

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5897464号  
(P5897464)

(45) 発行日 平成28年3月30日(2016.3.30)

(24) 登録日 平成28年3月11日(2016.3.11)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 39/29	(2006.01)
A 6 1 P 31/20	(2006.01)
A 6 1 K 39/295	(2006.01)
C 1 2 N 15/09	(2006.01)
C 1 2 N 7/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/29
A 6 1 P	31/20
A 6 1 K	39/295
C 1 2 N	15/00
C 1 2 N	7/00

請求項の数 63 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-523352 (P2012-523352)
(86) (22) 出願日	平成22年8月6日(2010.8.6)
(65) 公表番号	特表2013-501038 (P2013-501038A)
(43) 公表日	平成25年1月10日(2013.1.10)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2010/061492
(87) 國際公開番号	W02011/015656
(87) 國際公開日	平成23年2月10日(2011.2.10)
審査請求日	平成25年7月23日(2013.7.23)
(31) 優先権主張番号	09305742.0
(32) 優先日	平成21年8月7日(2009.8.7)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁(EP)

前置審査

(73) 特許権者	599082883 トランジェーヌ、ソシエテ、アノニム T R A N S G E N E S . A . フランス国イルキルシュ、グラフェンスター デン、セデックス、パルク、ディノバシイ オン、プールバール、ゴンティエ、ダンテ ルナシュ
(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行季
(74) 代理人	100126099 弁理士 反町 洋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H B V 感染を治療するための組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記 3 種のポリペプチド ( i ) ~ ( i i i ) のすべてを含む組合せ、または、下記 3 種のポリペプチド ( i ) ~ ( i i i ) をコードする核酸分子のすべてを含む組合せを含んでなる免疫原性組成物：

( i ) 第 1 の H B V ウィルスに由来するポリメラーゼタンパク質の少なくとも 4 5 0 個のアミノ酸残基を含んでなるポリメラーゼ部分；

( i i ) 第 2 の H B V ウィルスに由来するコアタンパク質の少なくとも 1 0 0 個のアミノ酸残基を含んでなるコア部分；および

( i i i ) 第 3 の H B V ウィルスに由来する H B s A g タンパク質の連続した 2 0 ~ 1 0 0 個のアミノ酸残基の 1 以上の免疫原性ドメインを含んでなる e n v 部分であって、前記 1 以上の免疫原性ドメインが、配列番号 1 2 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列のいずれかと少なくとも 8 0 % の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる。

## 【請求項 2】

前記第 1 、第 2 、および第 3 の H B V ウィルスが、異なる遺伝子型に由来する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 3】

前記第 1 、第 2 、および第 3 の H B V ウィルスの少なくとも 2 つが、同じ H B V 遺伝子型に由来する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 4】

前記第1、第2、および第3のHBVウイルスが、同じ遺伝子型に由来する、請求項3に記載の免疫原性組成物。

【請求項5】

前記第1、第2、および第3のHBVウイルスが、遺伝子型Dに由来する、請求項4に記載の免疫原性組成物。

【請求項6】

前記第1、第2、および第3のHBVウイルスが、HBV分離株Y07587に由来する、請求項5に記載の免疫原性組成物。

【請求項7】

前記第1、第2、および第3のHBVウイルスが、遺伝子型BまたはCに由来する、請求項4に記載の免疫原性組成物。 10

【請求項8】

前記ポリメラーゼ部分が、天然HBVポリメラーゼのN末端に通常存在する少なくとも20個のアミノ酸残基、多くとも335個のアミノ酸残基の末端切断によって改変される、請求項1～7のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項9】

前記ポリメラーゼ部分が、天然HBVポリメラーゼのN末端に位置する開始Met残基に続く最初の47または46個のアミノ酸残基の末端切断によって改変される、請求項8に記載の免疫原性組成物。

【請求項10】

前記ポリメラーゼ部分が、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、請求項8または9に記載の免疫原性組成物。 20

【請求項11】

前記ポリメラーゼ部分が、天然HBVポリメラーゼよりも低い逆転写酵素(RTアーゼ)活性を示すように改変される、請求項1～10のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項12】

前記ポリメラーゼ部分が、配列番号1の540番および配列番号7の494番に相当するAsp残基の、Asp以外の任意のアミノ酸残基への置換を含んでなる、請求項1～11のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 30

【請求項13】

前記Asp以外の任意のアミノ酸残基がHis残基である、請求項12に記載の免疫原性組成物。

【請求項14】

前記ポリメラーゼ部分が、天然HBVポリメラーゼよりも低いRNアーゼH酵素活性を示すように改変される、請求項1～13のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項15】

前記ポリメラーゼ部分が、配列番号1の718番および配列番号7の672番に相当するGlu残基の、Glu以外の任意のアミノ酸残基への置換を含んでなる、請求項1～14のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 40

【請求項16】

前記Glu以外の任意のアミノ酸残基がHis残基である、請求項15に記載の免疫原性組成物。

【請求項17】

前記ポリメラーゼ部分が、配列番号8に示されるアミノ酸配列と、または494番のAsp残基のHis残基への置換および672番のGlu残基のHis残基への置換を含む配列番号7に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、請求項14～16のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項18】

前記ポリメラーゼ部分が、異種の疎水性配列とインフレームで融合される、請求項1～ 50

17のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項19】

前記ポリメラーゼ部分が、狂犬病糖タンパク質のシグナルおよびトランスマンプランペプチドとインフレームで融合され、該狂犬病トランスマンプラン配列が該ポリメラーゼ部分のN末端においてインフレームで融合され、該狂犬病トランスマンプラン配列がC末端においてインフレームで融合される、請求項18に記載の免疫原性組成物。

【請求項20】

前記ポリメラーゼ部分が、配列番号9に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、請求項18または19に記載の免疫原性組成物。

【請求項21】

前記コア部分が、天然HBVコアのC末端に通常存在する、少なくとも10個のアミノ酸残基、多くとも40個のアミノ酸残基の末端切断によって改変される、請求項1～20のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項22】

前記コア部分が、天然HBVコアの最後の35個のアミノ酸残基の末端切断によって改変される、請求項21に記載の免疫原性組成物。

【請求項23】

前記コア部分が、配列番号10に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、請求項21または22に記載の免疫原性組成物。

【請求項24】

前記コア部分が、天然HBVコアに対して、HBVエンベロープタンパク質について低下した認識および/または相互作用を示すように改変される、請求項1～23のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項25】

前記コア部分が、配列番号11に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、請求項24に記載の免疫原性組成物。

【請求項26】

前記env部分が、配列番号16または配列番号17に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、請求項1～25のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項27】

前記ポリメラーゼ、コアおよび/またはenv部分が、ペアでまたはすべて一緒に单一ポリペプチド鎖においてインフレームで融合される、請求項1～26のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項28】

env部分が、前記コア部分のC末端とインフレームで融合される、請求項27に記載の免疫原性組成物。

【請求項29】

前記コア部分とenv部分の融合ポリペプチドが、

・配列番号18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；

・配列番号19に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；および

・配列番号20に示されるアミノ酸配列と、または残基1で始まり、残基251で終わる配列番号20に示されるアミノ酸配列の一部と、あるいはまた残基1で始まり、残基221で終わる配列番号20に示されるアミノ酸配列の一部と少なくとも80%の同一性を示すアミノ酸配列を含んでなるポリペプチド；または配列番号20における残基77～84を欠くその欠失型

からなる群から選択される、請求項28に記載の免疫原性組成物。

【請求項30】

10

20

30

40

50

請求項 1 および 8 ~ 20 のいずれか一項に定義されるポリメラーゼ部分、  
 請求項 1 および 21 ~ 25 のいずれか一項に定義されるコア部分、ならびに  
 請求項 1 および 26 ~ 29 のいずれか一項に定義される e n v 部分  
 のすべてを含む組合せをコードする核酸分子。

## 【請求項 3 1】

- ・配列番号 21 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子；
- ・配列番号 22 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子；
- ・1480 番の G ヌクレオチドの C への置換、2014 番の G ヌクレオチドの C への置換 10  
 、および 2016 番の A ヌクレオチドの T への置換を含む、配列番号 21 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子；
- ・配列番号 23 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子；
- ・配列番号 24 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子；
- ・配列番号 25 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 80 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子；および 20  
 配列番号 26 に示されるヌクレオチド配列と、またはヌクレオチド 1 で始まりヌクレオチド 753 で終わる配列番号 26 に示されるヌクレオチド配列の部分と、またはヌクレオチド 1 で始まりヌクレオチド 663 で終わる配列番号 26 に示されるヌクレオチド配列の部分と、少なくとも 80 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子；または配列番号 26 の 229 番の G から 252 番の A までに及ぶ部分を欠失しているそれらの欠失型

からなる群から選択される核酸分子を含んでなる、請求項 3 0 に記載の核酸分子。

## 【請求項 3 2】

請求項 3 0 または 3 1 に定義される 1 種以上の核酸分子を含んでなる、プラスミドまたはウイルスベクター。

## 【請求項 3 3】

ウイルスベクターが、複製欠損アデノウイルスベクターである、請求項 3 2 に記載のベクター。

## 【請求項 3 4】

ウイルスベクターが、E1 領域の代わりに挿入された前記核酸分子を含んでなるアデノウイルスベクターである、請求項 3 3 に記載のベクター。

## 【請求項 3 5】

ウイルスベクターが、ポックスウイルスベクターである、請求項 3 2 に記載のベクター。

## 【請求項 3 6】

前記ポックスウイルスベクターが、カナリア痘ウイルス、鶏痘ウイルス、またはワクシニアウイルスから得られる、請求項 3 5 に記載のベクター。

## 【請求項 3 7】

前記ワクシニアウイルスが、改変アンカラ (MVA) 株に由来する、請求項 3 6 に記載のベクター。

## 【請求項 3 8】

前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分、および前記 e n v 部分をコードする核酸分子を担持する、請求項 3 2 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のベクター。

## 【請求項 3 9】

前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分、および前記 e n v 部分をコードする核酸分子の 1 つだけまたは 2 つを担持する、請求項 3 2 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のベクター。 50

## 【請求項 4 0】

( i ) 7 . 5 K プロモーターなどのワクシニアプロモーターの制御下に置かれた、配列番号 7 、 8 もしくは 9 に、または 494 番の Asp 残基の His 残基への置換および 672 番の Glu 残基の His 残基への置換を含む配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分をコードする、核酸分子を含んでなる MVA ベクター；

( ii ) pH 5 r プロモーターなどのワクシニアプロモーターの制御下に置かれた、配列番号 18 または 19 に示されるアミノ酸配列を含んでなるコア部分および env 部分をコードする核酸分子を含んでなる MVA ベクター；

( iii ) E1 領域の代わり挿入された、CMV プロモーターの制御下に置かれた核酸分子であり、配列番号 7 、 8 もしくは 9 に、または 494 番の Asp 残基の His 残基への置換および 672 番の Glu 残基の His 残基への置換を含む配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分をコードする核酸分子を含んでなる E1 欠損型 Ad ベクター；および

( iv ) E1 領域の代わり挿入された、CMV プロモーターの制御下に置かれた、配列番号 18 、 19 もしくは 20 に、または残基 1 で始まり残基 251 で終わる配列番号 20 の部分に、または残基 1 で始まり残基 221 で終わる配列番号 20 の部分に示されるアミノ酸配列を含んでなるコア部分および env 部分をコードする核酸分子を含んでなる E1 欠損型 Ad ベクター

からなる群から選択される、請求項 3 9 に記載のベクター。

## 【請求項 4 1】

請求項 3 0 もしくは 3 1 に記載の核酸分子または請求項 3 2 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のベクターを含んでなる、感染性ウイルス粒子。

## 【請求項 4 2】

以下の工程：

( a ) 請求項 3 2 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のウイルスベクターを好適な細胞系統に導入する工程、

( b ) 該感染性ウイルス粒子の產生を可能にする好適な条件下で該細胞系統を培養する工程、

( c ) 產生された感染性ウイルス粒子を該細胞系統の培養物から回収する工程、および

( d ) 所望により、回収された該感染性ウイルス粒子を精製する工程

を含んでなる、請求項 4 1 に記載の感染性ウイルス粒子の製造方法。

## 【請求項 4 3】

請求項 3 0 もしくは 3 1 に記載の核酸分子、請求項 3 2 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のベクター、または請求項 4 1 に記載の感染性ウイルス粒子を含んでなる、宿主細胞。

## 【請求項 4 4】

請求項 3 0 もしくは 3 1 に記載の核酸分子、請求項 3 2 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のベクター、または請求項 4 1 に記載の感染性ウイルス粒子、または請求項 4 3 に記載の宿主細胞と、薬学上許容されるビヒクリルとを含んでなる、組成物。

## 【請求項 4 5】

ヒトにおける全身適用または粘膜適用に好適な 1 種以上のアジュバントをさらに含んでなる、請求項 4 4 に記載の組成物。

## 【請求項 4 6】

筋肉内投与または皮下投与用に処方される、請求項 4 4 または 4 5 に記載の組成物。

## 【請求項 4 7】

約 10<sup>5</sup> ~ 約 10<sup>13</sup> 感染単位のウイルスベクターまたは感染性ウイルス粒子を含んでなる、請求項 4 4 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 4 8】

HBV 感染または HBV 関連疾患もしくは病的状態の治療または予防のための薬物の製造のための、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物、請求項 3 0 もしくは 3 1 に記載の核酸分子、請求項 3 2 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のベクター、請求項 4

10

20

30

40

50

1に記載の感染性ウイルス粒子、請求項4 3に記載の宿主細胞、または請求項4 4～4 7のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つの使用。

【請求項 4 9】

慢性B型肝炎ウイルス感染を有する患者の治療を意図した薬物の製造のための、請求項4 8に記載の使用。

【請求項 5 0】

請求項1～2 9のいずれか一項に記載の免疫原性組成物、請求項3 0もしくは3 1に記載の核酸分子、請求項3 2～4 0のいずれか一項に記載のベクター、請求項4 1に記載の感染性ウイルス粒子、請求項4 3に記載の宿主細胞、または請求項4 4～4 7のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを含んでなる、HBV感染またはHBV関連疾患もしくは病的状態の治療または予防に用いるための、医薬組成物。10

【請求項 5 1】

慢性B型肝炎ウイルス感染の治療に用いるための、請求項5 0に記載の医薬組成物。

【請求項 5 2】

標準治療と併用される、請求項4 8または4 9に記載の使用。

【請求項 5 3】

標準治療と併用される、請求項5 0または5 1に記載の医薬組成物。

【請求項 5 4】

前記標準治療が、ラミブジン、エンテカビル、テルビブジン、アデホビル、ジピボキシル、およびテノホビルからなる群から選択される、サイトカインおよび／またはヌクレオチドもしくはヌクレオチド類似体を含んでなる、請求項5 2に記載の使用。20

【請求項 5 5】

前記標準治療が、ラミブジン、エンテカビル、テルビブジン、アデホビル、ジピボキシル、およびテノホビルからなる群から選択される、サイトカインおよび／またはヌクレオチドもしくはヌクレオチド類似体を含んでなる、請求項5 3に記載の医薬組成物。

【請求項 5 6】

請求項1～2 9のいずれか一項に記載の免疫原性組成物、請求項3 0もしくは3 1に記載の核酸分子、請求項3 2～4 0のいずれか一項に記載のベクター、請求項4 1に記載の感染性ウイルス粒子、請求項4 3に記載の宿主細胞、または請求項4 4～4 7のいずれか一項に記載の組成物の少なくとも1つを含んでなる、宿主生物においてHBVに対する免疫応答を誘導または刺激するために用いるための、医薬組成物。30

【請求項 5 7】

前記免疫応答が、CD4+および／またはCD8+に媒介される細胞性応答である、請求項5 6に記載の医薬組成物。

【請求項 5 8】

HBV感染の治療に使用するためのパーティットであって、請求項1～2 9のいずれか一項に記載の免疫原性組成物、請求項3 0もしくは3 1に記載の核酸分子、請求項3 2～4 0のいずれか一項に記載のベクター、請求項4 1に記載の感染性ウイルス粒子、請求項4 3に記載の宿主細胞、または請求項4 4～4 7のいずれか一項に記載の組成物からなる群から選択される複数の活性物質を含んでなる、パーティット。40

【請求項 5 9】

請求項1および8～20のいずれか一項に定義されるポリメラーゼ部分をコードする核酸分子を含んでなる第1のベクターと、請求項1および21～2 9のいずれか一項に定義されるコア部分およびenv部分をコードする核酸分子を含んでなる第2のベクターとを含んでなる、請求項5 8に記載のパーティット。

【請求項 6 0】

前記第1のベクターが、請求項4 0(i)に定義されるMVAベクターであり、前記第2のベクターが、請求項4 0(ii)に定義されるMVAベクターである、請求項5 9に記載のパーティット。

【請求項 6 1】

10

30

40

50

前記第1のベクターが、請求項4 0( i i i )に定義されるA dベクターであり、前記第2のベクターが、請求項4 0( i v )に定義されるA dベクターである、請求項5 9に記載のパーティット。

【請求項6 2】

免疫調節剤を発現する第3のベクターをさらに含んでなる、請求項5 9 ~ 6 1のいずれか一項に記載のパーティット。

【請求項6 3】

請求項1および8 ~ 2 9のいずれか一項に定義されるポリメラーゼ部分、コア部分、およびe n v部分をコードする、少なくとも2つの独立したベクターの組合せを含んでなる、免疫原性組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0 0 0 1】

本発明は、核酸に基づくかまたはポリペプチドに基づくB型肝炎ウイルス(H B V)成分を含む免疫原性組成物に関する。該免疫原性組成物は、H B V感染およびH B V感染によって引き起こされるかまたはそれに関連する任意の病態または疾患に対する防御的または治療的効果を提供する目的で、H B Vに対する免疫応答を刺激するまたは増強するために使用することができる。本発明はまた、そのようなH B V成分を発現するための発現ベクターおよびそれらの治療的または予防的使用に関する。本発明は、免疫療法の分野において、より特には、H B Vに感染した患者、特に、慢性的に感染した患者の治療に極めて特に興味深い。

20

【発明の背景】

【0 0 0 2】

B型肝炎は重大な公衆衛生問題であり、世界では慢性的に感染している人が3 5 0百万人を超えており、その感染者の2 0 ~ 4 0 %は慢性肝疾患、肝硬変および肝細胞癌を発症する危険性がある。有効な予防ワクチンがあるにもかかわらず、B型肝炎ウイルス(H B V)感染は多くの国で、先進国でもまだ蔓延しており、世界では毎年推計4 . 5百万の新たな感染症例が報告されている。WHOでは皆接種制度の実施を推奨しているが、予防接種フルコースの普及率は、アジアでの2 5 %から欧州での7 5 ~ 9 0 %まで様々である。現在、B型肝炎は、死因の第1 0位であり(およそ1百万人死亡/年)、H B Vは5番目に罹患率の高い癌である肝臓癌と関係している。H B V感染の地理的分布は一様ではなく、西洋諸国では有病率は1 %より低く、東南諸国、アフリカの大部分および南アメリカ赤道付近では1 0 %を上回っている。H B V慢性保菌者高蔓延地域では、感染母体から新生児への垂直伝播が最も頻発する感染様式であり、ほとんどの場合、結果として慢性肝炎となる(症例の9 0 %)。この割合は、出生直後に感染乳児に予防接種することによって1 5 %に下げるができる。西洋諸国では、感染は、血液、精液、唾液などの体液を介して、成人期に水平伝播によって起こる可能性が最も高く、結果として、患者の8 5 %は急性の自己回復する感染であるが、症例の1 5 %は慢性感染となる。

30

【0 0 0 3】

B型肝炎ウイルス(H B V)は、ヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)のメンバーであり、主に肝臓に感染し、肝細胞で複製する。感染粒子は、3種の異なる表面タンパク質(H B s)を含む外側リポタンパク質エンベロープと、その主要な構造タンパク質がコアタンパク質(H B c A g)である内部ヌクレオカプシドで構成されるいわゆる4 2 ~ 4 5 n mの「デーン粒子」である。ヌクレオカプシド内部にはウイルスポリメラーゼタンパク質(P)に関連したH B Vゲノムの單一コピーが存在する。H B V感染患者の血液には、4 2 ~ 4 5 n mのビリオンの他に、感染細胞から放出されたH B s A gおよび宿主由来の脂質からできた2 0 n mの球状物が含まれる。これらの球状物の数はビリオンの1 0<sup>4</sup> ~ 1 0<sup>6</sup>倍である。

40

【0 0 0 4】

H B Vゲノムは、全長マイナス鎖とより短いプラス鎖からなるおよそ3 , 2 0 0 ヌクレ

50

オチドの弛緩型開環状の部分的に二本鎖のDNAである。HBVゲノムは、4種のオーバーラップオープンリーディングフレーム(ORF)、C、S、PおよびXを含む。C ORFは、コアタンパク質(またはHBcAg)(HBVヌクレオカプシドを構成する183アミノ酸長のタンパク質)と、プレコアN末端伸長部およびHBcAgの一部を含むHB e Agとして知られる、ウイルス複製中に患者の血清で見られる第2のタンパク質をコードする。コアタンパク質のC末端は、非常に塩基性が高く、核酸だけでなく数多くのリン酸化部位とも結合すると予測される4つのArgに富んだドメインを含む(Yu and Sommers, 1994, J. Virol. 68:2965に記載のとおり、コアのリン酸化状態は、カプシド粒子におけるコンフォメーション変化に関連している)。S ORFは、3種の表面タンパク質をコードし、それらのタンパク質は総て同じC末端を有するがそれらのN末端では3つのインフレームATG開始コドンが存在することによって異なっており、S ORFはそれらの開始コドンによって3つの領域、それぞれ、S(226個のアミノ酸)、pre-S2(55個のアミノ酸)およびpre-S1(108個のアミノ酸)に分かれている。Large型表面抗原タンパク質(L)は、第1のATG開始コドンでの翻訳開始後に產生され、389個のアミノ酸残基(preS1-preS2-S)を含む。middle型表面抗原タンパク質(M)は、第2の開始ATGから始まるS領域およびpre-S2領域の翻訳から生じるのに対して、226個のアミノ酸からなるsmall型表面抗原タンパク質(S、HBsAgとも呼ばれる)は、第3の開始ATGコドンから開始するS領域の翻訳から生じる。それらのHBV表面タンパク質は、炭水化物側鎖(グリカン)がN-グリコシド結合によって結合されている糖タンパク質である。P ORFは、ウイルスポリメラーゼをコードし、X ORFは、転写活性化因子であると考えられている、Xタンパク質として知られるタンパク質を含む。

#### 【0005】

未知の受容体によって、ビリオンが肝細胞に入ると、ヌクレオカプシドによってゲノムHBV DNAが核に移行し、そこで、弛緩型開環状DNAが共有結合性閉環状DNA(cccDNA)に変わる。cccDNAは、4種のウイルスRNAの転写のための鑄型として働き、それらのウイルスRNAは細胞質に輸送され、HBVタンパク質の翻訳のためのmRNAとして用いられる。最も長い(プレゲノム)RNAは、HBV複製のための鑄型としても働き、細胞質においてヌクレオカプシド内で生じる。次いで、HBV DNAとポリメラーゼを含むカプシドのいくつかは核に再び運ばれ、そこで、カプシドは新たに作り出された弛緩型開環状DNAを放出してさらなるcccDNAを形成する。半減期が肝細胞より長いことから、cccDNAは、HBVの持続に関与する。他のカプシドは、小胞体への出芽によってエンベロープに覆われ、ゴルジ複合体の通過後に分泌される。

#### 【0006】

効果的な抗ウイルス応答を得るためにCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞免疫応答の重要性を強調した前臨床および臨床研究は複数ある(Ferrari et al, 1990, J Immunol 145:3442; Penna et al, 1996, J Clin Invest, 98:1185; Penna et al, 1997, Hepatology, 25:1022)。つまり、B型肝炎から自然に回復した患者は、Tヘルパー(T<sub>H</sub>)リンパ球および細胞傷害性T(CTL)リンパ球(末梢血で容易に検出可能である)によって媒介される多特異的で持続する応答が高かった。ウイルスエピソードを認識することによって、CTLは、HBV複製の非細胞変性的、サイトカイン媒介性阻害を介してHBV感染細胞を治癒する能力および/またはパーフォリン-Granz BリガンドおよびTNF-αを媒介する死経路を介してこれらの細胞を死滅させる能力のいずれかを獲得する。どちらのエフェクター機能も急性B型肝炎の回復中に観察されており、この1型T細胞(Th1)応答は臨床的回復後も持続する。その応答は、血清アラニン-アミノトランスフェラーゼ(ALT)レベルの上昇やHBcAg特異的IgMおよびIgGの出現と同時に起こる場合が多い。抗HB e抗体および抗HBs抗体は後に現れ、良好な感染転帰を示す。HBsAg特異的抗体は、中和抗体であり、感染防御免疫を媒介し、臨床的回復後も生涯続く。しかしながら、慢性HBV感染は、免疫系ではまれにしか回復しない。これが起こった場合、ウイルスクリアランスは、免疫系による感染肝細胞の破壊によって引き起こされるCTL活性の増加と

A L T レベルの上昇を伴う。しかしながら、肝臓生検材料から個々の H B V 特異的 T 細胞クローニングが単離され増殖されたが、慢性的に感染した患者の大部分は、抗原に拘束された、ウイルス感染を除去するのに効果がない、弱く一時的な C D 4 および C D 8 T 細胞免疫応答を示す。慢性 B 型肝炎における細胞性免疫応答のエフェクター機能のこの変化の理由は現在分かっていない。しかしながら、ウイルス量が閾値  $10^6$  I U / m L より低い場合には、一部の患者において機能的 T 細胞応答を部分的に回復させることができることが示された(Webster et al 2004, J. Virol. 78:5707)。これらのデータは、明らかに有望であり、効果的な T 細胞応答を誘導することが可能な免疫調節戦略の必要性を強調している。

## 【 0 0 0 7 】

理想的には、慢性ウイルス性 B 型肝炎の治療は、そのウイルスを除去し、肝硬変または肝臓癌への疾患進行を予防し、患者の生存を改善するために、まず、回復不能な肝臓損傷の前に H B V 複製を抑制することを可能にすることであろう。慢性 B 型肝炎の従来の治療には、ペグ化インターフェロン (I F N  $\alpha$ ) およびヌクレオシド / ヌクレオチド類似体 (N U C) (ラミブジンなど) があり、ごく最近では、エンテカビル、テルビブジン、アデホビルおよびテノホビルがある (E A S L 診療ガイドライン：慢性 B 型肝炎管理、2009年(EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B, 2009))。I F N  $\alpha$  は、ウイルスの複製を阻害する強力な抗ウイルス分子であるが、しかしながら、重篤な副作用を引き起こすのは患者の 25 ~ 30 % にすぎない。N U C は、プレゲノム R N A のマイナス鎖 D N A へ、さらに二本鎖ウイルス D N A への逆転写を阻害することを目的とする H B V ポリメラーゼの競合的阻害剤として作用する。N U C は、新たなビリオンの形成を制限するが、新たな子孫ウイルスの源である感染肝細胞の核内に潜在するスーパーコイル c c c D N A の除去には効果がない。これにより、N U C の有効性が一時的であり、治療中止直後にウイルスリバウンドが起こり、患者は生涯にわたって治療を受ける必要がある理由を説明することができる。加えて、長期有効性も、耐性のある H B V 变異株の出現(Leung et al., 2001, Hepatology 33:1527において議論されているように、ラミブジン治療については 1 年経過すると 24 % を上回り、4 年経過するとおよそ 66 % )により制限されるが、最新の N U C (エンテカビル、テルビブジンおよびテノホビル) では、薬物耐性のある H B V 变異株の発生はずっと少なく、H B V D N A の抑制は増大した。しかしながら、これらの新薬に関する長期治療データはわずかであり、このように有効性がより高いことは、H B s - セロコンバージョン率が有意に高いこととは相関していないかった。

## 【 0 0 0 8 】

抗ウイルス療法の他にも、現在、宿主の免疫応答の改善を目的とする補助療法、具体的には、細胞傷害性 T リンパ球およびヘルパー T リンパ球によって媒介されるものを開発するためには、努力がなされている。既存の免疫療法アプローチの大部分は、H B V 表面タンパク質、S p r e S 1 および / または p r e S 2 の使用に集中していた(Smith et al., 1983, Nature 302:490; Lubeck et al., 1989, Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 :6763 ; Adkins et al., 1998, BioDrugs 10:137; Loirat et al., 2000, J. Immunol. 165:4748; Funuy-Ren et al. 2003, J. Med. Virol., 71:376; Kasaks et al., 2004, J. Gen. Virol. 85:2665; Xiangming Li et al., 2005, Intern. Immunol. 17:1293; Mancini-Bourguin et al., 2006, Vaccine 24:4482; Vandepapeliere et al., 2007, Vaccine 25:8585)。少なくとも免疫応答の刺激に関連して有望な結果が得られた。例えば、Mancini-Bourguin et al. (2006, Vaccine 24:4482) には、p r e S 2 - S コード D N A ワクチンを注射した H B V 慢性感染患者における T 細胞応答の誘導および / または再現が報告されており、このことは、免疫系がこれらの患者においてまだ効力を発揮しているということを十分に示している。

## 【 0 0 0 9 】

H B c A g はまた、免疫原(Yi-Ping Xing et al., 2005, World J. Gastro. 11:4583)としてだけでなく表面上に外来エピトープを担持しているキメラ H B c A g カプシド (W

10

20

30

40

50

O 9 2 / 1 1 3 6 8 ; W O 0 0 / 3 2 6 2 5 ; Koletzki et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:2049) としても使用された。免疫原性の観点からエピトープを挿入するために最も有望な位置は、80番付近のH B c A g の表面上の存在すると予測される外側ループ部位であると思われる(Argos et al. 1988, EMBO J. 7:819)。Schodel et al. (1992, J. Virol. 66:106)、Borisova et al. (1993, J. Virol. 67:3696)は、p r e S 1 および H B s A g エピトープをこの領域に挿入することができ、キメラ粒子により成功した免疫誘導を報告した。

#### 【 0 0 1 0 】

複数のH B V 抗原を同時に標的とする目的とした多価ワクチン候補もまた、調査されてきた。特に、エンベロープタンパク質、コアタンパク質およびポリメラーゼタンパク質に存在する複数の細胞傷害性Tリンパ球（C T L）エピトープおよびヘルパーTリンパ球（H T L）エピトープの融合ポリペプチドをコードするポリエピトープD N A ワクチンは、前臨床マウスモデルにおいて複数のC T L 応答およびH T L 応答を引き出すことが示されている(Depla et al., 2008, J. Virol. 82:435)。H B s A g 、H B c A g およびH B V ポリメラーゼをコードするD N A プラスミドの混合物の基づくワクチン処方物がいくつか開発され (W O 2 0 0 5 / 0 5 6 0 5 1 ; W O 2 0 0 8 / 0 2 0 6 5 6 )、それらの処方物は、慢性B型肝炎のトランスジェニックマウスモデルにおいて特異的な抗H B V 細胞性応答および体液性応答を明らかに示した(Chae Young Kim et al., 2008, Exp. Mol. Medicine 40:669)。第1相臨床試験は、韓国においてH B V 保菌者でラミブジン治療との併用で開始された(Yang et al., 2006, Gene Ther. 13:1110)。

10

20

#### 【 0 0 1 1 】

従って、より強くかつ効果的に免疫応答、特に、細胞性免疫応答をH B V 慢性感染患者などのそれを必要とする個体において誘導するための代替免疫治療アプローチの必要性がなお存在する。さらに、安定かつ持続的にH B V 抗原を発現することが可能なベクターに基づく組成物を提供する必要性がある。

#### 【 0 0 1 2 】

この技術的問題は、特許請求の範囲に定義される実施形態が提供されることによって解決される。

本発明の他の態様、特徴および利点ならびにさらなる態様、特徴および利点は、本発明の現在の好ましい実施形態についての次の説明から明らかとなる。これらの実施形態は開示を目的として示している。

30

#### 【 発明の概要 】

#### 【 0 0 1 3 】

従って、第1の態様において、本発明は、少なくとも1つのポリペプチドまたは該少なくとも1つのポリペプチドをコードする核酸分子を含んでなる免疫原性組成物であって、前記少なくとも1つのポリペプチドが、

( i ) 第1のH B V ウィルスに由来するポリメラーゼタンパク質の少なくとも450個のアミノ酸残基を含んでなるポリメラーゼ部分；

( i i ) 第2のH B V ウィルスに由来するコアタンパク質の少なくとも100個のアミノ酸残基を含んでなるコア部分；および

( i i i ) 第3のH B V ウィルスに由来するH B s A g タンパク質の連続した15～100個のアミノ酸残基の1以上の免疫原性ドメインを含んでなるe n v 分；または

該ポリメラーゼ部分、該コア部分、該e n v 部分、該ポリメラーゼ部分をコードする該核酸分子、該コア部分をコードする該核酸分子および/または該e n v 部分をコードする該核酸分子の任意の組合せ

40

からなる群から選択される、免疫原性組成物を提供する。

#### 【 0 0 1 4 】

#### 定義

本出願全体を通じて本明細書において用いられるように、「1つの(a)」および「1つの(an)」とは、特に断りがない限り、それらの用語が「少なくとも1つ」、「少なくとも

50

最初」、「1つ以上」または「複数」の参照される化合物または工程を意味するという意味で用いられる。例えば、「1つの細胞(a cell)」という用語は、複数の細胞を含み、その混合物を含む。

#### 【0015】

「および／または」とは、本明細書において用いられる場合には必ず、「および」、「または」および「該用語によってつながれる要素の総てまたは任意の他の組合せ」の意味を含む。

#### 【0016】

本明細書において用いられる「約」または「およそ」とは、所定の値または範囲の10%以内、好ましくは8%以内、より好ましくは5%以内を意味する。

10

#### 【0017】

本明細書において、生成物、組成物および方法を定義するために用いられる場合には、「含んでなる(comprising)」(および含んでなる(comprising)の任意の形態、「含んでなる(comprise)」および「含んでなる(comprises)」など)、「有する(having)」(および有する(having)の任意の形態、「有する(have)」および「有する(has)」など)、「含む(including)」(および含む(including)の任意の形態、「含む/includes」)および「含む(include)」など)または「含む(containing)」(および含む(containing)の任意の形態、「含む(contains)」および「含む(contain)」など)とは、オープンエンドであり、追加の、記載されていない要素または方法工程を排除しない。「から本質的になる」は、本質的に重要な他の成分または工程を排除することを意味する。よって、記載された成分から本質的になる組成物は、微量の汚染物および薬学上許容されるビヒクルを排除するものでない。「からなる」は、他の成分または工程の微量とはいえない量の要素を排除することを意味する。例えば、ポリペプチドが記載されたアミノ酸配列の他にアミノ酸を含まない場合には、該ポリペプチドは該アミノ酸配列「からなる」。そのようなアミノ酸配列が最終的にはほんの数個の追加アミノ酸残基とともに存在する場合には、該ポリペプチドは該アミノ酸配列「から本質的になる」。アミノ酸配列がポリペプチドの最終的なアミノ酸配列の少なくとも一部である場合には、該ポリペプチドは該アミノ酸配列を「含んでなる」。そのようなポリペプチドは、数個～数百個までの追加アミノ酸残基を有していてよい。

20

#### 【0018】

「アミノ酸」、「残基」および「アミノ酸残基」という用語は、同義語であり、天然アミノ酸だけでなくアミノ酸類似体(例えば、非天然アミノ酸、合成アミノ酸および改変アミノ酸、D型またはL型光学異性体を含む)も包含する。

30

#### 【0019】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」とは、ペプチド結合によって結合された9個以上のアミノ酸を含んでなるアミノ酸残基のポリマーを言及するために本明細書において互換的に用いられる。そのポリマーは、線状、分岐状または環状であり、天然に存在するものおよび／またはアミノ酸類似体を含んでなってよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。一般的には、そのアミノ酸ポリマーが長い(例えば、50個より多いアミノ酸残基)場合には、好ましくは、ポリペプチドまたはタンパク質と呼ばれ、一方、50個のアミノ酸より多いまたは少ない場合には、「ペプチド」と呼ばれる。

40

#### 【0020】

本発明に関連して、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」および「ヌクレオチド配列」とは、互換的に用いられ、ポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)(例えば、cDNA、ゲノムDNA、プラスミド、ベクター、ウイルスゲノム、単離DNA、プローブ、プライマーおよびそれらの任意の混合物)またはポリリボヌクレオチド(RNA)分子(例えば、mRNA、アンチセンスRNA)またはポリリボヌクレオチド・ポリデオキシリボヌクレオチド混合物のいずれかの任意の長さのポリマーを定義する。それらは、一本鎖または二本鎖、線状または環状、天然または合成のポリヌクレオチドを包含する。さらに、ポリヌクレオチドは、天然に存在しないヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレ

50

オチドおよびヌクレオチド類似体などを含んでなってよく（改変の例としては、米国特許第5,525,711号、同第4,711,955号またはEPA302175参照）、非ヌクレオチド成分によって中断されていてもよい。存在する場合には、ヌクレオチドに対する改変は、重合の前または後に行われ得る。

#### 【0021】

本明細書において、「免疫原性組成物」とは、下に記載される1種、2種、3種、4種またはそれ以上の成分（例えば、前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分、前記e n v部分、前記ポリメラーゼ部分をコードする核酸分子、前記コア部分をコードする核酸分子および／または前記e n v部分をコードする核酸分子）と、所望により、他の成分（例えば、アジュvant、担体、希釈剤など）を含んでなる処方物を意味する。本発明の免疫原性組成物は、一般には、宿主生物に投与することが可能な形態のものであり、抗H B V免疫を誘導するまたは刺激するのに十分な防御的または治療的免疫応答を誘導し、結果として、治療上の利益をもたらす（例えば、H B V感染を予防する、H B V感染によって引き起こされるかまたはそれに関連する少なくとも1つの病態を軽減するおよび／または改善する（例えば、ウイルス量を減らす、肝硬変または肝臓癌などの肝臓病変の危険性を減らすまたは遅らせる、肝臓病歴を改善するなど）、および／または血清H B e A gレベルまたはH B s A gレベルまたは両方を下げる、および／またはH B e 血清変換、H B s 血清変換または両方を誘導するおよび／または別の抗H B V療法または予防の有効性を高めるなど）。宿主生物に導入することによって、本発明の免疫原性組成物は、限定されるものではないが、抗体および／またはサイトカインの産生および／または細胞傷害性T細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、抗原提示細胞、ヘルパーT細胞、樹状細胞、N K細胞の活性化を含む免疫応答を引き起こすことが可能であり、少なくとも1つのH B V抗原／エピトープに対する先天性免疫応答および／または特異的体液性免疫応答および／または細胞性免疫応答の產生に至る。

#### 【0022】

「免疫原性ドメイン」とは、抗体またはT細胞受容体が結合可能なH B Vタンパク質構造部分を意味する。一般には、そのような免疫原性ドメインは、1以上のBエピトープおよび／またはTエピトープ、特に、C T LエピトープまたはT<sub>H</sub>エピトープまたは両方を含み、特定の抗体による認識、またはM H C（主要組織適合遺伝子複合体）に関しては、T細胞受容体による認識に関与する。「エピトープ」は、全体として、抗体、T細胞受容体またはH L A分子によって認識される部位を形成する最小のペプチドモチーフ（通常、9～11個のアミノ酸残基のセット）に相当する。それらの残基は、連続したものであってよく（線状エピトープ）またはそうでなくてもよい（互いに直接隣接しない残基を含む立体構造エピトープ）。T細胞によるT細胞エピトープの認識は、一般的に、抗原提示細胞で発現されるクラスIまたはクラスII M H C分子と結合された抗原のペプチドフラグメントをT細胞が認識する機構によると考えられている。

#### 【0023】

本明細書において、「H B V」および「B型肝炎ウイルス」は互換的に用いられ、ヘパドナウイルス科の任意のメンバーを指す（例えば、Ganem and Schneider in Hepadnaviridae (2001) "The viruses and their replication" (pp2923-2969), Knipe DM et al.編 Fields Virology, 第4版. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkinsまたは後続の版参照）。広範囲にわたる系統発生解析によって、B型肝炎ウイルスは8種の主要遺伝子型（A～H）に分類されており、それらの遺伝子型は少なくとも8%まで配列分岐を示す。それぞれのH B V遺伝子型は特異な地理的分布を示し、異質の病徵および／または臨床転帰を示し得る。それぞれのH B Vは、H B s A g関連血清学に関連して9種の異なるサブタイプ（a y w 1、a y w 2、a y w 3、a y w 4、a y r、a d w 2、a d w 4、a d r q + およびa d q r -）に分類された（Mamum-Al Mahtab et al., 2008, Hepatobiliary Pancrease Dis Int 5:457; Schaeffer, 2007, World Gastroenterol. 7:14; Norder et al., 1993, J. Gen Virol. 74:1341による総説参照）。各遺伝子型および血清型は、異なるH B V系統および分離株を包含している。分離株は、特定H B V源（例えば、患者

10

20

30

40

50

サンプルまたは他の生物学的H B Vリザーバー)から単離された特異的なウイルスに相当するが、系統は、ゲノム配列に関して互いに非常に近い種々の分離株を包含している。

#### 【0024】

本発明に関連しての使用に適した複数のH B Vは、当技術分野において記載されており、特に、Genbankに存在する。遺伝子型Aの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、分離株H B - J I 4 4 4 A Fおよび系統H B - J I 4 4 4 A(受託番号A P 0 0 7 2 6 3)が挙げられる。遺伝子型Bの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、クローンp J D W 2 3 3(受託番号D 0 0 3 2 9)、分離株H B V / 1 4 6 1 1(受託番号A F 1 2 1 2 4 3)、2 0 0 1年にHou, et al.によって同定されたH B V - B 1(GenBank受託番号A F 2 8 2 9 1 7 . 1)、Zhang et al.によって同定されたH B V系統W h u t j - 3 7(GenBank受託番号A Y 2 9 3 3 3 0 9 . 1)(2005, Arch, Virol. 150, 721-741)、He et al.によって同定されたC h i n e s e H B V系統G D H 1(GenBank受託番号A Y 7 6 6 4 6 3 . 1)およびJiang et al.によって同定されたH B V分離株5 7 - 1サブタイプadw(GenBank受託番号A Y 5 1 8 5 5 6 . 1)が挙げられる。遺伝子型Cの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、分離株A H - 1 - O N 9 8 0 4 2 4(受託番号A B 1 1 3 8 7 9)、系統H C C - 3 - T T(受託番号A B 1 1 3 8 7 7)、Fang et al.によって同定されたH B V分離株S W T 3 . 3(GenBank受託番号E U 9 1 6 2 4 1 . 1)、Zhu et al.によって同定されたH B V分離株H 8 5(GenBank受託番号A Y 3 0 6 1 3 6 . 1)、Tu et al.によって同定されたH B V系統C 1 2 4 8(GenBank受託番号D Q 9 7 5 2 7 2 . 1)、Wang et al.によって同定されたH B V分離株C H N - H 1 5 5(GenBank受託番号D Q 4 7 8 9 0 1 . 1)(2007, J. Viral Hepat 14, 426-434)およびZhou et al.によって同定されたH B V分離株G Z 2 8 - 1(GenBank受託番号E F 6 8 8 0 6 2)が挙げられる。遺伝子型Dの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、分離株K A M C H A T K A 2 7(受託番号A B 1 8 8 2 4 3)、A L T A Y 1 3 6(受託番号A B 1 8 8 2 4 5)およびStoll-Becker et al. (1997, J. Viro l 71:5399)に記載されている、Genbankにおいて受託番号Y 0 7 5 8 7で入手可能なY 0 7 5 8 7ならびに受託番号A B 2 6 7 0 9 0で記載されているH B V分離株が挙げられる。遺伝子型Eの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、分離株H B - J I 4 1 1 Fおよび系統H B - J I 4 1 1(受託番号A P 0 0 7 2 6 2)が挙げられる。遺伝子型Fの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、分離株H B V - B L 5 9 7(受託番号A B 2 1 4 5 1 6)およびH B V - B L 5 9 2(受託番号A B 1 6 6 8 5 0)が挙げられる。遺伝子型Gの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、分離株H B - J I 4 4 4 G Fおよび系統H B - J I 4 4 4 G(受託番号A P 0 0 7 2 6 4)が挙げられる。遺伝子型Hの典型的なH B Vとしては、限定されるものではないが、分離株H B V S T 0 4 0 4(受託番号A B 2 9 8 3 6 2)および分離株H B - J T 2 6 0 Fおよび系統H B - J I 2 6 0(受託番号A P 0 0 7 2 6 1)が挙げられる。しかしながら、本発明はこれらの典型的なH B Vに限定されない。実際には、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、異なるH B V分離株および遺伝子型の間で様々であり、この自然遺伝的変異だけでなく非自然変更(下に記載されるものなど)も本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0025】

本明細書において、「天然H B Vタンパク質」とは、自然界においてH B V源から見出され、単離され、得られ得る、研究室で人によって人工的に変更されたまたは変更されたものとは異なる、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチド(例えば、前記ポリメラーゼタンパク質、前記コアタンパク質または前記H B s A gなど)を意味する。よって、この用語は、特に断りのない限り、天然に存在するH B Vタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含む。自然界におけるそのようなH B V源としては、感染したまたはH B Vに曝されたことのある対象から採取された生体サンプル(例えば、血液、血漿、血清、精液、唾液、組織切片、生検材料など)、培養細胞(例えば、H e p G 2 . 2 . 1 5 、H u H 6 5 0

- C 1 5 (Sureau et al., 1986, Cell 47:37; Sells et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84(4):1005) ; Hu H 7 . T A 6 1 または Hu H 7 . T A 6 2 (Sun et al., 2006, J Hepatol. 45(5):636)、組織培養物ならびに組換え材料が挙げられる。組換え材料としては、限定されるものではないが、HBV分離株（例えば、寄託機関で入手可能）、HBVゲノム、ゲノムRNAライブラリーまたはcDNAライブラリー、HBVゲノムまたはそのフラグメントを含むプラスミドまたはそのような要素を含むことが知られている任意の従来技術のベクターが挙げられる。

#### 【0026】

様々なHBVタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、専門データバンク（例えば、上述のもの）や文献（例えば、Valenzuela et al, 1980, The nucleotide sequence of the hepatitis B viral genome and the identification of the major viral genes (pp 57-70) in "Animal Virus Genetics"; B. Fields, et al. 編; Academic Press Inc., New York and Vaudin et al., 1988, J. Gen. Virol. 69: 1383参照）に見出すことができる。天然のポリメラーゼポリペプチド、コアポリペプチドおよびHBsAgポリペプチドの代表例は、それぞれ、配列番号1～3に示される（配列番号1は、HBV分離株Y07587の天然ポリメラーゼタンパク質のアミノ酸配列を示し、配列番号2は、HBV分離株Y07587の天然コアタンパク質のアミノ酸配列を示し、配列番号3は、HBV分離株Y07587の天然envelope(HBsAg)のアミノ酸配列を示す）。Y07587 HBVの天然のポリメラーゼ、コアおよびHBsAgをコードするヌクレオチド配列は、例示を目的として、それぞれ、配列番号4、配列番号5および配列番号6に示される。しかしながら、上述のように、HBVタンパク質はこれらの典型的な配列に限定されず、遺伝的変異は本発明の範囲に含まれる。

#### 【0027】

本明細書において、「部分」（例えば、ポリメラーゼ部分、コア部分および／またはenv部分）とは、本明細書において記載されるように研究室で人によって人工的に改変されたまたは変更された後、天然のHBVタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドから生じるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを意味する。「改変された」という用語は、1個以上のヌクレオチド／アミノ酸残基の欠失、置換または付加、これらの可能性の任意の組合せ（例えば、本発明の組成物によってコードされるHBV配列間の相同性を下げるための天然ヌクレオチド配列の変性、適当な制限部位の導入）ならびに非自然配置（例えば、2種以上のHBVタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドまたは部分／部分群の間の融合）を包含する。いくつかの改変が考えられる場合には、それらの改変は連続した残基および／または連続していない残基に関係し得る。改変は、当業者に公知の複数の方法（例えば、部位特異的突然変異誘発（例えば、Amersham (Les Ulis, France)のScutipator (商標) in vitro突然変異誘発システムを使用する）、PCR突然変異誘発、DNAシャッフリングなど）によっておよび化学合成技術（例えば、結果として合成核酸分子が得られる）によって起こすことができる。本発明によって考えられる改変は、コードされるHBVポリペプチドのアミノ酸配列を変更しないサイレント改変、ならびにコードされたポリペプチドに翻訳され、結果として、対応する天然配列と比べて改変されたアミノ酸配列をもたらす改変を包含する。「由来する」とは、分子の起源を特定するために用いられるが、分子を得る方法を限定するものではなく、例えば、化学合成手段または組換え手段でもよい。

#### 【0028】

好ましくは、本発明において使用されるHBV部分は各々、全長タンパク質またはその部分のいずれかと比べて、対応する天然HBVタンパク質と高度のアミノ酸配列同一性を保持する。2つのポリペプチド間の同一性パーセントは、それらの配列によって共有される同一位置の数の閑数であり、最適アライメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮する。アミノ酸配列間の同一性の割合を決定するために、当技術分野では、様々なコンピュータープログラムおよび数学アルゴリズムが利用可能であり、例えば、NCBIで利用可能なblastプログラム（例えば、Altschul et al

10

20

30

40

50

., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389; Altschul et al., 2005, FEBS J. 272:5101)などがある。同じことがヌクレオチド配列にも当てはまる。ヌクレオチド配列相同性を決定するためのプログラムも、専門データベース(GenbankまたはWisconsin Sequence Analysis Package)において利用可能であり、例えば、BESTFITプログラム、FASTAプログラムおよびGAPプログラムがある。

### 【0029】

例えば、下に記載される改変(例えば、酵素活性の低下など)に加えて、本発明の組成物に含まれるまたは本発明の組成物によってコードされるHBV部分のいずれかまたは総ては、特定の遺伝子型の代表であるように改変することができ、その結果、コンセンサスまたはニアコンセンサス配列(near consensus sequence)に相当するアミノ酸配列を含んでなる。コンセンサスまたはニアコンセンサス配列は、特定の遺伝子型の様々なHBVポリペプチドの配列アラインメント後に一般に決定される。

### 【0030】

本明細書において「組合せ」とは、本発明の免疫原性組成物に含まれるまたは本発明の免疫原性組成物によってコードされる成分の少なくとも2種と、様々な成分の起こり得るあらゆる配置とのあらゆる種類の組合せを指し、前記成分の2種または3種の場合が特に好ましい。これは、2つ以上のポリペプチドの混合物、2つ以上の核酸分子/ベクターの混合物、1つ以上のポリペプチドと1つ以上の核酸分子/ベクターの混合物、ならびに2つ以上の核酸分子の融合物を包含し、2以上のHBV部分を担持する単一ポリペプチド鎖を提供する(例えば、非自然配置)。

### 【0031】

好ましい実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分、前記env部分の少なくとも2つの組合せ、または前記ポリメラーゼ部分をコードする前記核酸分子、前記コア部分をコードする前記核酸分子および/または前記env部分をコードする前記核酸分子の少なくとも2つの組合せを含んでなる。本発明の特に好ましい組成物は、(i)本明細書において定義されるポリメラーゼ部分およびコア部分の組合せ、または前記ポリメラーゼ部分および前記コア部分をコードする核酸分子の組合せを含んでなる組成物；(ii)本明細書において定義されるコア部分およびenv部分の組合せまたは前記コア部分および前記env部分をコードする核酸分子の組合せを含んでなる組成物；および(iii)本明細書において定義されるポリメラーゼ部分、コア部分およびenv部分の組合せ、または前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分および前記エンベロープ部分をコードする核酸分子の組合せを含んでなる組成物からなる群から選択される。

### 【0032】

本明細書において「融合物」または「融合タンパク質」とは、単一ポリペプチド鎖での少なくとも2つのポリペプチド(またはそれらのフラグメント)の相互の組合せを意味する。好ましくは、様々なポリペプチド間の融合は、遺伝学的手段によって、すなわち、前記ポリペプチド各々をコードするヌクレオチド配列をインフレームで融合することによって行われる。「インフレームで融合される」とは、融合されたコード配列の発現によって、融合されたポリペプチドの各々の間に翻訳ターミネーターが存在しない單一タンパク質が生じるということを意味する。融合は、直接であっても(すなわち、間に追加のアミノ酸残基が存在しない)またはリンカーを通じてでもよい。リンカーが存在することによって、融合タンパク質の正確な形成、折りたたみおよび/または機能を容易にすることができる。本発明は、使用されるリンカー配列の形態、サイズまたは数によって制限されず、融合されるポリペプチド間の接合部にリンカー配列の複数のコピーを挿入することができる。本発明に従って好適なリンカーは、3~30個のアミノ酸長であり、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、アラニンおよび/またはプロリンなどのアミノ酸残基の反復から構成され(例えば、Wiederrecht et al., 1988, Cell 54, 841; Aumailly et al., 1990 FEBS Lett. 262, 82; およびDekker et al., 1993, Nature 362, 852参照)、例

10

20

30

40

50

えば、Ser-Gly-SerまたはGly-Ser-Gly-Ser-Glyリンカーである。

【0033】

本明細書において、「異種の疎水性配列」とは、疎水性のペプチド（Val残基、Leu残基、Ile残基、Met残基、Phe残基、Tyr残基およびTrp残基などの多数の疎水性アミノ酸残基を含むペプチド）を意味する。「異種の」とは、選択されるHBV部分の起源である天然のHBVタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドにとって異質である配列を意味する。それは、HBVウイルスにとって異質であるペプチド（例えば、麻疹ウイルスまたは狂犬病ウイルスのペプチド）またはウイルスゲノム内では通常見られない位置にあるHBVウイルスのペプチドとすることができます。異種疎水性配列は、N末端において、C末端においてまたはHBV部分内でインフレームで融合することができ、その配列によって、特に、ポリペプチド輸送に影響を与えることにより、ポリペプチド生産または精製を容易にしたり、半減期を延長したりする場合がある。本発明による好適な異種疎水性配列は、15～100個のアミノ酸長であり、高疎水性ドメインを含む。10

【0034】

本明細書において「ベクター」とは、発現ベクターおよび非発現ベクターの両方を意味し、ウイルスベクターならびに非ウイルスベクターを含む（染色体外ベクター（例えば、多コピーブラスミド）および宿主染色体中に組み込まれるように設計された組込みベクター）を含む）。本発明に関連して特に重要なのは、核酸分子をウイルスゲノム中に移入するためのベクター（いわゆるトランスファーべクター）、免疫療法で使用するベクター（すなわち、核酸分子を宿主生物に送達することが可能なベクター）ならびに様々な発現系または宿主生物において使用する発現ベクターである。20

【0035】

本明細書において、「ウイルスベクター」とは、ベクターDNAならびにそれから生成されたウイルス粒子を包含する。ウイルスベクターは、複製能を有するものであってよく、または複製欠損もしくは複製障害であるように遺伝的に障害があつてもよい。本明細書において用いられる「複製能を有する」とは、特定の宿主細胞（例えば、腫瘍細胞）においてより良好にまたは選択的に複製するように操作された複製選択的ウイルスベクターおよび制限増殖型ウイルスベクターを包含する。

【0036】

本明細書において、「調節配列」とは、所定の宿主細胞または生物体における核酸分子の発現（複製、重複、転写、スプライシング、翻訳、安定性および/または核酸またはその誘導体の1つ（すなわち、mRNA）の宿主細胞または生物体への輸送を含む）を可能にする、寄与するまたは調整する任意の配列を意味する。30

【0037】

本明細書において、「宿主細胞」とは、組織、器官または単離細胞における特定の組織化に関して何ら制限されることなく広く理解すべきである。そのような細胞は、独特的の細胞型のものまたは異なる細胞型の一群のものであってよく、細菌、下等真核細胞および高等真核細胞ならびに培養細胞株、初代細胞および増殖細胞を包含する。この用語は、本発明の組成物、核酸分子、ベクターまたは感染性ウイルス粒子のレシピエントであり得るまたはそのようなレシピエントであったことがある細胞およびそのような細胞の子孫を含む。40

【0038】

「宿主生物」とは、脊椎動物、特に、哺乳類種のメンバー、特に、家畜、農用動物、競技用動物、および靈長類（ヒトを含む）を意味する。好ましくは、宿主生物は、慢性HBV感染を患っている患者である。感染HBVは、本発明において使用される、第1のHBV、第2のHBVまたは第3のHBVの少なくとも1つと同じ遺伝子型または血清型のものであってよい。

【0039】

本明細書において、「単離された」とは、自然環境から取り出された（すなわち、本来会合している少なくとも1つの他の成分から分離された）、タンパク質、ポリペプチド、50

ペプチド、核酸分子、宿主細胞またはウイルスを意味する。

**【0040】**

本明細書において、「治療上有効な量」とは、H B V 感染またはH B V 感染によって引き起こされるかまたはそれに関連する任意の疾患または病態に通常伴う1以上の症状の緩和に十分な用量である。予防的使用に関する場合には、この用語は、H B V 感染の確立を妨げるまたは遅らせるのに十分な用量を意味する。「治療」組成物は、前記H B V 感染によって引き起こされるかまたはそれに関連する少なくとも1つの疾患または状態を軽減するまたは改善することを目的として、最終的には、本明細書において記載されるように1以上の従来の治療法（例えば、ヌクレオシド類似体またはヌクレオチド類似体での処置）と組み合わせて、設計され、H B V にすでに感染している宿主生物に投与される。例えは<sup>10</sup>、免疫応答を誘導するために治療上有効な量は、免疫系の活性化を引き起こす（例えば、結果として抗H B V 応答を進行させる）ために必要な量であり得る。「癌」とは、びまん性または限局性腫瘍、転移、癌性ポリープならびに前癌病変（例えば、肝硬変）を含む任意の癌性状態を包含する。

**【0041】**

本明細書において、「薬学上許容されるビヒクル」とは、医薬投与に適合する、あらゆる担体、溶媒、希釈剤、賦形剤、アジュバント、分散媒、コーティング、抗菌薬および抗真菌薬、および吸収遅延剤などを含むものとする。

**【0042】**

本発明に従って、本発明の組成物に含まれるまたは本発明の組成物によってコードされる、前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分および/または前記e n v 部分は、独立に、現在のところ確認されている任意のH B V 遺伝子型、系統または分離株（用語「H B V 」に関連して上に記載されたものなど）から生じ得るものである。さらに、そのポリメラーゼ部分、コア部分およびe n v 部分の各々は、天然の対応するH B V タンパク質からまたは改変H B V ポリペプチド（例えば、特定の遺伝子型の代表であるように改変されたもの）から生じ得るものである。よって、本発明の組成物に含まれるまたは本発明の組成物によってコードされる、ポリメラーゼ部分、コア部分およびe n v 部分の起源である第1のH B V ウィルス、第2のH B V ウィルスおよび第3のH B V ウィルスは、独立に、同じまたは異なる遺伝子型、血清型および/または分離株のものであってよい。例えば、2つまたは3つの異なるH B V 遺伝子型由来のH B V 部分を使用することによって広範囲のH B V 遺伝子型に対して防御を提供することが可能である。<sup>20</sup><sup>30</sup>

**【0043】**

一実施形態では、この地域に固有のH B V 遺伝子型の少なくとも1つのH B V 部分を使用することによって、本発明の免疫原性組成物を特定の地理的領域に適合させることにも注目することができる。例示を目的として、米国では遺伝子型AおよびCが最も多いが、一方で、西欧諸国の患者は遺伝子型AおよびDに大半が感染し、地中海沿岸の患者は遺伝子型Dに感染する。インドの限られたデータからは、インドでは遺伝子型AおよびDが最も一般的であることが示唆される。もう一方で、中国では遺伝子型BおよびCが最も多い。例えば、欧洲諸国に向けられる本発明の組成物は、遺伝子型A由来のポリメラーゼ部分と遺伝子型D由来のコア部分およびe n v 部分を含んでなることができ、逆もまた同じである。あるいは、そのポリメラーゼ部分およびコア部分は遺伝子型Aのものであってよく、e n v 部分は遺伝子型Dのものであってよい。別の例として、欧洲諸国およびU S A に向けられる本発明の組成物は、独立に、遺伝子型A、CおよびDを由来とする、ポリメラーゼ部分、コア部分およびe n v 部分を含んでなることができる。もう一方で、中国に向けられる本発明の組成物は、独立に、遺伝子型Bおよび/またはCを由来とする、ポリメラーゼ部分、コア部分およびe n v 部分を含んでなることができる、またはコードすることができる。<sup>40</sup>

**【0044】**

また、本発明の免疫原性組成物は、治療しようとする患者の集団に適合させることもできる。例えば、アメリカ系白人およびアフリカ系アメリカ人および性行為H B V 感染を有<sup>50</sup>

する人の間では遺伝子型 A がより一般的であるが、もう一方で、アジア系アメリカ人、アジアで生まれた患者および H B V 感染母系新生児伝播を受けた人の間では遺伝子型 B および C が一般的である。H B V 遺伝子型はまた、異なる臨床転帰にも関連しており (Schaeffer et al., 2005, J. Viral. Hepatitis 12:111)、遺伝子型 D および F は遺伝子型 A よりも重篤な疾患進行および不良な予後に関連している (Sanchez-Tapias et al., 2002, Gastroenterology 123:1848)。適当な H B V 遺伝子型、血清型、系統および / または分離株を選択することによって、治療しようとする集団および / または地理的領域に応じて本発明の組成物を適合させることは、当業者の能力の範囲内である。

#### 【 0 0 4 5 】

有利な実施形態によれば、第 1 の H B V ウィルス、第 2 の H B V ウィルスおよび第 3 の H B V ウィルスの少なくとも 2 つ、好ましくは全てが、同じ H B V 遺伝子型、特に遺伝子型 D のものである。独立して、それらは同じ分離株を起源とするものであってよく、第 1 の H B V ウィルス、第 2 の H B V ウィルスおよび第 3 の H B V ウィルスが H B V 分離株 Y 0 7 5 8 7 のものであることが特に好ましい。好ましくは、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列または少なくとも 4 5 0 個のアミノ酸残基を含んでなるその部分と、少なくとも 8 0 % の同一性、有利には少なくとも 8 5 % の同一性、好ましくは少なくとも 9 0 % の同一性、より好ましくは少なくとも 9 5 % の同一性、さらに好ましくは 1 0 0 % 同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる。あるいはまたは組み合わせて、本発明において使用されるコア部分は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列または少なくとも 1 0 0 個のアミノ酸残基を含んでなるその部分と、少なくとも 8 0 % の同一性、有利には少なくとも 8 5 % の同一性、好ましくは少なくとも 9 0 % の同一性、より好ましくは少なくとも 9 5 % の同一性、さらに好ましくは 1 0 0 % 同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる。あるいはまたは組み合わせて、本発明において使用される e n v 部分の 1 以上の免疫原性ドメインは、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列内の 1 5 ~ 1 0 0 個のアミノ酸残基からなる部分と、少なくとも 8 0 % の同一性、有利には少なくとも 8 5 % の同一性、好ましくは少なくとも 9 0 % の同一性、より好ましくは少なくとも 9 5 % の同一性、さらに好ましくは 1 0 0 % 同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる。

10

20

#### 【 0 0 4 6 】

##### ポリメラーゼ部分

一実施形態によれば、本発明の組成物に含まれるまたは本発明の組成物によってコードされるポリメラーゼ部分は、対応する天然 H B V ポリメラーゼと比べて改変されている。

30

#### 【 0 0 4 7 】

適当な改変は、天然 H B V ポリメラーゼの N 末端に通常存在する、少なくとも 2 0 個のアミノ酸残基、多くとも 3 3 5 個のアミノ酸残基の末端切断である。この改変は、ポリメラーゼ部分とコア部分の間のオーバーラップ部分を減少させるまたは欠失させるために第 2 のポリペプチドも含んでなる本発明の組成物に特に関連する。本発明の組成物への末端切断を記載された範囲内、少なくとも 2 0 個のアミノ酸残基、多くとも 3 3 5 個のアミノ酸残基に適合させることは、当業者の能力の範囲内である。天然 H B V ポリメラーゼに対して、本発明に関連して使用されるポリメラーゼ部分は、有利には、少なくとも 3 0 個のアミノ酸残基、多くとも 2 0 0 個のアミノ酸残基だけ、望ましくは少なくとも 3 5 個のアミノ酸残基、多くとも 1 0 0 個のアミノ酸残基だけ、好ましくは少なくとも 4 0 個のアミノ酸残基、多くとも 6 0 個のアミノ酸残基だけ、より好ましくは少なくとも 4 5 個、多くとも 5 0 個のアミノ酸残基だけ末端切断されており、末端切断部が、天然 H B V ポリメラーゼの N 末端に位置する開始 M e t 残基に続いて、最初の 4 7 個または 4 6 個のアミノ酸残基を含むことが特に好ましい。好ましくは、末端切断部は、配列番号 1 の 1 番 ( M e t 開始部 ) または 2 番 ~ 4 7 番まで及ぶ。

40

#### 【 0 0 4 8 】

好ましい実施形態は、およそ 4 8 番 ~ よおよそ 8 3 2 番まで及ぶ配列番号 1 に示されるアミノ酸配列の部分と少なくとも 8 0 % の同一性、有利には少なくとも 8 5 % の同一性、好ましくは少なくとも 9 0 % の同一性、より好ましくは少なくとも 9 5 % の同一性、さらに

50

好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分；さらに好ましくは、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分に関する。

#### 【0049】

あるいはまたは組み合わせて、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、天然HBVポリメラーゼに対して、低下した逆転写酵素（RTアーゼ）活性を示すように改変されている。有利には、前記RTアーゼ活性低下は、RTアーゼ酵素活性に関与するドメイン中に1つ以上の突然変異が存在することによってもたらされる。

10

#### 【0050】

HBVポリメラーゼの構造的および機能的組織化は、20年ほど前に調査された（例えば、Radziwill et al., 1990, J. Virol. 64:613参照）。HBVポリメラーゼは、HBV複製の主要工程（プライミング、DNA合成およびRNA鑄型の除去）を触媒する3つの機能ドメインと、非必須スペーサーを有する多機能タンパク質であり、機能ドメインと非必須スペーサーは次の順序で配置されている。

- ・第1のドメインは、1番～およそ177番まで及んでおり、HBV末端タンパク質の活性に関与しており、
- ・スペーサーは、およそ178番～およそ335番に位置しており、
- ・DNAポリメラーゼドメインは、およそ336番～およそ679番に及んでおり、RTアーゼ活性に関与しており、および
- ・RNアーゼHドメインは、およそ680番～C末端（およそ832番）であり、RNアーゼH活性に関連している。

20

#### 【0051】

4つの残基は、モチーフ「YMDD」（Tyrosine残基、Methionine残基、Asparagine残基およびAspartate残基の場合）を形成し、RTアーゼ活性に関連していた。そのモチーフは、天然HBVポリメラーゼのおよそ538番～およそ541番に一般的に存在している（例えば、配列番号1の538番、539番、540番および541番に、および配列番号7の492番、493番、494番および495番に相当する）。本発明は、免疫原性を保持しながら、RTアーゼ活性の大幅な低下（すなわち、少なくとも10倍の低下）または除去と相関する、RTアーゼドメイン中のこのモチーフまたはその他の場所における任意の突然変異を包含する。好適なRTアーゼ欠損ポリメラーゼ変異株の代表例は、文献に、例えば、Radziwill et al. (1990, J. Virol. 64:613)、Bartenschlager et al. (1990, J. Virol. 64:5324) およびJeong et al. (1996, Biochem Biophys Res Commun. 223(2):264) に記載されている。好ましくは、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、YMDDモチーフの最初のAsp残基（配列番号1の540番に、および配列番号7の494番に相当する）の、または天然HBVポリメラーゼの相当位置に位置するアミノ酸残基の、Asp以外の任意のアミノ酸残基への置換を含んでなり、His残基への置換（D540H突然変異）が特に好ましい。RTアーゼ活性の低下または除去は、当技術分野で周知のアッセイ（例えば、Radziwill et al., 1990, J. Virol. 64:613に記載されている内因性ポリメラーゼアッセイ）を用いて行うことができる。

30

#### 【0052】

あるいはまたは組み合わせて、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、天然HBVポリメラーゼよりも低いRNアーゼH酵素活性を示すように改変されている。有利には、前記RNアーゼH活性低下は、RNアーゼH酵素活性に関与するドメイン中に1つ以上の突然変異が存在することによってもたらされる。上述のように、RNアーゼH活性に関連している機能ドメインは、HBVポリメラーゼのC末端部分内に、より詳しくは、680番～C末端の832番までマッピングされた。本発明は、RNアーゼH活性の大幅な低下（すなわち、少なくとも10倍の低下）または除去と相関する、免疫原性に有害ではない、このドメイン中にある任意の突然変異を包含する。好適なRNアーゼH欠損ポリメ

40

50

ラーゼ変異株の代表例は、文献に、例えば、Radziwill et al. (1990, J. Virol. 64:613)、Bartenschlager et al. (1990, J. Virol. 64:5324)に記載されている。好ましくは、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、配列番号1の718番に、および配列番号7の672番に相当するG1u残基の、または天然HBVポリメラーゼの相当位置に位置するアミノ酸残基の、G1u以外の任意のアミノ酸残基への置換を含んでなり、His残基への置換(E718H突然変異)が特に好ましい。RNアーゼH活性の低下または除去は、当技術分野で周知のアッセイ(例えば、Radziwill et al., 1990, J. Virol. 64:613またはLee et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 233(2):401に記載されているin vitro RNアーゼH活性アッセイまたはDNA-RNAタンデム分子分析)を用いて行うことができる。

10

#### 【0053】

好ましくは、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、RTアーゼおよびRNアーゼの両方の活性を低下させるまたは除去するために突然変異されており、これらの酵素機能に関連して上述の改変を含んでなり、突然変異D540HおよびE718Hが特に好ましい。

#### 【0054】

本発明の好ましい実施形態は、配列番号8に示されるアミノ酸配列と、または494番のAsp残基のHis残基への置換および672番のG1u残基のHis残基への置換を含む配列番号7に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなるポリメラーゼ部分に関する。

20

#### 【0055】

別の好ましい実施形態では、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、合成および/または安定性および/または発現宿主細胞の表面での提示および/または宿主のMHCクラスIおよび/またはMHCクラスII抗原への提示を改善するために異種の疎水性配列とインフレームで融合されている。好適な異種の疎水性配列としては、分泌経路のポリメラーゼ部分の標的化を可能にするシグナルおよび/またはトランスマンプランペプチドなどの配列が挙げられる。そのようなペプチドは当技術分野で公知である。簡潔には、シグナルペプチドは、膜提示されたまたは分泌されたポリペプチドのN末端に一般的に存在し、それらは小胞体(ER)の通過を開始する。シグナルペプチドは、15~35個の本質的に疎水性のアミノ酸を含んでなり、シグナルペプチドは、その後、成熟ポリペプチドを与えるために特異的なER局在性エンドペプチダーゼによって取り除かれる。トランスマンプランペプチドは、通常高疎水性の性質であり、ポリペプチドを細胞膜につなぎ留める働きをする(例えば、Branden and Tooze, 1991, Introduction to Protein Structureの202-214頁, NY Garland; WO 99/03885参照)。本発明に関連して使用することができるトランスマンプランおよび/またはシグナルペプチドの選択は広い。それらのペプチドは、任意の膜係留型および/または分泌型ポリペプチド(例えば、細胞ポリペプチドまたはウイルスポリペプチド)、例えば、免疫グロブリン、組織プラスミノーゲン活性化因子(tissue plasminogen activator)、インスリン、狂犬病糖タンパク質、HIVウイルスエンベロープ糖タンパク質または麻疹ウイルスFタンパク質のものなどから得ることができ、または合成したものでもよい。シグナルペプチドの好ましい挿入部位は、翻訳開始のためのコドンのN末端下流であり、トランスマンプランペプチドの好ましい挿入部位は、C末端、例えば、停止コドンのすぐ上流である。さらに、リンクーペプチドを使用して、シグナルおよび/またはトランスマンプランペプチドをポリメラーゼ部分と連結することもできる。

30

#### 【0056】

他の疎水性配列も本発明に関連して使用することができ、例えば、HBsAgを含む、エンベロープタンパク質または膜結合タンパク質中に一般的に存在するものである。本発

40

50

明に関連して特に興味深いのは、ポリメラーゼ部分と、本明細書において記載される免疫原性ドメイン( env 1、env 2、env 3 および / または env 4 )の 1 以上との融合物であり、それらの免疫原性ドメインは疎水性を有するものである。1 以上の疎水性ドメインを、N 末端において、C 末端においてまたはポリメラーゼ部分内でインフレームで融合することができる。

#### 【 0 0 5 7 】

好ましくは、本発明に関連して、本発明において使用されるポリメラーゼ部分は、狂犬病糖タンパク質のシグナルおよびトランスマンプランペプチドとインフレームで融合されている。添付の実施例の節において例示するように、前記狂犬病シグナル配列は、N 末端においてインフレームで融合され、前記狂犬病トランスマンプラン配列は、前記ポリメラーゼ部分の C 末端においてインフレームで融合される。最も好ましい実施形態は、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と、少なくとも 80 % の同一性、有利には少なくとも 85 % の同一性、特に少なくとも 90 % の同一性、好ましくは少なくとも 95 % の同一性、より好ましくは 100 % 同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなるポリメラーゼ部分に関する。

10

#### 【 0 0 5 8 】

##### コア部分

あるいはまた、上記の組成物と組み合わせて、本発明はまた、第 2 の HBV に由来するコア部分を含んでなる組成物を提供する。HBV ウィルスに関連して本明細書において記載されるように、本発明において使用されるコア部分は、ポリメラーゼ部分の起源である HBV ウィルスと同じまたは異なる HBV を起源とする。好ましくは、コア部分およびポリメラーゼ部分は両方とも遺伝子型 D HBV を起源とし、Y07587 HBV 分離株あるいは、中国で多い HBV 遺伝子型（例えば、遺伝子型 B または C）のものが特に好ましい。

20

#### 【 0 0 5 9 】

一実施形態によれば、本発明において使用されるコア部分は、天然 HBV コア（例えば、配列番号 2 に示されるもの）または対応する天然 HBV コアと比べて改変されたコアであってよく、そのコア部分は、コアタンパク質の少なくとも 100 個のアミノ酸残基を保持し、コア部分が、120 ~ 180 個のアミノ酸残基、望ましくは 125 ~ 148 個のアミノ酸残基、好ましくは 130 ~ 143 個のアミノ酸残基（例えば、およそ 140 個のアミノ酸残基）を含んでなることが特に好ましい。

30

#### 【 0 0 6 0 】

適当な改変は末端切断である。望ましくは、その末端切断は、天然 HBV コアの C 末端にまたは C 末端部分（すなわち、最後の 40 個のアミノ酸残基を包含する部分）内に通常存在する、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、多くとも 40 個のアミノ酸残基を包含する。この改変は、ポリメラーゼ部分とコア部分の間のオーバーラップ部分を減少させるまたは欠失させるためにポリメラーゼ部分も含んでなる本発明の組成物に特に関連する。この改変は、コアのこの領域内の NLS（核局在化シグナル）の欠失および / または HBV ポリメラーゼとの相互作用の阻害にも関連し得る。本発明の組成物の末端切断を記載された範囲内、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、多くとも 40 個のアミノ酸残基に適合させることは、当業者の能力の範囲内である。適当な末端切断部には、天然 HBV コアの C 末端にまたはその C 末端部分内に通常存在する、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、16 個、17 個、18 個、19 個、20 個、21 個、22 個、23 個、24 個、25 個、26 個、27 個、28 個、29 個、30 個、31 個、32 個、33 個、34 個、35 個、36 個、37 個、38 個、39 個または 40 個の連続したアミノ酸残基が含まれる。天然 HBV コアに対して、本発明に関連して使用されるコア部分は、有利には、天然 HBV の C 末端にまたは C 末端部分内に位置する、少なくとも 20 個のアミノ酸残基、多くとも 40 個のアミノ酸残基が、好ましくは少なくとも 30 個のアミノ酸残基、多くとも 38 個のアミノ酸残基が、より好ましくは少なくとも 34 個のアミノ酸残基、多くとも 37 個のアミノ酸残基が末端切断され、末端切断部が、天然 HBV コアの最後の 35 個のア

40

50

ミノ酸残基を含むことが特に好ましい（言い換えれば、その末端切断部はコアポリペプチドのおよそ149番～C末端まで及ぶ）。

#### 【0061】

特に興味深いのは、1番～およそ148番まで及ぶ配列番号2に示されるアミノ酸配列の部分と少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなるコア部分、さらに好ましくは、配列番号10に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなるコア部分である。

10

#### 【0062】

あるいはまたは組み合わせて、コア部分は、天然HBVコアに対して、HBVエンベロープタンパク質について低下した認識および/または相互作用を示すように改変されている。有利には、前記認識/相互作用低下は、コア粒子の表面上に露出した外側ループを形成すると予測される残基80付近の、内部に位置する領域中に1つ以上の突然変異が存在することによってもたらされる(Argos et al., 1988, EMBO J. 7:819)。エンベロープタンパク質についての認識または相互作用の低下または除去は、当技術分野で周知のアッセイ(Seitz et al., 2007, EMBO J., 26:416またはPonsel et al., 2003, J. Virol. 77(1):416に記載のとおり、電子顕微鏡、細胞におけるヌクレオカプシド形成の解析、HuH7における一過性トランスフェクション後のビリオン分泌など)を用いて行うことができる。

20

#### 【0063】

好ましい改変は、およそ75番からおよそ85番までに及ぶ(配列番号2および配列番号10の残基75～85に相当する)、コアの領域中の1個以上のアミノ酸残基の欠失を含んでなり、およそ77番からおよそ84番までに及ぶ(配列番号2および配列番号10の残基77～84に相当する)、コア部分の部分の欠失が特に好ましい。好ましいコア部分は、配列番号11に示されるアミノ酸配列と、または配列番号2に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなり、残基77～84を欠失している。

30

#### 【0064】

##### E n v 部分

あるいはまたは上記の組成物と組み合わせて、本発明はまた、env部分を含んでなる組成物を提供する。前記env部分は、第3のHBVウイルス由来のHBsタンパク質中に存在する少なくとも15個の連続したアミノ酸残基の1つ以上の免疫原性ドメインを含んでなる。好ましくは、前記免疫原性ドメインの各々は、HBsAgタンパク質(天然のものまたは改変されたもの(例えば、特定の遺伝子型の代表である改変されたもの)のいずれか)中に存在する少なくとも20個のアミノ酸、多くとも100個のアミノ酸の一部に相当する。免疫原性ドメインの各々は、コア部分およびポリメラーゼ部分の起源であるHBVウイルスと同じであってもまたは異なっていてもよい同じまたは異なるHBVウイルスを起源とするものであってよい。好ましくは、env免疫原性ドメインは各々、遺伝子型D HBV、特に、Y07587 HBV分離株、あるいは、中国で多いHBV遺伝子型(例えば、遺伝子型BまたはC)を起源とするものである。

40

#### 【0065】

有利には、1つ以上の免疫原性ドメインの各々は、Tヘルパー(T<sub>H</sub>)細胞および/または細胞傷害性T(CTL)細胞に特異的なT細胞エピトープを含んでなり、それらは様々なMHCクラスIおよび/またはクラスII抗原(例えば、A2、A24、DR、DPなど)に拘束され得る。そのようなエピトープは当技術分野で記載されており(WO93/03764; WO94/19011; Desombere et al., 2000, Clin. Exp. Immunol. 1

50

22:390; Loirat et al., 2000, J. Immunol., 165:4748; Schirmbeck et al., 2002, J. Immunol. 168:6253; Depla et al., 2008, J. Virol. 82 :435 )、本明細書において記載される好適な免疫原性ドメインを、15～100個のアミノ酸残基の記載された範囲内で設計することは、当業者の能力の範囲内であり、そのような免疫原性ドメインには、天然envタンパク質（例えば、配列番号3に示されるもの）のBエピトープ、T<sub>H</sub>エピトープおよび/またはCTLエピトープが含まれる。好ましくは、本発明の組成物に含まれるまたは本発明の組成物によってコードされるenv部分は、pres1領域およびpres2領域由来の免疫原性ドメインを含まない。

#### 【0066】

本発明は、1つの免疫原性ドメインを含んでなるenv部分だけでなく、2つ、3つまたはそれ以上を含んでなるものも包含する。 10

#### 【0067】

望ましくは、本発明において用いられる1つ以上の免疫原性ドメインは、

- ・14～51番に及ぶenvタンパク質(HBsAg)の一部(env1ドメイン)；
- ・165～194番に及ぶenvタンパク質(HBsAg)の一部(env2ドメイン)；
- ・81～106番に及ぶenvタンパク質(HBsAg)の一部(env3ドメイン)；
- ・202～226番に及ぶenvタンパク質(HBsAg)の一部(env4ドメイン)；および
- ・それらの任意の組合せ

からなる群から選択される。 20

#### 【0068】

本発明における使用に特に好適な免疫原性ドメインは、配列番号12～15に示されるアミノ酸配列のいずれかと、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなる。 30

#### 【0069】

本発明に関連して、免疫原性ドメインの組合せは、本発明の組成物中の個々の免疫原性ドメインの混合物としてであってもまたは可能なあらゆる配置での2つ以上の免疫原性ドメイン間のインフレームでの融合物としてであってもよい（例えば、env1-env2、env2-env1、env1-env3、env3-env1、env1-env4、env4-env1、env2-env3、env3-env2、env2-env4、env4-env2、env3-env4、env4-env3、env1-env2-env3、env2-env1-env3、env1-env2-env4などの融合物または混合物）。さらに、その組合せは、その單一コピーまたはいくつかのコピー（例えば、env1-env2-env1、env1-env4、env1など）を含んでなってもよい。各免疫原性ドメイン間の融合は、直接であってもまたはリンカーを通じてでもよい。 40

#### 【0070】

本発明に関連して特に興味深いenv部分は、配列番号12～15に示される2つまたは3つの免疫原性ドメインの融合物を含んでなり、配列番号16に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなるenv1-env2融合物、または配列番号17に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなるenv1-env2-e 50

n v 4 融合物が特に好ましい。

**【0071】**

特定の実施形態によれば、本発明の組成物に含まれるまたは本発明の組成物によってコードされる、ポリメラーゼ部分、コア部分および／またはenv部分は、2つ1組でまたは全体として、インフレームで融合されていてよい。例えば、単一ポリペプチド鎖でのポリメラーゼ部分とenv部分の融合物を想定することができる。あるいは、コア部分とenv部分が、単一ポリペプチド鎖でインフレームで融合されていてもよい。この場合もまた、コード核酸配列は、直接またはリンカーを通じて融合されていてよい。有利には、env部分は、コア部分またはポリメラーゼ部分のC末端とインフレームで融合される。

**【0072】**

コア部分とenv部分との融合ポリペプチドの好ましい例は、

・配列番号18に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなるポリペプチド(core\*t-env1)；

・配列番号19に示されるアミノ酸配列と、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなるポリペプチド(core\*t-env1-env2)；および

・配列番号20に示されるアミノ酸配列と(core-env1-env2-env4)、または残基1で始まり残基251で終わる配列番号20に示されるアミノ酸配列の部分と(core-env1-env2)、または残基1で始まり残基221で終わる配列番号20に示されるアミノ酸配列の部分と(core-env1)、少なくとも80%の同一性、有利には少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、さらに好ましくは100%同一性を示すアミノ酸配列を含んでなる、あるいはそのアミノ酸配列から本質的になる、あるいはそのアミノ酸配列からなるポリペプチド；

またはコア部分において残基77～84を欠失しているそれらの欠失型

：からなる群から選択される。

**【0073】**

本発明に関連して、本発明の組成物に含まれるまたは本発明の組成物によってコードされる、ポリメラーゼ部分、コア部分および／またはenv部分は、さらなる改変をさらに含んでなってよい。好適な改変は、結果として生じるポリペプチドの合成、プロセシング、安定性および溶解度に有益であるもの（例えば、本明細書において記載される、潜在的切断部位、潜在的グリコシリ化部位および／または膜係留を改変することを目的としたもの）ならびに結果として生じる組成物の免疫原性に有益であるもの（例えば、免疫原性を増強することが可能な1種以上の化合物の組込みまたはそれらとの融合）である。免疫原性を増強することが可能なそのような化合物は文献に記載されており、それらの化合物には、限定されるものではないが、カルレティキュリン(Cheng et al., 2001, J. Clin. Invest. 108:669)、結核菌(Mycobacterium tuberculosis)熱ショックタンパク質70(HSP70)(Chen et al., 2000, Cancer Res. 60:1035)、ユビキチン(Rodriguez et al., 1997, J. Virol. 71:8497)、細菌毒素、例えば、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)外毒素Aの転移ドメイン(ETA(dIII))(Hung et al., 2001 Cancer Res. 61:3698)ならびにTヘルパーエピトープ、例えば、Pan-Drペプチド(Sidney et al., 1994, Immunity 1:751)、pstS1-GCGエピトープ(Vordermeier et al., 1992, Eur. J. Immunol. 22:2631)、破傷風トキソイドペプチドP2TT(Panina-Bordignon et al., 1989, Eur. J. Immunol. 19:2237)およびP30TT(Demotz et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23:425)、インフルエンザエピトープ(Lamb et al., 1982, Nature 300:66)およびヘマグ

10

20

30

40

50

ルチニンエピトープ(hemagglutinin epitope)(Rothbard et al., 1989, Int. Immunol. 1: 479)がある。

#### 【0074】

##### 核酸分子

本発明はまた、本発明において使用される、ポリメラーゼ部分、コア部分およびenv部分を、独立にまたは組み合わせて、コードする単離核酸分子、ならびにそのような核酸分子を含んでなる組成物を提供する。

#### 【0075】

特に興味深いのは、

- ・本明細書において記載されるポリメラーゼ部分をコードする核酸分子(配列番号7、8、9のいずれかに示されるアミノ酸配列、または494番のAsp残基のHis残基への置換および672番のGlu残基のHis残基への置換を含む、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるものが特に好ましい)；
- ・本明細書において記載されるコア部分をコードする核酸分子(配列番号10または11に示されるアミノ酸配列を含んでなるものが特に好ましい)；
- ・本明細書において記載されるenv部分をコードする核酸分子(配列番号12～17のいずれかに示されるアミノ酸配列を含んでなるものが特に好ましい)；および
- ・本明細書において記載される融合されたコア部分・env部分をコードする核酸分子(配列番号18、19または20のいずれかに示されるアミノ酸配列、または残基1で始まり残基251で終わる配列番号20に示されるアミノ酸配列の部分(core-env1-env2)、または残基1で始まり残基221で終わる配列番号20に示されるアミノ酸配列の部分(core-env1)；または配列番号20のコア残基77～84を欠失しているそれらの欠失型を含んでなるものが特に好ましい)；である。

#### 【0076】

望ましくは、本発明の核酸分子を、特定の宿主細胞または生物体、例えば、哺乳類、酵母(例えば、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、サッカロミセス・ポンベ(Saccharomyces pombe)またはピキア・パストリス(Pichia pastoris))または細菌(例えば、大腸菌(E. coli)、枯草菌(Bacillus subtilis)またはリステリア菌(Listeria))において高レベル発現を提供するために最適化してもよい。所定のアミノ酸をコードするために2つ以上のコドンが利用可能な場合には、生物体のコドン使用パターンは高度に非ランダムであることが実際に観察されており(例えば、Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111参照)、コドンの使用は、宿主によって著しく異なっている可能性がある(例えば、Nakamura et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24:214参照)。本発明において使用されるヌクレオチド配列は主にウイルス起源(HBV)のものであるため、これらの配列は、細菌、下等真核細胞または高等真核細胞などの宿主細胞において効率的発現には不適当なコドン使用パターンを示す可能性がある。一般に、コドン最適化は、目的の宿主細胞において使用頻度の低いコドンに相当する1つ以上の「天然の」(例えば、HBV)コドンを、使用頻度のより高い、同じアミノ酸をコードする1つ以上のコドンによって置き換えることによって行われる。発現の増加は部分的な置き換えでも成し遂げることができるため、使用頻度の低いコドンに相当する総ての天然コドンを置き換える必要はない。さらに、結果として生じる核酸分子への制限部位の導入に適合させるために、最適コドン使用頻度から多少逸脱してもよい。

#### 【0077】

コドン使用頻度の最適化に加え、宿主細胞または生物体における発現は、ヌクレオチド配列のさらなる改変を通じてさらに改善することができる。例えば、レアな非最適コドンのクラスターが集中した領域に存在しないようにおよび/または発現レベルに悪い影響を及ぼすと予想される少なくとも部分的に負の配列エレメントを抑制または改変するよう、本発明の核酸分子を改変することができる。そのような負の配列エレメントとしては、限定されるものではないが、GC含量が非常に高い(>80%)または非常に低い(<30%)

0 %) 領域; A T リッチ配列ストレッチまたは G C リッチ配列ストレッチ; 不安定な直接反復配列または逆方向反復配列; R N A 二次構造; および / または内部暗号調節エレメント、例えば、内部 T A T A ボックス、c h i 部位、リボソーム侵入部位および / またはスプライシングドナー部位 / スプライシングアクセプター部位などが挙げられる。本発明の別の実施形態は、本発明の核酸分子のフラグメント、例えば、制限エンドヌクレアーゼおよび P C R で生成されたフラグメントに関するものである。そのようなフラグメントは、第 1 のポリペプチドおよび / または第 2 のポリペプチドの免疫原性部分をコードする、プローブ、プライマーまたはフラグメントとして使用することができる。

## 【 0 0 7 8 】

本発明による好ましい核酸分子は、

- ・(配列番号 7 の末端切斷型 P o 1 をコードする) 配列番号 2 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子;
- ・(配列番号 8 の突然変異型 P o 1 をコードする) 配列番号 2 2 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子;
- ・(D 5 4 0 H 突然変異および E 7 1 8 H 突然変異の置換を含む、配列番号 7 の末端切斷型 P o 1 をコードする) 1 4 8 0 番の G ヌクレオチドの C への置換、2 0 1 4 番の G ヌクレオチドの C への置換、および 2 0 1 6 番の A ヌクレオチドの T への置換を含む、配列番号 2 1 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子;
- ・(配列番号 9 の末端切斷型 P o 1 - T M R および突然変異型 P o 1 - T M R をコードする) 配列番号 2 3 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子;
- ・(配列番号 1 8 の c o r e \* t - e n v 1 をコードする) 配列番号 2 4 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子;
- ・(配列番号 1 9 の c o r e \* t - e n v 1 - e n v 2 をコードする) 配列番号 2 5 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子; および
- ・(配列番号 2 0 の c o r e - e n v 1 - e n v 2 - e n v 4 をコードする) 配列番号 2 6 に示されるヌクレオチド配列と、または(c o r e - e n v 1 - e n v 2 をコードする) ヌクレオチド 1 で始まりヌクレオチド 7 5 3 で終わる配列番号 2 6 に示されるヌクレオチド配列の部分と、または(c o r e - e n v 1 をコードする) ヌクレオチド 1 で始まりヌクレオチド 6 6 3 で終わる配列番号 2 6 に示されるヌクレオチド配列の部分と、少なくとも 8 0 % の同一性を示すヌクレオチド配列を含んでなる核酸分子; または配列番号 2 6 の 2 2 9 番の G から 2 5 2 番の A までに及ぶ部分(コア部分における残基 7 7 ~ 8 4 の欠失に相当する)を欠失しているそれらの欠失型

: からなる群から選択される。

## 【 0 0 7 9 】

本発明の核酸分子は、当技術分野で利用可能な配列データおよび本明細書において提供される配列情報を用いて作製することができる。各 H B V ポリペプチドをコードする D N A 配列は、従来の分子生物学または P C R 技術によって、H B V を含む細胞、c D N A およびゲノムライブラリー、ウイルスゲノムまたはそれを含むことが知られている任意の従来技術ベクターから直接単離することができ、(例えば、本明細書において記載されるように) 改変することができる。また、本発明の核酸分子は、自動化プロセスで化学合成によっても作製することができる(例えば、Edge, 1981, Nature 292, 756; Nambair el al., 1984, Science 223:1299; Jay et al., 1984, J. Biol. Chem. 259:6311 に記載されているように、例えば、オーバーラップ合成オリゴヌクレオチドから構成される)。

## 【 0 0 8 0 】

また、本発明の 1 種以上の核酸分子を含んでなるベクター、ならびにそのようなベクターを含んでなる組成物も本発明によって提供される。

10

20

30

40

50

## 【0081】

本発明に関連して様々な宿主・ベクター系を使用することができ、それらには、原核宿主生物、例えば、細菌（例えば、大腸菌、枯草菌またはリステリア菌）などにおいて発現するように適合された、バクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドベクター；酵母（例えば、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ポンベ、ピキア・パストリス）において発現するように適合されたベクター；昆虫細胞系（例えば、Sf9細胞）において発現するように適合されたウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）；植物細胞系において発現するように適合されたウイルスまたはプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド、カリフラワーモザイクウイルス CaMV；タバコモザイクウイルス TMV）；ならびに高等真核細胞または生物において発現するように適合されたプラスミドおよびウイルスベクターが含まれる。そのようなベクターは、文献に広く記載されており、市販されている（例えば、Stratagene、Amersham Biosciences、Promegaなど）。好適なプラスミドベクターの代表例としては、限定されるものではないが、pREP4、pCEP4 (Invitrogen)、pCI (Promega)、pCDM8 (Seed, 1987, Nature 329, 840) および pMT2PC (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6:187)、pVAX および pgWiz (Gene Therapy System Inc; Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76: 12735) が挙げられる。本発明に関連して、種々の異なるウイルス（例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、フォーミーウイルス、アルファウイルス、水疱性口内炎ウイルスなど）に由来する複数のウイルスベクターを利用することもできる。

10

20

## 【0082】

特に興味深いのは、遺伝子導入または組換え産生について複数の十分に裏付けされた利点を有するアデノウイルスベクターである（概説については、“Adenovirus vectors for gene therapy”, 2002, D. Curiel and J. Douglas編, Academic Press参照）。本発明に従って使用するアデノウイルスベクターは、種々のヒト源または動物源（例えば、イヌ、ヒツジ、サルアデノウイルスなど）から得ることができる。任意の血清型を使用することができ、ヒトアデノウイルスが特に好ましく、C亜属、例えば、Ad2 (Ad2)、5 (Ad5)、6 (Ad6) など、B亜属、例えば、11 (Ad11)、34 (Ad34) および 35 (Ad35) などおよびD亜属、例えば、19 (Ad19)、24 (Ad24)、48 (Ad48) および 49 (Ad49) などが特に好ましい。また、動物のAdを使用することが有利であることもあり、チンパンジーAd、例えば、チンパンジーAd3 (Peruzzi et al., 2009, Vaccine 27:1293) およびチンパンジーAd63 (Dudareva et al., 2009, vaccine 27:3501) などが特に好ましい。記載したアデノウイルスは、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) から入手可能であり、またはそれらの配列、組織化および生産方法を記載している多数の刊行物の主題となっており、それによって、当業者はそれらを適用可能となった（例えば、米国特許第6,133,028号；同第6,110,735号；WO02/40665；WO00/50573；EP1016711；Vogels et al., 2003, J. Virol. 77:8263；WO00/70071；WO02/40665；WO2004/001032；WO2004/083418；WO2004/097016；WO2005/010149 参照）。

30

40

## 【0083】

一実施形態では、本発明のアデノウイルスベクターは複製欠損である。好ましい複製欠損型アデノウイルスベクターは、およそ459番から3328番までまたはおよそ459番から3510番までに及ぶE1欠失を有するE1欠損である（例えば、米国特許第6,136,594号および同第6,013,638号参照）（GeneBankにおいて受託番号M73260として、さらにChroboczek et al., 1992, Virol. 186:280において開示されているヒトアデノウイルス5型の配列を参照）。クローニング能力は、アデノウイルスゲノムのさらなる部分（WO94/28152；Lusky et al., 1998, J. Virol. 72:2022に記載されているように、非必須E3領域または他の必須E2領域、E4領域の総

50

てまたは一部)を欠失させることによってさらに向上させることができる。

【0084】

本発明の核酸分子は、アデノウイルスゲノムの任意の位置に挿入することができ、E1領域の代わりに挿入することことが特に好ましい。本発明の核酸分子は、問題の領域の自然転写方向に対してセンス配向またはアンチセンス配向に配置し得る。

【0085】

本発明に関連する他の好適なウイルスベクターは、ポックスウイルスから得られる(例えば、Cox et al. in "Viruses in Human Gene Therapy" J. M. Hos編, Carolina Academic Press参照)。本発明に関連し、ポックスウイルスベクターは、ポックスウイルス科(Poxviridae)の任意のメンバー、特に、カナリア痘ウイルス、鶏痘ウイルスおよびワクシニアウイルスから得ることができ、ワクシニアウイルスが好ましい。好適なワクシニアウイルスとしては、限定されるものではないが、コペンハーゲン系統(Goebel et al., 1990, Virol. 179:247および517; Johnson et al., 1993, Virol. 196:381)、および改変アンカラ(Wyeth系統およびmodified Ankara)(MVA)系統(Antoine et al., 1998, Virol. 244:365)が挙げられる。組換えポックスウイルス構築のため的一般条件は当技術分野で周知である(例えば、EP 206920; Mayr et al., 1975, Infection 3:6; Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847; 米国特許第6,440,422号参照)。本発明の核酸分子は、好ましくは、ポックスウイルスゲノム内の非必須遺伝子座に挿入される。チミジンキナーゼ遺伝子は、コペンハーゲンワクシニアベクターへの挿入に(Hruby et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3411; Weir et al., 1983, J. Virol. 46:530)、欠失IIまたはIIIは、MVAベクターへの挿入に(Meyer et al., 1991, J. Gen. Virol. 72:1031; Sutter et al., 1994, Vaccine 12:1032)特に適当である。10

【0086】

本発明はまた、脂質またはポリマーと複合体を形成して、リポソーム、リポプレックス(lipoplexes)またはナノ粒子などの微粒子構造を形成しているベクター(例えば、プラスミドDNA)を包含する。そのような技術は当技術分野で利用可能である(例えば、Aran goa et al., 2003, Gene Ther. 10:5; Eliaz et al., 2002, Gene Ther. 9:1230およびBetageri et al., 1993, "Liposome drug delivery systems", Technomic Publishing Company, Inc参照)。20

【0087】

好ましい実施形態によれば、本発明のベクターは、本発明の核酸分子を宿主細胞または生物体における発現に好適な形態で含んでなり、それは、核酸分子が、ベクターおよび/または宿主細胞に適当な1以上の調節配列の制御下に置かれるということを意味している。調節配列の選択が、宿主細胞、所望の発現レベルなどのような因子に依存することは当業者であれば理解することができる。

【0088】

プロモーターは特に重要であり、本発明に関連して有用な好適なプロモーターとしては、多くの種類の宿主細胞において核酸分子の発現を導く構成プロモーターおよびある特定の宿主細胞においてのみ(例えば、肝臓特異的調節配列)または特定の事象または外因性因子に応じて(例えば、温度、栄養添加物、ホルモンまたは他のリガンドにより)核酸分子の発現を導くものが挙げられる。40

【0089】

哺乳類細胞における構成的発現に好適なプロモーターとしては、限定されるものではないが、サイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーター(Boshart et al., 1985, Cell 41:521)、RSVプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、ホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーター(Adra et al., 1987, Gene 60:65)および単純ヘルペスウイルス(HSV)-1のチミジンキナーゼ(TK)プロモーターが挙げられる。ワクシニアウイルスプロモーターは、特に、ポックスウイルスベクターでの発現用に適合する。代表例としては、限定されるものではないが、ワクシニア7.5K、H5R、11K50

7 . 5 (Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther, 15:18)、T K、p 2 8、p 1 1 およびK 1 L プロモーター、ならびに合成プロモーター、例えば、Chakrabarti et al. (p S E / L プロモーターに関する、1997, Biotechniques 23:1094)、Hammond et al. (1997, J. Virological Methods 66:135) および Kumar and Boyle (1990, Virology 179:151) に記載されているものなど、ならびに初期 / 後期キメラプロモーターが挙げられる。肝臓特異的プロモーターとしては、限定されるものではないが、H M G - C o A レダクターゼ (Luskey, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1881) ; ステロール調節エレメント 1 (SRE-1; Smith et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:2306) ; アルブミン (Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1:2 68) ; ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (P E P C K) (Eisenberger et al., 1992, Mol. Cell. Biol. 12:1396) ; ヒトC反応性タンパク質 (C R P) (Li et al., 1 990, J. Biol. Chem. 265:4136) ; ヒトグルコキナーゼ (Tanizawa et al., 1992, Mol. Endocrinology 6:1070) ; コレステロール 7 - ヒドロキシラーゼ (cholesterol 7-alpha hydroxylase) (C Y P - 7) (Lee et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:14681) ; - 1 アンチトリプシン (Ciliberto et al., 1985, Cell. 41:531) ; インスリン様増殖因子結合タンパク質 (I G F B P - 1) (Babajko et al., 1993, Biochem Biophys. Res. Comm. 196:4 80) ; ヒトトランスフェリン (Mendelzon et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18:5717) ; I型コラーゲン (Houglum et al., 1994, J. Clin. Invest. 94:808) および F I X (米国特許第 5 , 8 1 4 , 7 1 6 号) の遺伝子のものが挙げられる。

#### 【0090】

当業者であれば、本発明の核酸分子の発現を制御する調節エレメントが、宿主細胞または生物体での、転写の適切な開始、調節および / または終結 (例えば、ポリA転写終結配列)、mRNA輸送 (例えば、核局在化シグナル配列)、プロセシング (例えば、スプライシングシグナル)、および安定性 (例えば、イントロンおよび非コード 5' および 3' 配列)、翻訳 (例えば、イニシエーター M e t 、トリパルタイトリーダー配列 (tripartite leader sequences)、リボソーム結合部位、Shine - Dalgarno 配列など) および精製プロセス (例えば、タグ) のためのさらなるエレメントをさらに含んでなり得ることは理解することができる。

#### 【0091】

本発明に従って、前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分および / または前記 e n v 部分をコードする本発明の核酸分子は、同じベクターまたは少なくとも 2 つのベクター (例えば、2 つまたは 3 つの独立したベクター) に担持することができる。よって、本発明は、前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分および前記 e n v 部分をコードする核酸分子を担持するベクターと、独立ベクターを包含し、それらの独立ベクターはそれぞれ、前記ポリメラーゼ部分、前記コア部分および前記 e n v 部分をコードする核酸分子の 1 種だけまたは 2 種を担持する。そのようなベクターは、本発明によって提供されるものであり、そのようなベクターを含んでなる組成物も同様である。異なるベクターを使用する場合には、それらは異なる起源のものであってもまたは同じ起源ものであってもよい。例えば、欠損型ポックスウイルス (例えば、MVA) からの 1 つのHBV部分の発現と、別のポックスウイルスベクター (例えば、コベンハーゲンベクター) からの他の 2 つの部分の発現を想定することができる。別の例として、ポリメラーゼ部分をコードするアデノウイルスベクターと、コア部分および e n v 部分をコードするアデノウイルスベクターを含んでなる組成物を想定することができる。あるいは、異なるウイルスベクターからの発現 (例えば、アデノウイルスベクターからのポリメラーゼ部分の発現と、MVAからのコア部分および / またはエンベロープ部分の発現、逆もまた同じ) もまた、本発明に関連して好適であり、プラスミドおよびウイルスベクターからのHBV部分の発現も同様である。

#### 【0092】

本発明の好ましい実施形態は、以下からなる群から選択されるベクターに関するものである：

(i) 7 . 5 K プロモーターなどのワクシニアプロモーターの制御下に置かれた、配列番号 7 、 8 もしくは 9 に、または 4 9 4 番の A s p 残基の H i s 残基への置換および 6 7

2番のG1u残基のH1s残基への置換を含む配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分をコードする、核酸分子を含んでなるMVAベクター。好ましくは、前記核酸分子はMVAゲノムの欠失IIIに挿入される。

(i i) pH5rプロモーターなどのワクシニアプロモーターの制御下に置かれた、配列番号18または19に示されるアミノ酸配列を含んでなるコア部分およびenv部分をコードする核酸分子を含んでなるMVAベクター。好ましくは、前記核酸分子はMVAゲノムの欠失IIIに挿入される。

(i i i) E1領域の代わり挿入された、CMVプロモーターの制御下に置かれた核酸分子であり、配列番号7、8もしくは9に、または494番のAsp残基のH1s残基への置換および672番のG1u残基のH1s残基への置換を含む配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分をコードする核酸分子を含んでなるE1欠損型Adベクター。

(i v) E1領域の代わり挿入された、CMVプロモーターの制御下に置かれた、配列番号18、19もしくは20に、または残基1からはじまり残基251で終わる配列番号20の部分(core-env1-env2)に、または残基1で始まり残基221で終わる配列番号20の部分(core-env1)に示されるアミノ酸配列を含んでなるコア部分およびenv部分をコードする核酸分子を含んでなるE1欠損型Adベクター。

#### 【0093】

同様に、ベクター(i)および(ii)または(iii)および(iv)を含んでなる組成物にも関する。

#### 【0094】

必要に応じて、本発明のベクターまたは組成物は、1種以上の導入遺伝子、例えば、宿主細胞または生物体において本発明の核酸分子とともに発現させるべき目的遺伝子をさらに含んでなってよい。望ましくは、導入遺伝子の発現は、HBV感染またはHBV感染により引き起こされるかまたはそれに関連する任意の疾患または状態に対する治療活性または防御活性を有し、または本発明の組成物の免疫原性を増強することが可能である。好適な導入遺伝子としては、限定されるものではないが、1つ以上の追加HBVポリペプチド/ペプチドまたはコード核酸分子、例えば、Xタンパク質またはそのフラグメントなど、免疫調節剤、例えば、サイトカイン(例えば、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IFNg)、サイトカインの融合物(WO2005/14642に記載されているものなど)またはそれらのコード核酸分子など、ならびに肝臓癌の治療に関して特に有用な自殺遺伝子産物またはコード核酸分子(例えば、シトシンデアミナーゼ(CDase)、ウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ(UPRTase)、FCU-1遺伝子産物(WO99/54481に記載されている)およびそれらの誘導体(WO2006/048768に記載されている)など(これらはプロドラッグである5-フルオロシトシン(5-FC)とともに使用される)が挙げられる。導入遺伝子を使用する場合には、導入遺伝子は、本発明の核酸分子のいずれかとの融合物の形で発現させることができ、または適当な調節エレメントの制御下で独立に発現させることができる。さらに、導入遺伝子は、本発明のベクターの任意の位置に、または本発明のベクターまたは組成物と組み合わせて使用される独立ベクターに挿入することができる。

#### 【0095】

別の態様では、本発明は、本発明の核酸分子またはベクターを含んでなる感染性ウイルス粒子、ならびにそのような感染性ウイルス粒子を含んでなる組成物を提供する。

#### 【0096】

一般には、そのようなウイルス粒子は、以下の工程を含む方法によって產生される：

- (a) 本発明のウイルスベクターを好適な細胞系統に導入する工程、
- (b) 該感染性ウイルス粒子の產生を可能にする好適な条件下で該細胞系統を培養する工程、
- (c) 產生された感染性ウイルス粒子を該細胞系統の培養物から回収する工程、および
- (d) 所望により、該感染性ウイルス粒子回収物を精製する工程。

10

20

30

40

50

## 【0097】

ウイルスベクターが欠損型である場合には、感染粒子は、通常、補完細胞系において、または非機能的ウイルス遺伝子をトランスで供給するヘルパーウィルスの使用によって產生される。例えば、E 1 欠失アデノウイルスベクターの補完に好適な細胞系としては、293細胞(Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36, 59-72)ならびにHEK-96細胞およびPER-C6細胞(例えば、Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9, 1909-1917; WO 97/00326)が挙げられる。ポックスウイルスベクターの増殖に適當な細胞は、鳥類細胞であり、最も好ましくは、受精卵から得られるニワトリ胚から調製された初代ニワトリ胚纖維芽細胞(CEF)である。

## 【0098】

感染性ウイルス粒子は、培養上清からまたは溶解後の細胞から回収することができる。感染性ウイルス粒子は、標準的な技術(例えば、WO 96/27677、WO 98/00524、WO 98/22588、WO 98/26048、WO 00/40702、EP 016700およびWO 00/50573に記載されているように、クロマトグラフィー、塩化セシウム勾配での超遠心分離)によってさらに精製することができる。

## 【0099】

本発明はまた、特定の標的細胞への優先的ターゲッティングを可能にするように改変されているベクターまたはウイルス粒子を包含する(例えば、Wickam et al., 1997, J. Virol. 71, 8221-8229; Arnberg et al., 1997, Virol. 227, 239-244; Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660-668; WO 94/10323; WO 02/96939およびEP 11146125参照)。本発明のターゲッティングベクターおよびウイルス粒子の特徴は、それらの表面に、細胞成分および表面露出成分を認識しその成分に結合することが可能なリガンド、例えば、細胞特異的マーカー(例えば、HBV感染細胞)、組織特異的マーカー(例えば、肝臓特異的マーカー)、ならびにウイルス(例えば、HBV)抗原などが存在することである。好適なリガンドの例としては、HBV抗原ドメインに対する抗体またはそのフラグメントが挙げられる。細胞ターゲッティングは、ウイルスの表面に存在するポリペプチド(例えば、アデノウイルス纖維、ペントン、pIXまたはワクシニアp14遺伝子産物)にリガンドを遺伝学的に挿入することによって行うことができる。

## 【0100】

本発明はまた、本発明の核酸分子、ベクターまたは感染性ウイルス粒子を含んでなる宿主細胞、ならびにそのような宿主細胞を含んでなる組成物に関する。本発明に関連して、宿主細胞には、原核細胞、下等真核細胞(酵母など)および他の真核細胞(昆虫細胞、植物細胞および哺乳類(例えば、ヒトまたは非ヒト)細胞など)ならびに本発明の複製欠損型ベクター(例えば、アデノウイルスベクター)の少なくとも1つの欠陥機能を補完することが可能な補完細胞(293細胞およびPERC.6細胞など)が含まれる。

## 【0101】

本発明の特定の実施形態によれば、宿主細胞はさらにカプセル封入することができる。細胞カプセル封入技術はこれまでに記載されている(Tresco et al., 1992, ASAIO J. 38. 17-23; Aebischer et al., 1996, Human Gene Ther. 7, 851-860)。

## 【0102】

本発明のさらなる態様は、本発明のベクター、感染性ウイルス粒子および/または宿主細胞を使用して組換え型のポリメラーゼ部分、コア部分および/またはenv部分を作出するための方法である。本発明の方法は、(a)トランスフェクトまたは感染した宿主細胞を作出するために本発明のベクターまたは感染性ウイルス粒子を好適な宿主細胞へ導入すること、(b)宿主細胞の増殖に好適な条件下で該トランスフェクトまたは感染宿主細胞をin-vitro培養すること、(c)ポリメラーゼ部分、コア部分および/またはエンベロープ部分を細胞培養物から回収すること、および(d)所望により、回収したポリペプチドを精製することを含む。

## 【0103】

当業者は、適當な宿主細胞におけるHBV部分の產生に利用可能な数多くの発現系につ

10

20

30

40

50

いておよびベクターまたは感染性ウイルス粒子を宿主細胞へ導入するための方法について熟知していると思われる。そのような方法としては、限定されるものではないが、マイクロインジェクション(Capechi et al., 1980, Cell 22:479)、CaPO<sub>4</sub>媒介トランスクエクション(Chen and Okayama, 1987, Mol. Cell Biol. 7:2745)、DEAE-デキストラント媒介トランスクエクション、エレクトロポレーション(Chu et al., 1987, Nucleic Acid Res. 15:1311)、リポフェクション/リポソーム融合(Felgner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413)、粒子衝撃(particle bombardement)(Yang et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9568)、遺伝子銃、形質導入、ウイルス感染ならびに様々な手段による宿主生物への直接投与が挙げられる。

## 【0104】

10

本発明のベクターは、宿主細胞へのベクターの導入を容易にするために、トランスクエクション試薬、例えば、ポリカチオン性ポリマー（例えば、キトサン、メタクリレート、PEIなど）および陽イオン性脂質（例えば、DC-Chol/DOPPE、Promegaから現在入手可能なトランスクタムリポフェクチン）などとともに使用することができる。さらに、上述のように、組換えDNA技術を用いて、例えば、高コピー数ベクターの使用、1以上の転写調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）の置換または改変、核酸分子コドン使用頻度の宿主細胞への最適化、および転写物を不安定にする可能性がある負の配列の抑制によって、宿主細胞または生物体における核酸分子の発現を改善することができる。

## 【0105】

20

本発明の宿主細胞は、従来の発酵バイオリアクター、フラスコおよびペトリ皿で培養することができる。培養は、所定の宿主細胞に適当な温度、pHおよび酸素含量で行うことができる。本明細書では、原核生物細胞および真核生物細胞におけるタンパク質の産生について知られている様々な方法を詳細に記載することはしない。

## 【0106】

30

HBV部分は、次いで、周知の精製方法によって精製することができ、それらの方法には、硫酸沈殿、酸抽出、ゲル電気泳動；濾過およびクロマトグラフィー法（例えば、逆相、サイズ排除、イオン交換、アフィニティー、ホスホセルロース、疎水性相互作用、ヒドロキシルアパタイトまたは高速液体クロマトグラフィー）が含まれる。使用する条件および技術は、正味電荷、分子量、疎水性、親水性のような因子に依存し、当業者には明らかであろう。さらに、精製のレベルは目的の用途にもよる。

## 【0107】

別の態様において、本発明は、本発明の、ポリメラーゼ部分、コア部分および/またはenv部分の少なくとも1つ、コード核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子または宿主細胞（本明細書では「活性物質」とも呼ばれる）またはそれらの任意の組合せ（例えば、本明細書に記載される種々のHBV部分をコードする、ポリペプチドまたはベクター/ウイルス粒子の組合せ、または異なる遺伝子型の組合せ）を含んでなる組成物を提供する。好ましくは、該組成物は、治療上有効な量の活性剤にさらに薬学上許容されるビヒクルを含んでなる医薬組成物である。

## 【0108】

40

好適には、本発明の組成物は、ヒトまたは動物用途に適当な希釈剤を含んでなる。それは好ましくは、等張、低張または弱高張であり、比較的低いイオン強度を有する。代表例としては、無菌水、生理食塩水（例えば、塩化ナトリウム）、リングル液、グルコース、トレハロースまたはサッカロース溶液、ハンクス液、および他の水性の生理学的平衡塩溶液が挙げられる（例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins参照）。本発明の組成物は、ヒト用途に好適とするために、生理学的pHまたはやや塩基性のpH（例えば、およそpH7～およそpH9）に適宜緩衝される。好適なバッファーとしては、限定されるものではないが、リン酸バッファー（例えば、PBS）、重炭酸バッファーおよび/またはTrisバッファーが挙げられる。

50

## 【0109】

該組成物はまた、例えばpHの改変および維持、浸透圧、粘度、明澄性、色、無菌性、安定性、処方物の溶解速度、ヒトもしくは動物生物体での放出または吸収の改変または維持、血液閑門を通過する輸送の促進、または特定の器官（例えば、肝臓）での浸透を含む、望ましい薬学的または薬力学的特性を提供するために、他の薬学上許容される賦形剤を含むことができる。好適な賦形剤としては、アミノ酸を含む。

## 【0110】

本発明の組成物に含まれる薬学上許容されるビヒクルはまた、製造、および冷凍庫（例えば、-70、-20）、冷蔵庫（例えば、4）または周囲温度での長期保存（すなわち、少なくとも1か月）の条件下でその安定性の保持を可能としなければならない。この点に関して、本発明の組成物に特に適合された処方物は、

- ・1M サッカロース、150mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、54mg/l Tw eet 80、10mM Tris pH 8.5（特に活性剤がアデノウイルスベクターである場合）、および
- ・10mg/ml マンニトール、1mg/ml HSA、20mM Tris、pH 7.2 および 150mM NaCl、
- ・生理食塩水

を含む。

## 【0111】

さらに、本発明の組成物は、ヒトにおける全身または粘膜適用に好適な1以上のアジュバントを含んでなり得る。好ましくは、アジュバントは、本発明の組成物に対する免疫、特に、例えば、TLR-7、TLR-8 および TLR-9などのToll様受容体（TLR）を介した細胞性免疫を刺激することができる。有用なアジュバントの代表例としては、限定されるものではないが、ミョウバン、フロイントの完全および不完全アジュバント（IFA）などの鉱油エマルション、リポ多糖類またはその誘導体(Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p407-419)、QS 21などのサボニン(Sumino et al., 1998, J. Virol. 72:4931; WO 98/56415)、イミキモドなどのイミダゾ-キノリン化合物(Suader, 2000, J. Am Acad Dermatol, 43:S6)、S-27609(Smorlesi, 2005, Gene Ther. 12: 1324)およびWO 2007/147529に記載されているものなどの関連化合物、CpGなどのシトシンリン酸グアノシンオリゴデオキシヌクレオチド(Chu et al., 1997, J. Exp. Med. 186:1623; Tritel et al., 2003, J. Immunol. 171:2358)およびIC-31などの陽イオンペプチド(Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr Anal. Technol Biomed Life Sci 8 22:263)が挙げられる。

## 【0112】

本発明の組成物は、全身、局所および限局投与を含む、種々の投与様式に好適である。注射は、例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内、腫瘍内、血管内、動脈内注射、または動脈への直接注射（例えば、肝動脈注入による）または肝臓栄養静脈（例えば、門脈への注射）によるなどの任意の手段によって行うことができる。注射は従来のシリンジと針、または当技術分野で利用可能な他の適当な任意の装置によって行うことができる。あるいは、本発明の組成物は、経口／食事性、鼻腔内、気管内、肺内、膣内または直腸内経路などの粘膜経路によって投与してもよい。気道内投与は、液滴、スプレーまたは乾燥粉末組成物を加圧容器（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの好適な噴射剤を伴う）または非加圧式ディスペンサーで噴霧化またはエアゾール化することによって行うことができる。

## 【0113】

局所投与はまた、経皮的手段（例えば、パッチなど）を用いて行うこともできる。本発明に関して、好ましい組成物は筋肉内および皮下経路向けに処方される。

## 【0114】

本発明の組成物は、例えば、固体、液体または凍結品などの種々の形態であってよい。

10

20

30

40

50

固体（例えば、乾燥粉末または凍結乾燥）組成物は、真空乾燥および凍結乾燥を含むプロセスによって得ることができる。粘膜投与では、組成物は経口投与用の胃耐性カプセル剤および顆粒剤、直腸または腔投与用坐剤として、最終的には、粘膜の孔径を増すのに有用な吸収促進剤と組み合わせて処方することができる。このような吸収促進剤は一般に、デオキシコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、ジメチル - - シクロデキストリン、ラウリル - 1 - リソホスファチジルコリンなど、粘膜のリン脂質ドメインに類似する構造を有する物質である。

#### 【0115】

適当な用量は、種々のパラメーター、特に、投与様式；用いる組成物；宿主生物の齢、健康状態および体重；症状の特徴および程度；併用処置の種類；処置の頻度；および／または予防もしくは治療の必要の関数として適合させることができる。処置に適当な用量を決定するために必要な、計算のさらなる精密化は、慣例的に、関連のある状況に照らして医師により行われる。一般的な指針としては、ウイルスを含んでなる組成物に好適な用量は、用いるベクターおよび定量技術によって、約 $10^5$ ～約 $10^{13}$ vp（ウイルス粒子）、iu（感染単位）またはpfu（plaques形成単位）で様々である。サンプル中に存在するvp、iuおよびpfuの量を評価するために利用可能な技術は、当技術分野では常法である。例えば、アデノウイルス粒子の数（vp）は、通常、A260における吸光度を測定することによって求められ、iu力値は定量的DBP免疫蛍光法によって、pfuは許容細胞の感染後にplaques数を数えることによって求められる。好ましくは、vp/iu比は、FDA指針によれば100未満である。MVAに基づく組成物では、約 $5 \times 10^5$ ～約 $10^9$ pfuの用量が好ましく、約 $10^7$ 、約 $5 \times 10^7$ 、約 $10^8$ または約 $5 \times 10^8$ pfuの用量が特に好ましい。Adに基づく組成物に関して、好ましい用量は、約 $10^6$ ～約 $10^{12}$ vpを含み、約 $10^9$ 、約 $5 \times 10^9$ 、約 $10^{10}$ 、約 $5 \times 10^{10}$ vpまたは約 $10^{11}$ vpの用量が特に好ましい。ベクタープラスマドに基づく組成物は、10μg～20mgの間、有利には100μg～2mgの間の用量で投与すればよい。タンパク質組成物は、体重1kg当たり10ng～20mgの間の用量の治療タンパク質を1回以上投与すればよく、約0.1μg～約2mgの用量が特に好ましい。投与は、一回用量で、または一定の時間間隔の後に1回または数回の繰り返し用量で行うことができる。

#### 【0116】

本発明の組成物は、種々の疾患および病的状態、特に、HBV感染によって引き起こされるかまたはそれに関連するものを処置するための方法に用いることができる。本明細書において「処置する」とは、予防および／または治療を包含する。それは特に、肝硬変および肝臓癌を含む、HBV感染患者におけるHBV慢性感染および／または肝臓病変を処置するのに有用である。好ましくは、本明細書に記載の治療法に従って宿主生物に導入した際に、本発明の組成物は、処置前に比べて、処置された宿主に治療上の利益を与える。治療上の利益は、例えば、感染被験体における血液、血漿、血清または肝臓において検出されるHBVウイルス量の低下、および／または抗HBV免疫応答の検出（例えば、抗HBV抗体の生産および／またはT細胞性免疫）またはHBV感染に関連する症状の遅延（例えば、肝硬変または癌の発症の遅延）、または一般にHBV感染に関連する肝臓炎症／脂肪症／纖維症の軽減、または従来の療法に対する個々の応答の改善などのいくつかの方法で証明することができる。

#### 【0117】

よって、本発明はまた、本明細書に記載の治療法に従ってHBV感染、HBV関連疾患および病的状態の治療または予防を意図した薬剤を製造するための、本発明のHBV部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞または組成物の少なくとも1つの使用を包含する。

#### 【0118】

本発明はまた、HBV感染、特に、慢性HBV感染、HBV関連疾患および病的状態を治療または予防する方法であって、それを必要とするヒトまたは動物生物体に、治療上有

10

20

30

40

50

効な量の、本発明のH B V部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞または組成物の少なくとも1つを投与することを含んでなる方法を提供する。

#### 【0119】

本発明の方法または使用は、治療上有効な量の該活性剤の1回以上の投与(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10など)を含んでなり、該投与は互いに適当な時間をおき、同じ投与経路または異なる投与経路(例えば、筋肉内経路と皮下経路)で、同じ部位にまたは異なる部位に行われる。M V Aに基づく組成物およびベクターの場合、3~10日おいた3回の投与(例えば、毎週3回の投与)が特に好適である。この第1クールの投与の後に、前記3連続投与によってプライムされた抗H B V免疫応答を想起させるために、同じ活性物質を用いて1回以上の後続投与を行うことができる(1または数ヶ月行うことができる)。A dに基づく組成物およびベクターに関して、好ましい方法または使用は、1回の投与と、最終的に、1か月後および6か月後の1回または2回の後続投与を含む。

10

#### 【0120】

所望により、本発明の方法または使用は、1以上の従来の治療法(例えば、放射線、化学療法および/または手術)と組み合わせて行うことができる。複数の治療アプローチの使用は、患者に、よりすそ野の広い介入を提供する。一実施形態では、本発明の方法は、外科的介入の前または後に行うことができる。別の実施形態では、本発明の方法は、放射線療法(例えば、線)の前または後に行うことができる。当業者ならば、当業者に容易に明らかになる適当な適合および改変を行い、適当な放射線療法プロトコールおよび使用可能なパラメーターを容易に設定することができる(例えば、Perez and Brady, 1992, Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd Ed, JB Lippincott Co参照)。

20

#### 【0121】

さらに別の実施形態では、本発明の方法または使用は、H B V感染、H B V関連疾患および病的状態を治療または予防するために従来から使用されている1以上のH B V薬による化学療法と組み合わせる。それらの投与は本発明において使用される活性物質の投与の前、または投与と並行して、または投与の後に行うことができる。H B V薬の代表例としては、限定されるものではないが、ポリメラーゼ阻害剤、R NアーゼH阻害剤、ヌクレオシド類似体、ヌクレオチド類似体、T L Rアゴニスト、N - グリコシリ化阻害剤、s i R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗H B V抗体、免疫調節剤、治療用ワクチンおよびH B V関連肝臓癌の処置に通常用いられる抗腫瘍剤(例えば、アドリアマイシン、アドリアマイシンとリピオドールまたはソラセニブ(sorafenib)の組合せ)が挙げられる。好適な治療用ワクチンの例としては、限定されるものではないが、抗H B V体液性応答の誘発に特に適した、H B Vタンパク質(C o r e、p r e S 1、p r e S 2、Sおよび/またはポリメラーゼ)に基づくか、またはそれをコードする組換え抗原、V L P、ベクターまたは合成ペプチドが挙げられる。このようなH B V薬は一回用量で、あるいはまた、数時間、数日および/または数週間にわたる、標準的なプロトコール、用量およびレジメンに従った複数用量で提供することができる。本発明による特に好適な方法または使用は標準治療と併用され、標準治療は本発明の方法または使用の前、または並行して、または後に行うことができる。このような標準治療は患者によって異なり得るが、一般に、サイトカイン(例えば、I F N a、p e g化I F N a 2)および/またはヌクレオチドまたはヌクレオシド類似体、例えば、ラミブジン、エンテカビル、テルビブジン、アデホビル、ジピボキシリルまたはテノホビルによる処置を含んでなる。

30

#### 【0122】

別の実施形態では、本発明の方法または使用は、1以上のプライム組成物と1以上のブースト組成物の連続投与を含んでなるプライムブースト治療法に従って行う。一般に、プライム組成物およびブースト組成物は、通常、少なくとも抗原ドメインを含んでなるか、またはコードする異なるビヒクルを使用する。さらに、プライム組成物およびブースト組成物は同じ部位または別の部位に、同じ投与経路または異なる投与経路によって投与することができる。例えば、ポリペプチドに基づく組成物は粘膜経路によって投与することができ、ベクターに基づく組成物は好ましくは注射され、例えば、M V Aベクターの場合は皮

40

50

下注射され、DNA プラスミドの場合は筋肉内注射され、アデノウイルスペクターの場合は皮下または筋肉内注射される。

#### 【 0 1 2 3 】

本発明はまた、宿主生物においてHBVに対する免疫応答を誘導または刺激する方法であって、該免疫応答を誘導または刺激するために該生物に本発明のHBV部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞または組成物の少なくとも1つを投与することを含んでなる方法を提供する。免疫応答は特異的および／または非特異的、体液性および／または細胞性であり得、これに関して、それはCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>またはその双方に媒介されるものであり得る。免疫応答は好ましくはHBV抗原に対するT細胞応答である。

10

#### 【 0 1 2 4 】

動物またはヒト生物体に投与した際の、本発明の方法の抗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用いて、in vitroまたはin vivoのいずれかで評価することができる。免疫応答の発現および活性化を評価するために利用可能な技術の全般的な説明については、例えば、Coligan et al (1992 and 1994, Current Protocols in Immunology; ed J Wiley & Sons Inc, National Institute of Health)を参照。細胞性免疫の測定は、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞に由来するものを含む、活性化された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ィールの測定（例えば、ELISPOTによるIL-10またはIFNg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（例えば、従来の[<sup>3</sup>H]チミジンの取り込みによるT細胞増殖アッセイ）によって、感作された被験体における抗原特異的Tリンパ球についてのアッセイ（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）によって行うことができる。体液性応答を刺激する能力は、抗体結合および／または結合における競合によって決定してもよい（例えば、Harlow, 1989, Antibodies, Cold Spring Harbor Press参照）。本発明の方法はまた、適当な感染性または腫瘍誘導性物質（例えば、HBV遺伝子産物を発現するワクシニアウイルスまたはリステリア・モノサイトゲネス(Listeria Monocytogenes)）で抗原投与を行った動物モデルにおいてさらにバリデートして、該感染性または腫瘍誘導性物質の中和および最終的には関連する症状に対する部分的な抵抗性（これは抗HBV免疫応答の誘導または増強を反映する）を決定することができる。本発明の組成物の試験およびバリデーションは、添付の実施例の節でも説明される。

20

#### 【 0 1 2 5 】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載の治療法に従って、慢性HBV感染、HBV関連疾患および病的状態を含むHBV感染の治療または予防、より詳しくは、HBVに感染した被験体における免疫応答の誘導または生成に使用するためのパーティキットを提供し、該キットは、本明細書に記載のHBV部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞および組成物からなる群から選択される複数の活性物質を含んでなる。望ましくは、該複数の活性物質は、独立したポリペプチドまたは独立したベクターの形態で提供され、各活性物質の投与は同時に（同じ時点で）または別に（一方の後に一定の時間のにおいて他方を）、同じ投与経路または異なる投与経路によって、同じ部位（または近接して）または異なる部位に、同じ用量または異なる用量を用いて行うことができる。

30

#### 【 0 1 2 6 】

本発明において特に注目されるのは、本明細書において定義されるポリメラーゼ部分をコードする核酸分子を含んでなる第1のベクターと、本明細書において定義されるコア部分および／またはenv部分をコードする核酸分子を含んでなる第2のベクターとを含んでなるパーティキットである。

40

#### 【 0 1 2 7 】

好ましい実施形態によれば、該第1のベクターは、7.5Kプロモーターなどのワクシニアプロモーターの制御下に置かれた、配列番号7、8もしくは9に、または494番のAsp残基のHis残基への置換および672番のGlu残基のHis残基への置換を含む配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分をコードする、核酸

50

分子を含んでなるMVAベクターであり；該第2のベクターは、pH5rプロモーターなどのワクシニアプロモーターの制御下に置かれた、配列番号18または19に示されるアミノ酸配列を含んでなるコア部分およびenv部分をコードする、核酸分子を含んでなるMVAベクターである。

#### 【0128】

別の好ましい実施形態によれば、該第1のベクターは、CMVプロモーターなどの好適なプロモーターの制御下に置かれた、配列番号7もしくは配列番号8に、または494番のAsp残基のHis残基への置換および672番のGlu残基のHis残基への置換を含む、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるポリメラーゼ部分をコードする、核酸分子を含んでなるアデノウイルスベクターであり；該第2のベクターは、CMVプロモーターなどの好適なプロモーターの制御下に置かれた、配列番号18、19もしくは20に、または残基1で始まり残基251で終わる配列番号20の部分(core-env1-env2)に、または残基1で始まり残基221で終わる配列番号20の部分(core-env1)に示されるアミノ酸配列を含んでなるコア部分およびエンベロープ部分をコードする核酸分子を含んでなるアデノウイルスベクターである。

10

#### 【0129】

本発明のパーティキットは、上記で定義された免疫調節剤を発現する第3のベクターをさらに含んでもよい。例示を目的として、パーティキットに含まれる各有効成分の好ましい用量は、本発明の組成物に関して上記されたものと同じ程度であるが、各ポックスウイルスまたはMVAベクターでは $5 \times 10^5 \sim 10^9$ pfu、各アデノウイルスベクターでは約 $10^6 \sim 約 10^{12}$ v.pの用量が特に好ましい。

20

#### 【0130】

本発明はまた、本発明において使用されるHBV部分またはそのペプチドフラグメントと選択的に結合する抗体を提供する。本明細書において、抗体は、標的ペプチドと結合し、無関係のタンパク質と有意には結合しない場合、標的ペプチドと選択的に結合する。ある場合には、ペプチドと結合する抗体は、ある程度の交差反応性にもかかわらずなお選択的であると理解される。しかしながらやはり、本発明の抗体は、HBV天然タンパク質と高い親和性または高い選択性で結合しないことが好ましい。

#### 【0131】

本明細書において、抗体は、当技術分野で認識されている抗体と一致すると明確に定義される。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ならびに限定されるものではないが、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>およびFvフラグメントを含む、このような抗体のフラグメントを含む。本発明の抗体は、当技術分野で慣例の技術を用いて、例えば、有効量の本明細書に記載のHBV部分および/またはそのペプチドフラグメントを動物に投与した後に產生され得る。抗体は、好ましくは、例えば天然HBVタンパク質に導入された本明細書に記載の改変に向けられたものなどの独特な配列を含んでなる、HBV部分の領域または不連続のフラグメントから作製される。

30

#### 【0132】

本発明の抗体は、本発明の範囲内にある種々の潜在的用途を有している。例えば、このような抗体は、(a)本発明の第1または第2のポリペプチドを検出するアッセイにおける試薬として、(b)生体サンプル中のHBVウイルスの存在を検出するアッセイにおける試薬として、および/または(c)組換え生産されたHBV部分を、タンパク質と他の夾雑物の混合物から回収するツールとして(例えば、培養宿主細胞からのアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降による精製を可能にすることによって)使用することができる。

40

#### 【0133】

本発明はまた、本発明のHBV部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞、組成物または抗体の少なくとも1つを用いる、HBVウイルスによる感染に感受性のある個体から採取した生体サンプル(例えば、血漿、血清、組織)中のHBVウイルスまたは抗HBV抗体の検出および/または定量のための方法に関する。

50

**【0134】**

一実施形態において、本方法は、生体サンプル中のH B Vウイルスの検出および／または定量により特に適切であり、該方法は、該生体サンプルを少なくとも1つの本発明の抗体と、ウイルスと抗体の間での複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程、および該複合体の形成を任意の適当な手段によって検出および／または定量する工程を少なくとも含んでなる。

**【0135】**

別の実施形態において、本方法は、生体サンプル中の抗H B V抗体の検出および／または定量により特に適切であり、該方法は、該生体サンプルを本発明のH B V部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞、組成物の少なくとも1つと、抗H B V抗体と本発明のH B V部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞、組成物の間での複合体の形成を可能にする条件下に接触させる工程、および該複合体の形成を任意の適当な手段によって検出および／または定量する工程を少なくとも含んでなる。 10

**【0136】**

当業者ならば、本発明の方法で使用される抗体、H B V部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞、組成物の量を容易に決定することができる。ウイルスの検出および／または定量の手段は慣例であり、当業者に周知である。例としては、プロット、E L I S A、いわゆるサンドイッチ技術、競合技術およびP C R技術（特に、いわゆる「リアルタイム」技術）が挙げられる。試薬としての本発明の抗体、H B V部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞または組成物の使用は、検出可能な物質とのカップリング（すなわち、物理的連結）により容易にすることができます。検出可能な物質の例としては、種々の酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼ）、補欠分子団（例えば、ストレプトアビジン／ビオチン、またはアビジン／ビオチン）、蛍光物質（例えば、ウンベリフェロン、フルオレセインまたはフルオレセイン誘導体）、発光物質、生物発光物質（例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリンまたはエクオリン）および放射性物質（例えば、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>Sまたは<sup>3</sup>H）が挙げられる。 20

**【0137】**

最後に、本発明は、生体サンプルにおけるH B V感染のin vitro診断のため、本発明のH B V部分、核酸分子、ベクター、感染性ウイルス粒子、宿主細胞、組成物または抗体の少なくとも1つの使用に関する。 30

**【0138】**

本発明を例示の様式で記載してきたが、用いた用語は、限定ではなく説明という言葉の性質を有するものと理解すべきである。自明のこととして、上記の教示に照らして本発明の多くの改変および変形が可能である。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲の範囲内で、本明細書中に具体的に記載されるものとは異なる様式で実施可能であると理解すべきである。

**【0139】**

上記で引用した特許、刊行物およびデータベース記載事項の開示は総て、そのような特許、刊行物または記載事項の各々が具体的かつ個々に参照により組み込まれることが示されている場合と同程度に、具体的にその全体が参照により本明細書に組み込まれる。 40

**【実施例】****【0140】****1. 材料および方法**

下記の構築を、Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY)に詳説されている一般的遺伝子操作および分子クローニング技術に従い、または市販のキットを用いる場合には製造者の推奨に従って行う。P C R增幅技術は当業者に公知である（例えば、Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Pressにより出版されているPCR protocols -A guide to methods and applications, 1990参照）。アンピシリン耐性遺伝子を担持する組換えプラスミドを、100 50

$\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗生物質を添加した寒天培地または液体培地の大腸菌 C 6 0 0 (Stratagene) で複製する。組換えワクシニアウイルスの構築は、上記に引用されている文献およびMackett et al. (1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419) およびMackett et al. (1984, J. Virol. 49, 857-864) 中の当技術分野の従来技術に従って行う。組換えワクシニアウイルスの選択を容易にするために、大腸菌の選択遺伝子 g p t (キサンチングアニンホスホリボシルトランスクレオチド) (Falkner and Moss, 1988, J. Virol. 62, 1849-1854) を用いる。

## 【0141】

## 1.1.ベクターの構築および生産

## 1.1.1.選択された抗原およびHBV配列株

10

以下に具体的に示すベクターは、ポリメラーゼ、コアポリペプチドおよびエンベロープタンパク質の免疫原性ドメインを発現するように操作されたものであった。このベクターは HBV 株 Y 0 7 5 8 7 に由来し、その配列は国際データベース (Genbank Y 0 7 5 8 7) および刊行物に記載されている。このベクターは血清型 ayw の遺伝子型 D のウイルスである。コアポリペプチドは野生型 (aa 1 ~ 183) またはアミノ酸 77 ~ 8 を欠くコアポリペプチド (すなわち、core<sup>\*</sup> で示されるアミノ酸 1 ~ 76 および 85 ~ 183 を含むコア) または C 末端切断型ポリペプチド (1 ~ 148) またはさらにアミノ酸 77 ~ 84 を欠く C 末端切断型コア (1 ~ 148) (すなわち、core<sup>\*</sup> t で示されるアミノ酸 1 ~ 76 および 85 ~ 148 を含むコア) のいずれかである。

## 【0142】

20

ポリメラーゼポリペプチドは、野生型または最初の 47 個のアミノ酸を欠く N 末端切断型ポリペプチド (48 ~ 832) または 540 番 (D が H) および 718 番 (E が H) (450 番および 718 番は野生型ポリメラーゼに関して与えられたものである) においてさらに変異された N 末端ポリメラーゼ (48 ~ 832) または狂犬病ウイルス糖タンパク質のペプチドシグナルおよびトランスマンブランドメインに融合されている、末端切断され (48 ~ 832) 、かつ、変異されたポリメラーゼ (D 540H および E 718H) (Pol<sup>\*</sup> TMR) のいずれかである。

## 【0143】

選択された Env ドメインは、S タンパク質のアミノ酸 14 ~ 51 のドメイン (Env 1) および HBs タンパク質のアミノ酸 165 ~ 194 のドメイン (Env 2) および HBs タンパク質のアミノ酸 202 ~ 226 のドメイン (Env 4) である。

30

## 【0144】

1.1.2.末端切断および変異型HBVポリメラーゼ(Pol<sup>\*</sup>)を発現するMVA  
TG17842の構築および生産

改変型 HBV ポリメラーゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、合成オリゴヌクレオチドおよび PCR 産物を用い、Geneart 社によって合成された。改変型 HBV ポリメラーゼは、HBV Y 0 7 5 8 7 のポリメラーゼタンパク質 (配列番号 1) が、天然 HBV ポリメラーゼによって示される RN アーゼ H および RT アーゼ活性を排除するために 540 番 (D が H) および 718 番 (E が H) において変異されたものに相当する (結果として配列番号 8 に示されるアミノ酸配列および配列番号 22 に示されるヌクレオチド配列が得られる)。次に、再構築された Pol 配列をプラスミドベクターにクローニングして、PGA15-pol (配列番号 27) を得る。天然 HBV ポリメラーゼの N 末端に存在する最初の 47 のアミノ酸が欠失された末端切断型を、以下のプライマー TG19037

40

## 【化1】

(GAGCGATATCCACCATGAATGTTAGTATTCTGGAC)

(配列番号 28) および OTG19038

## 【化2】

(GATCGCTAGCTCACGGTGGCTCCATGCGAC)

(配列番号29)

を用いてpGA15-Po1プラスミドからPCRによって増幅した。得られたフラグメントを、MVAトランスファープラスミドの、p7.5Kプロモーター(Cochran et al 1985, J. Virol., 54:30)の下流のNheIおよびEcoRV制限部位に挿入し、pTG17842を得た。この変異および末端切断型ポリメラーゼを以下p01\*と呼ぶ。

## 【0145】

このMVAトランスファープラスミドは、MVAゲノムの欠失部IIIにおける相同組換えにより、移入するヌクレオチド配列の挿入を可能とするように設計されている。このプラスミドはプラスミドpTG1E(Braun et al. 2000, Gene Ther. 7:1447に記載)に由来し、MVA欠失部IIIの前後にフランкиング配列(BRG3およびBRD3)がクローニングされている(Sutter and Moss, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847)。このトランスファープラスミドはまた、初期-後期ワクシニアウイルス合成プロモーター-p11K7.5の制御下に、オワンクラゲ(Aequorea victoria)増強緑色蛍光タンパク質(eGFP遺伝子、pEGP-C1から単離、Clontech)と大腸菌(Escherichia coli)キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子(gpt遺伝子)の融合物を含む(ローザンヌ大学のR. Wittekから厚意により提供)。キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼの合成によって、GPT+組換えMVAは、ミコフェノール酸、キサンチンおよびヒポキサンチンを含有する選択培地においてブラーク形成が可能となり(Falkner et al., 1988, J. Virol. 62, 1849-54)、およびeGFPは組換えMVAブラークの可視化を可能とする。選択マーカー-eGFP-GPTは、2つの相同配列の間に同じ配向で配置される。クローン選択が達成されれば、この選択マーカーは、選択を行わずに数回継代培養してeGFP-GPT組換えMVAを増殖させることで容易に除去される。

## 【0146】

MVA TG17842ウイルスの生成は、MVAに感染した初代ニワトリ胚纖維芽細胞(CEF)における相同組換えによって行い、pTG17842でトランスフェクトした(標準的なリン酸カルシウムDNA沈殿法に従う)。ウイルスの選択は、ミコフェノール酸、キサンチンおよびヒポキサンチンを含有する選択培地の存在下での3回のブラーク精製によって行った。上述のように、次に、選択マーカーを非選択培地での継代培養によって除去した。親MVAの混入がないことをPCRによって確認した。

## 【0147】

HBVポリメラーゼの発現の分析は、ウエスタンプロットによって行った。増殖培地にプロテアソーム阻害剤MG-132(10 μM)を添加して、または添加せずに、A549細胞(ATCC CCL-185)にMVA TG17842(Po1\*)をMOI1で感染させた。24時間後、細胞を回収した。ウエスタンプロット分析は、市販のモノクローナル抗Po1抗体Hep B Po1(8D5, Santa Cruz, # sc-81591)を用いて行った。

## 【0148】

1.1.3. 狂犬病エンベロープ糖タンパク質の膜係留ドメインと融合した末端切斷および変異型HBVポリメラーゼ(Po1\*TMR)を発現するMVA TG17843の構築および生産

次に、HBV Po1\*配列を、そのN末端においてペプチドシグナル(SS)と、また、そのC末端において狂犬病ウイルス(ERA分離株; Genbank No M38452に記載)の糖タンパク質に由来する膜係留配列(TMR)と融合させることによって改変した。このSS配列およびTMR配列を、それぞれプライマー対OTG19045(配列番号30)

【化3】

(GAGTGATATCCACCATGGTCCTCAGGCTCTCCTG)

/ O T G 1 9 0 4 7 (配列番号31)

【化4】

(GTCCAAGGAATACTAACATTAATAGGAATTCCCACAAATG)

およびO T G 1 9 0 4 9 (配列番号32)

【化5】

(GTCGCATGGAGACCACCGTATGTATTACTGAGTGCAGGG)

10

/ O T G 1 9 0 5 0 (配列番号33)

【化6】

(GAGTGCTAGTCACAGTCTGGTCTCACCC).

を用い、プラスミドpTG8042 (WO99/03885に記載)からPCRによって増幅した。Po1\*配列は、プライマー対O T G 1 9 0 4 6 (配列番号34)

【化7】

(GTTTGGAAATTCCCTATTAAATGTTAGTATTCCCTGGACTC)

20

/ O T G 1 9 0 4 8 (配列番号35)

【化8】

(CTGCACTCAGTAATAACATACGGTGGTCTCCATGCGACGTGC).

を用い、プラスミドpGA15-Po1からPCRによって増幅した。次に、SS-Po1\*-TMR配列を、以下のプライマーO T G 1 9 0 4 5 (配列番号30)およびO T G 1 9 0 5 0 (配列番号33)を用い、トリプルPCRによって再構築した。得られたフラグメントをワクシニアトランスファープラスミドの、p7.5Kプロモーターの下流のNheIおよびEcoRV制限部位に挿入し(Cochran et al, 1985, J. Virol. 54:30)、pTG17843を得た。

30

【0149】

MVA-TG17843ウイルスの生成は、CEFにおいて、上記のように相同組換えによって行った。

Po1\*-TMR発現の分析は、ウエスタンプロットによって行った。増殖培地にプロテアソーム阻害剤MG-132 (10 μM)を添加して、または添加せずに、A549細胞にMVA-TG17843をMOI 1で感染させた。24時間後、細胞を回収した。ウエスタンプロット分析は、市販のモノクローナル抗Po1抗体Hep B Po1 (8D5, Santa Cruz, # sc-81591)を用いて行った。

30

【0150】

1.1.4 欠失型のコアポリペプチド(Core\*)を発現するMVA-TG1797

40

1の構築および生産

Core\*は、アミノ酸77~84が欠失したHBV Y07587 (配列番号2)のコア配列に相当する。

Core\*コード配列は、pGA4-コアプラスミドから2重PCRによって再構成した。このプラスミドはGenearnt社によって作製された。このプラスミドは、合成オリゴスクレオチドおよび/またはPCR産物から組み立てられた変型HBVコア遺伝子の全長コード配列を含む。コード配列の最後の2つのコドンCAA-TGTは、Po1との配列相異性を避けるためにCAG-TGCに変更した(配列番号36)。

【0151】

1~76番のコア配列は、以下のプライマーO T G 1 9 2 9 0 (配列番号37)

50

【化9】

(GACTGTTAACCAACCATGGACATTGATCCTTA-TAAAGAATTG)

およびOTG19292(配列番号38)

【化10】

(GTTGACATAACTGACTA- CCAAATTACCAACCCACCCAGGTAG).

を用い、PCRによって増幅した。85～183番のコア配列は、以下のプライマーOTG19291(配列番号39)

【化11】

(GTGGGTGGTAATTGGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATG)

およびOTG19080(配列番号61)

【化12】

(GACTCTCGAGTTAGCACTGAGATTCCCGAGATTG).

を用い、PCRによって増幅した。OTG19290(配列番号37)およびOTG19080(配列番号61)およびその生成された両アンプリコンを用いて、ダブルPCRを行った。得られたフラグメントを、ワクシニアトランスファープラスミドの、pH5Rプロモーターの下流のXhoIおよびHpaI制限部位に挿入し(Rosel et al, 1986, J Virol. 60:436)、pTG17971を得た。

【0152】

MVA TG17971ウイルスの生成は、CEFにおいて、上記のように相同組換えによって行った。

Core<sup>\*</sup>発現の分析は、ウエスタンプロットによって行った。ニワトリ胚纖維芽細胞にMVA TG17971をMOI 0.2で感染させた。24時間後、細胞を回収した。ウエスタンプロット分析は、市販のモノクローナル抗体Hep B cAg(13A9)(Santa Cruz, # sc-23946)を用いて行った。

【0153】

1.1.5 欠失および末端切断型コアポリペプチド(Core<sup>\*</sup>t)を発現するMVA TG17972の構築および生産

Core<sup>\*</sup>tは、アミノ酸148の後で末端切断され、かつ、アミノ酸77～84が欠失されたHBV Y07587(配列番号2)のコア配列に相当する。

Core<sup>\*</sup>tコード配列は、コード配列の最後の2つのコドンCAA TGTを、P01(配列番号36)との配列相同性を避けるためにCAG TGCに改変したこと以外は、合成オリゴヌクレオチドおよびPCR産物から組み立てられた全長HBVコア遺伝子をコードする配列を含むpGA4-コアプラスミドからダブルPCRによって再構成した。

【0154】

1～76番のコア配列は、以下のプライマーOTG19290(配列番号37)

【化13】

(GACTGTTAACCAACCATGGACATTGATCCTTA-TAAAGAATTG)

およびG TG19292(配列番号38)

【化14】

(GTTGACATAACTGACTA- CCAAATTACCAACCCACCCAGGTAG).

を用い、PCRによって増幅した。85～148番のコア配列は、以下のプライマーOTG19291(配列番号39)

10

20

30

40

## 【化15】

(GTGGGTGGTAATTGGTAGTCAGTTATGTCAACACTAATATG)

およびOTG19299(配列番号40)

## 【化16】

(GACTCTCGAGTTAACACAGTAGTCTCCGGAAGTG).

を用い、pGA4-コアからPCRによって増幅した。ダブルPCRを、OTG19290(配列番号37)およびOTG19299(配列番号40)を用いて行った。得られたフラグメントを、ワクシニアトランスファープラスマドの、pH5Rプロモーターの下流のXhoIおよびHpaI制限部位に挿入し(Rosel et al, 1986, J Virol. 60:436)、pTG17972を得た。

## 【0155】

MVA TG17972ウイルスの生成は、CEFにおいて、上記のように相同組換えによって行った。

Core\*t発現の分析は、ウエスタンプロットによって行った。ニワトリ胚纖維芽細胞にMVA TG17972をMOI 0.2で感染させた。24時間後、細胞を回収した。ウエスタンプロット分析は、市販のモノクローナル抗コア抗体Hep B cAg(13A9)(Santa Cruz, # sc-23946)を用いて行った。

## 【0156】

1.1.6 Env1免疫原性ドメインと融合した欠失および末端切断型コアポリペプチド(Core\*t-env1)を発現するMVA TG17993の構築および生産

Core-t\*部分を、HBsタンパク質のアミノ酸14~51にわたるEnv1ドメインと融合させた。

このCore\*t-Env1配列は、ダブルPCRによって再構成した。Core\*t配列は、以下のプライマーOTG19317(配列番号41)

## 【化17】

(GACGGGATCCACCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTGG)

およびOTG19319(配列番号42)

## 【化18】

(GCCTGCTTGCAGGACAACAGTAGTCTCCGGAAGTGTG).

を用い、pTG17972からPCRによって増幅した。Env1配列は、以下のプライマーOTG19318(配列番号44)

## 【化19】

(CCGGAGACTACTGTTGCC-TGCAAGCAGGCTTCTTC)

およびOTG19320(配列番号45)

## 【化20】

(GAGTCATTCTCGAC-TGCGGCCGCTTACTGACCCAGGCAAACCGTGG).

を用い、プラスミドpMK-C/E(配列番号43)からPCRによって増幅した。ダブルPCRは、OTG19317(配列番号41)およびOTG19320(配列番号45)を用いて行った。得られたフラグメントを、ワクシニアトランスファープラスマドの、pH5Rプロモーターの下流のBamHIおよびNotI制限部位に挿入し(Rosel et al, 1986, J Virol. 60:436)、pTG17993を得た。

## 【0157】

例示を目的として、プラスミドpMK-C/Eは、Geneart社によって作製されたものであり、コア配列(配列番号43)への3つのHBV envドメイン配列の挿入

10

20

40

50

からなるキメラ配列を含む。天然コアおよびenvヌクレオチド配列は、HBV Pol配列との配列相同性およびまたポリTまたはポリGCストレッチによる配列の不安定性を避けるために変性させた。さらに、コア配列は、アミノ酸77～84を欠失させ、aa14～18において末端切断した。選択されたEnvドメインは、Sタンパク質のアミノ酸14～51のドメイン(Env1)およびSタンパク質のアミノ酸165～194のドメイン(Env2)およびSタンパク質のアミノ酸202～226のドメイン(Env4)である。これら3つのドメインをそれぞれコア配列のnt127、nt222およびnt416の位置に挿入した。この配列をMVAベクターに挿入すると発現細胞で細胞傷害性が生じ、env-core融合のデザインは簡単ではないことが強調されるということを述べておかなければならぬ。

10

## 【0158】

MVA TG17993ウイルスの生成は、CEFにおいて、上記のように相同組換えによって行った。

Core<sup>\*</sup>t-env1発現の分析は、ウエスタンプロットによって行った。ニワトリ胚纖維芽細胞にMVA TG17993をMOI 0.2で感染させた。24時間後、細胞を回収した。ウエスタンプロット分析は、市販のモノクローナル抗コア抗体Hep-B cAg(13A9)(Santa Cruz, # sc-23946)を用いて行った。

## 【0159】

1.1.7 Env1およびEnv2免疫原性ドメインと融合した欠失および末端切断型コアポリペプチド(Core<sup>\*</sup>t-env1-env2)を発現するMVA TG17994の構築および生産

20

1.1.5に記載されているCore<sup>\*</sup>tポリペプチドを、次に、HBsタンパク質のアミノ酸14～51(Env1)およびアミノ酸165～194(Env2)にわたる2つの免疫原性ドメインと融合させた。

Core<sup>\*</sup>t-Env1-Env2をコードするヌクレオチド配列をトリプルPCRによって再構築した。Core<sup>\*</sup>t配列は、以下のプライマー-OTG19317(配列番号41)およびOTG19319(配列番号42)を用い、pTG17972からPCRによって増幅した。Env1は、以下のプライマー-OTG19318(配列番号44)およびOTG19322(配列番号46)

## 【化21】

30

(GCGTGCCTGCCACTGACCCAGGCAAACCGTGG).

を用い、pMK-C/Eプラスミドから増幅した。Env2は、以下のプライマー-OTG19321(配列番号47)

## 【化22】

(CGGTTGCCTGGTCAGTGGCAAGCGCACGCTTACG)

およびOTG19323(配列番号48)

## 【化23】

(GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTACACGCTCAGCCACACGGTTGG).

40

を用い、pMK-C/Eプラスミドから増幅した。トリプルPCRは、OTG19317(配列番号41)およびOTG19323(配列番号48)を用いて行った。得られたフラグメントを、ワクシニアトランスマーカー-プラスミドの、pH5Rプロモーターの下流のBamHIおよびNotI制限部位に挿入し(Rosel et al, 1986, J Virol. 60:436)、pTG17994を得た。

## 【0160】

MVA TG17994ウイルスの生成は、CEFにおいて、上記のように相同組換えによって行った。

Core<sup>\*</sup>t-env1-env2発現の分析は、ウエスタンプロットによって行った

50

。ニワトリ胚纖維芽細胞にMVA TG17994をMOI 0.2で感染させた。24時間後、細胞を回収した。ウエスタンプロット分析は、市販のモノクローナル抗コア抗体Hep B cAg (13A9, Santa Cruz, # sc-23946)を用いて行った。

【0161】

1.1.8. CORE - Env1 - Env2 - Env4を発現するアデノウイルスベクターAdTG17909の構築および生産

CORE - Env1 - Env2 - Env4融合物をコードする合成遺伝子(831ヌクレオチド)は、ダブルPCRによって再構成した。COREは、以下のプライマーOTG19152(配列番号49)

【化24】

10

(GGGGGGCTAGCAAGCTTCCACCATGGACATTGATCCTTATAAAGAATTG)

およびOTG19154(配列番号50)

【化25】

(GAAAGAATCCAGCTTGCAGGACGCCT- GAGATTCCCGAGATTGAG).

を用い、pGA4-Core(1.1.4.に記載)からPCRによって増幅した。Env1 - Env2 - Env4は、以下のプライマーOTG19153(配列番号51)

【化26】

(CTCAATCTCGGGAATCT- CAGTGCCTGCAAGCTGGATTCTTC)

20

およびOTG19159(配列番号52)

【化27】

(GAGTCATTCTCGACTTGCAGGCCGCTTAGATATAAACCCACAAGC).

を用い、GA4 - EnvからPCRによって増幅した。ダブルPCRは、OTG19152(配列番号49)およびOTG19159(配列番号52)を用いて行った。得られたフラグメントを、相同組換えによるベクターゲノムの生成を可能とするために(Chartier et al, 1996, J. Virol 70:4805)、アデノウイルス配列(それぞれアデノウイルスヌクレオチド1~454およびヌクレオチド3513~5781)によって挟まれたCMV駆動発現カセットを含むアデノウイルスシャトルプラスミドのNheIおよびNotI制限部位に挿入した。得られたアデノウイルスベクターpTG17909は、E3(ヌクレオチド28593~30464)およびE1(ヌクレオチド455~3512)が欠失し、このE1領域が、5'から3'方向に、CMV前初期エンハンサー/プロモーター、キメラヒト-IgG1イントロン(Promegaにおいて入手可能なpCIベクターに見られるものなど)、CORE - Env1 - Env2 - Env4をコードする配列およびSV40後期ポリアデニル化シグナルを含む発現カセットに置換されている。組換えアデノウイルスは、PacIで線状化したウイルスゲノムをE1相補細胞系統にトランスフェクトすることによって作出した。ウイルスの増殖、精製および力価測定は従前に記載されているように行った(Erbs el al., 2000, Cancer Res. 60:3813)。

30

【0162】

40

融合タンパク質の発現は、ウエスタンプロットによって評価した。10<sup>6</sup>個のA549細胞(ATCCCCL-185)に、AdTG17909または陰性対照としてのエンプティーアデノウイルスを48時間、MOI 10または50で感染させた。細胞ペレットを回収し、抗COREマウスモノクローナル抗体(C1-5, sc-23945, Santa Cruz)でプローブした。

【0163】

1.1.9. Pol\*を発現するアデノウイルスベクターAdTG17910の構築および生産:

Met開始部(48~832)を除く最初の47のアミノ酸が末端切断され、かつ、5

50

40番(DがH)および718番(EがH)において変異された(野生型ポリメラーゼに対して)ポリメラーゼタンパク質であるPo1<sup>\*</sup>をコードする遺伝子をアデノウイルスベクターに挿入した。Po1遺伝子(2364ヌクレオチド)は、プライマーOTG19155(配列番号53)

【化28】

(GGGGGGCTAGCAAGCTTCCACCATGAA- TGTTAGTATTCCCTGGACTCATAAG)

およびOTG19156(配列番号54)

【化29】

(GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCGCTCACGGTGGTCTCCATGCGACGTGC). 10

を用い、pGA15-Po1(1.1.2に記載)からPCRによって増幅した。得られたフラグメントを、相同組換えによるベクターゲノムの生成を可能するために(Chartrie et al, 1996, J. Virol 70:4805)、アデノウイルス配列(それぞれアデノウイルスヌクレオチド1~454およびヌクレオチド3513~5781)によって挟まれたCMV駆動発現カセットを含むアデノウイルスシャトルプラスミドのNheIおよびNotI制限部位に挿入した。得られたアデノウイルスベクターpTG17910は、E3(ヌクレオチド28593~30464)およびE1(ヌクレオチド455~3512)が欠失し、このE1領域が、5'から3'方向に、CMV前初期エンハンサー/プロモーター、キメラヒト-グロビン/IgGイントロン(Promegaにおいて入手可能なpCIベクターに見られるものなど)、末端切断および変異型Po1をコードする配列およびSV40後期ポリアデニル化シグナルを含む発現カセットに置換されている。組換えアデノウイルスは、PacIで線状化したウイルスゲノムをE1相補細胞系統にトランスフェクトすることによって作出了した。ウイルスの増殖、精製および力価測定は従前に記載されているように行った(Erbs et al., 2000, Cancer Res. 60:3813)。

【0164】

融合タンパク質の発現は、アデノウイルス感染細胞においてウエスタンプロットによって評価した。A549細胞(10<sup>6</sup>個)(ATCC CCL-185)に、アデノウイルスAdTG17910または陰性対照としてのエンブティーアデノウイルスを48時間、MOI 10または50で感染させた。細胞ペレットを回収し、抗Po1マウスモノクローナル抗体(8D5, sc-81591, Santa Cruz)でプローブした。 20

【0165】

1.2.抗原の免疫原性の評価

抗原の免疫原性は、HLAトランスジェニックマウスの免疫誘導の後に、ELISPOT IFN および細胞内サイトカイン染色(ICS)アッセイによってin vivoで評価した。

【0166】

1.2.1 マウスモデル

試験に用いたHLA-A2.1トランスジェニックマウスは、Pascolo et al. (1997, J. Exp. Med. 185:2043)によって記載されている。これらのマウスはH-2D<sup>b</sup>およびネズミ<sub>2</sub>-ミクログロブリン遺伝子ノックアウトを有し、ヒト2mのC末端がキメラ重鎖に共有結合されているトランスジェニック単鎖組織適合性クラスI分子(HHD分子)(HLA-A<sup>\*</sup>0201 1-2, H-2D<sup>b</sup> 3トランスメンブランおよび細胞室内ドメイン)を発現する。7~10週齢のマウス(雄および雌)に免疫誘導を行った。マウスの平均体重は25~30g前後であった。 40

【0167】

1.2.2.免疫誘導プロトコール

マウスを、群1 AdTG17909(env1, env2およびenv4免疫原性ドメインと融合したHBV Coreをコードする)による免疫誘導、群2 AdTG17910(末端切断および変異型Po1<sup>\*</sup>をコードする)による免疫誘導、群3 両ベクタ 50

一による免疫誘導および群4 隆性対照としてのエンプティーアデノウイルス(AdTG15149)による免疫誘導、の4群に分けた。総ての動物を、尾の基部に皮下注射を行うことによって免疫誘導し、群1および2の動物には、 $10^8$  IUの各アデノウイルス(TG17909またはTG17910)の皮下注射を1回施し、群3には、 $10^8$  IUの各アデノウイルスを含む混合物(計 $2 \cdot 10^8$  IU :  $10^8$  IUのAdTG17909 +  $10^8$  IUのAdTG17910)の皮下注射を1回施し、隆性対照には、 $2 \cdot 10^8$  IUのAdTG15149の皮下注射を1回施した。細胞性免疫応答は、免疫誘導2週間後にIFNg Elispotおよび細胞内サイトカイン染色(ICS)アッセイによって評価した。

## 【0168】

10

1.2.3 ペプチド

*in vitro*細胞刺激に用いたペプチドは、HLA-A2制限エピトープであると記載されているまたは推定される9~10アミノ酸の短鎖ペプチドか、または総ての対象抗原をカバーするペプチドライブラーに含まれる15アミノ酸の長鎖ペプチドのいずれかであった。

ポリメラーゼタンパク質の記載されているまたは推定されるHLA-A2制限エピトープ、コアタンパク質またはEnvドメインに相当する短鎖ペプチドは、Eurogentec (Belgium)によって合成され、100%DMSO(sigma, D2650)に10mM濃度で溶かした。

## 【0169】

20

全ポリメラーゼ、コアおよびエンベロープタンパク質をカバーするペプチドライブラーはProImmune (Oxford, United Kingdom)によって合成された。このPo1、CoreおよびEnvライブラーは11アミノ酸がオーバーラップする15マーペプチドから構成された。各未精製ペプチドを100%DMSO(sigma, D2650)に50mg/ml濃度で溶かした。各ライブラーについて、各ペプチド2mg/mlの濃度となるようにペプチドをプールした。

## 【0170】

HBV Po1タンパク質は、Po1ライブラーに由来する8プールの24~25ペプチド、(プール1：残基45~151をカバーする24ペプチド；プール2：残基140~251をカバーする24ペプチド；プール3：残基241~347をカバーする24ペプチド；プール4：残基337~447をカバーする24ペプチド；プール5：残基437~543をカバーする24ペプチド；プール6：残基533~639をカバーする24ペプチド；プール7：残基629~735をカバーする24ペプチド；プール8：残基725~832をカバーする25ペプチド)によってカバーされ、

30

HBVコアタンパク質は、コアライブラーに由来する2プールの21~22ペプチド(プール1：残基1~100をカバーする22ペプチド；プール2：残基89~183をカバーする21ペプチド)によってカバーされ；

HBV Envタンパク質は、Envライブラーに由来する3プールの6~10ペプチド(プール1：HBs残基9~59をカバーする10ペプチド；プール2：HBs残基157~194をカバーする9ペプチド；プール4：HBs残基193~226をカバーする6ペプチド)によってカバーされる。

40

## 【0171】

1.2.4. IFNg Elispotアッセイ

免疫マウスからの脾細胞を回収し、赤血球を溶解させた(Sigma, R7757)。 $2 \cdot 10^5$  細胞ウェルを、抗マウスIFNモノクローナル抗体(BD Biosciences; 10μg/ml, 551216)でコーティングしたMultiScreenプレート(Millipore, MSHAS4510)にて、10%FCS(Sigma, F7524またはJRH, 12003-100M)、80U/mlペニシリン/ $80\mu g/ml$ ストレプトマイシン(PAN, P06-Q7-100)、2mM L-グルタミン(Gibco, 25030)、1×非必須アミノ酸(Gibco, 11140)、10mM Heps(Gibco, 15630)、1mMピルビン酸ナトリウム(Gibco, 31350)および50μM -メルカプトエタノール(Gibco, 31350)を添加したMEM培養培地(Gibco, 22571)中、隆性対照としての10

50

単位 / m l の組換えネズミ IL-2 (Peprotech, 212-12) 単独の存在下、または

- ・ AdベクターによってコードされるHBV抗原中に存在する1つのHLA-A2制限ペプチド (PolではSLY、CoreではFLP、ILC、EnvではVLQ、FLGおよびGLS) または無関連のもの10 μM、

- ・各ペプチド終濃度5 μg / m l のペプチドプール、

- ・陽性対照としてのコンカナバリンA (Sigma, C5275) 5 μg / m l

とともに、3反復で40時間培養した。

#### 【0172】

IFNg產生T細胞を、従前に記載されているように (Himoudi et al., 2002, J. Virol. 76:12735)、ELISPOT (サイトカイン特異的酵素結合免疫スポット) アッセイによって定量した。陰性対照ウェルにおけるスポットの数 (IFNg產生T細胞に相当する) を、HBVペプチドを含む試験ウェルにおいて検出されたスポットの数から差し引いた。結果は3反復のウェルで得られた平均値として示す。見られた応答の確実な試験閾値 (すなわちカットオフ) は、10<sup>6</sup>細胞に対して報告された、媒体単独 + 2標準偏差で見られたスポットの平均値に相当する閾値を計算することによって求める。また、CTL ELISPOTリーダーに関連するテクニカルカットオフは、50スポット / 10細胞 (リーダーのCVが体系的に20%未満であった場合を超える値である) として定義した。テクニカルカットオフと、各試験で計算された試験閾値の間の最高値を考慮して、各試験のカットオフ値を定義する。ELISPOT応答の統計分析は、マン・ホイットニー検定を用いて行った。0.05以上のP値を有意と見なした。

#### 【0173】

##### 1.2.5. 細胞内サイトカイン染色 (ICS) アッセイ

各群の各動物からの脾細胞に対して ICSを行った。溶解バッファー (Sigma, R7757) で赤血球を溶解させた後、ウェル当たり  $2 \times 10^6$  個の細胞を平底96ウェルプレートにて、完全 (MEM培養培地 (Gibco BRL, 22571) 中、陰性対照として10単位 / m l のネズミ組換えIL-2 (Peprotech, 212-12) 単独の存在下、または10 μMの特異的HBVペプチドまたは各ペプチド終濃度5 μg / m l のペプチドプールまたは10 μMの無関連のペプチドとともにインキュベートした。Goldiplug (BD Biosciences, 555029) を終濃度1 μl / m l ですぐに5時間加えた。次に、細胞をV底96ウェルプレートに回収し、1% FCS-PBSで洗浄した。染色は、50 μlの1% FCS-PBS中、CD3 (ハムスターMAb抗CD3e-PE、1/200希釈)、CD8 (ラットMAb抗CD8a-APC、1/600希釈) およびCD4 (ラットMAb抗CD4-PerCP、1/600希釈) (総てBD Biosciencesから、それぞれ553063、553035および553052) に対するモノクローナル抗体を用いて室温で15分間行った。洗浄後、細胞を固定し、Cytofix/Cytopermで透過処理を施し、Perm/Wash溶液 (BD Biosciences, 554714) で洗浄した。その後、抗マウスIFNg-PE抗体 (BD Biosciences, 5544125 57724) および抗マウスTNFa-Allexa488抗体 (BD Biosciences, 557719) または抗マウスIFNg-PE抗体 (BD Biosciences, 554412557724) および抗マウスIL2-Alexa488抗体 (BD Biosciences, 557719) を室温で15分間加え、Perm/Washで洗浄した後、細胞を1% FCS-PBSに再懸濁させ、FacsCalibur (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリーにより分析した。CD3e+、CD8a+細胞またはCD3e+、CD4+細胞にゲートをかけ、IFNg+CD8+またはIFNg+CD4+TまたはTNFa+CD8+またはTNFa+CD4+TまたはIFNg+TNFa+CD4+TまたはIL2+CD8+またはIL2+CD4+T細胞集団の割合%を求めた。媒体単独で得られた割合%をバックグラウンドとみなした。

#### 【0174】

##### 1.2.6. in vivo CTLアッセイ

in vivo CTLアッセイは、記載されているように行った (Fournillier et al., 2007)

10

20

30

40

50

。脾細胞懸濁液を同系マウスの脾臓から得、赤血球を溶解させた後に  $20 \times 10^6$  細胞 / m<sup>1</sup> に調整した。3分の1の細胞を H B V 特異的ペプチドの1つともにインキュベートし、別の3分の1の細胞を別のH B Vペプチドとともにインキュベートし(総て終濃度 10 μM にて 37 °C で 1 時間)、最後の3分の1はパルスを行わずにいた。5 (6) - カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (C F S E) (Molecular probes, C1157) を、un パルスを行わなかった細胞には 16 μM (C F S E - 高) で、I L C または V L Q ペプチドでパルスした細胞には 4 μM (C F S E - 中) で、また、S LY または F LP ペプチドでパルスした細胞には 1 μM (C F S E - 低) で 10 分間加えた。P B S で洗浄した後、これらの3つの集団(非パルス、ILC および SLY ペプチドでパルスした細胞、または非パルス、FLP および ILC ペプチドでパルスした細胞)を混合し、計  $30 \times 10^6$  個の細胞を、麻酔したマウスに後眼窩静脈から注射した(ケタミン - キシラジン - P B S 混合物 (Ketamine Virbac, Centravet KET204, 終濃度 2.5 mg / m<sup>1</sup>; 塩酸キシラジン (Rompun Bayer, Centravet, 終濃度 5 mg / m<sup>1</sup>) を使用)。従って、C F S E - 低および中集団は、細胞傷害性 T 細胞によって溶解されると思われる特異的標的に相当し、C F S E - 高集団アッセイのノーマライゼーションを可能とする内部参照であった。24時間後、レシピエントマウスからの脾細胞をフローサイトメトリーにより分析して、C F S E 標識細胞を検出した。リンパ球 (SSC / FSC) にゲートをかけた後、次のゲートを事象数 / C F S E 蛍光 (FL1) に基づいて設定したところ 3 つのピークが明らかになり、すなわち、1 つ目は C F S E - 低細胞に相当し、2 つ目は C F S E - 中細胞に相当し、3 つ目は C F S E - 高細胞に相当する。動物ごとに、C F S E + ペプチドでパルスされた標的と C F S E + でパルスされていない標的との比を計算した (R = C F S E - 低細胞の数 / C F S E - 高細胞の数)。2 匹のナイーブマウスを用いて R 参照値を求めた。各動物の特異的溶解の割合 % を下式 : 溶解率 % = (1 - R マウス / R 参照) × 100 によって求めた。応答は、特異的溶解の割合 % が 10 % (カットオフ) より大きければ陽性と見なした。

## 【0175】

2. 結果2.1 ウイルスベクターによる抗原の発現2.1.1 アデノウイルス構築物 AdT G 17909 および AdT G 17910 からの抗原の発現

core-env1-env2-env4 融合タンパク質の発現は、ウエスタンプロットによって評価した。A549 細胞 ( $10^6$  細胞) に、AdT G 17909 または陰性対照としてのエンプティーアデノウイルスを 48 時間、MOI 10 または 50 で感染させた。細胞ペレットを回収し、抗コアマウスモノクローナル抗体 (C1-5, sc-23945, Santa Cruz) でプローブした。図 1 A に示されるように、AdT G 17909 感染細胞から回収されたサンプルにおいて、予測分子量 (31.6 kDa) を有する主要バンドが現れた。

## 【0176】

A549 細胞の AdT G 17910 感染後の Pol<sup>\*</sup> ポリペプチドの発現は、ウエスタンプロットによって評価した。次に、細胞ペレットを回収し、抗 Pol<sup>\*</sup> マウスモノクローナル抗体 (8D5, sc-81591, Santa Cruz) でプローブした。図 1 A に示されるように、AdT G 17910 感染細胞から回収されたサンプルにおいて、予測分子量 (88.5 kDa) を有するバンドが、いくらかの副産物(部分的ポリメラーゼタンパク質)とともに現れた。

## 【0177】

2.1.2 MVA 構築物からの抗原の発現

Pol<sup>\*</sup>、Pol<sup>\*</sup> TMR、Core<sup>\*</sup> t、Core<sup>\*</sup> tEnv1、Core<sup>\*</sup> t-E nv1-E nv2 の発現の分析は、ウエスタンプロットによって行った。MVA-TG17842 および MVA-TG17843 では増殖培地にプロテアソーム阻害剤 MG-132 (10 μM) を加えて、または加えずに、A549 細胞または CEF に、それぞれ MVA

10

20

30

40

50

A TG17842、MVA TG17843、MVA TG17971、MVA TG17972、MVA TG17993およびMVA TG17994をそれぞれMOI 1または0.2で感染させた。24時間後、細胞を回収した。

#### 【0178】

MVA TG17842では、市販のモノクローナル抗P<sub>o</sub>1抗体Hep B P<sub>o</sub>1(8D5,Santa Cruz, #sc-81591)を用いてウエスタンプロット分析を行った。図1Bに示されるように、見掛けの分子量が88.5kDaのタンパク質の発現が唯一MG-132の存在下で検出された。このバンドはP<sub>o</sub>1\*タンパク質の予測分子量を有する。

#### 【0179】

MVA TG17843では、市販のモノクローナル抗P<sub>o</sub>1抗体Hep B P<sub>o</sub>1(8D5,Santa Cruz, #sc-81591)を用いてウエスタンプロット分析を行った。図1Bに示されるように、見掛けの分子量が98.2kDaのタンパク質の発現がMG-132の存在下または不在下で検出された。このバンドはP<sub>o</sub>1\*-TMRタンパク質の予測分子量を有する。MG132の存在下ではより多くの産物、また、200kDaを超える高分子量の付加的産物が検出された。

#### 【0180】

MVA TG17971では、市販のモノクローナル抗コア抗体Hep B cAg(13A9)(Santa Cruz, #sc-23946)を用いてウエスタンプロット分析を行った。図1Bに示されるように、予測分子量に相当する見掛けの分子量が21kDaのCore\*の発現が検出された。

10

#### 【0181】

MVA TG17972では、市販のモノクローナル抗コア抗体Hep B cAg(13A9)(Santa Cruz, #sc-23946)を用いてウエスタンプロット分析を行った。図1Bに示されるように、見掛けの分子量が予測分子量に相当する15.8kDaのCore\*tの発現が検出された。

20

MVA TG17993およびMVA TG17994では、ウエスタンプロット分析は、市販のモノクローナル抗コア抗体Hep B cAg(13A9,Santa Cruz,#sc-23946)を用いて行った。図1Bに示されるように、見掛けの分子量がそれぞれ19.9および23.4kDaのタンパク質の発現が検出された。このバンドはCore\*t-Env1タンパク質およびCore\*t-Env1-Fnv2の予測分子量を有する。

30

#### 【0182】

2.2.アデノウイルスベクターAdTG17909およびAdTG17910から発現される抗原の免疫原性

アデノウイルスベクターによって発現されるHBVポリペプチドの免疫原性は、AdTG17909またはAdTG17910単独か、またはこの2つのアデノウイルスの混合物のいずれかで免疫誘導したHLA-A2トランスジェニックマウスにおいて評価した。1回の皮下注射の後に誘導された特異的T細胞応答を、ポリメラーゼ、コアもしくはエンベロープメイン、または/および着目するHBV抗原をカバーするオーバーラップペプチドのプールに存在する既知の（患者における特異的T細胞応答の標的であると記載されている）HLA-A2エピトープを用いた、Elispot IFNg、ICSおよびin vivo細胞溶解アッセイによって評価した。

40

#### 【0183】

2.2.1. ElispotアッセイによるHBV特異的IFN産生細胞の評価

Elispot IFNgアッセイでは、HLA-A2制限エピトープ(SLYADSPSV)(HBVポリメラーゼ内の816~824番に位置する配列番号55)に特異的なIFNgを産生する細胞を誘導し得ることが示された（図2A）。AdTG17909による免疫誘導もまた、2つのコアHLA-A2制限エピトープ（18~27番のFLPSDFFPSV（配列番号56）および99~108番のILCWGELMTL（配列番号57））、ならびに3つのエンベロープHLA-A2制限エピトープ（双方ともEnv1に存在する14~22番のVLQAGF FLL（配列番号58）および41~49番のFLGGTTVCL（配列番号59））、ならびにEnv

50

2に存在する185～194番のGLSPTVWLSV(配列番号60)に特異的なIFNgを產生する細胞の高頻度での誘導をもたらした(図2BおよびC)。AdTG17909とAdTG17910の混合物による免疫誘導もまた、3つの抗原の同じエピトープ、すなわち、P01に存在するSLYエピトープ、コアタンパク質に存在するFLPおよびILCエピトープ、そしてエンベロープドメインの3つのエピトープ(VLQ、FLGおよびGLS)を標的とする、匹敵するレベルの特異的IFNg產生細胞を誘導した(図2A、BおよびC)。単一のAdまたは2つの混合物による免疫誘導後に検出されたT細胞応答の頻度は匹敵するものであったが、これは記載したベクターから発現した3つの抗原の間に主要な免疫優性が無いことを示す。

## 【0184】

10

2.2.2. 細胞内染色アッセイによるMEV特異的IFNg / TNFaを產生する細胞の評価

ポリメラーゼドメイン(SLY)、コアドメイン(FLPおよびILC)およびエンベロープドメイン(VLQ、FLGおよびGLS)に存在するHLA-A2制限エピトープを標的とする、IFNg単独またはIFNg+TNFaのいずれかを誘導することができるCD8 T細胞の数を、ICSアッセイによって評価した。これら総てのエピトープが二重および單一分泌細胞の標的であった。結果を図3に示す。AdTG17909単独またはAdTG17910との組合せで免疫誘導した動物では、およそ同等のCore特異的CD8 T細胞応答およびEnv特異的CD8 T細胞応答(図3Bおよび3Cに示されるように、FLP、ILC、VLQ、FLGおよびGLSペプチドで再刺激した後にIFNgまたはIFNg+TNFaを產生する特異的CD8 T細胞の割合%が同じ)が誘導された。他方、ポリメラーゼ特異的CD8 T細胞応答(SLYエピトープ)に関しては、P01<sup>\*</sup>を発現するAdTG1710で処置されたマウス(図3A)ならびに程度は低いが、AdTG17910とAdTG17909の混合物で免疫誘導されたマウス(図3C)において、極めて高い割合%のIFNgまたはIFNg+TNFa产生CD8+細胞が検出された。

20

## 【0185】

2.2.3. アデノウイルスベクターの混合物で免疫誘導した後のHEV特異的IFNg / TNFa产生CD8およびCD4 T細胞の、細胞内染色アッセイによる評価

30

ポリメラーゼドメイン(SLY)、コアドメイン(FLPおよびILC)およびエンベロープドメイン(VLQ、FLGおよびGLS)またはコアタンパク質とEnvドメインをカバーするオーバーラップペプチドのプールに存在するHLA-A2制限エピトープを標的とする、IFNg単独またはIFNg+TNFaまたはIFNg+IL2のいずれかを誘導することができるCD8およびCD4 T細胞の割合%をICSアッセイによって評価した。供試した総てのHLA-A2制限エピトープが單一および二重分泌(IFNgおよびIFNg+TNFa)細胞の標的であり、およびオーバーラップペプチドの一部のプールも、單一および二重產生細胞(IFNgおよびIFNg+TNFおよびIFNg+IL2)の標的であった。結果を図4に示す。5匹のHLA-A2トランスジェニックマウスをAdTG17909とAdTG17910の混合物で免疫誘導し、3匹のHLA-A2トランスジェニックマウスをAdTG15149(陰性対照)で免疫誘導した。AdTG15149で免疫誘導した動物は、HBV特異的T細胞応答を示さなかった(データは示されていない)。AdTG17909とAdTG17910を組み合わせて免疫誘導した動物は、HBV標的抗原に特異的な強いCD8 T細胞応答を示し(図4A)、ポリメラーゼドメイン、コアドメインおよびEnvドメインに存在するHLA-A2エピトープに特異的であり、かつ、ペプチドの「コア1」プールならびにEnv1およびEnv2ドメインをカバーするペプチドのプールに特異的な單一(IFNg)および二重(IFNg+TNFa)產生細胞の割合%は高かった。図4Bおよび4Cに示されるように、これらのワクチン接種マウスはまた、HBV抗原に特異的なCD4 T細胞応答、特に、ペプチドの「コア2」プールおよびEnv2をカバーするペプチドのプールに特異的な單一(IFNg)および二重(IFNg+TNFaおよびIFNg+IL2)產生細胞を示した

40

50

。

### 【0186】

#### 2.2.4. in vivo CTL アッセイによって測定された in vivo 細胞溶解の誘導

アデノウイルスベクター Ad TG17909 および Ad TG17910 の、 HBV HLA-A2 エピトープを提示する againsT 細胞に対して in vivo 細胞溶解を誘導する能力を、 in vivo CTL アッセイによって評価した。4つの HLA-A2 エピトープ、すなわち、 SLY (P01) 、 FLP および ILC (Core) および VLQ (Env1 ドメイン) をそれぞれ試験した。6匹の動物を Ad TG17909 + Ad TG17910 で免疫誘導し、2匹の動物を Ad TG15149 (陰性対照) で免疫誘導した。各群の半数 (Ad TG17909 + Ad TG17910 免疫誘導マウスは3匹、 Ad TG15149 免疫誘導マウスは1匹) の、 SLY ペプチドでパルスされた細胞および ILC ペプチドでパルスされた細胞を in vivo で溶解する能力を試験した。残りの半数で、ワクチン接種動物の、 FLP ペプチドでパルスされた細胞および VLQ ペプチドでパルスされた細胞を in vivo で溶解する能力を試験した。結果を図5に示す。予測されたように、 Ad TG15149 で免疫誘導したマウスでは、 HBV 特異的 in vivo 細胞溶解は検出できなかった (データは示されていない) 。 Ad TG17909 + Ad TG17910 で免疫誘導したマウスでは、2つのコアエピトープ FLP および ILC に対する in vivo 細胞溶解は弱かった。しかしながら、対照的に、 Ad TG17909 と Ad TG17910 の混合物で免疫誘導した動物は、ポリメラーゼエピトープ SLY (図5A) および Env1 エピトープ VLQ (図5B) に対して強い in vivo 細胞溶解を示し、両場合とも 50% を超える特異的溶解に達した。

### 【0187】

興味深いことに、 p01 部分、コア部分および env 部分を発現する Ad ベクターの組合せは、同時注射した3つの HBV 抗原を標的とする特異的 T 細胞応答の誘導を可能とする。誘導された T 細胞は、1つまたは2つのサイトカインを産生し、いくつかの HBV ペプチドが負荷された細胞を in vivo で溶解することができる。これらのデータを総て合わせると、記載されている組成物の免疫原活性および Ad をベクターとする場合の、それらの CDS および CD4 T 細胞応答誘導能が証明される。

### 【0188】

#### 2.3. MVA ベクター MVA TG17842 、 MVA TG17843 、 MVA TG17971 、 MVA TG17972 、 MVA TG17993 および MVA TG17994 から発現される抗原の免疫原性

実施例1.1.2~1.1.7 に記載されている MVA ベクターの1つ (MVA TG17842 、 MVA TG17843 、 MVA TG17971 または MVA TG17972 単独) で、または2つの MVA の混合物 (MVA TG17843 + MVA TG17972 、 MVA TG17843 + MVA TG17993 または MVA TG17843 + MVA TG17994) で免疫誘導した HLA-A2 トランスジェニックマウスにおいて、 MVA に基づく組成物の免疫原活性を評価した。マウスに1週間おきに3回の皮下注射を施して免疫誘導し、特異的 T 細胞応答を、ポリメラーゼドメイン、コアドメインもしくはエンベロープドメインまたは / および着目する HBV 抗原をカバーするオーバーラップペプチドのプールに存在する上記の HLA-A2 エピトープを用いた Elispot IFNg および ICS によって評価した。

### 【0189】

#### 2.5.1. ポリメラーゼ発現 MVA による免疫誘導後の Elispot アッセイによる HBV 特異的 IFN 産生細胞の評価

3匹のマウスを、末端切断および変異型ポリメラーゼ抗原を発現する MVA TG17842 または同じ末端切断および変異型ポリメラーゼの膜標的型を発現する MVA TG17843 または MVA N33.1 (陰性対照) のいずれかで免疫誘導した。ポリメラーゼ特異的 T 細胞応答を、 SLY HLA-A2 制限エピトープおよび該ポリメラーゼをカバーするペプチドのプールを用いた IFNg Elispot アッセイによって評価し

た。MVA N33.1およびMVA TG17842で免疫誘導されたマウスでは、HBV特異的T細胞応答は検出されなかった（データは示されていない）。しかしながら、図6Aに示されるように、MVA TG17843で免疫誘導した後では、HLA-A2制限エピトープSLY、およびポリメラーゼのC末端部分をカバーするペプチドプール8に特異的なIFNg産生細胞が誘導された（調べた試験条件下では、他のペプチドプール1～7に対する特異的応答は検出できなかった）。これらのデータは、MVAに基づく組成物において膜系留抗原としてポリメラーゼを発現することの利点を強調する。

#### 【0190】

#### 2.3.2. コア発現MVAによる免疫誘導の後のElispotアッセイによるEBV特異的IFN産生細胞の評価

8匹のマウスを、残基77～84を欠失したコア部分を発現するMVA TG17971、またはその末端切断型（残基149からのC末端切断）を発現するMVA TG17972、またはMVA N33.1（陰性対照）のいずれかで免疫誘導した。コア特異的T細胞応答を、HLA-A2制限エピトープ（FLPおよびILCペプチド）およびペプチドの上記コア1およびコア2プールを用いたIFNg Elispotアッセイによって測定した。図6Bに示されるように、MVA TG17971による免疫誘導により、HLA-A2制限FLPおよびILCペプチド、ならびにコア抗原をカバーする2つのペプチドプールに対して特異的な散在性T細胞応答を誘導することができる（図6B）。調べて試験条件下で供試ペプチドを用いた場合、MVA TG17972で免疫誘導したマウスにおいてコア特異的T細胞応答は検出できなかった（データは示されていない）。

#### 【0191】

#### 2.3.3. MVAベクターの組合せによる免疫誘導後のElispotアッセイによるHBV特異的IFN産生細胞の評価

3匹のマウスをMVA TG17843と、MVA TG17972、MVA TG17993およびMVA TG17994との混合物で免疫誘導し、HBV特異的T細胞応答を、上記のペプチドを用いたElispot IFNgアッセイによって評価した。

- ・ポリメラーゼ特異的T細胞応答は、MVA TG17843 + MVA TG17972（図7Aに示されるように2/3の動物で陽性応答）、MVA TG17843 + MVA TG17993（図7Bに示されるように3/3の動物で陽性応答）およびMVA TG17843 + MVA TG17994の組合せ（図7Cに示されるように2/3の動物で陽性応答）を接種した動物の大多数に検出された。IFNg産生細胞の頻度は、MVA TG17843を単独で注射した場合（図6A）に見られるものに匹敵すると思われ、ベクターの組合せは誘導される免疫応答に悪影響を及ぼさないことを示す。

- ・接種を行った動物において、調べた試験条件下では、HLA-A2またはペプチドプールを用いた場合、コア特異的応答は検出できなかった（データは示されていない）。
- ・MVA TG17993を含む組合せで接種を行った動物において、調べた試験条件下では、Env1 HLA-A2またはペプチドプールを用いた場合、env特異的応答は検出できなかった（データは示されていない）。

- ・図7Cに示されるように、MVA TG17994を含む組合せで免疫誘導した3匹のうち2匹の動物において、HLA-A2制限GLSエピトープおよびEnv2をカバーするペプチドプールの双方に対するEnv2 - 特異的T細胞応答が検出された（これらの試験条件下ではEnv1ドメインに対するT細胞応答は検出できなかった（データは示されていない））。

#### 【0192】

同じ条件でICSアッセイを行ったところ、Elispotアッセイで見られた結果が確認された（データは示されていない）。

興味深いことに、pol部分、コア部分およびenv部分を発現するMVAベクターの組合せは、同時注射したpolおよびenv抗原を標的とする特異的T細胞応答の誘導を可能とする。

これらのデータを考え合わせると、記載されている組成物の免疫原活性およびそれらの

10

20

30

40

50

、主要なHBV抗原に対するT細胞応答誘導能が証明される。

【図面の簡単な説明】

【0193】

【図1】アデノウイルスおよびMVA感染細胞からのHBVポリペプチドの発現を示す。A549細胞またはニワトリ胚纖維芽細胞は、アデノウイルスにはMOI10もしくは50、MVAにはMOI0.2もしくは1で感染させ、感染48時間後に細胞を溶解させた。次に、種々のAd(図1A)およびMVA(図1B)構築物に感染した細胞から得た細胞溶解液を用いてウエスタンプロットを行い、特異的HBVタンパク質を検出した。コア含有ポリペプチドを、一次抗体としての抗P01抗体(8D5、1/200希釈)とともに抗コア抗体(C1~5または13A9、1/200希釈)およびポリメラーゼ含有ポリペプチドを用いて検出し、二次抗体はHRPと結合させた。AdTG17909およびAdTG17910によって発現されるタンパク質の予測サイズはそれぞれ31.6kDaおよび88.5kDaである。MVA TG17971、MVA TG17972、MVA TG17993およびMVA TG17994によって発現されるタンパク質の予測サイズはそれぞれ20.2kDa、15.8kDa、20kDaおよび23.5kDaである。MVA TG17842およびMVA TG17843によって発現されるタンパク質の予測サイズはそれぞれ88.5kDaおよび98.2kDaである。10

【図2】ELISPOTS IFN アッセイにおける、アデノウイルスによってコードされるHBVポリペプチドの免疫原性を示す。5匹の各マウス(HLA-A2トランジエニックマウス)にAdTG17909単独(黒いバー)、AdTG17910単独(白いバー)または組合せ(AdTG17909+AdTG17910)(グレーのバー)のいずれかで1回免疫誘導を行った。図2Aは、HLA-A2制限ペプチドSLY(配列番号55)または無関連のもの(示されていない)を用いた場合のポリメラーゼタンパク質を標的とする特異的T細胞応答を示す。図2Bは、HLA-A2制限ペプチドFLP(配列番号56)またはILC(配列番号57)を用いた場合のコアタンパク質を標的とする特異的T細胞応答を示す。図2Cは、HLA-A2制限ペプチドVLQ(配列番号58)、FLG(配列番号59)またはGLS(配列番号60)を用いた場合のEnvドメインを標的とする特異的T細胞応答を示す。各バーは各ワクチン接種マウスを表し、斜線のバーは各群の中央値を表す。結果は、3反復のウェルから得られた $10^6$ 個の脾臓細胞で観察されたスポット数の平均値として示す。スポット数が $10^6$ 個の細胞当たり50スポットより多ければ、応答を陽性とみなした(このカットオフを黒い太線で表す)。2030

【図3】細胞内サイトカイン染色アッセイにおける、アデノウイルスベクターによってコードされたHBVポリペプチドの免疫原性を示す。5匹の各マウス(HLA-A2トランジエニックマウス)にAdTG17909(図3B)、AdTG17910(図3A)またはAdTG17909とAdTG17910の組合せ(図3C)のいずれかで1回免疫誘導を行った。脾細胞を各HLA-A2制限ペプチド(P01ではSLY、CoreではFLP、ILC、EnvではVLQ、FLGおよびGLS)または無関連のものの存在下、Golgi-Plugを用いて5時間培養した。各HLA-A2制限エピトープに特異的なサイトカイン(IFNgおよび/またはTNFa)を産生するCD8+細胞の割合%をICSアッセイによって評価した。各バーは各ワクチン接種マウスを表し、IFNg産生細胞を黒いバーで、TNFa産生細胞を白いバー、IFNg+TNFa産生細胞を斜線のバーで表し、マウスごとにこれらの細胞集団を総て積み上げた。40

【図4】細胞内サイトカイン染色アッセイによって検出された、アデノウイルスベクターによってコードされたHBVポリペプチドのCD8およびCD4 T細胞応答誘発能を示す。5匹の各マウス(HLA-A2トランジエニックマウス)にAdTG17909およびAdTG17910の混合物で1回免疫誘導を行った。脾細胞を、各HLA-A2制限ペプチド(P01ではSLY、CoreではFLP、ILC、EnvではVLQ、FLGおよびGLS)または抗原性ドメイン全域または無関連のペプチドをカバーするオーバーラップペプチドのプール(11のアミノ酸がオーバーラップする15aa、Coreで2プールのペプチド、Envで2プールのペプチド)の存在下、Golgi-Plugを50

用いて5時間培養した。IFN および/またはTNF を産生する、誘導された特異的CD8 T細胞(図4A)、ならびにIFN および/またはTNF を産生する(図4B)またはIFN および/またはSL2を産生する(図4C)、誘導された特異的CD4 T細胞を、ICSアッセイによってモニタリングした。各バーは各ワクチン接種マウスを表し、IFNg 産生細胞をグレーのバー、TNFa またはIL2 産生細胞を白いバーおよびIFNg + TNFa またはIFNg + IL2 産生細胞を斜線のバーで表し、マウスごとにこれらの細胞集団を総て積み上げた。各群の中央値も示す。

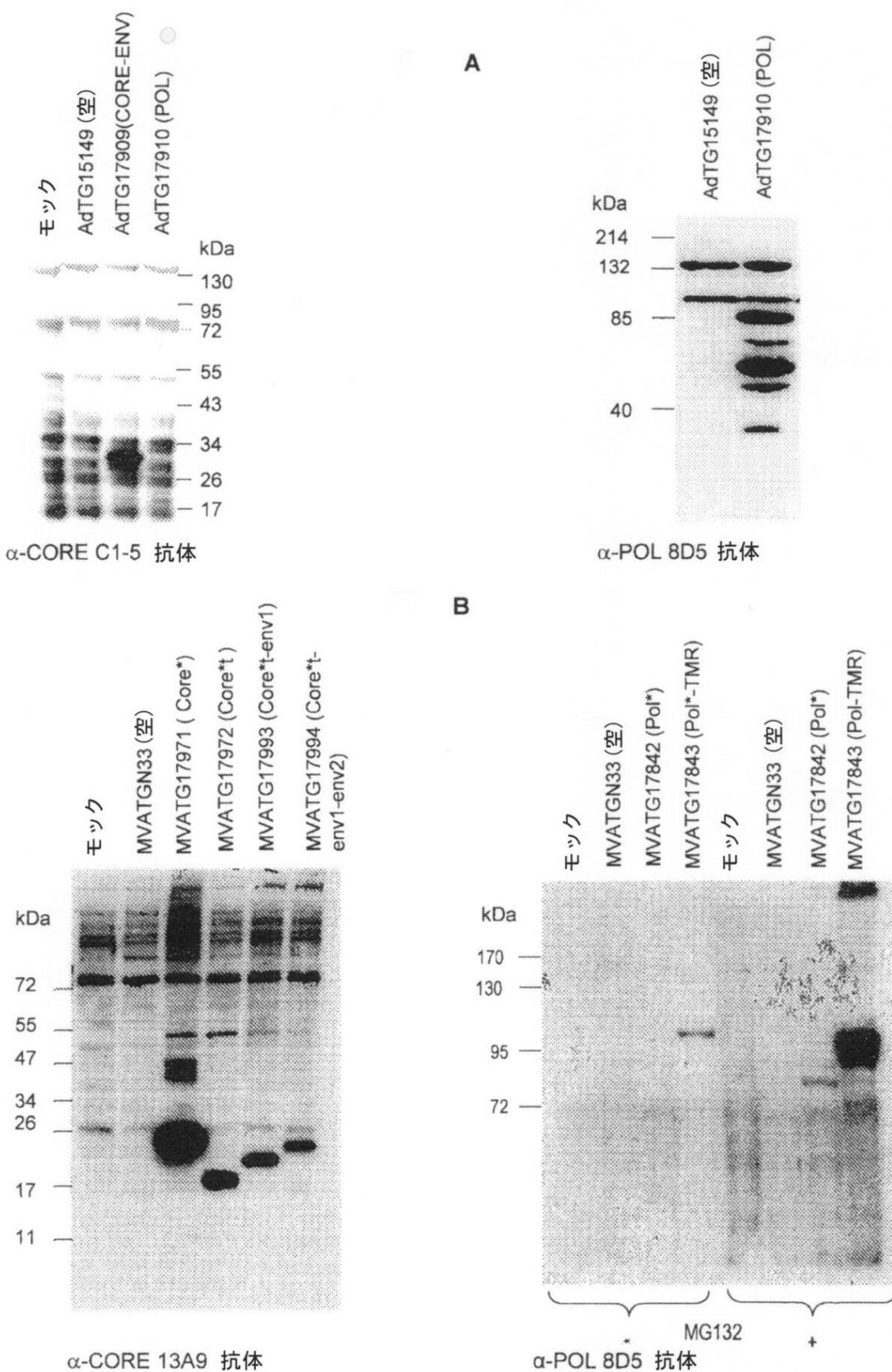
【図5】HBVポリペプチドをコードするアデノウイルスベクターの、HBV HLA-A2制限エピトープが負荷された標的細胞に対してin vivoで機能的細胞溶解を誘導する能力を示す。3匹の各マウス(HLA-A2トランスジェニックマウス)に、AdTG17909およびAdTG17910の組合せ(M1～M3)で1回免疫誘導を行い、陰性対照(M0)として1匹のマウスに、エンブティーアデノウイルスベクターで免疫誘導を行った。HBV HLA-A2エピトープが負荷されたまたは負荷されない(陰性対照)同系マウスからのCFSE染色脾細胞をワクチン接種マウスに静注した。24時間後、各マウスに対してフローサイトメトリーにより、染色細胞のin vivo溶解を評価し、材料および方法に示されているように計算した。AdHBVを接種した3匹のマウスに関して、各ペプチドで見られた特異的溶解の平均値を計算し、示した(平均値M1～M3)。

【図6】Elisots IFN アッセイによって決定された、MVAベクターによってコードされるHBVポリペプチドの免疫原性を示す。各マウス(HLA-A2トランスジェニックマウス)に、MVA TG17842またはMVA TG17843(図6A)またはMVA TG17971(図6B)またはMVA TG17972または陰性対照MVA TG N33.1(データは示されていない)のいずれかで、1週間おきに3回、免疫誘導を行った。図6Aは、MVA TG17842(濃いグレーのバー)またはMVA TG17843(薄いグレーのバー)で免疫誘導を行った後、HLA-A2制限ペプチドSLY(配列番号55)、ポリメラーゼタンパク質のC末端部分をカバーするペプチドのプール8(11アミノ酸/プールがオーバーラップする15アミノ酸の25ペプチド)、無関連のペプチドまたは媒体(陰性対照)を用いた場合の、ポリメラーゼタンパク質を標的とする特異的T細胞応答を示す。図6Bは、MVA TG17971で免疫誘導を行った後、HLA-A2制限ペプチドFLP(配列番号56)、ILC(配列番号57)、ペプチドプール「コア1およびコア2」(11アミノ酸/プールがオーバーラップする15アミノ酸の21～22ペプチド)、無関連のペプチドまたは媒体(陰性対照)を用いた場合の、コアタンパク質を標的とする特異的T細胞応答を示す。各バーは各ワクチン接種マウスを表し、斜線のバーは各群の平均値を示す。結果は、3反復のウェルから得られた10<sup>6</sup>個の脾臓細胞で観察されたスポット数の平均値として示す。スポット数が10<sup>6</sup>個の細胞当たり50スポットより多ければ、応答を陽性とみなした(このカットオフを黒い点線で表す)。

【図7】Elisots IFN アッセイによって決定された、マウスに同時注射されたMVAベクターによってコードされるHBVポリペプチドの免疫原性を示す。各マウス(HLA-A2トランスジェニックマウス)に、MVA TG17843と、MVA TG17972(図7A)もしくはMVA TG17993(図7B)もしくはMVA TG17994(図7C)いずれかとの混合物で、または陰性対照としてのMVA TG N33.1単独(データは示されていない)で、1週おきに3回、免疫誘導を行った。HLA-A2制限ペプチドSLY(配列番号55)を用いた場合のポリメラーゼタンパク質を標的とする特異的T細胞応答、およびHLA-A2制限ペプチドGLS(配列番号60)またはEnv2ドメインをカバーするペプチドプール(11アミノ酸がオーバーラップする15アミノ酸長のペプチドのプール)を用いた場合のEnvドメインを標的とする特異的T細胞応答を決定した。無関連のペプチドおよび媒体を陰性対照として用いた。各バーは各ワクチン接種マウスを表し、斜線のバーは各群の平均値を表す。結果は、3反復のウェルから得られた10<sup>6</sup>個の脾臓細胞で観察されたスポット数の平均値として示す。スポット数が10<sup>6</sup>個の細胞当たり92スポットより多ければ、応答を陽性とみなした(

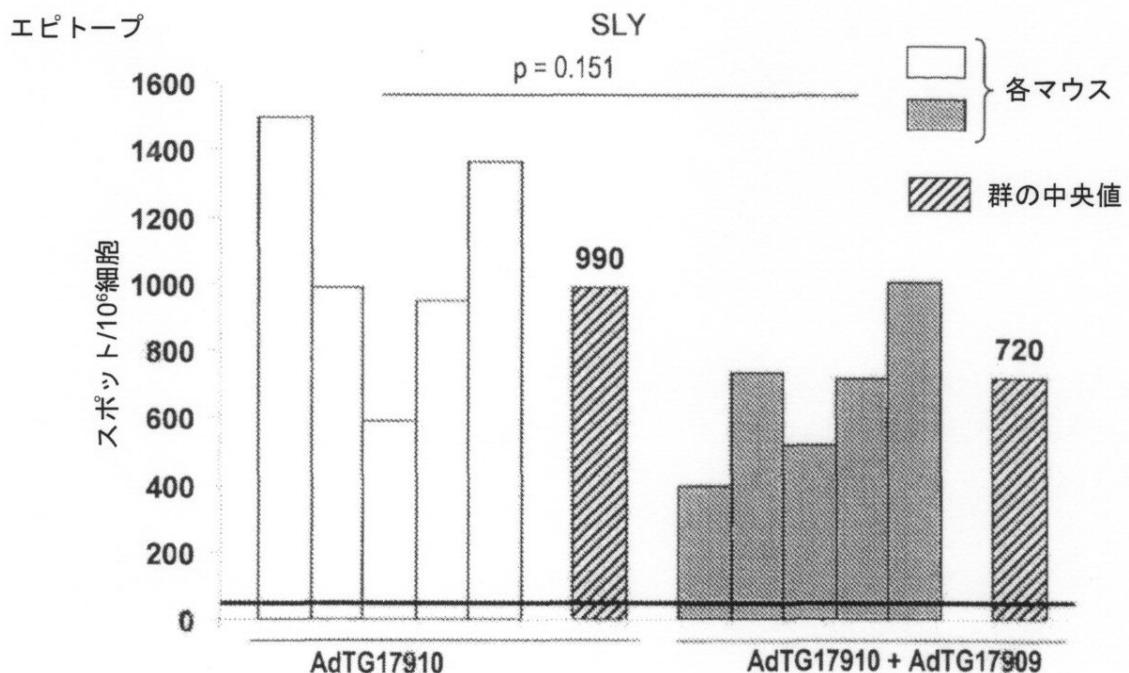
このカットオフを黒い点線で表す)。

【図1】

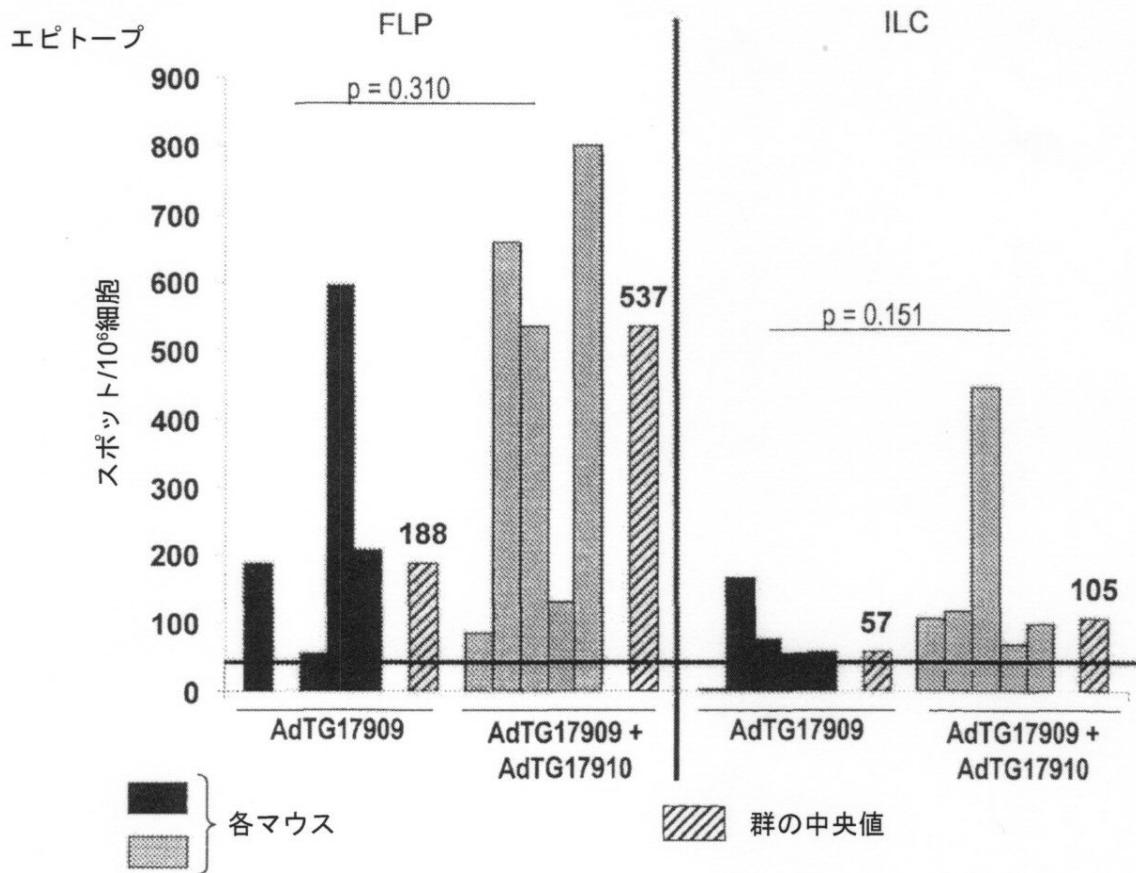


【図2-1】

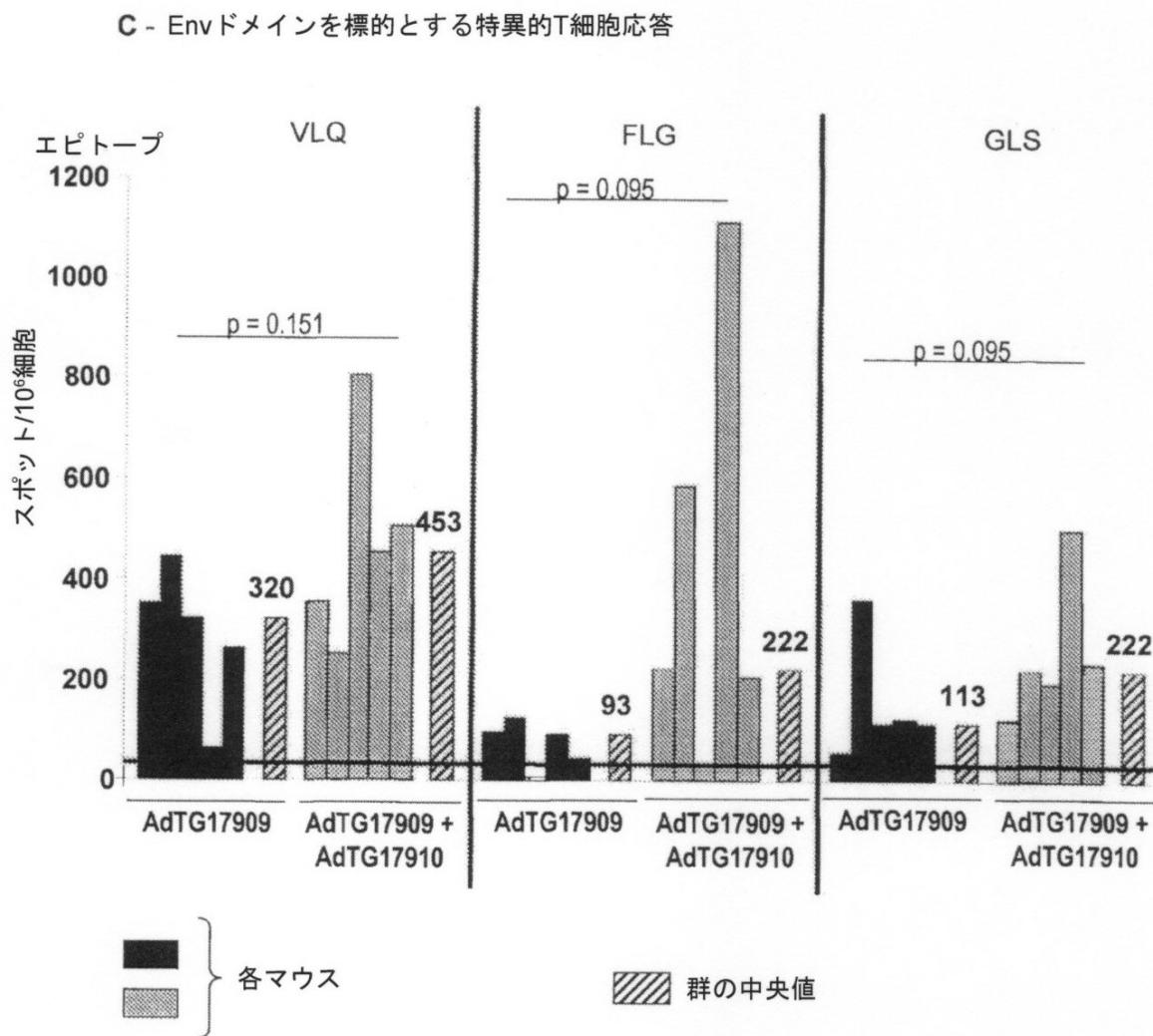
## A - Polタンパク質を標的とする特異的T細胞応答



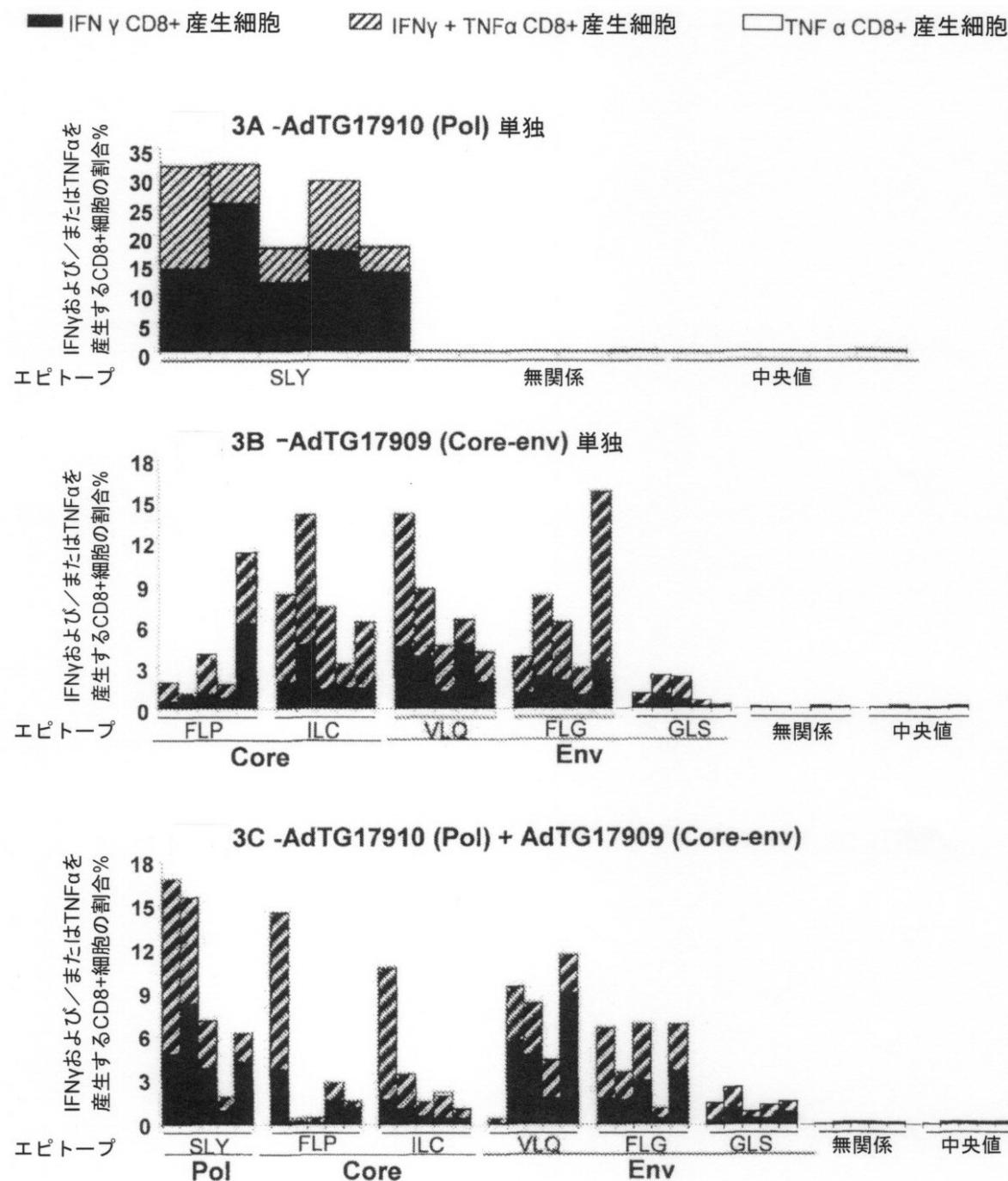
## B - Coreタンパク質を標的とする特異的T細胞応答



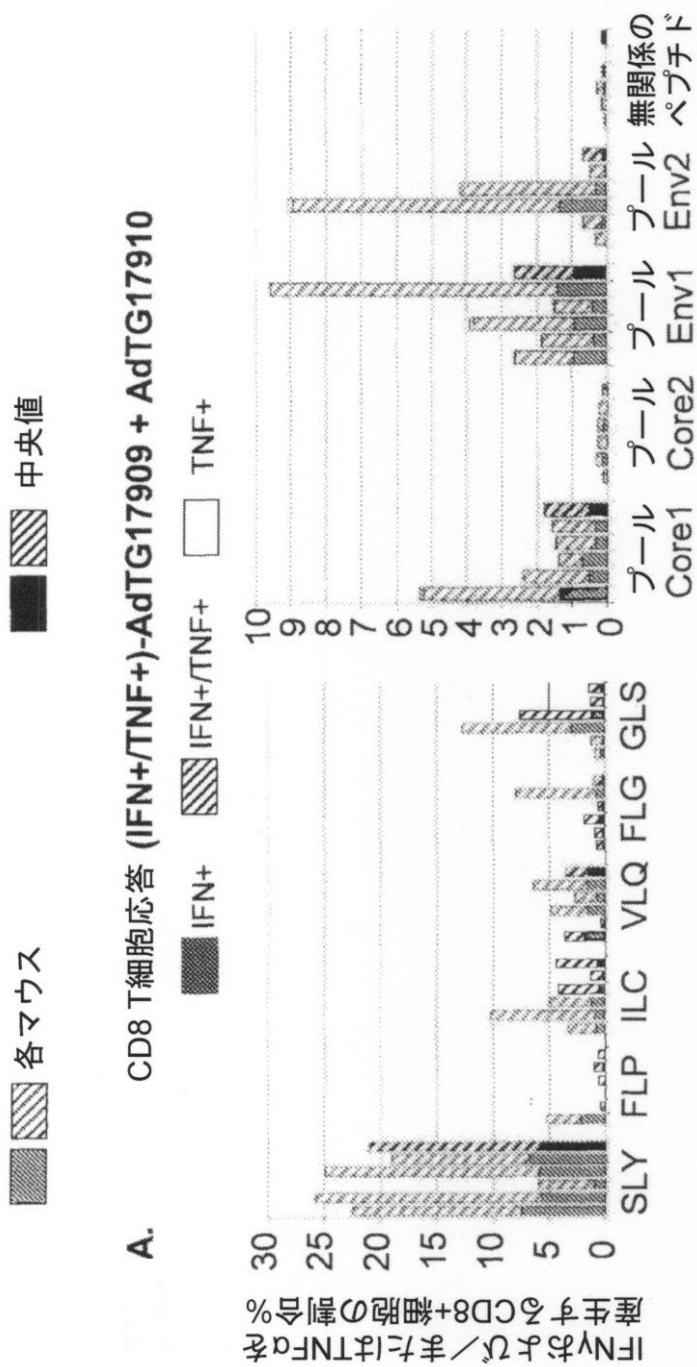
【図2-2】



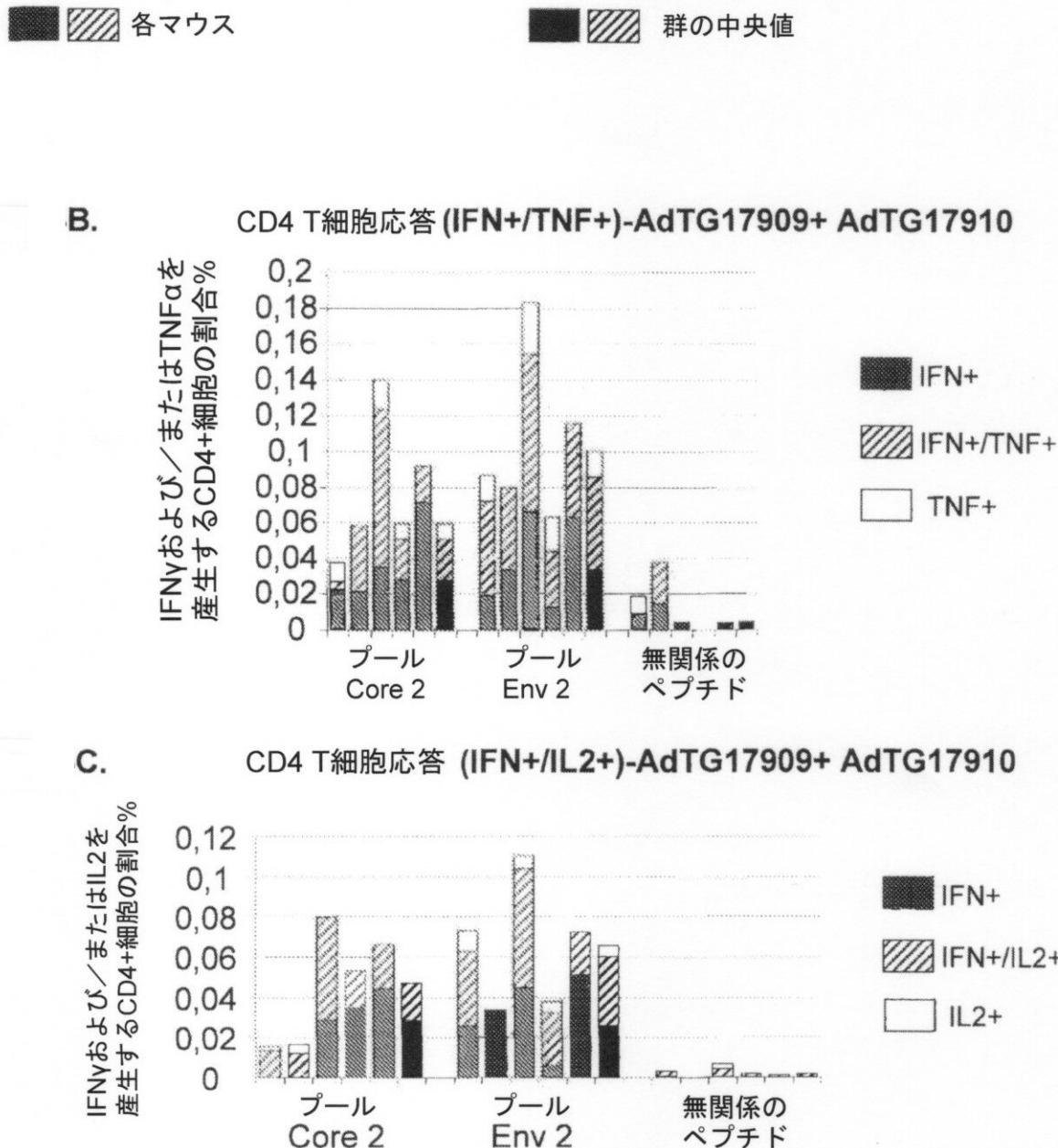
【図3】



【図4-1】

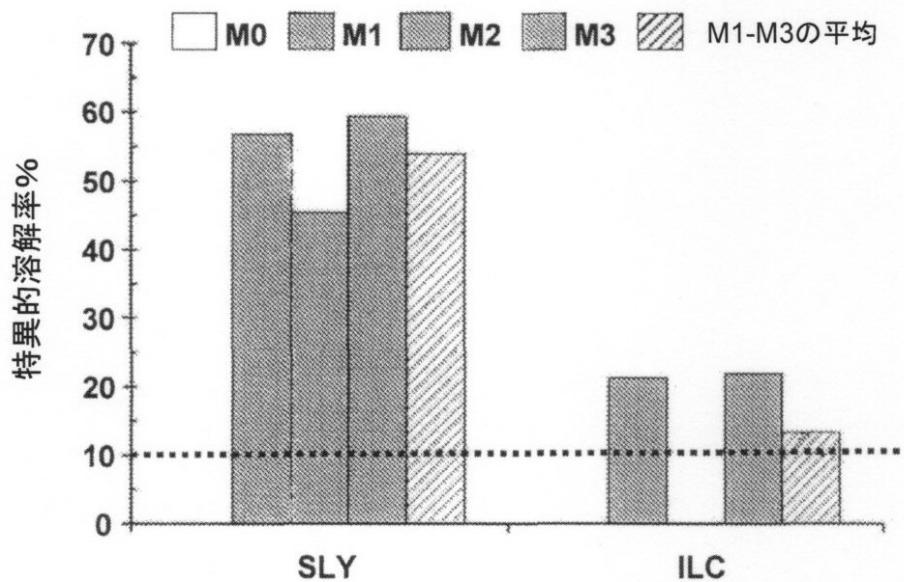


【図4-2】

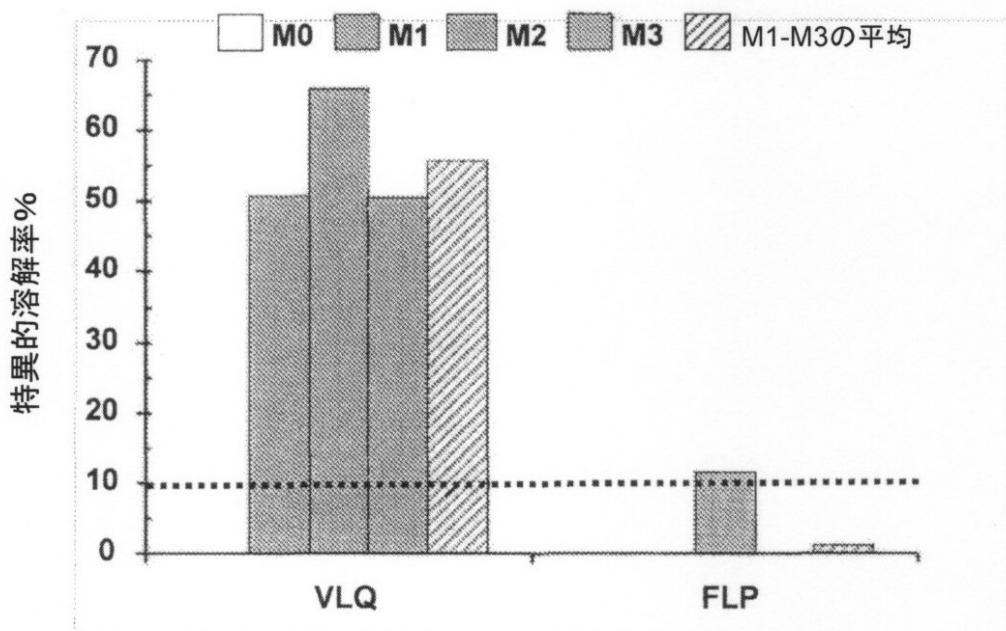


【図5】

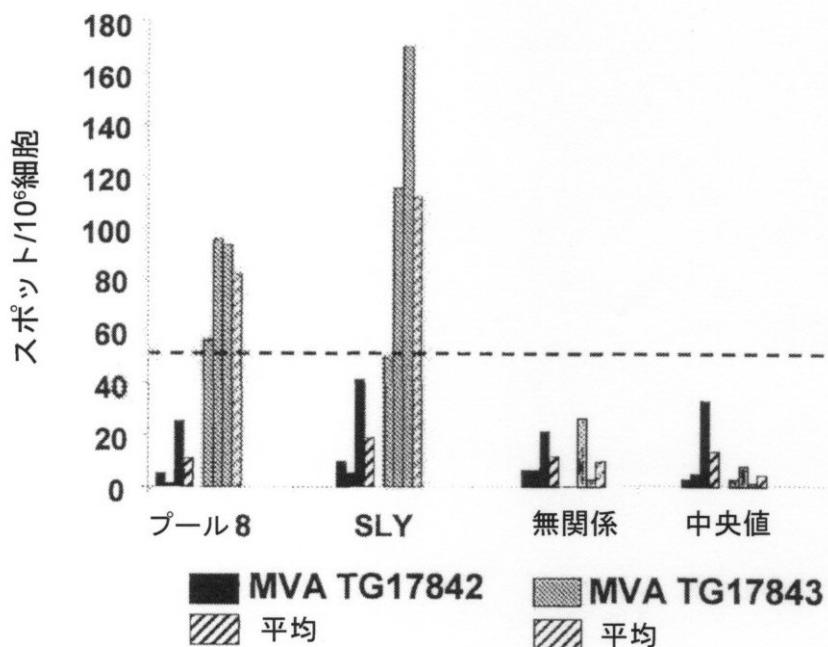
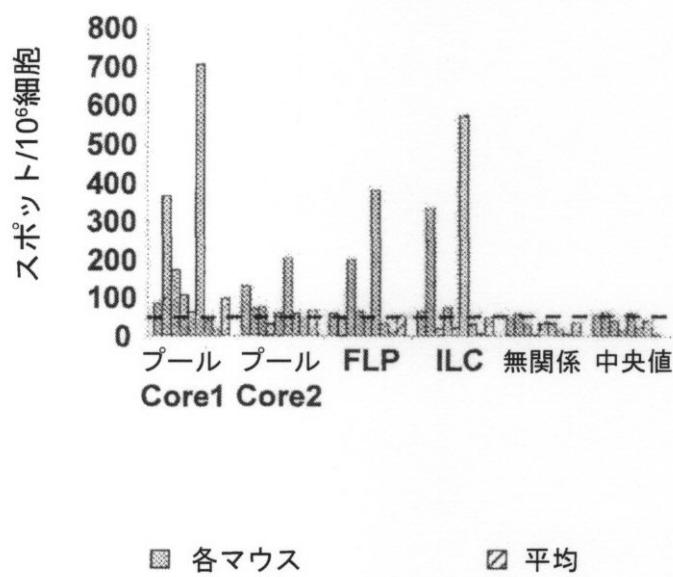
## A. AdTG17909 + AdTG17910. SLYおよびILCペプチドに対するin vivo溶解



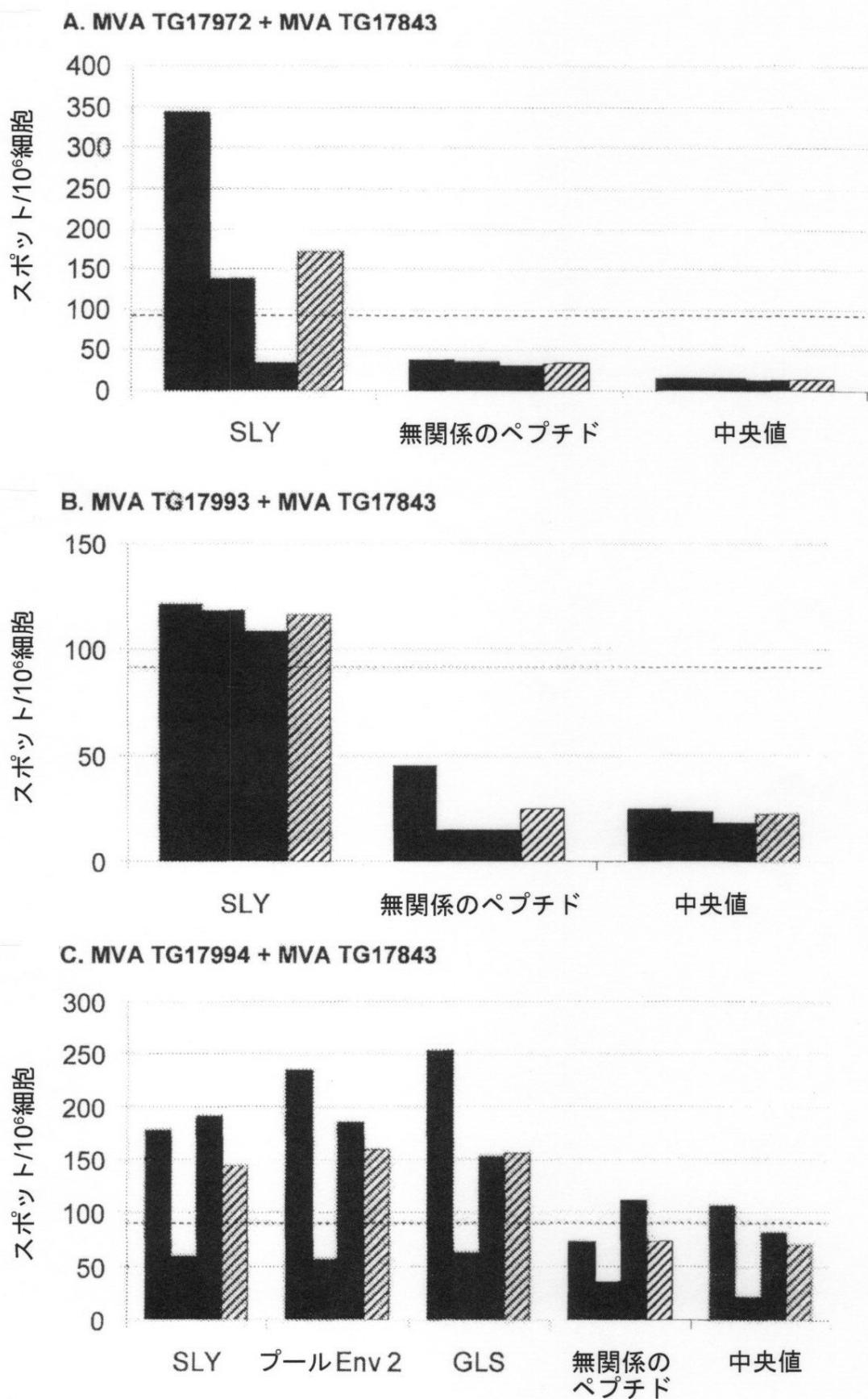
## B. AdTG17909 + AdTG17910. FLPおよびVLQペプチドに対するin vivo溶解



【図6】

**A. MVA TG17842またはMVA TG17843****B. MVA TG17971**

【図7】



## 【配列表】

0005897464000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 07 K 14/08 (2006.01) C 07 K 14/08  
C 07 K 19/00 (2006.01) C 07 K 19/00

(72)発明者 ペリーヌ、マルタン  
フランス国リル、ダボー、リュ、デュ、ディディエ、10、テル  
(72)発明者 ジェネビーブ、アンショブ  
フランス国リヨン、リュ、ビヨン、4  
(72)発明者 ナタリー、シルベストル  
フランス国エルグエルシャイム、リュ、デ、イリス、6  
(72)発明者 ドリス、シュミット  
フランス国プロブシャイム、リュ、アリストイド、ブリアン、6

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第2008/020656 (WO, A1)  
国際公開第2005/056051 (WO, A1)  
特表平11-508766 (JP, A)  
特表2007-534296 (JP, A)  
JOURNAL OF VIROLOGY, 2001年, Vol.75, p.11827-11833

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 61 K 39/00 - 39/44  
C A P L U S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)