

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6153473号
(P6153473)

(45) 発行日 平成29年6月28日 (2017. 6. 28)

(24) 登録日 平成29年6月9日 (2017. 6. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/02 (2006. 01)

C O 7 K 14/02

A 6 1 K 31/7088 (2006. 01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 39/29 (2006. 01)

A 6 1 K 39/29

A 6 1 K 39/39 (2006. 01)

A 6 1 K 39/39

請求項の数 18 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-553641 (P2013-553641)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月13日 (2012. 2. 13)
 (65) 公表番号 特表2014-507146 (P2014-507146A)
 (43) 公表日 平成26年3月27日 (2014. 3. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/024905
 (87) 国際公開番号 W02012/109668
 (87) 国際公開日 平成24年8月16日 (2012. 8. 16)
 審査請求日 平成27年2月6日 (2015. 2. 6)
 (31) 優先権主張番号 61/442, 162
 (32) 優先日 平成23年2月11日 (2011. 2. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 500429103
 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー
 シティ オブ ペンシルバニア
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 191
 04-6283, フィラデルフィア,
 チェスナット ストリート 3160,
 スイート 200
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ウェイナー, デイビッド ビー
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 190
 66, メリオン, ビーコン レーン
 717

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型肝炎ウイルスコアタンパク質をコードする核酸分子およびそれを含むワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 を含むタンパク質をコードするコード配列を含む、核酸分子。

【請求項 2】

前記タンパク質の N 末端に連結されるシグナルペプチドをコードするコード配列を更に含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 からなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質をコードする、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 1 を含む核酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記核酸配列の 5' 末端に連結されるシグナルペプチドをコードする核酸配列を更に含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 1、配列番号 3、および配列番号 5 からなる群から選択される 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記核酸分子がプラスミドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記核酸分子が発現ベクターであり、前記 1 つ以上のタンパク質をコードする配列が調節要素に動作可能に連結される、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記核酸分子がウイルス粒子に組み込まれる、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、個人において H B V 抗原に対する免疫応答を誘導するための組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、個人を H B V 感染から保護するための組成物。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、H B V 感染と診断された個人を保護するための組成物。

【請求項 13】

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、タンパク質。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のタンパク質を含む、個人において H B V 抗原に対する免疫応答を誘導するための組成物。

【請求項 15】

請求項 13 に記載のタンパク質を含む、個人を H B V 感染から保護するための組成物。

【請求項 16】

請求項 13 に記載のタンパク質を含む、H B V 感染と診断された個人を保護するための組成物。

【請求項 17】

請求項 1 に記載の核酸分子と、

アジュバント分子と、

を含む、対象における H B V に対する免疫応答の生成に有用なワクチン。

【請求項 18】

前記アジュバントが、I L - 12、I L - 15、I L - 28、またはランテスである、請求項 17 に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、B 型肝炎ウイルス (H B V) コアタンパク質およびそのフラグメントをコードする核酸配列、B 型肝炎ウイルス (H B V) コアタンパク質およびそのフラグメント、改善された H B V ワクチン、H B V に対する免疫応答を誘導するための方法改善、ならびに個人を H B V に対して予防的および / または治療的に免疫化するための方法改善に関する。

【背景技術】

【0002】

本出願は、参照として本明細書に組み込まれる、2011 年 2 月 11 日出願の米国特許仮出願第 61 / 442,162 号の優先権を主張する。

【0003】

B 型肝炎は、世界中で流行している一般的な感染症であり、肝硬変、肝不全、および肝細胞癌の発生につながる。相当数の肝炎症例が、この疾患の無症候性のため、報告されていない。それにもかかわらず、約 3 億 5 千万件の慢性 B 型肝炎の症例が毎年報告されている。肝炎に感染した人口の大部分は、発展途上国または開発途上国の人々である。

【0004】

ウイルスは、そのエンベロープタンパク質上に存在する抗原エピトープに基づいて、4 つの主な血清型 (a d r、a d w、a y r、a y w) に分類される。ゲノム配列の変

10

20

30

40

50

異に従って、HBVには少なくとも8つの遺伝子型（A～H）が存在する。HBVの代替の遺伝子型は、流行した地理的分布を有する。

【0005】

表1 HBV遺伝子型の地理的分布。

【表1】

表1－HBVの地理的分布

HBV 遺伝子型	HBV 遺伝子型	HBsAG 亜型	頻度	主な地理的分布
A	A2	adw2	高	ヨーロッパ、北アメリカ、オーストラリア
	A1	ayw1, adw2	高	アフリカ
B	B1 B2, B3	adw2	高	極東
	B4	ayw1	高	極東
	B2	adw3	低	極東
C	C1, C2, C4	adr	高	極東
	C3	adrq-	高	ニューギニア、太平洋
	C1, C2	ayr	高	極東
	C1, C3	adw2	低	極東
	C4	ayw3	低	極東、太平洋
D	D1, D3, D4	ayw2	高	西アジア、東ヨーロッパ、地中海
	D2, D3	ayw3	高	世界中
	未確認	adw3	低	東ヨーロッパ、スペイン
	D2	ayw4	低	東ヨーロッパ、スペイン、米国
E	-	ayw4	高	アフリカ
F	F1, F2	adw4q-	高	ラテンアメリカ、アラスカ、太平洋
	F1, F2	ayw4	低	ラテンアメリカ
G	-	adw2	低	ヨーロッパ、北アメリカ
H	-	ayw4	低	中央アメリカ

J. Med. Virol., DOI 10.1002/jmv

【0006】

HBVゲノムは、主に二本鎖であるが、他方よりも長い一本の鎖から生じる一本鎖の領域を有する、環状DNA分子である。二本鎖領域は、約3020長のヌクレオチドの短鎖の一本鎖と約3320長のヌクレオチドの長鎖の一本鎖とのハイブリダイゼーションから生じる。その長鎖のハイブリダイズされていないヌクレオチド上の一本鎖領域は、HBV DNAポリメラーゼと関連している。HBVゲノムDNAおよびHBV DNAポリメラーゼは、両方ともに、複数のHBVコアタンパク質（HBcAg）分子によって形成されるヌクレオカプシド内に含有される。HBVコアタンパク質は、HBV表面タンパク質（HBsAg）および脂質分子によってエンベロープされる。

【0007】

HBVゲノムは、4つのオープンリーディングフレーム（ORF）：1）HBV DNAポリメラーゼをコードするORF、2）2つの開始コドンを含むORF（ここで、第2開始コドンに連結された配列は、コアタンパク質をコードし、追加の上流開始コド

ンを含む配列は、pre-Cと呼ばれる配列をコードする)、3)3つの開始コドンを含むORF(ここで、1つは、表面タンパク質(gp27)をコードし、1つはpre-S2と呼ばれる配列(gp36)をコードする上流開始コドンを含み、pre-S1と呼ばれる配列(gp42)をコードする更に上流の開始コドンを含む別のもの)、ならびに4)その機能がよく理解されていないタンパク質であるHBxAgをコードするORF、を含有する。

【0008】

HBV感染の予防ワクチンおよび治療は、慢性保菌者の血漿から精製されたサブウイルス粒子、または安定的にトランスフェクトされた真核細胞系において組換えタンパク質として産生されたサブウイルス粒子の注射を伴う。サブウイルス粒子はウイルスタンパク質であり、そのようなワクチンは、多くの場合、サブユニットワクチンと呼ばれる。HBVタンパク質は、個人に投与されて、個人の免疫系の標的になる。非感染の個人では、サブユニットワクチンに対する免疫応答は、HBV感染から非感染の個人を保護する。感染した個人では、ワクチンにより誘導される免疫応答は、治療効果を有することができる。

【0009】

Chisari F.V., Am J Pathol., 2000, 156: 1117-1132およびPumpeus P. et al. Intervirology 2001, 44: 98-114は、HBVゲノム構造を開示する。Deny P.およびF. Zoulim, Pathologie Biologie 2010, Aug, 58(4): 245-53は、B型肝炎ウイルス診断および治療について考察する。Michel M.L.およびP. Tiollais, Pathologie Biologie 2010, Aug, 58(4): 288-95は、B型肝炎ワクチン、ならびにこれらの保護効果および治療可能性について考察する。特許文献1は、HBVアミノ酸配列を有するポリペプチド配列を含有する免疫原の使用を開示する。特許文献2は、HBVコード配列、タンパク質、ならびに組換え全長HBV表面抗原およびHBVコア抗原を含むワクチンを含むワクチンを開示する。HBV表面抗原は、全体として、3種類の表面タンパク質(Lタンパク質、Mタンパク質、およびSタンパク質)から構成される。特許文献3は、HBVコード配列、タンパク質、およびヒトにおける発現が最適化されたコドンであるB型肝炎ウイルスコア抗原をコードする核酸を含むワクチンを開示する。特許文献4は、組換えベクターを使用するHBV配列の送達を開示する。

【0010】

利用可能なHBVワクチンは、いくつかの効能を示すが、産生するには費用がかかる。加えて、血漿誘導サブユニットワクチンも、安全性に関して問題を有する。組換え生ベクター、合成ペプチド、およびHBVタンパク質のコドン最適化コード配列を含むDNAワクチンが含まれる幾つかのワクチン手法が、探求されてきた。これらの他の手法は、今までのところ様々な限定された効能を有してきた。加えて、ゲノムの差に起因して、幾つかのHBVワクチンは、幾つかの地理上の地域において肯定的な効能を示し、他の地域では限定された効能を示した。

【0011】

動物およびヒトの疾患に対してワクチン接種するための核酸配列の直接投与が研究されており、所望の抗原の必要な発現を生じ、免疫応答をもたらす、最終的にこの技術の成功をもたらすために、多くの努力が、核酸送達の効果的および効率的な手段に焦点を合わせてきた。

【0012】

DNAワクチンは内在抗原合成を可能にし、このことは、サブユニットワクチンではめったに得られない、CD8+組織適合性複合体のクラスI制限細胞障害性Tリンパ球を誘導する。加えて、持続期間にわたって発生する抗原合成は、低い応答性の克服を助け、追加免疫注射の必要性を排除または低減することができる。更に、DNAワクチンは、非常に安定し、産生することが簡単であると思われる。更に、広範囲の細胞免疫応答は、

10

20

30

40

50

コドン最適化、RNA最適化、および免疫グロブリンリーダー配列の付加のような戦略の組み合わせによって誘導することができる。

【0013】

DNAワクチンは、安全で、安定しており、容易に産生され、ヒトにおいて十分に許容され、前臨床試験はプラスミド組込みの証拠をほとんど示していない [Martin, T., et al., Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. Hum Gene Ther, 1999. 10(5): p. 759-68、Nichols, W.W., et al., Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Ann N Y Acad Sci, 1995. 772: p. 30-9]。加えて、DNAワクチンは、ワクチンの効能がベクターに対する概存抗体価による影響を受けないので、反復投与に十分に適している [Chattergoon, M., J. Boyer, and D.B. Weiner, Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. FASEB J, 1997. 11(10): p. 753-63]。しかし、DNAワクチンの臨床適応における1つの主な障害は、より大型の動物に移ったときのプラットフォームの免疫原性の減少である [Liu, M.A. and J.B. Ulmer, Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. Adv Genet, 2005. 55: p. 25-40]。

【0014】

DNAワクチン免疫原の操作における最近の技術的進歩は、コドン最適化、RNA最適化、および免疫グロブリンリーダー配列の付加のような、DNAワクチンの発現および免疫原性を改善し [Andre, S., et al., Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. J Virol, 1998. 72(2): p. 1497-503、Deml, L., et al., Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. J Virol, 2001. 75(22): p. 10991-1001、Laddy, D.J., et al., Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza. Vaccine, 2007. 25(16): p. 2984-9、Frelin, L., et al., Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene. Gene Ther, 2004. 11(6): p. 522-33]、ならびに電気穿孔のようなプラスミド送達系における技術を、最近開発している [Hirao, L.A., et al., Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. Vaccine, 2008. 26(3): p. 440-8、Luckay, A., et al., Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesu

s macaques. J Virol, 2007. 81(10): p. 5257-69
、 Ahlen, G., et al., In vivo electroporation
enhances the immunogenicity of hepatitis
s C virus nonstructural 3/4A DNA by incr
eased local DNA uptake, protein expressio
n, inflammation, and infiltration of CD3+
T cells. J Immunol, 2007. 179(7): p. 4741-53]
。インビボ電気穿孔技術は、ヒト臨床試験においてブレオマイシンのような抗癌薬を送達
するため、および多くの前臨床研究において多数の動物種に使用されてきた。加えて、研
究は、コンセンサス免疫原の使用が、未変性抗原単独と比較して、細胞免疫応答の幅を拡大
できることを示唆している[Yan, J., et al., Enhanced cel
lular immune responses elicited by an en
gineered HIV-1 subtype B consensus-based
envelope DNA vaccine. Mol Ther, 2007. 15(2
) : p. 411-21、Rolland, M., et al., Reconstruct
ion and function of ancestral center-of-
tree human immunodeficiency virus type 1
proteins. J Virol, 2007. 81(16): p. 8507-14]
。

10

【0015】

20

HBV抗原をコードする核酸構築物、およびHBVに対して免疫応答を誘導するの
に有用な組成物の必要性が、依然として存在する。経済的であり、効果的である、HBV
に対して効果的なワクチンの必要性が、依然として存在する。中和抗体レベルを増加し、
T細胞成分を誘発する効果的なワクチンの必要性が、依然として存在する。広範囲の遺伝
子型を有するHBV株に対して効果的であるものを含む、HBVに対して効果的なワクチ
ン、および好ましくは世界中で効果的である汎用ワクチンの必要性が、依然として存在す
る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0016】

30

【特許文献1】国際公開第2004/026899号

【特許文献2】国際公開第2008/093976号

【特許文献3】国際公開第2009/130588号

【特許文献4】国際公開第2010/127115号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明の態様には、HBVに対して免疫応答を誘導するのに有用なワクチンが含ま
れる。多数の遺伝子型に対する広範囲の有効性を有するHBV免疫治療ワクチンの開発は
、普遍的に保存されたHBVコア特異的抗原を標的にすることに基づいた、HBV感染の
治療DNAワクチンを使用することによってもたらすことができる。コンセンサスHBV
免疫原の利用は、より広範囲の細胞免疫応答を誘導し、異なるウイルス株の間で配列非類
似性の程度を最小限にするのに有用であり得る。

40

【0018】

本明細書において提供されるものは、配列番号2を含むタンパク質、配列番号2と
95%相同であるタンパク質、配列番号2のフラグメント、配列番号2のフラグメントと
95%相同であるタンパク質、配列番号4、配列番号4と95%相同であるタンパク質、
配列番号4のフラグメント、配列番号4のフラグメントと95%相同であるタンパク質、
配列番号6、配列番号6と95%相同であるタンパク質、配列番号6のフラグメント、お
よび配列番号6のフラグメントと95%相同であるタンパク質からなる群から選択される

50

タンパク質である。

【 0 0 1 9 】

上記に記載された 1 つ以上のタンパク質分子をコードする配列を含む核酸分子も、提供される。幾つかの実施形態において、核酸分子は、配列番号 1、配列番号 1 と 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 1 のフラグメント、配列番号 1 のフラグメントと 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 3、配列番号 3 と 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 3 のフラグメント、配列番号 3 のフラグメントと 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 5、配列番号 5 と 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 5 のフラグメント、および配列番号 5 のフラグメントと 9 5 % 相同である核酸配列からなる群から選択される配列を含む。

【 0 0 2 0 】

本発明の幾つかの態様は、そのような核酸分子および / または組成物を個人に投与するステップを含む、1 つ以上の H B V 遺伝子型からのコア抗原に対して免疫応答を誘導する方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明の追加的な態様は、個人を H B V 感染から保護する方法を提供する。方法は、そのような核酸配列または組成物を含む核酸分子の予防有効量を前記個人に投与するステップを含み、ここで、核酸配列は、前記個人の細胞において発現され、保護免疫応答は、前記核酸配列によりコードされたタンパク質に対して誘導される。

【 0 0 2 2 】

本発明の幾つかの態様において、H B V に感染している個人を治療する方法が提供される。方法は、そのような核酸分子および / または組成物の治療有効量を前記個人に投与するステップを含む。

【 0 0 2 3 】

本発明の態様は、追加的に、配列番号 2 を含むタンパク質、配列番号 2 と 9 5 % 相同であるタンパク質、配列番号 2 のフラグメント、配列番号 2 のフラグメントと 9 5 % 相同であるタンパク質、配列番号 4、配列番号 4 と 9 5 % 相同であるタンパク質、配列番号 4 のフラグメント、配列番号 4 のフラグメントと 9 5 % 相同であるタンパク質、配列番号 6、配列番号 6 と 9 5 % 相同であるタンパク質、配列番号 6 のフラグメント、および配列番号 6 のフラグメントと 9 5 % 相同であるタンパク質からなる群から選択されるタンパク質またはタンパク質をコードする核酸を含むワクチンに関する。ワクチンは、アジュバントタンパク質またはアジュバントタンパク質をコードする核酸配列を更に含むことができる。幾つかの実施形態において、アジュバントは、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 2 8、またはランテスである。

【 0 0 2 4 】

核酸分子を含むワクチンは、配列番号 1、配列番号 1 と 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 1 のフラグメント、配列番号 1 のフラグメントと 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 3、配列番号 3 と 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 3 のフラグメント、配列番号 3 のフラグメントと 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 5、配列番号 5 と 9 5 % 相同である核酸配列、配列番号 5 のフラグメント、および配列番号 5 のフラグメントと 9 5 % 相同である核酸配列からなる群から選択される核酸配列を含む核酸分子を含むことができる。ワクチンは、アジュバントタンパク質をコードする核酸配列を更に含むことができる。幾つかの実施形態において、アジュバントは、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 2 8、またはランテスである。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

配列番号 2 を含むタンパク質、配列番号 2 と 9 8 % 相同であるタンパク質、少なくとも 2 0 個のアミノ酸であり、配列番号 2 を含むタンパク質の免疫原性フラグメント、および少なくとも 2 0 個のアミノ酸である配列番号 2 と 9 8 % 相同であるタンパク質の免疫原性フラグメントからなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質をコードするコード配列を含む、核酸分子。

10

20

30

40

50

(項目 2)

前記タンパク質の N 末端に連結されるシグナルペプチドを更に含む、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 3)

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 からなる群から選択される 1 つ以上のタンパク質をコードする、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 4)

配列番号 1 を含む核酸配列、配列番号 1 と 98 % 相同である核酸配列、配列番号 1 によってコードされる、少なくとも 20 個のアミノ酸を含む免疫原性フラグメントをコードする核酸配列を含むそのフラグメント、および配列番号 1 によってコードされるタンパク質と 98 % 相同であるタンパク質の少なくとも 20 個のアミノ酸を含む免疫原性フラグメントをコードする核酸配列を含むそのフラグメントからなる群から選択される 1 つ以上の配列を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

10

(項目 5)

前記核酸配列の 5' 末端に連結されるシグナルペプチドを更に含む、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 6)

配列番号 1、配列番号 3、および配列番号 5 からなる群から選択される 1 つ以上のヌクレオチド配列を含む、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 7)

前記核酸分子がプラスミドである、項目 1 に記載の核酸分子。

20

(項目 8)

前記核酸分子が発現ベクターであり、前記 1 つ以上のタンパク質をコードする配列が調節要素に動作可能に連結される、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 9)

前記核酸分子がウイルス粒子に組み込まれる、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 10)

配列番号 2 を含むタンパク質の前記免疫原性フラグメントが、少なくとも 60 個、少なくとも 120 個、または少なくとも 180 個のアミノ酸である、項目 1 に記載の核酸分子。

(項目 11)

配列番号 2 と 98 % 相同であるタンパク質の前記免疫原性フラグメントが、少なくとも 60 個、少なくとも 120 個、または少なくとも 180 個のアミノ酸である、項目 1 に記載の核酸分子。

30

(項目 12)

項目 1 に記載の核酸分子を個人に投与することを含む、HBV 抗原に対する免疫応答を誘導する方法。

(項目 13)

項目 1 に記載の核酸分子を個人に投与することを含む、個人を HBV 感染から保護する方法。

(項目 14)

項目 1 に記載の核酸分子を個人に投与することを含む、HBV 感染と診断された個人を保護する方法。

40

(項目 15)

配列番号 2、
配列番号 2 と 98 % 相同であるタンパク質、
配列番号 2 の 20 個以上のアミノ酸を含む配列番号 2 の免疫原性フラグメント、
20 個以上のアミノ酸を含む配列番号 2 と 98 % 相同であるタンパク質の免疫原性フラグメント、
からなる群から選択される、タンパク質。

(項目 16)

50

配列番号 2 を含むタンパク質の前記免疫原性フラグメントが、少なくとも 60 個、少なくとも 120 個、または少なくとも 180 個のアミノ酸である、項目 15 に記載のタンパク質。

(項目 17)

配列番号 2 と 98 % 相同であるタンパク質の前記免疫原性フラグメントが、少なくとも 60 個、少なくとも 120 個、または少なくとも 180 個のアミノ酸である、項目 15 に記載のタンパク質。

(項目 18)

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 からなる群から選択されるタンパク質をコードする、項目 15 に記載のタンパク質。

10

(項目 19)

項目 15 に記載の核酸分子を個人に投与することを含む、HBV 抗原に対する免疫応答を誘導する方法。

(項目 20)

項目 15 に記載の核酸分子を個人に投与することを含む、個人を HBV 感染から保護する方法。

(項目 21)

項目 15 に記載の核酸分子を個人に投与することを含む、HBV 感染と診断された個人を保護する方法。

(項目 22)

20

項目 1 に記載の核酸分子と、
アジュバント分子と、

を含む、対象における HBV に対する免疫応答の生成に有用なワクチン。

(項目 23)

前記アジュバントが、IL - 12、IL - 15、IL - 28、またはランテスである、項目 22 に記載のワクチン。

【図面の簡単な説明】

30

【0025】

【図 1】 4 つの重複 ORF から構成される HBV ゲノムの構造を示すマップである。

【図 2 A】 pM コア発現実験の結果を示す。図 3 A は、インビトロ翻訳プロトコルの結果を示す。図 3 B は、ウェスタンブロットの結果を示す。

【図 2 B】 pM コア発現実験の結果を示す。図 3 A は、インビトロ翻訳プロトコルの結果を示す。図 3 B は、ウェスタンブロットの結果を示す。

【図 3 A - 1】 図 3 A および 3 B は、pM コアでワクチン接種した C57BL/6 マウスからの脾臓の CD8 + および CD4 + T 細胞による IFN - 分泌の大きさの高まりを示す。

【図 3 A - 2】 図 3 A および 3 B は、pM コアでワクチン接種した C57BL/6 マウスからの脾臓の CD8 + および CD4 + T 細胞による IFN - 分泌の大きさの高まりを示す。

40

【図 3 B】 図 3 A および 3 B は、pM コアでワクチン接種した C57BL/6 マウスからの脾臓の CD8 + および CD4 + T 細胞による IFN - 分泌の大きさの高まりを示す。

【図 4 A - 1】 図 4 A および 4 B は、pM コアでワクチン接種した C57BL/6 マウスの脾臓の CD8 + および CD4 + T 細胞による TNF - 分泌の大きさの高まりを示す。

【図 4 A - 2】 図 4 A および 4 B は、pM コアでワクチン接種した C57BL/6 マウスの脾臓の CD8 + および CD4 + T 細胞による TNF - 分泌の大きさの高まりを示す。

50

。

【図4B】図4Aおよび4Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの脾臓のCD8+およびCD4+ T細胞によるTNF-分泌の大きさの高まりを示す。

【図5A-1】図5Aおよび5Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの脾臓のCD8+およびCD4+ T細胞によるCD107a分泌の大きさの高まりを示す。

【図5A-2】図5Aおよび5Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの脾臓のCD8+およびCD4+ T細胞によるCD107a分泌の大きさの高まりを示す。

【図5B】図5Aおよび5Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの脾臓のCD8+およびCD4+ T細胞によるCD107a分泌の大きさの高まりを示す。

10

【図6A-1】図6Aおよび6Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓におけるインターフェロン-ガンマT細胞応答を示す。

【図6A-2】図6Aおよび6Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓におけるインターフェロン-ガンマT細胞応答を示す。

【図6A-3】図6Aおよび6Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓におけるインターフェロン-ガンマT細胞応答を示す。

【図6B】図6Aおよび6Bは、pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓におけるインターフェロン-ガンマT細胞応答を示す。

【図7A-1】pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓における腫瘍壊死因子 T細胞応答を示す。

20

【図7A-2】pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓における腫瘍壊死因子 T細胞応答を示す。

【図7A-3】pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓における腫瘍壊死因子 T細胞応答を示す。

【図7B】pMコアでワクチン接種したC57BL/6マウスの肝臓における腫瘍壊死因子 T細胞応答を示す。

【図8】ELISPOTアッセイのデータを示す。

【図9】CSFE標識細胞を使用して、CD8 T細胞によるペプチド処理標的細胞のインビボでの排除を、ワクチン接種した、およびワクチン接種しなかった動物において比較した実験のデータを示す。

30

【図10】pVaxベクター（対照）により、またはHBV Mコアを発現するプラスミドpMコアにより処理した、CD3+CD4+細胞およびCD3+CD8+の繁殖率の比較を示す。

【図11A】pVaxベクター（対照）により、またはHBV Mコアを発現するプラスミドpMコアにより処理した動物からの血清の段階希釈における抗HBVコア抗体の比較を示す。

【図11B】pVaxベクター（対照）により、またはHBV Mコアを発現するプラスミドpMコアにより処理した動物からの血清の段階希釈における抗HBVコア抗体の比較を示す。

40

【図12】脾臓および肝臓の細胞のCD4+およびCD8+からのTNF-aおよびIFN-gの率を示す。

【図13】免疫化されたマウスにより誘導されたクリアランスが肝臓に影響を与えたかを、血清中のALTレベルを測定することにより決定する実験のデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

1. 定義

【0027】

本明細書において使用される用語法は、特定の実施形態を記載するだけの目的であり、限定的であることを意図しない。明細書および添付の特許請求の範囲で使用されると

50

き、単数形「a」、「an」、および「the」は、特に文脈から明白に示されない限り、複数の対象を含む。

【0028】

本明細書における数値範囲の列挙では、同じ程度の正確さでその間に介在するそれぞれの数が、明確に考慮される。例えば、6～9の範囲では、7および8の数が6および9に加えて考慮され、6.0～7.0の範囲では、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、および7.0の数が明確に考慮される。

a. アジュバント

【0029】

「アジュバント」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に記載されるDNAプラスミドワクチンに添加されて、DNAプラスミドおよび本明細書以降に記載されるコード核酸配列によりコードされる抗原の免疫原性を増強する任意の分子を意味する。

b. 抗体

【0030】

「抗体」は、本明細書で使用されるとき、IgG、IgM、IgA、IgD、もしくはIgEの部類の抗体、またはFab、F(ab')₂、Fdが含まれるそのフラグメント、フラグメント、もしくは誘導体、ならびに一本鎖抗体、二特異性抗体、二重特異性抗体、二官能性抗体、およびその誘導体を意味する。抗体は、哺乳動物の血清試料から単離された抗体、ポリクローナル抗体、親和精製抗体、または所望のエピトープもしくはそれから誘導される配列に対して十分な結合特異性を示すそれらの混合物であり得る。

c. コード配列

【0031】

「コード配列」または「コードする核酸」は、本明細書で使用されるとき、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸(RNAまたはDNA分子)を意味する。コード配列は、核酸が投与される個人または哺乳動物の細胞において発現を指示することができるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む、調節要素に動作可能に連結している開始および終結シグナルを更に含むことができる。

d. 補体

【0032】

「補体」または「相補」は、本明細書で使用されるとき、核酸が、核酸分子のヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の間のワトソン・クリック(例えば、A-T/UおよびC-G)またはフーグスティーン塩基対を意味し得ることを意味する。

e. コンセンサスまたはコンセンサス配列

【0033】

「コンセンサス」または「コンセンサス配列」は、本明細書で使用されるとき、特定のHBV抗原の複数の亜型の整列に基づいたポリペプチド配列を意味する。コンセンサスポリペプチド配列をコードする核酸配列を、調製することができる。コンセンサス配列を含むタンパク質および/またはそのようなタンパク質をコードする核酸分子を含むワクチンを使用して、特定のHBV抗原の複数の亜群または血清群に対して広範囲の免疫性を誘導することができる。

f. 電気穿孔

【0034】

「電気穿孔」、「電気透過処理(electro-permeabilization)」または「電気動力的促進(electro-kinetic enhancement)」(「EP」)は、本明細書で交換可能に使用されるとき、生体膜内の微視的経路(細孔)を誘導するための膜貫通電界パルスの使用を意味し、それらの存在は、プラスミド、オリゴヌクレオチド、siRNA、薬剤、イオン、および水のような生体分子が細胞膜の一方の側から他方の側に通過することを可能にする。

g. フラグメント

【 0 0 3 5 】

「フラグメント」は、本明細書で核酸配列に関して使用されるとき、全長野生型株 H B V 抗原と交差反応する哺乳動物において免疫応答を誘発することができるポリペプチドをコードする、核酸配列またはその一部を意味する。フラグメントは、下記に記載されるタンパク質フラグメントをコードする様々なヌクレオチド配列のうちの少なくとも 1 つから選択される D N A フラグメントであり得る。

【 0 0 3 6 】

「フラグメント」または「免疫原性フラグメント」は、ポリペプチド配列に関して、全長野生型株 H B V 抗原と交差反応する哺乳動物において免疫応答を誘発することができるポリペプチドを意味する。コンセンサスタンパク質のフラグメントは、少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % のコンセンサスタンパク質を含むことができる。幾つかの実施形態において、コンセンサスタンパク質のフラグメントは、少なくとも 2 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 3 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 4 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 5 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 6 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 7 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 8 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 9 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 0 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 1 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 2 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 3 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 4 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 5 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 6 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 7 0 個以上のアミノ酸、少なくとも 1 8 0 個以上のアミノ酸のコンセンサスタンパク質を含むことができる。

h . 遺伝子構築物

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用されるとき、用語「遺伝子構築物」は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む D N A または R N A 分子を意味する。コード配列は、核酸分子が投与される個人の細胞において発現を指示することができるプロモーターおよびポリアデニル化シグナルを含む、調節要素に動作可能に連結している開始および終結シグナルを含む。本明細書で使用されるとき、用語「発現可能な形態」は、個人の細胞の中に存在するとき、コード配列が発現されるように、タンパク質をコードするコード配列に動作可能に連結している必要な調節要素を含有する遺伝子構築物を意味する。

i . 同一

【 0 0 3 8 】

「同一」または「同一性」は、2 つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において本明細書で使用されるとき、配列が、特定の領域にわたって同じである残基の特定の率を有することを意味する。率は、2 つの配列を最適に整列すること、2 つの配列を特定の領域にわたって比較すること、同一残基が両方の配列において生じる位置の数を決定して、一致した位置の数を生じること、一致した位置の数を、特定の領域内の位置の総数で割ること、結果に 1 0 0 を掛けて、配列同一性の率を生じることによって、計算することができる。2 つの配列が異なる長さであるか、または整列が 1 つ以上の付着末端を生じ、特定の比較領域が、単一配列のみを含む場合、単一配列の残基は、計算の分母に含まれるが、分子には含まれない。D N A および R N A を比較すると、チミン (T) およびウラシル (U) は、同等であると考えることができる。同一性は、手作業により、または B L A S T もしくは B L A S T 2 . 0 のようなコンピューター配列アルゴリズムを使用して実施することができる。

j . 免疫応答

【 0 0 3 9 】

「免疫応答」は、本明細書で使用されるとき、H B V コンセンサス抗原のような抗原の導入に応答した宿主の免疫系、例えば哺乳動物の免疫系の活性化を意味する。免疫応答は、細胞性もしくは液性応答、またはその両方の形態であり得る。

k . 核酸

【 0 0 4 0 】

「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用されるとき、一緒に共有結合している少なくとも2つのヌクレオチドを意味する。一本鎖の描写は、相補鎖の配列も定義する。したがって、核酸は、描写される一本鎖の相補鎖も包含する。核酸の多くの変種を、所定の核酸と同じ目的で 사용할 ことができる。したがって、核酸は、実質的に同一の核酸およびその相補体も包含する。一本鎖は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列とハイブリダイズすることができるプローブを提供する。したがって、核酸は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブも包含する。

10

【 0 0 4 1 】

核酸は、一本鎖もしくは二本鎖であり得る、または二本鎖と一本鎖の配列の両方の部分を含有することができる。核酸は、ゲノムおよびcDNAの両方のDNA、RNA、またはハイブリッドであることができ、ここで核酸は、デオキシリボ - およびリボ - ヌクレオチドの組み合わせ、ならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン ヒポキサンチン、イソシトシン、およびイソグアニンを含む塩基の組み合わせを含有することができる。核酸は、化学合成法により、または組換え法により得ることができる。

1 . 動作可能に連結する

【 0 0 4 2 】

20

「動作可能に連結する」は、本明細書で使用されるとき、遺伝子の発現が、空間的に連結しているプロモーターの制御下にあることを意味する。プロモーターは、その制御下の遺伝子の5'（上流）または3'（下流）に位置することができる。プロモーターと遺伝子との間隔は、プロモーターが誘導される遺伝子における、プロモーターと、それが制御する遺伝子との間隔とほぼ同じであり得る。当該技術において知られているように、この間隔の変動は、プロモーター機能を失うことなく適応され得る。

m . プロモーター

【 0 0 4 3 】

「プロモーター」は、本明細書で使用されるとき、細胞において核酸の発現を付与する、活性化する、または増強することができる合成的または天然に誘導される分子を意味する。プロモーターは、1つ以上の特定の転写調節配列を含み、その発現を更に増強し、かつ/またはその空間的発現および/もしくは時間的発現を変更することができる。プロモーターは、遠位エンハンサーまたはリプレッサー要素も含むことができ、これらは、転写の開始部位から数千塩基対まで位置することができる。プロモーターは、ウイルス、細菌、真菌、植物、昆虫、および動物を含む供給源から誘導することができる。プロモーターは、遺伝子成分の発現を構造的に、あるいは発現が生じる細胞、組織、もしくは臓器に関して、または発現が生じる発生段階に関して、または生理的ストレス、病原体、金属イオン、もしくは誘導作用物質のような外部刺激に応答して、差動的に調節することができる。プロモーターの代表例には、バクテリオファージT7プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、SP6プロモーター、lacオペレータープロモーター、tac
cプロモーター、SV40後期プロモーター、SV40初期プロモーター、RSV-LTR
Rプロモーター、CMV IEプロモーター、SV40初期プロモーターまたはSV40
後期プロモーター、およびCMV IEプロモーターが含まれる。

30

40

n . シグナルペプチド

【 0 0 4 4 】

「シグナルペプチド」および「リーダー配列」は、本明細書において交換可能に使用され、本明細書に記載されているHBVタンパク質のアミノ末端に連結され得るアミノ酸配列を意味する。シグナルペプチド/リーダー配列は、典型的には、タンパク質の局在化を指示する。本明細書において使用されるシグナルペプチド/リーダー配列は、好ましくは、産生される細胞からのタンパク質の分泌を促進する。シグナルペプチド/リーダー

50

配列は、多くの場合、細胞からの分泌の際に、多くの場合成熟タンパク質と呼ばれるタンパク質の残りの部分から切断される。シグナルペプチド／リーダー配列は、タンパク質のN末端に連結される。タンパク質のN末端にシグナルペプチドまたはリーダー配列を連結することに関して、本明細書に参照されているように、シグナルペプチド／リーダー配列はタンパク質のN末端メチオニンと代わり、これは核酸配列の開始コドンでコードされ、次にシグナルペプチドコード配列を有さないタンパク質をコードする。したがって、例えば、配列番号4は、配列番号2のN末端に連結されたシグナルペプチド／リーダー配列を有する配列番号2であり、すなわち、配列番号4は、配列番号2のN末端に連結されたシグナルペプチドを含むタンパク質である。配列番号2の最初の残基「X a a」は、シグナルペプチドが存在しない場合、典型的にはメチオニンである。しかし、配列番号4のような、配列番号2に連結されたシグナルペプチドを含むタンパク質は、X a aで残基1のメチオニンを、タンパク質にシグナルペプチドを連結させる残基に代える。したがって、配列番号2のN末端残基は、開始配列でコードされる場合、メチオニン以外のいずれかであり得る。配列番号2のN末端へのシグナルペプチド／リーダー配列の結合は、典型的には、N末端メチオニンを排除する。本明細書で使用されるとき、配列番号4は、配列番号2のN末端X a a残基が排除されているにもかかわらず、配列番号2のN末端に連結されたシグナルペプチド／リーダー配列を有する配列番号2を含むことが意図される。同様に、配列番号4のコード配列は、配列番号2をコードするコード配列の5'末端に連結したシグナルペプチド／リーダー配列のコード配列を有する配列番号2のコード配列を含む。開始コドンは、配列番号2のコード配列において「n n n」であり得るが、シグナルペプチド／リーダー配列のコード配列が、配列番号2をコードするコード配列の5'末端に連結したとき、排除される。本明細書で使用されるとき、配列番号4のコード配列は、n n nが生じる配列番号2のコード配列の5'末端に連結したシグナルペプチド／リーダー配列のコード配列を有する配列番号2のコード配列を含むことが意図される。したがって、例えば、配列番号3は、n n nの代わりに、配列番号1の5'末端に連結されたシグナルペプチド／リーダー配列のコード配列を有する配列番号1を含むことが意図される。幾つかの実施態様において、n n nは、配列番号1の5'末端の開始コドンである。

o. ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件

【0045】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、本明細書で使用されるとき、核酸の複合混合物におけるように、第1核酸配列（例えば、プローブ）が第2核酸配列（例えば、標的）とハイブリダイズすることを意味する。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、異なる状況において異なる。ストリンジェントな条件は、確定されたイオン強度のpHで特定の配列の熱融点（ T_m ）よりも約5～10℃低くなるように選択することができる。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が標的配列と平衡（標的配列が T_m で過剰に存在するので、50%のプローブが平衡を占める）でハイブリダイズする温度（確定されたイオン強度、pH、および核濃度下）であり得る。ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH 7.0～8.3で約0.01～1.0 Mのナトリウムイオン濃度のような約1.0 M未満のナトリウムイオン（または他の塩）であり、温度が、短プローブ（例えば、約10～50個のヌクレオチド）では少なくとも約30℃、長プローブ（例えば、約50個を超えるヌクレオチド）では少なくとも約60℃であるものであり得る。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加により達成することもできる。選択的または特定のハイブリダイゼーションでは、陽性シグナルは、バックグラウンドハイブリダイゼーションの少なくとも2～10倍であり得る。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、以下を含む：50%ホルムアミド、5×SSC、および1%SDS、42℃でのインキュベーション、または5×SSC、1%SDS、65℃でのインキュベーションと、0.2×SSCでの洗浄および65℃での0.1%SDS。

p. 実質的に相補的

【0046】

「実質的に相補的」は、本明細書で使用されるとき、第1配列が第2配列の補体と、8個、9個、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、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、180個、270個、360個、450個、540個またはそれ以上のヌクレオチドもしくはアミノ酸の領域にわたって、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一であること、あるいは2つの配列がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味する。

q. 実質的に同一

10

【0047】

「実質的に同一」は、本明細書で使用されるとき、第1配列および第2配列が、8個、9個、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、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、180個、270個、360個、450個、540個またはそれ以上のヌクレオチドもしくはアミノ酸の領域にわたって、あるいは第1配列が第2配列の補体と実質的に相補的である場合、核酸に関して、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一であることを意味する。

20

r. 亜型または血清型

【0048】

「亜型」または「血清型」は、本明細書で使用されるとき、交換可能に、HBVを参照して、1つの亜型が異なる亜型と別に免疫系により認識されるような、HBVの遺伝子変種を意味する。

s. 変種

【0049】

「変種」は、核酸に関して本明細書で使用されるとき、(i)参照ヌクレオチド配列の一部もしくはフラグメント、(ii)参照ヌクレオチド配列の補体もしくはその一部、(iii)参照核酸もしくはその補体と実質的に同一である核酸、または(iv)ストリンジェントな条件下、参照核酸、その補体もしくはそれと実質的に同一の配列にハイブリダイズする核酸を意味する。

30

【0050】

「変種」は、ペプチドまたはポリペプチドに関して、アミノ酸の挿入、欠失、または保存置換によりアミノ酸配列が異なるが、少なくとも1つの生物学的活性を保持する。変種は、少なくとも1つの生物学的活性を保持するアミノ酸配列を有する参照タンパク質と実質的に同一である、アミノ酸配列を有するタンパク質も意味する。アミノ酸の保存置換、すなわち、アミノ酸を同様の特性（例えば、親水性、荷電領域の程度および分布）の異なるアミノ酸と代えることは、典型的には僅かな修正を伴って、当該技術において認識されている。これらの僅かな修正は、部分的には、当該技術において理解されているようにアミノ酸の疎水性親水性指標を考慮することにより確認することができる。Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)。アミノ酸の疎水性親水性指標は、その疎水性および電荷の考慮に基づいている。同様の疎水性親水性指標のアミノ酸を置換して、依然としてタンパク質機能を保持できることは、当該技術において知られている。1つの態様において、±2の疎水性親水性指標を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性を使用して、タンパク質の生物学的活性の保持をもたらす置換を明らかにすることもできる。ペプチドの文脈におけるアミノ酸の親水性の考慮は、抗原性および免疫原性と十分相関することが報告されている有用な測度である、ペプチドの最大局所平均親水性の計算を可能にする。米国特許第4,554,101号は参照として本明細書に組み込まれる。同様の親水性値を有するアミノ酸の置換は、ペプチドが生

40

50

物学的活性、例えば免疫原性を保持することをもたらし、このことは当該技術において理解されている。置換は、互いに±2以内の親水性値を有するアミノ酸で実施することができる。アミノ酸の疎水性指標と親水性値の両方は、そのアミノ酸の特定の側鎖により影響を受ける。その観察と一致して、生物学的機能に匹敵するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、大きさ、および他の特性により明らかのように、アミノ酸、特にこれらのアミノ酸の側鎖の相対的な類似性に依存していることが理解される。

t. ベクター

【0051】

「ベクター」は、本明細書で使用されるとき、複製の起点を含有する核酸配列を意味する。ベクターは、ウイルスベクター、バクテリオファージ、細菌人工染色体、または酵母人工染色体であり得る。ベクターは、DNAまたはRNAベクターであり得る。ベクターは、自己複製染色体外ベクターであることができ、好ましくはDNAプラスミドである。

2. HBVコア抗原

【0052】

HBVコアタンパク質は、交差提示のために、1)細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答、2)Tヘルパー細胞応答、および/もしくは3)B細胞応答、または好ましくは前述の全てを誘導する免疫仲介ウイルスクリアランスの重要な標的を提示する。

【0053】

表2は、HBV-A、HBV-B、HBV-C、HBV-D、およびHBV-E遺伝子型のコア抗原と、表で「HBV-Mコア」と呼ばれるコンセンサスHBVコアタンパク質の遺伝子型の類似性を示す。幾つかの実施形態において、HBV-Mコア構築物は、広範囲のHBVコア標的に増大した相同性を有するように設計された。設計されたMコア構築物を有するコア抗原の遺伝子型の類似性は、広範囲のHBVコア標的に対する相同性を増大した。全ての遺伝子型は、HBVの汎用免疫治療ワクチンにおいて提示されるべきである。

【表2】

表2

同一性の率								
番号	1	2	3	4	5	6	7	8
	1		96.2	96.2	97.8	95.6	98.4	1 - HBV-A-構築物コア
	2	3.9		100	95.6	93.4	96.7	2 - HBV-B-構築物コア
	3	3.9	0		95.6	93.4	96.7	3 - HBV-C-構築物コア
	4	2.2	4.5	4.5		97.8	97.8	4 - HBV-D-構築物コア
	5	4.5	6.9	6.9	2.2		95.6	5 - HBV-E-構築物コア
	6	1.7	3.4	3.4	2.2	4.5		6 - HBV-M-コア
		1	2	3	4	5	6	

【0054】

本明細書において提供されるものは、哺乳動物において1つ以上のHBV血清型に対して免疫応答を誘発できる抗原である。抗原は、抗HBV免疫応答が誘導され得る免疫原として特に効果的になる、コアタンパク質エピトープを含むことができる。HBV抗原は、全長翻訳産物、その変種、そのフラグメント、またはその組み合わせを含むことができる。

【0055】

コンセンサスHBVコアタンパク質(配列番号2)が提供される。HBVコアタンパク質コンセンサス配列のN末端にIgEリーダーを含むアミノ酸配列が生成された。し

たがって、同じく提供されるものは、コンセンサス H B V コアタンパク質（配列番号 2）に連結して I g E リーダーコンセンサス H B V コアタンパク質（配列番号 4）を提供する、I g E リーダー（配列番号 7）を有するタンパク質である。提供される幾つかの実施形態は、H B V コアタンパク質コンセンサス配列の C 末端に連結された H A タグ（配列番号 8）も含む。したがって、H B V コアタンパク質コンセンサス配列（配列番号 2）に連結された I g E リーダー（配列番号 7）および H B V コアタンパク質コンセンサス配列の C 末端に連結された H A タグ（配列番号 8）を含む、H B V コアタンパク質コンセンサスタンパク質（配列番号 6）が提供される。

【 0 0 5 6 】

タンパク質は、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 と相同であり得る。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列に 9 5 % の相同性を有する免疫原性タンパク質に関する。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列に 9 6 % の相同性を有する免疫原性タンパク質に関する。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列に 9 7 % の相同性を有する免疫原性タンパク質に関する。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列に 9 8 % の相同性を有する免疫原性タンパク質に関する。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列に 9 9 % の相同性を有する免疫原性タンパク質に関する。

【 0 0 5 7 】

幾つかの実施形態において、タンパク質はリーダー配列を含まない。幾つかの実施形態において、タンパク質は I g E リーダーを含まない。コンセンサスタンパク質のフラグメントは、コンセンサスタンパク質を少なくとも 1 0 %、少なくとも 1 5 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 % もしくは少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 含むことができる。配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 の免疫原性フラグメントを提供することができる。免疫原性フラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 を少なくとも 1 0 %、少なくとも 1 5 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 % もしくは少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 含むことができる。幾つかの実施形態において、フラグメントは、例えば、I g E リーダーのような免疫グロブリンリーダーのようなリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、フラグメントはリーダー配列を含まない。幾つかの実施形態において、フラグメントは、リーダー配列 I g E リーダーを含まない。

【 0 0 5 8 】

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 のアミノ酸配列相同性の免疫原性フラグメントを有するタンパク質の免疫原性フラグメントを提供することができる。そのような免疫原性フラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6 と 9 5 % 相同であるタンパク質を少なくとも 1 0 %、少なくとも 1 5 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 2 5 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 3 5 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 4 5 %、少なくとも 5 0 % もしくは少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % 含むことができる。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列の免疫原性フラグメントに 9 6 % の相同性を有する免疫原性フラグメントに関する。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列の免疫原性フラグメントに 9 7 % の相同性を有する免疫原性フラグメントに関する。幾つかの実施形態

は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列の免疫原性フラグメントに 98% の相同性を有する免疫原性フラグメントに関する。幾つかの実施形態は、本明細書のコンセンサスタンパク質配列の免疫原性フラグメントに 99% の相同性を有する免疫原性フラグメントに関する。幾つかの実施形態において、フラグメントは、例えば、IgE リーダーのような免疫グロブリンリーダーのようなリーダー配列を含む。幾つかの実施形態において、フラグメントはリーダー配列を含まない。幾つかの実施形態において、フラグメントは、リーダー配列 IgE リーダーを含まない。

3. 遺伝子配列、構築物、およびプラスミド

【0059】

配列番号 2、配列番号 4、および配列番号 6、ならびに相同性タンパク質、免疫原性フラグメント、および相同性タンパク質の免疫原性フラグメントをコードする核酸配列を、日常的に生成することができる。したがって、コンセンサス配列に 95% までの相同性、コンセンサス配列に 96% までの相同性、コンセンサス配列に 96% までの相同性、コンセンサス配列に 97% までの相同性、コンセンサス配列に 98% までの相同性、およびコンセンサス配列に 99% までの相同性を有する免疫原性タンパク質をコードする核酸分子を提供することができる。同様に、本明細書に記載されている免疫原性フラグメントおよび本明細書に記載されているタンパク質と相同のタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする核酸配列も、提供される。

【0060】

コンセンサスアミノ酸配列をコードする核酸分子が生成された。ワクチンは、ヒトにおいて安定性および発現が最適化されるように生成された配列の群から選択される 1 つ以上のコンセンサス型免疫原性タンパク質をコードする、1 つ以上の核酸配列を含むことができる。HBV コアタンパク質コンセンサスタンパク質 (配列番号 2) をコードする核酸配列 (配列番号 1)、IgE リーダー HBV コアタンパク質コンセンサスタンパク質 (配列番号 4) をコードする核酸配列 (配列番号 3)、および IgE リーダー HBV コアタンパク質コンセンサスタンパク質 HA タグ (配列番号 6) をコードする核酸配列 (配列番号 5)。幾つかの実施形態は、本明細書の核酸コード配列に 95% の相同性を有する免疫原性タンパク質をコードする核酸分子に関する。幾つかの実施形態は、本明細書の核酸コード配列に 96% の相同性を有する免疫原性タンパク質をコードする核酸分子に関する。幾つかの実施形態は、本明細書の核酸コード配列に 97% の相同性を有する免疫原性タンパク質をコードする核酸分子に関する。幾つかの実施形態は、本明細書の核酸コード配列に 98% の相同性を有する免疫原性タンパク質をコードする核酸分子に関する。幾つかの実施形態は、本明細書の核酸コード配列に 99% の相同性を有する免疫原性タンパク質をコードする核酸分子に関する。幾つかの実施形態において、本明細書に開示されるコンセンサスタンパク質のコード配列に相同である本明細書に開示されるコード配列を有する核酸分子は、本明細書に開示される相同性タンパク質配列をコードするコード配列の 5' 末端に連結された IgE リーダー配列をコードする配列を含む。

【0061】

幾つかの実施形態において、核酸配列は、リーダー配列をコードするコード配列を含まない。幾つかの実施形態において、核酸配列は、IgE リーダーをコードするコード配列を含まない。

【0062】

幾つかの実施形態は、配列番号 1、配列番号 3、および配列番号 5 のフラグメントに関する。フラグメントは、配列番号 1、配列番号 3、および配列番号 5 の少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50% もしくは少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% であり得る。フラグメントは、配列番号 1、配列番号 3、および配列番号 5 のフラグメントと少

10

20

30

40

50

なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 相同であり得る。幾つかの実施形態において、フラグメントは、例えば、IgE リーダーのような免疫グロブリンリーダーのようなリーダー配列をコードする配列を含む。幾つかの実施形態において、フラグメントは、リーダー配列をコードするコード配列を含まない。幾つかの実施形態において、フラグメントは、リーダー配列 IgE リーダーをコードするコード配列を含まない。

【0063】

本明細書において提供されるものは、コンセンサスタンパク質配列、コンセンサスタンパク質配列と相同の配列、コンセンサスタンパク質配列のフラグメント、およびコンセンサスタンパク質配列のフラグメントと相同の配列が含まれる、開示される HBV コア抗原をコードする核酸配列を含むことができる、遺伝子構築物である。遺伝子構築物は、機能性染色体外分子として細胞に存在することができる。遺伝子構築物は、セントロメア、テロメア、またはプラスミドもしくはコスミドを含む線状微小染色体であり得る。

10

【0064】

遺伝子構築物は、また、組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルス関連ウイルス、および組換えワクチンが含まれる組換えウイルスベクターのゲノムの一部であり得る。遺伝子構築物は、細胞内に生存する弱毒生微生物または組換え微生物ベクターの遺伝子材料の一部であり得る。

【0065】

遺伝子構築物は、核酸のコード配列の遺伝子発現の調節要素を含むことができる。調節要素は、プロモーター、エンハンサー、開始コドン、終止コドン、またはポリアデニル化シグナルであり得る。

20

【0066】

核酸配列は、ベクターになり得る遺伝子構築物を構成することができる。ベクターは、哺乳動物において免疫応答を誘発するのに有効な量で哺乳動物の細胞内に抗原を発現することができる。ベクターは組換えであり得る。ベクターは、抗原をコードする異種核酸を含むことができる。ベクターはプラスミドであり得る。ベクターは、細胞を、抗原をコードする核酸でトランスフェクトするのに有用であることができ、形質転換された宿主細胞は培養され、抗原の発現が生じる条件下で維持される。

【0067】

コード配列を、発現の安定性および高いレベルのために最適化することができる。幾つかの場合において、コドンは、分子内結合によって形成されるような RNA の二次構造形成を低減するために選択される。

30

【0068】

ベクターは、抗原をコードする異種核酸を含むことができ、抗原コード配列の上流にあり得る開始コドン、および抗原コード配列の下流にあり得る終止コドンを更に含むことができる。開始および終結コドンは、抗原コード配列と共にフレーム内にあり得る。ベクターは、抗原コード配列と動作可能に連結しているプロモーターを含むこともできる。抗原コード配列と動作可能に連結しているプロモーターは、シミアンウイルス 40 (SV40) のプロモーター、マウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーター、ウシ免疫不全ウイルス (BIV) 長末端反復 (LTR) プロモーターのようなヒト免疫不全ウイルス (HIV) プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス (ALV) プロモーター、CMV 最初期プロモーターのようなサイトメガウイルス (CMV) プロモーター、エプスタイン・バーウイルス (EBV) プロモーター、またはラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターであり得る。プロモーターは、また、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、またはヒトメタロチオネインのようなヒト遺伝子からのプロモーターであり得る。プロモーターは、また、天然または合成の筋肉または皮膚特異的プロモーターのような組織特異的プロモーターであり得る。そのようなプロモーターの例は、米国特許出願公開第 20040175727 号に記載されており、その内容はその全体が参照として本明細書に組み込まれる。

40

50

【 0 0 6 9 】

ベクターは、HBVコアタンパク質コード配列の下流にあり得るポリアデニル化シグナルを含むこともできる。ポリアデニル化シグナルは、SV40ポリアデニル化シグナル、LTRポリアデニル化シグナル、ウシ成長ホルモン(bGH)ポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン(hGH)ポリアデニル化シグナル、またはヒトグロブリンポリアデニル化シグナルであり得る。SV40ポリアデニル化シグナルは、pCEP4ベクター(Invitrogen, San Diego, CA)からのポリアデニル化シグナルであり得る。

【 0 0 7 0 】

ベクターは、コンセンサスHBVコアタンパク質コード配列の上流にエンハンサーを含むこともできる。エンハンサーは、DNA発現に必要であり得る。エンハンサーは、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、またはCMV、HA、RSV、もしくはEBVのうちの1つのようなウイルスエンハンサーであり得る。ポリヌクレオチド機能の増強は、米国特許第5,593,972号、同第5,962,428号、および国際公開公報第94/016737号に記載されており、それぞれの内容は参照として完全に組み込まれる。

【 0 0 7 1 】

ベクターは、ベクター染色体外性を維持し、細胞内にベクターの複数のコピーを産生するため、哺乳類の複製の起点を含むこともできる。ベクターは、エプスタイン・バーウイルスの複製の起点を含むことができるInvitrogen(San Diego, CA)からのpVAX1、pCEP4、またはpREP4、および組み込みなしで高コピーエピソーム複製を生じることができる核抗原EBNA-1コード領域であり得る。ベクターは、pVAX1、または本明細書に記載されている変種プラスミドのような変化を有するpVax1変種であり得る。変種pVax1プラスミドは、主鎖ベクタープラスミドpVAX1の2998塩基対変種である(Invitrogen, Carlsbad CA)。CMVプロモーターは、塩基137~724に位置している。T7プロモーター/初回抗原刺激部位は、塩基664~683にある。多重クロニング部位は、塩基696~811にある。ウシGHポリアデニル化シグナルは、塩基829~1053にある。カナマイシン抵抗性遺伝子は、塩基1226~2020にある。pUC起点は、塩基2320~2993にある。

【 0 0 7 2 】

Invitrogenから入手可能なpVAX1の配列に基づいて、以下の突然変異体がpVAX1の配列において見出され、これを本明細書に記載されたプラスミド1~6のセットの主鎖として使用した:

C > G 241 CMVプロモーター、
C > T 1942 主鎖、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル(bGHpolyA)の下流、
A > - 2876 主鎖、カンマイシン遺伝子の下流、
C > T 3277 pUCの複製の起点(複製起点)高コピー数突然変異体(Nucleic Acid Research 1985を参照すること)、
G > C 3753 RNASEH部位の上流のpUC複製起点の最末端、
塩基対2、3、および4は、CMVプロモーターの上流の主鎖においてACTからCTGに変わる。

ベクターの主鎖は、pAV0242であり得る。ベクターは、複製欠損アデノウイルス型5(Ad5)ベクターであり得る。

【 0 0 7 3 】

ベクターは、ベクターが投与される哺乳類またはヒトの細胞における遺伝子発現に十分に適切であり得る調節配列を含むこともできる。コンセンサスHBVコード配列は、宿主細胞におけるコード配列のより効率的な転写を可能にし得るコドンを含むことができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

ベクターは、エシェリキア・コリ（大腸菌）におけるタンパク質産生に使用することができる p S E 4 2 0 (I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C a l i f) であり得る。ベクターは、酵母のサッカロマイセス・セレビシエ株におけるタンパク質産生に使用することができる p Y E S 2 (I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C a l i f) でもあり得る。ベクターは、昆虫細胞におけるタンパク質産生に使用することができる、M A X B A C (商標) 完全バキュロウイルス発現系 (I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C a l i f .) でもあり得る。ベクターは、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞のような哺乳類細胞におけるタンパク質産生に使用され得る、p c D N A 1 または p c D N A 3 (I n v i t r o g e n , S a n D i e g o , C a l i f .) でもあり得る。ベクターは、参照として完全に組み込まれる S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g a n d L a b o r a t o r y M a n u a l , S e c o n d E d . , C o l d S p r i n g H a r b o r (1 9 8 9) を含む、日常的な技術および容易に入手可能な出発材料によりタンパク質を産生する発現ベクターまたは系であり得る。

4 . 薬学的組成物

【 0 0 7 5 】

本明細書において提供されるものは、約 1 ナノグラムから約 1 0 m g の D N A を含む、本発明による薬学的組成物である。幾つかの実施形態において、本発明の薬学的組成物は、1) 少なくとも 1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、もしくは 1 0 0 ナノグラム、または少なくとも 1、5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 3 5、1 4 0、1 4 5、1 5 0、1 5 5、1 6 0、1 6 5、1 7 0、1 7 5、1 8 0、1 8 5、1 9 0、1 9 5、2 0 0、2 0 5、2 1 0、2 1 5、2 2 0、2 2 5、2 3 0、2 3 5、2 4 0、2 4 5、2 5 0、2 5 5、2 6 0、2 6 5、2 7 0、2 7 5、2 8 0、2 8 5、2 9 0、2 9 5、3 0 0、3 0 5、3 1 0、3 1 5、3 2 0、3 2 5、3 3 0、3 3 5、3 4 0、3 4 5、3 5 0、3 5 5、3 6 0、3 6 5、3 7 0、3 7 5、3 8 0、3 8 5、3 9 0、3 9 5、4 0 0、4 0 5、4 1 0、4 1 5、4 2 0、4 2 5、4 3 0、4 3 5、4 4 0、4 4 5、4 5 0、4 5 5、4 6 0、4 6 5、4 7 0、4 7 5、4 8 0、4 8 5、4 9 0、4 9 5、5 0 0、6 0 5、6 1 0、6 1 5、6 2 0、6 2 5、6 3 0、6 3 5、6 4 0、6 4 5、6 5 0、6 5 5、6 6 0、6 6 5、6 7 0、6 7 5、6 8 0、6 8 5、6 9 0、6 9 5、7 0 0、7 0 5、7 1 0、7 1 5、7 2 0、7 2 5、7 3 0、7 3 5、7 4 0、7 4 5、7 5 0、7 5 5、7 6 0、7 6 5、7 7 0、7 7 5、7 8 0、7 8 5、7 9 0、7 9 5、8 0 0、8 0 5、8 1 0、8 1 5、8 2 0、8 2 5、8 3 0、8 3 5、8 4 0、8 4 5、8 5 0、8 5 5、8 6 0、8 6 5、8 7 0、8 7 5、8 8 0、8 8 5、8 9 0、8 9 5、9 0 0、9 0 5、9 1 0、9 1 5、9 2 0、9 2 5、9 3 0、9 3 5、9 4 0、9 4 5、9 5 0、9 5 5、9 6 0、9 6 5、9 7 0、9 7 5、9 8 0、9 8 5、9 9 0、9 9 5、もしくは 1 0 0 0 マイクログラム、または少なくとも 1 . 5、2、2 . 5、3、3 . 5、4、4 . 5、5、5 . 5、6、6 . 5、7、7 . 5、8、8 . 5、9、9 . 5、もしくは 1 0 m g、またはそれ以上；および 2) 1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、もしくは 1 0 0 ナノグラム以下、または 1、5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、7 0、7 5、8 0、8 5、9 0、9 5、1 0 0、1 0 5、1 1 0、1 1 5、1 2 0、1 2 5、1 3 0、1 3 5、1 4 0、1 4 5、1 5 0、1 5 5、1 6 0、1 6 5、1 7 0、1 7 5、1 8 0、1 8 5、1 9 0、1 9 5、2 0 0、2 0 5、2 1 0、2 1 5、2 2 0、2 2 5、2 3 0、2 3 5、2 4 0、2 4 5、2 5 0、2 5 5、2 6 0、2 6 5、2 7 0、2 7 5、2 8 0、2 8 5、2 9 0、2 9 5、3 0 0、3 0 5、3 1 0、3 1 5、3 2 0、3 2 5、3 3 0、3 3 5、3 4 0、3 4 5、3 5 0、3 5 5、3 6 0、3 6 5、3 7 0、3 7 5、3 8 0、3 8 5、

10

20

30

40

50

390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、
440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、
490、495、500、605、610、615、620、625、630、635、
640、645、650、655、660、665、670、675、680、685、
690、695、700、705、710、715、720、725、730、735、
740、745、750、755、760、765、770、775、780、785、
790、795、800、805、810、815、820、825、830、835、
840、845、850、855、860、865、870、875、880、885、
890、895、900、905、910、915、920、925、930、935、
940、945、950、955、960、965、970、975、980、985、
990、995、もしくは1000マイクログラム以下、または1.5、2、2.5、3
、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5
、もしくは10mg以下を含む。幾つかの実施形態において、本発明による薬学的組成物
は、約5ナノグラムから約10mgのDNAを含む。幾つかの実施形態において、本発明
による薬学的組成物は、約25ナノグラムから約5mgのDNAを含む。幾つかの実施形
態において、薬学的組成物は、約50ナノグラムから約1mgのDNAを含有する。幾つ
かの実施形態において、薬学的組成物は、約0.1～約500マイクログラムのDNAを
含有する。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約1～約350マイクログラム
のDNAを含有する。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約5～約250マイ
クログラムのDNAを含有する。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約10～
約200マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの実施形態において、薬学的組成物
は、約15～約150マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの実施形態において、
薬学的組成物は、約20～約100マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの実施形
態において、薬学的組成物は、約25～約75マイクログラムのDNAを含有する。幾つ
かの実施形態において、薬学的組成物は、約30～約50マイクログラムのDNAを含有
する。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約35～約40マイクログラムのD
NAを含有する。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約100～約200マイ
クログラムのDNAを含有する。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約10マ
イクログラムから約100マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの実施形態におい
て、薬学的組成物は、約20マイクログラムから約80マイクログラムのDNAを含む。
幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約25マイクログラムから約60マイク
ログラムのDNAを含む。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は、約30ナノグラム
から約50マイクログラムのDNAを含む。幾つかの実施形態において、薬学的組成物は
、約35ナノグラムから約45マイクログラムのDNAを含む。幾つかの好ましい実施形
態において、薬学的組成物は、約0.1～約500マイクログラムのDNAを含有する。
幾つかの好ましい実施形態において、薬学的組成物は、約1～約350マイクログラムの
DNAを含有する。幾つかの好ましい実施形態において、薬学的組成物は、約25～約2
50マイクログラムのDNAを含有する。幾つかの好ましい実施形態において、薬学的組
成物は、約100～約200マイクログラムのDNAを含有する。

【0076】

本発明の薬学的組成物は、使用される投与様式に従って処方される。薬学的組成物
が注射用薬学的組成物である場合、これらは滅菌で発熱物質を含まず、粒子を含まない。
等張製剤が好ましく使用される。一般に、等張のための添加剤には、塩化ナトリウム、デ
キストロース、マンニトール、ソルビトール、およびラクトースが含まれる。幾つかの場
合において、リン酸緩衝生理食塩水のような等張溶液が好ましい。安定剤には、ゼラチン
およびアルブミンが含まれる。幾つかの実施形態において、血管収縮剤が製剤に添加され
る。

【0077】

好ましくは、薬学的組成物はワクチンであり、より好ましくはDNAワクチンであ
る。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 8 】

本明細書に提供されるものは、哺乳動物において、1つ以上の遺伝子型のHBVに対して免疫応答を生成することができるワクチンである。ワクチンは、上記に記載された遺伝子構築物を含むことができる。

【 0 0 7 9 】

科学的理論に束縛されることはないが、ワクチンを使用して、1つ以上の遺伝子型のHBVに対して広範囲に免疫応答（液性、細胞性、または両方）を誘発することができる。ワクチンは、コンセンサスHBVコアタンパク質配列のコード配列（配列番号2）、コンセンサスHBVコアタンパク質配列に連結したIgEリーダー（配列番号4）、およびHAタグ配列に連結したコンセンサスHBVコアタンパク質に連結したIgEリーダー（配列番号6）を含むことができる。ワクチンは、（配列番号1）のようなコンセンサスHBVコアタンパク質配列の特定のコード配列（配列番号2）、（配列番号3）のようなコンセンサスHBVコアタンパク質配列に連結したIgEリーダー（配列番号4）、および（配列番号5）のようなHAタグ配列に連結したコンセンサスHBVコアタンパク質に連結したIgEリーダー（配列番号6）を含むことができる。

10

【 0 0 8 0 】

幾つかの代替的な実施形態には、コンセンサスHBVコアタンパク質の免疫原性フラグメントをコードする核酸配列、コンセンサスHBVコアタンパク質に相同の1つ以上のタンパク質、およびコンセンサスHBVコアタンパク質に相同の1つ以上のタンパク質の免疫原性フラグメントを含むものが含まれる。

20

【 0 0 8 1 】

幾つかの実施形態は、本明細書に記載されている1つ以上の組成物を個人に投与することを含む、HBVコアタンパク質に対して免疫応答を生成する方法を提供する。幾つかの実施形態は、本明細書に記載されている1つ以上の組成物を投与することを含む、HBV感染に対して個人を予防的にワクチン接種する方法を提供する。幾つかの実施形態は、本明細書に記載されている1つ以上の組成物を投与することを含む、HBVに感染した個人を治療的にワクチン接種する方法を提供する。投与する前のHBV感染の診断は、日常的に実施することができる。

【 0 0 8 2 】

ワクチンは、DNAワクチンであり得る。DNAワクチンは、コンセンサスHBVコアタンパク質をコードする核酸配列を含む、複数の同じまたは異なるプラスミドを含むことができる。

30

【 0 0 8 3 】

DNAワクチンは、米国特許第5,593,972号、同第5,739,118号、同第5,817,637号、同第5,830,876号、同第5,962,428号、同第5,981,505号、同第5,580,859号、同第5,703,055号、および同第5,676,594号に記載されており、これらは参照として完全に組み込まれる。DNAワクチンは、それが染色体に組み込まれることを阻害する要素または試薬を更に含むことができる。ワクチンは、HBVコアタンパク質のRNAであり得る。RNAワクチンを細胞に導入することができる。

40

【 0 0 8 4 】

ワクチンは、上記に記載された遺伝子構築物または抗原を含む組換えワクチンであり得る。ワクチンは、1つ以上のタンパク質サブユニットの形態の1つ以上のコンセンサスHBVコアタンパク質、1つ以上のコンセンサスHBVコアタンパク質を含む1つ以上の死滅ウイルス粒子、または1つ以上のコンセンサスHBVコアタンパク質を含む1つ以上の弱毒化ウイルス粒子を含むこともできる。弱毒化ワクチンは、弱毒化生ワクチン、死菌ワクチン、および1つ以上のコンセンサスHBVコアタンパク質をコードする外来遺伝子を送達する組換えベクターを使用するワクチン、ならびにサブユニットおよび糖タンパク質ワクチンであり得る。弱毒化生ワクチン、外来抗原を送達する組換えベクターを使用するもの、サブユニットワクチン、および糖ワクチンの例は、米国特許第4,510,2

50

45号、同第4,797,368号、同第4,722,848号、同第4,790,987号、同第4,920,209号、同第5,017,487号、同第5,077,044号、同第5,110,587号、同第5,112,749号、同第5,174,993号、同第5,223,424号、同第5,225,336号、同第5,240,703号、同第5,242,829号、同第5,294,441号、同第5,294,548号、同第5,310,668号、同第5,387,744号、同第5,389,368号、同第5,424,065号、同第5,451,499号、同第5,453,364号、同第5,462,734号、同第5,470,734号、同第5,474,935号、同第5,482,713号、同第5,591,439号、同第5,643,579号、同第5,650,309号、同第5,698,202号、同第5,955,088号、同第6,034,298号、同第6,042,836号、同第6,156,319号、および同第6,589,529号に記載されており、それぞれ参照として本明細書に組み込まれる。

【0085】

ワクチンは、世界中の複数の特定の地域からの複数のHBV遺伝子型に向けられているベクターおよび/またはタンパク質を含むことができる。提供されるワクチンを使用して、治療または予防免疫応答を含む免疫応答を誘導することができる。抗体および/またはキラーT細胞を生成することができ、これらはコンセンサスHBVコアタンパク質に対して、またHBVウイルスの複数の遺伝子型にわたって広く向けられる。そのような抗体および細胞を単離することができる。

【0086】

ワクチンは、薬学的に許容される賦形剤を更に含むことができる。薬学的に許容される賦形剤は、ビヒクル、アジュバント、担体、または希釈剤としての機能分子であり得る。薬学的に許容される賦形剤は、免疫刺激複合体(ISCMS)のような界面活性剤、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質Aを含むLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、スクアレンおよびスクアレンのような小胞、ヒアルロン酸、脂質、リボソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、もしくはナノ粒子が含まれ得るトランスフェクション促進剤、または他の既知のトランスフェクション促進剤であり得る。

【0087】

トランスフェクション促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸(LGS)を含むポリアニオン、ポリカチオン、または脂質である。トランスフェクション促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸であり、より好ましくは、ポリ-L-グルタミン酸は6mg/ml未満の濃度でワクチンに存在する。トランスフェクション促進剤は、免疫刺激複合体(ISCMS)のような界面活性剤、フロイント不完全アジュバント、モノホスホリル脂質Aを含むLPS類似体、ムラミルペプチド、キノン類似体、ならびにスクアレンおよびスクアレンのような小胞を含むことができ、ヒアルロン酸を遺伝子構築物と共に投与に使用することもできる。幾つかの実施形態において、DNAベクターワクチンは、脂質、レクチンリボソーム、もしくはDNAリボソーム混合物(例えば、国際公報第09324640号を参照すること)のような当該技術において既知の他のリボソームを含むリボソーム、カルシウムイオン、ウイルスタンパク質、ポリアニオン、ポリカチオン、もしくはナノ粒子のようなトランスフェクション促進剤、または他の既知のトランスフェクション促進剤を含むこともできる。好ましくは、トランスフェクション促進剤は、ポリ-L-グルタミン酸(LGS)を含むポリアニオン、ポリカチオン、または脂質である。ワクチン中のトランスフェクション剤の濃度は、4mg/ml未満、2mg/ml未満、1mg/ml未満、0.750mg/ml未満、0.500mg/ml未満、0.250mg/ml未満、0.100mg/ml未満、0.050mg/ml未満、または0.010mg/ml未満である。

【0088】

薬学的に許容される賦形剤はアジュバントであり得る。アジュバントは、ワクチンにおいて、代替的なプラスミドに発現される、または上記のプラスミドと組み合わせられた

10

20

30

40

50

タンパク質として送達される、他の遺伝子であり得る。アジュバントは、 γ -インターフェロン (IFN- γ)、 α -インターフェロン (IFN- α)、 β -インターフェロン、血小板由来増殖因子 (PDGF)、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、表皮増殖因子 (EGF)、皮膚T細胞攻撃ケモカイン (CTACK)、上皮胸腺発現ケモカイン (TECK)、粘膜関連上皮ケモカイン (MEC)、IL-12、IL-15、MHC、CD80、D86 (IgEからのシグナル配列を欠失し、場合によりシグナルペプチドを含むIL-15が含まれる) からなる群から選択される。アジュバントは、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、血小板由来増殖因子 (PDGF)、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、表皮増殖因子 (EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、またはこれらの組み合わせであり得る。

10

【0089】

有用なアジュバントであり得る他の遺伝子には、MCP-1、MIP-1a、MIP-1p、IL-8、ランテス、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18の突然変異形態、CD40、CD40L、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7、神経増殖因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNFレセプター、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、不活性NIK、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、NFkB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANK LIGAND、Ox40、Ox40 LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、TAP2、およびこれらの機能的フラグメントをコードするものが含まれる。

20

5. 送達の方法

【0090】

30

本明細書において提供されるものは、HBVウイルス感染に対する免疫応答が誘導され得る特に有効な免疫原となるエピトープを含む、HBVコアタンパク質の遺伝子構築物およびタンパク質を提供する薬学的製剤、好ましくはワクチンを送達する方法である。ワクチンを送達する、またはワクチン接種の方法は、治療的および/または予防的な免疫応答を誘導するために提供することができる。ワクチン接種の方法は、複数のHBV遺伝子型に対する免疫応答を哺乳動物において生成することができる。ワクチンを個体に送達して、哺乳動物の免疫系の活性を調節し、免疫応答を増強することができる。ワクチンの送達は、細胞内で発現され、細胞の表面に送達され、その時点で免疫系が認識し、細胞性、液性、または細胞性および液性の応答を誘導する核酸分子としてのHA抗原のトランスフェクションであり得る。ワクチンの送達は、本明細書に考察されているワクチンを哺乳動物に投与して、複数のHBVウイルスに対する免疫応答を哺乳動物に誘導および誘発することに使用できる。

40

【0091】

哺乳動物へのワクチンの送達、その結果としての哺乳動物の細胞へのベクターの送達によって、トランスフェクトされた細胞は、コンセンサスHBVコアタンパク質を発現および分泌する。これらの分泌タンパク質または合成抗原は、免疫系により外来性であると認識され、抗原に対して作製された抗体、および抗原に対して特異的なT細胞応答が含まれ得る免疫応答を開始する。幾つかの例では、本明細書において考察されたワクチンでワクチン接種された哺乳動物は、初回抗原刺激免疫系を有し、HBVウイルス株を負荷したとき、初回抗原刺激免疫系は、体液性、細胞性、または両方のいずれかにかかわらず、

50

続くHBVウイルスの急速な除去を可能にする。ワクチンを個体に送達して、個体の免疫系の活性を調節し、それにより免疫応答を増強することができる。

【0092】

ワクチンをDNAワクチンの形態で送達することができ、DNAワクチンを送達する方法は、米国特許第4,945,050号および同第5,036,006号に記載されており、両方とも参照として完全に組み込まれる。

【0093】

ワクチンを哺乳動物に投与して、免疫反応を哺乳動物に誘発することができる。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、アンテロップ、バイソン、スイギュウ、ウシ科、シカ、ハリネズミ、ゾウ、ラマ、アルパカ、マウス、ラット、またはニワトリ、好ましくはヒト、ウシ、ブタ、またはニワトリであり得る。

a. 併用治療

【0094】

薬学的組成物、好ましくは本明細書に記載されているワクチンは、タンパク質または遺伝子コードアジュバントと組み合わせて投与することができ、これらには、 α -インターフェロン(IFN- α)、 β -インターフェロン(IFN- β)、 γ -インターフェロン(IFN- γ)、IL-12、IL-15、IL-28、CTACK、TECK、血小板由来増殖因子(PDGF)、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、表皮増殖因子(EGF)、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、MCP-1、MIP-1a、MIP-1p、IL-8、ランテス、L-セレクチン、P-セレクチン、E-セレクチン、CD34、GlyCAM-1、MadCAM-1、LFA-1、VLA-1、Mac-1、p150.95、PECAM、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、CD2、LFA-3、M-CSF、G-CSF、IL-4、IL-18の突然変異形態、CD40、CD40L、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、IL-7、神経増殖因子、血管内皮増殖因子、Fas、TNFレセプター、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2、DR6、カスパーゼICE、Fos、c-jun、Sp-1、Ap-1、Ap-2、p38、p65Rel、MyD88、IRAK、TRAF6、IkB、不活性NIK、SAPK、SAP-1、JNK、インターフェロン応答遺伝子、Nf-kB、Bax、TRAIL、TRAILrec、TRAILrecDRC5、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、RANKLIGAND、Ox40、Ox40LIGAND、NKG2D、MICA、MICB、NKG2A、NKG2B、NKG2C、NKG2E、NKG2F、TAP1、もしくはTAP2、またはこれらの機能性フラグメントが含まれ得る。

b. 投与経路

【0095】

ワクチンは、経口、非経口、舌下、経皮、直腸内、経粘膜、局所、吸入、口腔内投与、胸膜内、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、鼻腔内、鞅内、および関節内、またはこれらの組み合わせを含む異なる経路で投与することができる。獣医学的使用では、組成物を、通常の獣医学の診療に適切に許容される製剤として投与することができる。獣医師は、特定の動物に最も適した投与レジメンおよび投与経路を容易に決定することができる。ワクチンは、伝統的なシリンジ、無針注射装置、「微粒子銃」、または電気穿孔(「EP」)、「流体力学法」、もしくは超音波のような他の物理的方法により投与することができる。

【0096】

ワクチンのベクターは、インビボ電気穿孔を用いるおよび用いないDNA注入(DNAワクチン接種とも呼ばれる)、組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルス関連ウイルス、および組換えワクシニアのようなリボソーム仲介、ナノ粒子促進組換えベクターを含む幾つかの周知の技術により哺乳動物に送達することができる。HBV抗原は、DNA注入を介し、インビボ電気穿孔を伴って送達することができる。

c. 電気穿孔

【0097】

ワクチンのプラスミドの電気穿孔を介したワクチンの投与は、細胞膜に可逆的細孔を形成させるのに有効なエネルギーのパルスを、哺乳動物の組織に送達するように構成され得る電気穿孔装置を使用して達成することができ、好ましくは、エネルギーのパルスは、使用者により予め設定された電流入力と同様の定電流である。電気穿孔装置は、電気穿孔構成要素および電極アセンブリーまたはハンドルアセンブリーを含むことができる。電気穿孔構成要素は、制御装置、電流波形発生器、インピーダンス試験器、波形自動記録器、入力要素、状況報告要素、通信ポート、記憶装置構成要素、電源、および電源スイッチが含まれる、電気穿孔装置の様々な要素の1つ以上を含み、組み込むことができる。電気穿孔は、インビボ電気穿孔装置、例えば、CELLLECTRA（登録商標）EPシステム（Inovio Pharmaceuticals, Inc., Blue Bell, PA）またはElgen電気穿孔機（Inovio Pharmaceuticals, Inc.）を使用することにより達成され、プラスミドによる細胞のトランスフェクションを促進することができる。

10

【0098】

本発明のDNAワクチンの送達を促進することができる電気穿孔装置および電気穿孔法の例には、Draghia - Akli, et al.による米国特許第7,245,963号、Smith, et al.による米国特許公開第2005/0052630号に記載されたものが含まれ、これらの内容は、その全体が参照として本明細書に組み込まれる。DNAワクチンの送達の促進に使用することができる他の電気穿孔装置および電気穿孔法には、2006年10月17日出願の米国特許仮出願第60/852,149号および2007年10月10日出願の同第60/978,982号の特許法119条(e)に基づく利益を主張する、2007年10月17日出願の同時係属および共有の米国特許出願第11/874,072号において提供されたものが含まれ、これらはその全体が参照として組み込まれる。

20

【0099】

Draghia - Akli, et al.による米国特許第7,245,963号は、身体または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を促進するためのモジュール式電極システムおよびこれらの使用を記載する。モジュール式電極システムは、複数の針電極、皮下注射針、プログラム可能定電流パルス制御装置から複数の針電極へ導電性インクを提供する電気コネクタ、および電源を含むことができる。操作者は、支持構造に装填された複数の針電極を掴み、それらを身体または植物の選択された組織の中にしっかりと挿入することができる。次に生体分子は、選択された組織内に皮下注射針を介して送達される。プログラム可能定電流パルス制御装置を作動し、定電流電気パルスが複数の針電極に適用される。適用された定電流電気パルスは、複数の電極の間の細胞への生体分子の導入を促進する。米国特許第7,245,963号の全ての内容は、参照として本明細書に組み込まれる。

30

【0100】

Smith, et al.により提出された米国特許公開第2005/0052630号は、身体または植物内の選択された組織の細胞への生体分子の導入を効果的に促進するために使用される電気穿孔装置を記載する。電気穿孔装置は、操作がソフトウェアまたはファームウェアにより特定される動電学的装置（「EKD装置」）を含む。EKD装置は、電極配列の間に一連のプログラム可能定電流パルスパターンを、使用者の制御およびパルスパラメータの入力に基づいて生成し、電流波形データの記憶および取得を可能にする。電気穿孔装置は、また、針電極の配列を有する交換可能な電極ディスク、注入針の中央注入チャンネル、および取り外し可能なガイドディスクを含む。米国特許公開第2005/0052630号の全ての内容は、参照として本明細書に組み込まれる。

40

【0101】

電極配列および方法は、米国特許第7,245,963号に記載されており、米国

50

特許公開第2005/0052630号を、筋肉のような組織のみならず、他の組織または臓器の中にも深く侵入するように適合させることができる。電極配列の構成のため、注入針（選択された生体分子を送達する）も、標的臓器の中に完全に挿入され、注入は、電極により予め描かれた領域内の標的組織に対して垂直に施用される。米国特許第7,245,963号および米国特許公開第2005/005263号に記載された電極は、好ましくは長さが20mmであり、ゲージが21である。

【0102】

加えて、電気穿孔装置およびその使用を組み込む幾つかの実施形態において考慮されるように、以下の特許：1993年12月28日発行の米国特許第5,273,525号、2000年8月29日発行の米国特許第6,110,161号、2001年7月17日発行の同第6,261,281号、および2005年10月25日発行の同第6,958,060号、ならびに2005年9月6日発行の米国特許第6,939,862号に記載される電気穿孔装置が存在する。更に、様々な装置のいずれかを使用したDNAの送達に関する2004年2月24日発行の米国特許第6,697,669号、およびDNAを注入する方法を描写する2008年2月5日発行の米国特許第7,328,064号に提供された主題を網羅する特許が、本明細書において考慮される。上記の特許は、その全体が参照として組み込まれる。

d. ワクチンを調製する方法

【0103】

本明細書において提供されるものは、本明細書で考察されているDNAワクチンを含むDNAプラスミドを調製する方法である。DNAプラスミドは、哺乳類発現プラスミドへの最終サブクローニングステップの後、当該技術において既知の方法を使用して、大規模発酵タンク中の細胞培養物への接種に使用することができる。

【0104】

本発明のEP装置で使用されるDNAプラスミドは、既知の装置および技術の組み合わせを使用して処方および製造することができるが、好ましくは、これらは2007年5月23日出願の米国公開出願第20090004716号に記載されている最適化プラスミド製造技術を使用して製造される。幾つかの例において、これらの研究に使用されるDNAプラスミドを、10mg/mL以上の濃度で処方することができる。製造技術は、また、契約対象特許である2007年7月3日出願の米国特許第7,238,522号に記載されているものを含む、米国特許出願第60/939792号に記載されているものに加えて、当業者に一般的に既知の様々な装置およびプロトコルを含む、または組み込む。上記に参照された出願および特許である米国特許出願第60/939,792号および米国特許第7,238,522号は、それぞれその全体が本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0105】

本発明を下記の実施例において更に説明する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、例示のためにのみ提示されていることを理解するべきである。上記の考察および例から、当業者は、本発明の本質的な特性を確認することができ、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の様々な変更および修正を行って様々な用途および条件に適合させることができる。したがって、本明細書において示され、記載されているものに加えて、本発明の様々な変更が、前記の記載から当業者には明白である。そのような変更は、添付の特許請求の範囲の範囲内であることも意図される。

【0106】

コンセンサスHBVコアタンパク質は、HBV修飾またはMコア構築物とも呼ばれ、HBV遺伝子型のA、B、C、D、およびEからのエピトープ配列により設計した。これらの遺伝子型からのHBVコアタンパク質配列は、広範囲の遺伝子型に対して免疫を誘導し、したがってHBVの汎用ワクチンをもたらすコンセンサスコアの構成物に含まれるように選択した。幾つかの実施形態において、Mコア構築物の修飾は、IgEリーダー配列の付加を含んだ。幾つかの実施形態では、Mコアタンパクを、増強発現のためのコドン

最適化およびRNA最適化の使用によりコードした。

【0107】

IgEリーダーおよびHAタグを有するMコア配列をコードする核酸配列（配列番号5）を、発現ベクターpVAXにクローンして、構築物pMコアを生じた。インビトロ発現試験をpM構築物の使用により実施し、pVAXを対照として使用した。陽性発現を示す結果を、図2Aおよび2Bに示されているゲル画像で表す。

【0108】

C57BL/6トランスジェニックマウスを、それぞれ4匹のマウスの2群に分け、2週間に1回の間隔で20μgのDNAによる3回の電気穿孔免疫化に使用した（群1 - pVAXベクター対照、群2 - pMコア）。マウスを、0日目、14日目、28日目に免疫化し、35日目に殺処理した。脾臓、肝臓、および血清を、殺処理した動物から採取した。

【0109】

C57BL/6マウス系統のインビボ研究は、腫瘍壊死因子（TNF-）、インターフェロングamma T細胞（IFN-）、ならびに脾臓から取ったCD8およびCD4 T細胞におけるCD107aの分泌の大きさに高まりを示す。図3Aおよび3Bは、pMコアによるC57BL/6マウスのワクチン接種が、脾臓からのCD8+およびCD4+ T細胞によるIFN-分泌の大きさを高めたことを示す。図4Aおよび4Bは、pMコアによるC57BL/6マウスのワクチン接種が、脾臓からのCD8+およびCD4+ T細胞によるIFN-分泌の大きさを高めたことを示す。図5Aおよび5Bは、pMコアによるC57BL/6マウスのワクチン接種が、脾臓からのCD8+およびCD4+ T細胞によるCD107a分泌の大きさを高めたことを示す。

【0110】

肝臓へのHBV特異的T細胞移動も、pMコアDNAワクチンを投与した動物において示された。高頻度でのHBVコア抗原特異的T細胞の標的化、および肝臓に対するエフェクター機能は、HBV免疫療法の開発の重要な目標である。免疫化の後、動物を殺処理し、肝臓を取り出し、肝臓へのHBV特異的エフェクターT細胞移動を決定した。結果は、pMコアワクチンがエフェクターT細胞をインビボで肝臓に駆動することを示す。図6Aおよび6Bは、インターフェロン- T細胞肝臓応答を示す。図7Aおよび7Bは、pMコアのワクチン接種によりもたらされる腫瘍壊死因子 肝臓免疫応答およびに上昇した応答を示す。

【0111】

MコアDNA構築物によりコードされるpMコアコンセンサス免疫原は、強力に平衡したCD4+/CD8+ T細胞免疫応答を駆動する。誘導されたT細胞は、高頻度で肝臓に移動し、HBV感染後の免疫クリアランスのために正確なエフェクター表現型を示す。

【0112】

図8は、酵素結合免疫吸着スポット（ELISPOT）アッセイを使用した、pMコアにより誘導される細胞性免疫応答を示す。脾細胞を、pMコアの全長におよび、8個のアミノ酸と重複する、15merペプチドの2つのプールで刺激した。R10培地中の200,000個の脾細胞を、96ウェルIFN- 捕捉抗体（R&D system）被覆プレートで平板培養し、特定のペプチドプールの存在により5%CO₂中、37で一晩刺激した。細胞を洗浄し、プレートを、ビオチン化抗マウスIFN- 検出抗体（R&D system）と共に一晩インキュベートした。ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ、5-ブロモ-4-クロロ-3'-インドリルホスフェートp-トルイジン塩、およびニトロブルーテトラゾリウムクロリドを連続的に使用して、スポットを発生させた。スポットは、自動化ELISPOT読み取り機（CTL Limited）を使用してカウントした。図8に示されているように、pMコアによる免疫化は、強力な細胞性免疫応答を誘導することができた。データは、主要なエピトープがペプチドプール2に偏っていることを示した。平均HBcAg特異的IFN- T細胞応答は、脾細胞百万個あ

10

20

30

40

50

たり約2000(±210)SFUであった。

【0113】

インビボ細胞傷害性アッセイにおいて、研究は、フローサイトメトリーと組み合わせたカルボキシフルオセイン二酢酸スクシニミジルエステル(CFSE)標識化を使用して実施した。細胞個体群の細胞における細胞分裂を評価した。脾細胞を未処置マウスから単離し、2つの個体群に分けた。CFSEで高く標識した一方の個体群を、関連するペプチド(例えば、HBVコアペプチド)でパルスした。CFSEで低く標識した他方の個体群を、関連性のないペプチド(例えば、HCV NS3ペプチド)でパルスした。標識したペプチド処理細胞を組み合わせ、フロー分析が実施される養子移入実験に使用した。処理した標識化標的細胞の組み合わせた群を、対照群と免疫群の2群のマウスに投与した。脾細胞をそれぞれの群のマウスから単離し、試料をフローサイトメトリーかけた。CFSEの量を測定した。典型的には、そのような実験において2つのピークが形成され、第1は関連性のないペプチドであり、第2は、ピークにおいてより大きいCFSEを示している免疫ペプチドである。

10

【0114】

図9は、ワクチン接種により誘導されたCD8⁺T細胞が、インビボで標的細胞を特異的に排除できることを示す。結果は、未処置マウスの脾臓および肝臓の試料が、関連性のないペプチドおよび関連するペプチドのピークにおける細胞とほぼ等しい量を含むことを示し、一方、結果は、免疫化群のうち、関連するペプチドでパルスしたのから誘導された細胞のピークが、関連性のないペプチドより有意に低いことを明確に示す。これらのデータは、HBVペプチドで処理された標的細胞が、HBVワクチンで免疫化されたマウスにおいて特異的に排除されたが、非免疫化マウスでは排除されなかったことを示す。関連性のないペプチドで処理された標的細胞の排除は、仮にあったとしても、HBVワクチンで免疫化されたマウスと非免疫化マウスでは同じであり、HBVペプチドで処理された標的細胞の排除より有意に少なかった。

20

【0115】

図10は、CFSE標識化を使用するT細胞繁殖アッセイから集めたデータを示す。pVaxベクター(対照)により、またはHBV Mコアを発現するプラスミドpMコアにより処理した、CD3⁺CD4⁺細胞およびCD3⁺CD8⁺の繁殖率を比較した。簡潔には、単離された脾細胞を、製造会社の説明書に従ってカルボキシフルオセイン二酢酸スクシニミジルエステル(CFDA-SE)Cell Tracer Kit(Invitrogen)により染色した。染色された細胞を生理食塩水で3回洗浄し、pMコア特異的重複ペプチドで刺激した。細胞を37℃で96時間インキュベートした。48時間後、50%の培養培地を取り出し、新たなR10に代えた。4日目に細胞を採取し、CD3、CD4、およびCD8特異的モノクローナル抗体(BD Pharmingen)で染色した。細胞を、1%パラホルムアルデヒド(PFA)を有するPBSで固定し、FACS Calibur(Becton Dickinson)で取得した。データをFlowJoプログラムの使用により分析した。低CFSEおよび中CFSE個体群を繁殖細胞と考慮した。図10に示されているように、脾臓から単離されたCD3⁺CD8⁺T細胞は、CD3⁺CD4⁺T細胞と比較してより多く繁殖した。

30

40

【0116】

図11Aおよび11Bは、pVaxベクター(対照)により、またはHBV Mコアを発現するプラスミドpMコアにより処理した動物からの血清の段階希釈における抗HBVコア抗体の比較を示すELISAデータである。簡潔には、高結合ELISAプレート(Costar, Corning, NY)を、1μg/mlのPBS中HBcAgタンパク質により4℃で24時間被覆し、次にPBS-Tweenで洗浄し、1%BSAを含むPBSにより室温で2時間ブロックした。段階的に希釈した血清試料をウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。洗浄した後、結合血清抗体を、HRP標識ヤギ抗マウスIgG(図11A)またはIgA(図11B)で明らかにした。ペルオキシダーゼ結合Abを、テトラメチルベンジジン(Sigma-Aldrich)を基質として使用

50

して検出し、450nmでのODを、Multiscan ELISA Plate Readerで測定した。免疫化マウスから集めた血清における抗原特異的液性応答が、観察された。

【0117】

図12は、脾臓および肝臓の細胞のCD4+およびCD8+からのTNF-およびIFN-の率を示す。

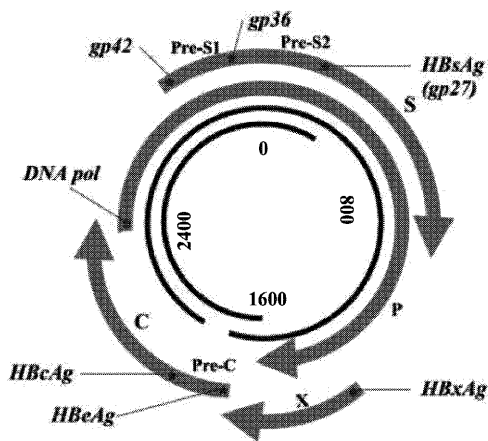
【0118】

HBVの小型動物モデルが不在であるので、HBcAgを使用し、流体力学的注入を介してマウスの肝臓に一過的にトランスフェクトした。免疫化マウスの肝臓に、pMコアまたはHCV NS3/4Aのいずれかでトランスフェクトした。トランスフェクションの3日後の免疫組織化学的染色は、NS3/4Aでトランスフェクトしたものと比較して、HBcAgトランスフェクト肝細胞のクリアランスを示した。血清中のALTレベルを測定して、免疫化マウスにより誘導されたクリアランスが肝損傷を引き起こさなかったことを確実にした。図13の結果は、免疫化マウスにより誘導されたクリアランスが肝損傷を引き起こさなかったことを示す。

10

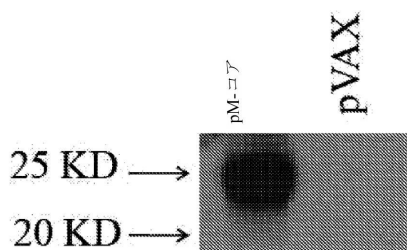
【図1】

FIGURE 1



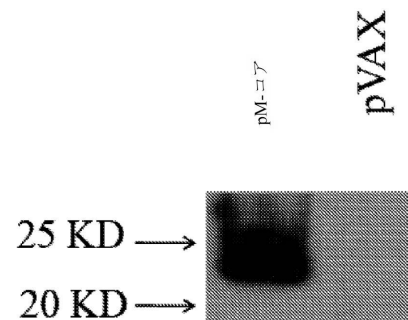
【図2A】

図2A

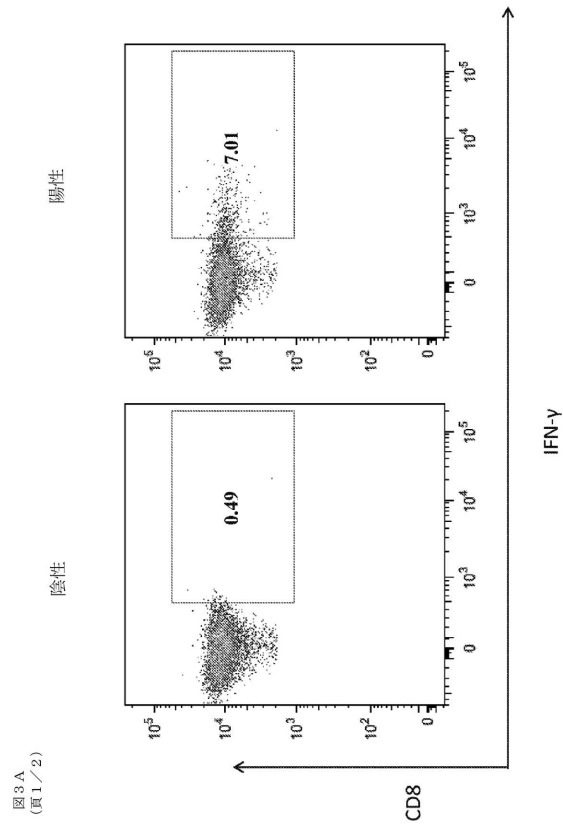


【図2B】

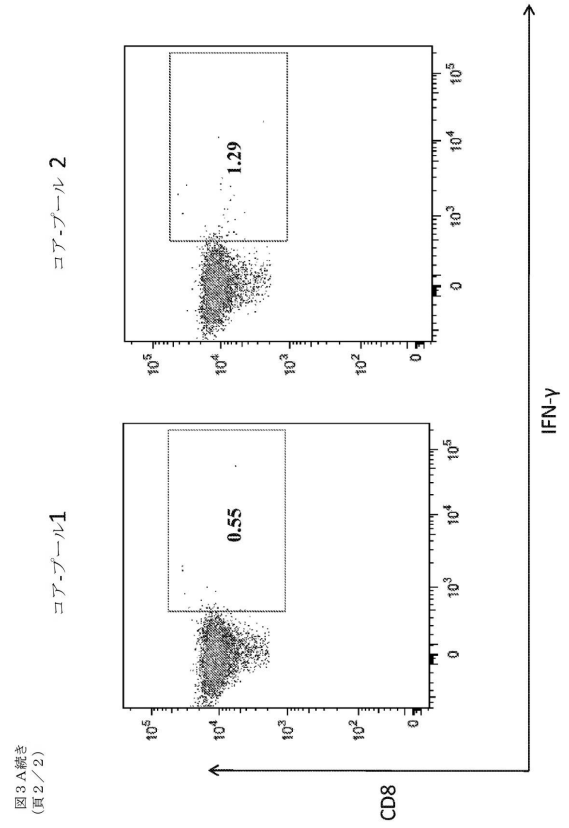
図2B



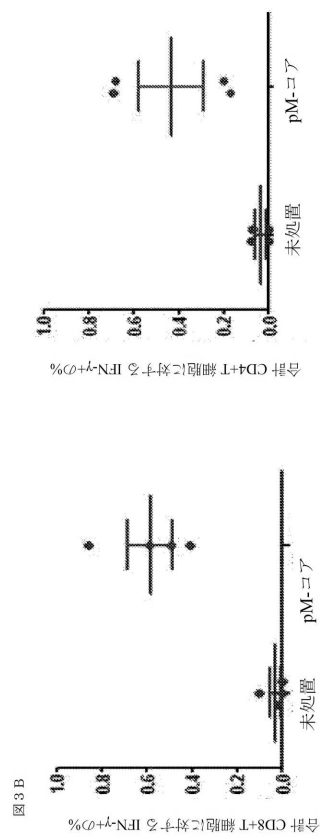
【図 3 A - 1】



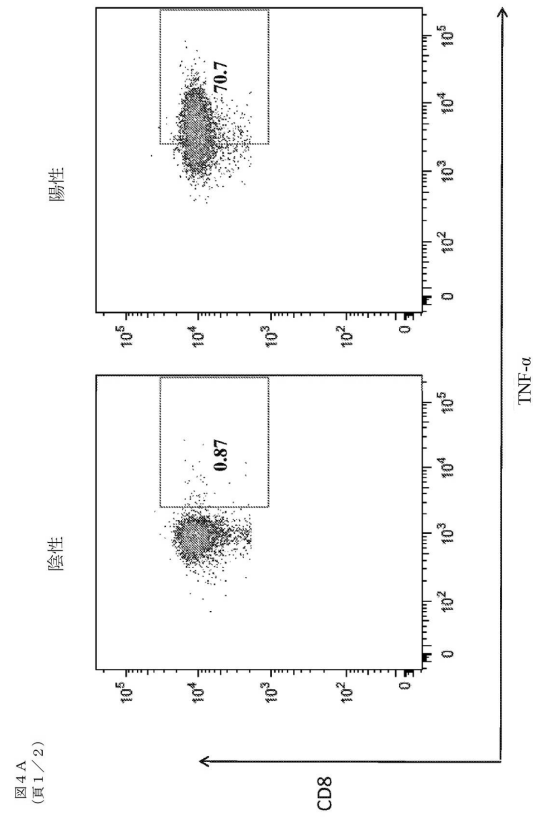
【図 3 A - 2】



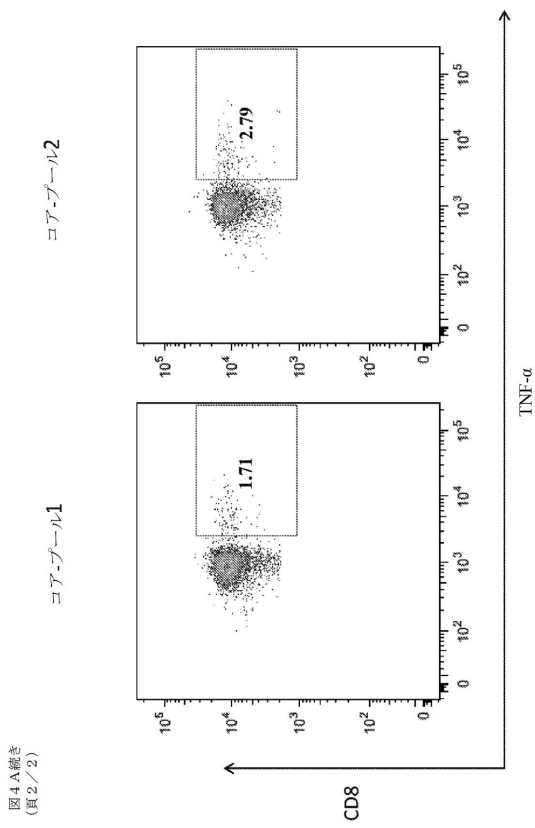
【図 3 B】



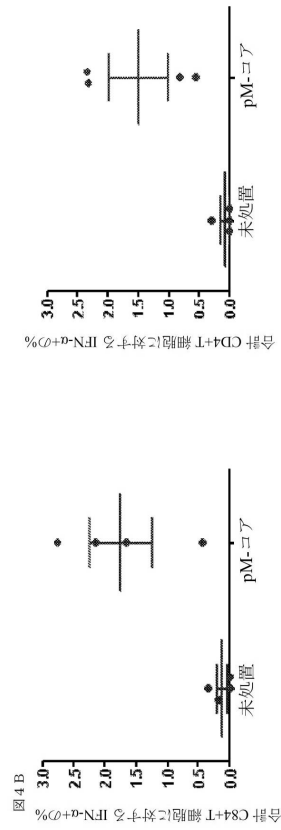
【図 4 A - 1】



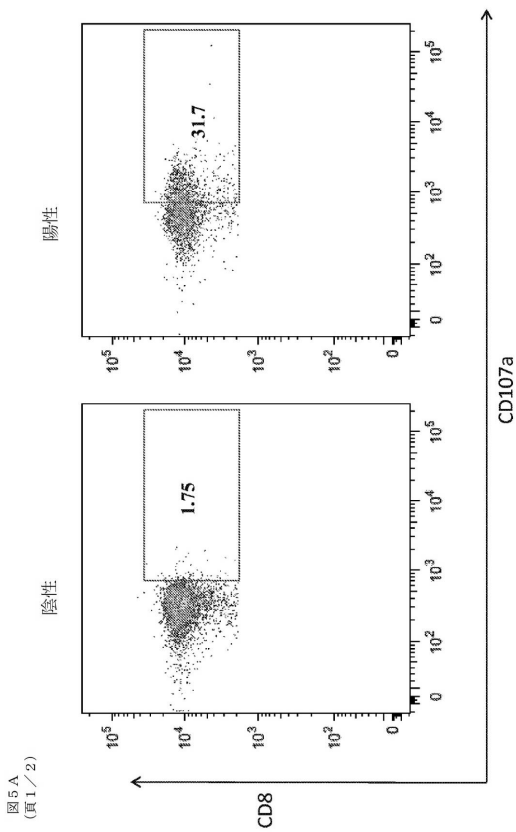
【図 4 A - 2】



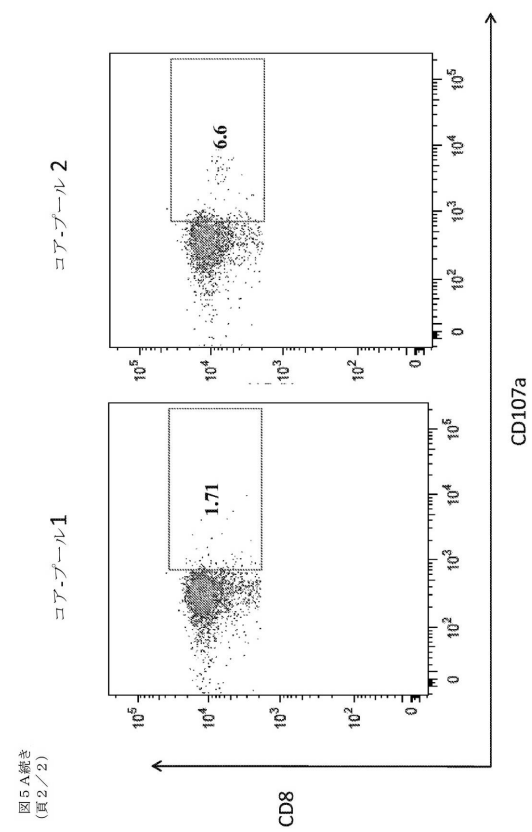
【図 4 B】



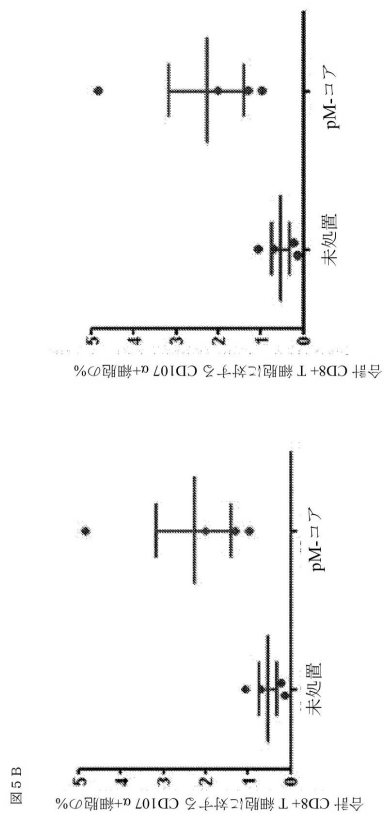
【図 5 A - 1】



【図 5 A - 2】

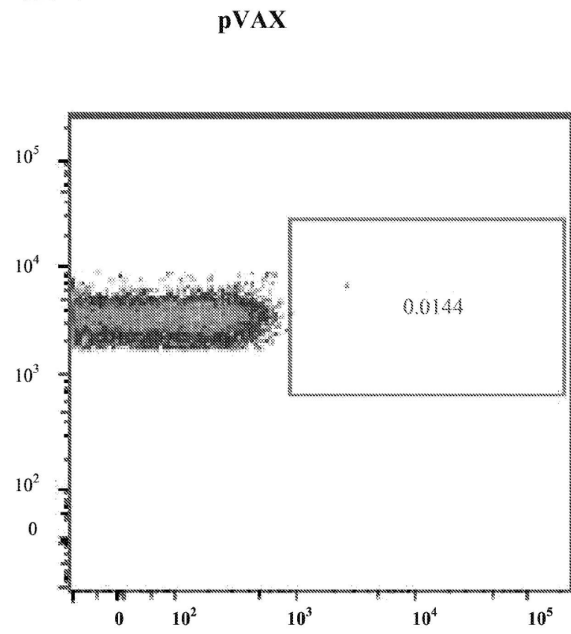


【図 5 B】



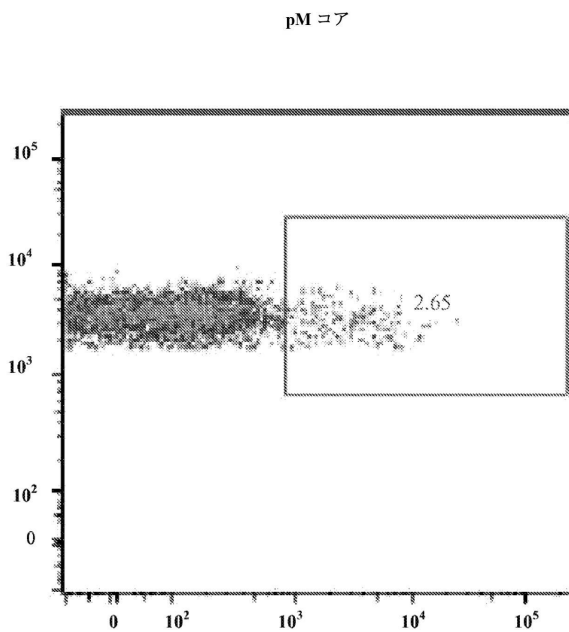
【図 6 A - 1】

図 6 A
(頁 1 / 3)



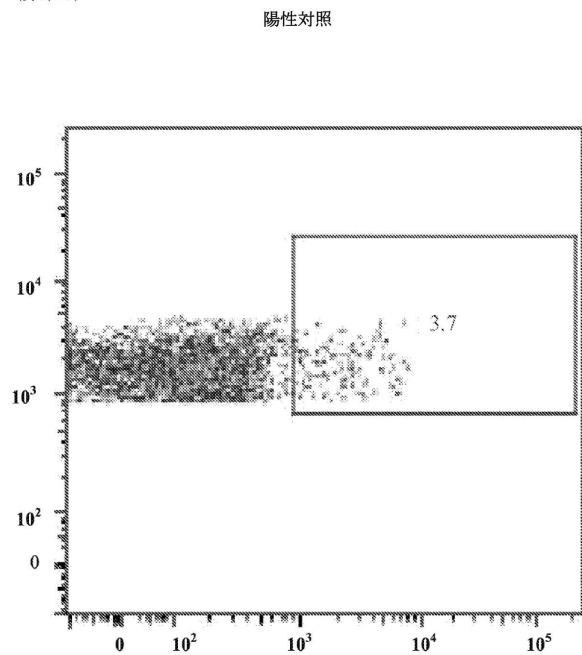
【図 6 A - 2】

図 6 A 続き
(頁 2 / 3)

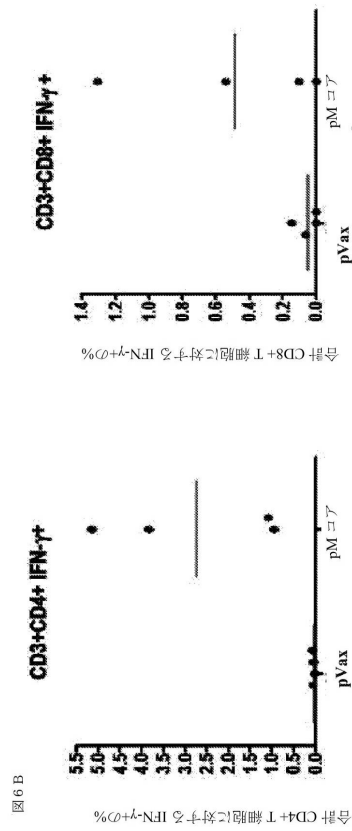


【図 6 A - 3】

図 6 A 続き
(頁 3 / 3)

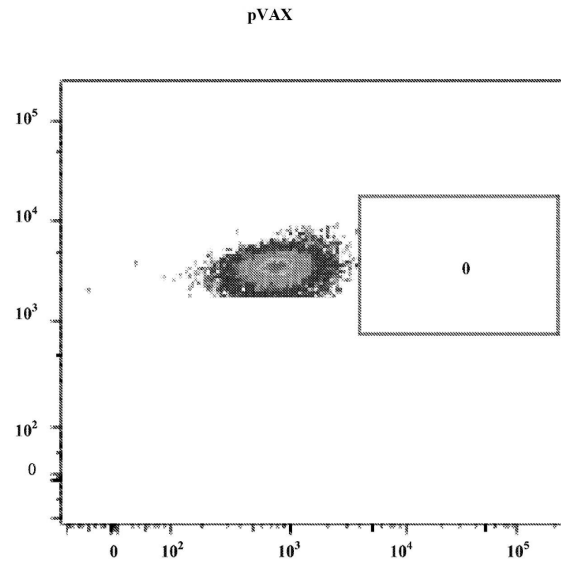


【図 6 B】



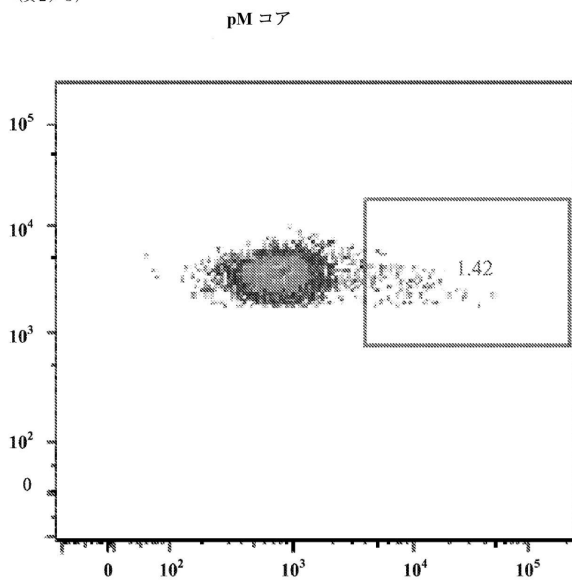
【図 7 A - 1】

図 7 A
(頁 1 / 3)



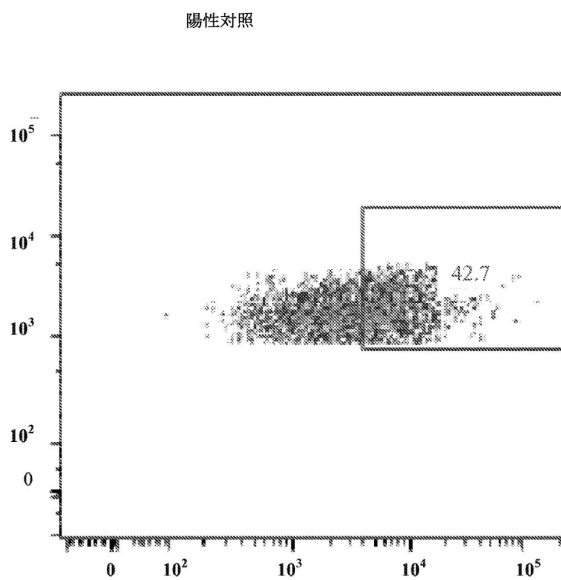
【図 7 A - 2】

図 7 A 続き
(頁 2 / 3)



【図 7 A - 3】

図 7 A 続き
(頁 3 / 3)



【図 7 B】

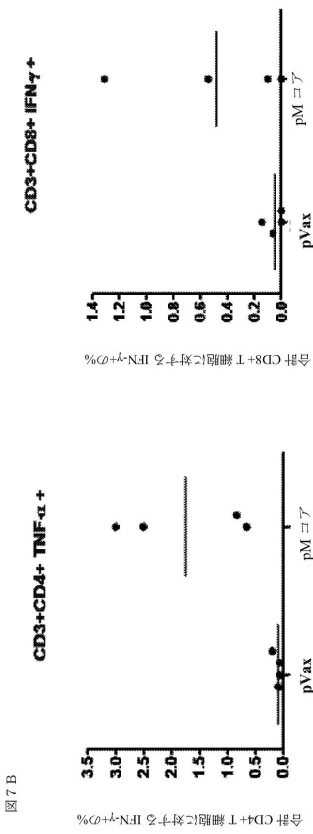
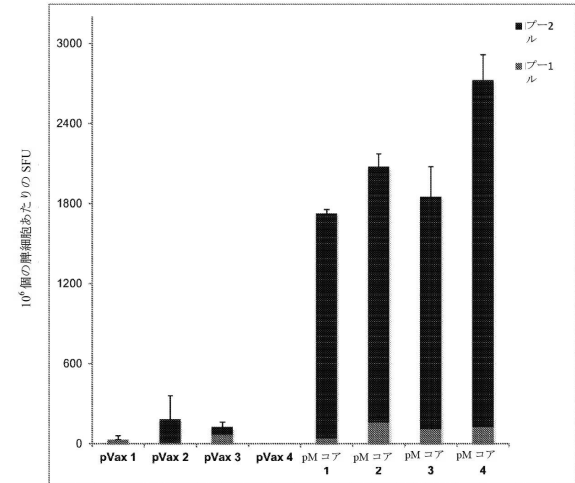


図 7 B

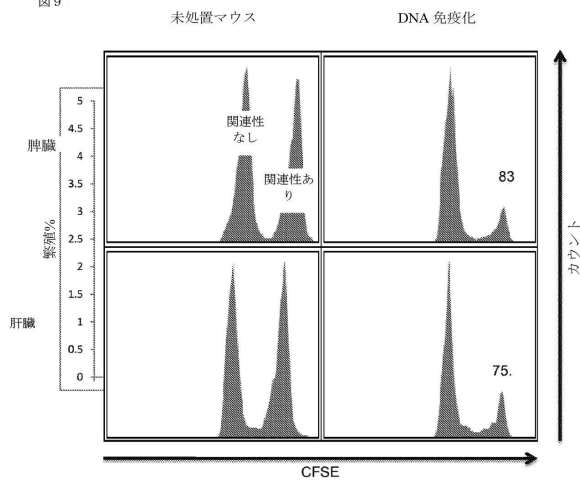
【図 8】

図 8



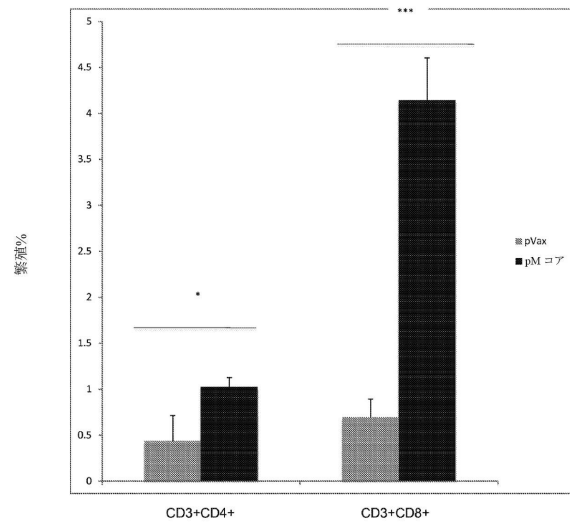
【図 9】

図 9



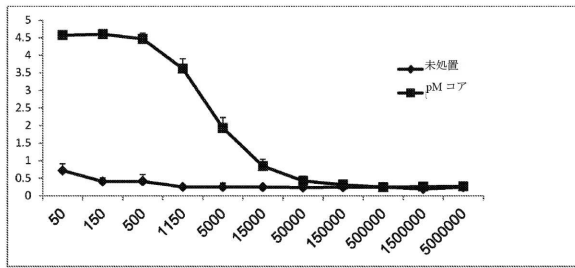
【図 10】

図 10



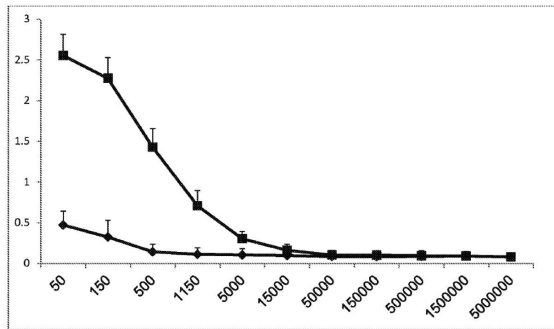
【図 1 1 A】

図 1 1 A



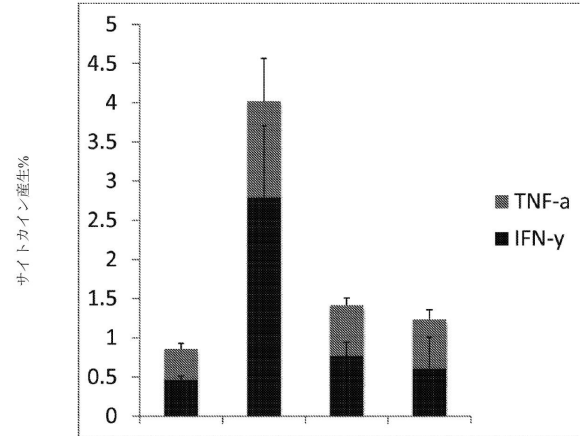
【図 1 1 B】

図 1 1 B



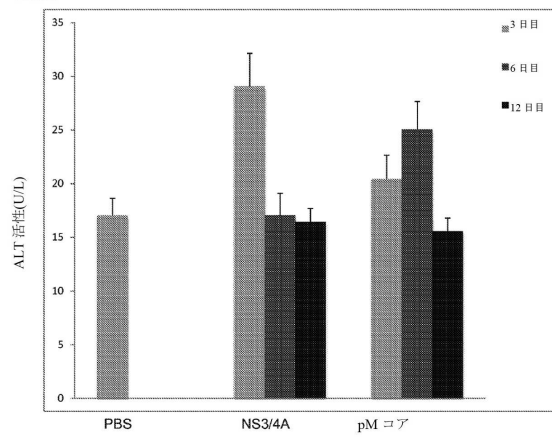
【図 1 2】

図 1 2



【図 1 3】

図 1 3



【配列表】

0006153473000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 31/20 (2006.01) A 6 1 P 31/20

(72)発明者 ヤン, チアン
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19083, ハイパータウン, クラマー アベニュー 2
 13

(72)発明者 オベング - アッジェイ, ニャメキー
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア 19050, ランズドーン, スコットデール ロード 2
 25, エー - 509

審査官 森井 文緒

(56)参考文献 国際公開第2009/130588(WO, A1)
 国際公開第2009/073330(WO, A1)
 国際公開第2009/124312(WO, A1)
 国際公開第2010/057159(WO, A1)
 米国特許出願公開第2004/0156863(US, A1)
 World J. Gastroenterol. (2005) vol.11, no.29, p.4583-4586
 J. Infect. Dis. (2010) vol.201, no.12, p.1867-1879
 Rev. Med. Virol. (2004) vol.14, issue 1, p.3-16

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 PubMed
 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 WPIDS/WPIX(STN)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
 UniProt/GenSeq