(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-536850
(P2022-536850A)
(43)公表日　令和4年8月19日(2022.8.19)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*39/29 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/29		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*31/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｓ	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｕ	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全71頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-575226(P2021-575226)
(86)(22)出願日　令和2年6月18日(2020.6.18)
(85)翻訳文提出日　令和4年2月15日(2022.2.15)
(86)国際出願番号　PCT/IB2020/055701
(87)国際公開番号　WO2020/255011
(87)国際公開日　令和2年12月24日(2020.12.24)
(31)優先権主張番号　62/862,791
(32)優先日　令和1年6月18日(2019.6.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　510020022
ヤンセン・サイエンシズ・アイルランド・アンリミテッド・カンパニー
アイルランド国 コーク州 リンガスキディ シーオー，バーナヒリー
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山 英二
(74)代理人　100093676
弁理士　小林 純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100153693
弁理士　岩田 耕一
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）ワクチンおよび抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体の組合せ

(57)【要約】
Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）ワクチンおよび抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片の治療的組合せが記載される。開示された治療的組合せを使用して、特に慢性ＨＢＶ感染症を有する個体において、ＨＢＶに対する免疫応答を誘導する方法またはＨＢＶ誘導疾患を処置する方法も記載される。

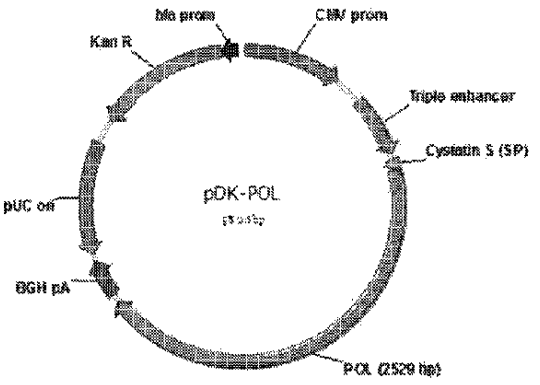


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
それを必要とする対象においてＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処置することに使用するための治療的組合せであって、
ｉ）ａ）配列番号２と少なくとも９５％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原、ならびに
ｂ）切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子、
ｃ）配列番号７と少なくとも９０％同一なアミノ酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原であって、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しないＨＢＶポリメラーゼ抗原、ならびに
ｄ）ＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子
の少なくとも１つ；ならびに
ｉｉ）好ましくは、
ａ）１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、およびそれらのバリアント；
ｂ）ＳＥＨＳＩ（配列番号２５）、ＤＰＦＥＬ（配列番号２６）、ＫＬＮＧ（配列番号２７）、ＱＴＳＷＫ（配列番号２８）、ＬＨＦＥＰ（配列番号２９）、ＮＤＮＧＳＹ（配列番号３０）、ＴＴＬＹＶＴ（配列番号３１）、またはＬＡＡＦＰＥＤＲＳＱＰＧＱＤＣＲ（配列番号３２）の配列を有するエピトープに結合する抗体；ならびに
ｃ）ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なもの
からなる群から選択される抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む、前記治療的組合せ。
【請求項２】
前記ＨＢＶポリメラーゼ抗原および前記切断型ＨＢＶコア抗原の少なくとも１つを含む、請求項１に記載の治療的組合せ。

【請求項３】
前記ＨＢＶポリメラーゼ抗原および前記切断型ＨＢＶコア抗原を含む、請求項２に記載の治療的組合せ。
【請求項４】
前記切断型ＨＢＶコア抗原をコードする前記第１のポリヌクレオチド配列を含む前記第１の天然に存在しない核酸分子、および前記ＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする前記第２のポリヌクレオチド配列を含む前記第２の天然に存在しない核酸分子の少なくとも１つを含む、請求項１に記載の治療的組合せ。
【請求項５】
それを必要とする対象においてＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処置することに使用するための治療的組合せであって、
ｉ）配列番号２と少なくとも９５％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子；および
ｉｉ）配列番号７と少なくとも９０％同一なアミノ酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子であって、ＨＢＶポリメラーゼ抗原は、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しない、第２の天然に存在しない核酸分子；ならびに
ｉｉｉ）好ましくは、
ａ）１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、およびそれらのバリアント；
ｂ）ＳＥＨＳＩ（配列番号２５）、ＤＰＦＥＬ（配列番号２６）、ＫＬＮＧ（配列番号２７）、ＱＴＳＷＫ（配列番号２８）、ＬＨＦＥＰ（配列番号２９）、ＮＤＮＧＳＹ（配列番号３０）、ＴＴＬＹＶＴ（配列番号３１）、またはＬＡＡＦＰＥＤＲＳＱＰＧＱＤＣＲ（配列番号３２）の配列を有するエピトープに結合する抗体；ならびに
ｃ）ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なもの
からなる群から選択される抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片

を含む、前記治療的組合せ。
【請求項６】
前記第１の天然に存在しない核酸分子が、前記切断型ＨＢＶコア抗原のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含み、前記第２の天然に存在しない核酸分子が、前記ＨＢＶポリメラーゼ抗原のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含み、好ましくは、前記シグナル配列は、独立して、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を含み、好ましくは、前記シグナル配列は、独立して、配列番号８または配列番号１４のポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項４または５に記載の治療的組合せ。
【請求項７】
ａ）前記切断型ＨＢＶコア抗原が、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなり；
ｂ）前記ＨＢＶポリメラーゼ抗原が、配列番号７のアミノ酸配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【請求項８】
前記第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれが、ＤＮＡ分子であり、好ましくは、前記ＤＮＡ分子は、プラスミドまたはウイルスベクターに存在する、請求項１～７のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【請求項９】
同じ非天然の核酸分子中に、前記第１の天然に存在しない核酸分子および前記第２の天然に存在しない核酸分子を含む、請求項４～８のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【請求項１０】
２つの異なる天然に存在しない核酸分子中に、前記第１の天然に存在しない核酸分子および前記第２の天然に存在しない核酸分子を含む、請求項４～８のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【請求項１１】
前記第１のポリヌクレオチド配列が、配列番号１または配列番号３と少なくとも９０％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項４～１０のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【請求項１２】
前記第１のポリヌクレオチド配列が、配列番号１または配列番号３のポリヌクレオチド配列を含む、請求項１１に記載の治療的組合せ。
【請求項１３】
前記第２のポリヌクレオチド配列が、配列番号５または配列番号６と少なくとも９０％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、請求項４～１２のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【請求項１４】
前記第２のポリヌクレオチド配列が、配列番号５または配列番号６のポリヌクレオチド配列を含む、請求項１３に記載の治療的組合せ。
【請求項１５】
前記抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片が、ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、またはアテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なものである、請求項１～１４のいずれか一項に記載の治療的組合せ。

【請求項１６】
請求項１～１５のいずれか一項に記載の治療的組合せ、およびそれを必要とする対象におけるＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処置することに治療的組合せを使用するための説明書を含むキット。
【請求項１７】
それを必要とする対象におけるＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処置することに使用するための、請求項１～１５のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
電子提出された配列表の参照
本出願は、作成日が２０２０年６月１５日で、サイズ４６ｋｂを有するファイル名「０６５８１４＿１５ＷＯ１＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ」を有するＡＳＣＩＩフォーマットの配列表としてＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子提出された配列表を含有する。ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して提出された配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。
【０００２】
関連出願の相互参照
本出願は、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれている、２０１９年６月１８日に出願された米国仮出願第６２／８６２，７９１号の優先権を主張する。
【背景技術】
【０００３】
Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）は、４つのオープンリーディングフレームおよび７つのタンパク質をコードする小さい３．２ｋｂの肝臓指向性ＤＮＡウイルスである。およそ２億４０００万人の人が、血液中のウイルスおよびサブウイルス粒子が６カ月超持続することによって特徴付けられるＢ型慢性肝炎感染症（慢性ＨＢＶ）を有する（Cohen et al. J. Viral Hepat. (2011) 18(6), 377-83）。持続性のＨＢＶ感染症は、ＨＢＶ特異的Ｔ細胞受容体がウイルスペプチドおよび循環中の抗原によって慢性的に刺激されることにより、循環中および肝臓内のＨＢＶ特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋　Ｔ細胞の枯渇をもたらす。その結果、Ｔ細胞の多機能性が減少する（すなわち、ＩＬ－２、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α、ＩＦＮ－γレベルの減少、および増殖の欠如）。
【０００４】
ＨＢＶ感染症に対する安全かつ有効な予防ワクチンは、１９８０年代以降、利用できるようになり、Ｂ型肝炎予防の主流である（世界保健機関、Ｂ型肝炎：ファクトシートＮｏ．２０４［インターネット］２０１５年３月）。世界保健機構は、全ての乳児のワクチン接種を推奨しており、Ｂ型肝炎の流行が低いまたは中間の国では、全ての子供および青年（年齢＜１８歳）、ならびにある特定のリスク集団カテゴリーの人々のワクチン接種を推奨している。ワクチン接種により、世界全体での感染率は劇的に低下した。しかし、予防用ワクチンは、確立されたＨＢＶ感染症を治癒しない。
【０００５】
慢性的なＨＢＶは現在、ＩＦＮ－α、ならびにヌクレオシドまたはヌクレオチドアナログによって処置されているが、ウイルスＲＮＡの鋳型として、したがって新規ビリオンの鋳型として根本的な役割を果たす共有結合閉鎖環状ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）と呼ばれる細胞内ウイルス複製中間体が、感染した肝細胞において持続することにより、最終的な治癒は生じない。誘導されたウイルス特異的Ｔ細胞およびＢ細胞応答は、ｃｃｃＤＮＡを有する肝細胞を有効に排除することができると考えられている。ＨＢＶポリメラーゼを標的とする現行の治療は、ウイルス血症を抑制するが、核に存在するｃｃｃＤＮＡおよび関連する循環中の抗原の産生に及ぼす効果は限定的である。最も厳格な治癒の形態は、生物からのＨＢＶｃｃｃＤＮＡの排除であり得るが、これは自然の転帰としてもいずれかの治療介入の結果としても観察されていない。しかし、ＨＢＶ表面抗原（ＨＢｓＡｇ）の喪失は、

臨床的に信頼できる治癒等価物であり、その理由は疾患の再発が重度の免疫抑制の場合に限って起こり得、これは予防的処置によって防止できるためである。このように、少なくとも臨床的見地から、ＨＢｓＡｇの喪失は、ＨＢＶに対する免疫再構成の最も厳格な形態に関連する。

【０００６】

例えば、ｐｅｇ化インターフェロン（ｐｅｇＩＦＮ）－αによる免疫調節は、有限の一連の処置による非処置時の持続的応答に関して、ヌクレオシドまたはヌクレオチド治療と比較してより良好であることが証明されている。直接の抗ウイルス剤の効果の他にも、ＩＦＮ－αは、細胞培養およびヒト化マウスにおいてｃｃｃＤＮＡの後成的抑制を発揮することが報告されており、これは、ビリオン生産性および転写物の低減をもたらす（Belloni et al. J. Clin. Invest. (2012) 122(2), 529-537）。しかし、この治療もなお副作用を伴い、理由の一部としてＩＦＮ－αがＨＢＶ特異的Ｔ細胞に及ぼす調節的影響がごくわずかであることから、全体的な応答はむしろ低い。特に、治癒率は低く（＜１０％）、毒性は高い。同様に、直接作用するＨＢＶ抗ウイルス剤、すなわちＨＢＶポリメラーゼ阻害剤であるエンテカビルおよびテノフォビルは、ウイルス抑制の誘導において単剤として有効であり、薬物耐性変異体の出現に対する遺伝的障壁が高く、肝疾患の進行を持続的に防止する。しかし、ＨＢｓＡｇの喪失またはセロコンバージョンによって定義される慢性Ｂ型肝炎の治癒が、そのようなＨＢＶポリメラーゼ阻害剤によって達成されることはめったにない。したがって、これらの抗ウイルス剤は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の抗レトロウイルス治療と同様に、理論的には、肝疾患の再発を防止するためにいつまでも投与する必要がある。

【０００７】

治療的ワクチン接種は、慢性的に感染した患者からＨＢＶを排除する潜在性を有する（Michel et al. J. Hepatol. (2011) 54(6), 1286-1296）。多くの戦略が探索されているが、今日まで治療的ワクチン接種の成功は証明されていない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

したがって、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、特に慢性的なＨＢＶの処置において、高い治癒率で忍容性が良好な有限の処置のアンメットメディカルニーズが存在する。本発明は、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症に対する免疫応答を誘導するための治療的組合せまたは組成物および方法を提供することによって、このニーズを満たす。本発明の免疫原性組成物／組合せおよび方法を使用して、慢性ＨＢＶ感染症を有する対象等の対象に治療免疫を提供することができる。

【０００９】

全般的態様では、本出願は、それを必要とする対象におけるＨＢＶ感染症の処置に使用するための、１つまたは複数のＨＢＶ抗原、またはＨＢＶ抗原をコードする１つまたは複数のポリヌクレオチド、および抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む治療的組合せまたは組成物に関する。

【００１０】

一実施形態では、治療的組合せは、

ｉ）ａ）配列番号２と、少なくとも９５％、例えば少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原、

ｂ）切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子；

ｃ）配列番号７と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一なアミノ酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原であって、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しないＨＢＶポリメラーゼ抗原、および

ｄ）ＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の

天然に存在しない核酸分子
の少なくとも１つ；ならびに
ｉｉ）抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片、例えば本明細書に記載されるもの
を含む。
【００１１】
一実施形態では、切断型ＨＢＶコア抗原は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなり、ＨＢＶポリメラーゼ抗原は、配列番号７のアミノ酸配列を含む。
【００１２】
一実施形態では、治療的組合せは、ＨＢＶポリメラーゼ抗原および切断型ＨＢＶコア抗原の少なくとも１つを含む。ある特定の実施形態では、治療的組合せは、ＨＢＶポリメラーゼ抗原および切断型ＨＢＶコア抗原を含む。
【００１３】
一実施形態では、治療的組合せは、切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子、およびＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子の少なくとも１つを含む。ある特定の実施形態では、第１の天然に存在しない核酸分子は、切断型ＨＢＶコア抗原のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含み、第２の天然に存在しない核酸分子は、ＨＢＶポリメラーゼ抗原のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含み、好ましくは、シグナル配列は、独立して、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を含み、より好ましくは、シグナル配列は、それぞれ配列番号８または配列番号１４のポリヌクレオチド配列によってコードされる。
【００１４】
ある特定の実施形態では、第１のポリヌクレオチド配列は、配列番号１または配列番号３と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。
【００１５】
ある特定の実施形態では、第２のポリヌクレオチド配列は、配列番号５または配列番号６と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む。
【００１６】
一実施形態では、治療的組合せは、
ａ）配列番号２と、少なくとも９５％、例えば少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子；
ｂ）配列番号７と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一なアミノ酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子であって、ＨＢＶポリメラーゼ抗原は、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しない、第２の天然に存在しない核酸分子；および
ｃ）好ましくは、
ｉ）１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ

９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、およびそれらのバリアント；

ｉｉ）ＳＥＨＳＩ、ＤＰＦＥＬ、ＫＬＮＧ、ＱＴＳＷＫ、ＬＨＦＥＰ、ＮＤＮＧＳＹ、ＴＴＬＹＶＴ、またはＬＡＡＦＰＥＤＲＳＱＰＧＱＤＣＲの配列を有するエピトープに結合する抗体；ならびに

ｉｉｉ）ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なもの

からなる群から選択される抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む。

【００１７】

好ましくは、治療的組合せは、ａ）配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子；ｂ）配列番号７のアミノ酸配列を有する、ＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子、ならびに（ｃ）抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む。

【００１８】

好ましくは、治療的組合せは、配列番号１または配列番号３と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子、および配列番号５または配列番号６と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子を含む。

【００１９】

より好ましくは、治療的組合せは、ａ）配列番号１または配列番号３の第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子；ｂ）配列番号５または６の第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子；およびｃ）抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む。

【００２０】

一実施形態では、第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれは、ＤＮＡ分子であり、好ましくはＤＮＡ分子は、プラスミドまたはウイルスベクターに存在する。

【００２１】

別の実施形態では、第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれは、ＲＮＡ分子であり、好ましくはｍＲＮＡまたは自己増殖ＲＮＡ分子である。

【００２２】
一部の実施形態では、第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれは、独立して、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と共に製剤化される。
【００２３】
別の一般的な態様では、本出願は、本出願の治療的組合せを含むキットに関する。
【００２４】
本出願はまた、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）に対する免疫応答の誘導に使用するための本出願の治療的組合せまたはキット；およびＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）に対する免疫応答を誘導するための医薬の製造における本出願の治療的組合せ、組成物またはキットの使用にも関する。使用は、別の免疫原性剤または治療剤、好ましくは別のＨＢＶ抗原または別のＨＢＶ療法との組合せをさらに含んでいてもよい。好ましくは、対象は慢性ＨＢＶ感染症を有する。
【００２５】
本出願はさらに、それを必要とする対象におけるＨＢＶ誘導疾患の処置に使用するための本出願の治療的組合せ、またはキット、およびそれを必要とする対象におけるＨＢＶ誘導疾患を処置するための医薬の製造における本出願の治療的組合せ、またはキットの使用に関する。使用は、別の治療剤、好ましくは別のＨＢＶ抗原との組合せをさらに含み得る。好ましくは、対象は慢性ＨＢＶ感染症を有し、ＨＢＶ誘導疾患は、進行線維症、肝硬変、および肝細胞癌（ＨＣＣ）からなる群から選択される。
【００２６】
本出願はまた、本発明の実施形態による治療的組合せを、それを必要とする対象に投与することを含む、ＨＢＶに対する免疫応答を誘導する方法またはＨＢＶ感染症またはＨＢＶ誘導疾患を処置する方法にも関する。
【００２７】
本発明の他の態様、特色および利点は、本発明の詳細な説明、ならびにその好ましい実施形態および添付の特許請求の範囲を含む以下の開示から明らかであろう。
【００２８】
前述の要約、ならびに以下の本出願の好ましい実施形態の詳細な説明は、添付の図面と共に読むとより良好に理解される。しかし、本出願は、図面に示された実施形態そのものに限定されないと理解すべきである。
【図面の簡単な説明】
【００２９】
【図１】図１Ａおよび図１Ｂは、本出願の実施形態に従うＤＮＡプラスミドの略図を示す。図１Ａは、本出願の実施形態に従うＨＢＶコア抗原をコードするＤＮＡプラスミドを示す。図１Ｂは、本出願の実施形態に従うＨＢＶポリメラーゼ（ｐｏｌ）抗原をコードするＤＮＡプラスミドを示す；ＨＢＶコアおよびｐｏｌ抗原は、ＣＭＶプロモーターの制御下で発現され、Ｎ末端シスタチンＳシグナルペプチドは、細胞からの分泌時に発現された抗原から切断される；プラスミドの転写調節エレメントは、ＣＭＶプロモーターとＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチド配列との間に位置するエンハンサー配列、およびＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチド配列の下流に位置するｂＧＨポリアデニル化配列を含む；第２の発現カセットは、プラスミドにおいて逆方向に含まれ、Ａｍｐｒ（ｂｌａ）プロモーターの制御下でカナマイシン耐性遺伝子を含む；複製開始点（ｐＵＣ）もまた、逆方向に含まれる。
【図２】図２Ａおよび図２Ｂは、本出願の実施形態に従うアデノウイルスベクターにおける発現カセットの略図を示す。図２Ａは、ＣＭＶプロモーター、イントロン（ヒトＡｐｏＡＩ遺伝子に由来する断片－ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ０１０３８、塩基対２９５～５２３、ＡｐｏＡＩの第２のイントロンを有する）、ヒト免疫グロブリン分泌シグナル、この後に続く切断型ＨＢＶコア抗原のコード配列およびＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを含有する、切断型ＨＢＶコア抗原の発現カセットを示す。図２Ｂは、ＨＢＶポリメラーゼ抗原に作動可能に連結された切断型ＨＢＶコア抗原の融合タンパク質の発現カセットを示し

、これは、ＨＢＶ抗原を除き、それ以外は切断型ＨＢＶコア抗原の発現カセットと同一である。
【図３】実施例３に記載された通りＨＢＶコア抗原またはＨＢＶ　ｐｏｌ抗原を発現する異なるＤＮＡプラスミドで免疫化されたＢａｌｂ／ｃマウスのＥＬＩＳＰＯＴ応答を示す図である；様々なワクチン接種した動物群から単離された脾細胞を刺激するのに使用されるペプチドプールは、灰色のスケールで示される；応答性Ｔ細胞の数は、脾細胞１０６個当たりのスポットを形成する細胞（ＳＦＣ）として表されるｙ軸に示される。
【図４】本出願の実施形態による抗ＰＤ－１またはアイソタイプ抗体と共に本出願の実施形態によるＤＮＡプラスミドを投与したマウス（ｄ０およびｄ２１に）のＥＬＩＳＰＯＴによって測定された免疫応答を示す図である；図４Ａは、１回目のワクチン接種後の１週間から開始して抗ＰＤ－１（黒色）またはアイソタイプ（灰色）の３回（すなわち、ｄ７、ｄ１４、ｄ２１）の注射を受けたマウスの結果を示す；図４Ｂは、１回目のワクチン接種と同時に、次いで７日毎に（すなわち、ｄ０、ｄ７、ｄ１４、ｄ２１）抗ＰＤ－１（黒色）またはアイソタイプ（灰色）で処置したマウスの結果を示す。
【図５】本出願の実施形態による抗ＰＤ－１またはアイソタイプ抗体と共に本出願の実施形態によるＤＮＡプラスミドを投与したマウス（ｄ０およびｄ２１に）から単離された脾細胞のＩＣＳによって測定された免疫応答を示す図であり、結果は平均±ＳＥＭとして表される；脾細胞を、コア（図５Ａおよび図５Ｄ）、ｐｏｌ１（図５Ｂおよび図５Ｅ）またはｐｏｌ２（図５Ｃおよび図５Ｆ）で６時間刺激し、次いでＩＦＮ－γ、ＩＬ－２またはＴＮＦ－αに対する応答を測定した；図５Ａ、図５Ｂおよび図５Ｃは、１回目のワクチン接種後の１週間から開始して抗ＰＤ－１（黒色）またはアイソタイプ（灰色）の３回（すなわち、ｄ７、ｄ１４、ｄ２１）の注射を受けたマウスから単離された脾細胞の結果を示す；図５Ｄ、図５Ｅおよび図５Ｆは、１回目のワクチン接種と同時に、次いで７日毎に（すなわち、ｄ０、ｄ７、ｄ１４、ｄ２１）抗ＰＤ－１（黒色）またはアイソタイプ（灰色）で処置したマウスの結果を示す。
【図６】本出願の実施形態による抗ＰＤ－１またはアイソタイプ抗体と共に本出願の実施形態によるＤＮＡプラスミドを投与したマウス（ｄ２８およびｄ４９に）から単離された肝臓内リンパ球（ＩＨＬ）におけるＣＤ８Ｔ細胞の増殖能を示す図であり、結果は平均±ＳＥＭとして表される。
【図７】本出願の実施形態による抗ＰＤ－１またはアイソタイプ抗体と共に本出願の実施形態によるＤＮＡプラスミドを投与したマウス（ｄ２８およびｄ４９に）から単離された脾細胞におけるＣＤ８Ｔ細胞の増殖能を示す図であり、結果は平均±ＳＥＭとして表される。
【発明を実施するための形態】
【００３０】
様々な刊行物、論文、および特許が、背景および本出願全体を通して引用または記載されているが、これらの参照の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。本明細書に含まれている文書、行為、材料、デバイス、品目等に関する考察は、本発明の内容を提供する目的のためである。そのような考察は、これらの事柄のいずれかまたは全てが、開示または特許請求される任意の本発明に関連して先行技術の一部を形成すると認めたわけではない。
【００３１】
それ以外であると定義している場合を除き、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、本発明が属する当業者に一般的に理解される意味と同じ意味を有する。そうでなければ、本明細書で使用するある特定の用語は、本明細書に記載の意味を有する。本明細書で引用した全ての特許、公開された特許出願、および刊行物は、それが本明細書に十分に記載されているように参照により本明細書に組み込まれている。
【００３２】
本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「１つの」、「１つの（ａｎ）」、および「その」は、本文がそれ以外であると明白に示していない限り、複数

形を含むことに注意しなければならない。

【００３３】

それ以外であると示していない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、その一連のあらゆる要素を指すと理解される。当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を、単なる通例の実験を使用して認識するか、または確認することができる。そのような均等物は、本発明に包含されると意図される。

【００３４】

以下に続く本明細書および特許請求の範囲を通して、本文がそれ以外であることを必要としていない限り、用語「含む」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」等の変化形は、記載の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群を含むことを暗示するが、他の任意の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群を除外しないと理解される。本明細書で使用する場合、用語「含む」は、用語「含有する」もしくは「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」に置換することができ、または時に本明細書において使用される場合、「有する」という用語に置換することができる。

【００３５】

本明細書で使用される場合、「からなる」は、特許請求の範囲の要素に明記されていないいかなる要素、ステップ、または成分も除外する。本明細書で使用される場合、「本質的にからなる」は、特許請求の範囲の基本的および新規特徴に実質的に影響を及ぼさない材料またはステップを除外しない。上記の用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含有する」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、および「有する」はいずれも、本出願の一態様または一実施形態の文脈において本明細書で使用されている場合は常に、本開示の範囲を変化させるために用語「からなる」または「本質的にからなる」と置換することができる。

【００３６】

本明細書で使用される場合、複数の列挙された要素の間の接続詞「および／または」は、個々のおよび組合せの選択肢の両方を包含すると理解される。例えば、２つの要素を「および／または」で接続する場合、第１の選択肢は第２の要素を有しない第１の要素の適応性を指す。第２の選択肢は、第１の要素を有しない第２の要素の適応性を指す。第３の選択肢は、第１および第２の要素の両方の適応性を指す。これらの選択肢の任意の１つが、その意味に含まれ、したがって本明細書で使用される用語「および／または」の必要条件を満たすと理解される。１つより多くの選択肢の同時の適応性もまた、その意味に含まれ、したがって用語「および／または」の必要条件を満たすと理解される。

【００３７】

それ以外であると明記していない限り、本明細書で記載する濃度または濃度範囲等のいかなる数値も、全ての例において用語「約」によって修飾されると理解される。このように、数値は典型的に、列挙した値の±１０％を含む。例えば、濃度１ｍｇ／ｍＬは、０．９ｍｇ／ｍＬ～１．１ｍｇ／ｍＬを含む。同様に、濃度範囲１ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬは、０．９ｍｇ／ｍＬ～１１ｍｇ／ｍＬを含む。本明細書で使用される場合、本文が明白にそれ以外であることを示していない限り、数値範囲の使用は、全ての可能性がある小範囲、そのような範囲内の整数および値の分数を含む、その範囲内の全ての個々の数値を明白に含む。

【００３８】

アミノ酸配列を参照して使用する場合の、語句「パーセント（％）配列同一性」または「％同一性」、または「％同一である」は、アミノ酸配列の全長を構成するアミノ酸残基の数と比較して、２つまたはそれより多くの整列させたアミノ酸配列の同一のアミノ酸のマッチ（「ヒット」）数を記載する。言い換えれば、２つまたはそれより多くの配列のアライメントを使用して、当技術分野で公知の配列比較アルゴリズムを使用して測定した場合に最大に一致するように、配列を比較および整列させた場合、または手作業で整列させて肉眼で検分する場合に、同じであるアミノ酸残基のパーセンテージ（例えば、アミノ酸

配列の完全長に対する９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一性）を決定してもよい。配列同一性を決定するために比較される配列は、このように、アミノ酸の置換、付加、または欠失によって異なっていてもよい。タンパク質配列を整列させるための適したプログラムが当業者に公知である。タンパク質配列のパーセンテージ配列同一性は、例えば、ＣＬＵＳＴＡＬＷ、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａ、ＦＡＳＴＡまたはＢＬＡＳＴ、例えばＮＣＢＩ　ＢＬＡＳＴアルゴリズム（Altschul SF, et al(1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402）等のプログラムによって決定することができる。

【００３９】

本明細書で使用される場合、２つまたはそれより多くの治療または構成要素を対象に投与する文脈における、用語および語句「組合せ」または「組み合わせて」、「同時送達」、および「共に投与する」は、２つのベクター、例えばＤＮＡプラスミド、ペプチドまたは治療的組合せおよびアジュバント等の２つまたはそれより多くの治療剤または構成要素の同時投与または後続の投与を指す。「同時投与」は、２つまたはそれより多くの治療または構成要素の少なくとも同じ日の投与であり得る。２つの構成要素を「共に投与する」または「組み合わせて投与する」場合、それらは、個別の組成物において短時間の間に、例えば２４、２０、１６、１２、８、もしくは４時間、もしくは１時間以内に連続して投与することができ、またはそれらは単一の組成物で同時に投与することができる。「後続の投与」は、同じ日または別の日における２つまたはそれより多くの療法または構成要素の投与であり得る。用語「組み合わせて」の使用は、治療または構成要素が対象に投与される順序を制限しない。例えば、第１の治療または構成要素（例えば、ＨＢＶ抗原をコードする第１のＤＮＡプラスミド）を、第２の治療または構成要素（例えば、ＨＢＶ抗原をコードする第２のＤＮＡプラスミド）および／または第３の療法または構成要素（例えば、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片）の投与の前（例えば、５分から１時間前）、付随してもしくは同時に、または後に（例えば、５分から１時間後）に投与することができる。一部の実施形態では、第１の治療または構成要素（例えば、ＨＢＶ抗原をコードする第１のＤＮＡプラスミド）、第２の治療または構成要素（例えば、ＨＢＶ抗原をコードする第２のＤＮＡプラスミド）および第３の療法または構成要素（例えば、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片）を、同じ組成物で投与する。他の実施形態では、第１の療法または構成要素（例えばＨＢＶ抗原をコードする第１のＤＮＡプラスミド）、第２の療法または構成要素（例えば、ＨＢＶ抗原をコードする第２のＤＮＡプラスミド）、および第３の療法または構成要素（例えば、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片）が、個別の組成物で、例えば２または３つの個別の組成物で投与される。

【００４０】

本明細書で使用される場合、「天然に存在しない」核酸またはポリペプチドは、自然界に存在しない核酸またはポリペプチドを指す。「天然に存在しない」核酸またはポリペプチドは、研究所および／または製造の状況で合成、処置、作製、および／またはそうでなければ操作することができる。一部の例では、天然に存在しない核酸またはポリペプチドは、処置前に天然に存在する核酸またはポリペプチドには存在しない特性を示すように、処置、処理、または操作されている天然に存在する核酸またはポリペプチドを含み得る。本明細書で使用される場合、「天然に存在しない」核酸またはポリペプチドは、それが発見された天然起源から単離または分離されている核酸またはポリペプチドであり得て、それが天然起源で会合している配列との共有結合を欠如する。「天然に存在しない」核酸またはポリペプチドは、組換えによって、または他の方法、例えば化学合成を介して作製することができる。

【００４１】

本明細書で使用される場合、「対象」は、本出願の実施形態に従う方法によって処置されるまたは処置された任意の動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを意味する。本明細書で使用される用語「哺乳動物」は、任意の哺乳動物を包含する。哺乳動物の例

には、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ネコ、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、非ヒト霊長類（ＮＨＰ）、例えばサルまたは類人猿、ヒト等が挙げられるがこれらに限定されず、より好ましくはヒトである。

【００４２】

本明細書で使用される場合、用語「作動可能に連結された」は、記述の構成要素がその意図する様式でそれらを機能させる関係にある連結または並置を指す。例えば、目的の核酸配列に作動可能に連結された調節配列は、目的の核酸配列の転写を指示することが可能であり、または目的のアミノ酸配列に作動可能に連結されたシグナル配列は、膜を超えて目的のアミノ酸配列を分泌または移動させることが可能である。

【００４３】

本出願の読者を助ける試みで、説明は様々な段落または節で区切られているか、または本出願の様々な実施形態を対象としている。これらの区切りは、段落または節または実施形態の物質を別の段落、節、または実施形態の物質と切り離すと考えるべきではない。逆に、当業者は、説明が広い応用を有し、企図することができる様々な節、段落、および文章の全ての組合せを包含すると理解するであろう。いかなる実施形態の考察も単なる例であることを意味しており、特許請求の範囲を含む本開示の範囲はこれらの例に限定されないと示唆することを意図する。例えば、本明細書に記載の本出願のＨＢＶベクターの実施形態（例えば、プラスミドＤＮＡまたはウイルスベクター）は、特定の順序で配置したある特定のプロモーター配列、エンハンサーまたは調節配列、シグナルペプチド、ＨＢＶ抗原のコード配列、ポリアデニル化シグナル配列等を含むがこれらに限定されない特定の構成要素を含有し得るが、当業者は、本明細書で開示される概念が、本出願のＨＢＶベクターにおいて使用することができる他の順序で配置した他の構成要素にも等しく当てはまり得ることを認識するであろう。本出願は、特定の組合せが明白に記載されているか否かによらず、本出願のＨＢＶベクターにおいて使用することができる任意の配列を有する任意の応用可能な構成要素の任意の組合せでの使用を企図する。本発明は、一般的に、１つまたは複数のＨＢＶ抗原および少なくとも１つの抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む治療的組合せに関する。

【００４４】

Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）

本明細書で使用される場合、「Ｂ型肝炎ウイルス」または「ＨＢＶ」は、ヘパドナウイルス科のウイルスを指す。ＨＢＶは、４つのオープンリーディングフレームおよび７つのタンパク質をコードする小さい（例えば、３．２ｋｂ）肝臓指向性のＤＮＡウイルスである。ＨＢＶによってコードされる７つのタンパク質は、ｓｍａｌｌ（Ｓ）、ｍｅｄｉｕｍ（Ｍ）、およびｌａｒｇｅ（Ｌ）表面抗原（ＨＢｓＡｇ）、またはエンベロープ（Ｅｎｖ）タンパク質、プレコアタンパク質、コアタンパク質、ウイルスポリメラーゼ（Ｐｏｌ）、およびＨＢｘタンパク質を含む。ＨＢＶは、３つの表面抗原またはエンベロープタンパク質、Ｌ、Ｍ、およびＳを発現し、Ｓが最小であり、Ｌが最大である。ＭおよびＬタンパク質におけるエクストラドメインはそれぞれ、Ｐｒｅ－Ｓ２およびＰｒｅ－Ｓ１と呼ばれる。コアタンパク質は、ウイルスヌクレオキャプシドのサブユニットである。Ｐｏｌは、ウイルスＤＮＡの合成にとって必要であり（逆転写酵素、ＲＮアーゼＨ、およびプライマー）、これは感染した肝細胞の細胞質に局在するヌクレオキャプシドで起こる。プレコアは、Ｎ末端シグナルペプチドを有するコアタンパク質であり、そのＮ末端およびＣ末端でタンパク質分解によりプロセシングされ、感染した細胞からいわゆるＢ型肝炎ｅ抗原（ＨＢｅＡｇ）として分泌される。ＨＢｘタンパク質は、共有結合閉鎖環状ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）の効率的な転写にとって必要である。ＨＢｘは、ウイルスの構造タンパク質ではない。ＨＢＶの全てのウイルスタンパク質は、ｍＲＮＡを共有するコアおよびポリメラーゼを除き自身のｍＲＮＡを有する。タンパク質プレコアを除き、いずれのＨＢＶウイルスタンパク質も翻訳後タンパク質分解によるプロセシングを受けない。

【００４５】

ＨＢＶビリオンは、ウイルスエンベロープ、ヌクレオキャプシド、および１コピーの部

分的二本鎖ＤＮＡゲノムを含有する。ヌクレオキャプシドは、コアタンパク質の１２０個の二量体を含み、Ｓ、Ｍ、およびＬウイルスエンベロープ、または表面抗原タンパク質に埋もれているキャプシド膜によって覆われている。細胞内に侵入後、ウイルスは、脱殻し、ウイルスポリメラーゼが共有結合したキャプシドを含有するリラックスした環状ＤＮＡ（ｒｃＤＮＡ）が核に移行する。そのプロセスの間、コアタンパク質のリン酸化が構造の変化を誘導し、核移行シグナルを露出させ、キャプシドといわゆるインポーチンとの相互作用を可能にする。これらのインポーチンは、コアタンパク質と核膜孔複合体との結合を媒介し、それによってキャプシドが分解し、ポリメラーゼ／ｒｃＤＮＡ複合体が核に放出される。核内でｒｃＤＮＡが、脱タンパク質化され（ポリメラーゼの除去）、宿主ＤＮＡ修復機構によって共有結合閉鎖環状ＤＮＡ（ｃｃｃＤＮＡ）ゲノムに変換され、重複する転写物がＨＢｅＡｇ、ＨＢｓＡｇ、コアタンパク質、ウイルスポリメラーゼおよびＨＢｘタンパク質をコードする。コアタンパク質、ウイルスポリメラーゼ、およびプレゲノムＲＮＡ（ｐｇＲＮＡ）は、細胞質で会合し、未成熟なｐｇＲＮＡ含有キャプシド粒子へと自己アセンブリし、これはさらに成熟ｒｃＤＮＡキャプシドへと変換して共通の中間体として機能し、エンベロープに包まれて感染性のウイルス粒子として分泌されるか、または核に再度輸送されて安定なｃｃｃＤＮＡプールを補充および維持する。

【００４６】

今日まで、ＨＢＶは、エンベロープタンパク質に存在する抗原性エピトープに基づいて４つの血清型（ａｄｒ、ａｄｗ、ａｙｒ、ａｙｗ）に、およびウイルスゲノムの配列に基づいて８つの遺伝子型（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、およびＨ）に分類される。ＨＢＶ遺伝子型は、異なる地域にわたって分布している。例えば、アジアで最も多い遺伝子型は、遺伝子型ＢおよびＣである。遺伝子型Ｄは、アフリカ、中東、およびインドで一般的であるが、遺伝子型Ａは、北部ヨーロッパ、サハラ下アフリカ、および西アフリカで広く認められる。

【００４７】

ＨＢＶ抗原

本明細書で使用される場合、用語「ＨＢＶ抗原」、「ＨＢＶの抗原性ポリペプチド」、「ＨＢＶ抗原性ポリペプチド」、「ＨＢＶ抗原性タンパク質」、「ＨＢＶ免疫原性ポリペプチド」、および「ＨＢＶ免疫原」は全て、対象においてＨＢＶに対する免疫応答、例えば液性免疫応答および／または細胞性免疫応答を誘導することが可能なポリペプチドを指す。ＨＢＶ抗原は、ＨＢＶのポリペプチド、その断片もしくはエピトープ、または複数のＨＢＶポリペプチド、その一部もしくは誘導体の組合せであり得る。ＨＢＶ抗原は、宿主において保護的免疫応答を生じる、例えばウイルス疾患または感染症に対する免疫応答を誘導することが可能であり、および／または対象において、ウイルス疾患または感染症に対して対象を保護する、ウイルス疾患もしくは感染症に対する免疫を生じる（すなわち、ワクチン接種する）ことが可能である。例えば、ＨＢＶ抗原は、任意のＨＢＶタンパク質、例えばＨＢｅＡｇ、プレコアタンパク質、ＨＢｓＡｇ（Ｓ、Ｍ、またはＬタンパク質）、コアタンパク質、ウイルスポリメラーゼ、または任意のＨＢＶ遺伝子型、例えば遺伝子型Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、および／もしくはＨに由来するＨＢｘタンパク質からのポリペプチドまたはその免疫原性断片、またはその組合せを含み得る。

【００４８】

（１）ＨＢＶコア抗原

本明細書で使用される場合、用語「ＨＢＶコア抗原」、「ＨＢｃ」、および「コア抗原」は全て、対象においてＨＢＶコアタンパク質に対する免疫応答、例えば液性免疫応答および／または細胞性免疫応答を誘導することが可能なＨＢＶ抗原を指す。用語「コア」、「コアポリペプチド」、および「コアタンパク質」の各々は、ＨＢＶウイルスコアタンパク質を指す。完全長のコア抗原は、典型的には、１８３アミノ酸長であり、アセンブリドメイン（アミノ酸１～１４９）および核酸結合ドメイン（アミノ酸１５０～１８３）を含む。３４残基の核酸結合ドメインは、プレゲノムＲＮＡキャプシド形成にとって必要である。このドメインはまた、核輸入シグナルとしても機能する。これは、１７個のアルギニ

ン残基を含み、その機能と整合して、高度に塩基性である。ＨＢＶコアタンパク質は溶液中で二量体であり、二量体は、正二十面体のキャプシドへと自己アセンブルする。コアタンパク質の各々の二量体は、いずれかの側にα－ヘリックスドメインが隣接する４つのα－ヘリックスバンドルを有する。核酸結合ドメインを欠如する切断型ＨＢＶコアタンパク質もまた、キャプシドを形成することが可能である。

【００４９】

本出願の一実施形態では、ＨＢＶ抗原は、切断型ＨＢＶコア抗原である。本明細書で使用される場合、「切断型ＨＢＶコア抗原」は、ＨＢＶコアタンパク質の完全長を含有しないが、対象においてＨＢＶコアタンパク質に対する免疫応答を誘導することが可能であるＨＢＶ抗原を指す。例えば、ＨＢＶコア抗原は、典型的に１７個のアルギニン（Ｒ）残基を含有するコア抗原の高度に正に帯電した（アルギニンに富む）Ｃ末端核酸結合ドメインの１つまたは複数のアミノ酸を欠失させるように改変することができる。本出願の切断型ＨＢＶコア抗原は、好ましくはＨＢＶコア核輸入シグナルを含まないＣ末端切断型ＨＢＶコアタンパク質、および／またはＣ末端ＨＢＶコア核輸入シグナルが欠失している切断型ＨＢＶコアタンパク質である。一実施形態では、切断型ＨＢＶコア抗原は、Ｃ末端核酸結合ドメインの１～３４アミノ酸残基の欠失、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、または３４アミノ酸残基の欠失、好ましくは３４アミノ酸残基全ての欠失を含む。好ましい実施形態では、切断型ＨＢＶコア抗原は、Ｃ末端核酸結合ドメインの欠失を含み、好ましくは３４アミノ酸残基全ての欠失を含む。

【００５０】

本出願のＨＢＶコア抗原は、複数のＨＢＶ遺伝子型（例えば、遺伝子型Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、およびＨ）に由来するコンセンサス配列であり得る。本明細書で使用される場合、「コンセンサス配列」は、例えば相同なタンパク質のアミノ酸配列のアライメント（例えば、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａを使用して）によって決定した、相同なタンパク質のアミノ酸配列のアライメントに基づく人工的なアミノ酸配列を意味する。これは、少なくとも１００個の天然のＨＢＶ単離体からのＨＢＶ抗原（例えば、コア、ｐｏｌ等）の配列に基づいて、配列アライメントにおける各位置で見出される最も頻繁なアミノ酸残基の計算された順序であり得る。コンセンサス配列は、天然に存在せず、ネイティブウイルス配列とは異なり得る。コンセンサス配列は、マルチプル配列アライメントツールを使用して異なる起源からの複数のＨＢＶ抗原配列を整列させるステップ、および多様なアライメント位置で最も頻繁なアミノ酸を選択するステップによって設計することができる。好ましくは、ＨＢＶ抗原のコンセンサス配列は、ＨＢＶ遺伝子型Ｂ、Ｃ、およびＤに由来する。用語「コンセンサス抗原」は、コンセンサス配列を有する抗原を指すために使用される。

【００５１】

本出願に従う例示的な切断型ＨＢＶコア抗原は、核酸結合機能を欠如し、哺乳動物において少なくとも２つのＨＢＶ遺伝子型に対する免疫応答を誘導することが可能である。好ましくは、切断型ＨＢＶコア抗原は、哺乳動物において少なくともＨＢＶ遺伝子型Ｂ、ＣおよびＤに対するＴ細胞応答を誘導することが可能である。より好ましくは、切断型ＨＢＶコア抗原は、ヒト対象において少なくともＨＢＶ遺伝子型Ａ、Ｂ、ＣおよびＤに対するＣＤ８　Ｔ細胞応答を誘導することが可能である。

【００５２】

好ましくは、本出願のＨＢＶコア抗原は、コンセンサス抗原、好ましくはＨＢＶ遺伝子型Ｂ、Ｃ、およびＤに由来するコンセンサス抗原、より好ましくはＨＢＶ遺伝子型Ｂ、Ｃ、およびＤに由来する切断型コンセンサス抗原である。本出願に従う例示的な切断型ＨＢＶコアコンセンサス抗原は、配列番号２または配列番号４と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号２または配列番号４と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．

５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列からなる。配列番号２および配列番号４は、ＨＢＶ遺伝子型Ｂ、Ｃ、およびＤに由来するコアコンセンサス抗原である。配列番号２および配列番号４は、それぞれネイティブコア抗原の高度に正に帯電した（アルギニンに富む）核酸結合ドメインの３４アミノ酸Ｃ末端欠失を含有する。

【００５３】

本出願の一実施形態では、ＨＢＶコア抗原は、配列番号２のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶ抗原である。別の実施形態では、ＨＢＶコア抗原は、配列番号４のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶ抗原である。別の実施形態では、ＨＢＶコア抗原は、成熟ＨＢＶコア抗原配列、例えば配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をさらに含有する。好ましくは、シグナル配列は、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を有する。

【００５４】

（２）ＨＢＶポリメラーゼ抗原

本明細書で使用される場合、用語「ＨＢＶポリメラーゼ抗原」、「ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原」、または「ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原」は、対象においてＨＢＶポリメラーゼに対する免疫応答、例えば液性免疫応答および／または細胞性免疫応答を誘導することが可能であるＨＢＶ抗原を指す。用語「ポリメラーゼ」、「ポリメラーゼポリペプチド」、「Ｐｏｌ」、および「ｐｏｌ」は、ＨＢＶウイルスＤＮＡポリメラーゼを指す。ＨＢＶウイルスＤＮＡポリメラーゼは、Ｎ末端からＣ末端に、マイナス鎖ＤＮＡ合成のプライマーとして作用する末端タンパク質（ＴＰ）ドメイン、ポリメラーゼ機能にとって必須ではないスペーサー、転写のための逆転写酵素（ＲＴ）ドメイン、およびＲＮアーゼＨドメインを含む４つのドメインを有する。

【００５５】

本出願の一実施形態では、ＨＢＶ抗原は、ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原、またはその免疫原性断片または組合せを含む。ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原は、例えばある特定の酵素活性を減少させるかまたは実質的に排除するために、ポリメラーゼおよび／またはＲＮアーゼドメインの活性部位に変異を導入することによって、抗原の免疫原性を改善するためにさらなる改変を含有し得る。

【００５６】

好ましくは、本出願のＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原は、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有さず、哺乳動物において少なくとも２つのＨＢＶ遺伝子型に対する免疫応答を誘導することが可能である。好ましくは、ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原は、哺乳動物において少なくともＨＢＶ遺伝子型Ｂ、ＣおよびＤに対するＴ細胞応答を誘導することが可能である。より好ましくは、ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原は、ヒト対象において、少なくともＨＢＶ遺伝子型Ａ、Ｂ、ＣおよびＤに対するＣＤ８　Ｔ細胞応答を誘導することが可能である。

【００５７】

このように、一部の実施形態では、ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原は、不活化Ｐｏｌ抗原である。一実施形態では、不活化ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原は、ポリメラーゼドメインの活性部位に１つまたは複数のアミノ酸変異を含む。別の実施形態では、不活化ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原は、ＲＮアーゼＨドメインの活性部位に１つまたは複数のアミノ酸変異を含む。好ましい実施形態では、不活化ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原は、ポリメラーゼドメインおよびＲＮアーゼＨドメインの両方の活性部位に１つまたは複数のアミノ酸変異を含む。例えば、ヌクレオチド／金属イオン結合にとって必要であり得るＨＢＶ　ｐｏｌ抗原のポリメラーゼドメインにおける「ＹＸＤＤ」モチーフを、例えばアスパラギン酸塩残基（Ｄ）の１つまたは複数をアスパラギン残基（Ｎ）に置換することによって、変異させることができ、それによって金属配位機能を排除するかまたは低減させ、それによって逆転写酵素機能を減少させるかまたは実質的に排除することができる。あるいは、または「ＹＸＤＤ」モチーフの変異に加えて、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原のＲＮアーゼＨドメインにおけるＭｇ２＋配位にとって必要な「

ＤＥＤＤ」モチーフを、例えば１つまたは複数のアスパラギン酸塩残基（Ｄ）をアスパラギン残基（Ｎ）に置換することによって、および／またはグルタミン酸塩残基（Ｅ）をグルタミン（Ｑ）に置換することによって変異させることができ、それによってＲＮアーゼＨ機能を減少させるかまたは実質的に排除することができる。特定の実施形態では、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原は、（１）ポリメラーゼドメインの「ＹＸＤＤ」モチーフにおいてアスパラギン酸塩残基（Ｄ）をアスパラギン残基（Ｎ）に変異させることによって、および（２）ＲＮアーゼＨドメインの「ＤＥＤＤ」モチーフにおける第１のアスパラギン酸塩残基（Ｄ）をアスパラギン残基（Ｎ）に、および第１のグルタミン酸塩残基（Ｅ）をグルタミン残基（Ｎ）に変異させることによって改変され、それによってｐｏｌ抗原の逆転写酵素およびＲＮアーゼＨ機能を減少させるかまたは実質的に排除する。

【００５８】

本出願の好ましい実施形態では、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原は、コンセンサス抗原、好ましくはＨＢＶ遺伝子型Ｂ、Ｃ、およびＤに由来するコンセンサス抗原であり、より好ましくはＨＢＶ遺伝子型Ｂ、Ｃ、およびＤに由来する不活化コンセンサス抗原である。本出願に従う例示的なＨＢＶ　ｐｏｌコンセンサス抗原は、配列番号７と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号７と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号７と少なくとも９８％同一である、例えば配列番号７と少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。配列番号７は、ポリメラーゼおよびＲＮアーゼＨドメインの活性部位に位置する４つの変異を含むＨＢＶ遺伝子型Ｂ、Ｃ、およびＤに由来するｐｏｌコンセンサス抗原である。特に、４つの変異は、ポリメラーゼドメインの「ＹＸＤＤ」モチーフにおけるアスパラギン酸塩残基（Ｄ）のアスパラギン残基（Ｎ）への変異、ならびにＲＮアーゼＨドメインの「ＤＥＤＤ」モチーフにおける第１のアスパラギン酸塩残基（Ｄ）のアスパラギン残基（Ｎ）への変異、およびグルタミン酸塩残基（Ｅ）のグルタミン残基（Ｑ）への変異を含む。

【００５９】

本出願の特定の実施形態では、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原は、配列番号７のアミノ酸配列を含む。本出願の他の実施形態では、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原は、配列番号７のアミノ酸配列からなる。さらなる実施形態では、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原は、成熟ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原配列、例えば配列番号７のアミノ酸配列のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をさらに含有する。好ましくは、シグナル配列は、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を有する。

【００６０】

（３）ＨＢＶコア抗原およびＨＢＶポリメラーゼ抗原の融合体

本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」、または「融合体」は、単一の天然のポリペプチドに通常存在しない少なくとも２つのポリペプチドドメインを有する単一のポリペプチド鎖を指す。

【００６１】

本出願の一実施形態では、ＨＢＶ抗原は、好ましくはリンカーを介して、ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に作動可能に連結された切断型ＨＢＶコア抗原、または切断型ＨＢＶコア抗原に作動可能に連結されたＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原を含む融合タンパク質を含む。

【００６２】

例えば、第１のポリペプチドおよび第２の異種ポリペプチドを含有する融合タンパク質では、リンカーは、主に第１のポリペプチドと第２の異種ポリペプチドとの間のスペーサーとしての役目を果たす。一実施形態では、リンカーは、ペプチド結合によって共に連結されたアミノ酸、好ましくはペプチド結合によって連結された１～２０個のアミノ酸で構成され、アミノ酸は、２０個の天然に存在するアミノ酸から選択される。一実施形態では

、１～２０個のアミノ酸は、グリシン、アラニン、プロリン、アスパラギン、グルタミン、およびリジンから選択される。好ましくは、リンカーは、立体妨害を受けないアミノ酸、例えばグリシンおよびアラニンで大部分が構成される。例示的なリンカーは、ポリグリシン、特に（Ｇｌｙ）$_5$、（Ｇｌｙ）$_8$、ポリ（Ｇｌｙ－Ａｌａ）、およびポリアラニンである。以下の実施例に示される１つの例示的な適したリンカーは、（ＡｌａＧｌｙ）$_n$であり、式中ｎは２～５の整数である。

【００６３】

好ましくは、本出願の融合タンパク質は、哺乳動物において、少なくとも２つのＨＢＶ遺伝子型のＨＢＶコアおよびＨＢＶ　Ｐｏｌに対する免疫応答を誘導することが可能である。好ましくは、融合タンパク質は、哺乳動物において少なくともＨＢＶ遺伝子型Ｂ、ＣおよびＤに対するＴ細胞応答を誘導することが可能である。より好ましくは、融合タンパク質は、ヒト対象において少なくともＨＢＶ遺伝子型Ａ、Ｂ、ＣおよびＤに対するＣＤ８Ｔ細胞応答を誘導することが可能である。

【００６４】

本出願の一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号２または配列番号４と少なくとも９０％同一である、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を有する切断型ＨＢＶコア抗原、リンカー、および配列番号７と少なくとも９０％同一である、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を有するＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原を含む。

【００６５】

本出願の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原、ｎが２～５の整数である（ＡｌａＧｌｙ）$_n$を含むリンカー、および配列番号７のアミノ酸配列を有するＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原を含む。より好ましくは、本出願の実施形態に従う融合タンパク質は、配列番号１６のアミノ酸配列を含む。

【００６６】

本出願の一実施形態において、融合タンパク質は、融合タンパク質のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をさらに含む。好ましくは、シグナル配列は、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を有する。一実施形態では、融合タンパク質は、配列番号１７のアミノ酸配列を含む。

【００６７】

本発明に使用することができるＨＢＶワクチンに関する追加の開示は、２０１８年１２月１８日に出願された米国特許出願第１６／２２３，２５１号に記載されており、この出願の内容、より好ましくはこの出願の実施例は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。

【００６８】

ポリヌクレオチドおよびベクター

別の一般的な態様では、本出願は、本出願の実施形態による発明に有用なＨＢＶ抗原をコードする天然に存在しない核酸分子、および天然に存在しない核酸を含むベクターを提供する。第１または第２の天然に存在しない核酸分子は、本出願に有用なＨＢＶ抗原をコードするあらゆるポリヌクレオチド配列を含むことができ、これは、本発明の開示を考慮して当技術分野で公知の方法を使用して作製することができる。好ましくは、第１または第２のポリヌクレオチドは、本出願の切断型ＨＢＶコア抗原およびＨＢＶポリメラーゼ抗原の少なくとも１つをコードする。ポリヌクレオチドは、組換え技術（例えば、クローニング）によって得た、または合成（例えば、化学合成）によって産生されたＲＮＡの形態

またはＤＮＡの形態であり得る。ＤＮＡは、一本鎖もしくは二本鎖であり得るか、または二本鎖および一本鎖配列の両方の部分を含有し得る。例えば、ＤＮＡは、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、またはその組合せを含み得る。ポリヌクレオチドはまた、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドでもあり得る。本出願のポリヌクレオチドおよびベクターは、組換えタンパク質産生、宿主細胞におけるタンパク質の発現、またはウイルス粒子の産生のために使用することができる。好ましくは、ポリヌクレオチドは、ＤＮＡである。

【００６９】

本出願の一実施形態では、第１の天然に存在しない核酸分子は、配列番号２または配列番号４と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号２と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号２または配列番号４と９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む。本出願の特定の実施形態では、第１の天然に存在しない核酸分子は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む。

【００７０】

配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする本出願のポリヌクレオチド配列の例には、配列番号１または配列番号３と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号１または配列番号３と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号１または配列番号３と９８％、９９％、または１００％同一であるポリヌクレオチド配列が挙げられるがこれらに限定されない。切断型ＨＢＶコア抗原をコードする例示的な天然に存在しない核酸分子は、配列番号１または３のポリヌクレオチド配列を有する。

【００７１】

別の実施形態では、第１の天然に存在しない核酸分子は、ＨＢＶコア抗原配列のＮ末端に作動可能に連結されているシグナル配列のコード配列をさらに含む。好ましくは、シグナル配列は、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を有する。より好ましくは、シグナル配列のコード配列は、配列番号８または配列番号１４のポリヌクレオチド配列を含む。

【００７２】

本出願の実施形態では、第２の天然に存在しない核酸分子は、配列番号７と少なくとも９０％同一な、例えば配列番号７と、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％または１００％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む。本出願の特定の実施形態では、第２の天然に存在しない核酸分子は、配列番号７のアミノ酸配列からなるＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む。

【００７３】

配列番号７と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原をコードする本出願のポリヌクレオチド配列の例には、配列番号５または配列番号６と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号５または配列番号６と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％

、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号５または配列番号６と９８％、９９％、または１００％同一であるポリヌクレオチド配列が挙げられるがこれらに限定されない。ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原をコードする例示的な天然に存在しない核酸分子は、配列番号５または６のポリヌクレオチド配列を有する。

【００７４】

別の実施形態では、第２の天然に存在しない核酸分子は、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原配列、例えば配列番号７のアミノ酸配列のＮ末端に作動可能に連結されているシグナル配列のコード配列をさらに含む。好ましくは、シグナル配列は、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を有する。より好ましくは、シグナル配列のコード配列は、配列番号８または配列番号１４のポリヌクレオチド配列を含む。

【００７５】

本出願の別の実施形態では、天然に存在しない核酸分子は、ＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に作動可能に連結された切断型ＨＢＶコア抗原、または切断型ＨＢＶコア抗原に作動可能に連結されたＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原を含むＨＢＶ抗原融合タンパク質をコードする。特定の実施形態では、本出願の天然に存在しない核酸分子は、配列番号２または配列番号４と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号２または配列番号４と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号２または配列番号４と１００％同一である、より好ましくは配列番号２または配列番号４と１００％同一であるアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原；リンカー；ならびに配列番号７と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号７と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号７と９８％、９９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする。本出願の特定の実施形態では、天然に存在しない核酸分子は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原、ｎが２～５の整数である（ＡｌａＧｌｙ）ｎを含むリンカー、および配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原を含む融合タンパク質をコードする。本出願の特定の実施形態では、天然に存在しない核酸分子は、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＢＶ抗原融合タンパク質をコードする。

【００７６】

ＨＢＶ抗原融合タンパク質をコードする本出願のポリヌクレオチド配列の例には、配列番号１または配列番号３と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号１または配列番号３と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号１または配列番号３と９８％、９９％、または１００％同一であるポリヌクレオチド配列であって、配列番号１１と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号１１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号１１と９８％、９９％、または１００％同一であるリンカーコード配列に作動可能に連結され、リンカーコード配列がさらに、配列番号５または配列番号６と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号５または配列番号６と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９

．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号５または配列番号６と９８％、９９％、または１００％同一であるポリヌクレオチド配列にさらに作動可能に連結される、ポリヌクレオチド配列が挙げられるがこれらに限定されない。本出願の特定の実施形態では、ＨＢＶ抗原融合タンパク質をコードする天然に存在しない核酸分子は、配列番号５または配列番号６にさらに作動可能に連結された配列番号１１に作動可能に連結された配列番号１または配列番号３を含む。

【００７７】

別の実施形態では、ＨＢＶ融合体をコードする天然に存在しない核酸分子は、ＨＢＶ融合体配列、例えば配列番号１６のアミノ酸配列のＮ末端に作動可能に連結されているシグナル配列のコード配列をさらに含む。好ましくは、シグナル配列は、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を有する。より好ましくは、シグナル配列のコード配列は、配列番号８または配列番号１４のポリヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、シグナル配列を含むコードされた融合タンパク質は、配列番号１７のアミノ酸配列を含む。

【００７８】

本出願はまた、第１および／または第２の天然に存在しない核酸分子を含むベクターにも関する。本明細書で使用される場合、「ベクター」は、遺伝子材料を別の細胞に運ぶために使用され、そこで複製および／または発現させることができる核酸分子である。本開示を考慮して当業者に公知の任意のベクターを使用することができる。ベクターの例には、プラスミド、ウイルスベクター（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、コスミド、および人工染色体（例えば、ＹＡＣ）が挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、ベクターはＤＮＡプラスミドである。ベクターは、ＤＮＡベクターまたはＲＮＡベクターであり得る。当業者は、本開示を考慮して標準的な組換え技術を通して、本出願のベクターを構築することができる。

【００７９】

本出願のベクターは、発現ベクターであり得る。本明細書で使用される場合、用語「発現ベクター」は、転写することが可能なＲＮＡをコードする核酸を含む任意のタイプの遺伝子構築物を指す。発現ベクターには、組換えタンパク質発現のためのベクター、例えばＤＮＡプラスミド、またはウイルスベクター、および対象の組織において発現させるために対象に核酸を送達するためのベクター、例えばＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル等の要因に依存し得ることは当業者によって認識される。

【００８０】

本出願のベクターは、多様な調節配列を含有し得る。本明細書で使用される場合、用語「調節配列」は、複製、重複、転写、スプライシング、翻訳、核酸またはその誘導体の１つ（すなわち、ｍＲＮＡ）の安定性および／または宿主細胞もしくは生物への輸送を含む、核酸分子の機能的調節を可能にする、寄与する、またはモジュレートする任意の配列を指す。本開示の文脈では、この用語は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナルおよびｍＲＮＡ安定性に影響を及ぼすエレメント）を包含する。

【００８１】

本出願の一部の実施形態では、ベクターは、非ウイルスベクターである。非ウイルスベクターの例には、ＤＮＡプラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、バクテリオファージ等が挙げられるがこれらに限定されない。非ウイルスベクターの例には、ＲＮＡレプリコン、ｍＲＮＡレプリコン、改変ｍＲＮＡレプリコン、または自己増幅ｍＲＮＡ、閉鎖線形デオキシリボ核酸、例えば線形共有結合閉鎖二本鎖ＤＮＡ分子など線形共有結合閉鎖ＤＮＡが挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、非ウイルスベクターは、ＤＮＡプラスミドである。「ＤＮＡプラスミド」は、「ＤＮＡプラスミドベクター」、「プラスミドＤＮＡ」または「プラスミドＤＮＡベクター」と互換的に使用され、適した宿主細

胞において自立複製を可能にする、二本鎖で一般的に環状のＤＮＡ配列を指す。コードされるポリヌクレオチドの発現のために使用されるＤＮＡプラスミドは、典型的には、複製開始点、マルチクローニングサイト、および例えば抗生物質耐性遺伝子であり得る選択可能マーカーを含む。使用することができる適したＤＮＡプラスミドの例には、周知の発現系において使用するための市販の発現ベクター（原核細胞および真核細胞系の両方を含む）、例えば大腸菌（Escherichia coli）におけるタンパク質の産生および／または発現のために使用することができるｐＳＥ４２０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．）；酵母（Saccharomyces cerevisiae）株における産生および／または発現のために使用することができるｐＹＥＳ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）；昆虫細胞における産生および／または発現のために使用することができるＭＡＸＢＡＣ（登録商標）完全バキュロウイルス発現系（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）；哺乳動物細胞における高レベルの構成的タンパク質発現のために使用することができるｐｃＤＮＡ（商標）またはｐｃＤＮＡ３（商標）（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）；ならびにほとんどの哺乳動物細胞において目的のタンパク質の高レベルの一過性の発現のために使用することができるｐＶＡＸまたはｐＶＡＸ－１（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が挙げられるがこれらに限定されない。任意の市販のＤＮＡプラスミドの骨格を、宿主細胞におけるタンパク質発現を最適にするために、通常の技術および容易に入手可能な出発材料を使用して、例えばある特定のエレメント（例えば、複製開始点および／または抗生物質耐性カセット）の方向を逆転させるように、プラスミドに対して内因性のプロモーター（例えば、抗生物質耐性カセットにおけるプロモーター）を置換するように、および／または転写されたタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子のコード配列）を置換するように改変することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Second Ed. Cold Spring Harbor Press(1989)を参照されたい）。

【００８２】

好ましくは、ＤＮＡプラスミドは、哺乳動物宿主細胞におけるタンパク質発現にとって適した発現ベクターである。哺乳動物宿主細胞におけるタンパク質発現にとって適した発現ベクターには、ｐｃＤＮＡ（商標）、ｐｃＤＮＡ３（商標）、ｐＶＡＸ、ｐＶＡＸ－１、ＡＤＶＡＸ、ＮＴＣ８４５４等が挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、発現ベクターはｐＶＡＸ－１に基づくが、これを、哺乳動物細胞におけるタンパク質発現を最適にするためにさらに改変することができる。ｐＶＡＸ－１は、ＤＮＡワクチンにおいて一般的に使用されるプラスミドであり、強いヒト中間初期サイトメガロウイルス（ＣＭＶ－ＩＥ）プロモーター、その後に続くウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）由来ポリアデニル化配列（ｐＡ）を含有する。ｐＶＡＸ－１は、細菌プラスミドの繁殖を可能にする小さい原核細胞プロモーターによって駆動されるｐＵＣ複製開始点およびカナマイシン耐性遺伝子をさらに含有する。

【００８３】

本出願のベクターはまた、ウイルスベクターであり得る。一般的に、ウイルスベクターは、非感染性にされているが、それでもなおウイルスプロモーターおよびトランスジーンを含有し、それによってウイルスプロモーターを通してのトランスジーンの翻訳を可能にする、改変ウイルスＤＮＡまたはＲＮＡを保有する遺伝子操作ウイルスである。ウイルスベクターはしばしば、感染性の配列を欠如することから、それらは大規模トランスフェクションのためにはヘルパーウイルスまたはパッケージングラインを必要とする。使用することができるウイルスベクターの例には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、腸内ウイルスベクター、ベネズエラウマ脳炎ウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、タバコモザイクウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられるがこれらに限定されない。使用することができるウイルスベクターの例には、アレナウイルスウイルスベクター、複製欠損アレナウイルスウイ

ルスベクターまたは複製コンピテントアレナウイルスウイルスベクター、２分節または３分節アレナウイルス、感染性アレナウイルスウイルスベクター、ゲノム分節の１つのオープンリーディングフレームが欠失しているかまたは機能的に不活性化されている（および本明細書に記載のＨＢＶ抗原をコードする核酸によって置換されている）アレナウイルスゲノム分節を含む核酸、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）、例えばクローン１３株またはＭＰ株、およびフニンウイルス、例えば、Ｃａｎｄｉｄ　＃１株等のアレナウイルス等のアレナウイルス等が挙げられるがこれらに限定されない。ベクターはまた、非ウイルスベクターでもあり得る。

【００８４】

好ましくは、ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、例えば組換えアデノウイルスベクターである。組換えアデノウイルスベクターは、例えばヒトアデノウイルス（ＨＡｄＶ、またはＡｄＨｕ）、またはシミアンアデノウイルス、例えばチンパンジーもしくはゴリラアデノウイルス（ＣｈＡｄ、ＡｄＣｈ、またはＳＡｄＶ）もしくはアカゲザルアデノウイルス（ｒｈＡｄ）に由来し得る。好ましくは、アデノウイルスベクターは、組換えヒトアデノウイルスベクター、例えば組換えヒトアデノウイルス血清型２６、または組換えヒトアデノウイルス血清型５、４、３５、７、４８等のいずれか１つである。他の実施形態では、アデノウイルスベクターは、ｒｈＡｄベクター、例えばｒｈＡｄ５１、ｒｈＡｄ５２またはｒｈＡｄ５３である。

【００８５】

ベクターは、線形共有結合閉鎖二本鎖（ｌｉｎｅａｒ　ｃｏｖａｌｅｎｔｌｙ　ｃｌｏｓｅｄ　ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ）ＤＮＡベクターであってもよい。「線形共有結合閉鎖二本鎖ＤＮＡベクター」は、本明細書で使用される場合、構造的にプラスミドＤＮＡとは異なる線形閉鎖デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を指す。これは、プラスミドＤＮＡの利点の多くに加えてＲＮＡ戦略に類似した最小のカセットサイズを有する。例えば、これは、コードされた抗原性配列、プロモーター、ポリアデニル化配列、およびテロメア末端を一般的に含むベクターカセットであり得る。プラスミドフリーの構築物は、細菌の配列を必要とすることなく酵素的なプロセスを介して合成することができる。好適な線形共有結合閉鎖ＤＮＡベクターの例には、商業的に入手可能な発現ベクター、例えば「Ｄｏｇｇｙｂｏｎｅ（商標）閉鎖線形ＤＮＡ」（ｄｂＤＮＡ（商標））（ＴｏｕｃｈｌｉｇｈｔＧｅｎｅｔｉｃｓ　Ｌｔｄ．；Ｌｏｎｄｏｎ、Ｅｎｇｌａｎｄ）が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、内容全体が参照により本明細書に組み込まれるScott et al, Hum Vaccin Immunother. 2015 Aug; 11(8): 1972-1982を参照されたい。ＤＮＡ分子、例えば本発明の活性分子を送達するためのこのようなベクターを作り出し、使用するための、線形共有結合閉鎖二本鎖ＤＮＡベクター、組成物および方法の一部の例は、ＵＳ２０１２／０２８２２８３、ＵＳ２０１３／０２１６５６２、およびＵＳ２０１８／００３７９４３に記載されており、これらのそれぞれの関連する内容は、参照によりその全体が組み込まれる。

【００８６】

本出願にとって有用な組換えベクターは、本開示を考慮して当技術分野で公知の方法を使用して調製することができる。例えば、遺伝子コードの縮重を考慮して、同じポリペプチドをコードするいくつかの核酸配列を設計することができる。本出願のＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞（例えば、細菌または哺乳動物細胞）における適切な発現を確保するために、任意選択でコドン最適化することができる。コドン最適化は、当技術分野で広く適用される技術であり、コドン最適化ポリヌクレオチドを得る方法は本開示を考慮して当業者に周知である。

【００８７】

本出願のベクター、例えば、ＤＮＡプラスミド、ウイルスベクター（特にアデノウイルスベクター）、ＲＮＡベクター（例えば自己増殖ＲＮＡレプリコン）、または線形共有結合閉鎖二本鎖ＤＮＡベクターは、これらに限定されないが、ベクターのポリヌクレオチド配列によってコードされたＨＢＶ抗原の複製および発現などのベクターの従来の機能を確

立するために、任意の調節エレメントを含み得る。調節エレメントには、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、翻訳終止コドン、リボソーム結合エレメント、転写ターミネーター、選択マーカー、複製開始点等が挙げられるがこれらに限定されない。ベクターは、１つまたは複数の発現カセットを含み得る。「発現カセット」は、細胞機構にＲＮＡおよびタンパク質を作製するよう指示するベクターの一部である。発現カセットは典型的には、３つの構成要素：プロモーター配列、オープンリーディングフレーム、および任意選択でポリアデニル化シグナルを含む３’非翻訳領域（ＵＴＲ）を含む。オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、開始コドンから終止コドンまでの目的のタンパク質（例えば、ＨＢＶ抗原）のコード配列を含有する読み取り枠である。発現カセットの調節エレメントは、目的のＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結させることができる。本明細書で使用される場合、用語「作動可能に連結された」は、その最も広い妥当な文脈で解釈され、機能的に関連するポリヌクレオチドエレメントの連結を指す。ポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチドと機能的関係にある場合に「作動可能に連結」されている。例えば、プロモーターは、それがコード配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結されている。本明細書に記載の発現カセットにおいて使用するために適した任意の構成要素を、本出願のベクターを調製するために任意の組合せおよび任意の順序で使用することができる。

【００８８】

ベクターは、目的のＨＢＶ抗原の発現を制御するために、好ましくは発現カセット内にプロモーター配列を含み得る。用語「プロモーター」は、その通常の意味で使用され、作動可能に連結されたヌクレオチド配列の転写を開始するヌクレオチド配列を指す。プロモーターは、それが転写するヌクレオチド配列の近くの同じ鎖上に位置する。プロモーターは、構成的、誘導型、または抑制性であり得る。プロモーターは、天然に存在するかまたは合成であり得る。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、および動物を含む起源に由来し得る。プロモーターは、同種プロモーター（すなわちベクターと同じ遺伝的起源に由来する）または異種プロモーター（すなわち、異なるベクターまたは遺伝的起源に由来する）であり得る。例えば、使用されるベクターが、ＤＮＡプラスミドである場合、プロモーターは、プラスミドに対して内因性であり得るか（同種）、または他の起源に由来し得る（異種）。好ましくは、プロモーターは、発現カセット内でＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドの上流に位置する。

【００８９】

使用することができるプロモーターの例には、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）のプロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルスウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）プロモーター、例えばウシ免疫不全ウイルス（ＢＩＶ）長末端反復（ＬＴＲ）プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス（ＡＬＶ）プロモーター、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、例えばＣＭＶ前初期プロモーター（ＣＭＶ－ＩＥ）、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）プロモーター、またはラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）プロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。プロモーターはまた、ヒト遺伝子のプロモーター、例えばヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、またはヒトメタロチオネインのプロモーターであり得る。プロモーターはまた、組織特異的プロモーター、例えば天然または合成の筋特異的または皮膚特異的プロモーターであり得る。

【００９０】

好ましくは、プロモーターは、強い真核細胞プロモーター、好ましくはサイトメガロウイルス前初期（ＣＭＶ－ＩＥ）プロモーターである。例示的なＣＭＶ－ＩＥプロモーターのヌクレオチド配列を、配列番号１８または配列番号１９に示す。

【００９１】

ベクターは、発現された転写物を安定化する、ＲＮＡ転写物の核輸出を増強する、および／または転写－翻訳カップリングを改善する追加のポリヌクレオチド配列を含み得る。そのような配列の例には、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサー配列が挙げられる

。ポリアデニル化シグナルは、典型的には、ベクターの発現カセット内の目的のタンパク質（例えば、ＨＢＶ抗原）のコード配列の下流に位置する。エンハンサー配列は、転写因子が結合すると、関連する遺伝子の転写を増強する調節性ＤＮＡ配列である。エンハンサー配列は、ベクターの発現カセット内で、好ましくはＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチド配列の上流であるが、プロモーター配列の下流に位置する。

【００９２】

本開示を考慮して当業者に公知の任意のポリアデニル化シグナルを使用することができる。例えば、ポリアデニル化シグナルは、ＳＶ４０ポリアデニル化シグナル、ＬＴＲポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）ポリアデニル化シグナル、またはヒトβ－グロビンポリアデニル化シグナルであり得る。好ましくは、ポリアデニル化シグナルは、ウシ成長ホルモン（ｂＧＨ）ポリアデニル化シグナル、またはＳＶ４０ポリアデニル化シグナルである。例示的なｂＧＨポリアデニル化シグナルのヌクレオチド配列を配列番号２０に示す。例示的なＳＶ４０ポリアデニル化シグナルのヌクレオチド配列を配列番号１３に示す。

【００９３】

本開示を考慮して当業者に公知の任意のエンハンサー配列を使用することができる。例えば、エンハンサー配列は、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン、またはウイルスエンハンサー、例えばＣＭＶ、ＨＡ、ＲＳＶ、もしくはＥＢＶ由来のエンハンサーであり得る。特定のエンハンサーの例には、ウッドチャックＨＢＶ転写後調節エレメント（ＷＰＲＥ）、ヒトアポリポタンパク質Ａ１前駆体（ＡｐｏＡＩ）に由来するイントロン／エクソン配列、ヒトＴ細胞白血病ウイルス１型（ＨＴＬＶ－１）長末端反復（ＬＴＲ）の非翻訳Ｒ－Ｕ５ドメイン、スプライシングエンハンサー、合成ウサギβ－グロビンイントロン、またはその任意の組合せが挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、エンハンサー配列は、ＨＴＬＶ－１　ＬＴＲの非翻訳Ｒ－Ｕ５ドメイン、ウサギβ－グロビンイントロン、およびスプライシングエンハンサーの３つの連続するエレメントの複合配列であり、これを本明細書において「トリプルエンハンサー配列」と呼ぶ。例示的なトリプルエンハンサー配列のヌクレオチド配列を配列番号１０に示す。別の例示的なエンハンサー配列は、配列番号１２に示すＡｐｏＡＩ遺伝子断片である。

【００９４】

ベクターは、シグナルペプチド配列をコードするポリヌクレオチドを含み得る。好ましくは、シグナルペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列は、ＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチド配列の上流に位置する。シグナルペプチドは、典型的には、タンパク質の局在化を指示し、それが産生される細胞からのタンパク質の分泌を容易にし、ならびに／または抗原発現および抗原提示細胞に対する交差提示を改善する。シグナルペプチドは、ベクターから発現される場合、ＨＢＶ抗原のＮ末端に存在し得るが、細胞からの分泌時にシグナルペプチダーゼによって切断される。シグナルペプチドが切断されている発現されたタンパク質は、しばしば「成熟タンパク質」と呼ばれる。本開示を考慮して当技術分野で公知の任意のシグナルペプチドを使用することができる。例えば、シグナルペプチドは、シスタチンＳシグナルペプチド、免疫グロブリン（Ｉｇ）分泌シグナル、例えばＩｇ重鎖ガンマシグナルペプチドＳＰＩｇＧ、またはＩｇ重鎖イプシロンシグナルペプチドＳＰＩｇＥであり得る。

【００９５】

好ましくは、シグナルペプチド配列は、シスタチンＳシグナルペプチドである。シスタチンＳシグナルペプチドの例示的な核酸およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号８および９に示す。免疫グロブリン分泌シグナルの例示的な核酸およびアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号１４および１５に示す。

【００９６】

ベクター、例えばＤＮＡプラスミドはまた、細菌複製開始点、ならびに細菌細胞、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）におけるプラスミドの選択および維持のための抗生物質耐性発現カセットも含み得る。細菌の複製開始点および抗生物質耐性カセットは、ベクター内でＨＢ

Ｖ抗原をコードする発現カセットと同じ方向に、または反対（逆）方向に位置することができる。複製開始点（ＯＲＩ）は、そこで複製が開始される配列であり、プラスミドが細胞内で再生および生存することを可能にする。本出願で使用するために適したＯＲＩの例には、ＣｏｌＥ１、ｐＭＢ１、ｐＵＣ、ｐＳＣ１０１、Ｒ６Ｋ、および１５Ａ、好ましくはｐＵＣが挙げられるがこれらに限定されない。ｐＵＣ　ＯＲＩの例示的なヌクレオチド配列を配列番号２１に示す。

【００９７】

細菌細胞における選択および維持のための発現カセットは典型的には、抗生物質耐性遺伝子に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。好ましくは、抗生物質耐性遺伝子に作動可能に連結されたプロモーター配列は、目的のタンパク質、例えばＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列とは異なる。抗生物質耐性遺伝子は、コドン最適化することができ、抗生物質耐性遺伝子の配列組成は通常、細菌、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のコドン使用に調整される。カナマイシン耐性遺伝子（Ｋａｎｒ）、アンピシリン耐性遺伝子（Ａｍｐｒ）、およびテトラサイクリン耐性遺伝子（Ｔｅｔｒ）、ならびにクロラムフェニコール、ブレオマイシン、スペクチノマイシン、カルベニシリン等に対して耐性を付与する遺伝子を含むがこれらに限定されない、本開示を考慮して当業者に公知の任意の抗生物質耐性遺伝子を使用することができる。

【００９８】

好ましくは、ベクターの抗生物質発現カセットにおける抗生物質耐性遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子（Ｋａｎｒ）である。Ｋａｎｒ遺伝子の配列を配列番号２２に示す。好ましくは、Ｋａｎｒ遺伝子はコドン最適化されている。コドン最適化したＫａｎｒ遺伝子の例示的な核酸配列を配列番号２３に示す。Ｋａｎｒは、そのネイティブプロモーターに作動可能に連結させることができ、またはＫａｎｒ遺伝子を異種プロモーターに連結させることができる。特定の実施形態では、Ｋａｎｒ遺伝子を、ｂｌａプロモーターとしても知られるアンピシリン耐性遺伝子（Ａｍｐｒ）プロモーターに作動可能に連結させる。ｂｌａプロモーターの例示的なヌクレオチド配列を配列番号２４に示す。

【００９９】

本出願の特定の実施形態では、ベクターは、配列番号７と、少なくとも９０％、例えば９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６、９７％、好ましくは少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％または１００％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶ　ｐｏｌ抗原からなる群から選択されるＨＢＶ抗原の少なくとも１つ、および配列番号２または配列番号４と、少なくとも９５％、例えば９５％、９６、９７％、好ましくは少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％または１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチドを含む発現カセット；５’末端から３’末端に、プロモーター配列、好ましくは配列番号１８のＣＭＶプロモーター配列、エンハンサー配列、好ましくは配列番号１０のトリプルエンハンサー配列、およびシグナルペプチド配列、好ましくは配列番号９のアミノ酸配列を有するシスタチンＳシグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された上流の配列；およびポリアデニル化シグナル、好ましくは配列番号２０のｂＧＨポリアデニル化シグナルを含むＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された下流の配列を含むＤＮＡプラスミドである。そのようなベクターは、配列番号２３と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号２３と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号２３と１００％同一である抗生物質耐性遺伝子、好ましくはＫａｎｒ遺伝子、より好ましくはコドン最適化Ｋａｎｒ遺伝子をコー

ドするポリヌクレオチドであって、抗生物質耐性遺伝子をコードするポリヌクレオチドの上流で作動可能に連結された配列番号２４のＡｍｐｒ（ｂｌａ）プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む抗生物質耐性発現カセット、および複製開始点、好ましくは配列番号２１のｐＵＣ　ｏｒｉをさらに含む。好ましくは、抗生物質耐性カセットおよび複製開始点は、プラスミドにおいてＨＢＶ抗原発現カセットとは逆方向で存在する。

【０１００】

本出願の別の特定の実施形態では、ベクターはウイルスベクター、好ましくはアデノウイルスベクター、より好ましくはＡｄ２６またはＡｄ３５ベクターであって、配列番号７と少なくとも９０％、例えば９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、好ましくは少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含むＨＢＶ　ｐｏｌ抗原、および配列番号２または配列番号４と少なくとも９５％、例えば９５％、９６％、９７％、好ましくは少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原からなる群から選択されるＨＢＶ抗原の少なくとも１つをコードするポリヌクレオチド；５’末端から３’末端に、プロモーター配列、好ましくは配列番号１９のＣＭＶプロモーター配列、エンハンサー配列、好ましくは配列番号１２のＡｐｏＡＩ遺伝子断片配列、およびシグナルペプチド配列、好ましくは配列番号１５のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分泌シグナルをコードするポリヌクレオチド配列を含む、ＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された上流の配列；ならびにポリアデニル化シグナル、好ましくは配列番号１３のＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを含む、ＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された下流の配列を含む発現カセットを含むベクターである。

【０１０１】

本出願の一実施形態では、ベクター、例えばプラスミドＤＮＡベクターまたはウイルスベクター（好ましくはアデノウイルスベクター、より好ましくはＡｄ２６またはＡｄ３５ベクター）は、配列番号７のアミノ酸配列を有するＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原をコードする。好ましくは、ベクターは、配列番号５または配列番号６のポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号５または配列番号６と９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号５または配列番号６と１００％同一であるＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原のコード配列を含む。

【０１０２】

本出願の一実施形態では、ベクター、例えばプラスミドＤＮＡベクターまたはウイルスベクター（好ましくはアデノウイルスベクター、より好ましくはＡｄ２６またはＡｄ３５ベクター）は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする。好ましくは、ベクターは、配列番号１または配列番号３のポリヌクレオチド配列と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号１または配列番号３と９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号１または配列番号３と１００％同一である切断型ＨＢＶコア抗原のコード配列を含む。

【０１０３】

本出願のなお別の実施形態では、ベクター、例えばプラスミドＤＮＡベクターまたはウ

イルスベクター（好ましくはアデノウイルスベクター、より好ましくはＡｄ２６またはＡｄ３５ベクター）は、配列番号７のアミノ酸配列を有するＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原、および配列番号１または配列番号３のアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原を含む融合タンパク質をコードする。好ましくは、ベクターは、配列番号１または配列番号３と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号１または配列番号３と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号１または配列番号３、より好ましくは配列番号１または配列番号３と９８％、９９％または１００％同一である切断型ＨＢＶコア抗原のコード配列であって、配列番号５または配列番号６と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号５または配列番号６と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号５または配列番号６と、より好ましくは配列番号５または配列番号６と９８％、９９％または１００％同一であるＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原のコード配列に作動可能に連結された切断型ＨＢＶコア抗原のコード配列を含有する融合体のコード配列を含む。好ましくは切断型ＨＢＶコア抗原のコード配列は、配列番号１１と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号１１と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一である、好ましくは配列番号１１と９８％、９９％または１００％同一であるリンカーのコード配列を介してＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原のコード配列に作動可能に連結されている。本出願の特定の実施形態では、ベクターは、配列番号５または配列番号６にさらに作動可能に連結された配列番号１１に作動可能に連結された、配列番号１または配列番号３を有する融合体のコード配列を含む。

【０１０４】

本出願のＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドおよび発現ベクターは、本開示を考慮して当技術分野で公知の任意の方法によって作製することができる。例えば、ＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドを、当業者に周知である標準的な分子生物学技術、例えばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）等を使用して発現ベクターに導入または「クローニング」することができる。

【０１０５】

細胞、ポリペプチドおよび抗体

本出願はまた、本明細書に記載の任意のポリヌクレオチドおよびベクターを含む細胞、好ましくは単離された細胞も提供する。細胞は、例えば組換えタンパク質の産生のために、またはウイルス粒子を産生するために使用することができる。

【０１０６】

本出願の実施形態は、本出願のＨＢＶ抗原を作製する方法にも関する。方法は、宿主細胞に、プロモーターに作動可能に連結された本出願のＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターをトランスフェクトするステップ、トランスフェクトした細胞を、ＨＢＶ抗原の発現にとって適した条件下で増殖させるステップ、および任意選択で細胞において発現されたＨＢＶ抗原を精製または単離するステップを含む。ＨＢＶ抗原は、アフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等を含む当技術分野で公知の任意の方法によって細胞から単離または収集することができる。組換えタンパク質発現のために使用する技術は、本開示を考慮して当業者に周知である。発現されたＨＢＶ抗原はまた、発現されたタンパク質を精製または単離することなく、例えばＨＢＶ抗原をコードする発現ベクターをトランスフェクトして、ＨＢＶ抗原の発現にとって適した条件で増殖させた細胞の上清を分析することによって、試験することもできる。

【０１０７】
このように、配列番号２、配列番号４、または配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む天然に存在しないまたは組換えポリペプチドも提供される。上記および以下に記載するように、これらの配列をコードする単離された核酸分子、プロモーターに作動可能に連結されたこれらの配列を含むベクター、およびポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはベクターを含む組成物もまた、本出願によって企図される。
【０１０８】
本出願の一実施形態では、組換えポリペプチドは、配列番号２のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号２と９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、天然に存在しないまたは組換えポリペプチドは、配列番号２からなる。
【０１０９】
本出願の別の実施形態では、天然に存在しないまたは組換えポリペプチドは、配列番号４のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号４と９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、天然に存在しないまたは組換えポリペプチドは配列番号４を含む。
【０１１０】
本出願の別の実施形態では、天然に存在しないまたは組換えポリペプチドは、配列番号７のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である、例えば配列番号７と９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９５．５％、９６％、９６．５％、９７％、９７．５％、９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、天然に存在しないまたは組換えポリペプチドは配列番号７からなる。
【０１１１】
同様に、本出願の天然に存在しないポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片も提供する。本出願の一実施形態では、本出願の天然に存在しないＨＢＶ抗原に対して特異的である抗体は、別のＨＢＶ抗原に特異的に結合しない。例えば、配列番号７のアミノ酸配列を有するＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に特異的に結合する本出願の抗体は、配列番号７のアミノ酸配列を有しないＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に特異的に結合しない。
【０１１２】
用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、広義の意味を有し、免疫グロブリン分子、例えば、ポリクローナル抗体、マウス、ヒト、ヒト化およびキメラモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体など、抗原結合断片、二重特異性または多重特異性抗体、二量体、四量体または多量体抗体、Ｆｖ、ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）２、二機能性ハイブリッド（例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17:105, 1987）、単鎖（Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988； Bird et al., Science 242:423, 1988）、定常領域が変更された抗体（例えば、米国特許第５，６２４，８２１号）、必要な特異性を有する抗原結合部位を含む免疫グロブリン分子のドメイン抗体および他のあらゆる改変された構造を含む。
【０１１３】
本明細書で使用される場合、抗原に「特異的に結合する」抗体は、１×１０－７Ｍまたはそれ未満のＫＤで抗原に結合する抗体を指す。好ましくは、抗原に「特異的に結合する」抗体は、１×１０－８Ｍもしくはそれ未満、より好ましくは５×１０－９Ｍもしくはそ

れ未満、１×１０－９Ｍもしくはそれ未満、５×１０－１０Ｍもしくはそれ未満、または１×１０－１０Ｍもしくはそれ未満のＫＤで抗原に結合する。用語「ＫＤ」は、解離定数を指し、ＫｄのＫａに対する比（すなわち、Ｋｄ／Ｋａ）から得られ、モル濃度（Ｍ）として表記される。抗体のＫＤ値は、本開示を考慮して当技術分野の方法を使用して決定することができる。例えば、抗体のＫＤは、表面プラズモン共鳴、例えばバイオセンサーシステム、例えばＢｉａｃｏｒｅ（登録商標）システムを使用することによって、またはバイオレイヤー干渉技術、例えばＯｃｔｅｔ　ＲＥＤ９６システムを使用することによって決定することができる。

【０１１４】

抗ＰＤ－１および抗ＰＤ－Ｌ１抗体

本出願はまた、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体の治療用途にも関する。上述したように、「抗体」は、広義の意味を有し、免疫グロブリン分子、例えば、ポリクローナル抗体、マウス、ヒト、ヒト化およびキメラモノクローナル抗体などのモノクローナル抗体、抗原結合断片、二重特異性または多重特異性抗体、二量体抗体、四量体抗体、多量体抗体、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、二機能性ハイブリッド抗体、単鎖抗体、定常領域が変更された抗体、必要な特異性を有する抗原結合部位を含む免疫グロブリン分子のドメイン抗体および他のあらゆる改変された構造を含む。

【０１１５】

「全長抗体」は、ジスルフィド結合によって相互接続された２つの重（Ｈ）鎖および２つの軽（Ｌ）鎖で構成されるものであり、加えてそれらの多量体（例えばＩｇＭ）である。各重鎖は、重鎖可変領域（ＶＨ）および重鎖定常領域で構成される（ドメインＣＨ１、ヒンジＣＨ２およびＣＨ３で構成される）。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ＶＬ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）で構成される。ＶＨおよびＶＬ領域はさらに、フレームワーク領域（ＦＲ）が組み込まれた相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性を有する領域に細かく分類できる。各ＶＨおよびＶＬは、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順番：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、およびＦＲ４で配列された３つのＣＤＲおよび４つのＦＲセグメントで構成される。

【０１１６】

「相補性決定領域（ＣＤＲ）」は、抗体における「抗原結合部位」である。ＣＤＲは、様々な用語を使用して定義することができる：（ｉ）相補性決定領域（ＣＤＲ）は、３つはＶＨにあり（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３）、３つはＶＬにあり（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３）、配列可変性に基づく（Ｗｕ ａｎｄ Ｋａｂａｔ, (１９７０) Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １３２:２１１-５０; Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ., Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ, ５ｔｈ Ｅｄ. Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ, Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ, Ｂｅｔｈｅｓｄａ, Ｍｄ., １９９１）。（ｉｉ）「高度可変領域」は、「ＨＶＲ」、または「ＨＶ」、３つはＶＨにあり（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、３つはＶＬにあり（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）、ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋで定義される通りの構造において超可変性である抗体可変ドメインの領域を指す（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ, (１９８７) Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９６:９０１-１７）。国際免疫遺伝学（International ImMunoGeneTics：ＩＭＧＴ）データベース（ｈｔｔｐ://ｗｗｗ_ｉｍｇｔ_ｏｒｇ）は、抗原結合部位の標準化した番号付けおよび定義を提供する。ＣＤＲ、ＨＶおよびＩＭＧＴ設計間の対応は、Ｌｅｆｒａｎｃ ｅｔ ａｌ., (２００３) Ｄｅｖ Ｃｏｍｐａｒａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７:５５-７７に記載されている。用語「ＣＤＲ」、「ＨＣＤＲ１」、「ＨＣＤＲ２」、「ＨＣＤＲ３」、「ＬＣＤＲ１」、「ＬＣＤＲ２」および「ＬＣＤＲ３」は、本明細書で使用される場合、明細書中に明示的に別段の記述がない限り、上記で記載された方法、Ｋａｂａｔ、ＣｈｏｔｈｉａまたはＩＭＧＴのいずれかによって定義されるＣＤＲを含む。

【０１１７】

免疫グロブリンは、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて５つの主要なクラス、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭに割り当てることができる。ＩｇＡおよびＩｇＧはさらに、アイソタイプＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３および

ＩｇＧ４として細分される。いずれの脊椎動物種の抗体軽鎖も、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、２つの明らかに別個のタイプ、すなわちカッパ（κ）およびラムダ（λ）の一方に割り当てることができる。

【０１１８】

「抗体断片」または「抗原結合断片」は、本明細書で使用される場合、親の全長抗体の抗原結合特性を保持する免疫グロブリン分子の部分を指す。例示的な抗原結合断片は、重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）１、２および３、軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）１、２および３、重鎖可変領域（ＶＨ）、軽鎖可変領域（ＶＬ）、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、ＦｄおよびＦｖ断片、加えて、１つのＶＨまたはＶＬドメインのいずれかからなるドメイン抗体（ｄＡｂ）である。ＶＨおよびＶＬドメインは、合成リンカーを介して一緒に連結されて、様々な種類の単鎖抗体設計を形成することができ、ＶＨおよびＶＬドメインが別個の単鎖抗体構築物によって発現される場合、ＶＨ／ＶＬドメインは分子内または分子間で対を形成して、１価抗原結合部位、例えば単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）またはダイアボディを形成することができる；これは、例えば国際特許公開ＷＯ１９９８／４４００１号、ＷＯ１９８８／０１６４９号、ＷＯ１９９４／１３８０４号およびＷＯ１９９２／０１０４７号に記載されている。

【０１１９】

「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用される場合、抗体重鎖からのＣ末端リジンの除去などの起こり得る周知の変更を除いて各重鎖および各軽鎖において単一のアミノ酸組成を有する抗体集団を指す。モノクローナル抗体は、典型的には１種の抗原エピトープと結合するが、多重特異性を有するモノクローナル抗体は、２種またはそれより多くの別個の抗原またはエピトープと結合する。二重特異性のモノクローナル抗体は、２種の別個の抗原エピトープと結合する。モノクローナル抗体は、抗体集団内でヘテロジニアスなグリコシル化を有する場合がある。モノクローナル抗体は、単一特異性または多重特異性を有していてもよいし、または１価、２価または多価であってもよい。多重特異性抗体、例えば二重特異性抗体または三重特異性抗体は、モノクローナル抗体という用語に含まれる。

【０１２０】

「ヒト化抗体」は、本明細書で使用される場合、少なくとも１つのＣＤＲが非ヒト種由来であり、可変領域フレームワークがヒト免疫グロブリン配列由来である抗体を指す。ヒト化抗体は、フレームワークが、発現されるヒト免疫グロブリンまたは生殖細胞系遺伝子配列の正確なコピーではなくなり得るように、フレームワーク領域中に意図的に導入された突然変異を含んでいてもよい。

【０１２１】

「ヒト抗体」は、本明細書で使用される場合、両方のフレームワークおよび全ての６つのＣＤＲがヒト起源の配列由来である重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体を指す。抗体が定常領域または定常領域の一部を含有する場合、定常領域もヒト起源の配列由来である。ヒト抗体は、抗体の可変領域が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリンまたは再配列された免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られる場合、ヒト起源の配列「由来」である重鎖または軽鎖可変領域を含む。このような例示的な系は、ファージ上に提示されるヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリー、およびトランスジェニック非ヒト動物、例えば本明細書に記載されるようなヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するマウスまたはラットである。「ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリンまたは再配列された免疫グロブリン遺伝子と比較して、例えばフレームワークもしくは抗原結合部位、またはその両方への天然に起こる体細胞突然変異または意図的な置換の導入に起因するアミノ酸の差を含有していてもよい。典型的には、「ヒト抗体」は、アミノ酸配列が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリンまたは再配列された免疫グロブリン遺伝子によってコードされたアミノ酸配列と、少なくとも約８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一である。一部の場合、「ヒト抗体」は、例えばKnappik et al.,

(2000) J Mol Biol 296:57-86に記載されたようなヒトフレームワーク配列分析から得られたコンセンサスフレームワーク配列、または例えばShi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96、および国際特許公開ＷＯ２００９／０８５４６２号に記載されたような、ファージ上に提示されるヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーに取り込まれた合成ＨＣＤＲ３を含有していてもよい。

【０１２２】

ヒト免疫グロブリン配列由来のヒト抗体は、合成ＣＤＲおよび／または合成フレームワークを取り込んだファージディスプレイなどの系を使用して生成してもよいし、またはｉｎ ｖｉｔｒｏでの変異誘発に供して抗体特性を改善してもよく、結果としてｉｎ ｖｉｖｏでヒト抗体生殖細胞系レパートリーによって発現されない抗体を得ることができる。

【０１２３】

「エピトープ」は、本明細書で使用される場合、抗体が特異的に結合する抗原の部分を指す。エピトープは、典型的には、アミノ酸または多糖側鎖などの成分の化学的に活性な（例えば極性、非極性または疎水性）表面基群（surface grouping）からなり、特異的な３次元の構造的な特徴、加えて特異的な電荷の特徴を有し得る。エピトープは、コンホメーションの空間的な単位を形成する連続および／または非連続アミノ酸で構成されていてもよい。非連続エピトープの場合、抗原の直鎖状の配列の異なる部分からのアミノ酸は、タンパク質分子のフォールディングを介して３次元空間において近接した状態になる。抗体「エピトープ」は、エピトープを同定するのに使用される手法に依存する。

【０１２４】

「多重特異性を有する」は、本明細書で使用される場合、少なくとも２種の別個の抗原または抗原内の２種の別個のエピトープ、例えば３、４または５種の別個の抗原またはエピトープと特異的に結合する抗体を指す。

【０１２５】

「二重特異性」は、本明細書で使用される場合、同じ抗原内の２種の別個の抗原または２種の別個のエピトープと特異的に結合する抗体を指す。

【０１２６】

「ＰＤ－１」は、本明細書で使用される場合、プログラム死－１タンパク質を指し、これはＴ細胞共阻害剤であり、ＣＤ２７９またはＰＤＣＤ１としても公知である。全長ＰＤ－１の代表的なアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋで受託番号ＮＰ００５００９．２として提供される。用語「ＰＤ－１」は、タンパク質バリアントおよび組換えＰＤ－１またはそれらの断片を含む。本出願における「ＰＤ－１」は、そうではないことが明示的に述べられていない限り、ヒト成熟ＰＤ－１を指す。

【０１２７】

ＰＤ－１は、活性化されたＴ細胞およびＢ細胞、ナチュラルキラー細胞および単球上で発現される２８８アミノ酸のタンパク質受容体である。ＰＤ－１は、Ｔ細胞共阻害性受容体のＣＤ２８／ＣＴＬＡ－４（細胞傷害性Ｔリンパ球抗原）／ＩＣＯＳ（誘導性共刺激因子）ファミリーのメンバーである（Chen et al. 2013, Nat. Rev. Immunol. 13 : 227-242）。このタンパク質は、ＩｇＶ様の膜貫通ドメインである細胞外のＮ末端ドメイン、ならびに免疫受容体チロシンベース阻害（ＩＴＩＭ）モチーフおよび免疫受容体チロシンベーススイッチ（ＩＴＳＭ）モチーフを含有する細胞内ドメイン（Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev.）を有する。ＰＤ－１の主要な機能は、免疫応答を弱めることである（Riley 2009, Immunol. Rev. 229: 114-125）。ＰＤ－１は、２つのリガンド、ＰＤ－リガンド１（ＰＤ－Ｌ１）およびＰＤ－Ｌ２を有する。ＰＤ－Ｌ１（ＣＤ２７４、Ｂ７Ｈ１）は、リンパおよび非リンパ組織の両方で、例えばＣＤ４およびＣＤ８Ｔ細胞、マクロファージ系統細胞、末梢組織で、加えて腫瘍細胞、ウイルスが感染した細胞および自己免疫組織細胞で広く発現される。ＰＤ－Ｌ２（ＣＤ２７３、Ｂ７－ＤＣ）は、ＰＤ－Ｌ１より発現が制限されており、活性化された樹状細胞およびマクロファージで発現される（Dong et al 1999, Nature Med.）。ＰＤ－１のそのリガンドへの結合は、Ｔ細胞増殖およびサイトカイン分泌の減少をもたらし、体液性のおよび細胞性

免疫応答を弱める。

【０１２８】

「ＰＤ－Ｌ１」は、本明細書で使用される場合、プログラム死－リガンド１を指し、これは、ＣＤ２７４およびＢ７Ｈ１としても公知である。全長ＰＤ－Ｌ１のアミノ酸配列は、ＧｅｎＢａｎｋで受託番号ＮＰ＿０５４８６２．１として提供される。用語「ＰＤ－Ｌ１」はまた、タンパク質バリアントおよび組換えＰＤ－Ｌ１またはそれらの断片も含む。用語「ＰＤ－Ｌ１」は、非ヒト種由来であると特定されない限り、ヒトＰＤ－Ｌ１を意味する。

【０１２９】

ＰＤ－Ｌ１は、細胞外ＩｇＶ様およびＩｇＣ様ドメインを有する２９０アミノ酸のタンパク質（全長ＰＤ－Ｌ１のアミノ酸１９～２３９）、膜貫通ドメイン、およびおよそ３０アミノ酸の細胞内ドメインである。ＰＤ－Ｌ１は、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージ、およびＢ細胞）などの多くの細胞上で、さらに、造血細胞および非造血細胞（例えば、血管内皮細胞、膵島、および免疫特権を有する部位）上で構成的に発現される。ＰＤ－Ｌ１はまた多種多様の腫瘍、およびウイルス感染細胞上でも発現され、免疫抑制環境の構成要素である（Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519）。PD-L１は、２つのＴ細胞共阻害剤ＰＤ－１およびＢ７－１のうち一方に結合する。

【０１３０】

Ｔ細胞共刺激および共阻害分子（集合的に共シグナル伝達分子と名付けられる）は、Ｔ細胞活性化、サブセットの分化、エフェクター機能および生存を調節することにおいて重要な役割を果たす（Chen et al2013, Nature Rev. Immunol. 13 : 227-242）。Ｔ細胞受容体により抗原提示細胞上の同族のペプチド－ＭＨＣ複合体が認識された後、共シグナル伝達受容体は、免疫シナプスにおいてＴ細胞受容体と共局在し、そこでそれらはＴＣＲシグナル伝達との相乗作用を示して、Ｔ細胞の活性化および機能を促進または阻害する（Flies et al. 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421）。最終的な免疫応答は、共刺激および共阻害シグナルの間のバランスによって調節される（「免疫チェックポイント」）（Pardoll 2012, Nature 12: 252-264）。理論に拘束されることは望まないが、現在のところ、ＰＤ－１は、末梢Ｔ細胞の寛容を媒介すること、および自己免疫を回避することにおける１種のこのような「免疫チェックポイント」として機能すると考えられている。ＰＤ－１は、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２に結合し、Ｔ細胞活性化を阻害する。Ｔ細胞活性化を阻害するＰＤ－１の能力は、免疫応答を逃れるために慢性ウイルス感染症および腫瘍によって利用される。慢性ウイルス感染症において、ＰＤ－１は、ウイルス特異的なＴ細胞で高度に発現され、これらのＴ細胞は、エフェクター機能および増殖能の喪失で「枯渇した」状態になる（Freeman 2008, PNAS 105: 10275-1 0276）。ＰＤ－１：ＰＤ－Ｌ１系はまた、誘導された制御性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞の発生およびＴｒｅｇ機能の維持においても重要な役割を果たす（Francisco et al2010, Immunol. Rev. 236:219-242）。

【０１３１】

「アンタゴニスト」は、本明細書で使用される場合、細胞タンパク質に結合した時に、タンパク質の天然リガンドによって誘導される少なくとも１つの反応または活性を抑制する分子を指す。少なくとも１つの反応または活性が、アンタゴニストの非存在下で抑制される少なくとも１つの反応または活性（例えば、陰性対照）より、少なくとも約３０％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％多く抑制される場合、またはアンタゴニストの非存在下における抑制と比較して抑制が統計学的に有意である場合、その分子は、アンタゴニストである。アンタゴニストは、抗体、可溶性リガンド、小分子、ＤＮＡまたはＲＮＡ、例えばｓｉＲＮＡであってもよい。例示的なアンタゴニストは、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１に特異的に結合するアンタゴニスト抗体である。その受容体ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２へのＰＤ－１結合によって誘導される典型的な反応または活性は、抗原特異的なＣＤ４＋またはＣＤ８＋細胞の増殖を低減させたり、またはＴ細胞によるインターフェロン－γ（Ｉ

ＦＮ－γ）生産を低減させたりすることができ、その結果として免疫応答の抑制が起こる。したがって、ＰＤ－１に特異的に結合するアンタゴニストＰＤ－１抗体、またはＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、阻害経路を阻害することによって免疫応答を誘導する。

【０１３２】

一部の実施形態では、抗ＰＤ－１抗体またはその抗原結合断片は、以下の特性のうち１、２、３、４または５つを有する：

ａ）抗原特異的なＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化を用量依存的に強化すること、この場合、活性化は、その全体が参照により本明細書に組み込まれているＵＳ２０１７０１２１４０９の実施例１に記載されたようなサイトメガロウイルス抗原リコールアッセイ（ＣＭＶアッセイ）を使用して測定される；

ｂ）約１００ｎＭ未満の平衡解離定数（K_D）でヒトＰＤ－１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される；

ｃ）約１ｎＭ未満のK_DでヒトＰＤ－１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される；

ｄ）約１００ｎＭ未満のK_DでカニクイザルＰＤ－１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される。または

ｅ）約１ｎＭ未満のK_DでカニクイザルＰＤ－１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される。

【０１３３】

一部の実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片は、以下の特性のうち１、２、３、４または５つを有する：

ａ）抗原特異的なＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化を用量依存的に強化すること、この場合、活性化は、その全体が参照により本明細書に組み込まれているＵＳ２０１７０１２１４０９の実施例１に記載された通りサイトメガロウイルス抗原リコールアッセイ（ＣＭＶアッセイ）を使用して測定される；

ｂ）約１００ｎＭ未満の平衡解離定数（K_D）でヒトＰＤ－Ｌ１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される；

ｃ）約１ｎＭ未満のK_DでヒトＰＤ－Ｌ１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される；

ｄ）約１００ｎＭ未満のK_DでカニクイザルＰＤ－Ｌ１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される；または

ｅ）約１ｎＭ未満のK_DでカニクイザルＰＤ－Ｌ１と結合すること、この場合、K_Dは、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６システムを使用して＋２５℃で測定される。

【０１３４】

ヒトまたはカニクイザルＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１への抗体の親和性は、あらゆる好適な方法を使用して実験的に決定することができる。このような方法は、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６、Ｂｉａｃｏｒｅ　３０００またはＫｉｎＥｘＡ装置、ＥＬＩＳＡまたは当業者公知の競合結合アッセイを利用することができる。特定の抗体／ＰＤ－１または抗体／ＰＤ－Ｌ１相互作用の測定された親和性は、異なる条件（例えば、浸透圧モル濃度、ｐＨ）下で測定される場合、変化する可能性がある。したがって、親和性および他の結合パラメーター（例えば、K_D、Ｋｏｎ、Ｋｏｆｆ）の測定は、典型的には、標準化された条件および標準化された緩衝液を用いてなされる。例えばＢｉａｃｏｒｅ　３０００またはＰｒｏｔｅＯｎを使用した親和性測定の内部エラー（標準偏差、ＳＤとして測定された）は、典型的な検出限界の範囲で測定した場合、典型的には５～３３％の範囲内であり得ることを当業者であれば理解しているであろう。それゆえに、K_Dの文脈における用語「約」は、アッセイにおける典型的な標準偏差を反映する。例えば、1×10^{9}ＭのK_Dの典型的なＳＤは、最大$+0.33\times10^{-9}$Ｍである。

【０１３５】

抗原特異的なＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化は、公知のプロトコールおよびＵ

Ｓ２０１７０１２１４０９の実施例１に記載されるものを使用して、混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイにおけるＴ細胞増殖の増加、ＭＬＲアッセイにおけるインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）分泌の増加、ＭＬＲアッセイにおけるＴＮＦ－α分泌の増加、サイトメガロウイルス抗原アッセイ（ＣＭＶアッセイ）におけるＩＦＮ－γ分泌の増加、またはＣＭＶアッセイにおけるＴＮＦ－α分泌の増加を測定することによって評価することができる。測定されたＴ細胞の機能性が本出願の抗体によって用量依存性の方式で増加する場合、本出願の抗体は、抗原特異的なＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔの活性化を強化する。

【０１３６】

当業界において公知の、または将来的に作製されることになるあらゆる抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体およびそれらの断片が、本発明の開示を考慮して本発明において使用することができる。

【０１３７】

ある特定の実施形態では、本発明に有用な抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片は、ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、またはアテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）である。

【０１３８】

ある特定の実施形態では、本発明に有用な抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片は、ＵＳ２００２０１１０８３６、ＵＳ２００３００４４７６８、ＵＳ２００５０１８０９６９、ＵＳ２００６０１１０３８３、ＵＳ２００６０２１０５６７、ＵＳ２００７００６５４２７、ＵＳ２００７０１２２３７８、ＵＳ２００８００２５９７９、ＵＳ２００８００４４８３７、ＵＳ２００９００２８８５７、ＵＳ２００９００５５９４４、ＵＳ２０１０００４０６１４、ＵＳ２０１０００５５１０２、ＵＳ２０１００１５１４９２、ＵＳ２０１００２６６６１７、ＵＳ２０１１０００８３６９、ＵＳ２０１１００８５９７０、ＵＳ２０１１０１１７０８５、ＵＳ２０１１０１７１２１５、ＵＳ２０１１０１７１２２０、ＵＳ２０１１０１７７０８８、ＵＳ２０１１０１９５０６８、ＵＳ２０１１０２２９４６１、ＵＳ２０１１０２７１３５８、ＵＳ２０１２０２３７５２２、ＵＳ２０１２００３９９０６、ＵＳ２０１３００１７１９９、ＵＳ２０１３００２２５９５、ＵＳ２０１３００９５０９８、ＵＳ２０１４００４４７３８、ＵＳ２０１５００７９１０９、ＵＳ２０１６００７５７８３、ＵＳ２０１７０２１０８０６、ＵＳ２０１７０１２１４０９、またはＷＯ２０１８０３９１３１に記載されており、前述の公報のそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１３９】

ある特定の実施形態では、本発明に有用な抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片は、ＵＳ２００９０２１７４０１（例えば、１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、およびそれらのバリアント）、ＵＳ２０１４０２３４２９６（例えば、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、およびそれらのバリアント）、ＵＳ２０１５０２０３５７９（例えば、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４

ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、およびそれらのバリアント）、ＵＳ２０１７０２４７４５４（例えば、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、およびそれらのバリアント）、またはＷＯ２０１７０２５０５１（１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、およびそれらのバリアント）に記載されており、前述の公報のそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０１４０】

好ましくは、本発明に有用な抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片は、その抗原結合断片であり、（ａ）１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、もしくはそれらのバリアント；（ｂ）ＳＥＨＳＩ、ＤＰＦＥＬ、ＫＬＮＧ、ＱＴＳＷＫ、ＬＨＦＥＰ、ＮＤＮＧＳＹ、ＴＴＬＹＶＴ、もしくはＬＡＡＦＰＥＤＲＳＱＰＧＱＤＣＲの配列を有するエピトープに結合する抗体；または（ｃ）ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なものである。

【０１４１】

本明細書で使用される場合、抗体に対して言及される用語「それらと等価なもの」は、例えば、参照抗体と実質的に同じエピトープに結合する実質的に同一なＣＤＲを有し、実質的に同一な生物学的活性を有する抗体を意味する。

【０１４２】

本明細書に記載される抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片のバリアントは、本出願の範囲内である。例えば、バリアントは、相同な抗体が親抗体と比較して改善された機能特性を維持または保持する限りは、ＶＨおよび／またはＶＬ中に、

１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５個のアミノ酸置換を含んでいてもよい。一部の実施形態では、配列同一性は、本出願のＶＨまたはＶＬのアミノ酸配列に対して約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％であり得る。任意選択で、親の抗体と比較したバリアントのいずれのバリエーションも、バリアントのＣＤＲ内ではない。

【０１４３】

また、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３配列を含むＶＨ、ならびにＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３配列を含むＶＬを含む、ＰＤ－１もしくはＰＤ－Ｌ１またはその抗原結合断片に特異的に結合するアンタゴニスト抗体であって、ＣＤＲ配列の１つまたは複数が、本明細書に記載される抗体に基づき特定されたアミノ酸配列、またはそれらの保存的改変を含み、抗体が、本出願のＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する親アンタゴニスト抗体の所望の機能特性を保持する、抗体も提供される。

【０１４４】

「保存的改変」は、そのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に著しい影響を与えたりまたは変更したりしないアミノ酸改変を指す。保存的改変としては、アミノ酸の置換、付加および欠失が挙げられる。保存的置換は、アミノ酸が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは明確であり、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン、トリプトファン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン）、アミドを有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン）、ベータ分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および硫黄を含有する側鎖を有するアミノ酸（システイン、メチオニン）を含む。さらに、ポリペプチド中のいずれの生来の残基も、これまでにアラニンスキャニング変異に関して記載された通りに、アラニンで置換してもよい（MacLennan et al., Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67, 1998； Sasaki et al., Adv. Biophys. 35:1-24, 1998）。本出願の抗体に対するアミノ酸置換は、周知の方法によって、例えばＰＣＲ変異誘発（米国特許第４，６８３，１９５号）によって作製することができる。代替として、バリアントのライブラリーは、公知の方法を使用して、例えば、ランダム（ＮＮＫ）または非ランダムコドン、例えば１１個のアミノ酸（Ａｌａ、Ｃｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ａｒｇ、Ｓｅｒ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ）をコードするＤＶＫコドンを使用して生成することができる。得られた抗体バリアントは、本明細書に記載されるアッセイを使用して、それらの特徴に関して試験することができる。

【０１４５】

抗体およびその断片を作製および使用する方法は当業界において公知である。ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１に特異的に結合する抗体およびその断片を作製および使用するために、本出願の状況で、あらゆるこのような公知の方法を使用することができる。抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体およびその断片を作製および使用する方法は、当業界において公知であり、例えば、ＵＳ２００２０１１０８３６、ＵＳ２００３００４４７６８、ＵＳ２００５０１８０９６９、ＵＳ２００６０１１０３８３、ＵＳ２００６０２１０５６７、ＵＳ２００７／００６５４２７、ＵＳ２００７／０１２２３７８、ＵＳ２００８００２５９７９、ＵＳ２００８００４４８３７、ＵＳ２００９００２８８５７、ＵＳ２００９００５５９４４、ＵＳ２００９０２１７４０１、ＵＳ２０１０００４０６１４、ＵＳ２０１０００５５１０２、ＵＳ２０１００１５１４９２、ＵＳ２０１００２６６６１７、ＵＳ２０１１０００８３６９、ＵＳ２０１１００８５９７０、ＵＳ２０１１０１１７０８５、ＵＳ２０１１０１７１２１５、ＵＳ２０１１０１７１２２０、ＵＳ２０１１０１７７０８８、ＵＳ

２０１１０１９５０６８、ＵＳ２０１１０２２９４６１、ＵＳ２０１１０２７１３５８、ＵＳ２０１２／０２３７５２２、ＵＳ２０１２００３９９０６、ＵＳ２０１３００１７１９９、ＵＳ２０１３００２２５９５、ＵＳ２０１３００９５０９８、ＵＳ２０１４０２３４２９６、ＵＳ２０１４００４４７３８、ＵＳ２０１５００７９１０９、ＵＳ２０１５０２０３５７９、ＵＳ２０１６００７５７８３、ＵＳ２０１７０２１０８０６、ＵＳ２０１７０２４７４５４、ＵＳ２０１７０１２１４０９、ＷＯ２０１７０２５０５１およびＷＯ２０１８０３９１３１に記載されており、これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる。

【０１４６】

組成物、治療的組合せ、およびワクチン

本出願はまた、１つまたは複数のＨＢＶ抗原、本出願による１つまたは複数のＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチド、および／またはベクター、ならびに／または１つまたは複数の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む組成物、治療的組合せ、より特にキット、およびワクチンにも関する。本明細書に記載される本出願のＨＢＶ抗原、ポリヌクレオチド（ＲＮＡおよびＤＮＡを含む）、および／またはベクターのいずれか、ならびに本明細書に記載される本出願の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片のいずれかを、本出願の組成物、治療的組合せまたはキット、およびワクチンに使用することができる。

【０１４７】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４に少なくとも９０％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたまたは天然に存在しない核酸分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）、または配列番号７と少なくとも９０％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶポリメラーゼ抗原、単離されたまたは天然に存在しない核酸分子を含むベクター、および／または単離されたまたは天然に存在しない核酸分子によってコードされた単離されたまたは天然に存在しないポリペプチドを含む。

【０１４８】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号７と少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたまたは天然に存在しない核酸分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む。

【０１４９】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４に少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号２または配列番号４に１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする単離されたまたは天然に存在しない核酸分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む。

【０１５０】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４に少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号２または配列番号４と１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたまたは天然に存在しない核酸分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）；および配列番号７と少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたまたは天然に存在しない核酸分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）を含む。切断型ＨＢＶコア抗原およびＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原のコード配列は、同じ単離されたまたは天然に存在しない核酸分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）に存在していてもよいし、または２つの異なる単離されたまたは天然に存在しない核酸分子（ＤＮＡまたはＲＮＡ）に存在していてもよい。

【０１５１】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４に少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号２または配列番号４に１００％同一なアミノ酸配列からなる切

断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくはＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクター（例えばアデノウイルスベクター）を含む。

【０１５２】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号７と少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくはＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクター（例えばアデノウイルスベクター）を含む。

【０１５３】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４に少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号２または配列番号４と１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくはＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクター（例えばアデノウイルスベクター）；および配列番号７と少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくはＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクター（例えばアデノウイルスベクター）を含む。切断型ＨＢＶコア抗原コード配列を含むベクターおよびＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原のコード配列を含むベクターは、同じベクター、または２つの異なるベクターであってもよい。

【０１５４】

本出願の一実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４と少なくとも９０％同一である、好ましくは配列番号２または配列番号４と１００％同一であるアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原であって、配列番号７と少なくとも９０％同一である、好ましくは配列番号７と１００％同一であるアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に作動可能に連結された切断型ＨＢＶコア抗原、またはその逆を含む融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくはＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター）を含む。好ましくは、融合タンパク質は、切断型ＨＢＶコア抗原をＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に作動可能に連結する、またはその逆に連結するリンカーをさらに含む。好ましくは、リンカーは、アミノ酸配列（ＡｌａＧｌｙ）ｎを有し、式中ｎは２～５の整数である。

【０１５５】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４に少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号２または配列番号４に１００％同一なアミノ酸配列からなる単離されたまたは天然に存在しない切断型ＨＢＶコア抗原を含む。

【０１５６】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号７と少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含む単離されたまたは天然に存在しないＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原を含む。

【０１５７】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号２または配列番号４に少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号２または配列番号４と１００％同一なアミノ酸配列からなる単離されたまたは天然に存在しない切断型ＨＢＶコア抗原；および配列番号７と少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含む単離されたまたは天然に存在しないＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原を含む。

【０１５８】

本出願の実施形態では、組成物は、配列番号７と少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号７と１００％同一なアミノ酸配列を含むＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に作動可能に連結された、配列番号２または配列番号１４に少なくとも９０％同一な、好ましくは配列番号２または配列番号４に１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原を含む単離されたまたは天然に存在しない融合タンパク質を含み、または逆もまた同様である。好ましくは、融合タンパク質は、切断型ＨＢＶコア抗原をＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原に作動可能に連結する、またはその逆に連結するリンカーをさらに含む。好ましくは、リンカーは、ア

ミノ酸配列（ＡｌａＧｌｙ）ｎを有し、式中ｎは２～５の整数である。
【０１５９】
本出願の実施形態では、組成物は、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む。
【０１６０】
好ましい実施形態では、本発明に有用な抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片は、ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、またはアテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なものである。
【０１６１】
本出願はまた、本出願の実施形態による切断型ＨＢＶコア抗原およびＨＢＶ　ｐｏｌ抗原を発現するポリヌクレオチド、ならびに／または本出願の実施形態による抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む治療的組合せまたはキットにも関する。本明細書に記載される本出願のＨＢＶコアおよびｐｏｌ抗原をコードするあらゆるポリヌクレオチドおよび／またはベクターが、本出願の治療的組合せまたはキットで使用でき、本明細書に記載される本出願のあらゆる抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片が、本出願の治療的組合せまたはキットで使用できる。
【０１６２】
本出願の実施形態によれば、それを必要とする対象におけるＨＢＶ感染症の処置に使用するための治療的組合せまたはキットは、
ｉ）ａ）配列番号２と少なくとも９５％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原、および
ｂ）切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子
ｃ）配列番号７と少なくとも９０％同一なアミノ酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原であって、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しないＨＢＶポリメラーゼ抗原、および
ｄ）ＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子
の少なくとも１つ；ならびに
ｉｉ）抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片
を含む。
【０１６３】
本出願の特定の実施形態では、治療的組合せまたはキットは、ｉ）配列番号２と少なくとも９５％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子；ｉｉ）配列番号７と少なくとも９０％同一なアミノ酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子であって、ＨＢＶポリメラーゼ抗原は、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しない、第２の天然に存在しない核酸分子；およびｉｉｉ）抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む。
【０１６４】
本出願の実施形態に従って、ワクチンの組合せまたはキットにおけるポリヌクレオチドは、そのようなポリヌクレオチドから発現されたＨＢＶ抗原が、同じまたは異なるポリヌ

クレオチドから発現されたか否かによらず、共に融合されるかまたは個別のタンパク質として産生されるように、連結され得るかまたは個別であり得る。一実施形態では、第１および第２のポリヌクレオチドは、発現されたタンパク質がまた個別のタンパク質であるが、組み合わせて使用されるように、同じまたは個別の組成物のいずれかとして組み合わせて使用される個別のベクター、例えば、ＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクターに存在する。別の実施形態では、第１および第２のポリヌクレオチドによってコードされるＨＢＶ抗原を、ＨＢＶコア－ｐｏｌ融合抗原が産生されるように、同じベクターから発現させることができる。任意選択で、コアおよびｐｏｌ抗原を、短いリンカーによって共に結合または融合することができる。あるいは、第１および第２のポリヌクレオチドによってコードされるＨＢＶ抗原は、コアおよびｐｏｌ抗原コード配列の間にリボソーム翻訳スリップ部位（シス－ヒドロラーゼ部位としても知られる）を使用して、単一のベクターから独立して発現させることができる。この戦略によって、個々のコアおよびｐｏｌ抗原が単一のｍＲＮＡ転写物から産生されるバイシストロニック発現ベクターが得られる。そのようなバイシストロニック発現ベクターから産生されるコアおよびｐｏｌ抗原は、ｍＲＮＡ転写物のコード配列の順序づけに応じて、追加のＮ末端またはＣ末端残基を有し得る。この目的のために使用することができるリボソーム翻訳スリップ部位の例には、手足口病ウイルス（ＦＭＤＶ）のＦＡ２翻訳スリップ部位が挙げられるがこれらに限定されない。別の可能性は、第１および第２のポリヌクレオチドによってコードされるＨＢＶ抗原を、２つの個別のベクター、すなわち１つがＨＢＶコア抗原をコードし、１つがＨＢＶ　ｐｏｌ抗原をコードするベクターから独立して発現させることができることである。

【０１６５】

好ましい実施形態では、第１および第２のポリヌクレオチドは、個別のベクター、例えばＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクターに存在する。好ましくは個別のベクターは、同じ組成物に存在する。

【０１６６】

本出願の好ましい実施形態に従って、治療的組合せまたはキットは、第１のベクターに存在する第１のポリヌクレオチド、第２のベクターに存在する第２のポリヌクレオチドを含む。第１および第２のベクターは同じまたは異なり得る。好ましくは、ベクターはＤＮＡプラスミドである。

【０１６７】

本出願の特定の実施形態では、第１のベクターは第１のＤＮＡプラスミドであり、第２のベクターは第２のＤＮＡプラスミドである。第１および第２のＤＮＡプラスミドの各々は、複製開始点、好ましくは配列番号２１のｐＵＣ　ＯＲＩ、および好ましくは配列番号２３と少なくとも９０％同一であるポリヌクレオチド配列を有するコドン最適化Ｋａｎｒ遺伝子を含み、好ましくはｂｌａプロモーター、例えば配列番号２４に示すｂｌａプロモーターの制御下にある抗生物質耐性カセットを含む。第１および第２のＤＮＡプラスミドの各々は、独立してプロモーター配列、エンハンサー配列、および第１のポリヌクレオチド配列または第２のポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたシグナルペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列のうちの少なくとも１つをさらに含む。好ましくは、第１および第２のＤＮＡプラスミドの各々は、第１のポリヌクレオチドまたは第２のポリヌクレオチドに作動可能に連結された上流の配列を含み、上流の配列は、５’末端から３’末端に、配列番号１８または配列番号１９のプロモーター配列、エンハンサー配列、および配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を有するシグナルペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。第１および第２のＤＮＡプラスミドの各々はまた、ＨＢＶ抗原のコード配列の下流に位置するポリアデニル化シグナル、例えば配列番号２０のｂＧＨポリアデニル化シグナルも含み得る。

【０１６８】

本出願のある特定の実施形態では、第１のベクターはウイルスベクターであり、第２のベクターはウイルスベクターである。好ましくは、ウイルスベクターの各々は、アデノウイルスベクター、より好ましくはＡｄ２６またはＡｄ３５ベクターであって、本出願のＨ

ＢＶ　ｐｏｌ抗原または切断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチド；５’末端から３’末端に、プロモーター配列、好ましくは配列番号１９のＣＭＶプロモーター配列、エンハンサー配列、好ましくは配列番号１２のＡｐｏＡＩ遺伝子断片配列、およびシグナルペプチド配列、好ましくは配列番号１５のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分泌シグナルをコードするポリヌクレオチド配列を含む、ＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された上流の配列；ならびにポリアデニル化シグナル、好ましくは配列番号１３のＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを含む、ＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された下流の配列を含む発現カセットを含むアデノウイルスベクターである。

【０１６９】

別の好ましい実施形態では、第１および第２のポリヌクレオチドは、単一のベクター、例えばＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクターに存在する。好ましくは単一のベクターは、アデノウイルスベクター、より好ましくはＡｄ２６ベクターであって、本出願のＨＢＶ　ｐｏｌ抗原および切断型ＨＢＶコア抗原をコードし、好ましくは融合タンパク質として本出願のＨＢＶ　ｐｏｌ抗原および切断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチド；５’末端から３’末端に、プロモーター配列、好ましくは配列番号１９のＣＭＶプロモーター配列、エンハンサー配列、好ましくは配列番号１２のＡｐｏＡＩ遺伝子断片配列、およびシグナルペプチド配列、好ましくは配列番号１５のアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分泌シグナルをコードするポリヌクレオチド配列を含む、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原および切断型ＨＢＶコア抗原をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結された上流の配列；ならびにポリアデニル化シグナル、好ましくは配列番号１３のＳＶ４０ポリアデニル化シグナルを含むＨＢＶ抗原をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結された下流の配列を含む発現カセットを含むアデノウイルスベクターである。

【０１７０】

本出願の治療的組合せが第１のベクター、例えばＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクター、および第２のベクター、例えばＤＮＡプラスミドまたはウイルスベクターを含む場合、第１および第２のベクターの各々の量は特に限定されない。例えば、第１のＤＮＡプラスミドおよび第２のＤＮＡプラスミドは、１０：１～１：１０の重量比で、例えば１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、または１：１０の重量比で存在し得る。好ましくは、第１および第２のＤＮＡプラスミドは、１：１の重量比で存在する。本出願の治療的組合せは、ＨＢＶ感染症の処置に有用な第３の活性薬剤をコードする第３のベクターをさらに含んでいてもよい。

【０１７１】

本出願の組成物および治療的組合せは、追加のＨＢＶ抗原および／もしくは追加のＨＢＶ抗原もしくはそれらの免疫原性断片、例えばＨＢｓＡｇ、ＨＢＶ　Ｌタンパク質もしくはＨＢＶエンベロープタンパク質をコードする追加のポリヌクレオチドまたはベクター、またはそれをコードするポリヌクレオチド配列、または本出願の実施形態による抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含み得る。しかし、特定の実施形態では、本出願の組成物および治療的組合せは、ある特定の抗原を含まない。

【０１７２】

特定の実施形態では、本出願の組成物または治療的組合せまたはキットは、ＨＢｓＡｇまたはＨＢｓＡｇをコードするポリヌクレオチド配列を含まない。

【０１７３】

別の特定の実施形態では、本出願の組成物または治療的組合せまたはキットは、ＨＢＶ　Ｌタンパク質またはＨＢＶ　Ｌタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含まない。

【０１７４】

本出願のなお別の特定の実施形態では、本出願の組成物または治療的組合せは、ＨＢＶエンベロープタンパク質またはＨＢＶエンベロープタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含まない。

【０１７５】
本出願の組成物および治療的組合せはまた、薬学的に許容可能な担体も含み得る。薬学的に許容可能な担体は、非毒性であり、活性成分の有効性を妨害してはならない。薬学的に許容可能な担体は、１つまたは複数の賦形剤、例えば結合剤、崩壊剤、膨張剤、懸濁剤、乳化剤、湿潤剤、潤滑剤、香味料、甘味料、保存剤、色素、溶解剤、およびコーティングを含み得る。薬学的に許容可能な担体は、ビヒクル、例えば脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）を含み得る。担体または他の材料の正確な性質は、投与経路、例えば筋肉内、皮内、皮下、経口、静脈内、皮下、粘膜内（例えば、腸）、鼻腔内、または腹腔内経路に依存し得る。液体注射可能調製物、例えば懸濁剤および液剤の場合、適した担体および添加剤は、水、グリコール、油、アルコール、保存剤、着色剤等を含む。固体経口調製物、例えば散剤、カプセル剤、カプレット、ゲルキャップおよび錠剤の場合、適した担体および添加剤は、デンプン、砂糖、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤等を含む。鼻腔内スプレー／吸入混合物の場合、水溶液／懸濁液は、適した担体および添加剤として水、グリコール、油、エモリエント、安定剤、湿潤剤、保存剤、芳香剤、着香料等を含み得る。

【０１７６】
本出願の組成物および治療的組合せは、経口（腸内）投与および非経口注射を含むがこれらに限定されない、投与を容易にするためおよび有効性を改善するために対象への投与にとって適した任意の物質で製剤化することができる。非経口注射は、静脈内注射または注入、皮下注射、皮内注射、および筋肉内注射を含む。本出願の組成物はまた、経粘膜、眼、直腸、長時間作用型埋め込み、舌下投与、門脈循環を迂回する舌の下の口腔粘膜、吸入、または鼻腔内を含む他の投与経路のために製剤化することもできる。

【０１７７】
本出願の好ましい実施形態では、本出願の組成物および治療的組合せは、非経口注射のために、好ましくは皮下、皮内注射、または筋肉内注射のために製剤化され、より好ましくは筋肉内注射のために製剤化される。

【０１７８】
本出願の実施形態に従って、投与のための組成物および治療的組合せは、典型的には薬学的に許容可能な担体、例えば水性担体中の緩衝溶液、例えば緩衝食塩水等、例えばリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を含む。組成物および治療的組合せはまた、ｐＨ調節剤および緩衝剤等の生理的条件を近似するために必要な薬学的に許容可能な物質を含有し得る。例えば、プラスミドＤＮＡを含む本出願の組成物または治療的組合せは、薬学的に許容可能な担体としてリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を含有し得る。プラスミドＤＮＡは、例えば０．５ｍｇ／ｍＬ～５ｍｇ／ｍＬ、例えば０．５ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ、２ｍｇ／ｍＬ、３ｍｇ／ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ、または５ｍｇ／ｍＬ、好ましくは１ｍｇ／ｍＬの濃度で存在し得る。

【０１７９】
本出願の組成物および治療的組合せは、当技術分野で周知の方法に従ってワクチン（「免疫原性組成物」とも呼ばれる）として製剤化することができる。そのような組成物は、免疫応答を増強するためのアジュバントを含み得る。製剤における各々の構成要素の最適な比は、本開示を考慮して当業者に周知の技術によって決定することができる。

【０１８０】
本出願の特定の実施形態では、組成物または治療的組合せは、ＤＮＡワクチンである。ＤＮＡワクチンは、典型的には強い真核細胞プロモーターの制御下で目的の抗原をコードするポリヌクレオチドを含有する細菌プラスミドを含む。プラスミドが宿主の細胞の細胞質に送達されると、コードされた抗原が、内因性に産生され、プロセシングされる。得られた抗原は、典型的には、液性および細胞性免疫応答の両方を誘導する。ＤＮＡワクチンは、それらが少なくとも改善された安全性を提供し、温度安定であり、抗原性のバリアントを発現させるように容易に適合させることができ、および産生が単純であることから有利である。本出願の任意のＤＮＡプラスミドを使用してそのようなＤＮＡワクチンを調製することができる。

【０１８１】
本出願の他の特定の実施形態では、組成物または治療的組合せは、ＲＮＡワクチンである。本出願のＲＮＡワクチンは、典型的には目的の抗原、例えば融合タンパク質またはＨＢＶ抗原をコードする少なくとも１つの一本鎖ＲＮＡ分子を含む。ＲＮＡが宿主の細胞の細胞質に送達されると、コードされる抗原が内因性に産生されてプロセシングされ、ＤＮＡワクチンと類似の液性および細胞性免疫応答の両方を誘導する。ＲＮＡ配列をコドン最適化して、翻訳効率を改善することができる。ＲＮＡ分子は、安定性および／または翻訳を増強するために、本開示を考慮して当技術分野で公知の任意の方法で改変することができ、例えば少なくとも３０アデノシン残基のポリＡテールを付加することによって、および／またはＲＮＡ合成の際に取り込まれ得るかもしくはＲＮＡ転写後に酵素的に操作され得る改変リボヌクレオチド、例えば７－メチルグアノシンキャップによって５末端をキャッピングすることによって改変することができる。ＲＮＡワクチンはまた、アルファウイルス発現ベクターから作製された自己複製ＲＮＡワクチンでもあり得る。自己複製ＲＮＡワクチンは、融合タンパク質またはＨＢＶ抗原ＲＮＡの複製を制御するサブゲノムプロモーターの後にレプリカーゼの下流に位置する人工ポリＡテールを含む、アルファウイルス科に属するウイルスに由来するレプリカーゼＲＮＡ分子を含む。

【０１８２】
ある特定の実施形態では、さらなるアジュバントが、本出願の組成物または治療的組合せ中に含まれていてもよいし、または本出願の組成物または治療的組合せと共に投与されてもよい。別のアジュバントの使用は、任意選択であり、ワクチン接種目的で組成物が使用される場合、免疫応答をさらに強化することができる。本出願による共投与または組成物中に含めるのに好適な他のアジュバントは、好ましくはヒトにおいて潜在的に安全な、十分許容され有効なものであるべきである。アジュバントは、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、抗ＰＤ－１、抗ＴＩＭ－３等）、ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体アゴニスト（例えば、ＴＬＲ７アゴニストおよび／またはＴＬＲ８アゴニスト）、ＲＩＧ－１アゴニスト、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（Ａｌｔｏｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、変異体ＩＲＦ３およびＩＲＦ７遺伝子アジュバント、ＳＴＩＮＧアゴニスト（Ａｄｕｒｏ）、ＦＬＴ３Ｌ遺伝子アジュバント、およびＩＬ－７－ｈｙＦｃが挙げられるがこれらに限定されない低分子または抗体であり得る。例えば、アジュバントは、例えば以下の抗ＨＢＶ剤：ＨＢＶ　ＤＮＡポリメラーゼ阻害剤；イムノモジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体７モジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体８モジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体３モジュレーター；インターフェロンアルファ受容体リガンド；ヒアルロニダーゼ阻害剤；ＩＬ－１０のモジュレーター；ＨＢｓＡｇ阻害剤；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体９モジュレーター；シクロフィリン阻害剤；ＨＢＶ予防用ワクチン；ＨＢＶ治療用ワクチン；ＨＢＶウイルス侵入阻害剤；ウイルスｍＲＮＡを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、より特に抗ＨＢＶアンチセンスオリゴヌクレオチド；低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、より特に抗ＨＢＶ　ｓｉＲＮＡ；エンドヌクレアーゼモジュレーター；リボヌクレオチドレダクターゼの阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスＥ抗原阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスの表面抗原を標的とするＨＢＶ抗体；ＨＢＶ抗体；ＣＣＲ２ケモカインアンタゴニスト；サイモシンアゴニスト；サイトカイン、例えばＩＬ１２；キャプシドアセンブリモジュレーター、ヌクレオタンパク質阻害剤（ＨＢＶコアまたはキャプシドタンパク質阻害剤）；核酸ポリマー（ＮＡＰ）；レチノイン酸誘導遺伝子１の刺激剤；ＮＯＤ２の刺激剤；組換えサイモシンアルファ－１；Ｂ型肝炎ウイルス複製阻害剤；ＰＩ３Ｋ阻害剤；ｃｃｃＤＮＡ阻害剤；免疫チェックポイント阻害剤、例えばＰＤ－Ｌ１阻害剤、ＰＤ－１阻害剤、ＴＩＭ－３阻害剤、ＴＩＧＩＴ阻害剤、Ｌａｇ３阻害剤、ＣＴＬＡ－４阻害剤；免疫細胞（より特にＴ細胞）において発現される共刺激受容体のアゴニスト、例えばＣＤ２７およびＣＤ２８；ＢＴＫ阻害剤；ＨＢＶを処置するための他の薬物；ＩＤＯ阻害剤；アルギナーゼ阻害剤；ならびにＫＤＭ５阻害剤から選択することができる。

【０１８３】
ある特定の実施形態では、第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれは、

独立して脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と共に製剤化される。

【０１８４】

本出願はまた、本出願の組成物および治療的組合せを作製する方法も提供する。組成物または治療的組合せを産生する方法は、本出願のＨＢＶ抗原をコードする単離されたポリヌクレオチド、ベクター、および／またはポリペプチドを、１つまたは複数の薬学的に許容可能な担体と混合するステップを含む。当業者は、そのような組成物を調製するために使用される通常の技術を熟知している。

【０１８５】

免疫応答を誘導するまたはＨＢＶ感染症を処置する方法

本出願はまた、それを必要とする対象においてＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）に対する免疫応答を誘導する方法であって、本出願の組成物または免疫原性組成物の免疫原性有効量を対象に投与するステップを含む方法も提供する。本明細書に記載の本出願の組成物および治療的組合せのいずれも、本出願の方法に使用することができる。

【０１８６】

本明細書で使用される場合、用語「感染症」は、病原体による宿主の侵入を指す。病原体は、それが宿主に侵入することが可能で、宿主内で複製または繁殖することが可能である場合、「感染性」であると考えられる。感染性作用剤の例には、ウイルス、例えばＨＢＶおよびある特定の種のアデノウイルス、プリオン、細菌、真菌、原虫等が挙げられる。「ＨＢＶ感染症」は、具体的には、ＨＢＶによる宿主生物、例えば宿主生物の細胞および組織の侵入を指す。

【０１８７】

語句「免疫応答を誘導する」は、本明細書に記載の方法に関連して使用する場合、それを必要とする対象において、感染症、例えばＨＢＶ感染症に対して所望の免疫応答または効果を引き起こすことを包含する。「免疫応答を誘導する」はまた、病原体、例えばＨＢＶに対して処置するために治療免疫を提供することも包含する。本明細書で使用される場合、用語「治療免疫」または「治療的免疫応答」は、ワクチン接種した対象が、それに対するワクチン接種を行った病原体による感染症を制御することができること、例えばＨＢＶワクチンによるワクチン接種によって付与されたＨＢＶ感染症に対する免疫を意味する。一実施形態では、「免疫応答を誘導する」は、それを必要とする対象において免疫を生じること、例えばＨＢＶ感染症等の疾患に対する治療効果を提供することを意味する。ある特定の実施形態では、「免疫応答を誘導する」は、ＨＢＶ感染症に対する細胞性免疫、例えばＴ細胞応答を引き起こすまたは改善することを指す。ある特定の実施形態では、「免疫応答を誘導する」は、ＨＢＶ感染症に対する液性免疫応答を引き起こすまたは改善することを指す。ある特定の実施形態では、「免疫応答を誘導する」とは、ＨＢＶ感染症に対する細胞性および液性免疫応答を引き起こすまたは改善することを指す。

【０１８８】

本明細書で使用される場合、用語「保護免疫」または「保護免疫応答」は、ワクチン接種した対象が、それに対するワクチン接種を行った病原体による感染症を制御することができることを意味する。通常、「保護免疫応答」を有する対象は、ごく軽度から中等度の臨床症状を示すか、または症状を全く示さない。通常、ある特定の病原体に対して「保護免疫応答」、または「保護免疫」を有する対象は、前記病原体による感染症の結果として死亡することはない。

【０１８９】

典型的には、本出願の組成物および治療的組合せの投与は、ＨＢＶ感染後にＨＢＶに対する免疫応答を生成するか、または例えば治療的ワクチン接種の場合では、ＨＢＶ感染症に特徴的な症状を発症させる治療目的を有する。

【０１９０】

本明細書で使用される場合、「免疫原性有効量」または「免疫学的有効量」は、それを必要とする対象において所望の免疫効果または免疫応答を誘導するために十分な組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、または抗原の量を意味する。免疫原性有効量は、それを必

要とする対象において免疫応答を誘導するために、十分な量であり得る。免疫原性有効量は、それを必要とする対象において免疫を生じるために、例えばＨＢＶ感染症等の疾患に対する治療効果を提供するために十分な量であり得る。免疫原性有効量は、多様な要因、例えば対象の身体条件、年齢、体重、健康等；特定の応用、例えば保護免疫または治療免疫を提供すること；およびそれに対する免疫が望ましい特定の疾患、例えばウイルス感染症に応じて変化し得る。免疫原性有効量は、本開示を考慮して当業者によって容易に決定することができる。

【０１９１】

本出願の特定の実施形態では、免疫原性有効量は、以下の効果の１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれより多くを達成するために十分である組成物または治療的組合せの量を指す：（ｉ）ＨＢＶ感染症またはそれに関連する症状の重症度を低減または改善すること；（ｉｉ）ＨＢＶ感染症またはそれに関連する症状の持続を低減させること；（ｉｉｉ）ＨＢＶ感染症またはそれに関連する症状の進行を防止すること；（ｉｖ）ＨＢＶ感染症またはそれに関連する症状の退行を引き起こすこと；（ｖ）ＨＢＶ感染症またはそれに関連する症状の発生または発症を防止すること；（ｖｉ）ＨＢＶ感染症またはそれに関連する症状の再発を防止すること；（ｖｉｉ）ＨＢＶ感染症を有する対象の入院を低減させること；（ｖｉｉｉ）ＨＢＶ感染症を有する対象の入院期間を低減させること；（ｉｘ）ＨＢＶ感染症を有する対象の生存を増加させること；（ｘ）対象におけるＨＢＶ感染症を排除すること；（ｘｉ）対象におけるＨＢＶ複製を阻害または低減させること；ならびに／または（ｘｉｉ）別の治療の予防効果または治療効果を増強または改善すること。

【０１９２】

免疫原性有効量はまた、臨床的セロコンバージョンへの進展と整合するまでＨＢｓＡｇレベルを低減させるために；対象の免疫系による感染した肝細胞の低減に関連する持続的なＨＢｓＡｇクリアランスを達成するために；ＨＢＶ抗原特異的活性化Ｔ細胞集団を誘導するために；および／または１２カ月以内のＨＢｓＡｇの持続的喪失を達成するために十分な量でもあり得る。目標とする指標の例は、５００コピーのＨＢｓＡｇ国際単位（ＩＵ）の閾値より下のより低いＨＢｓＡｇおよび／またはより高いＣＤ８数を含む。

【０１９３】

一般的な指針として、ＤＮＡプラスミドを参照して使用する場合の免疫原性有効量は、ＤＮＡプラスミド全体の約０．１ｍｇ／ｍＬ～１０ｍｇ／ｍＬの範囲、例えば０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２５ｍｇ／ｍＬ、０．５ｍｇ／ｍＬ、０．７５ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ、１．５ｍｇ／ｍＬ、２ｍｇ／ｍＬ、３ｍｇ／ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、６ｍｇ／ｍＬ、７ｍｇ／ｍＬ、８ｍｇ／ｍＬ、９ｍｇ／ｍＬ、または１０ｍｇ／ｍＬであり得る。好ましくは、ＤＮＡプラスミドの免疫原性有効量は、８ｍｇ／ｍＬ未満、より好ましくは６ｍｇ／ｍＬ未満、さらにより好ましくは３～４ｍｇ／ｍＬ未満である。免疫原性有効量は、１つのベクターまたはプラスミド、または複数のベクターもしくはプラスミドに由来し得る。さらなる一般的な指針として、免疫原性的に有効な量は、ペプチドに対して使用される場合、約１０μｇ～１ｍｇ／投与の範囲、例えば１０、２０、５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９０００、または１０００μｇ／投与であり得る。免疫原性有効量は、単一の組成物で、または複数の組成物で、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の組成物（例えば、錠剤、カプセル剤または注射剤、または皮内送達のために適合させた任意の組成物、例えば皮内送達パッチを使用する皮内送達）で投与することができ、複数のカプセル剤または注射剤の投与は、集合的に対象に免疫原性有効量を提供する。例えば、２つのＤＮＡプラスミドを使用する場合、免疫原性有効量は３～４ｍｇ／ｍＬであり、各プラスミドについて１．５～２ｍｇ／ｍＬであり得る。同様に、いわゆるプライム－ブーストレジメンにおいて、対象に免疫原性有効量を投与し、その後同じ対象に免疫原性有効量の別の用量を投与することが可能である。プライム－ブーストレジメンのこの一般的な考え方は、ワクチンの分野の当業者に周知である。さらなるブースター投与を、必要に応じて任意選択でレジメンに追加することができる。

【０１９４】
２つのＤＮＡプラスミド、例えばＨＢＶコア抗原をコードする第１のＤＮＡプラスミドおよびＨＢＶ　ｐｏｌ抗原をコードする第２のＤＮＡプラスミドを含む治療的組合せを、両方のプラスミドを混合するステップおよび混合物を単一の解剖学的部位に送達するステップによって、対象に投与することができる。あるいは、各々が単一の発現プラスミドを送達する２つの個別の免疫を実施することができる。そのような実施形態では、両方のプラスミドを２つの個別の免疫の混合物として単一の免疫として投与するかによらず、第１のＤＮＡプラスミドおよび第２のＤＮＡプラスミドを、１０：１～１：１０の重量比で、例えば１０：１、９：１、８：１、７：１、６：１、５：１、４：１、３：１、２：１、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、または１：１０の重量比で投与することができる。好ましくは、第１および第２のＤＮＡプラスミドは、１：１の重量比で投与される。

【０１９５】
一般的な指針として、免疫原性的に有効な量は、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片に対して使用される場合、約０．００５ｍｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ、例えば約０．０５ｍｇ～約３０ｍｇ／ｋｇもしくは約５ｍｇ～約２５ｍｇ／ｋｇの範囲、または約４ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約１６ｍｇ／ｋｇもしくは約２４ｍｇ／ｋｇ、または例えば約１、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０ｍｇ／ｋｇであってもよいが、それよりさらに多くてもよく、例えば約１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０もしくは１００ｍｇ／ｋｇであってもよい。また固定された単位用量、例えば、５０、１００、２００、５００または１０００ｍｇを与えてもよいし、または用量は、患者の体表面積に基づいて、例えば、５００、４００、３００、２５０、２００、または１００ｍｇ／ｍ２であってもよい。通常、患者を処置するために、１～８回の用量（例えば、１、２、３、４、５、６、７または８回）を投与してもよいが、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０またはそれより多くの用量を与えることができる。

【０１９６】
本出願の抗体またはその抗原結合断片の投与は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、１カ月、５週間、６週間、７週間、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月またはそれより長い期間の後に繰り返すことができる。長期投与の場合のように、繰り返しの処置過程も可能である。繰り返しの投与は、同じ用量でなされてもよいし、または異なる用量でなされてもよい。例えば、本出願の抗体またはその抗原結合断片は、静脈内輸注によって、８週間にわたり週１回の間隔で、８ｍｇ／ｋｇまたは１６ｍｇ／ｋｇで投与することができ、それに続いて追加の１６週間にわたり２週間毎に８ｍｇ／ｋｇまたは１６ｍｇ／ｋｇで投与することができ、それに続いて４週間毎に８ｍｇ／ｋｇまたは１６ｍｇ／ｋｇで投与することができる。例えば、本出願の抗体またはその抗原結合断片は、処置開始後の、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、もしくは４０日目の少なくとも１つにおいて、または代替として、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９もしくは２０週目の少なくとも１つにおいて、１日当たり、約０．１～１００ｍｇ／ｋｇ、例えば０．５、０．９、１．０、１．１、１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０もしくは１００ｍｇ／ｋｇの量での１日投薬量として、またはそれらのあらゆる組合せで、単回用量、または２４、１２、８、６、４、もしくは２時間毎の数回に分けた用量、またはそれらのあらゆる組合せを使用して提供することができる。

【０１９７】
好ましくは、本出願の方法に従って処置される対象は、ＨＢＶ感染対象、特に慢性ＨＢ

Ｖ感染症を有する対象である。急性ＨＢＶ感染症は、生得の免疫系の効率的な活性化がその後の広い適応性の応答（例えば、ＨＢＶ特異的Ｔ細胞、中和抗体）によって補完されることによって特徴付けられ、これは通常、感染した肝細胞の複製の抑制または除去の成功をもたらす。これに対し、そのような応答は、ウイルス負荷および抗原負荷が高い場合には損なわれるかまたは減損し、例えばＨＢＶエンベロープタンパク質が大量に産生され、感染性ウイルスに対して１，０００倍過剰量でサブウイルス粒子として放出され得る。

【０１９８】

慢性ＨＢＶ感染症は、ウイルス量、肝酵素レベル（壊死炎症活性）、ＨＢｅＡｇ、またはＨＢｓＡｇ量、またはこれらの抗原に対する抗体の存在によって特徴付けられる語句として記載される。ｃｃｃＤＮＡレベルは、およそ１０～５０コピー／細胞で比較的一定のままであるが、ウイルス血症はかなり多様であり得る。ｃｃｃＤＮＡ種の持続は慢性化をもたらす。より詳しくは、慢性ＨＢＶ感染症のフェーズは：（ｉ）高いウイルス量および正常またはわずかに上昇した肝酵素によって特徴付けられる免疫寛容フェーズ；（ｉｉ）肝酵素の有意な上昇を伴うウイルス複製レベルの低下または減少が観察される免疫活性化ＨＢｅＡｇ陽性フェーズ；（ｉｉｉ）血清中の低いウイルス量および正常な肝酵素レベルを伴う低い複製状態の後にＨＢｅＡｇセロコンバージョンが起こり得る不活性なＨＢｓＡｇキャリアフェーズ；および（ｉｖ）ウイルス複製が周期的に起こり（再活性化）、肝酵素レベルの同時の変動、プレコアおよび／または基礎コアプロモーターの変異が一般的であり、ＨＢｅＡｇが感染細胞によって産生されないＨＢｅＡｇ陰性フェーズを含む。

【０１９９】

本明細書で使用される場合、「慢性ＨＢＶ感染症」は、６カ月より長いＨＢＶの検出可能な存在を有する対象を指す。慢性ＨＢＶ感染症を有する対象は、慢性ＨＢＶ感染症のいずれかのフェーズにあり得る。慢性ＨＢＶ感染症は、当技術分野でその通常の意味に従って理解される。慢性ＨＢＶ感染症は、例えば急性ＨＢＶ感染症後６カ月またはそれより長い間のＨＢｓＡｇの持続によって特徴付けられ得る。例えば、本明細書で呼ぶ慢性ＨＢＶ感染症は、米国疾病予防管理センター（ＣＤＣ）によって公表された定義に従い、それに従って慢性ＨＢＶ感染症を以下の臨床基準によって特徴付けることができる：（ｉ）Ｂ型肝炎コア抗原に対するＩｇＭ抗体（ＩｇＭ抗ＨＢｃ）陰性およびＢ型肝炎表面抗原（ＨＢｓＡｇ）陽性、Ｂ型肝炎ｅ抗原（ＨＢｅＡｇ）陽性、もしくはＢ型肝炎ウイルスＤＮＡに関する核酸試験陽性、または（ｉｉ）ＨＢｓＡｇもしくはＨＢＶ　ＤＮＡの核酸試験陽性、または少なくとも６カ月間空けて２回のＨＢｅＡｇ陽性。

【０２００】

好ましくは、免疫原性有効量は、慢性ＨＢＶ感染症を処置するために十分である本出願の組成物または治療的組合せの量を指す。

【０２０１】

一部の実施形態では、慢性ＨＢＶ感染症を有する対象は、ヌクレオシドアナログ（ＮＵＣ）処置を受けており、ＮＵＣ抑制されている。本明細書で使用される場合、「ＮＵＣ抑制」は、ＨＢＶの検出不能なウイルスレベルおよび安定なアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）レベルを少なくとも６カ月間有する対象を指す。ヌクレオシド／ヌクレオチドアナログ処置の例は、ＨＢＶポリメラーゼ阻害剤、例えばエンタカビルおよびテノフォビルを含む。好ましくは、慢性ＨＢＶ感染症を有する対象は、進行した肝線維症または肝硬変を有しない。そのような対象は典型的に、線維症に関してＭＥＴＡＶＩＲスコア３未満および９ｋＰａ未満のフィブロスキャン結果を有するであろう。ＭＥＴＡＶＩＲスコアは、Ｂ型肝炎患者の肝生検における組織病理学的評価によって炎症および線維症の程度を評価するために一般的に使用される採点システムである。採点システムは、２つの標準化された数字：炎症の程度を反映する数字、および線維症の程度を反映する数字を割付する。

【０２０２】

慢性ＨＢＶの排除または低減は、ウイルス性肝硬変および肝細胞癌を含む重度の肝疾患の早期の疾患の妨害を可能にし得ると考えられている。このように、本出願の方法はまた

、ＨＢＶ誘導疾患を処置するための治療としても使用することができる。ＨＢＶ誘導疾患の例には、肝硬変、がん（例えば、肝細胞癌）、および線維症、特にＭＥＴＡＶＩＲスコアが線維症に関して３またはそれより高いことによって特徴付けられる進行線維症が挙げられるがこれらに限定されない。そのような実施形態では、免疫原性有効量は、１２カ月以内のＨＢｓＡｇの持続的な喪失および臨床疾患（例えば、肝硬変、肝細胞癌等）の有意な減少を達成するために十分な量である。

【０２０３】

本出願の実施形態に従う方法は、それを必要とする対象に、本出願の組成物と組み合わせて別の免疫原製剤（例えば、別のＨＢＶ抗原または他の抗原）、または別の抗ＨＢＶ剤（例えば、ヌクレオシドアナログまたは他の抗ＨＢＶ剤）を投与するステップをさらに含む。例えば、別の抗ＨＢＶ剤または免疫原性剤は、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、抗ＰＤ－１、抗ＴＩＭ－３等）、ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体アゴニスト（例えば、ＴＬＲ７アゴニストおよび／またはＴＬＲ８アゴニスト）、ＲＩＧ－１アゴニスト、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（Ａｌｔｏｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、変異体ＩＲＦ３およびＩＲＦ７遺伝子アジュバント、ＳＴＩＮＧアゴニスト（Ａｄｕｒｏ）、ＦＬＴ３Ｌ遺伝子アジュバント、ＩＬ－１２遺伝子アジュバント、ＩＬ－７－ｈｙＦｃ；ＨＢＶ　ｅｎｖに結合するＣＡＲ－Ｔ（Ｓ－ＣＡＲ細胞）；キャプシドアセンブリモジュレーター；ｃｃｃＤＮＡ阻害剤、ＨＢＶポリメラーゼ阻害剤（例えば、エンテカビルおよびテノフォビル）が挙げられるがこれらに限定されない低分子または抗体であり得る。いずれかの抗ＨＢＶ活性剤は、例えば低分子、抗体またはその抗原結合性断片、ポリペプチド、タンパク質、または核酸であり得る。いずれかの抗ＨＢＶ剤は、例えば、ＨＢＶ　ＤＮＡポリメラーゼ阻害剤；イムノモジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体７モジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体８モジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体３モジュレーター；インターフェロンアルファ受容体リガンド；ヒアルロニダーゼ阻害剤；ＩＬ－１０のモジュレーター；ＨＢｓＡｇ阻害剤；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体９モジュレーター；シクロフィリン阻害剤；ＨＢＶ予防用ワクチン；ＨＢＶ治療用ワクチン；ＨＢＶウイルス侵入阻害剤；ウイルスｍＲＮＡを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、より特に抗ＨＢＶアンチセンスオリゴヌクレオチド；低分子干渉ＲＮＡｓ（ｓｉＲＮＡ）、より特に抗ＨＢＶ　ｓｉＲＮＡ；エンドヌクレアーゼモジュレーター；リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスＥ抗原阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスの表面抗原を標的とするＨＢＶ抗体；ＨＢＶ抗体；ＣＣＲ２ケモカインアンタゴニスト；サイモシンアゴニスト；サイトカイン、例えばＩＬ１２；キャプシドアセンブリモジュレーター、ヌクレオタンパク質阻害剤（ＨＢＶコアまたはキャプシドタンパク質阻害剤）；核酸ポリマー（ＮＡＰ）；レチノイン酸誘導遺伝子１の刺激剤；ＮＯＤ２の刺激剤；組換えサイモシンアルファ－１；Ｂ型肝炎ウイルス複製阻害剤；ＰＩ３Ｋ阻害剤；ｃｃｃＤＮＡ阻害剤；免疫チェックポイント阻害剤、例えばＰＤ－Ｌ１阻害剤、ＰＤ－１阻害剤、ＴＩＭ－３阻害剤、ＴＩＧＩＴ阻害剤、Ｌａｇ３阻害剤、およびＣＴＬＡ－４阻害剤；免疫細胞（より特に、Ｔ細胞）において発現される共刺激受容体のアゴニスト、例えばＣＤ２７、ＣＤ２８；ＢＴＫ阻害剤；ＨＢＶを処置するための他の薬物；ＩＤＯ阻害剤；アルギナーゼ阻害剤；およびＫＤＭ５阻害剤から選択することができる。

【０２０４】

送達方法

本出願の組成物および治療的組合せは、非経口投与（例えば、筋肉内、皮下、静脈内、または皮内注射）、経口投与、経皮投与、および鼻腔内投与を含むがこれらに限定されない、本開示を考慮して当業者に公知の任意の方法によって対象に投与することができる。好ましくは、組成物および治療的組合せは、非経口（例えば、筋肉内注射または皮内注射によって）、または経皮投与される。

【０２０５】

組成物または治療的組合せが１つまたは複数のＤＮＡプラスミドを含む本出願の一部の実施形態では、投与は皮膚を通しての注射、例えば筋肉内または皮内注射、好ましくは筋

肉内注射であり得る。筋肉内注射は、電気穿孔、すなわちＤＮＡプラスミドの細胞への送達を容易にするための電場の印加と組み合わせることができる。本明細書で使用される場合、用語「電気穿孔」は、生体膜において顕微鏡的経路（孔）を誘導するために膜内外で電場パルスを使用することを指す。Ｉｎ　ｖｉｖｏ電気穿孔の間、適切な大きさおよび持続の電場を細胞に印加し、細胞膜透過性が一過性に増強された状態を誘導し、このようにして単独では細胞膜を通過することができない分子の細胞取り込みを可能にする。電気穿孔によるそのような孔の作製は、細胞膜の１つの側から他方の側への生体分子、例えばプラスミド、オリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ、薬物等の通過を容易にする。ＤＮＡワクチンを送達するためのＩｎ　ｖｉｖｏ電気穿孔は、宿主細胞によるプラスミド取り込みを有意に増加させることが示されているが、注射部位で軽度から中等度の炎症ももたらす。その結果、皮内または筋肉内電気穿孔では、通常の注射と比較するとトランスフェクション効率および免疫応答が有意に改善される（例えば、それぞれ最大１，０００倍および１００倍）。

【０２０６】

典型的な実施形態では、電気穿孔は、筋肉内注射と組み合わせる。しかし、電気穿孔を非経口投与の他の形態、例えば皮内注射、皮下注射等と組み合わせることも可能である。

【０２０７】

本出願の組成物、治療的組合せ、またはワクチンの電気穿孔による投与は、可逆的な孔を細胞膜に形成させるために有効なエネルギーのパルスを哺乳動物の所望の組織に送達するように構成することができる電気穿孔デバイスを使用して達成することができる。電気穿孔デバイスは、電気穿孔構成要素および電極アセンブリまたはハンドルアセンブリを含み得る。電気穿孔構成要素は、電気穿孔デバイスの以下の構成要素の１つまたは複数を含み得る：コントローラー、電流波形ジェネレーター、インピーダンステスター、波形ロガー、インプットエレメント、ステータス報告エレメント、接続口、メモリー構成要素、電源、および電源スイッチ。電気穿孔は、ｉｎ　ｖｉｖｏ電気穿孔デバイスを使用して達成することができる。本出願の組成物および治療的組合せ、特にＤＮＡプラスミドを含むものの送達を容易にすることができる電気穿孔デバイスおよび電気穿孔方法の例は、ＣＥＬＬＥＣＴＲＡ（登録商標）（Ｉｎｏｖｉｏ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｂｌｕｅ　Ｂｅｌｌ、ＰＡ）、Ｅｌｇｅｎエレクトロポレーター（Ｉｎｏｖｉｏ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｉｎｃ．）Ｔｒｉ－Ｇｒｉｄ（商標）送達システム（Ｉｃｈｏｒ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｉｎｃ．、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ　９２１２１）、ならびにその全ての全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第７，６６４，５４５号明細書、米国特許第８，２０９，００６号明細書、米国特許第９，４５２，２８５号明細書、米国特許第５，２７３，５２５号明細書、米国特許第６，１１０，１６１号明細書、米国特許第６，２６１，２８１号明細書、米国特許第６，９５８，０６０号明細書、および米国特許第６，９３９，８６２号明細書、米国特許第７，３２８，０６４号明細書、米国特許第６，０４１，２５２号明細書、米国特許第５，８７３，８４９号明細書、米国特許第６，２７８，８９５号明細書、米国特許第６，３１９，９０１号明細書、米国特許第６，９１２，４１７号明細書、米国特許第８，１８７，２４９号明細書、米国特許第９，３６４，６６４号明細書、米国特許第９，８０２，０３５号明細書、米国特許第６，１１７，６６０号明細書、および国際特許出願国際公開第２０１７１７２８３８号明細書に記載されるものを含む。Ｉｎ　ｖｉｖｏ電気穿孔デバイスの他の例は、その内容の全体が参照により本明細書に組み込まれている、代理人文書番号６８８０９７－４０５ＷＯとして本出願と同じ日に提出されている「Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccines」と題する国際特許出願に記載されている。同様に、本出願の組成物および治療的組合せを送達するための応用によって企図されるのは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第６，６９７，６６９号明細書に記載されるパルス電場の使用である。

【０２０８】

組成物または治療的組合せが１つまたは複数のＤＮＡプラスミドを含む本出願の他の実

施形態では、投与方法は経皮である。経皮投与は、ＤＮＡプラスミドの細胞への送達を容易にするために表皮アブレーションと組み合わせることができる。例えば、表皮アブレーションのために皮膚パッチを使用することができる。皮膚パッチを除去すると、組成物または治療的組合せが剥削された皮膚に堆積することができる。

【０２０９】

送達方法は、上記の実施形態に限定されず、細胞内送達のための任意の手段を使用することができる。本出願の方法によって企図される他の細胞内送達方法には、リポソーム封入、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）等が挙げられるがこれらに限定されない。

【０２１０】

ある本出願の特定の実施形態では、投与方法は、脂質組成物、例えば脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）である。治療用生成物（例えば本発明の１種または複数の核酸分子）を送達するのに使用することができる脂質組成物、好ましくは脂質ナノ粒子には、水性部分が両親媒性の脂質二重層によって封入されている、または脂質が治療用生成物を含む内部をコーティングしているリポソームもしくは脂質小胞；または脂質で封入された治療用生成物が比較的無秩序な脂質混合物内に含有されている脂質集合体もしくはミセルが挙げられるがこれらに限定されない。

【０２１１】

特定の実施形態では、ＬＮＰは、本発明の核酸分子、例えばＤＮＡまたはＲＮＡ分子を封入するために、および／またはその標的細胞への送達を強化するために、カチオン脂質を含む。カチオン脂質は、選択されたｐＨで、例えば生理学的なｐＨで正味の正電荷を有するあらゆる脂質種であり得る。脂質ナノ粒子は、１つまたは複数のカチオン脂質、非カチオン脂質およびポリエチレングリコール（ＰＥＧ）で改変された脂質を採用した様々な比率の多成分の脂質混合物を含めることによって調製することができる。いくつかのカチオン脂質が文献に記載されており、その多くが商業的に入手可能である。例えば、本発明の組成物および方法に使用するのに好適なカチオン脂質としては、１，２－ジオレオイル－３－トリメチルアンモニウム－プロパン（ＤＯＴＡＰ）が挙げられる。

【０２１２】

ＬＮＰ製剤は、アニオン性脂質を含んでいてもよい。アニオン性脂質は、選択されたｐＨで、例えば生理学的なｐＨで正味の負電荷を有するあらゆる脂質種であり得る。アニオン性脂質は、カチオン脂質と組み合わされる場合、ＬＮＰの全体的な表面電荷を低減するため、およびＬＮＰ二分子層構造のｐＨ依存性の崩壊を導入するために使用され、ヌクレオチド放出を容易にする。いくつかのアニオン性脂質が文献に記載されており、その多くが商業的に入手可能である。例えば、本発明の組成物および方法に使用するのに好適なアニオン性脂質としては、１，２－ジオレオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）が挙げられる。

【０２１３】

ＬＮＰは、本発明の開示を考慮して当技術分野において周知の方法を使用して調製することができる。例えば、ＬＮＰは、エタノール注入または希釈、薄膜の水和、凍結融解、フレンチプレスまたは膜押出し、透析ろ過、音波処理、界面活性剤透析、エーテル注入、および逆相蒸発を使用して調製することができる。

【０２１４】

活性な核酸分子、例えばこの発明の核酸分子を送達するための脂質担体を生成するための脂質、脂質組成物、および方法の一部の例は、ＵＳ２０１７／０１９０６６１、ＵＳ２００６／０００８９１０、ＵＳ２０１５／００６４２４２、ＵＳ２００５／００６４５９５、ＷＯ／２０１９／０３６０３０、ＵＳ２０１９／００２２２４７、ＷＯ／２０１９／０３６０２８、ＷＯ／２０１９／０３６００８、ＷＯ／２０１９／０３６０００、ＵＳ２０１６／０３７６２２４、ＵＳ２０１７／０１１９９０４、ＷＯ／２０１８／２００９４３、ＷＯ／２０１８／１９１６５７、ＵＳ２０１４／０２５５４７２、およびＵＳ２０１３／０１９５９６８に記載されており、これらのそれぞれの関連する内容は、参照によりその全体が組み込まれる。

【０２１５】
本出願の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片は、対象に、あらゆる好適な経路によって、例えば静脈内（ｉ．ｖ．）輸注もしくはボーラス注射によって非経口で、筋肉内に、または皮下に、または腹腔内に投与することができる。静脈内輸注は、例えば１５、３０、６０、９０、１２０、１８０、または２４０分間にわたり、または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２時間にわたり与えることができる。
【０２１６】
アジュバント
本出願の一部の実施形態では、ＨＢＶに対する免疫応答を誘導する方法は、アジュバントを投与するステップをさらに含む。用語「アジュバント」および「免疫刺激剤」は、本明細書において互換的に使用され、免疫系の刺激を引き起こす１つまたは複数の物質として定義される。この文脈において、アジュバントは、本出願のＨＢＶ抗原および抗原性ＨＢＶポリペプチドに対する免疫応答を増強するために使用される。
【０２１７】
本出願の実施形態に従って、アジュバントは、本出願の治療的組合せもしくは組成物に存在し得るか、または個別の組成物で投与することができる。アジュバントは、例えば低分子または抗体であり得る。本出願で使用するために適したアジュバントの例には、免疫チェックポイント阻害剤（例えば、抗ＰＤ－１、抗ＴＩＭ－３等）、ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体アゴニスト（例えば、ＴＬＲ７および／またはＴＬＲ８　アゴニスト）、ＲＩＧ－１アゴニスト、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（Ａｌｔｏｒ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、変異体ＩＲＦ３およびＩＲＦ７遺伝子アジュバント、ＳＴＩＮＧアゴニスト（Ａｄｕｒｏ）、ＦＬＴ３Ｌ遺伝子アジュバント、ＩＬ－１２遺伝子アジュバント、およびＩＬ－７－ｈｙＦｃが挙げられるがこれらに限定されない。アジュバントの例は、例えば、なかでも以下の抗ＨＢＶ薬剤：ＨＢＶ　ＤＮＡポリメラーゼ阻害剤；イムノモジュレーター；Ｔｏｌｌ様受容体７モジュレーター；Ｔｏｌｌ様受容体８モジュレーター；Ｔｏｌｌ様受容体３モジュレーター；インターフェロンアルファ受容体リガンド；ヒアルロニダーゼ阻害剤；ＩＬ－１０のモジュレーター；ＨＢｓＡｇ阻害剤；Ｔｏｌｌ様受容体９モジュレーター；シクロフィリン阻害剤；ＨＢＶ予防ワクチン；ＨＢＶ治療ワクチン；ＨＢＶウイルス侵入阻害剤；ウイルスｍＲＮＡを標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチド、より特に抗ＨＢＶアンチセンスオリゴヌクレオチド；短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、より特に抗ＨＢＶ　ｓｉＲＮＡ；エンドヌクレアーゼモジュレーター；リボヌクレオチドレダクターゼの阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスＥ抗原阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスの表面抗原を標的化するＨＢＶ抗体；ＨＢＶ抗体；ＣＣＲ２ケモカインアンタゴニスト；チモシンアゴニスト；サイトカイン、例えばＩＬ１２；キャプシドアセンブリモジュレーター、核タンパク質阻害剤（ＨＢＶコアまたはキャプシドタンパク質阻害剤）；核酸ポリマー（ＮＡＰ）；レチノイン酸誘導性遺伝子１の刺激因子；ＮＯＤ２の刺激因子；組換えチモシンアルファ－１；Ｂ型肝炎ウイルス複製阻害剤；ＰＩ３Ｋ阻害剤；ｃｃｃＤＮＡ阻害剤；免疫チェックポイント阻害剤、例えばＰＤ－Ｌ１阻害剤、ＰＤ－１阻害剤、ＴＩＭ－３阻害剤、ＴＩＧＩＴ阻害剤、Ｌａｇ３阻害剤、およびＣＴＬＡ－４阻害剤；免疫細胞（より特にＴ細胞）上に発現される共刺激受容体のアゴニスト、例えばＣＤ２７、ＣＤ２８；ＢＴＫ阻害剤；ＨＢＶを処置するための他の薬物；ＩＤＯ阻害剤；アルギナーゼ阻害剤；およびＫＤＭ５阻害剤から選択することができる。
【０２１８】
本出願の組成物および治療的組合せはまた、少なくとも１つの他の抗ＨＢＶ剤と組み合わせて投与することもできる。本出願と共に使用するために適した抗ＨＢＶ剤の例には、低分子、抗体、および／またはＨＢＶ　ｅｎｖに結合するＣＡＲ－Ｔ治療（Ｓ－ＣＡＲ細胞）、キャプシドアセンブリモジュレーター、ＴＬＲアゴニスト（例えば、ＴＬＲ７および／またはＴＬＲ８アゴニスト）、ｃｃｃＤＮＡ阻害剤、ＨＢＶポリメラーゼ阻害剤（例えば、エンテカビルおよびテノフォビル）、および／または免疫チェックポイント阻害剤

等が挙げられるがこれらに限定されない。

【０２１９】

少なくとも１つの抗ＨＢＶ剤は、例えば、ＨＢＶ　ＤＮＡポリメラーゼ阻害剤；イムノモジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体７モジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体８モジュレーター；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体３モジュレーター；インターフェロンアルファ受容体リガンド；ヒアルロニダーゼ阻害剤；ＩＬ－１０のモジュレーター；ＨＢｓＡｇ阻害剤；ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ受容体９モジュレーター；シクロフィリン阻害剤；ＨＢＶ予防用ワクチン；ＨＢＶ治療用ワクチン；ＨＢＶウイルス侵入阻害剤；ウイルスｍＲＮＡを標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド、より特に抗ＨＢＶアンチセンスオリゴヌクレオチド；低分子干渉ＲＮＡｓ（ｓｉＲＮＡ）、より特に抗ＨＢＶ　ｓｉＲＮＡ；エンドヌクレアーゼモジュレーター；リボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスＥ抗原阻害剤；Ｂ型肝炎ウイルスの表面抗原を標的とするＨＢＶ抗体；ＨＢＶ抗体；ＣＣＲ２ケモカインアンタゴニスト；サイモシンアゴニスト；サイトカイン、例えばＩＬ１２；キャプシドアセンブリモジュレーター、ヌクレオタンパク質阻害剤（ＨＢＶコアまたはキャプシドタンパク質阻害剤）；核酸ポリマー（ＮＡＰｓ）；レチノイン酸誘導遺伝子１の刺激剤；ＮＯＤ２の刺激剤；組換えサイモシンアルファ－１；Ｂ型肝炎ウイルス複製阻害剤；ＰＩ３Ｋ阻害剤；ｃｃｃＤＮＡ阻害剤；免疫チェックポイント阻害剤、例えばＰＤ－Ｌ１阻害剤、ＰＤ－１阻害剤、ＴＩＭ－３阻害剤、ＴＩＧＩＴ阻害剤、Ｌａｇ３阻害剤、およびＣＴＬＡ－４阻害剤；免疫細胞（より特に、Ｔ細胞）において発現される共刺激受容体のアゴニスト、例えばＣＤ２７、ＣＤ２８；ＢＴＫ阻害剤；ＨＢＶを処置するための他の薬物；ＩＤＯ阻害剤；アルギナーゼ阻害剤；およびＫＤＭ５阻害剤から選択することができる。そのような抗ＨＢＶ剤は、本出願の組成物および治療的組合せと同時にまたは連続的に投与することができる。

【０２２０】

プライム／ブースト免疫方法

本出願の実施形態はまた、いわゆるプライム－ブーストレジメンで、組成物または治療的組合せの免疫原性有効量を対象に投与するステップ、およびその後に同じ対象に組成物または治療的組合せの免疫原性有効量の別の用量を投与するステップも企図する。このように、一実施形態では、本出願の組成物または治療的組合せは、免疫応答をプライミングするために使用されるプライマーワクチンである。別の実施形態では、本出願の組成物または治療的組合せは、免疫応答をブーストするために使用されるブースターワクチンである。本出願のプライミングおよびブースティングワクチンは、本明細書に記載の本出願の方法において使用することができる。プライム－ブーストレジメンのこの一般的な考え方は、ワクチン技術分野の当業者に周知である。本明細書に記載の本出願の組成物および治療的組合せのいずれも、ＨＢＶに対する免疫応答をプライミングおよび／またはブースティングするためのプライムおよび／またはブーストワクチンとして使用することができる。

【０２２１】

本出願の一部の実施形態では、本出願の組成物または治療的組合せは、免疫をプライミングするために投与することができる。組成物または治療的組合せは、免疫をブースティングするために再投与することができる。組成物またはワクチン組合せのさらなるブースター投与を、任意選択で必要に応じてレジメンに追加することができる。アジュバントは、免疫をブースティングするために使用される本出願の組成物に存在することができ、ブースティング免疫のために本出願の組成物または治療的組合せと共に投与される個別の組成物に存在することができ、またはブースティング免疫として単独で投与することができる。アジュバントがレジメンに含まれるそれらの実施形態では、アジュバントは、好ましくは免疫をブースティングするため使用される。

【０２２２】

プライム－ブーストレジメンの例示的なおよび非制限的な例は、本出願の組成物または治療的組合せの免疫原性有効量の１回用量を対象に投与して、免疫応答をプライミングす

るステップ、および次に本出願の組成物または治療的組合せの免疫原性有効量の別の用量を投与して、免疫応答をブーストするステップを含み、ブースティング免疫は、プライミング免疫を最初に投与した約２～６週間後、好ましくは４週間後に初めて投与される。任意選択で、プライミング免疫を最初に投与した１０～１４週間後、好ましくは１２週間後に、組成物または治療的組合せまたは他のアジュバントのさらなるブースティング免疫を投与する。

【０２２３】

キット

同様に本明細書において本出願の治療的組合せを含むキットも提供される。キットは、第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチドおよび抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を１つまたは複数の個別の組成物中に含むことができ、またはキットは、第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチドおよび抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を単一の組成物中に含むことができる。キットはさらに、１つまたは複数のアジュバントまたは免疫刺激剤、および／または他の抗ＨＢＶ剤を含み得る。

【０２２４】

動物またはヒト生物において投与時に抗ＨＢＶ免疫応答を誘導または刺激する能力は、当技術分野で標準的な多様なアッセイを使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏのいずれかで評価することができる。免疫応答の開始および活性化を評価するために利用することができる技術の一般的な説明に関しては、例えばＣｏｌｉｇａｎら（1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed. J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health）を参照されたい。細胞性免疫の測定は、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋　Ｔ細胞に由来する細胞を含む活性化エフェクター細胞によって分泌されるサイトカインプロファイルの測定（例えば、ＥＬＩＳＰＯＴによるＩＬ－１０またはＩＦＮガンマ産生細胞の定量）によって、免疫エフェクター細胞の活性化状態の決定によって（例えば、古典的な［３Ｈ］チミジン取り込みによるＴ細胞増殖アッセイまたはフローサイトメトリーに基づくアッセイ）、または感作された対象における抗原特異的Ｔリンパ球に関してアッセイすることによって（例えば、細胞傷害性アッセイにおけるペプチド特異的溶解等）実施することができる。

【０２２５】

細胞性および／または液性応答を刺激する能力は、抗体結合および／または結合の競合によって決定することができる（例えば、Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい）。例えば、免疫原を提供する組成物の投与に応答して産生される抗体の力価を、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって測定することができる。免疫応答はまた、ウイルスの中和が、特異的抗体によるウイルスの反応／阻害／中和を通しての感染性の喪失として定義される中和抗体アッセイによっても測定することができる。免疫応答はさらに、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）アッセイによって測定することができる。

【０２２６】

実施形態

本発明はまた、以下の非限定的な実施形態も提供する。

【０２２７】

実施形態１は、それを必要とする対象においてＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処置することに使用するための治療的組合せであって、

ｉ）ａ）配列番号２と、少なくとも９５％、例えば少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原、

ｂ）切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子、

ｃ）配列番号７と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一なアミノ

酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原であって、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しないＨＢＶポリメラーゼ抗原、および

ｄ）ＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子

の少なくとも１つ；ならびに

ｉｉ）好ましくは、

ａ）１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、およびそれらのバリアント；

ｂ）ＳＥＨＳＩ、ＤＰＦＥＬ、ＫＬＮＧ、ＱＴＳＷＫ、ＬＨＦＥＰ、ＮＤＮＧＳＹ、ＴＴＬＹＶＴ、またはＬＡＡＦＰＥＤＲＳＱＰＧＱＤＣＲの配列を有するエピトープに結合する抗体；ならびに

ｃ）ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なもの

からなる群から選択される抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合断片を含む治療的組合せである。

【０２２８】

実施形態２は、ＨＢＶポリメラーゼ抗原および切断型ＨＢＶコア抗原の少なくとも１つを含む、実施形態１に記載の治療的組合せである。

【０２２９】

実施形態３は、ＨＢＶポリメラーゼ抗原および切断型ＨＢＶコア抗原を含む、実施形態２に記載の治療的組合せである。

【０２３０】

実施形態４は、切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子、およびＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子の少なくとも１つを含む、実施形態１に記載の治療的組合せである。

【０２３１】

実施形態５は、それを必要とする対象においてＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処

置することに使用するための治療的組合せであって、
ｉ）配列番号２と少なくとも９５％同一なアミノ酸配列からなる切断型ＨＢＶコア抗原をコードする第１のポリヌクレオチド配列を含む第１の天然に存在しない核酸分子；および
ｉｉ）配列番号７と少なくとも９０％同一なアミノ酸配列を有するＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードする第２のポリヌクレオチド配列を含む第２の天然に存在しない核酸分子であって、ＨＢＶポリメラーゼ抗原は、逆転写酵素活性およびＲＮアーゼＨ活性を有しない、第２の天然に存在しない核酸分子；および
ｉｉｉ）好ましくは、
ａ）１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、およびそれらのバリアント；
ｂ）ＳＥＨＳＩ、ＤＰＦＥＬ、ＫＬＮＧ、ＱＴＳＷＫ、ＬＨＦＥＰ、ＮＤＮＧＳＹ、ＴＴＬＹＶＴ、またはＬＡＡＦＰＥＤＲＳＱＰＧＱＤＣＲの配列を有するエピトープに結合する抗体；ならびに
ｃ）ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なもの
からなる群から選択される抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体または抗原結合断片その抗原結合断片
を含む治療的組合せである。

【０２３２】

実施形態６は、第１の天然に存在しない核酸分子が、切断型ＨＢＶコア抗原のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態４または５に記載の治療的組合せである。

【０２３３】

実施形態６ａは、第２の天然に存在しない核酸分子が、ＨＢＶポリメラーゼ抗原のＮ末端に作動可能に連結されたシグナル配列をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む、実施形態４から６のいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２３４】

実施形態６ｂは、シグナル配列が、独立して、配列番号９または配列番号１５のアミノ酸配列を含む、実施形態６または６ａに記載の治療的組合せである。

【０２３５】

実施形態６ｃは、シグナル配列が、独立して、配列番号８または配列番号１４のポリヌクレオチド配列によってコードされる、実施形態６または６ａに記載の治療的組合せである。

【０２３６】

実施形態７は、ＨＢＶポリメラーゼ抗原が、配列番号７と、少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一なアミノ酸配列を含む、実施形態１から６ｃのいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２３７】

実施形態７ａは、ＨＢＶポリメラーゼ抗原が、配列番号７のアミノ酸配列を含む、実施形態７に記載の治療的組合せである。

【０２３８】

実施形態７ｂは、切断型ＨＢＶコア抗原が、配列番号２と、少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％同一なアミノ酸配列からなる、実施形態１から７ａのいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２３９】

実施形態７ｃは、切断型ＨＢＶ抗原が、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列からなる、実施形態７ｂに記載の治療的組合せである。

【０２４０】

実施形態８は、第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれが、ＤＮＡ分子である、実施形態１から７ｃのいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２４１】

実施形態８ａは、ＤＮＡ分子が、ＤＮＡベクター上に存在する、実施形態８に記載の治療的組合せである。

【０２４２】

実施形態８ｂは、ＤＮＡベクターが、ＤＮＡプラスミド、細菌人工染色体、酵母人工染色体、および閉鎖した線形デオキシリボ核酸からなる群から選択される、実施形態８ａに記載の治療的組合せである。

【０２４３】

実施形態８ｃは、ＤＮＡ分子が、ウイルスベクター上に存在する、実施形態８に記載の治療的組合せである。

【０２４４】

実施形態８ｄは、ウイルスベクターが、バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルスからなる群から選択される、実施形態８ｃに記載の治療的組合せである。

【０２４５】

実施形態８ｅは、第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれが、ＲＮＡ分子である、実施形態１から７ｃのいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２４６】

実施形態８ｆは、ＲＮＡ分子が、ＲＮＡレプリコン、好ましくは自己増殖ＲＮＡレプリコン、ｍＲＮＡレプリコン、改変されたｍＲＮＡレプリコン、または自己増幅ｍＲＮＡである、実施形態８ｅに記載の治療的組合せである。

【０２４７】

実施形態８ｇは、第１および第２の天然に存在しない核酸分子のそれぞれが、独立して、脂質組成物、好ましくは脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）と共に製剤化される、実施形態１から

８ｆのいずれか一項に記載の治療的組合せである。
【０２４８】
実施形態９は、同じ天然に存在しない核酸分子中に第１の天然に存在しない核酸分子および第２の天然に存在しない核酸分子を含む、実施形態４から８ｇのいずれか一項に記載の治療的組合せである。
【０２４９】
実施形態１０は、２つの異なる天然に存在しない核酸分子中に、第１の天然に存在しない核酸分子および第２の天然に存在しない核酸分子を含む、実施形態４から８ｇのいずれか一項に記載の治療的組合せである。
【０２５０】
実施形態１１は、第１のポリヌクレオチド配列が、配列番号１または配列番号３と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態４から１０のいずれか一項に記載の治療的組合せである。
【０２５１】
実施形態１１ａは、第１のポリヌクレオチド配列が、配列番号１または配列番号３と、少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態１１に記載の治療的組合せである。
【０２５２】
実施形態１２は、第１のポリヌクレオチド配列が、配列番号１または配列番号３のポリヌクレオチド配列を含む、実施形態１１ａに記載の治療的組合せである。
【０２５３】
実施形態１３　第２のポリヌクレオチド配列が、配列番号５または配列番号６と、少なくとも９０％、例えば少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む、実施形態４から１２のいずれか一項に記載の治療的組合せ。
【０２５４】
実施形態１３ａ　第２のポリヌクレオチド配列が、配列番号５または配列番号６と、少なくとも９８％、例えば少なくとも９８％、９８．５％、９９％、９９．１％、９９．２％、９９．３％、９９．４％、９９．５％、９９．６％、９９．７％、９９．８％、９９．９％、または１００％の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む実施形態１３に記載の治療的組合せ。
【０２５５】
実施形態１４は、第２のポリヌクレオチド配列が、配列番号５または配列番号６のポリヌクレオチド配列を含む、実施形態１３ａに記載の治療的組合せである。
【０２５６】
実施形態１５は、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片が、１７Ｄ８、２Ｄ３、４Ｈ１、５Ｃ４、４Ａ１１、７Ｄ３、５Ｆ４、Ｈ４０９Ａ１１、ｈＰＤ－１．０８Ａ、ｈＰＤ－１．０９Ａ、１０９Ａ－Ｈ、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１１、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１６、Ｋ０９Ａ－Ｌ－１７、４０９Ａ－Ｈ、Ｈ１Ｍ７７８９Ｎ、Ｈ１Ｍ７７９９Ｎ、Ｈ１Ｍ７８００Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７８８Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９０Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９１Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９４Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９５Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９６Ｎ、Ｈ２Ｍ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ９０１９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９０３４Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０３７Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９０４８Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０５７Ｐ２、Ｈ４Ｈ９０６８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１１９Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２０Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１２８Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１３５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ９１４５Ｐ２、Ｈ４ｘＨ８９９２Ｐ、Ｈ４ｘＨ８９９９Ｐ、Ｈ４ｘＨ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ７７９８Ｎ、Ｈ４Ｈ７７９５Ｎ２、Ｈ４Ｈ９００８Ｐ、Ｈ４Ｈ９０４８Ｐ２、ＰＤ１－０１０３、ＰＤ１－００９８、ＰＤ１－００５０、ＰＤ１－００６

９、ＰＤ１－００７３、ＰＤ１－００７８、ＰＤ１－０１０２、ＰＤ１－０１０３＿０１、ＰＤ１－０１０３＿０２、ＰＤ１－０１０３＿０３、ＰＤ１－０１０３＿０４、ＰＤ１－０１０３－０３１２、ＰＤ１－０１０３－０３１３、ＰＤ１－０１０３－０３１４、ＰＤ１－０１０３－０３１５、１．７．３ｈＡｂ、１．４９．９ｈＡｂ、１．１０３．１１ｈＡｂ、１．１０３．１１－ｖ２ｈＡｂ、１．１３９．１５ｈＡｂ、１．１５３．７ｈＡｂ、またはそれらのバリアントである、実施形態１から１４のいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２５７】

実施形態１５ａは、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片が、ＳＥＨＳＩ、ＤＰＦＥＬ、ＫＬＮＧ、ＱＴＳＷＫ、ＬＨＦＥＰ、ＮＤＮＧＳＹ、ＴＴＬＹＶＴ、またはＬＡＡＦＰＥＤＲＳＱＰＧＱＤＣＲの配列を有するエピトープに結合する抗体である、実施形態１から１４のいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２５８】

実施形態１５ｂは、抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体、またはそれらの断片が、ニボルマブ（ＭＤＸ－１１０６、オプジーボ；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、キイトルーダ、ランブロリズマブ、ＢＭＳ－９３６５５８；Ｍｅｒｃｋ）、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ，Ｉｎｃ．）、ＲＥＧＮ２８１０（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＥＨ１２．２Ｈ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９０２）、アベルマブ（バベンチオ；ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ、Ｐｆｉｚｅｒ）、デュルバルマブ（イミフィンジ、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、セミプリマブ（ＲＥＧＮ－２８１０、リブタヨ；Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＢＭＳ－９３６５５９、アテゾリズマブ（テセントリク、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、またはそれらと等価なものである、実施形態１から１４のいずれか一項に記載の治療的組合せである。

【０２５９】

実施形態１６は、実施形態１から１５ｂのいずれか一項に記載の治療的組合せ、およびそれを必要とする対象におけるＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処置することに治療的組合せを使用するための説明書を含むキットである。

【０２６０】

実施形態１７は、それを必要とする対象におけるＢ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）感染症を処置する方法であって、実施形態１から１５ｂのいずれか一項に記載の治療的組合せを対象に投与することを含む方法である。

【０２６１】

実施形態１７ａは、処置が、それを必要とする対象においてＢ型肝炎ウイルスに対する免疫応答を誘導し、好ましくは対象は、慢性ＨＢＶ感染症を有する、実施形態１７に記載の方法である。

【０２６２】

実施形態１７ｂは、対象が、慢性ＨＢＶ感染症を有する、実施形態１７または１７ａに記載の方法である。

【０２６３】

実施形態１７ｃは、対象が、進行した線維症、硬変症および肝細胞癌（ＨＣＣ）からなる群から選択されるＨＢＶ誘導疾患の処置を必要とする、実施形態１７から１７ｂのいずれか一項に記載の方法である。

【０２６４】

実施形態１８は、治療的組合せが、皮膚を介した注射によって、例えば、筋肉内または皮内注射、好ましくは筋肉内注射によって投与される、実施形態１７～１７ｃのいずれか一項に記載の方法である。

【０２６５】

実施形態１９は、治療的組合せが、第１および第２の天然に存在しない核酸分子の少なくとも１つを含む、実施形態１８に記載の方法である。

【０２６６】

実施形態１９ａは、治療的組合せが、第１および第２の天然に存在しない核酸分子を含む、実施形態１９に記載の方法である。

【０２６７】

実施形態２０は、天然に存在しない核酸分子が、電気穿孔を併用した筋肉内注射によって対象に投与される、実施形態１９または１９ａに記載の方法である。

【０２６８】

実施形態２１は、天然に存在しない核酸分子が、脂質組成物によって、好ましくは脂質ナノ粒子によって対象に投与される、実施形態１９または１９ａに記載の方法である。

【実施例】

【０２６９】

上述した実施形態に、それらの広範な発明概念から逸脱することなく変更をなし得ることが当業者に理解されるであろう。それゆえに、この発明は、開示された特定の実施形態に限定されないが、本発明の説明で定義される通りの本発明の本質および範囲内の改変を網羅することが意図されることが理解される。

【０２７０】

[実施例１]

ＨＢＶコアプラスミドおよびＨＢＶ　ｐｏｌプラスミド

ｐＤＫ－ｐｏｌおよびｐＤＫ－コアベクターの概略図が、それぞれ図１Ａおよび１Ｂに示される。ＣＭＶプロモーター（配列番号１８）、スプライシングエンハンサー（三重の複合配列）（配列番号１０）、シスタチンＳ前駆体シグナルペプチドＳＰＣＳ（ＮＰ＿００１８９０１．１）（配列番号９）、およびｐｏｌ（配列番号５）またはコア（配列番号２）遺伝子を含有するＨＢＶコアまたはｐｏｌ抗原に最適化された発現カセットを、標準的な分子生物学的技術を使用してｐＤＫプラスミド主鎖に導入した。

【０２７１】

プラスミドを、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、コアおよびｐｏｌ特異的抗体を使用したウェスタンブロット分析によって、コアおよびｐｏｌ抗原発現に関して試験したところ、細胞の、および分泌されたコアおよびｐｏｌ抗原（データは示されない）について矛盾のない発現プロファイルを提供することが示された。

【０２７２】

[実施例２]

切断型ＨＢＶコア抗原とＨＢＶ　Ｐｏｌ抗原との融合体を発現するアデノウイルスベクターの生成

アデノウイルスベクターの作製は、単一のオープンリーディングフレームから発現された融合タンパク質として設計されている。例えば２つの個別の発現カセットを使用する、または２つの配列を分離するために２Ａ様配列を使用する、２つのタンパク質を発現させるための追加の構成も同様に想像することができる。

【０２７３】

アデノウイルスベクターの発現カセットの設計

発現カセット（図２Ａおよび図２Ｂに図示する）は、ＣＭＶプロモーター（配列番号１９）、イントロン（配列番号１２）（ヒトＡｐｏＡＩ遺伝子に由来する断片、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号Ｘ０１０３８、塩基対２９５～５２３、ＡｐｏＡＩの第２のイントロンを有する）、後に続く最適化コード配列－ヒト免疫グロブリン分泌シグナルコード配列（配列番号１４）の後に続くコア単独またはコアとポリメラーゼとの融合タンパク質、その後に続くＳＶ４０ポリアデニル化シグナル（配列番号１３）で構成される。

【０２７４】

分泌シグナルは、過去の実験により、誘発されるＴ細胞応答に影響を及ぼすことなく（マウスの実験）、分泌されるトランスジーンを有する一部のアデノウイルスベクターの製造性が改善することが示されたことから含めた。

【０２７５】

コアタンパク質の最後の２つの残基（ＶＶ）およびポリメラーゼタンパク質の最初の２

つの残基（ＭＰ）を融合すると、隣接する相同配列と共にヒトドーパミン受容体タンパク質（Ｄ３アイソフォーム）上に存在する接合配列（ＶＶＭＰ）をもたらす。

【０２７６】

コア配列とポリメラーゼ配列との間にＡＧＡＧリンカーを挿入すると、この相同性が排除され、ヒトプロテオームのＢｌａｓｔにおいてさらなるヒットなしに戻った。

【０２７７】

[実施例３]

マウスにおけるＤＮＡワクチンのｉｎ　ｖｉｖｏ免疫原性試験

ＨＢＶコア抗原またはＨＢＶポリメラーゼ抗原をコードするＤＮＡプラスミドを含有する免疫治療用ＤＮＡワクチンを、マウスにおいて試験した。試験の目的を、ＢＡＬＢ／ｃマウスへの電気穿孔を介した筋肉内送達後にワクチンによって誘導されたＴ細胞応答を検出するように設計した。最初の免疫原性試験は、導入されたＨＢＶ抗原によって誘発される細胞性免疫応答を決定することに集中した。

【０２７８】

特に、試験したプラスミドは、図１Ａおよび１Ｂにそれぞれ示すように、および上記の実施例１で説明したように、ｐＤＫ－ＰｏｌプラスミドおよびｐＤＫ－コアプラスミドを含んだ。ｐＤＫ－Ｐｏｌプラスミドは、配列番号７のアミノ酸配列を有するポリメラーゼ抗原をコードし、ｐＤＫ－コアプラスミドは、配列番号２のアミノ酸配列を有するコア抗原をコードした。第１に、各々のプラスミドによって個々に誘導されたＴ細胞応答を試験した。ＤＮＡプラスミド（ｐＤＮＡ）ワクチンを、マウス前脛骨筋モデルに適用するために適合させた市販のＴｒｉＧｒｉｄ（商標）送達システム－筋肉内（ＴＤＳ－ＩＭ）を使用して、電気穿孔を介してＢＡＬＢ／ｃマウスに筋肉内送達した。電気穿孔によるＤＮＡのマウスへの筋肉内送達の方法およびデバイスに関する追加の説明に関しては、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれている、国際特許出願国際公開２０１７１７２８３８号明細書、および２０１７年１２月１９日に提出された「Method and Apparatus for the Delivery of Hepatitis B Virus (HBV) Vaccine」と題する米国特許出願第６２／６０７，４３０号を参照されたい。特に、電極間に２．５ｍｍの間隔を空けて、電極直径が０．０３０インチである電極アレイを有するＴＤＳ－ＩＭ　ｖ１．０デバイスのＴＤＳ－ＩＭアレイを、導体の長さが３．２ｍｍ、有効な貫通深度が３．２ｍｍであり、電極の菱形構成の主軸が筋繊維と平行な方向を向くように、選択した筋肉内に経皮挿入した。電極の挿入後、注射を開始してＤＮＡ（例えば、０．０２０ｍｌ）を筋肉内に分布させた。ＩＭ注射の完了後、２５０Ｖ／ｃｍ電場（印加電圧５９．４～６５．６Ｖ、印加電流の限界４Ａ未満、０．１６Ａ／秒）を、全期間約４００ｍｓの間、１０％デューティ比（すなわち、電圧を、約４００ｍｓの期間のうち全体で約４０ｍｓの間、積極的に印加する）で全６パルスを局所に印加する。電気穿孔手順の終了後、ＴｒｉＧｒｉｄ（商標）アレイを除去し、動物を回復させた。ＢＡＬＢ／ｃマウスへの高用量（２０μｇ）投与を、表１に要約するように実施した。マウス６匹に、ＨＢＶコア抗原をコードするプラスミドＤＮＡ（ｐＤＫ－コア；群１）を投与し、マウス６匹に、ＨＢＶ　ｐｏｌ抗原をコードするプラスミドＤＮＡ（ｐＤＫ－ｐｏｌ；群２）を投与し、およびマウス２匹に陰性対照として空のベクターを投与した。動物に、２週間空けて２回のＤＮＡ免疫を行い、最後の免疫の１週間後に脾細胞を収集した。

【０２７９】

【表１】

表 1: 予備試験のマウス免疫実験の設計

群	N	pDNA	一側性の投与部位(交互の側)	用量	容量	投与日	エンドポイント(脾臓の採取日)
1	6	コア	CT + EP	20μg	20μL	0、14	21
2	6	Pol	CT + EP	20μg	20μL	0、14	21
3	2	空のベクター(陰性対照)	CT + EP	20μg	20μL	0、14	21

CT、前脛骨筋; EP、電気穿孔

【０２８０】

ＩＦＮ－γ酵素結合イムノスポット（ＥＬＩＳＰＯＴ）によって抗原特異的応答を分析および定量した。このアッセイにおいて、免疫した動物の単離された脾細胞を、コアタンパク質、Ｐｏｌタンパク質、または小さいペプチドリーダーおよび接合配列（各ペプチド２μｇ／ｍｌ）を含むペプチドプールと共に一晩インキュベートした。これらのプールは、コアおよびＰｏｌワクチンベクターの遺伝子型ＢＣＤコンセンサス配列にマッチする１１残基が重複する１５量体ペプチドからなった。大きい９４ｋＤａｎ　ＨＢＶ　Ｐｏｌタンパク質を中央で２つのペプチドプールに分割した、抗原特異的Ｔ細胞を相同なペプチドプールによって刺激し、ＩＦＮ－γ陽性Ｔ細胞を、ＥＬＩＳＰＯＴアッセイを使用して評価した。単一の抗原特異的Ｔ細胞によるＩＦＮ－γの放出を、適切な抗体によって、およびスポット形成細胞（ＳＦＣ）と呼ばれるマイクロプレート上での着色スポットとしてその後の色素産生の検出によって可視化した。

【０２８１】

ＤＮＡワクチンプラスミドｐＤＫ－コア（群１）によって免疫したマウスでは、ＨＢＶコアに対する実質的なＴ細胞応答が達成され、１，０００ＳＦＣ／細胞１０６個（図３）に達した。Ｐｏｌ　１ペプチドプールに対するＰｏｌ　Ｔ細胞応答は強力であった（～１，０００ＳＦＣ／細胞１０６個）。弱いＰｏｌ－２指向性抗Ｐｏｌ細胞応答は、おそらく、マウスにおける限定的なＭＨＣ多様性が原因であった。これは、１つの抗原からの異なるエピトープの認識が同等でないこととして定義されるＴ細胞イムノドミナンスと呼ばれる現象である。この試験において得られた結果を確認する確認試験を実施した（データは示していない）。

【０２８２】

上記の結果は、マウスにおけるＨＢＶ抗原をコードするＤＮＡプラスミドワクチンによるワクチン接種が、投与したＨＢＶ抗原に対する細胞性免疫応答を誘導することを証明する。非ヒト霊長類でも類似の結果が得られた（データ示さず）。

【０２８３】

[実施例４]

ＨＢＶワクチンで誘導された免疫応答への抗ＰＤ－１の影響

健康なマウスにおいてＰＤ－１をブロックすることがＨＢＶ－ワクチンによって誘導された細胞媒介性免疫（ＣＭＩ）に影響を与えるかどうかを評価するために、成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、ｄ０およびｄ２１にＤＮＡ電気穿孔によってワクチン接種し、ｄ２８にそれらの脾臓を回収した。ワクチンは、ｐＤＦ－コアおよびｐＤＦ－Ｐｏｌ　ｖａｘ（ｐＤＫ－コアおよびｐＤＫ－Ｐｏｌと同じ配列であるが、異なる抗生物質耐性をコードする異なる主鎖を有する）のミックスであり、これを両方の脚に各部位につき１０μｇで投与した。抗ＰＤ－１ｍＡｂ（ＣＤ２７９；ＩｎＶｉｖｏｍａｂ）またはアイソタイプｍＡｂ（ＩｎＶｉｖｏｍａｂ）を、腹膜内注射（１０ｍｇ／ｋｇ）によって、第１のワクチン接

種時に、次いでｄ２１まで１週間当たり１回（すなわち、ｄ０、ｄ７、ｄ１４およびｄ２１）投与した。第２のマウス群を、抗ＰＤ－１ｍＡｂまたはアイソタイプｍＡｂでｄ７、ｄ１４およびｄ２１に処置した。対照マウスを、アイソタイプ抗体で処置した。

【０２８４】

２８日目に、すなわち最後のワクチン接種の１週間後にマウスを致死させ、それらの脾細胞を単離して、ＥＬＩＳＰＯＴおよび細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）によって免疫応答を測定した。簡単に言えば、各脾臓を致死させた免疫化マウスから滅菌方式で取り出し、２ｍｌのＲ１０培地を含有する５ｍｌのスナップキャップのポリプロピレンチューブに入れた。次いで脾臓を、金属グリッドで引掻くことによって６ｃｍペトリ皿中で砕いた。グリッドを追加の２ｍｌのＲ１０培地で洗浄し、チューブ中に試料を収集した。死細胞片を数分間デカントし、上の相を迅速に新しいチューブに移し、室温で、１２００ｒｐｍで１０分間遠心分離した。懸濁した細胞ペレットに４．５ｍｌの溶解緩衝液（ＡＣＫ溶解緩衝液）を添加し、穏やかに混合し、さらに１０分間静置することによって、赤血球（ＲＢＣ）浸透圧溶解を実行した。０．５ｍｌの１０×ＰＢＳを添加して溶解緩衝液を中和した。室温で、１２００ｒｐｍで１０分間回転させた後、細胞をＲ１０で洗浄し、再び遠心分離し、１ｍｌのＲ１０培地に再懸濁した。細胞の生存率を評価するために、脾細胞をＧｕａｖａ　ＶｉａＣｏｕｎｔ試薬で１：１０に希釈し、Ａｃｃｕｒｉ　Ｃ６　ＦＡＣＳソーターを使用して計数した。細胞生存率は典型的には９６～９９％であった。提供されたペプチドプールを、それぞれ０．３３ｍｇ／ｍｌでＤＭＳＯ中に再懸濁した、ペプチドプールは、以下のように構成された：コア：３５種のペプチド、Ｐｏｌ１：１０３種のペプチド、およびＰｏｌ２：１０５種のペプチド。

【０２８５】

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイを、標準的な実施に従って、４つのプレートを使用して実行し、各試料につき、４００，０００または２００，０００個の脾細胞を２連で平板培養し、ＤＭＳＯ、コアまたはＣｏｎＡで刺激した。

【０２８６】

ペプチドプールを１μｇ／ｍｌの最終濃度で使用した。アッセイから、低バックグラウンド（ＤＭＳＯ刺激）およびコンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ）での活性化が明らかになった。スポットを形成する細胞（ＳＦＣ）を以下の式：［（２．５×平均４００Ｋ）＋（５×平均２００Ｋ）］／２を用いて計算した。品質チェックおよびデータ詳細は、０日目にｐＣｏｒｅでワクチン接種したものを含む全ての動物において免疫応答がなかったことを示した。

【０２８７】

結果は、図４に示され、コアおよびＰｏｌ抗原に対する強い免疫応答を示し、以前のワクチン接種研究で得られたデータと一致する。有意なバックグラウンド（ＤＭＳＯ）は測定されず、それに対しＰｏｌ２ペプチドプールに対して強い応答が測定された。Ｐｏｌ１ペプチドプールに対して、より低い応答が測定された。興味深いことに、抗ＰＤ－１の３回の注射を受けた群は、アイソタイプ抗体と比較して、Ｐｏｌ抗原に対してより有意に高い応答を示した（それぞれＰｏｌ１およびＰｏｌ２に対してｐ＝０．０４およびｐ＝０．０１５）。加えて、３回の抗ＰＤ－１注射を受けた群におけるＰｏｌに対する応答も、４回の抗体処置を受けたマウスと比較してより高かった（それぞれＰｏｌ１およびＰｏｌ２に対してｐ＝０．０２およびｐ＝０．００４）。総合すると、これらのデータは、３×抗ＰＤ－１投与は、ワクチン接種した健康なマウスにおいてＨＢＶ特異的な免疫応答を増加させることができることを示唆する。

【０２８８】

免疫応答をさらに特徴付けるために、脾細胞を、ＩＦＮγ、ＴＮＦαおよびＩＬ２の分泌に関するマルチカラーＩＣＳによって分析した。アッセイを、標準的なＩＣＳ実施に従って実行した。

【０２８９】

結果は、図５に示される。

【０２９０】
ＩＣＳ分析は、ＥＬＩＳＰＯＴの発見と一致した：コア特異的な応答は、主としてＣＤ４＋／ＩＦＮγ＋／ＴＮＦα＋／ＩＬ２＋であり、それに対してＰｏｌ１特異的な応答は、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋／ＩＦＮγ＋／ＴＮＦα＋／ＩＬ２＋の両方であった。対照的に、Ｐｏｌ２特異的なＣＭＩはＣＤ８＋／ＩＦＮγ＋／ＴＮＦα＋であった。ＩＣＳによって検出されたＰｏｌ特異的なＣＭＩは、抗ＰＤ－１で３回処置したマウスにおいて、他の群と比較してより高かった。
【０２９１】
総合すると、これらのデータは、ＨＢＶコア／Ｐｏｌワクチンが免疫原性であり、抗ＰＤ－１の３回の投与は、最適な免疫作用をもたらし得ることを示す。
【０２９２】
[実施例５]
ＡＡＶ／ＨＢＶ感染マウスにおけるＨＢＶワクチンで誘導された免疫応答への抗ＰＤ－１の影響。
ＰＤ－１をブロックすることが、ＡＡＶ／ＨＢＶ感染マウスにおいてＨＢＶ－ワクチンによって誘導された細胞媒介性免疫（ＣＭＩ）影響に与えるかどうかをさらに評価するために、成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスを２８日間にわたりＡＡＶ／ＨＢＶに感染させた。その後、１４匹の動物の１つの群に、ｄ２８およびｄ４９にＤＮＡ電気穿孔によってワクチン接種し（２．５μｇの各プラスミド）、１つの群に、ｄ２８およびｄ４９にＤＮＡ電気穿孔によってワクチン接種し、５６日目に抗ＰＤ－１抗体（１０ｍｇ／ｋｇ）で処置した。動物の第３の群を、ワクチン接種後にアイソタイプ抗体で処置した。６３日目に、マウスを致死させた。脾細胞、加えて肝臓内リンパ球（ＩＨＬ）を単離し、ＣＤ８Ｔ細胞の増殖能を測定した。図６で示されるように、抗ＰＤ－１で処置したマウスからのＩＨＬは、抗ＰＤ－１で処置されていないもの、およびアイソタイプ抗体で処置したものと比較して、より有意に高いＣＤ８増殖性Ｔ細胞を有していた。対照的に、脾細胞は、より高い増殖能を示さなかったことから（図７）、これは、増殖性ＣＤ８Ｔ細胞が、感染が起こる部位、この場合では肝臓に移動するという事実を反映する。
【０２９３】
動物：Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、尾静脈を介して、ｒＡＡＶ８－１．３ＨＢＶ（Fivep lus Medical Institute、China）に１０１１のＭＯＩで感染させた。ＨＢＶ慢性化が感染後２８日に達したら、ワクチン接種を実行した。
【０２９４】
プラスミドＤＮＡ：ＤＮＡワクチンは、それぞれ図１Ａおよび図１Ｂで示されるように、ＨＢＶのコア（ｐＤＦ－コア）およびポリメラーゼ（Ｐｏｌ）タンパク質（ｐＤＦ－Ｐｏｌ）をコードする２つの別個のＤＮＡプラスミドの組合せであった。２．５μｇの各プラスミドを、トリグリッド（trigrid）システムで、ｉ．ｍ．で電気穿孔した。
【０２９５】
抗体：抗ＰＤ－１抗体（ＲＭＰ１－１４、Ｂｉｏｘｃｅｌｌ）、アイソタイプ対照抗体（Ｂｉｏｘｃｅｌｌ）。この研究に、１０μｇ／ｍｌの抗体を使用し、ｉ．ｐ．で投与した。
【０２９６】
研究設計：成体Ｃ５７ＢＬ／６マウスを２８日間にわたりＡＡＶ／ＨＢＶに感染させた。その後、１４匹の動物の１つの群に、ｄ２８およびｄ４９にＤＮＡ電気穿孔によってワクチン接種し（２．５μｇの各プラスミド）、１つの群に、ｄ２８およびｄ４９にＤＮＡ電気穿孔によってワクチン接種し、５６日目に抗ＰＤ－１抗体（１０ｍｇ／ｋｇ）で処置した。動物の第３の群を、ワクチン接種後にアイソタイプ抗体で処置した。
【０２９７】
脾細胞およびＩＨＬの単離：脾臓をマウスから単離した；組織の破壊を、ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳディソシエーター（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して実行し、細胞を計数し、指示されたアッセイで使用した。肝臓をＰＢＳで灌流することによって肝臓内

リンパ球を得て、組織の破壊を、ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳディソシエーター、続いて３３．７５％（ｖ／ｖ）Ｐｅｒｃｏｌｌ（登録商標）／ＰＢＳ２％ＦＣＳ勾配を使用して実行した。７００×ｇでの遠心分離（１２分、室温、最大加速および１でのブレーキ）により、リンパ球から肝細胞を分離した。試料を慎重に吸引し、指示されたアッセイで使用した。

【０２９８】

免疫表現型検査：脾細胞およびＩＨＬを、ウェル当たり１００．０００個の細胞で平板培養した。次にこれらを生存率の色素で染色した。その後、細胞を固定し、透過化して、細胞内染色を実行した。細胞を、以下のマーカー：増殖性Ｔ細胞のマーカーである抗ＣＤ３、抗ＣＤ８、抗ＣＤ４、およびｋｉ６７で染色した。１時間後、細胞を２回洗浄し、１００μｌの染色緩衝液に再懸濁し、Ｆａｃｓ　ｆｏｒｔｅｓｓａで読み出しを行った。

【０２９９】

本明細書に記載の実施例および実施形態は、単なる例証目的のためであり、広い本発明の概念から逸脱することなく、上記の実施形態に変更を行うことができると理解される。したがって、本発明は、開示の特定の実施形態に限定されないと理解され、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲内の改変を含むと意図される。

【図面】

【図１】

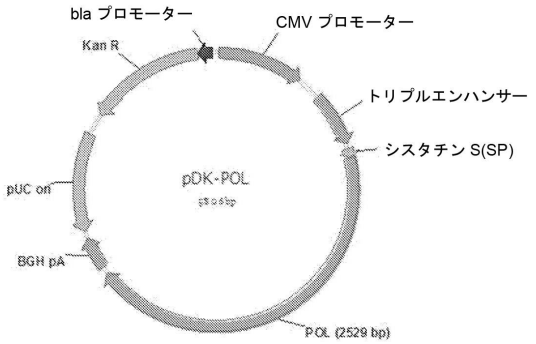


図 1A

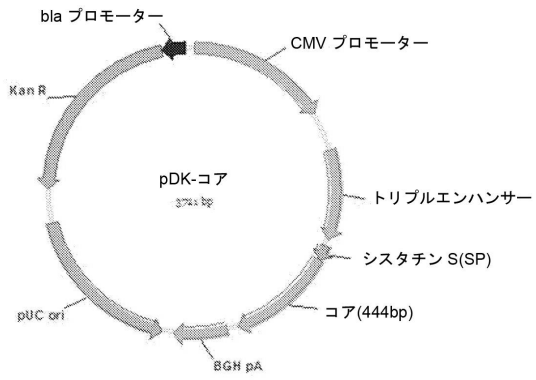


図 1B

【図２】

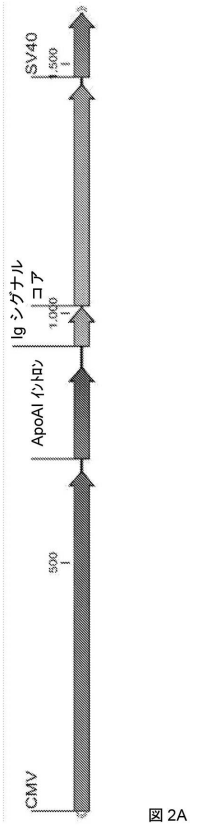


図 2A

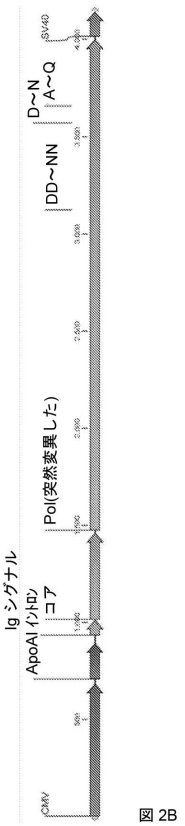


図 2B

【図３】

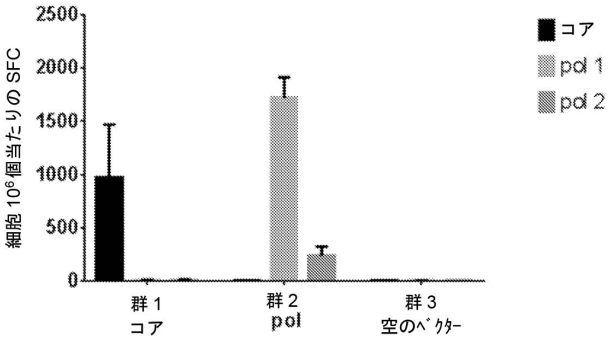


図 3

【図４】

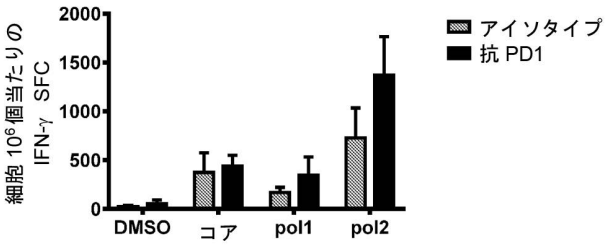


図 4A

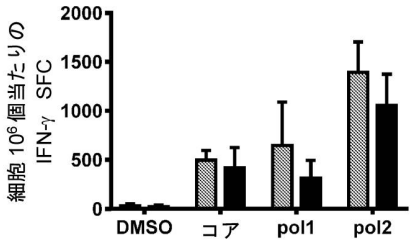


図 4B

【図５】

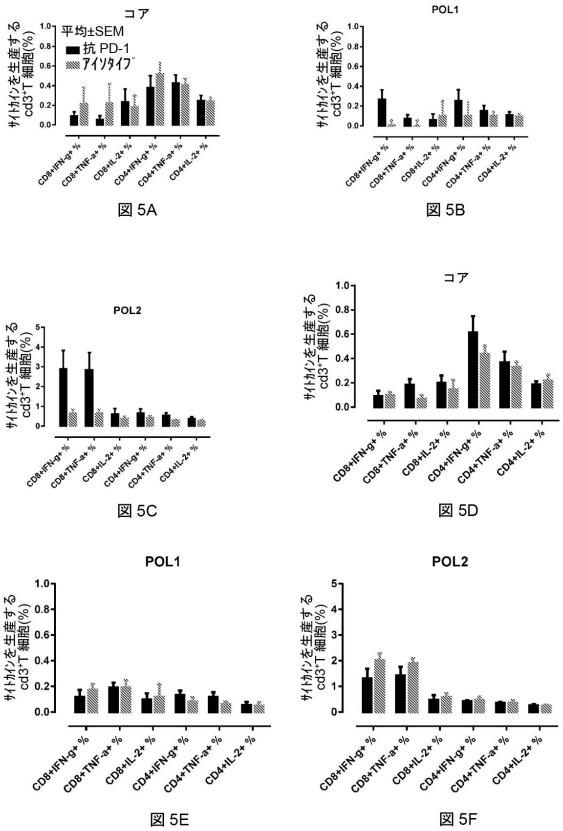


図 5A

図 5B

図 5C

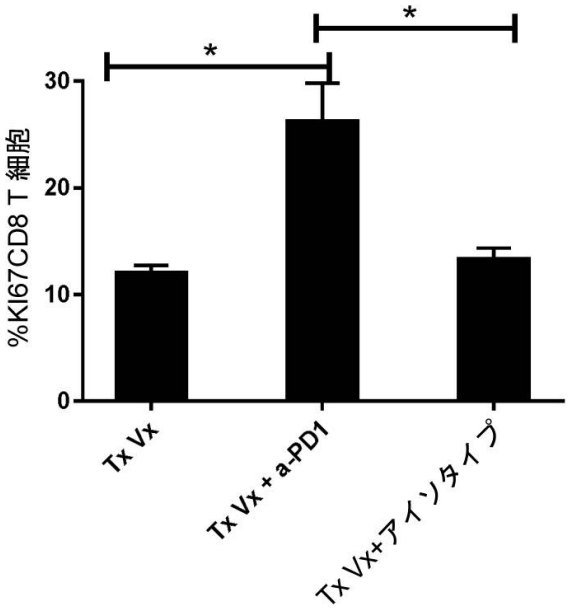
図 5D

図 5E

図 5F

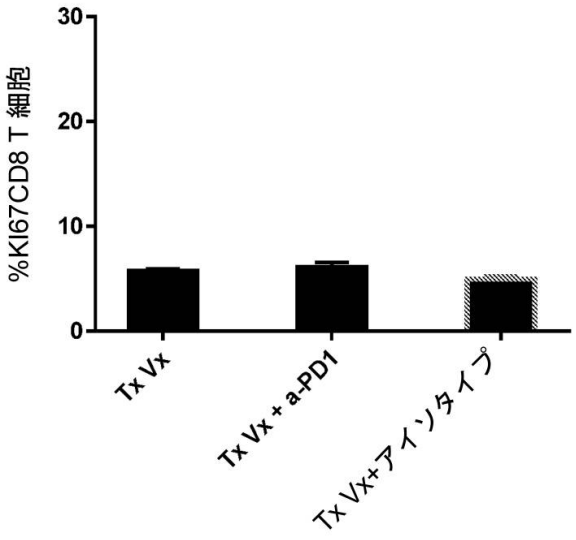
【図６】

図 6



【図７】

図７



【配列表】

2022536850000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/055701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/12 A61K39/395 A61P31/20 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/020538 A1 (TRANSGENE SA [FR]; PASTEUR INSTITUT [FR]; INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 11 February 2016 (2016-02-11) The whole document, in particular from page 46, line 17 to page 48, line 13 and from page 28, line 10 to page 29, line 9. ----- -/--	1-17

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 September 2020	28/09/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Marinoni J-C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/055701

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HORNG-TAY TZENG ET AL: "PD-1 Blockage Reverses Immune Dysfunction and Hepatitis B Viral Persistence in a Mouse Animal Model", PLOS ONE, vol. 7, no. 6, 22 June 2012 (2012-06-22), page e39179, XP055418120, DOI: 10.1371/journal.pone.0039179 Paragraph "Blockade of the PD-1 Pathway by an Anti-PD-1 mAb Reduced the HBV Persistence Rate in this Mouse Animal Model"	1-17
A	GUO Z S ET AL: "PP-023 Enhancing the immune responses of HBsAg-pulsed DC vaccine to hepatitis B virus by blocking PD-1:PD-L1 signal", INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, INTERNATIONAL SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, HAMILTON, CA, vol. 12, 1 November 2008 (2008-11-01), page S62, XP025867959, ISSN: 1201-9712, DOI: 10.1016/S1201-9712(09)60174-0 [retrieved on 2008-11-01] The last two sentences	1-17
A	WO 2019/040102 A1 (GILEAD SCIENCES INC [US]) 28 February 2019 (2019-02-28) paragraphs [0328], [0329], [0344]; claims 46-54, 73-82	1-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2020/055701

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016020538 A1	11-02-2016	NONE	
WO 2019040102 A1	28-02-2019	AU 2018319538 A1	27-02-2020
		CA 3073376 A1	28-02-2019
		CN 111051305 A	21-04-2020
		EP 3672970 A1	01-07-2020
		KR 20200043439 A	27-04-2020
		TW 201920168 A	01-06-2019
		US 2019192504 A1	27-06-2019
		WO 2019040102 A1	28-02-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61P 1/16 (2006.01)		A61P	31/20		
A61K 48/00 (2006.01)		A61P	43/00	121	
A61P 37/04 (2006.01)		A61K	35/76		
C07K 14/02 (2006.01)		A61P	1/16		
C12N 15/36 (2006.01)		A61K	48/00		
C07K 16/28 (2006.01)		A61P	37/04		
C07K 16/18 (2006.01)		C07K	14/02	ZNA	
C12N 15/86 (2006.01)		C12N	15/36		
		C07K	16/28		
		C07K	16/18		
		C12N	15/86	Z	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ホートン，ヘレン
ベルギー国 ２３４０ ベルセ，トルンハウッサーヴェヒ ３０，ヤンセン ファーマシューティカ エヌベー 内
(72)発明者 デ クルーズ，アン マルティネ エム．
ベルギー国 ２３４０ ベルセ，トルンハウッサーヴェヒ ３０，ヤンセン ファーマシューティカ エヌベー 内
(72)発明者 バン ガルク，エレン ロザリー エー．
ベルギー国 ２３４０ ベルセ，トルンハウッサーヴェヒ ３０，ヤンセン ファーマシューティカ エヌベー 内

Ｆターム（参考） 4C084 AA13 MA02 NA14 ZA75 ZB09 ZC75
4C085 AA04 AA13 AA14 BA89 CC23 EE03
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA75 ZB09 ZB33 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA01 CA40 DA75 DA76 DA86 EA20 EA31 FA74