctggcagccctggctcatttggggaattgtgtactggatgcaccgc cgcactcggaaagccccaaagcgcatacgcctccccacatccgggaagac gaccagccgtcctcgcaccagcccttqttttactag

40

【表 9 - 10】

	配列
gD-HBV2アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 185)	MGCAARLGAIVLFVVIVGLHGVGRGYALADASLKMADPNRFRGKDLPLVDQLTDPFGVRRV YHIQAGLPDPFQPPSLPITVYAVLERACRSVLLNAPSEAPQIVRGASEDVVRKQPYNLTIAW FRMGNGCAIPITVMEYTECSYNKSLGACPIRTQPRWNYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETA GTYLRLVKINDWTEITQFILEHRAKGSCKYALPLRIPPSACLSPOAYQQGVTVDSIGMLPRF IPENQRTVAVYSLKIAGWHGPYLPDLKGIKPYYPEHAVNHYFQTRHYLHTLWKAGIILYKRET TRSASFCCSPYSWEQELQHGSCWWLQFRNSKPCSEYCLTHLVNLLDWDGPCDEHGEHHIRIP RTPARVTGGVFLVDKNPHNTAESRLVVDQFSQFSGRITRVSWPKFAVPNLQSLTNLLSSNLSW LSLDVQAFTFSPTYKAFLSKQYLNLYPVARQRPGLCQVFADATPTGWGLAMGHQRMRTFVA PLPIHTAELLAACFARSRSKAKILGTNSVLSRKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYVPSA LNPADDVGSNLEDPASRELVSYSVNVNMGKIRQLLWFHISCLTFGRETVIEYLVSPGVWIR TPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRDRGRGPKAPYTSTLLPPELSETPNATQPELAPEDPED SALLEDPVGTVPAPQIPPNWHIPSIQDAATPYHPPATPNMGLIAGAVGGSLLAALVICGIVY WMHRRTRKAPKIRLRLPHIREDDQPSHQPLFY*
gD-HBV3核酸配列 (SEQ ID NO: 186)	atggggggggctgcccgcaggttgggggcccgtgattttgtttgtcgctcatagtgggccctcca tggggtccgcggcaaatatgccttggcggatgcctctctcaagatggccgaccccaatcgct ttcgcggaagacccctccggctcctggaccagctgaccgacccctccgggggtccggcgcggtg taccacatccaggcggcctaccggacccgttccagccccccagcctcccgatccaggcttta ctacgcggtgttgagcgcgccctgcccgcagcggtctcctaaccgcacccgtcggaggccccc agattgtccgggggctccgaagacgtccggaacaacccctacaacctgaccatcgcttgg tttcggatgggaggcaactgtgctatccccatcacgggtcatggagtacaccgaatgctccta caacaagtctctggggcctgtcccatccgaacgcagccccgctggaactactatgacagct tcagcgccgtcagcgagataaacctgggggttcctgatgcacgcccccgcggttgagaccgccc ggcacgtacctgcggtcgtgaagataaacgactggacggagattacacagtttatcctgga gcacagcgcaagggtcctgtaagtacgccctcccgctgcgcaccccccgctcagcctgcc tctccccccaggcctaccagcaggggtgacgggtggacagcatcgggatgctgccccgcttc atccccgagaaccagcgacccgtcgccgtatacagcttgaagatcgccgggtggcacggggcc ccattttcgcaactgtgctgctggatgaagaagcgggacccgctggaagaagaactgccgc gcctggcgatgaaggcctgaaccgcgcgctggcggaagatctgaacctgggcaacctgcgc gaatggcagaccccgagcttccgaaaattcatctgcaggaagatattgtggatcgctgcaa acagtttgtgggaccgctgaccgtgaacgaaaaacgcgcgctgaaactgattatgccggcgc gcttttatccgaacgtgacaaatatctgcgcgtggataaaggcattaaaccgtattatccg gaacatgcggtgaaccattattttcagaccgccattatctgcataacctgtggaaagcggg cattctgtataaacgcgaaaccaccgcagcgcgagcttttgcggcagcccgatatagctggg aacaggaaactgcagcatggcagctgctgggtggctgcagtttcgcaacagcaaacctgcagc gaatattgcctgacccatctggtgaacctgctggaagattggggacccgtgcgatgaacatgg cgaacatcatattcgcattccgcgcaccccgcgcgcgctgaccaggcgtttacctttagcc cgacctataaagcgtttctgagcaaacagtatctgaacctgtatccgggtggcgccagcgc ccgggacctgtgccagggtgtttcggtatgcgaccccgacccggtggggcctggcgatgggcca tcagcgcatgcgcggcacctttgtggcgccgctgcggattcatacccggaactgctggcgg cggtgtttgcgcgacccgcagcgcgcgaaaattctgggacccgataacagcgtggtgctg agccgcaaatataccagctttccgtggctgctgggtgcgcggcggaactggattctgcgcgg caccagctttgtgtatgtgcgagcgcgctgaaccggcgcgatgatgtgggcagcaacctgg aagatccggcgagccgcgaactgggtggtgagctatgtgaacgtgaacatgggacctgaaaatt cgccagctgctgtggtttcatattagctgctgacctttggccgcgaaacctgattgaata ttctgagcaccctgcccgaaccacccgtggtgcgcgcggagatcgaggccgcgggcccgaag gccccatacagcgacccctgctgccccggagctgtccgagaccccccaacgccacgcagcc agaactcggcccggaagaccccgaggattcggccctcttgaggagaccccggtggggacgggtgg cgccgcaaatcccacaaactggcacatcccgctcgatccaggacgcgcgacgccttaccat cccccgccaccccgaaacatgggcctgatcgccggcgcggtgggcggcagctctcctggc agccctggtcattttcggaattgtgtactggatgcacgcgcgactcggaagccccaaagc gcatacgccctccccacatccgggaagacgaccagccgtcctcgacacagcccttgttttac tag

10

20

30

40

50

【表 9 - 1 1】

	配列	
gD-HBV3アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 187)	MGGAAARLGAVILFVVIVGLHGVRGKYALADASLKMADP NRFRGKDLPLVDQLTDPFGVRRVYHIQAGLPDPFQPPSL PITVYYAVLERACRSVLLNAPSEAPQIVRGASEDVRKQP YNLTIAWFRMGGNCAIPITVMEYTECSYNKSLGACPIRT QPRWNYDYDSFSAVSEDNLGFLMHAPAFETAGTYLRLVKI NDWTEITQFILEHRAKGSCKYALPLRIPPSACLSPQAYQ QGVTVDSIGMLPRFIPENQRTVAVYSLKIAGWHGPHFRK LLLLDEEAGPLEEELPRLADEGLNRRVAEDLNLGNLPEW QTPSFPKIHLQEDIVDRCKQFVGPLTVNEKRRLKLIMPA RFYPNVTKYLPDLKGIKPYYPEHAVNHVFQTRHYLHTLW KAGILYKRETTTSASFCSGSPYSWEQELQHGSCWWLQFRN SKPCSEYCLTHLVNLLDWDGPCDEHGEHHIRIPRTPARV TQAFTFSPTYKAFLSKQYLNLYPVARQRPGLCQVFADAT PTGWGLAMGHQRMRTFVAPLPIHTAELLAACFARSRSRSG AKILGTDNSVVLRSKYTSFPWLLGCAANWILRGTSFVYV PSALNPADDVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLL WFHISCLTFGRETVIEYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPIL STLPETTIVRRRDRGRGPKAPYTSTLLPPELSETPNATQ PELAPEDPEDSALLEDPVGTVAPQIPPNNWHIPSIQDAAT PYHPPATPNNMGLIAGAVGGSLAALVICGIVYWMHRRT RKAPKRIRLPHIREDDQPSSHQPLFY*	10
		20

【0159】

実施形態

以下の実施形態のリストは、以前の記述を置き換える又は取り換えるより補足することを意図される。

実施形態 1. 配列番号 6 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む B 型肝炎ウイルス (HBV) コアタンパク質。

実施形態 2. この免疫原性断片は、配列番号 20～54 のいずれか 1 つを含む、実施形態 1 に記載の HBV コアタンパク質。

実施形態 3. 配列番号 180 のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片、又は配列番号 183 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む B 型肝炎ウイルス (HBV) コアタンパク質。

実施形態 4. 実施形態 1～3 のいずれか 1 つに記載の HBV コアタンパク質をコードする核酸分子。

実施形態 5. この核酸分子は配列番号 7 の核酸配列を含む、実施形態 4 に記載の核酸分子。

実施形態 6. 実施形態 4 又は 5 に記載の核酸分子を含むベクター。

実施形態 7. このベクターはアデノウイルスベクターである、実施形態 6 に記載のベクター。

実施形態 8. このアデノウイルスベクターは、AdC6 ベクター又は AdC7 ベクターである、実施形態 7 に記載のベクター。

実施形態 9. 実施形態 6～8 のいずれか 1 つに記載のベクターを含むワクチン。

実施形態 10. 配列番号 8 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン。

実施形態 11. この免疫原性断片は、配列番号 55 ~ 113 のいずれか 1 つを含む、実施形態 10 に記載の H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン。

実施形態 12. 配列番号 178 のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片、又は配列番号 181 のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン。

実施形態 13. 配列番号 10 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン。

実施形態 14. この免疫原性断片は、配列番号 114 ~ 172 のいずれか 1 つを含む、実施形態 13 に記載の H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン。

実施形態 15. 配列番号 179 のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片、又は配列番号 182 のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン。

実施形態 16. 実施形態 10 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の H B V ポリメラーゼをコードする核酸分子。

実施形態 17. この核酸分子は、配列番号 9 の核酸配列を含む、実施形態 16 に記載の核酸分子。

実施形態 18. この核酸分子は、配列番号 11 の核酸配列を含む、実施形態 16 に記載の核酸分子。

実施形態 19. 実施形態 16 ~ 18 のいずれか 1 つの核酸分子を含むベクター。

実施形態 20. このベクターは、アデノウイルスベクターである、実施形態 19 に記載のベクター。

実施形態 21. このアデノウイルスベクターは、A d C 6 ベクター又は A d C 7 ベクターである、実施形態 20 に記載のベクター。

実施形態 22. 実施形態 19 ~ 21 のいずれか 1 つのベクターを含むワクチン。

実施形態 23.

1 つ又は複数の、配列番号 6 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V コアタンパク質、配列番号 8 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン、及び配列番号 10 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメインを含む融合タンパク質。

実施形態 24.

(1) 配列番号 6 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V コアタンパク質及び配列番号 8 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン、

(2) 1 つ又は複数の配列番号 20 ~ 54 (配列番号 6 の免疫原性断片) 及び 1 つ又は複数の配列番号 55 ~ 113 (配列番号 8 の免疫原性断片)、

(3) 配列番号 6 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V コアタンパク質及び配列番号 10 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン、

(4) 1 つ又は複数の配列番号 20 ~ 54 (配列番号 6 の免疫原性断片) 及び 1 つ又は複数の配列番号 114 ~ 172 (配列番号 10 の免疫原性断片)、

(5) 配列番号 8 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン及び配列番号 10 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ C 末端ドメイン、

(6) 1 つ又は複数の配列番号 55 ~ 113 (配列番号 8 の免疫原性断片) 及び 1 つ又は複数の配列番号 114 ~ 172 (配列番号 10 の免疫原性断片)、

(7) 配列番号 6 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V コアタンパク質、配列番号 8 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ N 末端ドメイン、及び配列番号 10 のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む H B V ポリメラーゼ C

10

20

30

40

50

末端ドメイン、又は

(8) 1つ又は複数の配列番号20～54 (配列番号6の免疫原性断片)、1つ又は複数の配列番号55～113 (配列番号8の免疫原性断片)、及び1つ又は複数の配列番号114～172 (配列番号10の免疫原性断片)

を含む、実施形態23に記載の融合タンパク質。

実施形態25. 配列番号178のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、配列番号179のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び配列番号180のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質を含む、融合タンパク質。

実施形態26. 配列番号174のアミノ酸配列を含む、実施形態25に記載の融合タンパク質。

10

実施形態27. 配列番号181のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、配列番号182のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び配列番号183のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質を含む融合タンパク質。

実施形態28. 配列番号175のアミノ酸配列を含む、実施形態27に記載の融合タンパク質。

実施形態29. N末端単純ヘルペスウイルス(HSV)糖タンパク質(gD)配列又はその変異体、

配列番号6のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質、及びC末端HSV gD配列又はその変異体を含む、融合タンパク質。

20

実施形態30. この免疫原性断片は、配列番号20～54のいずれか1つを含む、実施形態29に記載の融合タンパク質。

実施形態31. N末端HSV gD配列又はその変異体、

配列番号8のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、及び

C末端HSV gDタンパク質配列又はその変異体を含む、融合タンパク質。

実施形態32. この免疫原性断片は、配列番号55～113のいずれか1つを含む、実施形態31に記載の融合タンパク質。

実施形態33. N末端HSV gD配列又はその変異体、

30

配列番号10のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び

C末端HSV gDタンパク質配列又はその変異体を含む融合タンパク質。

実施形態34. この免疫原性断片は、配列番号114～172のいずれか1つを含む、実施形態33の記載の融合タンパク質。

実施形態35. N末端HSV gD配列又はその変異体、

(1) 配列番号6のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質及び配列番号8のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、

40

(2) 1つ又は複数の配列番号20～54 (配列番号6の免疫原性断片) 及び1つ又は複数の配列番号55～113 (配列番号8の免疫原性断片)、

(3) 配列番号6のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質及び配列番号10のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、

(4) 1つ又は複数の配列番号20～54 (配列番号6の免疫原性断片) 及び1つ又は複数の配列番号114～172 (配列番号10の免疫原性断片)、

(5) 配列番号8のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン及び配列番号10のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、

50

(6) 1つ又は複数の配列番号55～113 (配列番号8の免疫原性断片) 及び1つ又は複数の配列番号114～172 (配列番号10の免疫原性断片)、

(7) 配列番号6のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質、配列番号8のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、及び配列番号10のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、又は

(8) 1つ又は複数の配列番号20～54 (配列番号6の免疫原性断片)、1つ又は複数の配列番号55～113 (配列番号8の免疫原性断片)、及び1つ又は複数の配列番号114～172 (配列番号10の免疫原性断片)、を含むHBV配列、及びC末端HSV gDタンパク質配列又はその変異体を含む融合タンパク質。

10

実施形態36. N末端HSV gD配列又はその変異体、配列番号180のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片、又は配列番号183のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質、及びC末端HSV gD配列又はその変異体を含む融合タンパク質。

実施形態37. N末端HSV gD配列又はその変異体、配列番号178のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片、又は配列番号181のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、及びC末端HSV gDタンパク質配列又はその変異体を含む融合タンパク質。

実施形態38. N末端HSV gD配列又はその変異体、配列番号179のアミノ酸配列若しくはその免疫原性断片、又は配列番号182のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及びC末端HSV gDタンパク質配列又はその変異体を含む融合タンパク質。

20

実施形態39. N末端HSV gD配列又はその変異体、

(1) 配列番号178のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、配列番号179のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び配列番号180のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質、又は

(2) 配列番号181のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、配列番号182のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び配列番号183のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質を含むHBV配列、及び

30

C末端HSV gDタンパク質配列又はその変異体を含む融合タンパク質。

実施形態40. このHBV配列は、配列番号178のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、配列番号179のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び配列番号180のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質を含む、実施形態39に記載の融合タンパク質。

40

実施形態41. このHBV配列は、配列番号174のアミノ酸配列を含む、実施形態40に記載の融合タンパク質。

実施形態42. このHBV配列は、配列番号181のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼN末端ドメイン、配列番号182のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVポリメラーゼC末端ドメイン、及び配列番号183のアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含むHBVコアタンパク質を含む、実施形態39に記載の融合タンパク質。

実施形態43. HBV配列は、配列番号175のアミノ酸配列を含む、実施形態42に記載の融合タンパク質。

実施形態44. このN末端HSV gD配列は、配列番号12のアミノ酸配列を含む、

50

実施形態 29～43 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

実施形態 45 . N 末端 H S V g D 配列は、配列番号 12 のアミノ酸残基 26～269 を含む、実施形態 29～43 のいずれか 1 つを含む融合タンパク質。

実施形態 46 . C 末端 H S V g D 配列は、H S V g D の膜貫通ドメインを含む、実施形態 29～45 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

実施形態 47 . C 末端 H S V g D 配列は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む、実施形態 29～46 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

実施形態 48 . この融合タンパク質は、配列番号 14 若しくはその免疫原性断片、配列番号 16 若しくはその免疫原性断片、又は配列番号 18 若しくはその免疫原性断片のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、実施形態 29～47 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

10

実施形態 49 . この融合タンパク質は、配列番号 185 のアミノ酸配列を含む、実施形態 39～47 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

実施形態 50 . この融合タンパク質は、配列番号 187 のアミノ酸配列を含む、実施形態 39～47 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質。

実施形態 51 . 実施形態 23～50 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

実施形態 52 . この核酸分子は、配列番号 15、17、又は 19 のいずれか 1 つに記載の核酸配列を含む、実施形態 51 に記載の核酸分子。

実施形態 53 . この核酸分子は、配列番号 176 の核酸配列を含む、実施形態 51 に記載の核酸分子。

20

実施形態 54 . この核酸分子は、配列番号 177 の核酸配列を含む、実施形態 51 に記載の核酸分子。

実施形態 55 . この核酸分子は、配列番号 184 の核酸配列を含む、実施形態 51 に記載の核酸分子。

実施形態 56 . この核酸分子は、配列番号 186 の核酸配列を含む、実施形態 51 に記載の核酸分子。

実施形態 57 . 実施形態 51～56 のいずれか 1 つに記載の核酸分子を含むベクター。

実施形態 58 . このベクターは、アデノウイルスベクターである、実施形態 57 に記載のベクター。

30

実施形態 59 . このアデノウイルスベクターは、A d C 6 ベクター又は A d C 7 ベクターである、実施形態 58 に記載のベクター。

実施形態 60 . 実施形態 57～59 のいずれか 1 つに記載のベクターを含むワクチン。

実施形態 61 . 被験体に H B V に対する免疫応答を誘導する方法であって、この方法は、この被験体に有効量の実施形態 23～50 のいずれか 1 つに記載の融合タンパク質、実施形態 51～56 のいずれか 1 つに記載の核酸分子、実施形態 57～59 のいずれか 1 つに記載のベクター、又は実施形態 60 に記載のワクチンを提供して、これにより H B V に対する免疫応答を誘導することを含む、方法。

実施形態 62 . このワクチンは、配列番号 14、16、又は 18 のいずれか 1 つのアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む融合タンパク質を含む A d C 6 ベクターを含む、実施形態 61 に記載の方法。

40

実施形態 63 . この被験体に、A d C 6 ベクターを含むワクチンを提供することに続けて、配列番号 14、16、又は 18 のいずれか 1 つのアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む融合タンパク質を含む A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することをさらに含む、実施形態 62 に記載の方法。

実施形態 64 . このワクチンは、配列番号 14、16、又は 18 のいずれか 1 つのアミノ酸配列又はその免疫原性断片を含む融合タンパク質を含む A d C 7 ベクターを含む、実施形態 61 に記載の方法。

実施形態 65 . この被験体に、A d C 7 ベクターを含むワクチンを提供することに続けて、配列番号 14、16、又は 18 のいずれか 1 つのアミノ酸配列又はその免疫原性断片

50

を含む融合タンパク質を含むA d C 6ベクターを含むワクチンを提供することをさらに含む、実施形態64に記載の方法。

実施形態66. このワクチンは、配列番号185のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 6ベクターを含む、実施形態61に記載の方法。

実施形態67. この被験体に、このA d C 6ベクターを含むワクチンを提供することによって、配列番号185のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 7ベクターを含むワクチンを提供することをさらに含む、実施形態66に記載の方法。

実施形態68. このワクチンは、配列番号185のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 7ベクターを含む、実施形態61に記載の方法。

実施形態69. この被験体に、このA d C 7ベクターを含むワクチンを提供することによって、配列番号185のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 6ベクターを含むワクチンを提供することをさらに含む、実施形態68に記載の方法。

実施形態70. このワクチンは、配列番号187のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 6ベクターを含む、実施形態61に記載の方法。

実施形態71. この被験体に、このA d C 6ベクターを含むワクチンを提供することによって、配列番号187のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 7ベクターを含むワクチンを提供することをさらに含む、実施形態70に記載の方法。

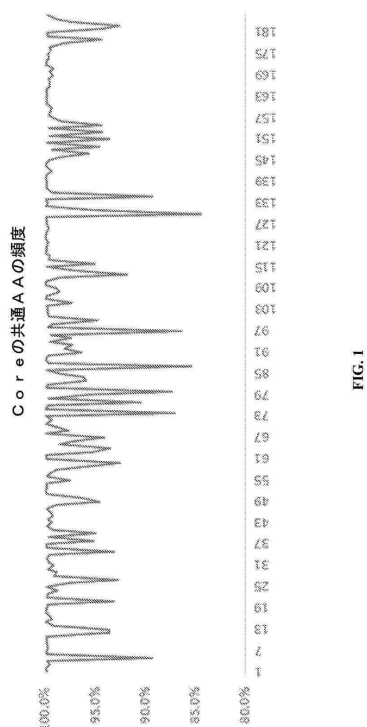
実施形態72. このワクチンは、配列番号187のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 7ベクターを含む、実施形態61に記載の方法。

実施形態73. この被験体に、このA d C 7ベクターを含むワクチンを提供することによって、配列番号187のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含むA d C 6ベクターを含むワクチンを提供することをさらに含む、実施形態72に記載の方法。

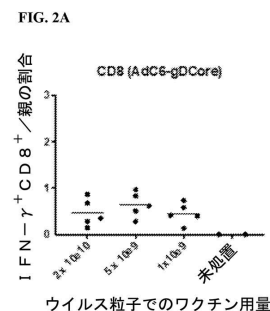
実施形態74. 配列番号14、16、18、185、若しくは187のいずれか1つのアミノ酸配列又はその免疫原性断片は、N末端の25個のアミノ酸シグナルペプチドを含まない、実施形態61～73のいずれか1つに記載の方法。

【図面】

【図1】



【図2A】



10

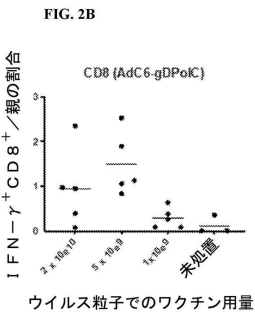
20

30

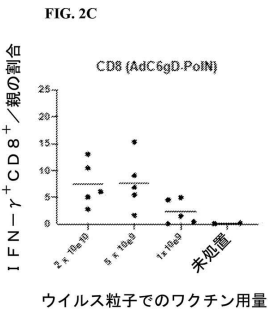
40

50

【図 2 B】

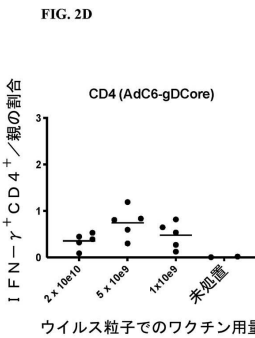


【図 2 C】

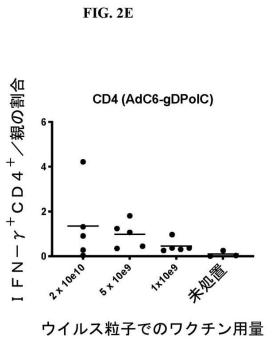


10

【図 2 D】



【図 2 E】



20

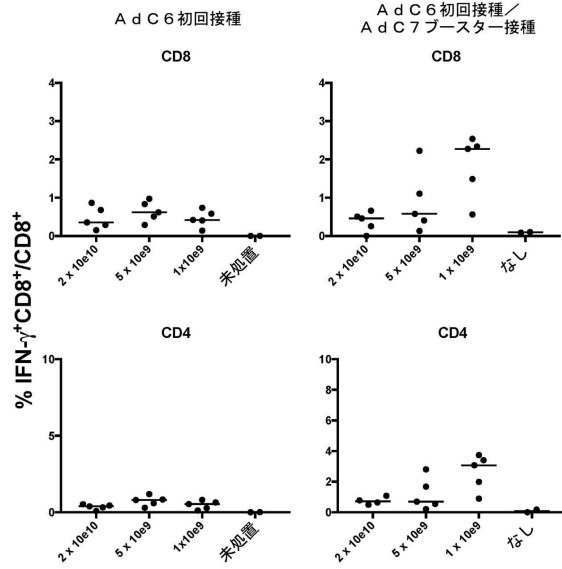
30

40

50

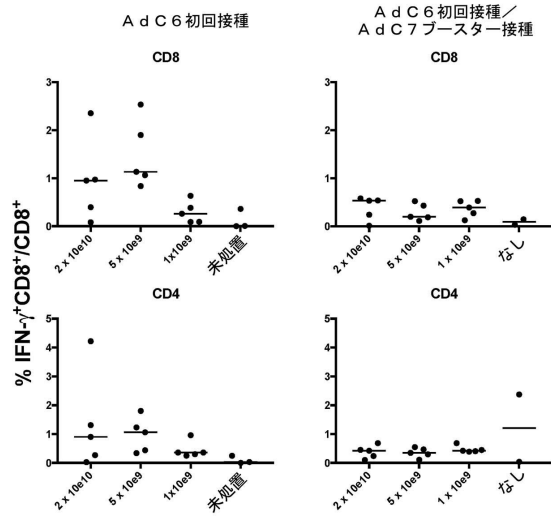
【図 4 A】

FIG. 4A



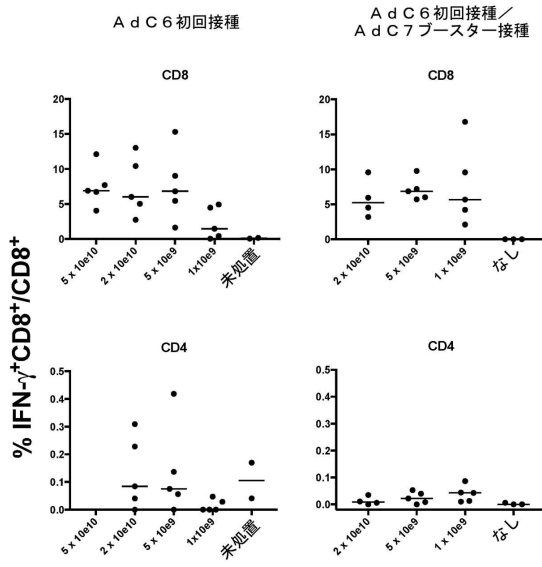
【図 4 B】

FIG. 4B



【図 4 C】

FIG. 4C



【図 5 A】

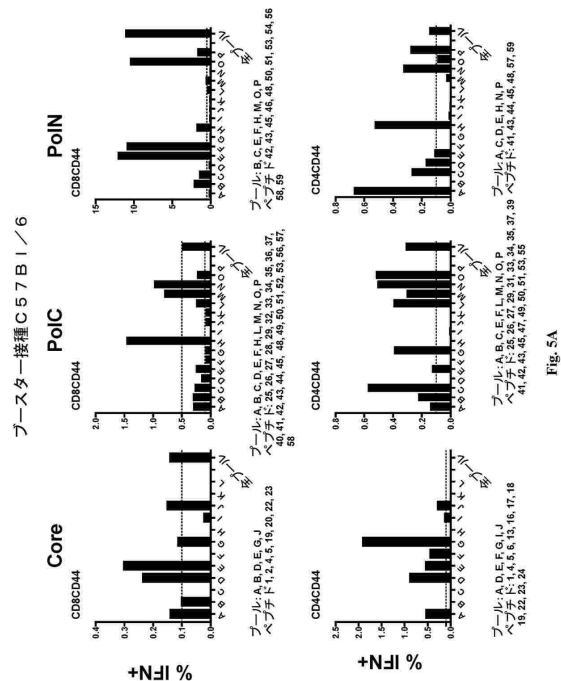


Fig. 5A

10

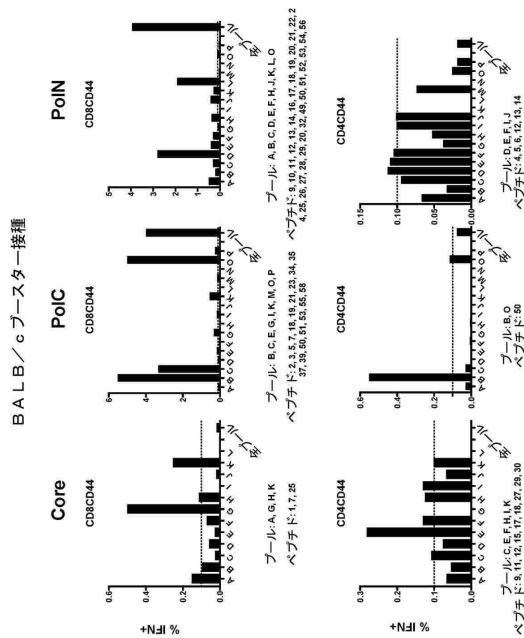
20

30

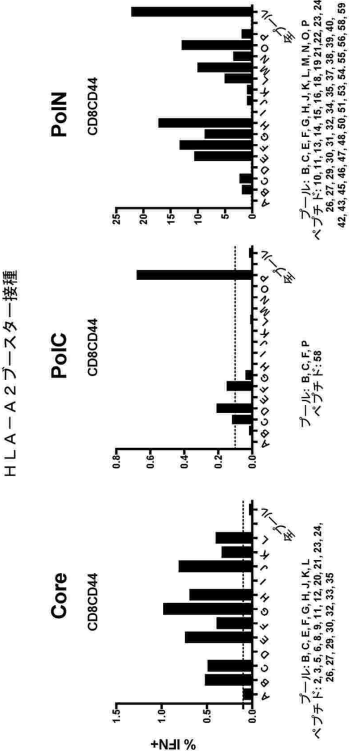
40

50

【図 5 B】

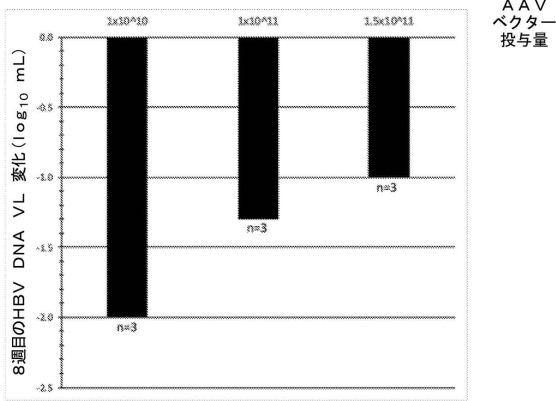


【図 5 C】



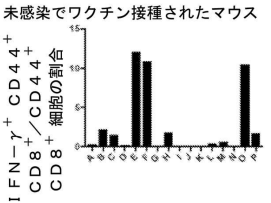
【図 6】

FIG. 6



【図 7 A】

FIG. 7A



10

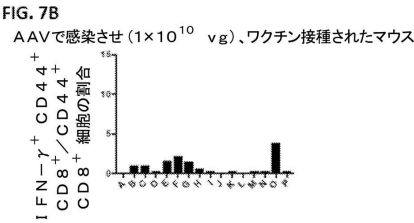
20

30

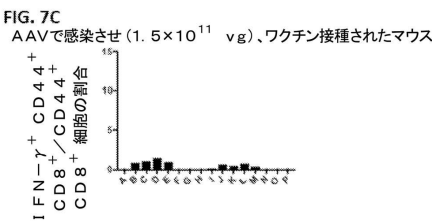
40

50

【図 7 B】



【図 7 C】



【図 7 D】

FIG. 7D プール中のペプチド

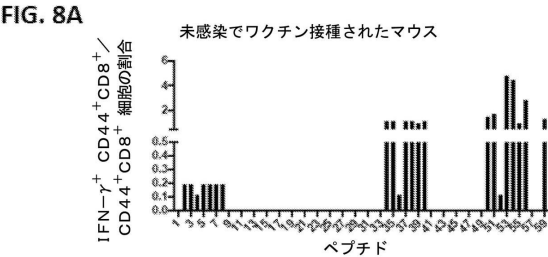
	A	B	C	D	E	F	G	H
X	1	2	3	4	5	6	7	8
Y	9	10	11	12	13	14	15	16
K	17	18	19	20	21	22	23	24
L	25	26	27	28	29	30	31	32
M	33	34	35	36	37	38	39	40
N	41	42	43	44	45	46	47	48
O	49	50	51	52	53	54	55	56
P	57	58	59					

【図 7 E】

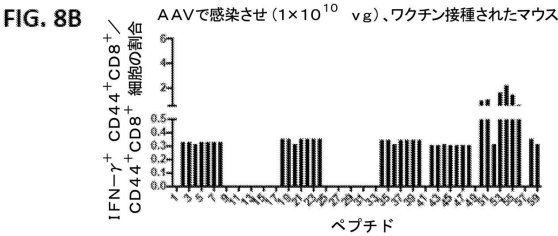
FIG. 7E

1	PLSYQ HFRKL LLLDE
2	HFRKL LLLDE EAGPL
3	LLLDE EAGPL EEELP
4	EAGPL EEELP RLADE
5	EEELP RLADE GLNRR
6	RLADE GLNRR VAEDL
7	GLNRR VAEDL NLGNL
8	VAEDL NLGNL NVSIP
9	NLGNL NVSIP WTHKV
10	NVSIP WTHKV GNFTG
11	WTHKV GNFTG LYSST
12	GNFTG LYSST VPFVN
13	LYSST VPFVN FEWQT
14	VPFVN FEWQT PSFPK
15	FEWQT PSFPK IHLQE
16	PSFPK IHLQE DIVDR
17	IHLQE DIVDR CKQFV
18	DIVDR CKQFV GPLTV
19	CKQFV GPLTV NEKRR
20	GPLTV NEKRR LKLIM
21	NEKRR LKLIM PARFY
22	LKLIM PARFY PNVTK
23	PARFY PNVTK YLPDL
24	PNVTK YLPDL KGILK
25	YLPDL KGILK YYPEH
26	KGILK YYPEH AVNHV
27	YYPEH AVNHV FQTRH
28	AVNHV FQTRH YLHTL
29	FQTRH YLHTL WKAGI
30	YLHTL WKAGI LYKRE
31	WKAGI LYKRE TTRSA
32	LYKRE TTRSA SFCGS
33	TTRSA SFCGS PYSWE
34	SFCGS PYSWE QELQH
35	PYSWE QELQH GSCWW
36	QELQH GSCWW LQFRN
37	GSCWW LQFRN SKPCS
38	LQFRN SKPCS EYCLT
39	SKPCS EYCLT HLVNL
40	EYCLT HLVNL LEDWG
41	HLVNL LEDWG PCDEH
42	LEDWG PCDEH GEHHI
43	PCDEH GEHHI RIPT
44	GEHHI RIPT PARVT
45	RIPT PARVT GGIVL
46	PARVT GGIVL VDKNP
47	GGIVL VDKNP HNTAE
48	VDKNP HNTAE SRLVV
49	HNTAE SRLVV DFSQF
50	SRLVV DFSQF SRGIT
51	DFSQF SRGIT RVSWP
52	SRGIT RVSWP KFAPV
53	RVSWP KFAPV NLQSL
54	KFAPV NLQSL TNLLS
55	NLQSL TNLLS SNLSW
56	TNLLS SNLSW LSLDV
57	SNLSW LSLDV SAAFY
58	LSLDV SAAFY HIFPLH
59	SAAFYHIFPLHPAAMP

【図 8 A】



【図 8 B】



10

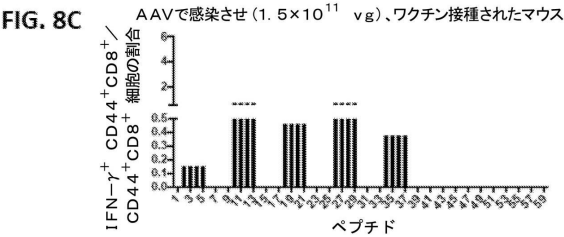
20

30

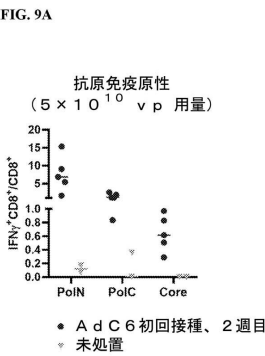
40

50

【図 8 C】

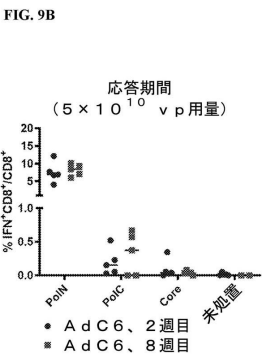


【図 9 A】

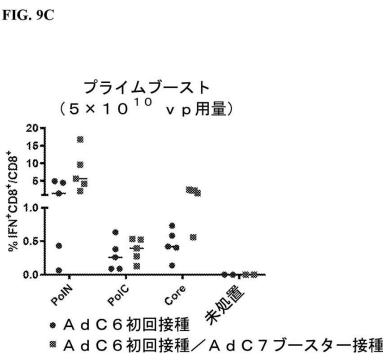


10

【図 9 B】



【図 9 C】



20

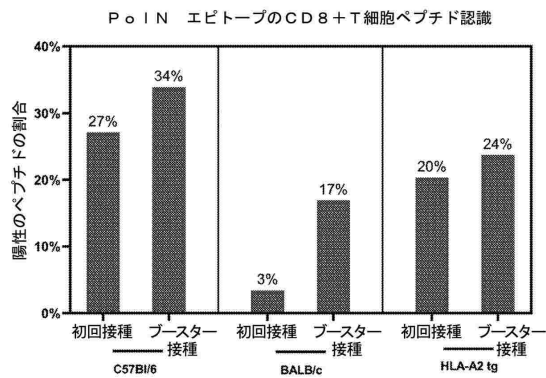
30

40

50

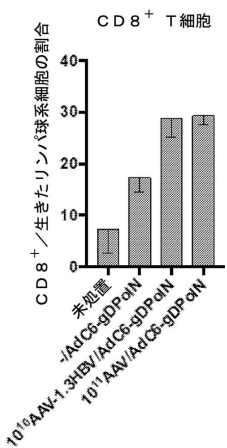
【図 1 0】

FIG. 10



【図 1 1 A】

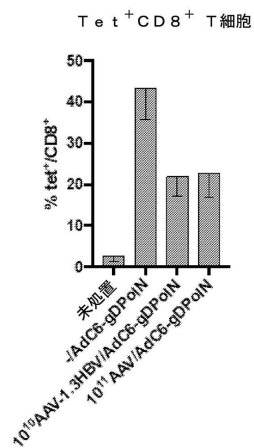
FIG. 11A



10

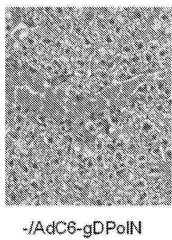
【図 1 1 B】

FIG. 11B



【図 1 2 A】

FIG. 12A



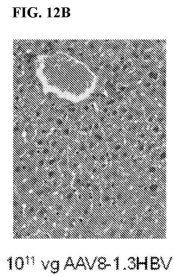
20

30

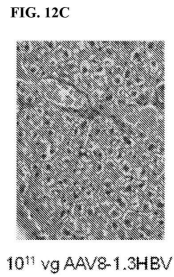
40

50

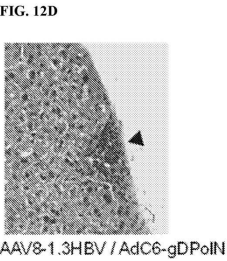
【図 1 2 B】



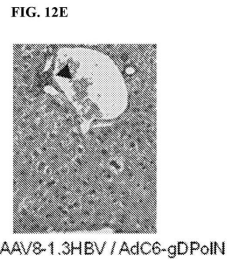
【図 1 2 C】



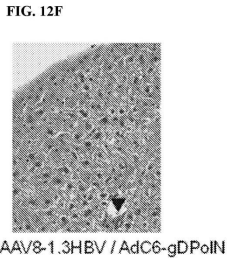
【図 1 2 D】



【図 1 2 E】

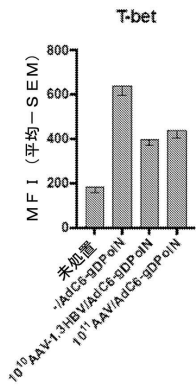


【図 1 2 F】



【図 1 3 A】

FIG. 13A



10

20

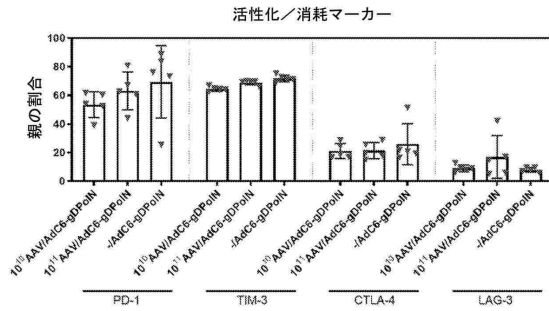
30

40

50

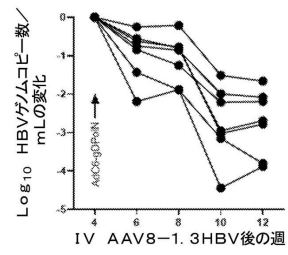
【図 1 3 B】

FIG. 13B



【図 1 4 A】

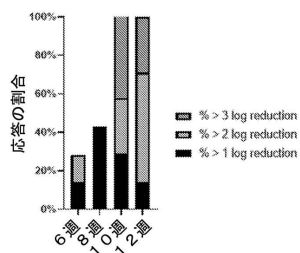
FIG. 14A



10

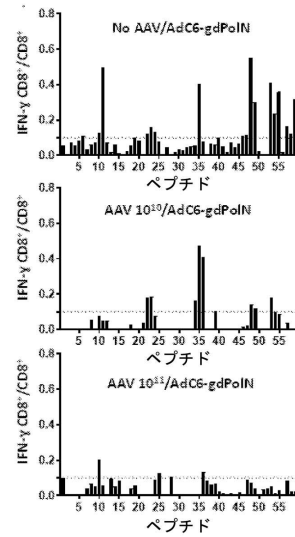
【図 1 4 B】

FIG. 14B



【図 1 5 A】

FIG. 15A



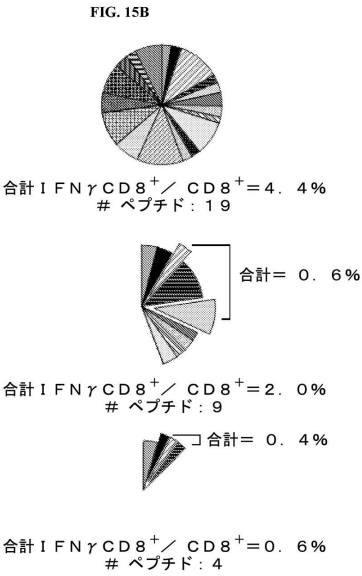
20

30

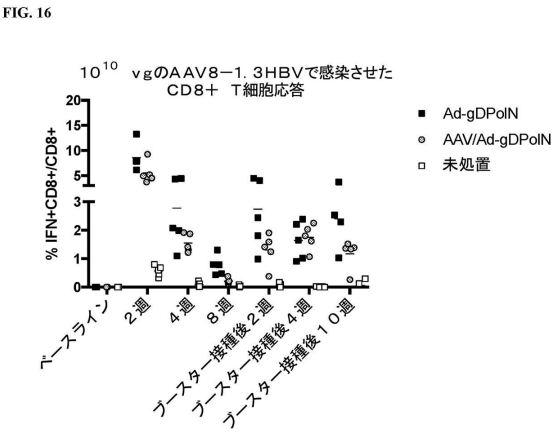
40

50

【図 15 B】

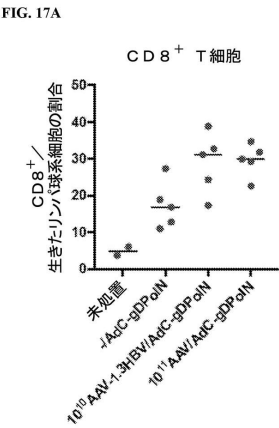


【図 16】

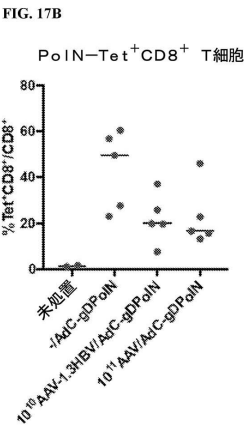


10

【図 17 A】



【図 17 B】



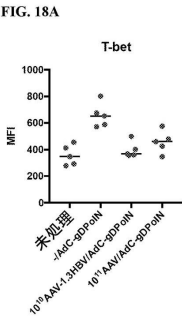
20

30

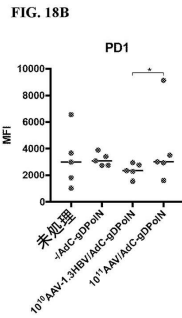
40

50

【図 18 A】

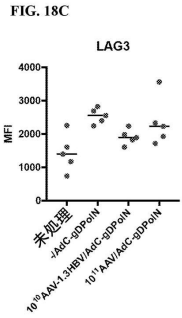


【図 18 B】

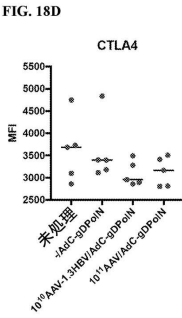


10

【図 18 C】

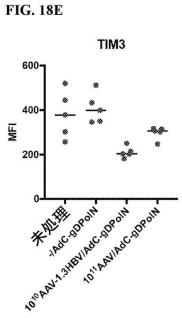


【図 18 D】

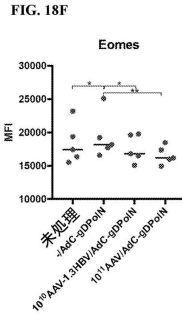


20

【図 18 E】



【図 18 F】



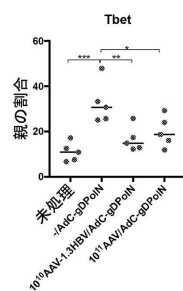
30

40

50

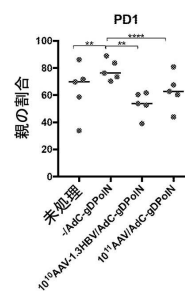
【図 19 A】

FIG. 19A



【図 19 B】

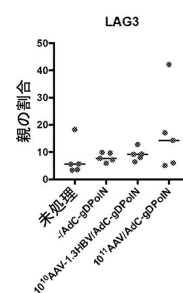
FIG. 19B



10

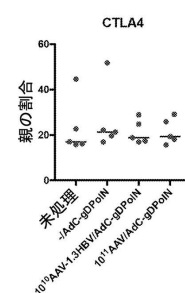
【図 19 C】

FIG. 19C



【図 19 D】

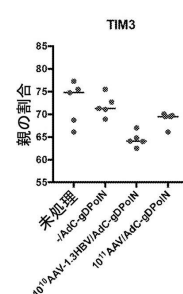
FIG. 19D



20

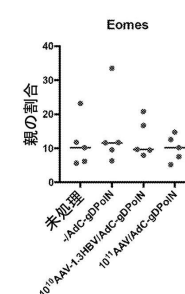
【図 19 E】

FIG. 19E



【図 19 F】

FIG. 19F



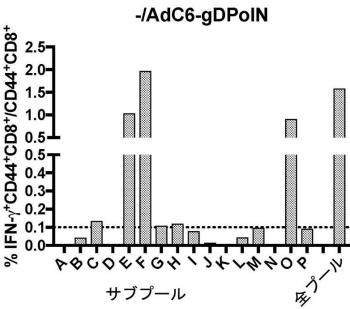
30

40

50

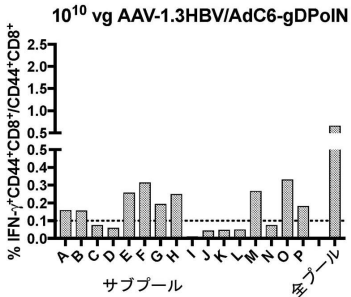
【図 20 A】

FIG. 20A



【図 20 B】

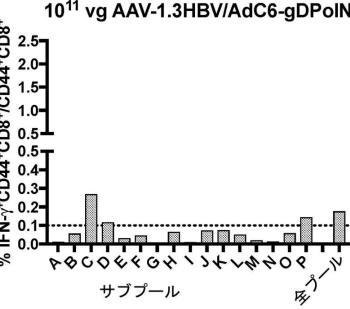
FIG. 20B



10

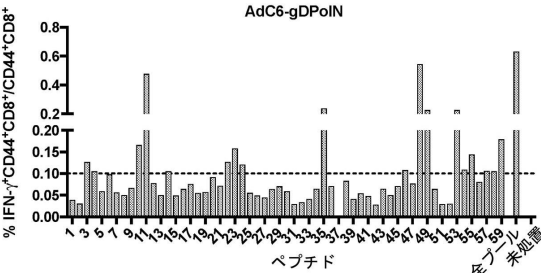
【図 20 C】

FIG. 20C



【図 20 D】

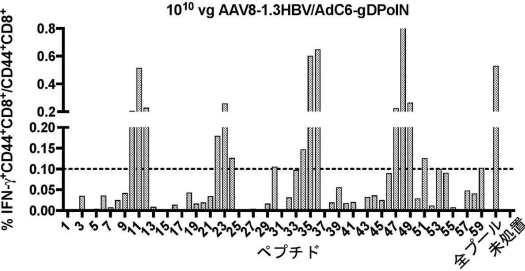
FIG. 20D



20

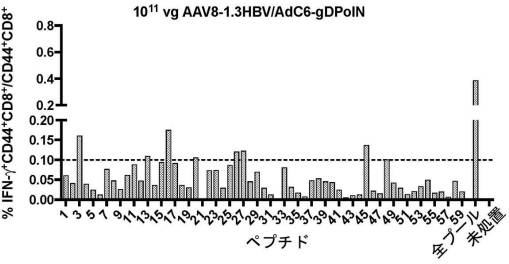
【図 20 E】

FIG. 20E



【図 20 F】

FIG. 20F



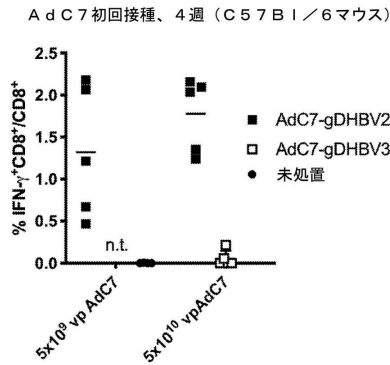
30

40

50

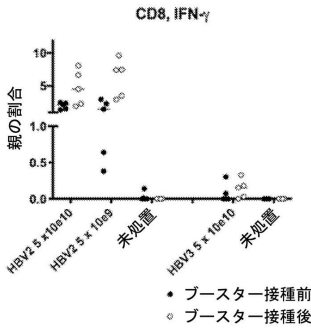
【図 2 3】

FIG. 23



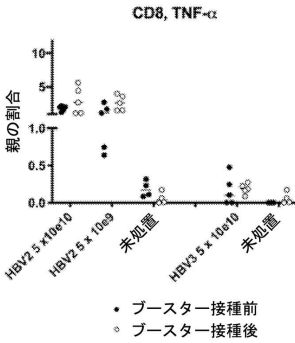
【図 2 4 A】

FIG. 24A



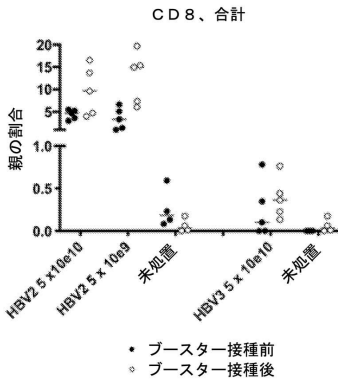
【図 2 4 B】

FIG. 24B



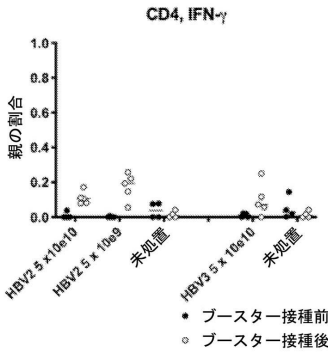
【図 2 4 C】

FIG. 24C



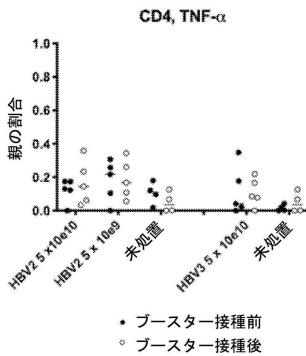
【図 2 4 D】

FIG. 24D



【図 2 4 E】

FIG. 24E



10

20

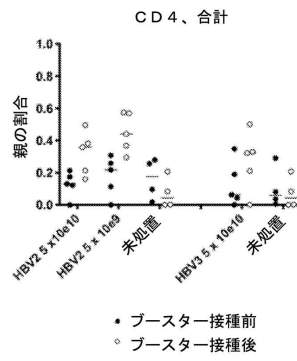
30

40

50

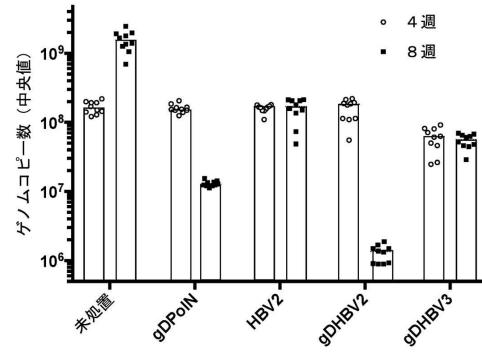
【図 2 4 F】

FIG. 24F



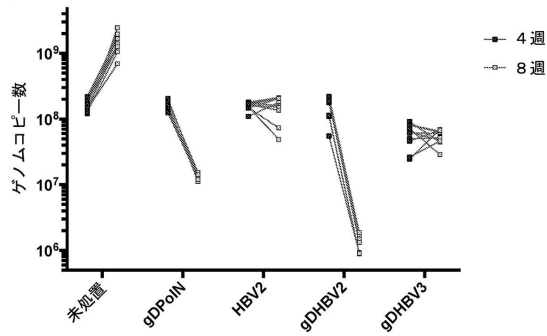
【図 2 5 A】

FIG. 25A



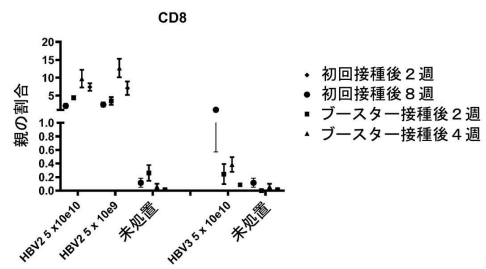
【図 2 5 B】

FIG. 25B



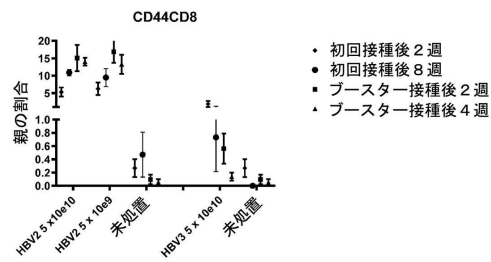
【図 2 6 A】

FIG. 26A



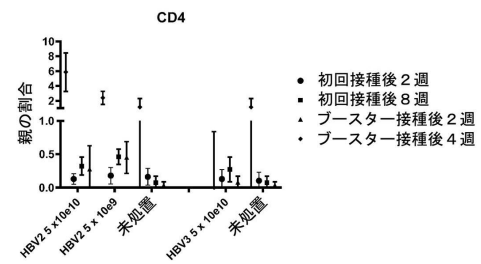
【図 2 6 B】

FIG. 26B



【図 2 6 C】

FIG. 26C



10

20

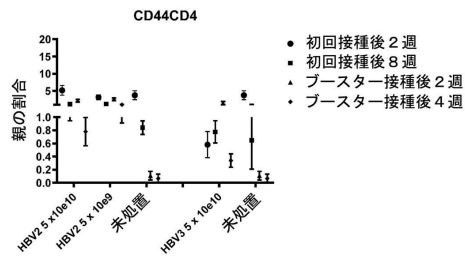
30

40

50

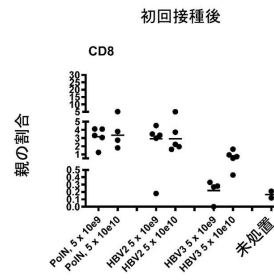
【図 26 D】

FIG. 26D



【図 27 A】

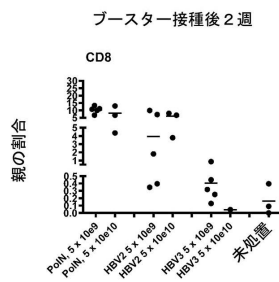
FIG. 27A



10

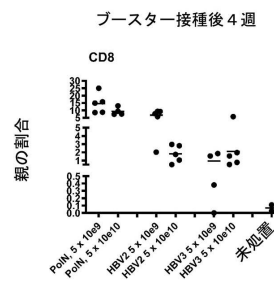
【図 27 B】

FIG. 27B



【図 27 C】

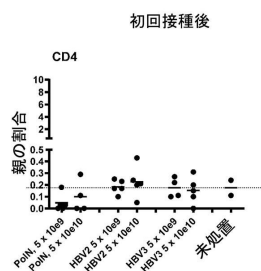
FIG. 27C



20

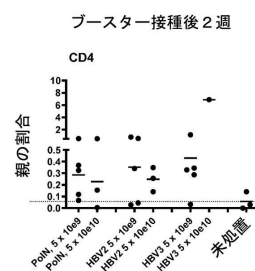
【図 28 A】

FIG. 28A



【図 28 B】

FIG. 28B



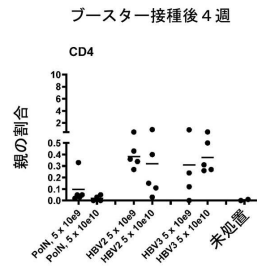
30

40

50

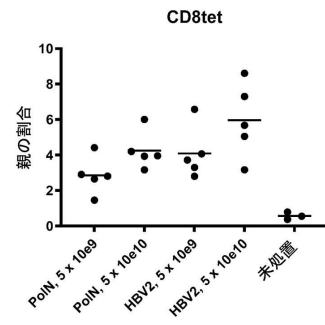
【図 28 C】

FIG. 28C



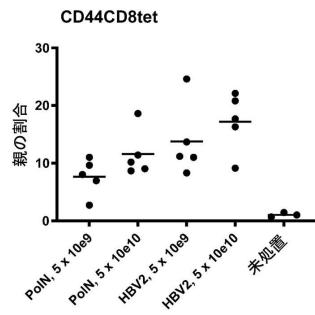
【図 29 A】

FIG. 29A



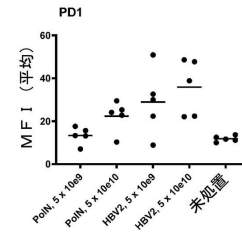
【図 29 B】

FIG. 29B



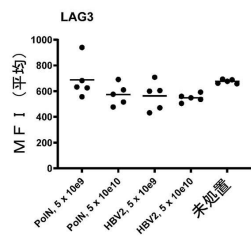
【図 30 A】

FIG. 30A



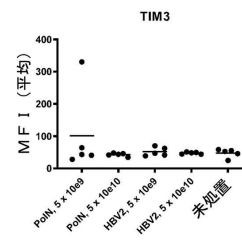
【図 30 B】

FIG. 30B



【図 30 C】

FIG. 30C



10

20

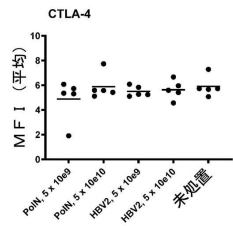
30

40

50

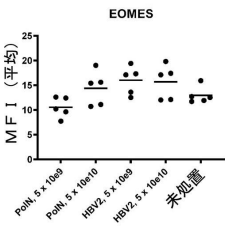
【図 30 D】

FIG. 30D



【図 30 E】

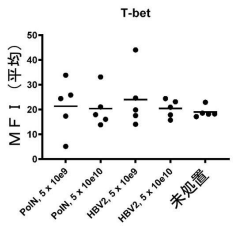
FIG. 30E



10

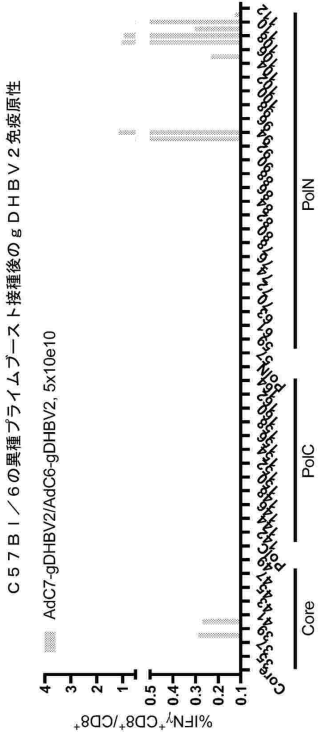
【図 30 F】

FIG. 30F



【図 31】

FIG. 31



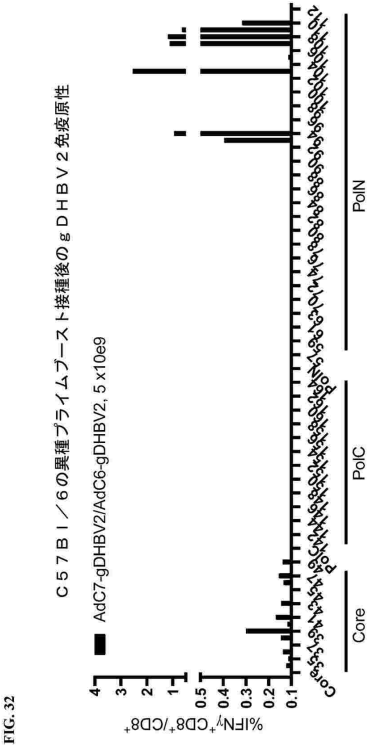
20

30

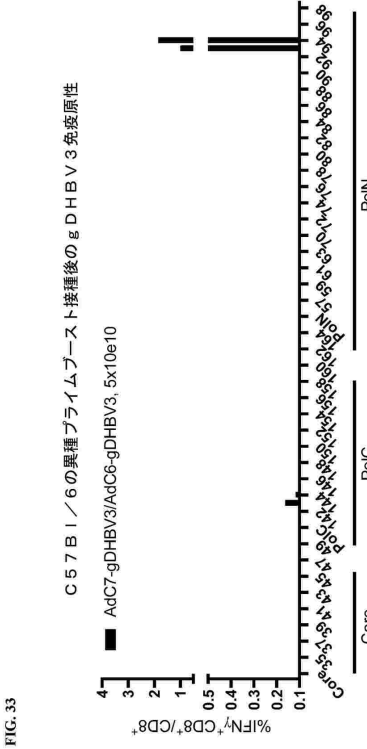
40

50

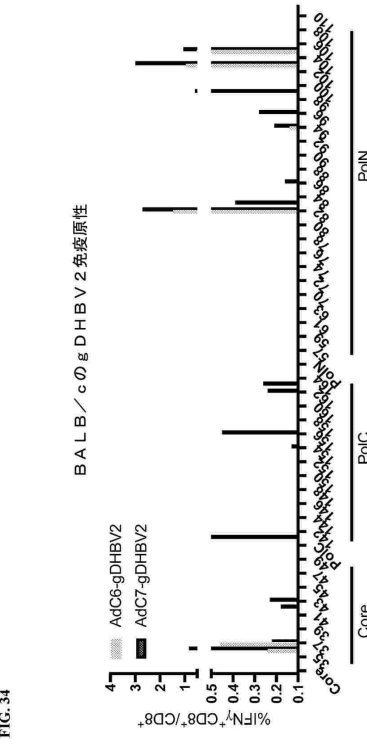
【図 3 2】



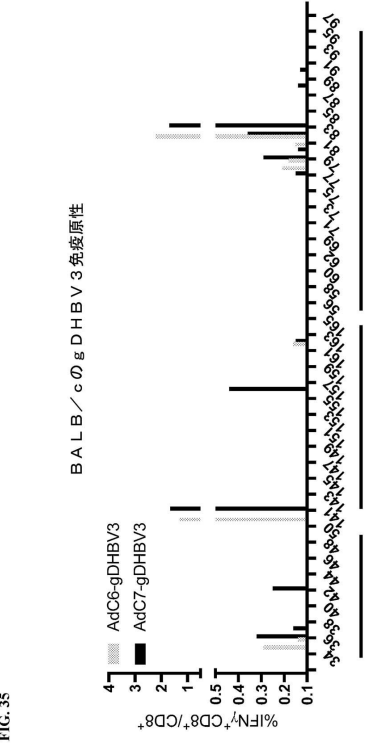
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007696909000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 P	31/20 (2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/967,104

(32)優先日 令和2年1月29日(2020.1.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/967,242

(32)優先日 令和2年1月29日(2020.1.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/064,506

(32)優先日 令和2年8月12日(2020.8.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/064,571

(32)優先日 令和2年8月12日(2020.8.12)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/112,202

(32)優先日 令和2年11月11日(2020.11.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/112,219

(32)優先日 令和2年11月11日(2020.11.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ヒルデガンド シージェイ アートル

アメリカ合衆国, ペンシルベニア 1 9 1 0 4, フィラデルフィア, スプルース ストリート 3 6 0 1, シー／オー ザ ウィスター インスティテュート

(72)発明者 コリン スティーブン マゴワン

アメリカ合衆国, デラウェア 1 9 7 1 1, ニューアーク, クリーク ベンド コート 7, シー／オー ビリオン セラピューティクス, リミティド ライアビリティ カンパニー

審査官 福澤 洋光

-
- (56)参考文献 特表2014-507144 (JP, A)
 米国特許出願公開第2007/0054262 (US, A1)
 Vaccine, 1993年, Vol.11, No.12, pp.1191-1198
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
- C12N 1/00-15/90
 C07K 1/00-19/00
 CAplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 PubMed