

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7635198号
(P7635198)

(45)発行日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(24)登録日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	39/29 (2006.01)	A 6 1 K	39/29
A 6 1 P	31/20 (2006.01)	A 6 1 P	31/20
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	31/675(2006.01)	A 6 1 K	31/675
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00
		1 2 1	
		請求項の数 21 (全53頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2022-502118(P2022-502118)	(73)特許権者	523257196
(86)(22)出願日	令和2年6月30日(2020.6.30)		カイミ バイオメディシン (チェンドウ)
(65)公表番号	特表2022-542225(P2022-542225 A)		カンパニー リミテッド
(43)公表日	令和4年9月30日(2022.9.30)		中華人民共和国, シーチュアン 6 1 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/040272		2 1 9 チェンドウ チェンドウ ティア
(87)国際公開番号	WO2021/007070		ンフ インターナショナル バイオータウ
(87)国際公開日	令和3年1月14日(2021.1.14)		ン シェンウチェン ミドル ロード ナン
審査請求日	令和4年1月24日(2022.1.24)		バー 1 8
(31)優先権主張番号	62/871,891	(74)代理人	100079108
(32)優先日	令和1年7月9日(2019.7.9)		弁理士 稲葉 良幸
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100109346
前置審査			弁理士 大貫 敏史
		(74)代理人	100117189
			弁理士 江口 昭彦
		(74)代理人	100134120
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ウィルス感染治療用キメラ抗原

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原および宿主におけるHBVレベルを低下させる治療剤を含む、宿主におけるHBV感染を治療するための組成物であって、

前記治療剤は、HBV（ヒトB型肝炎ウイルス）抗ウイルス剤であり、

前記宿主は、ヒトであり、

前記治療剤および前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原は、前記治療の0、21、42日目に投与されるように、2週間おきに1回投与されるという間隔で3回投与され、前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原の投与量は0.498mg／ヒトであり、前記治療剤の投与量は0.0705mg／kg-0.0767mg／kgであり、

前記HBV抗ウイルス剤が、テノホビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩、テノホビルアラフェナミド、エンテカビル、テルビブジン、アデホビルジピボキシルおよびラミブジンよりなる群から選ばれるいずれか一種以上の化合物を含む、組成物。

【請求項 2】

前記HBV抗ウイルス剤が、HBV複製を阻害するHBV抗ウイルスRNAi剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記HBV抗ウイルス剤が、コアカプシド集合阻害剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記HBV抗ウイルス剤が、Toll様受容体（TLR）アゴニストをさらに含む、ことを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物は免疫調節剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

前記免疫調節剤が、ペグインターフェロンアルファ-2aなどのインターフェロンである、ことを特徴とする請求項5に記載の組成物。

【請求項 7】

前記免疫調節剤が、PD1/PDL1阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤である、ことを特徴とする請求項5に記載の組成物。

【請求項 8】

HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原および宿主におけるHBVレベルを低下させる治療剤と、

前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原および前記治療剤を前記宿主に投与することにより、前記宿主におけるHBV感染を治療するための注意事項等情報を有する添付文書またはラベルと、を含む、宿主におけるHBV感染を治療するためのキットであって、

前記治療剤は、HBV（ヒトB型肝炎ウイルス）抗ウイルス剤であり、

前記宿主は、ヒトであり、

前記注意事項等情報は、前記治療剤および前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原が、前記治療の0、21、42日目に投与されるように、2週間おきに1回投与されるという間隔で3回投与され、前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原の投与量が0.498mg/ヒトであり、前記治療剤の投与量が0.0705mg/kg-0.0767mg/kgであるという使用および取扱い上の注意事項を含み、

前記治療剤および前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原が、前記注意事項等情報に従って投与され、

前記HBV抗ウイルス剤が、テノホビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩、テノホビルアラフェナミド、エンテカビル、テルビブジン、アデホビルジピボキシルおよびラミブジンよりなる群から選ばれるいずれか一種以上の化合物を含む、キット。

【請求項 9】

前記HBV抗ウイルス剤が、HBV複製を阻害するHBV抗ウイルスRNAi剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項 10】

前記HBV抗ウイルス剤が、コアカプシド集合阻害剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項 11】

前記HBV抗ウイルス剤が、Toll様受容体（TLR）アゴニストをさらに含む、ことを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項 12】

免疫調節剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項8に記載のキット。

【請求項 13】

前記免疫調節剤が、ペグインターフェロンアルファ-2aなどのインターフェロンである、ことを特徴とする請求項12に記載のキット。

【請求項 14】

前記免疫調節剤が、PD1/PDL1阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤である、ことを特徴とする請求項12に記載のキット。

【請求項 15】

HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原および宿主におけるHBVレベルを低下させるための治療剤の、宿主におけるHBV感染を治療するための組成物の製造における

10

20

30

40

50

使用であって、

前記治療剤は、HBV（ヒトB型肝炎ウイルス）抗ウイルス剤であり、

前記宿主は、ヒトであり、

前記治療剤および前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原は、前記治療の0、21、42日目に投与されるように、2週間おきに1回投与されるという間隔で3回投与され、前記HBV Core-異種型Fc断片キメラ抗原の投与量が0.498mg／ヒトであり、前記治療剤の投与量が0.0705mg／kg-0.0767mg／kgであり、

前記HBV抗ウイルス剤が、テノホビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩、テノホビルアラフェナミド、エンテカビル、テルビブジン、アデホビルジピボキシルおよびラミブジンよりなる群から選ばれるいずれか一種以上の化合物を含む、使用。

10

【請求項16】

前記HBV抗ウイルス剤が、HBV複製を阻害するHBV抗ウイルスRNAi剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項15に記載の使用。

【請求項17】

前記HBV抗ウイルス剤が、コアカプシド集合阻害剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項15に記載の使用。

【請求項18】

前記HBV抗ウイルス剤が、Toll様受容体（TLR）アゴニストをさらに含む、ことを特徴とする請求項15に記載の使用。

20

【請求項19】

免疫調節剤をさらに含む、ことを特徴とする請求項15に記載の使用。

【請求項20】

前記免疫調節剤が、ペグインターフェロンアルファ-2aなどのインターフェロンである、ことを特徴とする請求項19に記載の使用。

【請求項21】

前記免疫調節剤が、PD1／PDL1阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤である、ことを特徴とする請求項19に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、HBV特異的T細胞および抗体反応を誘導するために抗原提示細胞（antigen presenting cells；APC）を標的化かつ活性化させることにより、HBV抗原に対する宿主耐性を破るキメラ抗原の用途に関する。

【背景技術】

【0002】

ウイルス感染症は、主な公衆医療の問題である。ヒトB型肝炎ウイルス（HBV）は、主として肝臓を感染させるDNAウイルス科の一つである（Gust, 1986）。この科の他の一員としては、ウッドチャックB型肝炎ウイルス（Woodchuck hepatitis virus；WHV, Summers et al., 1978）、アヒルB型肝炎ウイルス（Duck hepatitis virus；DHBV, Mason et al., 1980）およびサギB型肝炎ウイルス（Heron hepatitis B virus；HHBV, Sprengel et al., 1988）が挙げられる。これらのウイルスは、形態と複製機序が同一であるものの、感染性に異なる種特異性を有している（Marion, 1988）。

40

【0003】

HBVは、主として肝細胞を感染させ、肝硬変症と肝細胞癌を誘発する急性および慢性の肝疾患を引き起こす。感染は、血液と他の体液によって起こる。HBVに感染された成人の約9割は完治することができるが、残りの1割は、肝硬変症や肝細胞癌に発展する可能性が高い慢性ウイルス保菌者になる（Block, 2016）。世界保健機構の統計

50

によれば、20億人を超える人々がHBVに感染されており、その中で3億5千万人はウイルスに慢性的に感染される（Beasley, 1988; Lau and Wright, 1993）。HBV表面抗原（HbsAg）に基づく予防的なワクチンは、HBV感染に対抗して防御免疫を形成する上で極めて有効である。これらのワクチンは、慢性HBV保菌者の血漿において精製されたHbsAgから発展したものであり、DNA組換え技術と合成ペプチドの利用を通して製造された（米国特許第4,599,230号と第4,599,231号を参照）。これらは、感染の予防には極めて有効であるものの、すでに形成された慢性的な感染の根絶には決して有効ではない。

【0004】

ヒトB型肝炎ウイルス（HBV）は、ヘパドナウイルス科に属する（Mason et al., 1980）。この科の他の一員としては、アヒルB型肝炎ウイルス（DHBV）、ウッドチャック肝炎ウイルス（WHV）、地リスB型肝炎ウイルス（GSHV）、およびサギB型肝炎ウイルス（HHBV）が挙げられる。これらのウイルスは、類似の形態と複製機序を示すものの、非常に密接に関連している種のみを感染させるなど、結果的にはそれぞれ異なる種特異性を有している。これらは、3.0から3.2Kbまでの範囲の大きさであるDNAゲノムを有しており、いくつかのタンパク質を符号化する読み枠（リーディングフレーム）が重なり合う。HBVゲノムは、いくつかのタンパク質を符号化する。これらの中で、表面抗原大（S1/S2/S）、中（S2/S）、小（S）の抗原が吸収のためのウイルスと細胞受容体の結合に与る。コアタンパク質（Core）は、カプシドを形成するが、このカプシドは、部分的な二本鎖DNAゲノムを取り囲む。重合／逆転写酵素（Polymerase/Reverse Transcriptase; Pol）タンパク質は、ウイルスの複製に必要な多機能的酵素である。Xタンパク質は、Srcキナーゼ（Src kinases）の活性化など多くの特性を有している（Ganem and Schneider, 2001）。本発明は、キメラ抗原融合タンパク質であるHBV S1断片/S2断片/コアタンパク質とネズミ（異種型）Mab Fc断片を他のHBV抗ウイルス剤と組み合わせて用いる用途について述べる。

【0005】

ヘパドナウイルス科の他の一員であるDHBVは、北京種アヒルを感染させて慢性DHBV感染を招く。このウイルスは、種特異的であり、B型肝炎ウイルスへの取り組みのための動物モデルとして用いられてきた。DHBVは、DNAゲノムを有し、表面抗原PreSとPreS/S、コアタンパク質と重合／逆転写酵素を符号化する。

【0006】

健康な宿主（ヒトもしくは動物）が抗原（バクテリア、ウイルス、および／または寄生虫由来のタンパク質など）に接触すれば、普通、宿主は免疫反応を開始する。この免疫反応は、体液反応および／または細胞反応であってもよい。体液反応においては、抗原刺激に対抗してB細胞が抗体を形成し、血液および／またはリンパ液に分泌される。抗体は、特に、抗原を抗体の表面に結び付ける方法で抗原（例えば、ウイルス）を中性化させ、貪食細胞および／または補体媒介（complement-mediated）機序による崩壊のための標識とする。細胞反応は、抗原を含む細胞を直接的に除去ようにヘルパーTーリンパ球と細胞毒性Tーリンパ球を選別と拡張できることを特徴とする。

【0007】

多くの個体において免疫反応は特定の抗原に反応しない。抗原が特定の抗体および／またはキラーT細胞の生成を刺激しないとき、免疫体系は、その結果としてかかった疾病を防ぐことができない。その結果、感染体（例えば、ウイルス）は、慢性感染を形成することができ、宿主の免疫体系は、ウイルスが生成した抗原に耐性が生じることができる。ウイルスが免疫体系から逸脱する機序はまだ不明である。最もよく知られている慢性ウイルス感染の例としては、B型肝炎、C型肝炎、人体免疫欠乏ウイルス（HIV）、および単純ヘルペスウイルス（HSV）が挙げられる。

【0008】

ウイルス感染が慢性的な状態になると、ウイルスは宿主の免疫体系から逸脱する。ウィ

10

20

30

40

50

ルス抗原は、「自己細胞 (self)」として捉えられ、したがって、抗原提示細胞により捉えられない。抗原提示細胞は、抗原の位置に応じて遭遇した抗原を異なる方法で処理する (Steinman et al., 1999)。外因性抗原は、抗原提示細胞のエンドソームの内部において処理され、このときに生成されたペプチド断片は、主要組織適合性遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex; MHC) Class IIと複合化して、細胞の表面に提示される。この複合体をCD4+T細胞に提示すれば、CD4+Tヘルパー細胞を刺激することになる。その結果、ヘルパー細胞が分泌したサイトカインがB細胞を刺激して外因性抗原に対応して抗体を生成することになる (体液反応)。抗原を用いた免疫は、普通、このエンドソームの抗原処理過程を通して抗体反応を形成する。

10

【0009】

一方、細胞内抗原は、プロテアソームにより処理され、その結果として生成されるペプチド断片は、抗原提示細胞の表面においてMHC Class Iと複合化した複合体として提示される。この複合体が共受容体CD8分子と結合されることを受けて、CD8+T細胞への抗原の提示は、抗原を運ぶ宿主細胞を殺す細胞毒性T細胞 (Cytotoxic T cell; CTL) の免疫反応を招く。

【0010】

慢性ウイルス感染患者の場合、ウイルスが盛んに複製するため、ウイルス抗原が宿主細胞内において生成される。分泌された抗原は、体液循環系において循環する。例えば、慢性HBV保菌者の場合、ビリオンとHBV表面抗原、およびコア抗原 (e-抗原) を血液において観察することができる。効果的な治療ワクチンは、MHC Class I処理過程を活性化させるべく、細胞内の抗原や適切な細胞区画に送達された抗原に対するCTL反応を引き起こす。

20

【0011】

CTL反応を引き起こし得る治療ワクチンは、プロテアソーム経路を通して処理されることができ、MHC Class Iを通して提示される (Larsson et al., 2001)。これは、宿主細胞の内部において抗原を生成したり、適切な細胞区画に送達されたりして成し遂げることができるが、これは、処理されかつ提示されて細胞反応を誘導するためである。抗原を細胞の内部に送達するいくつかのアプローチが文献に記録されている。中でも、ウイルス媒介体 (Lorenz et al., 1999)、cDNAで感染させた細胞の利用法 (Donnelly et al., 1997)、cDNA媒体の注入を通じた抗原の発現 (Lai and Bennett, 1998; 米国特許第5, 589, 466号) などが報告された。慢性HBV感染を治療するためのいくつかの他のアプローチが文献に取り込まれている (Liang et al., 2015; Block et al., 2015; Block et al., 2018)。

30

【0012】

MHC Class I経路の処理のために細胞基質が仕切った区画に抗原を運べる送達担体もまたすでに用いられた。同一の目的を達成するための補助剤の用途についてもまた詳しく述べられている (Hilgers et al., 1999)。他のアプローチは、生分解性微細球体を抗原の細胞質の送達に用いることである (Newman et al., 2000)。これは、オボアルブミンペプチド (ovalbumin peptide) に対するTh1免疫反応生成の事例として挙げられた (Newman et al., 2000; Newman et al., 1998)。ほとんどの強力な抗原提示細胞と樹脂状細胞がPLGAナノ球体を吸収することもまた報告された (Newman et al., 2002)。

40

【0013】

血液単核細胞由来の樹脂状細胞 (dendritic cells; DCs) は、抗原提示細胞としての能力のおかげで、主なT細胞反応を刺激する免疫調節剤になりえる (Steinman et al., 1999; Banchereau and Steinman, 1998)。抗原を捕捉し、処理し、提示し、しかも、ナイーブT細胞を刺激

50

するユニークな特性のおかげで、DCは、治療ワクチンの開発のために非常に重要なツールとして位置づけられた(Laupezee et al., 1999)。抗原のDC標化は、抗原の提示において重要な段階であり、DCには、単一抗体のFc領域のために存在するいくつかの受容体があり、上記のような目的で用いられてきた(Regnault et al., 1999)。このアプローチの事例は、卵巣がんMab-B43.13抗体、抗前立腺特異抗原(prostate specific antigen; PSA)抗体はもとより、抗HBV抗体抗原複合体を含む(Wen et al., 1999)。腫瘍と関わる抗原を有するDCは、がんの免疫治療に用いられるが、このとき、腫瘍にのみ限定される免疫反応と抗腫瘍活性を生成したことが明らかになった(Campton et al., 2000; Fong and Engleman, 2000)。生体内において腫瘍抗原パルスDCを用いた臨床試験において希望的な結果を得ることができた(Tarte and Klein, 1999)。これらの研究は、DCを用いてがん抗原に対する免疫反応を生成することが効率的であるということを示唆する。

【0014】

ここ数年間でがんを治療するとき、積極的な免疫治療が適用されてきた。このアプローチの主な内容は、Pd-1とPD-L1を用いたプログラム細胞死(programmed cell death)の遮断であり、「免疫阻害剤」としてよく知られている。商業的に利用可能な製品は、黒色腫と非小細胞肺癌の治療に使われるペムブロリズマブ(Merck社製)を含む。これと同様に、ニボルマブ(Bristol-Myers Squibb社製)が黒色腫、扁平状被細胞肺癌、腎臓細胞がん、およびホジキンリンパ腫を治療できる承認を受けた。慢性HBV感染の治療にも類似のアプローチへの取り組みが行われ、かつ文献に報告された(Peng et al., 2008)。慢性HBV感染の治療のためのマウスモデルにおいて、Pd-1の遮断は、いくつかの免疫逆機能を取り戻すということが判明された(Tzeng, H. T et al., 2012; Fisicaro et al., 2010)。

【0015】

(Fc抗体断片とHBV抗原との融合である)キメラ抗原は、HBVに対応してHBV抗原特異的T細胞とB細胞性媒介免疫反応を導き出すことに有効であることを示し、かつ、慢性的な疾患の状態ではHBV抗原に対する耐性を破る(George et al., US patents, 8007805 B2, 8025873 B2, 8029803 B2, 8465745 B2, China patents 200480022747.1, India 225281, Japan 5200201, Korea 10-1327719, New Zealand 545048, Singapore 119567, Taiwan I364294, South Africa 2006-0804, Australia 2012200998, European Patent validated; Germany, France, UK 1664270; Ma et al., 2020, George et al., 2020)。

【発明の概要】

【0016】

一態様において、本発明は、キメラ抗原および宿主におけるウィルスレベルを低下させる治療剤とを投与することにより、宿主におけるウィルス感染を治療する方法を提供する。

【0017】

治療法のいくつかの実施形態において、前記キメラ抗原は、HBV S1/S2/Coreキメラ抗原である。

【0018】

治療法のいくつかの実施形態において、前記治療剤は、HBV抗ウィルス剤である。いくつかの例において、前記HBV抗ウィルス剤は、テノホビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩、テノホビルアラフェナミド、エンテカビル、テルビブジン、アデホビルジピボキシルおよびラミブジンよりなる群から選ばれるいずれか一種以上の化合物を含む薬学的に許容可能な薬剤であってもよい。他の例において、前記HBV抗ウィルス剤は、H

B V複製を阻害するH B V抗ウィルスRNA i 剤である。さらに他の例において、請求項3の治療法は、前記H B V抗ウィルス剤が、コアカプシド集合阻害剤である治療法である。さらに他の例において、請求項3の治療法は、前記H B V抗ウィルス剤が、T o l l様受容体（T L R）アゴニストである治療法である。

【0019】

治療法のさらに他の実施形態において、治療法は、宿主への免疫調節剤の投与をさらに含む。いくつかの例において、前記免疫調節剤は、ペグインターフェロナルファアー2 aなどのインターフェロンである。他の例において、前記免疫調節剤は、P D 1 / P D L 1阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤である。

【0020】

治療法のさらに他の実施形態において、前記宿主は、ヒトである。他の実施形態において、ウィルス感染とは、H B V感染のことを意味する。

【0021】

他の態様において、本発明は、キメラ抗原および宿主におけるウィルスレベルを低下させる治療剤と、前記治療的なキメラ抗原および治療剤を前記宿主に投与することにより、前記宿主におけるウィルス感染を治療するための注意事項等情報を有する添付文書またはラベルと、を含む、宿主におけるウィルス感染を治療するためのキットを提供する。

【0022】

キットのいくつかの実施形態において、前記注意事項等情報は、前記キメラ薬剤および前記治療剤を同時に投与する使用および取扱い上の注意事項を含む。いくつかの例において、前記注意事項等情報は、前記キメラ薬剤および前記治療剤を別々に投与する使用および取扱い上の注意事項を含む。

【0023】

キットのいくつかの実施形態において、前記キメラ抗原は、H B V S 1 / S 2 / C o r eキメラ抗原である。他の実施形態において、前記治療剤は、H B V抗ウィルス剤である。いくつかの例において、前記H B V抗ウィルス剤は、テノホビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩、テノホビルアラフェナミド、エンテカビル、テルビブジン、アデホビルジピボキシルおよびラミブジンよりなる群から選ばれるいずれか一種以上の化合物を含む薬学的に許容可能な薬剤である。他の例において、前記H B V抗ウィルス剤は、H B V複製を阻害するH B V抗ウィルスRNA i 剤である。他の例において、前記H B V抗ウィルス剤は、コアカプシド集合阻害剤である。さらに他の例において、前記H B V抗ウィルス剤は、T o l l様受容体（T L R）アゴニストである。

【0024】

他の実施形態において、前記キットは、免疫調節剤をさらに含む。いくつかの例において、前記免疫調節剤は、ペグインターフェロナルファアー2 aなどのインターフェロンである。他の例において、前記免疫調節剤は、P D 1 / P D L 1阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤である。

【0025】

さらに他の態様において、本発明は、宿主におけるウィルス感染を治療する際に、キメラ抗原および宿主におけるウィルスレベルを低下させる治療剤の用途を提供する。いくつかの実施形態において、前記キメラ抗原は、H B V S 1 / S 2 / C o r eキメラ抗原である。いくつかの実施形態において、前記治療剤は、H B V抗ウィルス剤である。いくつかの例において、前記H B V抗ウィルス剤は、テノホビル、テノホビルジソプロキシルフマル酸塩、テノホビルアラフェナミド、エンテカビル、テルビブジン、アデホビルジピボキシルおよびラミブジンよりなる群から選ばれるいずれか一種以上の化合物を含む薬学的に許容可能な薬剤である。他の例において、前記H B V抗ウィルス剤は、H B V複製を阻害するH B V抗ウィルスRNA i 剤である。他の例において、前記H B V抗ウィルス剤は、コアカプシド集合阻害剤である。さらに他の例において、前記H B V抗ウィルス剤は、T o l l様受容体（T L R）アゴニストである。

【0026】

他の実施形態において、前記用途は、免疫調節剤をさらに含む。いくつかの例において、前記免疫調節剤は、ペグインターフェロナルファ-2aなどのインターフェロンである。他の例において、前記免疫調節剤は、PD1/PDL1阻害剤などの免疫チェックポイント阻害剤である。

【図面の簡単な説明】

【0027】

本特許または本出願ファイルは、カラーで仕上げられた少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を伴うこの特許または特許出願の公報のコピーは、要求して必要な手数料を支払うと、官庁によって提供される。

【図1】二量体状態のキメラ抗原構造を説明する模式図である。前記キメラ抗原は、HBV S1とS2断片、コア抗原、およびマウスモノクローナル抗体Fc断片を含む。(N-末端) 6xHis-rTEVプロテアーゼサイト-HBV S1/S2/Core [IRD] ---リンカーペプチド-Part CH1-CH2-CH3-ペプチド [TBD] (C-末端)。

10

【図2】DHBVコアキメラ抗原ワクチンの二酸化状態を説明する模式的な表現である。(N-末端) 6xHis-rTEVプロテアーゼサイト-DHBV Core [IRD] ---リンカーペプチド-Part CH1-CH2-CH3-ペプチド [TBD] (C-末端)。

【図3】組換え時の事象を表すチャートを示す。

【図4】DHBVコアキメラ抗原とTBDのアヒルPBMCとの結合を表す二つのグラフであり、陽性細胞の比率(左)(% positive cells)と相対的な平均蛍光強度(右)(Relative Mean Fluorescence Intensity)にて示す。

20

【図5】Fc断片によるDHBVコアキメラ抗原とアヒルPBMCとの結合の抑制を図解するグラフを示す。

【図6】孵化後にDHBVに感染されたアヒルのDHBV DNAを表す写真を示す。

【図7】AとBは、慢性的に感染されたアヒルの血清中の抗DHBVコア抗体のレベルをそれぞれPBSにて免疫化したグループ(7A)とcore-TBDにて免疫化したグループ(7B)に分けて表すグラフを示す。

【図8】AとBは、慢性的にDHBVに感染されたアヒルの血清中のDHBV DNAを図解する写真を示すものであり、それぞれ3TC(7A)とワクチン(7B)投与の後を示している。

30

【図9】慢性的に感染されたアヒルの平均のSGPT(ALT)レベルを表すグラフを示す。

【図10】慢性的に感染されたアヒルの平均のSGOT(AST)レベルを表すグラフを示す。

【図11】二量体化した形態の前記HBVコアキメラ抗原ワクチンの模式的な表現を示す。

【図12】AとBは、qPCR(図12A)とサザンブロットハイブリダイゼーション(Southern blot hybridization)(図12B)を用いて、前記HBVキメラワクチンが前記トランスジェニックマウス(遺伝子が改変されたマウス)における肝HBV DNAに及ぼす効果を表すグラフを示す。

40

【図13】AとBは、前記HBVコアキメラ抗原ワクチンが前記トランスジェニックマウス(図13B)における血漿ALT(図13A)と肝HBV RNAに及ぼす効果を表すグラフを示す。

【図14】前記HBVコアキメラ抗原ワクチンが前記トランスジェニックマウスにおける全体の重量の変化に及ぼす効果を表すグラフを示す。

【図15】A~Pは、それぞれ前記HBVコアキメラ抗原ワクチンが前記HBVトランスジェニックマウスにおける肝サイトカイン(それぞれ、IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF- α , MIP-1, GM-CSF,

50

RANTES)に及ぼす効果を表すグラフを示す。

【図16】A～Pは、それぞれ前記HBVコアキメラ抗原ワクチンが前記HBVトランスジェニックマウスにおける血漿サイトカイン(IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF- α , MIP-1, GM-CSF, RANTES)に及ぼす効果を表すグラフを示す。

【図17】A～Pは、それぞれ前記HBVコアキメラ抗原ワクチンが前記HBVトランスジェニックマウスにおける脾臓サイトカイン(IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, MCP-1, TNF- α , MIP-1, GM-CSF, RANTES)に及ぼす効果を表すグラフを示す。

10

【図18】A～Dは、それぞれ1日目、14日目、35日目および56日目のすべての値に対して、前記トランスジェニックマウスにおける前記HBVコアキメラ抗原ワクチンに応じた血漿IFN- γ の時間的な発現を表すグラフである。

【図19】前記HBVコアキメラ抗原ワクチンにより治療を受けたすべての動物の組み合わせられた値に対して、前記HBVトランスジェニックマウスにおける前記HBVコアキメラ抗原ワクチンに応じた血漿IFN- γ の時間的な発現を表すグラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明は、前記キメラ抗原が抗HBVウィルス剤および／または免疫阻害剤と組み合わせてHBV抗原への耐性を破ることができるという知見に基づいている。これは、HBV保菌者が自らHBV特異的T細胞とB細胞の反応を誘導して、慢性HBV感染の治療につながる。特に、前記キメラ抗原は、ウィルス抗原—例えば、B型肝炎コア抗原—を異種型断片(xenotypic fragment)—例えば、マウス免疫グロブリンG Fc断片(murine immunoglobulin G Fc fragment)—と結合する分子である。

20

【0029】

いくつかの態様から見ると、本発明は、宿主のウィルス荷重を低下させるために、前記キメラ抗原を一つまたはそれ以上の抗ウィルス剤と組み合わせる用途と、前記キメラ抗原に免疫反応を開始させる刺激／抑制的な免疫剤の用途について述べる。いくつかの実施形態において、前記キメラ抗原は、異種型断片mAbとDHBVコアタンパク質融合を用いる。これは、治療ワクチンのように慢性的なウィルス感染に対する広い免疫反応を誘発することができる。

30

【0030】

抗ウィルス剤の例としては、ヌクレオチド／ヌクレオチド様RNAi、カプシド集合阻害剤、Toll様受容体(TLR)アゴニスト、インターフェロン、免疫チェックポイント阻害剤とウィルス症を直間接的に低下させることのできる他の薬剤などを含むが、これらに限定されない。

【0031】

免疫調節剤の例としては、免疫チェックポイント阻害剤(例えば、PD-1、PDL-1、CTLA4への抗体遮断)やウィルス感染に応じて免疫反応を直間接的に調節する他の薬剤を含むが、これらに限定されない。

40

【0032】

慢性HBV感染治療において、ワクチン分子として用いるためにCTL反応を誘導するHBV抗原の提示は、DCで前記ワクチンを標的化するために設計された。これにより、慢性感染の間に「自己」であると捉えられていた前記HBV関連抗原が「外部のもの」として捉えられるはずであり、宿主の免疫体系は、HBVに感染された細胞を除去するためのCTL反応を搭載するはずである。これと同時に、交差提示を通して、循環する前記HBV抗原に対する抗体反応は、前記抗原に結合するはずであり、循環系において抗原を除去するはずである。したがって、本発明は、慢性HBVに感染された患者の免疫反応を誘

50

導し、かつ、感染を治療できる前記キメラ抗原を他の抗ウィルス剤と組み合わせて用いる用途について詳しく述べる。前記キメラ抗原の典型的な例示は、図1に示されている。

実施例

【0033】

実施例1 慢性DHBV感染を治療するための免疫治療療法としてのキメラDHBV抗原の評価

【0034】

1. はじめに

【0035】

1.1 HBVの動物モデル

【0036】

ヒトHBVは、ヘパドナウィルス科に属する。この科の他の一員としては、前記アヒルB型肝炎ウィルス(DHBV, Mason et al., 1980)、前記サギB型肝炎ウィルス(HHBV, Sprengel et al., 1988)、前記ウッドチャック肝炎ウィルス(WHV, Summers et al., 1978)、および前記地リスB型肝炎ウィルス(GSHV, Marion et al., 1980)が挙げられる。これらのウィルスが、たとえ類似のゲノム構造と複製機序の特徴を示すとしても、各ウィルスは、互いに異なる種特異性を有しており、したがって、非常に密接に関連している種のみを感染させる。アヒルB型肝炎ウィルス(DHBV)に感染された北京種アヒル(*Anas platyrhynchos*)は、ウィルス複製機序と抗ウィルス剤の解析の研究のための動物モデルとして用いられてきた(Schultz et al., 2004)。これらのウィルスは、3.0から3.2Kbまでの範囲の大きさであるDNAゲノムを有しており、いくつかのタンパク質を符号化する読み枠が重なり合う。

【0037】

前記HBVゲノムは、いくつかのタンパク質を符号化する。中でも、表面抗原大(S1/S2/S)、中(S2/S)、および小(S)の抗原が吸収のための前記ウィルスと細胞受容体の結合に与る。コアタンパク質(Core)は、カプシドを形成するが、このカプシドは、部分的な二本鎖DNAゲノムを取り囲む。重合/逆転写酵素(Polymerase/Reverse Transcriptase; Pol)タンパク質は、ウィルスの複製に必要な多機能的酵素である。前記Xタンパク質は、Srcキナーゼ(Src kinases)の活性化など多くの特性(Ganem, 2001, Bouchard and Schneider, 2004)を有している(Klein and Schneider, 1997)。

【0038】

前記DHBVゲノムは、表面抗原PreS/S、コアタンパク質、および重合/逆転写酵素を符号化する。DHBVが、たとえ前記Xタンパク質のためのオープンリーディングフレーム(開放型読み枠)を含まないとしても、X様タンパク質が培養細胞において産生されるということが知られている(Chang et al., 2001)。しかしながら、この遺伝子製品がDHBVに感染されたアヒルにおいて機能的な重要性を示すかどうかはいまだ判明されていない(Meier et al., 2003)。たとえHBVとDHBVとが類似性を示すとしても、これらのウィルスの間にはいくつかの側面から見て互いに異なる点がある。DHBVは、前記宿主に疾病を発病させない。DHBVには、X遺伝子生成物が足りない恐れがあるが、このタンパク質の欠乏があったからこそ、肝細胞癌種が発展することができないということが示唆された。前記糖タンパク質、カルボキシペプチダーゼDのようなDHBV感染に欠かせない要素がHBVにおいては観察されない(Schultz et al., 2004)。

【0039】

1.2 HBV感染の動物モデルであるDHBV

【0040】

DHBVを見つけて以来(Mason et al., 1980)、前記アヒル動物モ

10

20

30

40

50

デルはヘパドナウィルスの複製機序と抗ウィルス剤の解析の研究に広く用いられた (Schultz et al., 2004)。アヒルの免疫体系に関する知識が限定されているにも関わらず、この動物モデルは、DHBV感染に対する免疫反応への取り組みを行ううえで用いられた (Jilbert and Kotlarski, 2000)。

【0041】

ヒトのHBV感染と類似しているところは、アヒルのDHBV感染が急性または慢性である可能性があるということである。感染されたアヒルは、血流を通して卵を生むときにその卵に伝染させる。先天的なDHBV感染は、黄卵嚢と胚の発達中の肝臓において起こるウィルス複製の結果として起こる (Urban et al., 1985, Jilbert et al., 1998)。先天的にDHBVに感染されたアヒルは、一生慢性的に感染されたままに残るが、肝の歴史的な変化は非常に微々たるものであり、肝の損傷の生化学的な証拠もまた見られない (Marion et al., 1984)。

【0042】

慢性DHBV感染はまた、感染されたアヒルの血清を注入することにより、新たに孵化したアヒルの子においても現れることができる (Marion et al., 1984, Jilbert et al., 1996)。感染の結果は、アヒルの年齢によるものであると見られるが、もっとも感染が起こりやすいときは、新たに孵化したアヒルの子のときであり、加齢に伴い、感染が起こりにくくなる (Jilbert et al., 1998)。大きくなった大人のアヒルのDHBV感染は一時的であり、再感染に対してウィルス反応を中性化する抗体と免疫の生成をもたらす (Jilbert et al., 1998)。新生児の感染を招く免疫反応の類型と年をとった鳥類の感染なしの原因は、いまだに明らかに判明されていない。免疫体系の相対的な成熟度が感染の結果を定義することが示された。免疫体系がさらに発達していればいるほど、ウィルス治療の可能性と抵抗的な免疫はなお一層高くなるのである (Zinkernagel, 1996, Vickery and Cossart, 1996)。

【0043】

先天的かつ慢性的にDHBVに感染されたアヒルとこれらに由来した主な肝細胞は、抗ウィルス化合物を分析し、ウィルス複製の機序を研究するうえで広く用いられた (Offensperger et al., 1993, 1996; Hafkemeyer et al., 1996)。

【0044】

1.3 防御的かつ治療的な免疫体系の研究のための動物モデルとしてのアヒル

【0045】

前記動物モデルアヒルは、DHBVに対応して予防的かつ治療的な免疫反応を評価するうえで用いられたりもした (Rollier et al., 1999)。DNAに基づくワクチンは、防御的かつ治療的な効果を有するということが明らかになった (Rollier et al., 2000a & b)。アデフォビルとDHBV Lタンパク質DNAに基づくワクチンなどの抗ウィルス化合物を用いる研究において現れた結果は、抗ウィルス薬と免疫治療との組み合わせが一つの方法のみを用いる場合よりも慢性HBV感染を治療するうえでさらに効果的であり得るということである (LeGuerhier et al., 2003)。

【0046】

1.4 HBV感染に対する正常的な免疫反応

【0047】

HBVなどの細胞内病原菌の除去を成し遂げるために、前記感染された細胞がMHC Class Iに制限的なCD8+ CTLsにより破壊されなければならないということは、一般的に、人々が信じている事実である (Chisari and Ferrari, 1995)。HBV感染の間に、CTL反応は、肝細胞炎症とウィルス治療を引き起こす (Bertolotti and Maini, 2000; Rehmann, 2000)。感染された細胞を除去することなく、HBVを除去するに際して、IFN- γ

などの炎症誘発性サイトカインが行う役割もまた記録された (Guidotti et al., 1999; Bertolotti et al., 1997)。この効果は、急性HBVに感染されたチンパンジーにおいて明らかに見られる (Guidotti et al., 1999)。前記HBVトランスジェニックマウスにおいて、肝のIFN- γ とTNF- α の誘導は、非細胞変性的に前記ウィルスの複製と遺伝子の発現を防ぐことができる (Guidotti et al., 1996)。炎症性サイトカインの抗ウィルス効果は、LCMVにより重感染した前記HBVトランスジェニックマウスにおいて証明されている。この過程は、前記LCMVに感染された肝マクロファージにより産生されるTNF- α およびIFN- α/β によって仲介されると考えている (Guidotti et al., 1996a)。この結果は、慢性HBV感染を除去するために必要な免疫反応の重要性を強調する。

10

【0048】

1.5 DHBV感染に対するアヒルの免疫反応

【0049】

前記アヒル動物モデルにおいて、DHBV感染の免疫反応に関する研究は、アヒルの免疫体系に関する理解の不足と適切な試薬の欠如により非常に限られていた (Schultz et al., 2004)。近頃、いくつかのアヒルサイトカインが識別された。中でも、アヒルIFN- γ は、DHBVの生体内におけるおよび生体外における前記複製を抑えるということが明らかになった (Heuss et al., 1998, Schultz et al., 1999)。他のアヒルサイトカインに対しては非常に限られた情報しか利用することができないが、いくつかの研究は、IFN- γ (Schultz and Chisari, 1999)とIL-2 (Schultz et al., 2004)について報告している。前記アヒル動物モデルにおいて起こる免疫反応の評価のための免疫学的なツールを用いることが困難であるにも関わらず、本発明においては、前記キメラ抗原ワクチンの効果を研究するためにこのモデルを用いることを試みた。

20

【0050】

1.6 DHBVコアキメラ抗原ワクチンの設計

【0051】

キメラ抗原ワクチン技術は、ユニークな抗ウィルス治療ワクチンの開発と設計の面において突破口を設けた。前記キメラ抗原ワクチンは、「キメラ抗原」を組み換えた新たな段階であり、選別させた抗原と、融合タンパク質として産生される異種性抗体の特定の領域と、を含む。分子の両機能的な設計は、前記ウィルス抗原に対する耐性を破るために前記適切な抗原提示細胞にウィルス抗原を標的化するために、かつ、体液免疫と、最も好ましくは、細胞免疫反応を誘導してウィルス感染を一掃するために調節される。前記キメラ抗原ワクチン単量体融合タンパク質は、図2に模式的に示されている。

30

【0052】

図2から明らかなように、前記ワクチンは、二つの領域を有する。組換え抗原を含む免疫反応領域 (Immune response domain; IRD)と異種性抗体の断片部分を含む標的結合領域 (target-binding domain; TBD)である。さらに明示的には、前記キメラ抗原は、異種型Fc断片 (ネズミ)と融合されたDHBVコア抗原を含む。

40

【0053】

分子の設計は、いくつかのユニークな性質を知らせる。ユニークなキメラ設計は、特定の受容体を介した吸収を促すために抗体とほぼ同じ構造を形成することを好み、適切な抗原提示を引き起こす。これは、細胞免疫 (Class I)と体液免疫 (Class II)の両方ともにおいて広い免疫反応を生成する。これは、前記プロテアソーム経路とMHC Class Iとの複合体として提示されたペプチドを通して処理されてCTL反応を招く。前記キメラ抗原ワクチンはまた、MHC Class IIが提示したエンドソーム経路を通して処理されてもよく、体液反応を生成する。前記TBDは、Fc- γ 受容体などの特定のAPC受容体とキメラ抗原ワクチンとの結合を仲介する。未成熟なDCとの結

50

合は、ほとんどの場合、Class Iの提示を引き起こす。前記TBDの異種形成の本性は、分子をなお一層免疫的なものにする。さらに、様々な長さのリンカーペプチド(linker peptide)は、生タンパク質(native protein)と関連性がなく、前記抗原のNとC末端とキメラ抗原ワクチンの抗体断片において統合されるが、これは、前記慢性DHBV保菌者の宿主免疫体系により分子が「外部のもの」とであると捉えられることを援助する。

【0054】

昆虫細胞において、前記組換えタンパク質の発現は、哺乳類細胞とは異なるグリコシル化反応を与え、前記タンパク質の免疫を形成する性質に他の次元を加えるという特徴を示す。昆虫細胞に取り込まれたマンノース／パウチマンノースグルコシル化反応(mannose/pauci mannose glycosylation)はまた、吸収のためにAPCがマンノース受容体を標的化することを許容する。前記キメラ抗原ワクチンは、特定のFcγ受容体I、IIとIII(CD64, CD32, CD16)、マンノース受容体(CD206)、他のC型レクチン受容体と食細胞作用を通してAPCにより吸収され得る(Geijtenbeek et al., 2004)。前記エンドソームとプロテアソーム経路、およびMHCの二つのClassへの提示を通じた処理過程を経る、これらの受容体を介した吸収は、ウィルスに感染された細胞をなくし、循環する抗原を除去するなど広い免疫反応を引き起こすことができる。

【0055】

CTL反応の生成は、ウィルスに感染された細胞を一掃するうえで重要である。抗体に基づく治療法において、投与された抗体の濃度は、循環する自己抗原の最適な複合化のために各患者に調節されなければならない。前記キメラ抗原ワクチン技術において、この変数は、Ag/Abの化学量論がワクチン分子内において保たれるために避けられる。前記DHBVキメラ抗原ワクチンが提示のために循環する抗原に頼らなくても済むということは、さらなるメリットである。

【0056】

2. DHBVコアキメラ抗原ワクチンの生成

【0057】

2.1 複製と発現

【0058】

このセクションにおいては、「Bac to bac」クローニングシステムを用いた前記DHBVコアキメラ抗原ワクチン、DHBVコアと前記TBD構成要素のクローニングのために用いる方法論について述べる。このセクションにおいては、High Five TM昆虫細胞内タンパク質の発現の標準化について述べる。

【0059】

2.2 pFastBacHTa TBD、親プラスミド構築

【0060】

CH1-Hinge-CH2-CH3領域のアミノ酸を符号化するマウスのIgG1 DNA配列は、HBsAgに対応してmAbを生成するリンパ雑種細胞種(2C12)から分離されたmRNAに由来したものである。総mRNAは、TRIzol試薬(Thermo Fisher Scientific社製)を用いて分離され、前記TBDの前記cDNAは、Superscript First-strand Synthesis(Thermo Fisher Scientific社製)を用いたRT-PCRにより生成された。前記PCRプライマーは、前記5'末端のユニークなNot Iと3'末端のユニークなHind IIIのリンカーペプチド-SRPQGGGS-を符号化するリンカー配列を含んでいた。結果として生じる前記cDNAは、(5' Not I)-リンカー配列-CH1(VDKKI)-CH2-CH3-リンカー配列-(3' Hind III)を含む。前記各酵素とともに消化された後、断片は前記同じ制限酵素サイトを用いてpFastBacHTaドナーベクタープラスミド(donor vector plasmid, Thermo Fisher Scientific社製)とライゲーションされた

。PCR増幅に用いられた前記5'プライマーは、(sense) 5' TGTCAATTC TGC GGCCG CAAGGCGGCGGATCCGTGGACAAGAAAATTG TGCCCAAGGであり、前記3'プライマーは、(antisense) 5' ACGA ATCAAGCTTTG CAGCCC AGGAGAGTGGGAGAGであり、それぞれ前記Not Iと前記Hind IIIサイトを含んでいた。

【0061】

増幅されたDNAは、Not IとHind IIIとともに消化され、前記断片は、アガロースゲルにより浄化され、pFastBacHTaベクタープラスミドとライゲーションされて前記同じ制限酵素とともに消化された。これは、前記ドナープラスミドpFastBacHTa-TBDを産生するためである。このプラスミドは、前記組換えバキュロウイルスプラスミド（後述する）を生成するために大腸菌DH10Bacの形成に用いられた。DNA配列とORFの正確性は、標準配列方法により確認された。

【0062】

2.3 pFastBacHTa DHBVコア抗原とDHBVコア-TBD融合タンパク質発現ベクター

【0063】

前記DHBVコア抗原を符号化するDNAは、前記PCR方法論を用いた前記プラスミドpRSET B DHBVにおいて生成された。用いられたプライマーは、次の通りである：前記ユニークな(unique)制限酵素サイトNco Iを含む(Sense) 5' TGC GCTACCATGGATATCAATGCTTCTAGAGCCと前記ユニークな制限酵素サイトNot Iを含む3'プライマー(antisense) 5' TGTCAATTC TGC GGCCGCGATTTCCTAGGCGAGGGAGATCTATG。増幅されたDNAは、Nco I/Not Iとともに消化され、前記同じ二つの酵素とともに消化されたpFastBacHTa発現ベクターとともにライゲーションされた。これは、発現ベクターpFastBacHTa DHBVコアを生成した。このプラスミドは、前記組換えバキュロウイルスプラスミド（バキュロウィルのゲノムをベクターとして用いたもの）を産生するためのDH10Bac内転位に用いられる。前記組換えバキュロウイルスプラスミドは、Sf9昆虫細胞のトランスフェクションに用いられた。結果として生じるバキュロウィルは、前記DHBVコア抗原の遺伝子を運び、前記タンパク質DHBVのコアタンパク質の発現に用いられた。pFastBacHTa DHBVコア-TBDプラスミドの生成は、類似のプロトコルを通して成し遂げられる。前記PCRにより増幅されたDNAは、Nco I/Not Iとともに消化され、前記精製されたDNA断片は、各酵素とともに消化されながら、前記プラスミドpFastBacHTa-TBDとライゲーションされた。これは、発現ベクターpFastBacHTa DHBV Core-TBDを生成した。このプラスミドは、前記タンパク質キメラ抗原DHBV Core-TBDを発現した組換えバキュロウィルスを生成するために用いられた。

【0064】

2.4 大腸菌DH5αの形質転換

【0065】

ライゲーションされたプラスミドは、大腸菌DH5αを形質転換するために用いられ、前記プラスミドは、標準プロトコルにより分離された。配列とオープンリーディングフレームは、シーケンシングにより確認され、前記プラスミドは、前記組換えバキュロウイルスプラスミドを生成するために大腸菌DH10Bacの形質転換に用いられた。

【0066】

2.5 転位

【0067】

前記組換えバキュロウイルスプラスミドの生成は、バクテリア転移因子Tn7と部位特異的な転位を用いる「Bac-to-bac」クローニング体系(Thermo Fisher Scientific社製)に基づいている。これは、大腸菌株DH10Bacにおいて成し遂げられる。前記DH10Bac細胞は、前記バキュロウイルスプラスミド

を含む。前記バキュロウイルスプラスミドは、遺伝子転位酵素を符号化するカナマイシン抵抗性とヘルパープラスミドを与え、テトラサイクリンに抵抗性を与える。関心の対象となる遺伝子は、クローニング部位の隣に配置されるmini-Tn7要素を有するドナープラスミドpFastBacHTaによりクローニングされる。プラスミドは、大腸菌株DH10Bacを形質転換するために用いられる。LacZ α 遺伝子内のTn7の付着サイトを含むバキュロウイルスシャトルプラスミド（バキュロウイルスプラスミド）を有している。転位は、組換えのみが白色群集を生成することができ、かつ、手軽に選別できるように前記LacZ α 遺伝子を妨げる。E. coli内転位使用のメリットは、単一の群集が前記組換えバキュロウイルスプラスミドのみを含むということである。前記組換えバキュロウイルスプラスミドは、標準プラスミド分離プロトコルを用いて分離され、前記組換えタンパク質を発現するバキュロウイルスを生成するためにSf9昆虫細胞内形質注入に用いられる。組換えに含まれる事件の順序は、図3に示されている。

【0068】

前記ドナープラスミドpFastBacHTa-TBD、pFastBacHTa DHBV Core、pFastBacHTa DHBV Core-TBDがクローニングされた前記遺伝子をバキュロウイルスシャトルベクター（バキュロウイルスプラスミド）にサイト特異的に転位するのに用いられた。前記組換えpFastBacHTaプラスミドと前記関心の対象となる遺伝子（TBD、DHBV Core & Core-TBD）は、前記組換えバキュロウイルスプラスミドを生成するための転位をするために、前記DH10Bac細胞を形質転換するのに用いられた。

【0069】

100 μ L部分標本の抗体反応を引き起こす前記DH10Bac細胞は、氷において解凍され、前記pFastBacHTaに基づくプラスミドが添加されて混合物が氷において30分間培養された。前記混合物は、42°Cにおいて45秒間熱ショックを受け、その後、2分間氷の上において冷やされた。次いで、前記混合物は、LB培地900 μ Lに添加され、37°Cにおいて4時間培養された。形質転換された細胞は、連続してLBにより10⁻¹と10⁻²まで希釈される。各希釈液100 μ Lは50 μ g/mLカナマイシン、7 μ g/mLゼンタマイシン、10 μ g/mLテトラサイクリン、100 μ g/mL X-gal、および40 μ g/mLを含むIPTGのLB培養皿に位置付けられ、37°Cにおいて少なくとも36時間の間に培養された。

【0070】

前記pFastBacHTaはゼンタマイシン抵抗性を有し、前記X-galとIPTGは、白色群集（組換えバキュロウイルスプラスミド）と青色群集（非組換えバキュロウイルスプラスミド）を差別化するために用いられた。前記白色群集は選別されて、50 μ g/mLのカナマイシン、7 μ g/mLのゼンタマイシン、および10 μ g/mLのテトラサイクリンを含むLB 2mLに接種され、一晩中37°Cにおいて混ざりながら培養された。殺菌されたループが一晩中培養された培養液の少量の標本を抽出するために用いられ、抽出液は、50 μ g/mLカナマイシン、7 μ g/mLゼンタマイシン、10 μ g/mLテトラサイクリン、100 μ g/mL X-gal、および40 μ g/mL IPTGを含む新たなLB培養液の培養皿に塗り付けられ、少なくとも36時間の間に37°Cにおいて白色表現型を確かめるために培養された。

【0071】

前記組換えバキュロウイルスプラスミドは、標準プロトコルにより分離され（Sambrook & Russell, 2001）、DNAサンプルが40 μ L TE（10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA）において溶解された後、形質注入に用いられた。

【0072】

2.6 組換えバキュロウイルスの形質注入と産生

【0073】

前記組換えバキュロウイルスを産生するために、前記各バキュロウイルスプラスミドは

、Sf9昆虫細胞に形質注入された。Sf9細胞（ 9×10^5 ）は、2mL Sf900 I I（Thermo Fisher Scientific社製）において6ウェル細胞培養皿（35mmウェル）の各ウェルに接種され、少なくとも1時間の間に27℃において付着するように許可された。Sf9細胞の供給業者によって与えられたプロトロールに従い、Cellfectin試薬（Thermo Fisher Scientifics社製）を用いて形質注入が行われた。形質注入に続けて、細胞は、27℃において72時間培養された。前記バキュロウィルスを含む媒体は、集められた後、暗所において4℃に保存された。

【0074】

形質注入の効率性は、前記バキュロウィルスDNAの産生を確かめることにより確証された。分離された前記バキュロウィルスDNAは、挿入された目標遺伝子を検査するためにPCRに注入された。細胞内異種タンパク質の発現は、SDSポリアクリルアミドゲル電気移動（SDS-PAGE）と前記6xHisタグモノクローナル抗体（Clontech社製）をプローブとして用いるウェスタンブロットにより確証された。

【0075】

2.7 組換えバキュロウィルス群の増幅

【0076】

前記バキュロウィルスの生成とタンパク質の発現が確かめられれば、前記ウィルスの産生は増幅されて前記目標遺伝子を運ぶ、前記バキュロウィルスの密集した群れを産生することになる。前記バキュロウィルスを少なくとも2倍に増幅させることは標準的な慣行であり、ここで述べられたあらゆるプロトコルにおいてこの標準的な慣行を順守した。増幅の第2の段階後に、生成された前記バキュロウィルスの密集群は、キットの製造会社（Thermo Fisher Scientifics）により述べられたプロトコルに従って溶菌斑検査（plaque assay）を用いて数量化された。Sf9昆虫細胞を感染させるための最も適切な前記ウィルスの密集群と前記好ましいタンパク質の産生のための最適な時点もまた確立された。二つの単層の発現のためのプロトコルとSf9細胞の懸濁培養もまた確立された。

【0077】

2.8 組換えタンパク質の発現

【0078】

標準化されたMOIの前記組換えバキュロウィルスは、High Five™昆虫細胞を感染させるために用いられた。懸濁培養液において、細胞は、 3×10^5 cells/mLの密度にて接種され、細胞密度が $2 - 3 \times 10^6$ cells/mLに達するまで27.5℃において138rpmにて混ざりながら培養された。前記組換えバキュロウィルスは、細胞に添加された。前記DHBVタンパク質の発現において、MOIが1-2 pfu/cellであり、TBDには10 pfu/cellが用いられた。27.5℃において、培養は48時間の間に行われ続けられた。細胞は、2500rpmにて10分間4℃において遠心分離により抽出され、前記組換えタンパク質の精製に用いられた。細胞の未使用の部分は、液体窒素内において冷凍され、-70℃において保存された。

【0079】

2.9 タンパク質の精製

【0080】

前記6xHisタグタンパク質の精製は、変性状態でのニッケルキレーション親和性クロマトグラフィー（Ni-chelation affinity chromatography）に基づいており、その後に、イオン交換クロマトグラフィが続く。前記異なるタンパク質の精製に用いられる前記プロトコルは、次のセクションにおいて述べられている。

【0081】

2.10 溶解と可溶化

【0082】

250mL培養液の細胞の粒は、約30mLの冷たい溶解緩衝液 (l y s i s b u f f e r) (6 M G u a n i d i n e H C l , 100mM N a H ₂ P O ₄ , 10mM T r i s H C l , 10mM I m i d a z o l e , p H 8 . 00) 内において再び懸濁培養された。10分間氷において冷凍した後、前記懸濁培養液は超音波分解を受けた (S o n i c a t o r 3000 , M i s o n i c s I n c . , 60~65ワットで5回パルス／分、その間に5分間冷却) 。前記溶解物は、RTにおいて2時間をかけて攪拌させることによりさらに可溶化された。可溶化されていない物質は、JA 25.50回転子において15,000rpmにて30分間4℃の温度においてBeckman Avanti J25遠心分離機を用いて遠心分離されて除去された。

【0083】

2.11 Ni-NTA精製

【0084】

BioRad Econoカラム (クロマト管) (1.5x12cm) が2.5ml (PV) のNi-NTA Super Flow微生物 (Qiagen) によりいっぱい満たされ、20mLの溶解緩衝液により平衡化された。ターゲットタンパク質を縛るために一掃された溶液がNi-NTA Super Flowカラムに注ぎ込まれた。

【0085】

前記A280が安定化されるまで前記カラムが溶解緩衝液 (カラム約30個の体積) により洗浄された。カラムは、A280が0.1よりも小さくなるまで約30個のカラム体積の洗浄緩衝液 (8M urea in 100 mM N a H ₂ P O ₄ , 10mM T r i s , 20mM I m i d a z o l e , p H 8 . 0) によりさらに洗浄された。Ni-NTAに結合したタンパク質は溶出緩衝液 (8 M u r e a i n 100 m M N a H ₂ P O ₄ , 10 m M T r i s , 250 m M I m i d a z o l e , p H 8 . 0) により溶出され、1mlごとの断片が回収された。0.05よりも高い吸収剤A280 (U l t r o s p e c 4000 S p e c t r o p h o t o m e t e r , P h a r m a c i a B i o t e c h) を含む前記タンパク質断片がアミコンウルトラ遠心分離フィルター装置 (M i l l i p o r e A m i c o n U l t r a - 15 , 30,000 M W C O) を用いて集められ、最終的な体積が4~5mLとなった。イミダゾールを除去するために、サンプルは、Sephadex G 25 (1.5x30cm) カラムに適用され、20mM N a H ₂ P O ₄ p H 7 . 4を含む8Mウレアとあらかじめ平衡化された。縛られた前記タンパク質は、同じ緩衝液を用いて、前記カラムから溶出され、前記関心の対象となるタンパク質を含む前記断片は、イオン交換クロマトグラフィ (i o n e x c h a n g e c h r o m a t o g r a p h y) のために集められて用いられた。

【0086】

2.12 CM-セファロースを用いたイオン交換クロマトグラフィ (DHBVコアキメラ抗原ワクチンとDHBV Core)

【0087】

この手続きは、前記DHBVコアキメラ抗原ワクチンと前記DHBVコアタンパク質のための第2の段階の精製に用いられた。CMセファロース (Pharmacia) カラム (1.5x15cm) は、20mMリン酸ナトリウム、8Mウレア、pH 7.4によりいっぱい満たされて平衡化された。Ni-NTA親和性クロマトグラフィにより精製された前記タンパク質はカラムに適用された。結合とそれに続く溶出に用いられた流量 (f l o w r a t e) は、1ml/minである。前記カラムは、A280が安定的になり、基底線に近づくまで同じ緩衝液により洗浄される。前記CM-セファロースと縛られたタンパク質は、塩化ナトリウム (0~0.6M) の増加する線形勾配曲線を描きながら溶出された。前記関心の対象となるタンパク質を含む断片は集められ、前記A280は前記DHBVコアキメラ抗原ワクチンには0.3に、DHBV Coreには0.2に調節された。サンプルは、三組の前記緩衝液とともに、20mMリン酸ナトリウムと300mM塩化ナトリウム、pH 7.4の1Lに透析された。

【0088】

10

20

30

40

50

3. DHBVキメラ抗原ワクチンの免疫学的特徴づけ 【0089】

次のセクションにおいては、前記アヒルPBMCの分離に用いられる方法論と、前記DHBVキメラ抗原ワクチンの前記アヒルPBMCへの結合の評価について述べる。

【0090】

3.1 アヒルPBMCの分離と培養

【0091】

前記アヒルPBMCは、Ficoll密度勾配分離によりすべての血液から分離された。その後、細胞は、100mm培養皿において10% FBSにより37℃においてイスコフ改変ダルベッコ培地（I-DMEM）を用いて一晩中培養された。非付着細胞は、前記培養皿をI-DMEM/10% FBSにより広く洗浄することにより除去された。付着細胞は、前記培養皿から機械的に除去され、0.1% BSAのダルベッコPBSにより洗浄され、前記キメラ抗原ワクチンの結合の評価のために用いられた。

【0092】

3.2 キメラ抗原ワクチンのアヒルPBMCへの結合

【0093】

付着性PBMCは、96ウェルプレートのウェルに2×10⁵細胞/ウェルにて配置された。細胞は、その後、DHBVコアキメラ抗原ワクチン、コア、またはTBDの存在する/存在しない状態で4℃において1時間の間に培養された。いくつかの場合において、細胞は、抗原を追加する前に3mM精製されたマウスIgG Fc断片により20分間4℃においてあらかじめ培養された。抗原との培養後に、細胞は洗浄され、20分間抗マウスIgG-biotin Abまたはanti-DHBV-Core-biotin mAbにより培養された。その結果、細胞は、トレプトアビジン-Cy-Chromeにより20分間培養され、洗浄され、再びDPBSにおいて2%のパラホルムアルデヒドとともに懸濁培養された。FACSCalibur (BD Biosciences社製)を用いた少なくとも2万件の結合が生じ、解析には、CELLQuestソフトウェアを用いた。

【0094】

3.3 FACS取得と解析

【0095】

陽性細胞に関する資料は、Cellquest収集および分析ソフトウェア (BD) 付きFACSCalibur (BD Biosciences社製)を用いて取得した。FSCとSSC分布プロファイルにより決定されて生存可能な細胞群にゲートが作られ、10,000件以上の結合が取得された。陽性細胞の比率を決めるために、ゲートが陰性制御を受けた細胞に基づいて設定された (F(ab')₂ヤギ抗マウスAlexa-488単独にて標識された同型対照群または細胞)。

【0096】

特定の陽性細胞の比率は、次のようにして計算された：

$(\% \text{陽性細胞実験サンプル} - \% \text{陽性細胞対照群}) \times 100$
100-%対照陽性細胞

【0097】

相対的な平均蛍光強度 (mean fluorescent intensity; MFI) は、次のようにして決められた：実験サンプルのMFI-対照サンプルのMFI。

【0098】

3.4 実験動物と手続き

【0099】

孵化後に慢性的にDHBVに感染されたアヒルグループが前記DHBVコアキメラ抗原ワクチンの効果を評価するために用いられた。次のセクションにおいては、動物の選別と実験のために用いられた手続きについて述べる。

【0100】

3.4.1 DHBVに慢性的に感染されたアヒルの生成と解析

【0101】

孵化後にDHBVに慢性的に感染されたアヒルを作るために、感染されていない集団のアヒルの子にDHBV陽性血清100 μ L~200 μ Lを接種した(i.v.)(>100pg DHBV DNA/10 μ L、点滴検査)。孵化してから1~3日後と3週間目の鳥がセラム点滴検査によりDHBV感染されたか否かを調べるために検査が行われ、陽性ウィルス症を示す動物が研究の対象として選定された。最初のDHBV DNA点滴検査において陽性であると示された動物や、DHBVウィルス症が3週間目にも10pg/10 μ L未満であるか、あるいは、他の自明な健康問題がある動物は、研究の対象外とした。

【0102】

3.4.2 DNA点滴検査によるセラムDHBV DNAの確認

【0103】

血清10 μ Lがアルカリ変性と紫外線交差結合とともにHybond-N+ナイロンメンブレイン(Amersham Biosciences UK Limited社製)に適用された。メンブレインは、2時間の混成化準備過程を経て16時間の間に65 $^{\circ}$ Cにおいて7%SDS/6xSSCにおいて混成化された。DHBVプローブは、ランダムプライマーキット(Random Primer Kit, Thermo Fisher Scientific社製)を用いて前記プラスミドpAltD2-8内前記DHBV DNAの単量体複製において作られた。メンブレインは、0.1%SDS/2xSSCにおいて15分間2回洗浄され、再び0.1%SDS/0.2xSSCにおいて215分間洗浄された。シグナルは、前記同じメンブレインに適用された既存の濃度のプラスミド標準と比較した後、これに基づいて数量化された。

【0104】

3.4.3 アヒル血清の抗体レベル

【0105】

前記アヒル血清における抗体のレベルは、ELISA方法により測定された。ELISA皿は、組換えDHBVコア抗原やDHBV PreS抗原(1 μ g/mL, 100 μ L/ウェル)のうちのどちらか一方に一晩中4 $^{\circ}$ Cにおいてコーティングされた。皿は、洗浄緩衝液により洗浄され、その後、1時間の間にRTにおいて2%BSA/PBSにより遮断された。すべてのサンプルは、各ウェルにおいて2%BSA/PBS(1:50)、100 μ Lにて希釈され、1時間の間に37 $^{\circ}$ Cにおいて培養され、洗浄された後、1時間の間に37 $^{\circ}$ Cにおいてヤギ抗アヒルIgG-HRP(1:4000)により培養された。前記培養皿は、前記洗浄緩衝液により洗浄され、発色体ABTS(KPL, MD, USA:2,2'-アジノージー(3-エチルベンズシアゾリン-6-スルホン酸)が各ウェル(100 μ L/ウェル)に添加され、前記培養皿は、10分間RTにおいて培養された。発現された色度は、405nmで測定された。

【0106】

4. ワクチンプロトコル

【0107】

4.1 DHBVコアーTBD(キメラ抗原ワクチン)が慢性DHBV感染にかかったアヒルに及ぼす効果

【0108】

孵化後にDHBVに感染されたアヒルグループが実験のために用いられた。実験群は、前記DHBVコアーTBDキメラ抗原ワクチン(20 μ g, 緩衝液150 μ L)を皮下注射にて最初の5週間に毎週1回接種し、40 μ g、緩衝液300 μ Lを実験が終わるまで毎4週間ごとに1回ずつ接種した。対照群は、他の群と同じ療法にて同じ量の緩衝液(20mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH7.4)が入れられている注射を接種した。アヒルは、ワクチンを接種し始めた時点で孵化してから3~4週間目となるアヒルであった。実験期間は、33週間であった。

【0109】

10

20

30

40

50

4. 2 ラミブジンとDHBVコアキメラ抗原ワクチンを用いた治療法がDHBVに感染されたアヒルに及ぼす効果

【0110】

DHBVに感染されたアヒル（孵化してから3～4週間目）が3TC（ラミブジン）により治療された。このとき、注射は、筋肉注射（20mg/kg/日、1日につき2回）によりワクチンを接種し始める前に16日間接種し、この状態で10週間続いた。研究してから12週間目に開始したラミブジン接種は、同じ量の前記緩衝液において40mg/kg/日まで増え、4週間続いて、DHBVDNA点滴検査により追跡監視した結果、完全なウィルスの抑制を成し遂げることができた。

【0111】

最初のグループは、前記DHBVコアキメラ抗原ワクチン（40μg、緩衝液300μL）を皮下注射にて2週間につき1回接種し、最初の注射は、ラミブジン治療を開始してから2週間後に接種した。2番目のグループは、前記DHBV Core（20μg、緩衝液300μL）を皮下注射にて2週間につき1回接種し、最初の注射は、ラミブジン治療を開始してから2週間後に接種した。3番目のグループは、緩衝液（20mM NaH₂PO₄ pH 7.4, 300mM NaCl）を接種した。合計の実験期間は、24週間であった。

【0112】

4. 3 組織サンプルの収集

【0113】

孵化後にDHBVに感染されるべきアヒルの血液（0.1～0.2ml）が感染前に集められ、感染してから1週間目と3週間目にはDHBVウィルス症の評価のために、その後には毎2週間ごとに1回ずつ血液を採取した（1ml）。研究が終わり次第、肝と脾臓サンプルが液体窒素において冷凍された。組織学と毒性学的な評価のために、次のような臓器の組織がホルムアルデヒドに保存された：肝、脾臓、肺、腎臓、心臓、膵臓、十二指腸、注射を接種した、または接種しなかった部位の皮膚と筋肉。

【0114】

4. 4 結果評価

【0115】

研究の結果が、点滴検査による前記血清DHBVDNALevelの測定（セクション3.4.2）と前記抗体反応の測定（セクション3.4.3）を通して評価された。前記アヒル血清の血清SGPT（ALT）と他の酵素が自動化された検査を用いて測定された。検査は、エドモントンにあるCVPLD獣医病理学研究所との契約を通して行われた。すべての組織の組織学、病理学、およびH+E染色、および免疫組織化学検査は、DHBV CoreとPreSタンパク質に対する抗体を用いて契約された研究機関（Histobest、エドモントン）において行われた。

【0116】

5. 結果

【0117】

5. 1 アヒルPBMCの抗原結合受容体

【0118】

哺乳類体系においては、抗原が抗原提示細胞、特に、DC（樹脂状細胞）の中に挿入できるいくつかの方法がある。中でも、受容体媒介吸収は、一番重要である。CD64またはFcγRIは、高い親和性の受容体であって、IgG複合抗原のための効果的な吸収機序として機能する。吸収後に抗原は、Class IとClass IIの経路を通して処理され、かつ提示され得る。CD32またはFcγRIIは、IgG複合抗原の効果的な吸収に低い親和度を示す親和性受容体である。抗原は、Class IとClass IIの経路を通して処理され、かつ、提示され得る。CD16またはFcγRIIIは、IgGに低い親和度を示す親和性受容体であって、抗原の処理と提示過程の細かい事項が上手く特徴づけられていない受容体である。CD206は、高いマンノースを含有する抗原に

10

20

30

40

50

高い親和度を示す親和性受容体であって、処理過程は、主としてClass II経路を通して行われる。抗原吸収の受容体媒介機序に加えて、抗原吸収の他の主な経路は、大食作用と微小細胞吸収作用である。鳥類において抗原吸収の機序、特に、アヒルの場合には上手く特徴づけられていない (Schultz et al., 2004)。通常の哺乳類と鳥類の免疫体系との間において、非常に重要な相違点もあるものの、ある類似性もあることが示唆された (Sharma, 1997)。Fcγ受容体の結晶構造は、いろいろな他の種においてFc断片の結合部位を識別し、アヒル受容体は、これと非常に類似している認識部位を有するものであると見られる (Sondermann et al., 2001)。この観察に基づいて、出願者は、前記DHBVキメラ抗原ワクチンの前記アヒルPBMCへの結合を評価するいくつかの研究を行った。

10

【0119】

5.2 DHBVキメラ抗原ワクチンのアヒルPBMCへの結合流動細胞計測法（フローサイトメトリー）による解析

【0120】

出願者は、前記DHBVキメラ抗原ワクチンが前記アヒルの付着性PBMCに結合し得る能力について調べた。PBMCは、Ficol lの密度勾配分離によりアヒルの血液から分離されて20時間の間に37℃にてI-DMEM/10% FBSにおいて培養された。

【0121】

前記培養皿は、非付着細胞を除去するために洗浄され、前記付着細胞は、機械的な分離により除去されて結合の研究に用いられた。細胞は、前記キメラ抗原ワクチン（抗原）とともにPBS/0.1% BSAにおいて1時間の間に4℃にて培養された。前記TBD領域の結合は、ヤギ抗マウスIgG biotinとSA-Cyにより認識され、コア領域は、抗アヒルコアビオチンmAbとヤギ抗マウスFab IgG FITC Abにより認識された。資料の取得は、%陽性結合細胞と相対的なMFI（平均蛍光強度）を定めるために流動細胞計測法により行われた。結果は、図4に示されている。図4は、融合タンパク質が前記アヒルPBMCと結合することができることを示している。この結合は、Fc断片により抑えられたが、前記アヒル細胞のFc特異的受容体が前記キメラ抗原ワクチンの結合に与るということを示唆している（図5）。

20

【0122】

5.3 キメラ抗原ワクチンが慢性DHBVに感染されたアヒルに及ぼす効果に関する評価

30

【0123】

孵化後にDHBVに感染された（慢性）アヒルを対象として実験が行われた。前記DHBVコアキメラ抗原ワクチンは、孵化後に感染されたアヒル（慢性的な感染）を対象としてラミブジンを用いた事前治療が存在する場合と存在しない場合とに分けて試験された。次のセクションは、この研究の結果を述べたものである。

【0124】

5.4 DHBVコアキメラ抗原ワクチンが慢性DHBVに感染されたアヒルに及ぼす効果に関する評価

40

【0125】

慢性DHBVに感染されたアヒルは、上述したように、前記DHBVコア-TBDキメラ抗原ワクチンにより治療を受けたり同量の前記DHBVコアタンパク質により治療を受けたりした。対照群には、注射に用いられる緩衝液を接種した。

【0126】

5.4.1 コアキメラ抗原ワクチンにより治療されたアヒルにおいてウィルス症の相当の減少が観察された

【0127】

治療を受ける間に互いに異なる時点において慢性DHBVに感染されたアヒルの血液サンプルが集められ、DHBV DNAレベルは、DNA点滴検査により測定された。孵化

50

後に D H B V に感染されたアヒルの場合、D H B V D N A 血清の減少が前記コアキメラ抗原ワクチンを接種してから 18 週間目に観察されたが、以降の時点においては効果がはっきりとしていなかった（図 6）。さらに、対照群においてもいくつかのアヒルにウィルス症の減少があった。この効果が前記ウィルスの一時的な減少に起因するものであるか否かははっきりしていない。

【0128】

5. 4. 2 慢性 D H B V に感染されたアヒルの抗 C o r e 抗体レベルがワクチン接種後に増加を示した

【0129】

上述したように、治療を受ける間に前記アヒルの血清を他の時点において集めた結果を通して抗 C o r e 抗体レベルを測定した。図 7 B に示す慢性的に感染されたグループの結果は、図 7 A の対照群と比較したとき、抗体レベルが増加したということを示す。

【0130】

6. 融合治療：ラミブジン（3 T C）により事前治療された慢性 D H B V 感染アヒルにコアキメラ抗原ワクチンが及ぼす効果に関する評価

【0131】

H B V が宿主の耐性を誘導する機序の一つは、前記宿主の免疫体系を飽和させるために、ウィルスとウィルスタンパク質を大量にて産生する方法であると主張されてきた。推論してみると、ウィルス症の減少とその結果として生じる前記ウィルス抗原の集中は、治療的なワクチンの接種の間に免疫反応を生じさせる上で役に立つはずである。

【0132】

この可能性は、上述したように、3 T C により事前治療を受ける、孵化後に D H B V に感染されたアヒルにおいて試験された。この実験の結果は、次のセクションにおいて示されている。

【0133】

6. 1 D H B V コアキメラ抗原ワクチンの 3 T C 治療を受けた慢性 D H B V に感染されたアヒルへの投与の効果

【0134】

上述したように、アヒルは、3 T C により事前治療を受けた後、前記 D H B V コアキメラ抗原ワクチンで免疫するようになった。D H B V D N A 点滴検査において決められたように、前記アヒル血清内の D H B V ウィルス症は、図 8 B に示されている。これと比較して、対照群は、図 8 A に示されている。結果は、いくつかの動物において、ウィルス症が再拡大される開始点が遅くなるということを示す。

【0135】

6. 2 ワクチンを接種したアヒルの肝内炎症性酵素は、接種した結果、いかなる有意な変化も示さなかった

【0136】

前記 D H B V コアキメラ抗原ワクチンは、3 T C により事前治療した、孵化後に感染されたアヒルグループにおいて炎症性酵素の有意な増加を誘導しなかった。この実験の結果が図 9 および図 10 に示される。アヒルグループの血清サンプルにおいて、次のような肝酵素の効力が検定されてこの研究において用いられた。S G O T（A S T）、S G P T（A L T）、ソルビトール脱水酵素－A O、アルカリホスファターゼ、およびガンマグルタミル転移酵素（G T）。各対象グループにおいて一匹ずつ三匹のアヒルの A L T と A S T を測定した結果が、図 9 と図 10 にそれぞれ示される。対照群に比べて実験群において注目値する変化はなかったものの、すべての動物において数値の有意な変動があった。このアヒルグループにおいて、ワクチンに関わる死亡は存在しなかった。

【0137】

7. 結果要約

【0138】

慢性的に D H B V に感染されたアヒルの場合、前記 D H B V コアキメラ抗原ワクチンは

10

20

30

40

50

、対照群と比較したとき、18週間目までウィルス症の減少を示したが、長期的に見たときには、この効果が保たれなかった。これは、おそらく、鳥類における保持（記憶）T細胞の欠損のためであろうと推察される。3TCと前記コアキメラ抗原ワクチンを用いた融合治療は、対照群と比較したとき、3TCの投与を中止した後、前記ウィルスの再拡大時点が遅くなったということを示す。慢性的に感染されたアヒルは、前記HBVコアキメラ抗原ワクチンに対して抗体レベルの増加を示した。前記ワクチンに対して注目に値するほど不利な反応はなく、しかも、前記キメラ抗原ワクチンの投与と関わる疾病や死亡もまたなかった。

【0139】

実施例2．慢性感染の治療のための免疫治療法としてのHBVコアキメラ抗原ワクチンの評価（研究は、NIH USA, Expt. No. NHA-77により2007年10月に行われた）

【0140】

1．HBVコアキメラ抗原ワクチンの設計

【0141】

前記HBVコアキメラ抗原ワクチン単量体融合タンパク質は、次のように模式的に示される。（N-末端）6xHis-rTEVプロテアーゼサイトーHBVコアタンパク質―――[IRD]―――リンカーペプチドーPart CH1-CH2-CH3ーペプチド（C-末端）[TBD]、図11を参照。

【0142】

2．慢性HBV感染の治療のためのトランスジェニックマウスモデル

【0143】

HBVトランスジェニックマウスは、HBV感染、ウィルス複製、および免疫治療をはじめとする様々な治療方法を研究するために開発された実験モデルである。前記HBVコアキメラ抗原のみを用いた免疫反応と、HBV抗ウィルス剤（アデホビルピボキシル（ADV））と組み合わせて用いた免疫反応が実験された。

【0144】

2.1 物質と方法

【0145】

動物：

【0146】

同型のHBVトランスジェニックマウスの雄性和雌性が用いられた（ 22.2 ± 2.8 g）。マウスは、もともとフランクチサリ（Scripps研究所、ラホヤ、カリフォルニア）（Guidotti et al., 1995）から取得したものであり、次いで、AAALAC（American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care；米国実験動物介護認証協会）の認定を受けたユタ州立大学実験動物研究センター（Laboratory Animal Research Center；LARC）生物安定性レベル3（Biosafety Level 3；BL-3）領域において飼われた。動物は、founder 1.3.32に由来したものである。実験前に肝生検を通して肝HBV DNAを取得し、かつ検定し、引き続き、実験群にブロック無造作化された。この研究は、ユタ州立大学の動物介護および利用委員会の承認を受けて行われ、満了日は、2008年6月8日であった。研究は、AAALACの認証を受けたユタ州立大学実験動物研究センターにおいて行われた。米国政府（国立保健院（NIH））の承認は、国立保健院実験動物の介護と利用に関する指針（1996年に改訂）に準拠して2002年2月27日に更新された（確認番号A3801-01）。

【0147】

マウスは、3週間前に離乳をすることや硬い食べ物を食べることを許諾されず、持続的に高い肝HBV DNA力価（titer）を有さなければならなかった。このようなマウスの利用は、検査の限界値において肝HBV DNAを発現する動物の進入を避ける。

10

20

30

40

50

したがって、出願者は、早く離乳しなかったマウスを利用し、これらのマウスが実験前に肝HBV DNA値を得るために生検された。

【0148】

化合物：

【0149】

前記HBVコアキメラ抗原ワクチンが以上において与えられた指示事項に準拠して用意された。前記液体形態のワクチンが緩衝液（最終的な透析緩衝液）により前述したレベルまで希釈され、実験期間の間に2～8℃において保存された。

【0150】

アデホビルビボキシル（ADV）は、ユタ州立大学（USU）によりギリアドサイエンシズ（フォスターシティ、カリフォルニア）から得た。前記ADVを陽性制御として用いるために許可を受けた。前記ADVは、クエン酸（0.05M，pH2.0）において用意され、これは、液体懸濁液において前記ADVの溶解度を向上させるために用いられた。前記ADVは、0.1mLを経口摂食により投与した。

【0151】

肝HBV DNA効力検定：

【0152】

肝組織は、検視したや否や、溶解緩衝液において均質化された。組織（約0.1g）は、溶解緩衝液（1mM EDTA、10mM Tris、10mM塩化ナトリウム、0.5% SDS、プロテアーゼK）を含む微細遠心分離機チューブにおいて納まりが良い乳棒により粉碎された。常温において5～10分間培養した後、チューブは保存のために液体窒素において凍結された。DNAの抽出のために、サンプルは55℃において2～4時間の間に培養された。前記サンプルは、150μLの水と350～500μLのフェノールを含むPhase Lock™ゲルチューブに注入された。15分間12,000rpmにて震盪させ、遠心分離された後、中身は350～500μLのクロロホルムを含む第2のチューブに注入された。遠心分離後に、DNAは50μL 5M塩化ナトリウムおよび650μLのイソプロパノールとともに沈殿され、70%エタノールにより洗浄された。乾燥された粒は、1μL Rnaseを含む500μL TE緩衝液において均一に行き渡り、時々震盪されながら55℃において一晚中培養された。明示された量のDNA溶液は、普通、40μgを含むが、37℃において3時間の培養期間の間にHind III酵素とともに消化された（ニューイングランドバイオ研究所、ビバリー、マサチューセッツ）。Hind IIIは、前記HBV導入遺伝子配列内において切断されないということが明らかになった。消化されたDNAは、1% TAEを緩衝液としたアガロースゲルを用いて、80Vにおいて3～4時間の間に電気移動により分離された。DNAは、次いで、アルカリ転移方法によりBioDyne™ B正電荷ナイロンメンブレインに転移された。アルカリ転移方法を用いるときには、次のような修正事項を順守した。1）前記ゲルは、0.4M水酸化ナトリウムに15～30分間浸された。2）前記ナイロンメンブレインは水により、その後には、0.4M水酸化ナトリウムにより5分間浸された。転移に用いられたスポンジもまた、0.4M水酸化ナトリウムにすっかり浸された。処理した前記ゲルは、スポンジの吸収紙の上に置かれた（ウェル付き面が下に来るように）。転移は、3時間の間に起こり、その後、前記ゲルは廃棄され、前記ナイロンメンブレインは0.2M Tris（pH 7.6）、2xSSC、および0.1% SDS溶液において洗浄された。前記メンブレインは、30分よりも長く80℃においてベーキングされ、UV Strat a linker™ 1800（Stratagene、ラホヤ、カリフォルニア）を用いてUV紫外線により固定された。混成化前に、フィルターは中性化溶液0.1xSSCと0.1% SDSにより30分間2回洗浄された。[32P]CTPにより標識された、HBVゲノムプローブ（Hae IIIにより消化された）を用いた混成化は、pBluscriptプラスミド（ルカグイドッティ博士のプレゼント、Scrrips研究所、ラホヤ、カリフォルニア）によりクローニングされ、一晚中60℃において10% PEG-8000、0.05M NaPO4、0.21mg/mLサケ精子DNA、およ

10

20

30

40

50

び7% SDSにより発生した。

【0153】

放射線信号は、リン光イメージング方法 (Optiquant) を用いて測定された。紫外線フィルターの画像は、一晩中にCyclone™貯蔵燐光体スクリーン (パーキンエルマー多重感受性培地、タイプMSPPN7001723) を介して晒された。露光された画面は、Cyclone™ドラムに移され、600dpiセッティングを用いて読み取られた。宿主DNAあたりのウィルスDNAの濃度を決めるために、ウィルスDNA結合と導入遺伝子結合の比率を利用した。この計算は、前記トランスジェニックマウスの種においては宿主細胞1個あたりに導入遺伝子細胞が1.3個存在するということに基づいている (F. チサリ博士との個人的な会話において)。前記導入遺伝子は、同型細胞宿主DNA μg あたりにHBV DNAのpgを計算する内部的な指標として使われた。

【0154】

肝HBcAg効力検定：

【0155】

B型肝炎コア抗原 (HBcAg) の検査のために、肝生検は、まず、パラフィン包埋された。前記パラフィンは、次いで、キシレンにより5分間2回処理することにより、前記セクションから除去された。組織は、95%エタノールで3分間2回処理することにより固定された。セクションは3分間脱イオン水により処理され、5分間3%過酸化水素水に晒され、ビオチンブロック (#X0590, Dako Corporation) に5分間晒された。主な抗体、ウサギ抗HBcAg (1:100希釈) (#B0586, Dako Corporation)、ヤギ抗ウサギ2次抗体 (#k684 Dako, LSABペルオキシダーゼキット)、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ (#K684 Dako, LSABペルオキシダーゼキット)、および基質色素原溶液 (3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC)) がそれぞれ30分、30分、10分、10分の期間の間に加えられた。区画は、搭載される前にマイヤーのヘマトキシリンにより対比染色された。

【0156】

三つの異なるパラメーターが各組織区画から取得された。最初の二つの測定は、肝の中心静脈を取り囲んだ細胞が肝の他の領域よりもさらに強く染色されるという観察に基づくものであり (個人的な観察)、腹腔内に投与された薬は、静脈のルミナル細胞にさらに早く近づくという観察にも基づく。最初の二つのパラメーターは、中心静脈を取り囲んだ細胞の数を数えることにより取得された。中心静脈を取り囲む、細胞の総数、染色された核がある細胞の数、染色された細胞質がある細胞の数が計算された。染色された核がある細胞の数または染色された細胞質がある細胞の数は、細胞の総数により割られた。三つの中心静脈領域が各スライドサンプルにより計算された。三番目のパラメーターの場合、中心静脈領域ではない領域の染色された核がある細胞の数を数えた。全体の領域の1/4が数えられた。三つの領域が肝の区画あたりの細胞数として数えられた。サンプルのアイデンティティは、スライドを読み取る人にはブラインド処理された。

【0157】

血清HBeAg：

【0158】

総血液サンプルが心臓穿刺により検視されながら取得された。総血液は、その後、ヘパリンを含むガラス瓶に移され、血清構成要素の収集のために遠心分離された。次いで、前記血清10 μL が90 μL の陰性制御血清により希釈され、各サンプルあたりに1:10の希釈液の比率を示した。陽性制御とキャリブレーター希釈液 (calibrator diluent) の連続した希釈とともにサンプルが製造会社の指図に準拠してHBeAg特異的なELISA (国際免疫診断 (International Immuno Diagnostics)、フォスターシティ、カリフォルニア) において作動された。キャリブレーターPEI単位として知られている単位を用いつつ、PEI単位は、陽性血清の連続した希釈のために形成された。グラフが生成され、外挿法が用いられた。これは、高

い信頼レベルのPEI単位値を(R2値0.9816)高い信頼レベルの各サンプル(R2値0.9816)に割り当てるためであった。ELISA製品の判定基準値もまた用いられた。

【0159】

血清HBsAg:

【0160】

HBeAg ELISAのために集められかつ用意された同じ前記血清サンプルが前記HBsAg ELISAのために用いられた。15 µLの血清が同様の方法により希釈され、製造会社の指図に準拠してHBsAg特異的なELISA(国際免疫診断(International Immuno Diagnostics)、フォスターシティ、カリフォルニア)において作動された。次いで、製品の判定基準値の表(ブランク補正あり)と製造会社の判定基準値の公式(ブランク補正なし)が両方とも解析された。

【0161】

サイトカインアレイ-プラズマ:

【0162】

HBeAgとHBsAg ELISAのために集められかつ用意された前記同じ血清サンプルがまた血清サイトカインの効力検定に用いられた。5 µLの血清が120 µLのサンプル希釈緩衝液により希釈され、これにより、各サンプルごとに1:25の希釈比率を示した。30 µLの用意されたサンプルが製造会社の指図に準拠してQ-Plex™マウスサイトカインアレイ(Quansys Biosciences社製、ローガン、ユタ)において作動された。完全に開発されたサイトカイン皿が、次いで、Fuji LAS-3000ルミネセンスイメージアナライザー(Fuji Life Sciences社製、スタンフォード、コネチカット)においてtif画像として取り込まれ、Quansys Array Software™, version 1.3により解析された。

【0163】

サイトカインアレイ-肝と脾臓:

【0164】

肝と脾臓の組織(それぞれ約35 mg)が検視中に集められ、速やかに0.1% Np-40を含む殺菌PBSにおいて均質化された。この均質化されたサンプルは、次いで、効力検定が行われるまで液体窒素において冷凍された。効力検定を行うすぐ前に、サンプルは固体団塊を除去するために急激に溶かされ、3000 rpmにおいて20分間遠心分離された。次いで、前記上澄み液がサンプル希釈緩衝液において1:5の比率に希釈され、製造会社の指図に準拠して、Q-Plex™マウスサイトカインアレイ(Quansys Biosciences社製、ローガン、ユタ)において作動された。完全に開発されたサイトカイン皿が、次いで、Fuji LAS-3000ルミネセンスイメージアナライザー(Fuji Life Sciences社製、スタンフォード、コネチカット)においてtif画像として取り込まれ、Quansys Array Software™, version 1.3により解析された。

【0165】

プラスミドインターフェロン-γ効力検定:

【0166】

IFN-γ ELISAキット(BD Opt EIA ELISAセットマウスIFN-γキット, cat. # 551866)が、一回目のワクチンを接種してから1、14、35、56日目に集められたプラズマを効力検定するために用いられた。

【0167】

プラズマ化学パネル:

【0168】

特に、獣医学のために設計されたVetScan(R)化学、電解質およびT4アナライザーがBL-2研究所において「総合診断プロファイル」にサンプルを処理するために用いられた。「総合診断プロファイル」は、ALT、BUN、クレアチニン、総ビリルビン、

10

20

30

40

50

アルブミン、アルカインホスファターゼ、グロブリン、糖、Na⁺、K⁺、リン、および総タンパク質を含む。機械のためのプロトコルもまた順守された。

【0169】

肝HBV RNA：

【0170】

リアルタイムRT-PCRが肝生検組織のHBV特異的RNAを効力検定するために用いられた。組織から出た総RNAは、TrizolTM試薬を用いて抽出された。プライマー対 (primer-pairs) (HBV3順ATAAACGCCGCAGACACATC、HBV3逆AACCTCCAATCACTCACCAACC)とHBV3 Taq-manプローブ [6~FAM] -AGCGATAACCAGGACAAGTTTGGAGGACA-[BHQ1a~6FAM] が用いられた。2番目のプライマー対 (HBV4順GGACAACGGGCAACATACCT、HBV4逆TCTTCTCTCTTCACTCTGCCTGCT)、およびHBV4 Taq-manプローブ [6~FAM] TCCAGAAAGAACCAACAAGAAGATGAGGCA [BHQ1a~6FAM] が用いられた。2対の間の注目に値する相違点はなかったため、前記HBV3プローブ/プライマー対が用いられた。二重重合酵素連鎖反応がマウスGAPDHプライマー/プローブの内部制御により行われた。プライマーとプローブは、順GCATCTTGGGCTACACTGAGG、逆GAAGGTGGGAAGAGTGGGAGTTG、およびプローブ [5~HEX] -ACCAGGTGTCTCTCTGCGACTTCAACAG-[BHQ1a~5HEX] であった。ワンステップFull VelocityTM QPCRマスターミックス (Stratagene社製、ラホヤ、カリフォルニア) がRT、HBV RNAの増幅、およびマウスGAPDHのために用いられ、プライマーとプローブは、最終濃度0.1 μMに設定されていた。総細胞RNA 2 μLが感染群や対照群の組織から抽出されて用いられた。サンプルは、DNAエンジンオプティコン2 (MJ Research Inc、ウォルサム、マサチューセッツ) において作動された。25 μL反応液は、12.5 μL Full VelocityTM QPCRマスターミックス、0.375 μL希釈リファレンス色素 (1:500)、0.25 μL StratascryptTM RT/RNase遮断酵素混合物、および0.5 μL Full VelocityTM 酵素から構成されている。反応液は、二つのHBV-プライマー0.25 μL、二つのGAPDH-プライマー0.25 μL、二つのプローブ0.25 μLを含んでおり、総反応液は、いずれも10 μMの原液を含む。細胞RNAの逆転写は、30分間50℃において行われ、PCRは、2分間1周期を95℃において、次いで、10秒間40周期を95℃において、さらに、30秒間60℃において行われた。効力検定は、検量線を得るために前記HBVトランスジェニックマウスから肝RNAを抽出して10回の希釈により実行された。Y軸は、10回希釈された希釈液の1回の分量を、x軸はC値を示す。R²値は、曲線の質を測定するために用いられ、常に0.098の上にあった。平均C (t) 値は、各サンプルの複製のために取得された。各サンプルの平均C (t) 値は、標準曲線のfit lineの公式を用いて、ログ相対RNA値を取得するために使われた。

【0171】

統計解析：

【0172】

プリズム4を用いたニューマン-コイルス多重比較検定 (Graph Pad Software, Inc. 製) を用いて分散の一方方向解析が行われた。

【0173】

2.2 実験設計

【0174】

実験設計は、表1に示されている。実験前に肝生検において測定可能なHBV DNA発現を有する前記HBVトランスジェニックマウスは、グループの間において任意に抽出された。この場合、下記に示す治療グループ7個のうちの1個が0、21、42日目を基準として皮下 (皮膚内) 治療を受けたヘパリン化された血漿は、14、35、56日目に

10

20

30

40

50

集められるが、各ワクチンを接種してから2週間の後であった。56日目に、マウスは、肝と最終血漿の収集前に安楽死させられた。血漿は、 $\text{IFN-}\gamma$ （サプライヤーに出荷）とALT（もし、残っている量が十分であれば、血漿HBV抗原）により効力検定された。肝は、HBV DNAとサイトカインアレイのために集められた。三つの肝組織がバックアップ用に冷凍された。

【表1】

実験設計

各ケー ジの数	グルー プ数	遺伝子 改変	薬	投与量	治療日
6	1	T g	キャリア緩衝液	—	皮下注射 0、21、42日目
6	2	T g	抗原単独	1. 25 μg タンパク 質/マウス	皮下注射 0、21、42日目
6	3	T g	HBVコアワク チン	1 μg タンパク質 /マウス	皮下注射 0、21、42日目
6	4	T g	HBVコアワク チン	2. 5 μg タンパク質 /マウス	皮下注射 0、21、42日目
6	5	T g	HBVコアワク チン	5 μg タンパク質 /マウス	皮下注射 0、21、42日目
6	6	T g	HBVコアワク チン+ADV	2. 5 μg タンパク質 /マウス+1 mg/k g ADV	皮下注射 0、21、42日目
6	7	N o n - t g	HBVコアワク チン		皮下注射 0、21、42日目

【0175】

2.3 結果

【0176】

リアルタイムPCR（図12A）やサザンブロットハイブリダイゼーション（図12B）により測定したとき、前記HBVコアキメラ抗原ワクチン単独では肝HBV DNAに有意な影響を及ぼすことができなかった。期待されたように、ADV 5 mg/kg/日は、肝HBV DNAを低下させた。前記HBV肝RNAは、ワクチンにより有意に変化されなかった（図13B）。これらの結果は、トランスジェニックマウスの耐性が前記ワクチンにより破壊されなかったということを示唆する。

【0177】

血漿ALTは、キャリア緩衝液により治療された動物においては増加しなかったものの、さらに多くの量のHBVコアワクチン（2.5～5.0 μg /マウス）により治療されたマウスにおいては、前記トランスジェニックマウスと非トランスジェニックマウスの両方ともにおいて増加した。これを通して、前記ワクチン単独にて血球からのALTの放出を引き起こしたということが分かる（図13A）。しかしながら、全体の体重の変化に応じては、前記ワクチンは、いかなる毒性も引き起こさなかった（図14）。

【0178】

QuansysTMアレイによれば、HBVコアワクチンは、 $\text{IFN-}\gamma$ を含み、肝（図15A～図15P）、血漿（図16A～図16P）、および脾臓（図17A～図17P）組織の検死日にサイトカインアレイに目立つような影響を及ぼさなかった。 $\text{IFN-}\gamma$ がウィルスに特異的な細胞毒性T細胞（CTL）の指標になり得るため、マウス $\text{IFN-}\gamma$ 専用のELISAキットを用いて、出願者は各ワクチンを接種してから2週間が過ぎた後、血漿を集めて効力検定を行った。例えば、14、35、56日目に集め、1日目が対照の基準となった（図18A～図18D）。基準線（波線）は、基準線の上にあるサンプル

がIFN- γ に陽性であると思なされ得るように平均の三種類の標準偏差により計算された。前記ワクチンの投与前（1日目）に集められた四匹のマウスのサンプルが前記基準線の上にあった（図18A）。これは、おそらく、環境において誤りがある抗原に起因することであり、HBV特異的なCTL反応に起因することではない。以上とほぼ同じ数字である四つと三つの血漿サンプルがそれぞれ14日目（図18B）と35日目（図18C）に採取されたが、これもまた、前記基準線の上であり、これは、誤りにより上昇したCTL反応が原因であった。しかしながら、56日目のサンプル九個（図18D）は基準線を超えており、前記サンプルのうちの六個は、他のIFN- γ 値よりも最も早い時点において高かった。図19は、HBVコアワクチンの治療を受けたマウスの数を合算した値を示す。たとえグループが統計的に異なっていないとしても、56日目のサンプルは注目に値するほど高いIFN- γ 値を有しており、これは、2週間おきに合計で3回接種したワクチンが前記トランスジェニックマウスにおいてHBVに対する耐性を破壊した可能性があるということを示唆する。

【0179】

2.4 まとめ

【0180】

2週間おきの皮下注射ワクチンの3回の接種は、血漿IFN- γ の増加により確かめられたように、あるトランスジェニックマウスにおいてHBVに対する耐性を破壊した可能性がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0181】

【文献】Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

【文献】Beasley, R. P. (1988). Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61, 1942-1956.

【文献】Bouchard, M. J. and Schneider, R. J. (2004). The enigmatic X gene of Hepatitis B virus. *J. Virol.* 78: 12725-12734.

【文献】Block, T. M., Rawat, S., and Brosgart, C. L. (2015). Chronic hepatitis B: A wave of new therapies on the horizon. *Antiviral Res.* 121: 69-81.

【文献】Block, T. M., Alter, H., Brown, N et al. (2018). Research priorities for the discovery of a cure for chronic hepatitis B: Report of a workshop. *Antiviral Res.* 150: 93-100.

【文献】Block, T. M., Alter, H. A., London, W. T and Bray, M. (2016). A historical perspective on the discovery and elucidation of the hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 131: 109-123.

【文献】Bertoletti, A and Maini, M. K (2000). Protection or damage: A dual role for the virus-specific cytotoxic T lymphocyte response in hepatitis B and C infection? *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 387-392.

10

20

30

40

50

【文献】Bertoletti, A., D'Elia, M. M., Boni, C., De Carli, M., Zignego, A. L., Durazzo, M., Iissale, G., Penna, A., Ficcadori, F., Del Prete, G and Ferrari, C. (1997). Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 112: 193-199.

【文献】Campton, K., Ding, W., Yan, Z., Ozawa, H., Seiffert, K., Miranda, E., Lonati, A., Beissert, S., and Granstein, R. D. (2000). Tumor antigen presentation by dermal antigen-presenting cells. *J Invest Dermatol* 115, 57-61.

10

【文献】Chang, S. F., Netter, H. J., Hildt, E., Schuster, R., Schaefer, S., Hsu, Y. C., Rang, A and Will, H. (2001). Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. *J. Virol.* 75: 161-170.

20

【文献】Chisari, F. V and Ferrari, C (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 29-60.

【文献】Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 15, 617-648.

【文献】Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E and Biasini, E (2010). Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 138: 682-693.

30

【文献】Fong, L., and Engleman, E. G. (2000). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 18, 245-273.

【文献】Ganem, D (2001). The X files. One step closer to closure. *Science* 294: 2376-2378.

【文献】Geijtenbeek, T. B. H., van Vliet, S. J., Engering, A., Hart, B. A., and van Kooyk, Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-Type lectins on dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 22: 33-54.

40

【文献】Geijtenbeek, T. B. H., van Vliet, S. J., Engering, A., Hart, B. A., and van Kooyk, Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-Type lectins on dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 22: 33-54.

【文献】George, R., Ma, A., Motyka, B., Shi, Y. E., Liu, Q. and Griebel, P. (2020). A dendritic cell-targeted chimeric hepatitis B vir

50

us immunotherapeutic vaccine induces both cellular and humoral immune responses in vivo. Hum Vaccin Immunother. 16 (4) : 779-792.

【文献】George, R., Motyka, B., Ma, A., Wang, D., Eng, H., Xu, B., Polakowski, R., Noujaim, A. A., and Tyrrell, D. L. J. (2005). A new class of therapeutic vaccines produced in insect cells for the treatment of chronic viral infections. BioProcessing J. 4: 39-45.

10

【文献】George, R., Tyrrell, D. L. J., Noujaim, A. A., Ma, A., Xu, B., Wang, D., Eng, H., Polakowski, R., Szpacenko, A., and Motyka, B. (2006). A new class of therapeutic vaccines for the treatment of chronic hepatitis B infections. In "Framing the Knowledge of Viral Hepatitis" Schinazi, R. F and Schiff, E. R Editors, IHL Press USA.

【文献】Guidotti, L. G., Borrow, P., Hobbs, M., Matzke, B., Gresser, I., Oldstone, M. B and Chisari, F. V. (1996a). Viral cross talk: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 4589-4594.

20

【文献】Guidotti, L. G., Ishikawa, T., Hobbs, M., Matzke, B., Schreiber, R and Chisari, F. V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. Immunity 4: 25-36.

30

【文献】Guidotti, L. G., Matzke, B., Schaller, H., and Chisari, F. V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. Journal of Virology 69, 6158-6169.

【文献】Guidotti, L. G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R and Chisari, F. V. (1999). Virus clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science 284: 825-829.

【文献】Gust, I. D., Burrell, C. J., Robinson, W. S and Zuckerman, A. J (1986). Taxonomic classification of human hepatitis B. Intervirology 25: 14-29.

40

【文献】Hafkemeyer, P., Keppler-Hafkemeyer, A., al Haya, M. A., von Janta-Lipinski, M., Lehmann, C., Offensperger, W. B., Offensperger, S., Gerok, W and Blum, H. E (1996). Inhibition of duck hepatitis B virus replication by 2', 3'-dideoxy-3'-fluoroguanosine in vitro and in vivo. Antimicrob. Agents Ch

50

emootherap. 40: 792-794.

【文献】Heuss, L., Heim, M.H., Schultz, U., Wi
ssmann, D., Offensperger, W.B., Staeheli,
P and Blum H.E. (1988). Biological efficac
y and signal transduction through STAT pro
teins of recombinant duck interferon in du
ck hepatitis B virus infection. J. Gen. Vi
rol. 79: 2007-2012.

【文献】Hilgers, L.A., Lejeune, G., Nicolas,
I., Fochesato, M., and Boon, B. (1999). Su
lfolipo-cyclodextrin in squalane-in-water
as a novel and safe vaccine adjuvant. Vacc
ine 17, 219-228.

10

【文献】Jilbert, A.R., Botten, J.A., Miller,
D.S., Betram, E.M., Hall, P., Kotlarski, I
and Burrell, C.J. (1998). Characterizatio
n of age- and dose- related outcomes of du
ck hepatitis B virus infection. Virology 2
43: 273-282.

【文献】Jilbert, A.R and Kotlarski, I. (2000).
Immune response to duck hepatitis B virus
infection. Dev. Comp. Immunol. 24: 285-302.

20

【文献】Klein, N.P and Schneider, R.J (1997).
Activation of Src family kinases by Hepati
tis B virus HBx protein and coupled signal
ing to Ras. Mol. Cell. Biol. 17: 6427-6436.

【文献】Lai, W.C., and Bennett, M. (1998). DNA
vaccines. Crit Rev Immunol 18, 449-484.

【文献】Larsson, M., Fonteneau, J.F., and Bha
rdwaj, N. (2001). Dendritic cells resurre
ct antigens from dead cells. Trends Immuno
l 22, 141-148.

30

【文献】Laupeze, B., Fardel, O., Onno, M., Ber
tho, N., Drenou, B., Fauchet, R., and Amio
t, L. (1999). Differential expression of m
ajor histocompatibility complex class Ia,
Ib, and II molecules on monocytes-derived
dendritic and macrophagic cells. Hum Immu
nol 60, 591-597.

【文献】Lau, J.Y. and Wrught, T.L. (1993). Mol
ecular virology and pathogenesisi of hepa
titis B. Lancet 342: 1335-1340

40

【文献】Le Guerhier, F., Thermet, A., Guerret,
S., Chevallier, M., Jamard, C., Gibbs, C.S
. , Trepo, C., Cova, L and Zoulim, F (2003)
. Antiviral effect of adefovir in combinat
ion with a DNA vaccine in the duck hepatit
is B infection model. J. Hepatol. 38: 328-3
34.

【文献】Liang, T.J., Block, T.M, McMahon, B.J

50

. , Ghany, M. G. , Urban, S. , Guo, J. T. , Locarini, S. , Zoulim, F. , Chang, K. M. m and Lok, A. S. (2015). Present and future therapies of hepatitis B : from discovery to cure. *Hepatology* 62:1893-1908

【文献】Lorenz, M. G. , Kantor, J. A. , Schlom, J. , and Hodge, J. W. (1999). Anti-tumor immunity elicited by a recombinant vaccinia virus expressing CD70 (CD27L). *Hum Gene Ther* 10, 1095-1103.

【文献】Ma, A. , Motyka, B. , Gutfreund, K. , Shi, Y. E. and George, R. (2020). A dendritic cell receptor-targeted chimeric immunotherapeutic protein (C-HBV) for the treatment of chronic hepatitis B. *Hum Vaccin Immunother*. 16 (4) :756-778.

【文献】Mason, W. S. , Seal, G. , and Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *Journal of virology* 36, 829-836.

【文献】Newman, K. D. , Elamanchili, P. , Kwon, G. S. , and Samuel, J. (2002). Uptake of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by antigen-presenting cells in vivo. *J Biomed Mater Res* 60, 480-486.

【文献】Marion, P. L. , Knight, S. S. , Ho, B. K. , Guo, Y. Y. , Robinson, W. S. and Popper, H. (1984). Liver disease associated with duck hepatitis B virus infection of domestic ducks. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 898-902

【文献】Marion, P. L. , Oshiro, L. S. , Regnery, D. C. , Scullard, G. H. , and Robinson, W. S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2941-2945.

【文献】Mason, W. S. , Seal, G and Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36: 829-836.

【文献】Meier, P. , Scougall, C. A. , Will, H. , Burrell, C. J and Jilbert, A. R. (2003). A duck hepatitis B virus strain with a knockpout mutation in the putative X ORF shows similar infectivity and in vivo growth characteristics to wild-type virus. *Virology* 317: 291-298.

【文献】Newman, K. D. , Kwon, G. S. , Miller, G. G. , Chlumecky, V. , and Samuel, J. (2000). Cytoplasmic delivery of a macromolecular f

luorescent probe by poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) microspheres. J Biomed Mater Res 50, 591-597.

【文献】Newman, K. D., Samuel, J., and Kwon, G. (1998). Ovalbumin peptide encapsulated in poly (d, l lactic-co-glycolic acid) microspheres is capable of inducing a T helper type 1 immune response. J Control Release 54, 49-59.

【文献】Peng, G., Li, S., Wu, W., Tan, X., Chen, Y and Chen, Z (2008). PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. Mol. Immunol. 45: 963-970.

【文献】Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. J Exp Med 189, 371-380.

【文献】Offensperger, W. B., Offensperger, S., Keppler-Hafkemeyer, A., Hafkemeyer, P and Blum H. E (1996). Antiviral activities of pencyclovir and famcyclovir on duck hepatitis B virus in vitro and in vivo. Antivir. Ther. 1: 141-146.

【文献】Offensperger, W. B., Offensperger, S., Walter, E., Teubner, K., Igloi, G., Blum, H. E and Gerok, W. (1993). In vivo inhibition of duck hepatitis B virus replication and gene expression by phosphorothiolate modified antisense oligonucleotides. EMBO J. 12: 1257-1262.

【文献】Rehermann, B (2000). Intrahepatic T cells in hepatitis B: Viral control versus liver cell injury. J. Exp. Med. 191: 1263-1268.

【文献】Rollier, C., Charolloy, C., Jamarad, C., Trepo, C and Cova, L (2000a). Early life humoral response of ducks to DNA immunization against hepadnavirus large envelope protein. Vaccine 18: 3091-3096.

【文献】Rollier, C., Charolloy, C., Jamarad, C., Trepo, C and Cova, L (2000b). Maternally transferred antibodies from DNA-immunized avians protect offspring against hepad

10

20

30

40

50

navirus infection. *J. Virol.* 74: 4908–4911.
 【文献】Rollier, C., Sunyach, C., Barraud, L., Madani, N., Jamarad, C., Trepo, C and Cova, L (1999). Protective and therapeutic effect of DNA-based immunization against hepadnaviral large envelope protein. *Gastroenterology* 116: 658–665.

【文献】Schultz, U and Chisari, F.V. (1999). Recombinant duck interferon gamma inhibits duck hepatitis B virus replication in primary hepatocytes. *J. Virol.* 73: 3162–3168.

【文献】Schultz, U., Grgacic, E and Nassal, M (2004). Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection. *Adv. Virus Res.* 63: 1–70.

【文献】Sharma, J.M (1997). The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet. Hung.* 45: 229–238.

【文献】Sondermann, P., Kaiser, J and Jacob, U (2001). Molecular basis for immune complex recognition: A comparison of Fc-receptor structures. *J. Mol. Biol.* 301: 737–749.

【文献】Sprengel, R., Kaleta, E.F., and Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *Journal of virology* 62, 3832–3839.

【文献】Steinman, R.M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., and Mellman, I. (1999). Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 60, 562–567.

【文献】Summers, J., Smolec, J.M., and Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4533–4537.

【文献】Tarte, K., and Klein, B. (1999). Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia* 13, 653–663.

【文献】Tzeng, H.T., Tsai, H.F., Liao, H.J., Lin, Y.J., Chen, L., Chen, P.J. and Hsu, P.N. (2012). PD-1 blockade reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model. *PLoS One* 7: e39178

【文献】Urban, M.K., O'Connell, A.P and London, W.T. (1985). Sequence of events in natural infection of Pekin duck embryos with duck hepatitis B virus. *J. Virol.* 55:16–22.

10

20

30

40

50

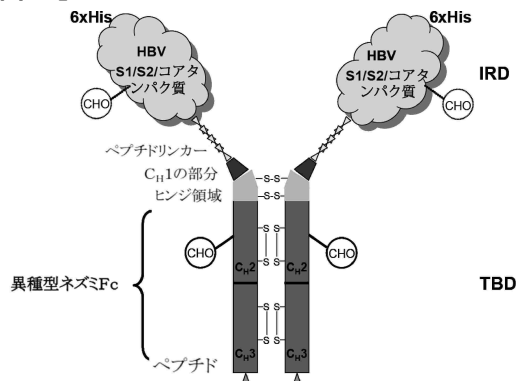
【文献】Vickery, K and Cosssart, Y. E (1996) DH BV manipulation and prediction of the outcome of infection. J. Hepatol. 25: 504-509.

【文献】Wen, Y. M., Qu, D., and Zhou, S. H. (1999). Antigen-antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B. Int Rev Immunol 18, 251-258. Zinkernagel, R. M. (1996). Immunology taught by viruses. Science 271: 173-178.

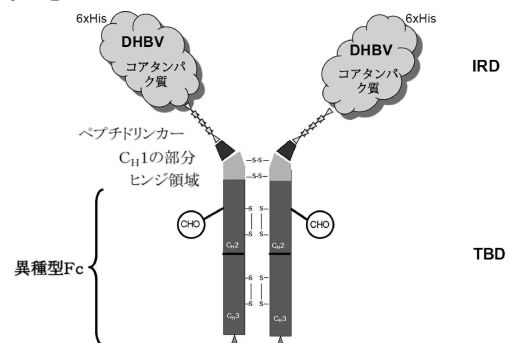
【文献】Zinkernagel, R. M. (1996). Immunology taught by viruses. Science 271: 173-178.

【図面】

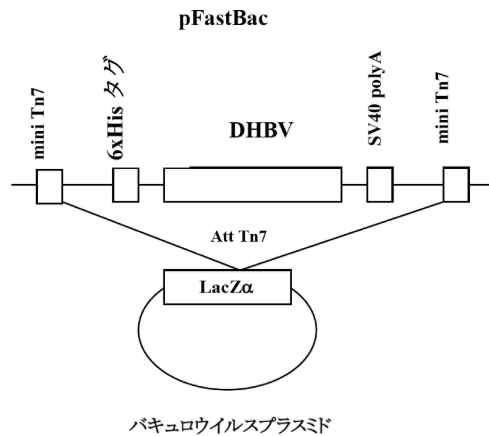
【図 1】



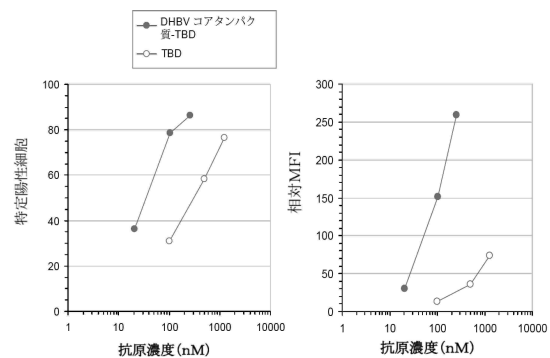
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

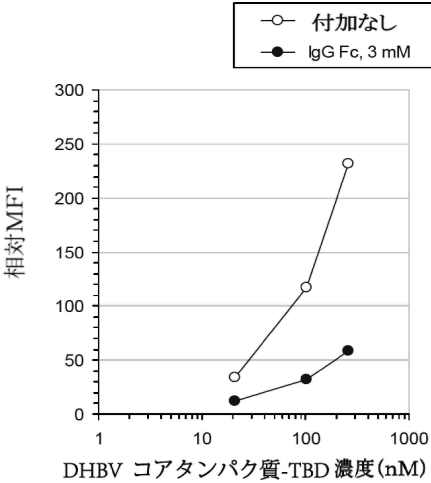
20

30

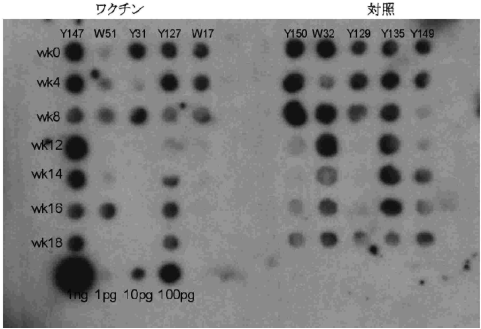
40

50

【図 5】

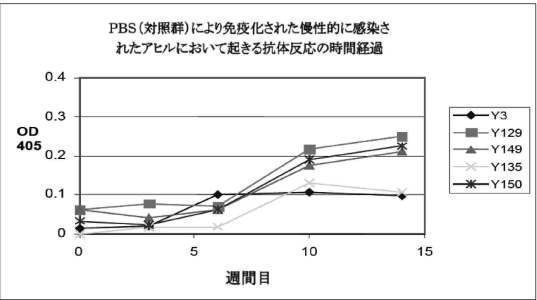


【図 6】

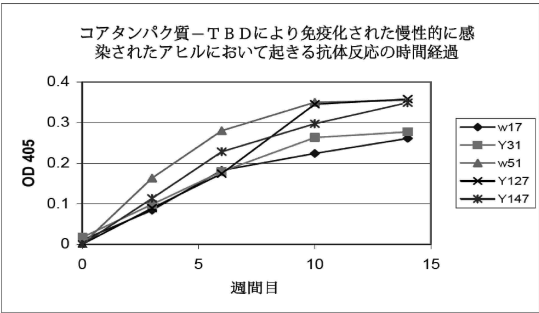


10

【図 7 A】



【図 7 B】



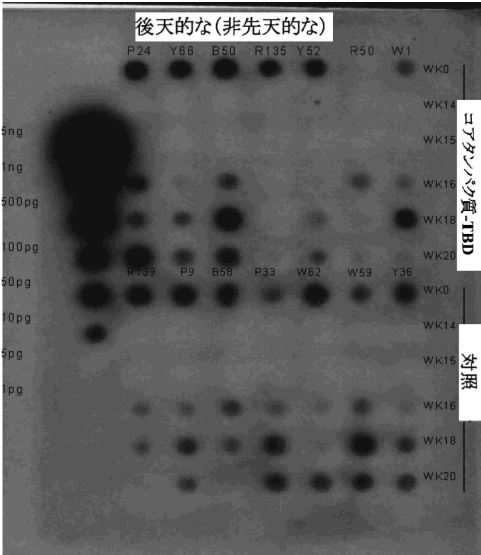
20

30

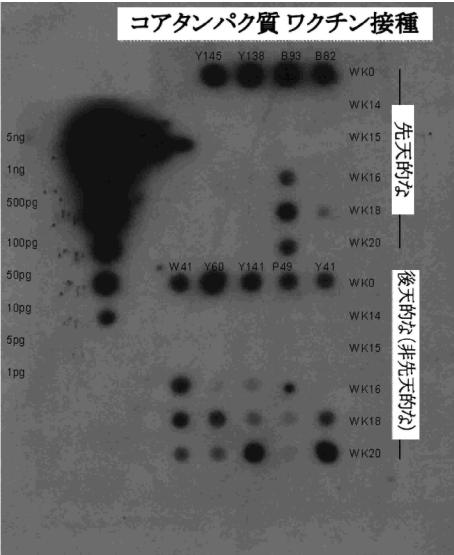
40

50

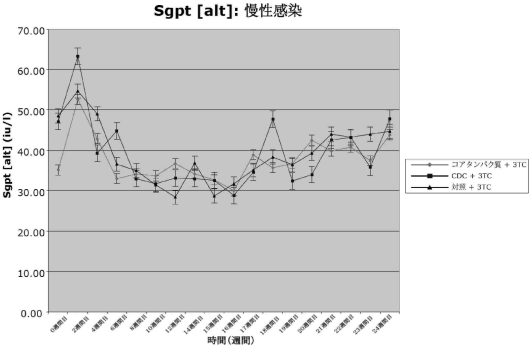
【図 8 A】



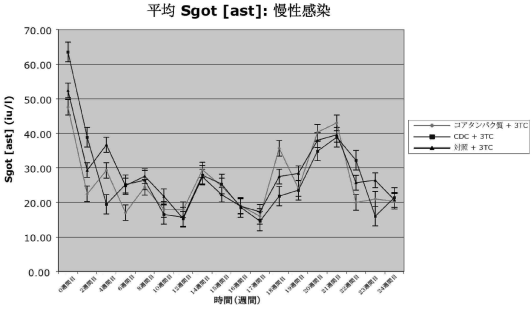
【図 8 B】



【図 9】



【図 10】



10

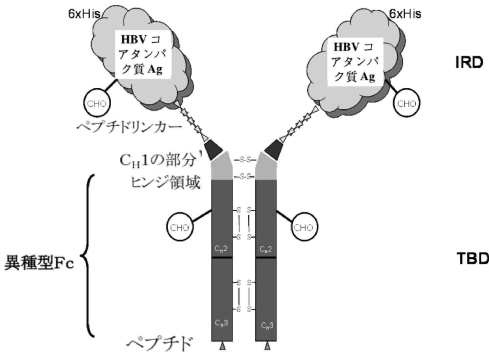
20

30

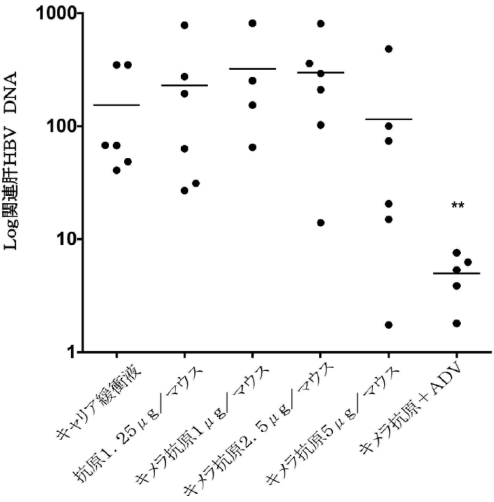
40

50

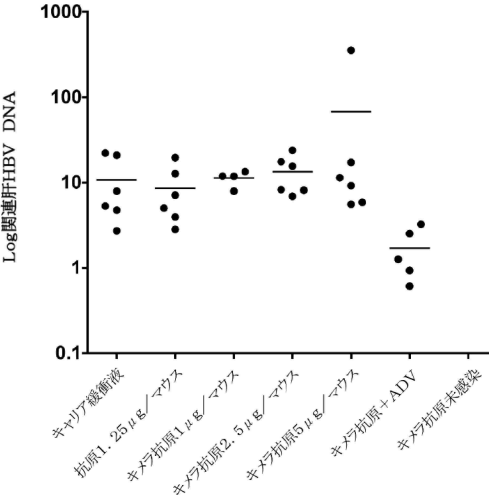
【図 1 1】



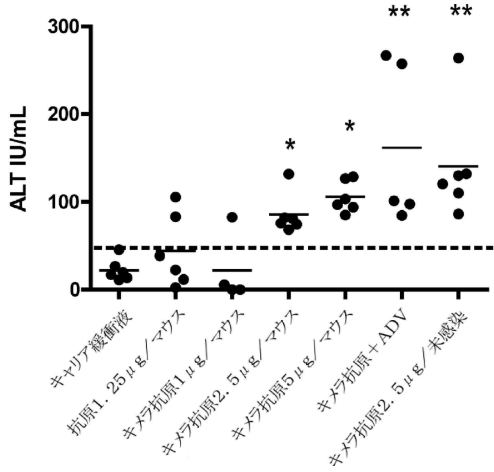
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 3 A】



10

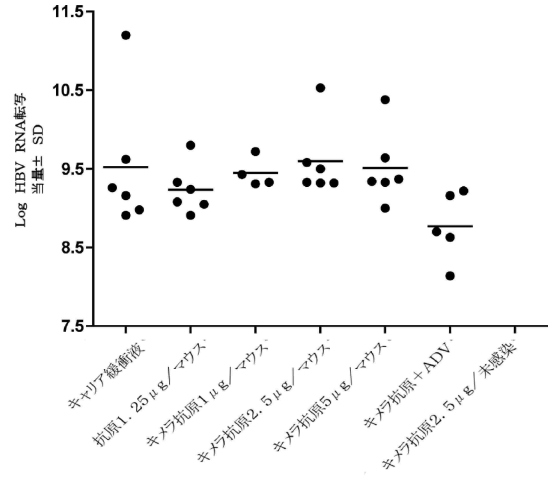
20

30

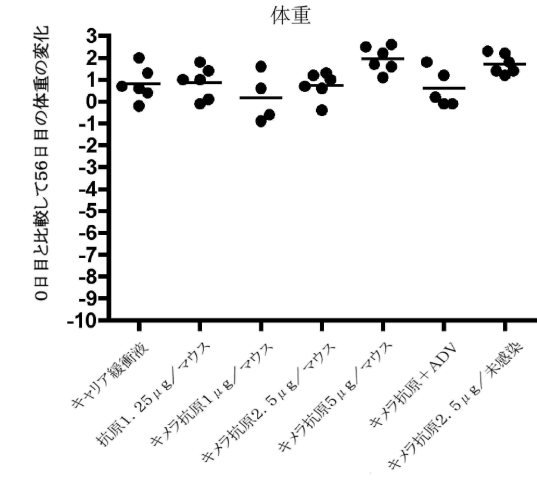
40

50

【図 1 3 B】

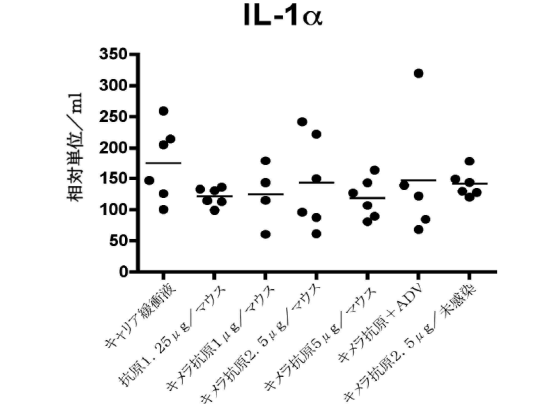


【図 1 4】

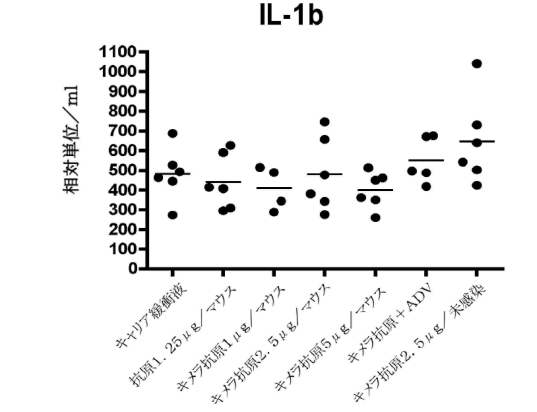


10

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



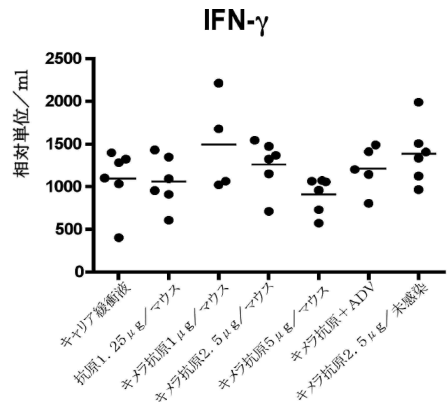
20

30

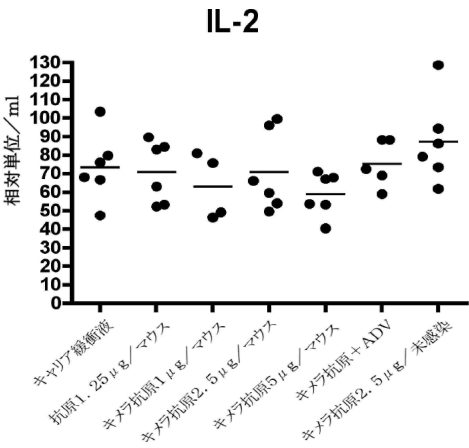
40

50

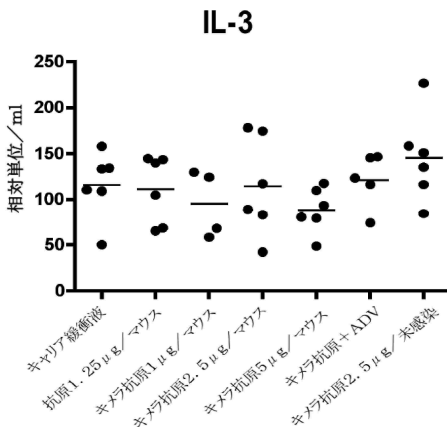
【図 1 5 C】



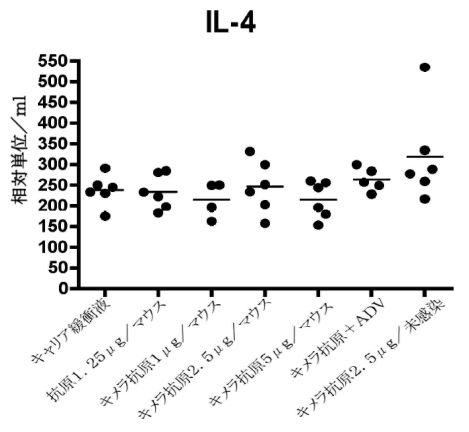
【図 1 5 D】



【図 1 5 E】



【図 1 5 F】



10

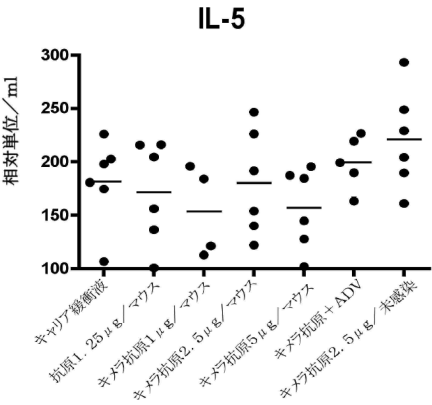
20

30

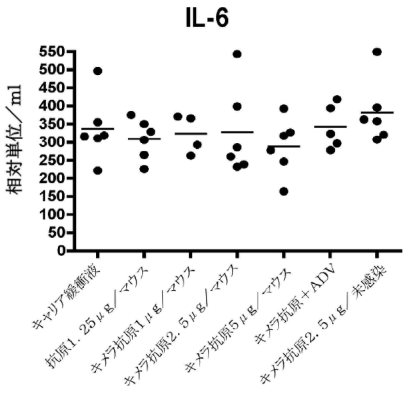
40

50

【図 1 5 G】

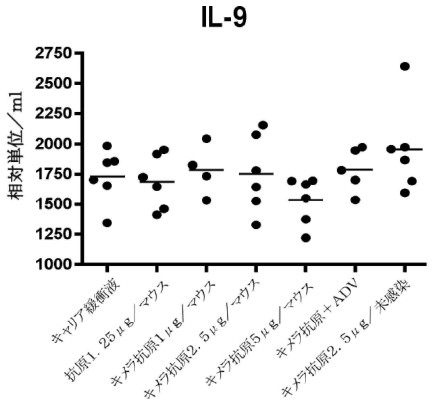


【図 1 5 H】

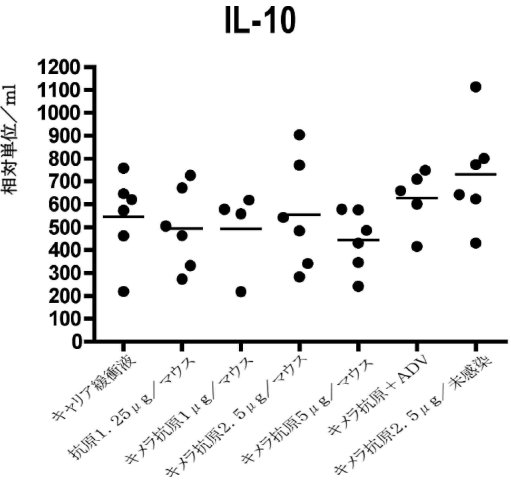


10

【図 1 5 I】



【図 1 5 J】



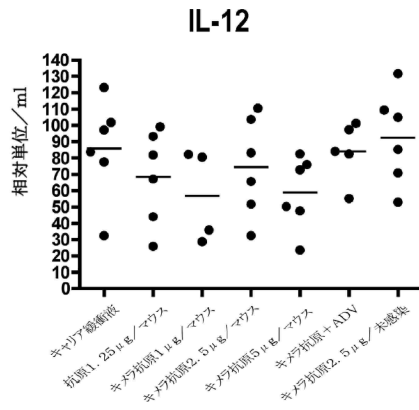
20

30

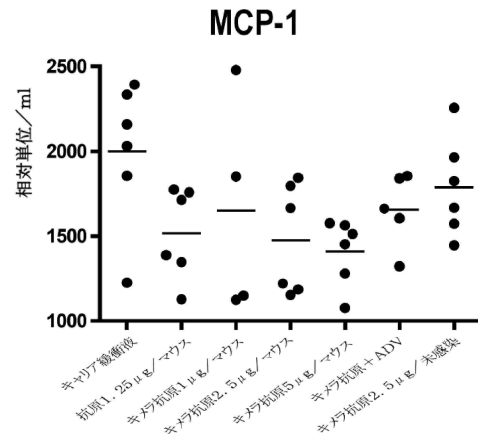
40

50

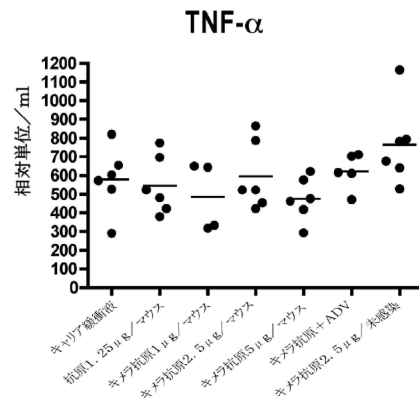
【図 1 5 K】



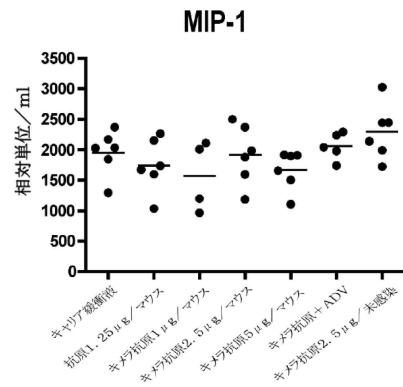
【図 1 5 L】



【図 1 5 M】



【図 1 5 N】



10

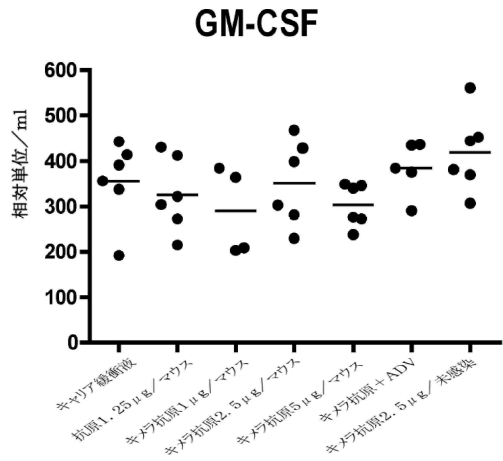
20

30

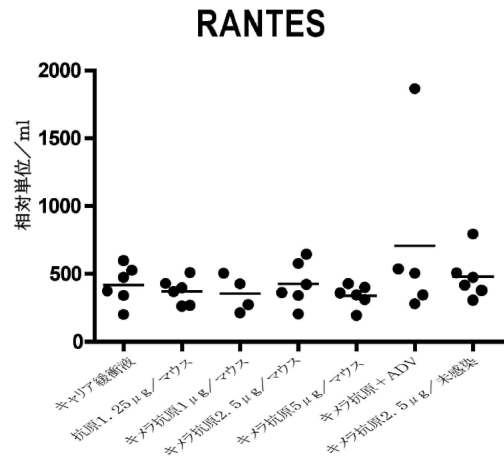
40

50

【図 1 5 O】

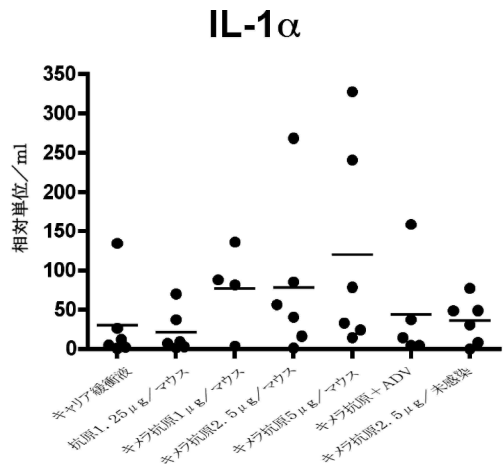


【図 1 5 P】

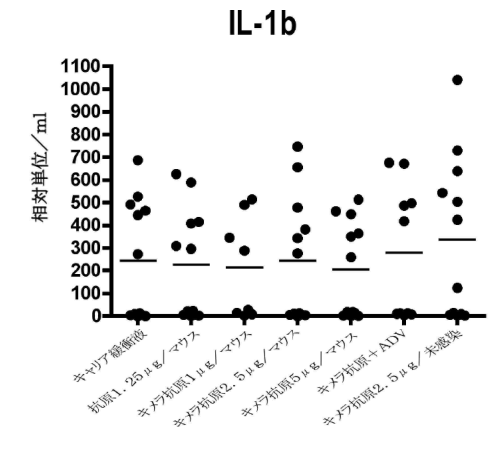


10

【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



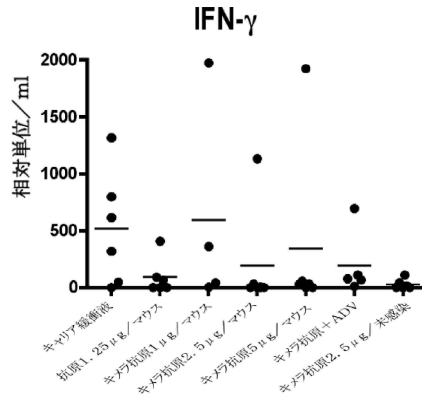
20

30

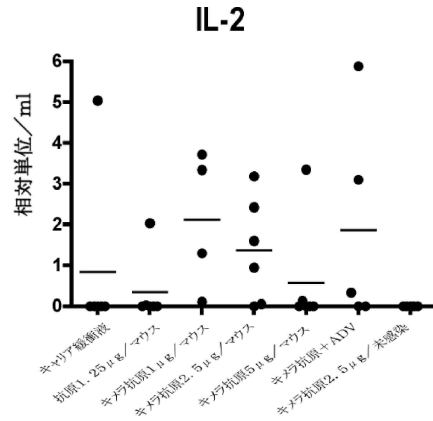
40

50

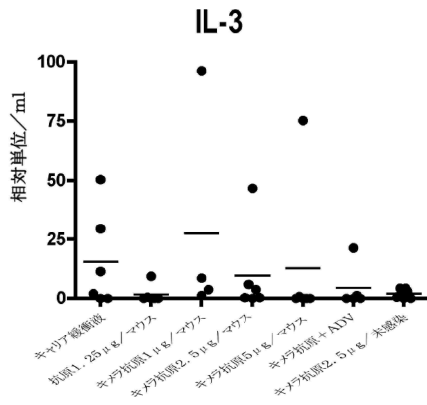
【図 1 6 C】



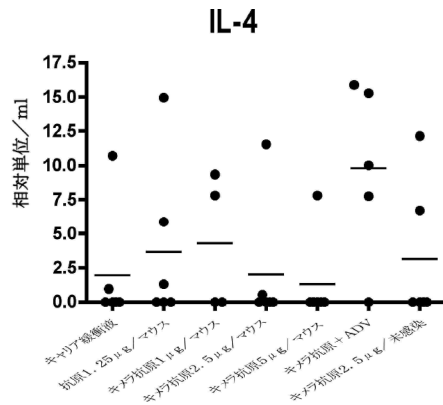
【図 1 6 D】



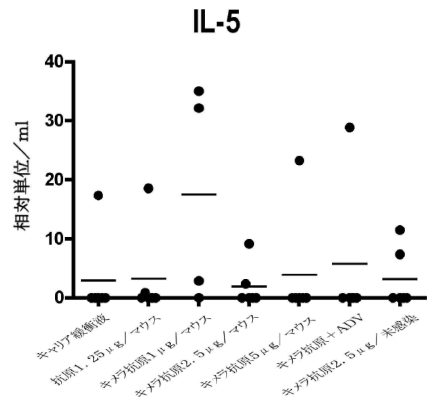
【図 1 6 E】



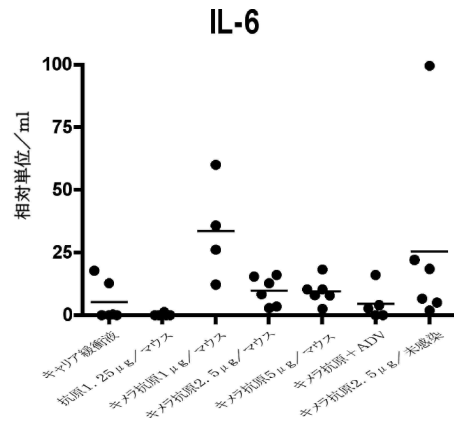
【図 1 6 F】



【図 1 6 G】



【図 1 6 H】



10

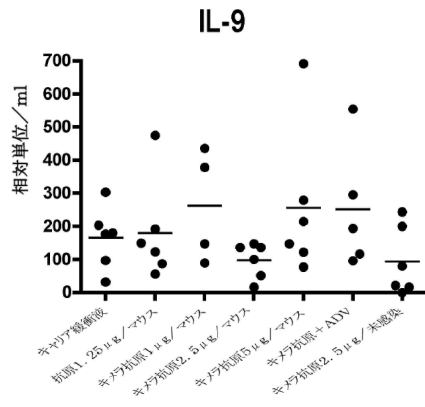
20

30

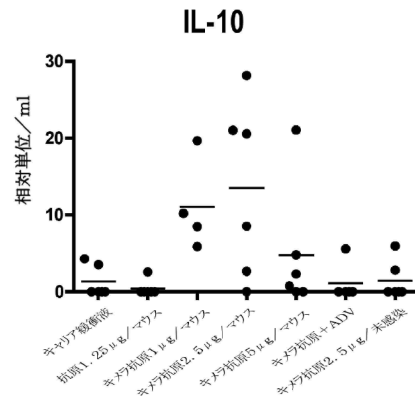
40

50

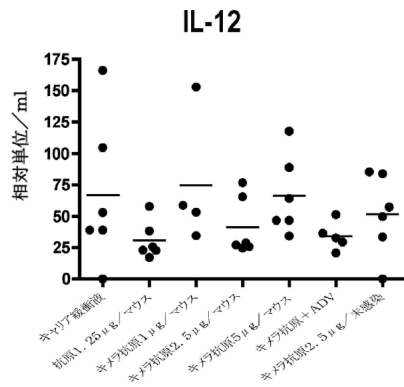
【図 16 I】



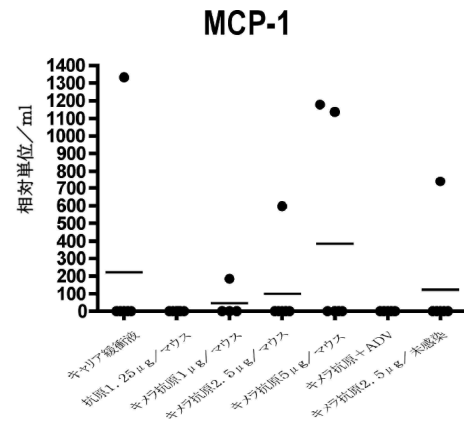
【図 16 J】



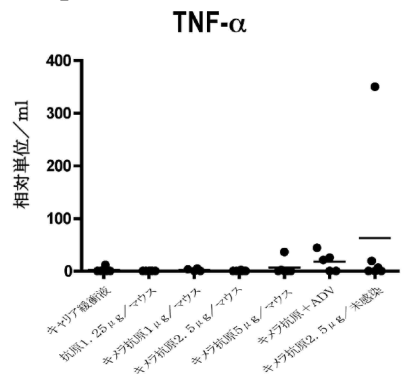
【図 16 K】



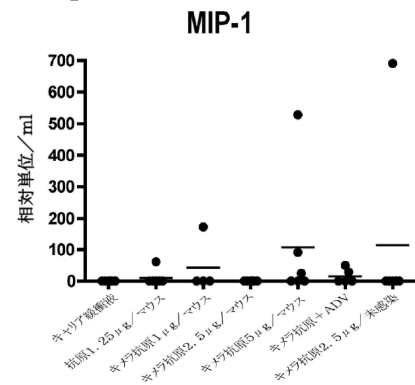
【図 16 L】



【図 16 M】



【図 16 N】



10

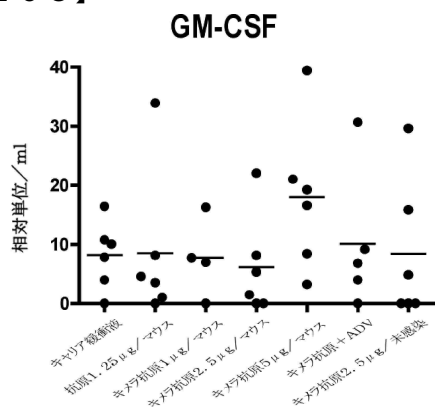
20

30

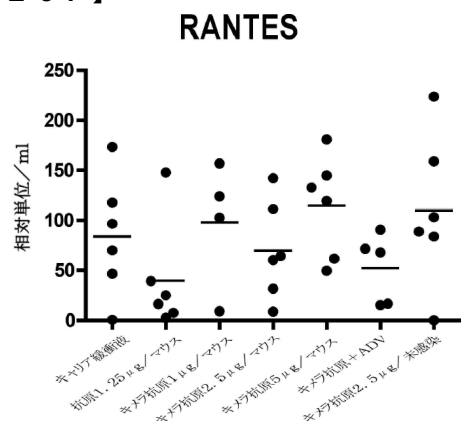
40

50

【図 16 O】

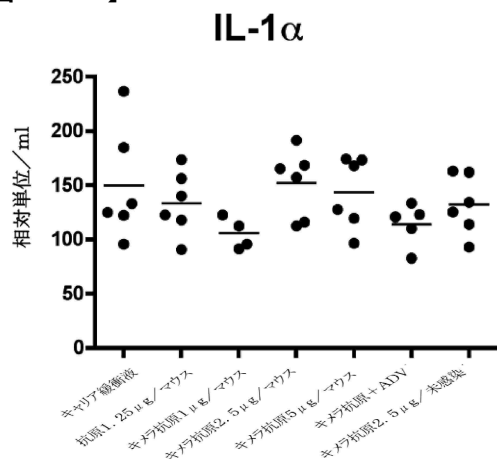


【図 16 P】

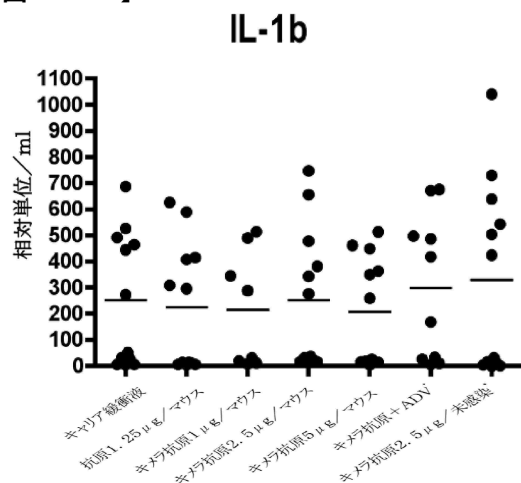


10

【図 17 A】



【図 17 B】



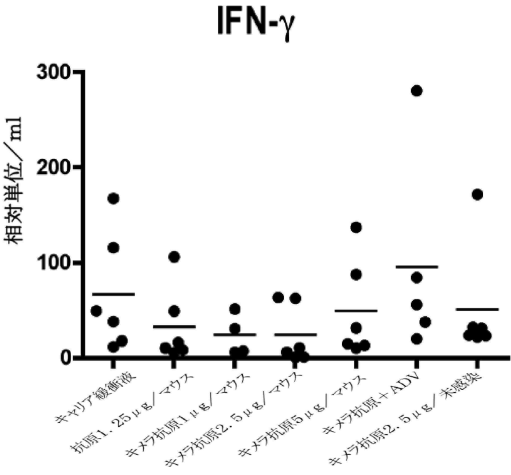
20

30

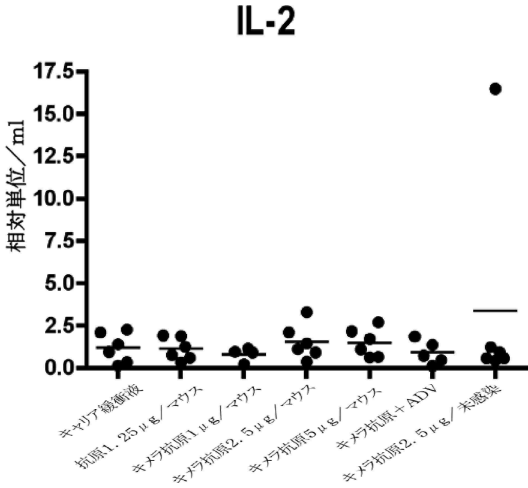
40

50

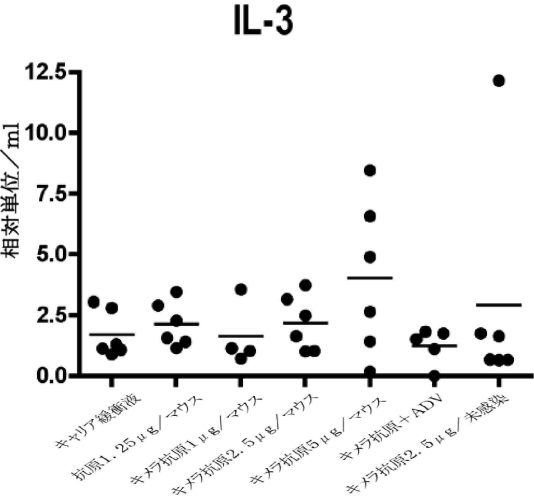
【図 1 7 C】



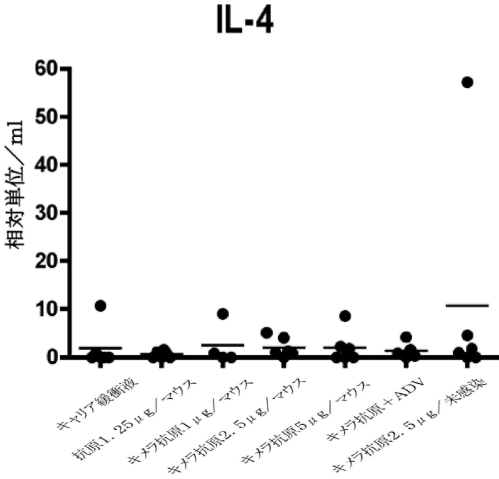
【図 1 7 D】



【図 1 7 E】



【図 1 7 F】



10

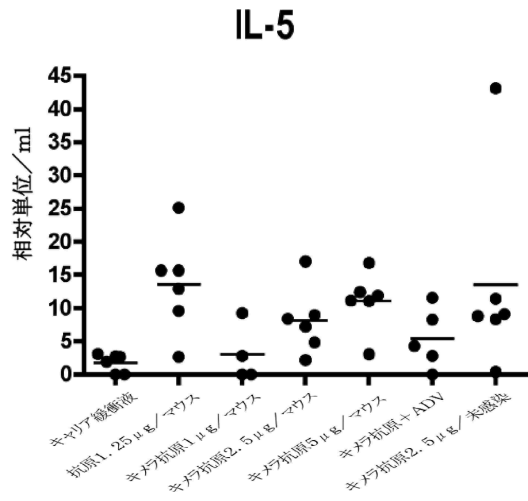
20

30

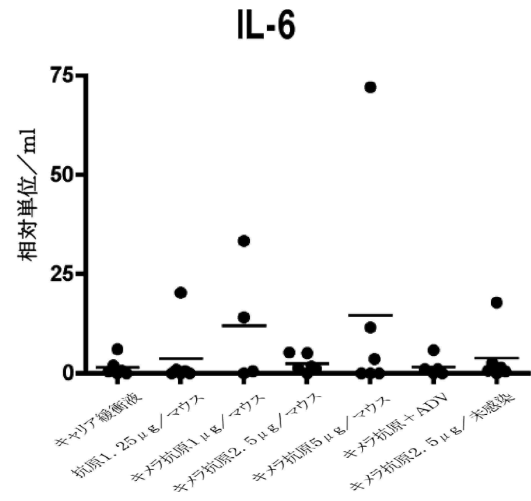
40

50

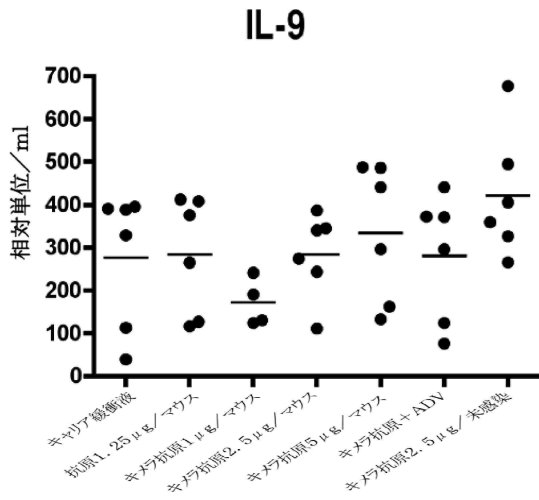
【図 1 7 G】



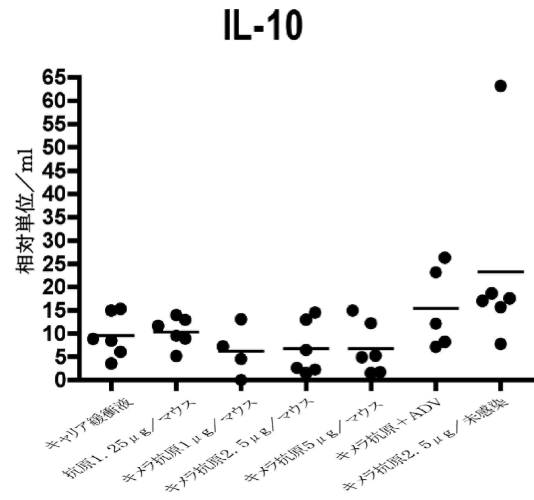
【図 1 7 H】



【図 1 7 I】



【図 1 7 J】



10

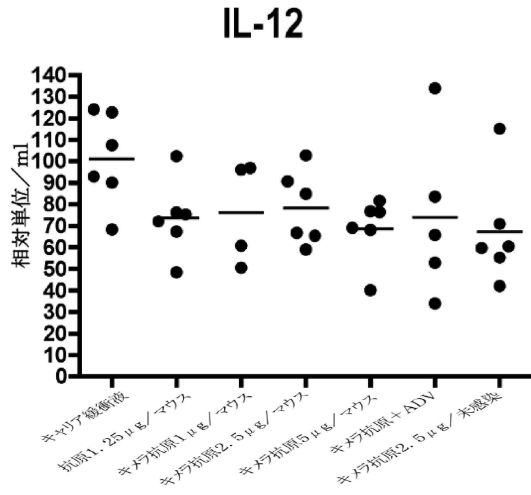
20

30

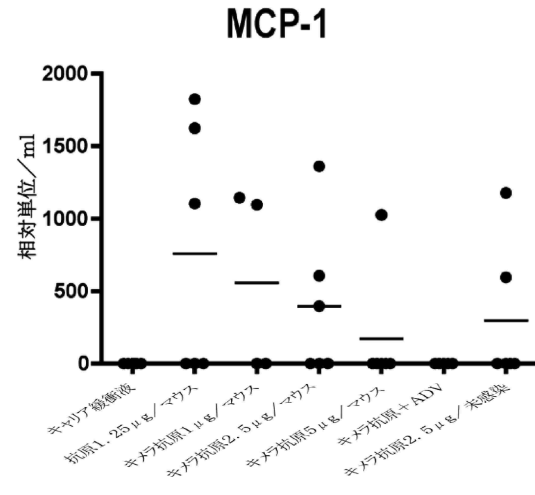
40

50

【図 1 7 K】

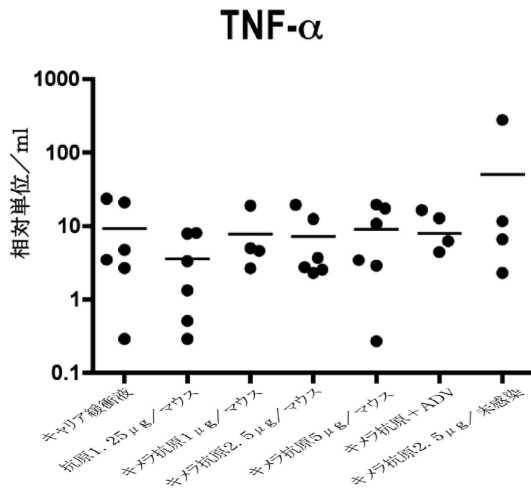


【図 1 7 L】

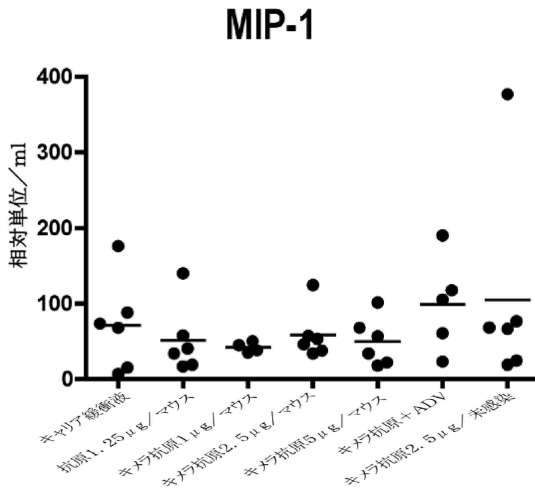


10

【図 1 7 M】



【図 1 7 N】



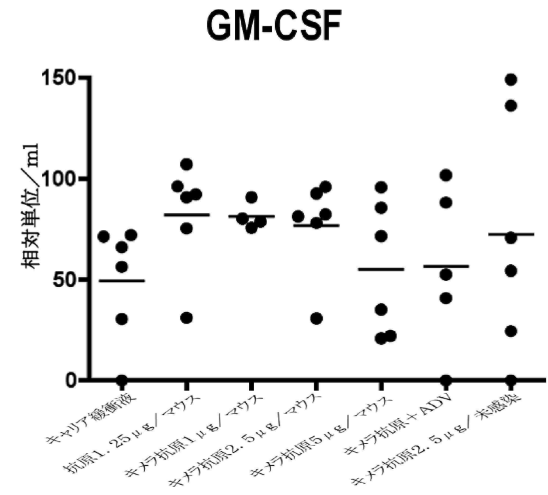
20

30

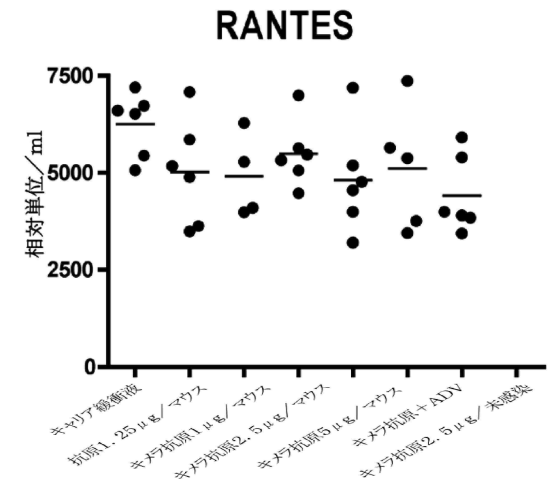
40

50

【図 1 7 O】

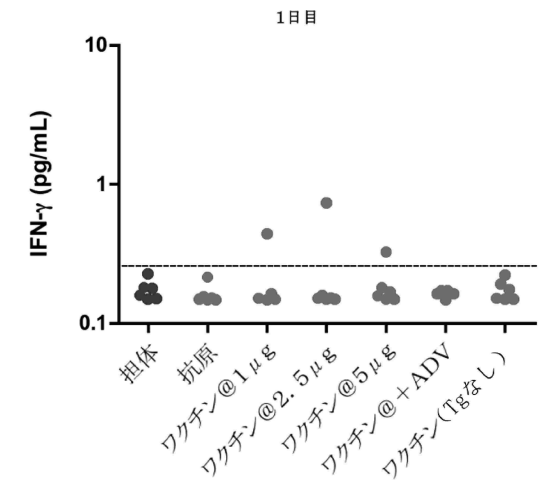


【図 1 7 P】

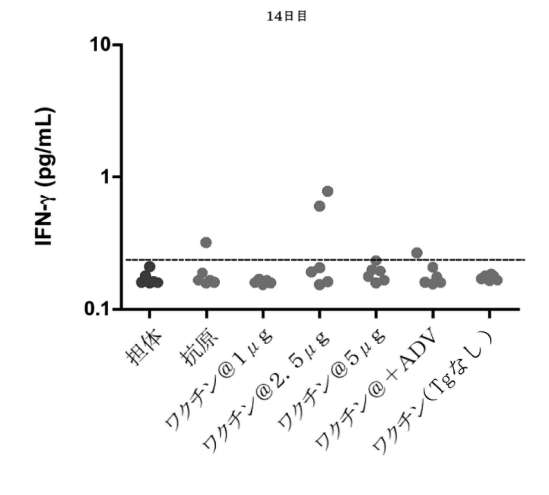


10

【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



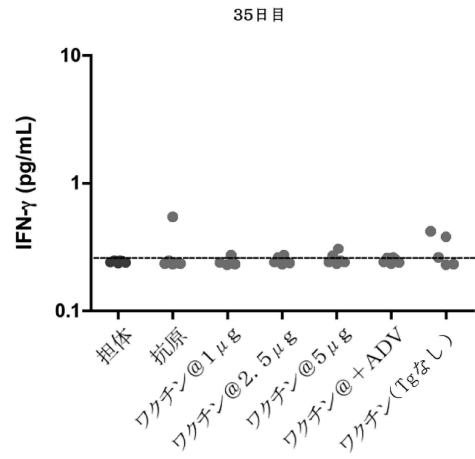
20

30

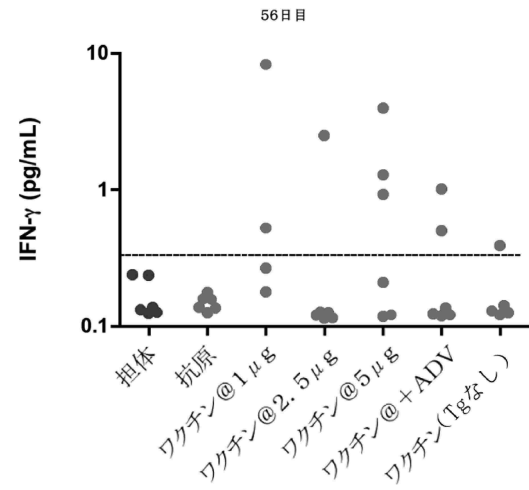
40

50

【図 18 C】



【図 18 D】



【図 19】



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	31/522 (2006.01)	A 6 1 K	31/522	
A 6 1 K	31/513 (2006.01)	A 6 1 K	31/513	
A 6 1 K	31/7072 (2006.01)	A 6 1 K	31/7072	
A 6 1 K	38/21 (2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A
C 0 7 K	14/02 (2006.01)	C 0 7 K	14/02	
C 1 2 N	15/113 (2010.01)	C 1 2 N	15/113	1 0 0 Z
C 0 7 K	14/56 (2006.01)	C 0 7 K	14/56	

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者

シ, ユエニアン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 1 5 7 7 ロズリン ハイツ イェール ストリート 1 8

(72)発明者

ラジャン, ジョージ

カナダ国 ティー6アール 1ゼット7 アルバータ エドモントン バージェス クローズ エヌダブリュー 6 0 2

(72)発明者

マ, アラン

カナダ国 ティー6エイチ 4エックス3 アルバータ エドモントン ホワイトマッド ロード エヌダブリュー 5 6 1 1

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献

米国特許出願公開第2 0 0 5 / 0 0 1 3 8 2 8 (U S, A 1)

肝臓, 2017年, Vol. 58, No. 4, p.217-227

HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS, 2020年04月, VOL. 16, NO. 4, p.779-792

Journal of Antivirals and Antiretrovirals, 2014年, Vol. 6, No. 2, p.212

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 P 3 1 / 0 0 - 3 1 / 2 2

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)