

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5710254号  
(P5710254)

(45) 発行日 平成27年4月30日 (2015. 4. 30)

(24) 登録日 平成27年3月13日 (2015. 3. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	7/04	(2006. 01)	C 1 2 N	7/04	
A 6 1 K	35/76	(2015. 01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	39/145	(2006. 01)	A 6 1 K	39/145	
A 6 1 K	39/21	(2006. 01)	A 6 1 K	39/21	

請求項の数 5 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-524517 (P2010-524517)  
 (86) (22) 出願日 平成20年9月12日 (2008. 9. 12)  
 (65) 公表番号 特表2010-538629 (P2010-538629A)  
 (43) 公表日 平成22年12月16日 (2010. 12. 16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/062208  
 (87) 国際公開番号 W02009/034182  
 (87) 国際公開日 平成21年3月19日 (2009. 3. 19)  
 審査請求日 平成23年9月12日 (2011. 9. 12)  
 (31) 優先権主張番号 60/960, 091  
 (32) 優先日 平成19年9月14日 (2007. 9. 14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/136, 125  
 (32) 優先日 平成20年8月13日 (2008. 8. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501173391  
 アンステイテュ・パストゥール  
 INSTITUT PASTEUR  
 フランス国パリ、リュ、デュ、ドクトール  
 、ルー、25-28  
 (73) 特許権者 500025477  
 アンステイテュ、ナショナル、ド、ラ、サ  
 ント、エ、ド、ラ、ルシエルシュ、メディ  
 カル (アンセルム)  
 INSTITUT NATIONAL D  
 E LA SANTE ET DE LA  
 RECHERCHE MEDIC  
 AL (INSERM)  
 フランス国パリ、リュ ド トルビアク、  
 101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 外来エピトープを含む組換え偽ウイルスの発現および分泌を可能とするポリヌクレオチド、それらの製造および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B 型肝炎ウイルスキャプシドタンパク質 (H B c ) の発現が欠損している B 型肝炎ウイルスゲノムを含む組換え複製欠陥 B 型肝炎ウイルスと薬学上許容される担体とを含んでなる、 B 型肝炎の治療のための組成物であって、

該ウイルスが、野生型 B 型肝炎ウイルスには見られない、少なくとも 1 つの免疫優性エピトープを含む外来ペプチドをコードする 1 9 5 ヌクレオチドまでのヌクレオチド配列を含有し、該免疫優性エピトープが配列番号 8 または配列番号 9 で表されるアミノ酸配列を含むものである、組成物。

【請求項 2】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 1 4 で表される N C B I 受託番号 V 0 1 4 6 0 の H B V a y w 3 ゲノムの E c o R I 部位における 4 番目のヌクレオチドからナンバリングを始めて、H B V a y w 3 ゲノムのヌクレオチド残基 1 9 8 1 ~ ヌクレオチド残基 2 3 0 8 の間に位置する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の組成物を含んでなる、 B 型肝炎の治療のためのワクチン。

【請求項 4】

B 型肝炎ウイルスに持続的に感染している患者の処置を目的とする薬剤の製造のための、請求項 1 または 2 に記載の組成物の使用。

【請求項 5】

10

20

B型肝炎ウイルスに慢性的に感染している患者の処置を目的とする薬剤の製造のための、請求項1または2に記載の組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本発明は、持続的感染に関与する組換え複製欠陥ウイルスの発現のためのポリヌクレオチド、および組換え複製欠陥ウイルスを含んでなる組換え複製可能偽ウイルス、ならびに宿主細胞におけるこれらのウイルスの生産に関する。組換え複製欠陥ウイルスおよび複製可能偽ウイルスは、病原体の外来アミノ酸残基などの外来エピトープまたはエピトープを含み得る。複製欠陥ウイルスおよび複製可能偽ウイルスは免疫原性組成物において、また、治療用ワクチンとして特に有用である。本発明はまた、ウイルス感染に対するT細胞応答、および外来抗原性エピトープを肝臓に送達し、エピトープ特異的免疫応答を誘発する組換えウイルスに関する。

10

【0002】

背景技術

B型肝炎ウイルス(HBV)感染に対する有効なワクチンは20年以上利用可能であったが、4億人、すなわち世界の人口の5%を超える人々がHBVに慢性的に感染している。毎年100万人を超える人がHBV関連の肝硬変および肝細胞癌から死に至っている(Ganem D., Prince, A.M. (2004) Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences, N Engl J Med 350:1118-29)。

20

【0003】

HBVは、主として直接の細胞変性性はない。ウイルス抗原に対する免疫応答が、HBV感染後の肝臓疾患とウイルスのクリアランスの双方を担っていると考えられている(Ganem et al, 2004)。ウイルス特異的CD8<sup>+</sup>細胞傷害性Tリンパ球(CTL)およびCD4<sup>+</sup>Tヘルパー(Th)細胞による免疫応答は肝臓の病理とウイルスのクリアランスの双方において重要なエフェクター的役割と調節的役割を果たす。免疫適格成人におけるHBV急性感染は通常、一過性の自然治癒型(self-limited)の肝臓疾患を生じ、その後、ウイルスはクリアランスされ、HBVウイルスタンパク質内のいくつかのエピトープに特異的な強いポリクローナルCTLおよびTh-1型応答を特徴とする。

30

【0004】

ウイルスを首尾よくクリアランスする急性ウイルス感染患者は、コア、ポリメラーゼおよびエンベロープタンパク質内のいくつかのエピトープに特異的な多重特異的ポリクローナル細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答を示す。ウイルス特異的、例えばHBV特異的なTh細胞もまた活性化される。多重特異的Th1様応答は、急性感染後にHBVを首尾よくクリアランスする患者で検出されている(Chisari et al, 1995, Hepatitis B virus immunopathogenesis, Annu Rev Immunol 13:29-60)。

【0005】

HBV特異的T細胞応答は、慢性的感染を生じる患者では弱い、または検出不能であり、T細胞の低応答性または慢性感染における耐性を担う機構は完全には理解されていない。慢性感染患者では、末梢のCD8<sup>+</sup>T細胞応答は検出不能か、または弱く、CD4<sup>+</sup>T細胞応答は感染をクリアランスする患者よりもはるかに弱い。

40

【0006】

機能的エフェクターT細胞はまず感染の初期段階に生じるが、慢性感染の過程で、プログラムされた細胞死1(PD-1)阻害性受容体のアップレギュレーションにより徐々に機能を失う(Chisari et al., 1995)。よって、B型肝炎表面抗原(HBsAg)を自発的にクリアランスし、中和抗HB抗体を生成する慢性患者では、血清変換直前の血液でHBV特異的T細胞応答が検出されている。また、慢性B型肝炎患者からの血液において、HBVウイルス量の有効な治療的低減がHBV特異的CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>T細胞応答の一時的回復をもたらしたことも示されている。

【0007】

50

H B V 持続的感染中の T 細胞の低応答性および消耗を担う機構はまだ完全には明らかにされていない(Rehermann B., Nascimbeni M., 2005, Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection, Nat Rev Immunol 5:215-29)。持続的ウイルス感染中に見られる T 細胞応答の消耗は、病原体のクリアランスに必要なエフェクター機能と T 細胞の免疫病理を生じる能力の間のバランスを反映している。樹状細胞機能の不全および C D 4 <sup>+</sup> C D 2 5 <sup>+</sup> 調節 T 細胞の存在もウイルスの持続性に寄与する。さらに、肝臓は特に肝内 T 細胞応答を耐性またはアネルギーに偏向する。

【 0 0 0 8 】

特異的ウイルスエピトープに基づく能動的免疫療法および肝炎ワクチン注射は、有効な細胞性免疫応答を誘導する上で有望なアプローチとなる。第 I 相臨床試験のこれまでの研究では、H B V D N A ワクチン接種は慢性 H B V 保菌者において T 細胞応答性を特異的に回復させ得ることが示唆されている。しかしながら、この H B V 特異的 T 細胞の活性化は一時的なものであると思われ、その後、D N A 注射をしても徐々に低下した(Mancini-Bou rgine M., Fontaine H., Scott-Algara D., Pol S., Brechet C, Michel M.L., 2004, Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers, Hepatology 40:874-82)。従って、H B V 抗原に対する T 細胞の潜在的耐性を迂回することが免疫療法において最も重要な点であることが分かる。

【 0 0 0 9 】

これを考え合わせると、慢性肝炎、例えば H B V 感染を処置するためには、肝内 T 細胞応答を、消耗またはアネルギーの状態からエフェクター T 細胞が完全に有効な状態へ切り換えなければならないことが示唆される(Bertoletti A., Gehring A.J., 2006, The immune response during hepatitis B virus infection, J Gen Virol 87:1439-49; Rehermann et al., 2005)。

【 0 0 1 0 】

よって、当技術分野において、慢性肝炎感染、例えば、B 型肝炎感染の処置のための新たな療法の必要がある。これらの療法は他のウイルス持続的感染の処置にも一般に有用であるはずである。また、これらの療法は持続的感染に関与するウイルスに感染した細胞に特異的でなければならない。例えば、肝炎ウイルス感染の場合、これらの療法は肝炎ウイルスに感染した細胞、特にヒト肝細胞に特異的でなければならない(Rehermann et al., 2005)。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 1 】

本発明は、当技術分野におけるこれらの要求の充足に寄与するものである。これらの目的を達成するため、本発明は、in vivo においてウイルス感染細胞で野生型ウイルスとともに維持され、補足後にウイルス感染細胞内で外来抗原性エピトープを発現することによりウイルスのクリアランスに免疫学的に寄与する、組換え複製欠陥ウイルスを提供する。本発明は、これらの目的を達成するための偽ウイルスを提供する。本発明の組換え欠陥ウイルスは、ウイルス複製に必須のタンパク質の発現が欠損しているゲノムを含んでなる。このようなタンパク質の例としては、構造タンパク質、より詳しくは、キャプシドタンパク質がある。

【 0 0 1 2 】

本発明はまた、肝臓に外来抗原性エピトープを送達するためのベクターとしての肝炎ウイルスの使用に対してモデル化された新規なワクチン戦略を提供する。肝臓細胞によるこれらのエピトープの提示は、次に、有効な(すなわち、消耗していない) T 細胞応答を標的組織、例えば肝臓に誘引し、ウイルスのクリアランスに寄与する。

【 0 0 1 3 】

一つの実施態様において、組換え複製欠陥ウイルスは、in vivo において肝炎ウイルス感染肝細胞で野生型肝炎ウイルスとともに維持され、補足後にウイルス感染細胞内で外来抗原性エピトープを発現することによりウイルスのクリアランスに免疫学的に寄与する肝炎ウイルスである。本発明は、これらの成果を達成するための肝炎偽ウイルスを提供する

10

20

30

40

50

## 【0014】

より詳しくは、本発明は、偽ウイルスにおいてFluポリエピトープなどの外来ペプチドまたはポリペプチドをクローニングおよび発現するためのポリヌクレオチドおよび発現ベクターの設計を含む。一つの実施態様において、これらのポリヌクレオチドおよび発現ベクターは肝炎偽ウイルスにおいてFluポリエピトープなどの外来ペプチドまたはポリペプチドをクローニングおよび発現するために設計される。これらのポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドおよび発現ベクターが設計され、これらは全て組換え肝炎偽ウイルスの形成を保持している。

## 【0015】

一つの実施態様において、本発明は、肝炎ウイルスキャプシドタンパク質(HBc)の発現が欠損している肝炎ウイルスゲノムを含んでなる組換え複製欠陥肝炎ウイルスを提供する。このウイルスは、病原体の少なくとも1つの免疫優性エピトープをコードする約195ヌクレオチドまでのヌクレオチド配列を含有する。このヌクレオチド配列は、HBVayw3ゲノムのヌクレオチド残基1981~ヌクレオチド残基2308の間に位置する(NCBI受託番号V01460のHBVゲノムのEcoRI部位からナンバリングを始める)。B型肝炎は本発明の実施に用いるのに好ましいウイルスである。

## 【0016】

本発明の脊組換え複製欠陥ウイルスによりトランスフェクトされた脊椎動物細胞もまた提供される。一つの実施態様において、脊椎動物細胞は肝細胞であり、ウイルスは肝炎ウイルスである。一つの実施態様において、組換えウイルスは、2つの構築物p rHBV1.3-IIIまたは-IVのうちの1つによるHu h 7(11)またはHep G2(12)などの肝細胞系統と野生型キャプシド(pCMV-コアまたはpMAS-コア)をコードするプラスミドとの同時トランスフェクションによるか、あるいは1.3コピーのrHBVゲノムおよびHBV野生型コアタンパク質用の付加的発現カセットを担持するp rHBV1.3/HBなどのプラスミドを用いたトランスフェクションによって作製することができる。肝細胞はさらに、肝炎偽ウイルスを形成するように組換え複製欠陥肝炎ウイルスを補足するためのHBcをコードするヌクレオチド配列を含んでなることができる。

## 【0017】

よって、本発明は、ウイルスのキャプシドタンパク質により補足された組換え複製欠陥ウイルスを含んでなる複製可能偽ウイルスを提供し、この偽ウイルスはin vitroにおいてヒト細胞で複製する。一つの実施態様において、この複製可能偽ウイルスは、HBcにより補足された組換え複製欠陥肝炎ウイルスを含んでなる肝炎偽ウイルスであり、この偽ウイルスはin vitroにおいてヒト肝細胞で複製する。

## 【0018】

さらに、本発明は、偽ウイルスを発現する脊椎動物細胞を提供する。一つの実施態様において、脊椎動物細胞は肝炎偽ウイルスを発現する肝細胞である。

## 【0019】

さらに、本発明は、本発明の感染細胞を、ウイルスのキャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を発現すること、かつ、偽ウイルスを形成するように組換え複製欠陥ウイルスを補足するための条件下で培養することを含む、複製可能偽ウイルスの形成方法を提供し、それは所望により宿主細胞から細胞外間隙に分泌させることができる。一つの実施態様において、この方法は、本発明の感染肝細胞を、HBcをコードするヌクレオチド配列を発現するため、かつ、肝炎偽ウイルスを形成するように組換え複製欠陥肝炎ウイルスを補足するための条件下で培養することにより複製可能肝炎偽ウイルスを形成するために使用可能であり、それは所望により宿主細胞から細胞外間隙に分泌させることができる。

## 【0020】

また、組換え複製欠陥肝炎ウイルスまたはその相補物とストリンジェント条件下でハイ

10

20

30

40

50

ブリダイズするポリヌクレオチドも提供される。一つの実施態様において、このポリヌクレオチドは組換え複製欠陥肝炎ウイルスまたはその相補物とストリンジェント条件下でハイブリダイズする。

【0021】

さらにこの組換え複製欠陥ウイルスを含んでなるクローニングおよび/または発現ベクターも提供される。一つの実施態様において、このクローニングおよび/または発現ベクターは組換え複製欠陥肝炎ウイルスを含んでなる。

【0022】

また、この組換え複製欠陥ウイルスおよび複製可能偽ウイルスによりコードされるポリペプチドも提供される。一つの実施態様において、これらのポリペプチドは、組換え複製欠陥肝炎ウイルスおよび複製可能肝炎偽ウイルスによりコードされている。

10

【0023】

さらに、本発明は、本発明のベクターを含んでなる真核生物宿主細胞を提供する。一つの実施態様において、真核生物宿主細胞内のこのベクターは、肝炎偽ウイルスの発現のためにヌクレオチド配列に作動可能なように連結された真核生物プロモーター配列を含んでなる。所望により、このベクターは、外来ポリペプチドとウイルスタンパク質を含んでなる融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでなることができ、この場合、真核生物宿主細胞はその融合タンパク質を含んでなる偽ウイルスを生産する。一つの実施態様において、この融合タンパク質は肝炎タンパク質を含んでなり、真核生物宿主細胞は融合タンパク質を含んでなる肝炎偽ウイルスを生産する。

20

【0024】

より詳しくは、特定の実施態様において、本発明は、HBVゲノムに由来するベクターに関する。HBVゲノムは、HBVキャプシドタンパク質のN末端部分内で融合された外来抗原性エピトープを発現し、野生型キャプシドの補足によって感染個体の肝臓で同時に維持される組換えHBVウイルスを生じるように改変されている。HBVゲノムはさらに、この組換えHBVウイルスに感染した後に、肝細胞の表面で外来エピトープの発現および提示を可能とするように改変することもできる。この外来抗原性エピトープは、MHCクラス1分子の会合に供される一般病原体に由来し、宿主CD8<sup>+</sup>T細胞免疫応答の標的として働き得る。それにより、すでにHBVに感染した肝細胞における組換えHBVベクターにおける複製は、HBVに感染した肝細胞において外来抗原性エピトープを発現することによりHBVのクリアランスに免疫学的に寄与し得る。

30

【0025】

本発明の組換えウイルスベクターの複製を可能とするウイルス感染細胞だけが免疫応答の標的となる。一つの実施態様において、ウイルス感染細胞は、本発明の組換え肝炎ウイルスベクターの複製を可能とする肝炎ウイルス感染肝細胞である。この組換え複製欠陥ウイルスは、脊椎動物の細胞において本発明の複製可能偽ウイルスを介して外来抗原性エピトープ(例えば、ポリエピトープ)を送達し、次いで、強い(ポリ)エピトープ特異的免疫応答を惹起する。一つの実施態様において、組換え複製欠陥ウイルスは組換え複製欠陥肝炎ウイルスであり、脊椎動物細胞は肝細胞である。肝炎ウイルスは細胞溶解機構または非細胞溶解機構によってクリアランスされる。

40

【0026】

本発明の偽ウイルスは強い免疫応答の誘導と、配列特異的CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>Tリンパ球の活性化状態の増強をもたらす、そのため、この偽ウイルスは治療適用に使用することができる。一つの実施態様において、本発明の偽ウイルスは肝炎偽ウイルスである。

【0027】

p rHBV1.3 DNAは、慢性的にHBVに感染している患者における治療的介入のためのDNAワクチンとして使用可能である。この構築物は3つのHBVエンベロープタンパク質とポリメラーゼとHBxタンパク質を発現する。このベクターは、全身経路によってDNAとして投与される場合には複製しない。pCMV-rHBe構築物は、外来エピトープを担持する分泌型のHBeAgをコードする。それは外来エピトープに特異的

50

なT細胞応答を誘導し、これらのエピトープを担持する病原体に対するDNA感作用のベクターとして使用することができる。

【0028】

よって、本発明は、本発明の複製欠陥ウイルスを含んでなる組成物、および該組成物を含んでなるワクチンを提供する。本発明のワクチンは、ウイルスに感染した細胞に対してT細胞応答を刺激するために、持続的にウイルスに感染している患者に投与することができる。よって、本発明はまた、野生型ウイルスに持続的に感染している患者を処置することを目的とする薬剤の製造のための本発明の組換え複製欠陥ウイルスの使用も意図する。本発明はまた、細胞に本発明の組換え複製欠陥ウイルスを提供することにより、ウイルスに感染した細胞におけるエピトープの発現を標的化するための方法も意図する。

10

【0029】

本発明は、本発明の偽ウイルスにより生産されるキメラ抗原性融合タンパク質に対する抗体を提供する。

【0030】

本発明はまた、本明細書に記載のプラスミドを含んでなるマウス、例えば、HLA-A2/DR1またはHbsAg/HLA-A2二重トランスジェニックマウスを提供する。このプラスミドは、トランスジェニック動物を作製するための当技術分野で公知のいずれの方法を用いてマウスの細胞に移入されたものでもよい。一つの実施態様において、動物に筋肉内注射するか、または例えば尾静脈を介して流体力学的に注入する。

【0031】

一つの実施態様において、動物はprHBV-1.3、例えばprHBV-1.3-IIIまたはprHBV-1.3-IVを含んでなる。一つの実施態様において、トランスジェニック動物は、rHBe\_III、rHBe\_IV、ポリトープIIIまたはポリトープIVをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなるプラスミドを含んでなる。

20

【0032】

一つの実施態様において、トランスジェニック動物のCD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージは本発明の偽ウイルスの感染に反応して増加する。一つの実施態様において、トランスジェニック動物は本発明の偽ウイルスに対するエピトープ特異的T細胞応答を惹起する。一つの実施態様において、rHBVは肝臓細胞で発現され、コードされている外来抗原は免疫認識のためにポリペプチドへと処理される。

30

【0033】

本発明は、ウイルスのキャプシドタンパク質により補足された組換え複製欠陥ウイルスを含んでなる組換え複製可能偽ウイルスを提供することによる病原性ウイルスに慢性的に感染した動物にワクチン接種を行う方法を提供する。一つの実施態様において、動物は哺乳類、例えばヒトである。一つの実施態様において、プラスミドは、以下により詳しく記載されるように本発明のプラスミドのいずれかである。

【発明の具体的説明】

【0034】

ヘパドナウイルスは小型で、エンベロープを有する肝臓指向性DNAウイルスである。この科の原株はヒトB型肝炎ウイルス(HBV)である。ヘパドナウイルスゲノムは、部分的に二本鎖の弛緩型環状DNAからなり、広範囲に重複のあるオープンリーディングフレームと調節配列を用いるコンパクトな構成を持っている。HBVゲノムは互いに重複する種々のシスまたはトランスエレメントにより厳密に組織化されている。

40

【0035】

このウイルスゲノムの調査により、それはキャプシドコード領域のN末端部分の外来配列片に、肝細胞で維持されるような偽ウイルスを作出するようにさせることができるが、この挿入を受けたタンパク質は自然感染の際に野生型HBVによりトランスで補足されることが判明した(Gunther S., Piwon N., Jung A., Iwanska A., Schmitz H., Will H., 2000, Enhanced replication contributes to enrichment of hepatitis B virus with a deletion in the core gene, Virology 273:286-99)。よって、組換えHBVは、遺伝子

50

送達のために肝臓指向性を有するターゲティングベクターとして働くと思われた（図1参照）。

【0036】

従って、本発明は、肝炎ウイルスゲノムに由来するベクターを提供する。この肝炎ウイルスゲノムは、肝炎ウイルスキャプシドタンパク質のN末端部分内で融合された外来エピトープを発現するように改変されたものである。結果として得られるウイルスは複製欠陥型である。この組換え複製欠陥型の肝炎ウイルスは肝炎ウイルス感染個体の肝臓で野生型キャプシド補足によってともに維持される。この組換えウイルスに感染すると、肝細胞の表面において外来エピトープの発現および提示が起こる。MHC分子とともに提供されたこれらのエピトープは宿主T細胞免疫応答の標的となる。従って、組換え肝炎ウイルスベクターの複製が可能な肝炎ウイルス感染肝細胞だけが免疫応答の標的となって治癒を受ける。本発明は、例えば、Fluなどの一般的な病原体に由来する外来エピトープに対する既存の免疫を利用する。肝炎ウイルスは細胞溶解性機構または非細胞溶解性気候によってクリアランスされる。

10

【0037】

患者においてウイルスのクリアランスは、市販のキットを用いて血清中のHBV DNAを測定することによって定量することができる。肝臓におけるクリアランスは生検中のDNAを測定することによって定量することができる。ウイルス複製のマーカであるHBsAgから抗HBs抗体への血清変換をウイルスクリアランスのマーカとして使用することができる。HBsAgの血清からのクリアランスおよび抗HBs抗体への血清変換はウイルスの完全なクリアランスを示す。

20

【0038】

本発明はまた、本発明の複製欠陥肝炎ウイルスに基づく組換え複製可能肝炎偽ウイルスを提供する。この偽ウイルスは、HBcにより補足された本発明の組換え複製欠陥肝炎ウイルスを含んでなり、この偽ウイルスはin vitroにおいてヒト肝細胞内で複製する。

【0039】

より詳しくは、本発明は、肝炎ウイルスキャプシドタンパク質（HBc）の発現が欠損している肝炎ウイルスゲノムを含んでなる組換え複製欠陥肝炎ウイルスを提供し、このウイルスは病原体の少なくとも1つの免疫優性エピトープをコードする約195ヌクレオチドまでのヌクレオチド配列を含み、このヌクレオチド配列はHBV ayw3ゲノムのヌクレオチド残基1981～ヌクレオチド残基2308の間に位置する（NCBI受託番号V01460のHBVゲノムのEcoRI部位の4番目のヌクレオチドからナンバリングを始める）。このウイルスは本明細書において本発明の「組換え複製欠陥肝炎ウイルス」と呼ばれる。

30

【0040】

本発明の組換え複製欠陥肝炎ウイルスは、感染細胞において肝炎ウイルス感染細胞によるHBcの発現によって補足される。複製不適格ウイルスのゲノムは、細胞に感染している野生型肝炎ウイルスにより産生されるキャプシド内に完全に封入される。補足されたウイルスは本明細書において「肝炎偽ウイルス」と呼ばれる。

【0041】

よって、本発明は、偽ウイルスへと組み立て可能であり、宿主細胞内で効率的に生産されるタンパク質の生産のためのポリヌクレオチドおよび発現ベクターを提供する。従って、外来ペプチドの残基を伴う自己組み立て組換え偽ウイルスの作製が可能となる。これは有効な一価、二価および多価免疫原性組成物および治療用ワクチンを提供する。

40

【0042】

本発明の複製欠陥肝炎ウイルスおよび肝炎偽ウイルスはHBVに関して詳細に記載されるが、本発明は、A型肝炎ウイルス（HAV）（ピコルナウイルス）；D型肝炎ウイルス（HDV）（デルタウイルス）；C型肝炎ウイルス（HCV）（フラビウイルス）；およびE型肝炎ウイルス（HEV）を含む他の肝炎ウイルスにも適用可能であると理解される。よって、本明細書において「肝炎」とは、B型肝炎ウイルスおよびその他の肝炎ウイルス

50

を含む。B型肝炎ウイルスが本発明の実施に用いるのに好ましい。より一般には、本発明は他のウイルスにも適用可能である。

【0043】

HCVなどの他の肝臓指向性ウイルス、およびより一般には持続的感染に關与するあらゆるウイルスを用いて本発明を実施する場合、外来エピトープの挿入に適切な部位を特定すべくウイルスゲノムを調べることができる。例えば、HBVの構造的および非構造的ウイルスタンパク質をコードしている、重複するオープンリーディングフレームのために、エピトープ挿入のために標的化可能な唯一の遺伝子は、ヌクレオキャプシドコード遺伝子である。しかしながら、他のRNAまたはDNAウイルスはゲノム挿入に対して様々な耐性を有する。さらに、ウイルスが異なれば感染する組織が異なり、それらの組織は、他の非感染組織が傷害されることなく、誘導されたT細胞応答によって標的化され、破壊され得る。

10

【0044】

「ペプチド」は当技術分野で一般に小アミノ酸分子を意味するものと理解され、「ポリペプチド」は一般にそれより大きなアミノ酸分子を意味するものと理解される。ペプチドとポリペプチドは双方とも本発明の範囲内である。よって、例えば、外来配列はペプチドまたはポリペプチドのいずれかであり得る。これらの用語は本明細書において互換的に用いられる。

【0045】

一つの態様において、本発明は、外来ペプチドまたはポリペプチドのエピトープ担持部分を含んでなる肝炎偽ウイルスを提供する。本明細書において、外来ペプチドおよびポリペプチドまたはエピトープとは、野生型肝炎ウイルスには見られないペプチドまたはポリペプチドまたはエピトープを意味する。

20

【0046】

これらのエピトープは外来ペプチドまたはポリペプチドの免疫原性または抗原性エピトープである。「免疫原性エピトープ」とは、完全なポリペプチドまたはそのフラグメントが免疫原である場合に、*in vivo*において体液性または細胞性応答を惹起するタンパク質の部分と定義される。抗体が結合し得るポリペプチドの領域は「抗原決定基」または「抗原性エピトープ」と定義される。抗原性エピトープは、肝炎偽ウイルスにおいて使用した際にも*in vivo*において体液性または細胞性応答を惹起することができる。よって、免疫原性エピトープおよび抗原性エピトープの双方、またはそのいずれか一方を含む肝炎偽ウイルスが本発明に含まれる。免疫原性または抗原性エピトープを含んでなる外来ペプチドまたはポリペプチドは、MHCクラスI分子に対するエピトープの結合のためには少なくとも8アミノ酸残基の長さであり、MHCクラスII分子に対するエピトープの結合のためには少なくとも12アミノ酸長である(細胞性応答)。B細胞(体液性応答)エピトープは少なくとも4アミノ酸長である。

30

【0047】

いくつかの実施態様において、外来ペプチドまたはポリペプチドは約8~約140のアミノ酸残基、好ましくは約20~約140のアミノ酸残基、特に約60~約140のアミノ酸残基を含み得る。HBVの場合には、約68までのアミノ酸を含み得る。一つの実施態様において、HBVの場合、外来ペプチドまたはポリペプチドは68のアミノ酸を含む。別の実施態様では、約65のアミノ酸を含む。肝炎偽ウイルスを生成するために、外来ペプチドまたはポリペプチドのN末端、C末端またはN末端とC末端の双方にフランキング残基を付加することができる。

40

【0048】

外来ペプチドまたはポリペプチドはまた、いずれの数の外来タンパク質に由来してもよい。外来ペプチドまたはポリペプチドはいずれの植物、動物、細菌、ウイルスまたは寄生生物のいずれのタンパク質に由来してもよい。

【0049】

一つの実施態様において、外来ペプチドまたはポリペプチドは病原体のポリペプチドに

50

由来し得る。本明細書において「病原体」とは疾病の特定の原因因子を意味し、例えば、いずれの細菌、ウイルスまたは寄生体も含み得る。

【0050】

本明細書において「疾病」とは、身体機能、系または器官の妨害、停止または障害を意味する。典型的な疾病としては感染性疾患が含まれる。例えば、外来ペプチドまたはポリペプチドは、HIV - I、HIV - 2、SIV、HCV、エボラウイルス、マールブルグウイルス、HTLV - IおよびHTLV - IIなどのRNAウイルスの免疫原性タンパク質に由来するものであってもよい。具体例としては、デング熱ウイルスの構造タンパク質またはNSIタンパク質；ハンタンウイルスのG1、G2またはNタンパク質；A型インフルエンザウイルスのHAタンパク質；フレンドネズミ白血病ウイルスのEnvタンパク質；HTLV - 1ウイルスのEnvタンパク質；日本脳炎ウイルスのpreM、E、NS1またはNS2Aタンパク質；ラッサ熱ウイルスのNまたはGタンパク質；リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスのGまたはNPタンパク質；麻疹ウイルスのHAまたはFタンパク質；パラインフルエンザ3ウイルスのFまたはHNタンパク質；パラインフルエンザSV5ウイルスのFまたはHNタンパク質；狂犬病ウイルスのGタンパク質；呼吸器合胞体ウイルスのFまたはGタンパク質；牛疫のHAまたはFタンパク質；または水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質がある。これらは可能性の一部に過ぎず、網羅的または限定的なリストを表すのではない。

10

【0051】

外来ペプチドまたはポリペプチドはまた、DNAウイルスの免疫原性タンパク質、例えば、サイトメガロウイルスのgp89；エプスタイン - バーウイルスのgp340；ウマヘルペスウイルスのgp13または14；1型単純疱疹ウイルスのgB；1型単純疱疹ウイルスのgD；2型単純疱疹ウイルスのgD；または偽狂犬病ウイルスのgp50に由来するものであってもよい。ここでもまた、これらは可能性の一部に過ぎず、網羅的または限定的なリストを表すのではない。

20

【0052】

さらに、外来ペプチドまたはポリペプチドは、連鎖球菌A M6抗原などの細菌の免疫原性タンパク質、または腫瘍抗原、例えば、ヒト黒色腫p97、ラットNeu癌遺伝子p185、ヒト上皮腫瘍ETAもしくはヒト乳頭腫ウイルス抗原に由来するものであってもよい。ここでもこれらは網羅的または限定的なリストを含むのではない。

30

【0053】

本発明の一つの実施態様において、外来ペプチドまたはポリペプチドはヒト免疫不全ウイルスに由来する。次のものは外来ペプチドまたはポリペプチドの設計に使用することができるHIV - Iエピトープである。

## 【表1】

GAG	P17 (77-85)	SLYNTVATL (S9L)
	P24(19-27)	TLNAWVKW (T9V)
POL	(79-88)	LLDTGADDTV (L10V)
	(263-273)	VLDVGDAYFSV (V11V)
	(334-342)	VIYQYMDDL (V9L)
	(464-472)	ILKEPVHGV (I9V)
	(576-584)	PLVKLWYQL (P9L)
	(669-679)	ESELVNQIIEQ (E11Q)
	(671-680)	ELVNQIIEQL (E10L)
	(956-964)	LLWKGEGAV (L9V)
ENV	Gp41 (260-268)	RLRDLLLIV (R9V)
NEF	(188-196)	AFHHVAREL (A9L)

10

## 【0054】

ナンバリングはH I V - I W E A Uクローン1.60 (Genbank受託番号U21135)のアミノ酸配列に基づく。W E A U配列は反応性ペプチドの配列と常に同一とは限らず、単にウイルスタンパク質におけるその位置を示す。

20

## 【0055】

外来ペプチドまたはポリペプチドは1つのエピトープまたは互いに連結された複数のエピトープを含み得る。さらに、本発明の肝炎偽ウイルスは、同じ病原体の異なる免疫原性タンパク質に由来するエピトープなど、1以上の起源の複数のエピトープを含み得ると理解される。また、この肝炎偽ウイルスは異なる病原体に由来するエピトープなど、異なる起源に由来する1以上のエピトープを含み得ると理解される。さらに、異なる粒子中に異なるエピトープを有する肝炎偽ウイルスの混合物も本発明により意図される。

30

## 【0056】

外来配列を含むタンパク質は野生型ウイルスに感染した細胞の表面に露出させることができる。結果として露出されたエピトープは、例えば、他の感染性ウイルスなどの病原体に存在する場合、エピトープの優れた配置模倣物となる。このような理由で、ウイルス感染細胞は、本発明の複製欠陥肝炎ウイルスおよび結果として生じる肝炎偽ウイルスを介した、病因因子の保護決定因子などの外来ペプチドまたはポリペプチドの担体としての利用に好適である。

## 【0057】

本発明の偽ウイルスのタンパク質をコードする核酸を含む組換え発現ベクターは周知の方法を用いて作製することができる。発現ベクターとしては、哺乳類、ウイルスまたは昆虫遺伝子に由来するものなどの好適な転写または翻訳調節ヌクレオチド配列と作動可能なように連結された外来ペプチドまたはポリペプチドをコードする配列を含む。転写または翻訳調節ヌクレオチド配列は、そのヌクレオチド配列が別のコードDNA配列の転写または翻訳を制御するならば、作動可能なように連結されている。調節配列の例としては、転写プロモーター、オペレーターまたはエンハンサー、mRNAリボゾーム結合部位、組織特異的プロモーターおよび転写後調節エレメント(PRE)、ならびに転写および翻訳の開始または終結を制御する適当な配列を含む。通常には複製起点によって付与される所望の宿主細胞での複製能、および形質転換体が特定される選択遺伝子を発現ベクターに付加的に組み込んでもよい。

40

## 【0058】

50

本発明のベクターの作製に用いるための真核生物ベクターとしては、Stratagene (La Jolla, CA)から入手可能な pWLN E O、pS V 2 C A T、pO G 4 4、pX T 1 および p S G ; ならびにPharmacia (Piscataway, NJ)から入手可能な p S V K 3、p B P V、p M S G および p S V L がある。他の好適なベクターも当業者には容易に明らかになる。  
【 0 0 5 9 】

本発明のベクターの作製に用いるためのベクターでは、非組み込み型真核生物ベクターが有用であるだけでなく、組み込み型/形質転換体ベクター(すなわち、真核生物宿主細胞のゲノムにそれらの核酸材料の一部を組み込むベクター)も使用可能である。これらのベクターに典型はレンチウイルスベクター T r i p s、アデノウイルスおよび酵母組み込みベクターである。

【 0 0 6 0 】

好ましい実施態様では、本発明の発現ベクターは少なくとも1つの選択マーカールを含む。このようなマーカールとしては、真核細胞の培養に関しては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ、G 4 1 8、アンピシリンまたはネオマイシン耐性が挙げられる。

【 0 0 6 1 】

当業者に知られているいずれの強力なプロモーターも、発現の駆動のために使用可能である。好適なプロモーターとしては、アデノウイルス主要後期プロモーターなどのアデノウイルスプロモーター; サイトメガロウイルス(C M V)プロモーターなどの異種プロモーター; 呼吸器合胞体ウイルス(R S V)プロモーター; M M Tプロモーター、メタロチオネインプロモーターなどの誘導プロモーター; 熱ショックプロモーター; アルブミンプロモーター; A p o A Iプロモーター; ヒトグロビンプロモーター; 単純疱疹チミジンキナーゼプロモーターなどのウイルスチミジンキナーゼプロモーター; レトロウイルスL T R; - アクチンプロモーター; およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。プロモーターはまた、H B Vなどの肝炎ウイルス由来の天然プロモーターであってもよい。

【 0 0 6 2 】

本発明の組換えウイルスのin vivo送達にはウイルス保存株の作出が必要である。肝炎ウイルスの場合、これは野生型肝臓ウイルスキャプシドを発現する肝細胞系統を用いることにより達成することができる。ウイルス保存株の作出方法はGunther S. et al, Virology, 273:286-99 (2000)に記載されている。

【 0 0 6 3 】

偽ウイルスの発現に好適な宿主細胞としては高等真核細胞が挙げられる。例えば、肝炎ウイルスの場合、H B V、H C VおよびH D Vの複製には分化した肝細胞が必要である。植物、真菌、酵母および哺乳類細胞宿主とともに用いるのに適当なクローニングおよび発現ベクターは、例えば、Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, (1985)に記載されている。適当な宿主の代表的例として、限定されるものではないが、酵母細胞などの真菌細胞; ショウジョウバエ(Drosophila) S 2 およびヨトウガ(Spodoptera) S f 9 細胞などの昆虫細胞; C H O、C O S、2 9 3 およびBowes黒色腫細胞などの動物細胞; および植物細胞が挙げられる。上記の宿主細胞に適当な培養培地および条件は当技術分野で公知である。

【 0 0 6 4 】

本発明のベクターの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染またはその他の方法によって達成することができる。このような方法は、Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986)などの多くの標準的な実験手引き書に記載されている。

【 0 0 6 5 】

別の態様において、本発明は、in vitroにおいて好適な培養培地で、本発明の発現ベクターを組み込んだ細胞を培養すること、および培養培地においてこれらの細胞によって生産された偽ウイルスを回収することを含む、偽ウイルスのin vitro生産方法に向けられる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 6 】

よって、本発明はまた、偽ウイルスを発現するために本発明のポリヌクレオチドまたはベクターにより感染、形質転換またはトランスフェクトされた組換え真核生物細胞などの細胞に関する。このような細胞を生産するための方法および組換えウイルスの生産においてこれらの細胞を使用する方法は当技術分野で周知である。偽ウイルスは、硫酸アンモニウム沈殿、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンまたはヘパリンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え細胞培養物から回収および精製することができる。

## 【 0 0 6 7 】

本発明は外来ペプチドまたはポリペプチドの1以上の(ポリ)エピトープを担持する肝炎偽ウイルスに関するが、本発明は肝炎偽ウイルスにおける組み込みのために最適化された(ポリ)エピトープの使用を意図する。(ポリ)エピトープヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、その(ポリ)エピトープの全体的な親水性を高める、およびエピトープの改変されたプロセッシングを確保するという点で改変することができる。ポリエピトープ中のエピトープは最良の親水性特性を得るために入れ替えることができる。全般的に疎水性のエピトープと釣り合わせるために親水性スパーサーを付加することもできる。

## 【 0 0 6 8 】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドは単離型であっても精製型であってもよい。「単離」または「精製」とは、本明細書の文脈で純度を定義するために用いる場合、そのタンパク質、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが天然または内因性起源の他のタンパク質を実質的に含まず、製造工程の他の混入残渣のタンパク質またはポリヌクレオチドは約1重量%未満のみ含む。

## 【 0 0 6 9 】

本発明の方法の実施において、複製欠陥ウイルスは、ヒトおよびその他の動物に薬剤を投与するために通常用いられる投与様式の1つを用いて宿主に投与される。よって、例えば、複製欠陥ウイルスは、経口経路により、または静脈内もしくは筋肉内注射など非経口的に宿主に投与することができる。脾臓内、肝内、灌流、皮内および粘膜経路などの他の投与様式も使用可能である。好ましくは、本発明の複製欠陥ウイルスは天然のウイルス感染経路に従って投与される。注射のためには、上記の複製欠陥ウイルスは、この目的で便宜に用いられるビヒクル中の溶液、懸濁液またはエマルションの形で調製することができる。

## 【 0 0 7 0 】

よって、本発明は、本発明の組換え複製欠陥ウイルスを薬学上許容される担体と組み合わせて含んでなる組成物を意図する。本発明はまた、このような組成物を含んでなるワクチンも意図する。本発明のワクチンは、ウイルスに感染した細胞に対するT細胞応答を刺激するためにウイルスに持続的に感染している患者に投与することができる。よって、本発明はまた、野生型ウイルスに持続的に感染している患者を処置することを目的とする薬剤の製造のための本発明の組換え複製欠陥ウイルスの使用を意図する。本発明はまた、本発明の組換え複製欠陥ウイルスを細胞に提供することにより、ウイルスに感染した細胞におけるエピトープ発現を標的化するための方法を意図する。

## 【 0 0 7 1 】

本発明の複製欠陥ウイルスは他の微生物抗原、抗体もしくは有糸分裂促進剤、または他の予防用もしくは治療用物質と組み合わせて使用できると理解される。例えば、種々の寄生体抗原、抗体もしくは有糸分裂促進剤の混合物、または種々のウイルスもしくは細菌抗原、抗体もしくは有糸分裂促進剤の混合物が本発明の方法において使用可能である。同様に、種々の複製欠陥ウイルスの混合物も同組成物において使用可能である。複製欠陥ウイルスはまた、免疫優性、免疫病理学的、および免疫保護性エピトープに基づくワクチン、または不活性化弱毒もしくはサブユニットワクチンなどの他のワクチン剤と組み合わせることもできる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 2 】

本発明の複製欠陥ウイルスは感染細胞においてウイルスをクリアランスするのに十分な濃度を提供するような有効な量で使用する。よって、複製欠陥肝炎ウイルスの量は宿主による吸収、分布およびクリアランスによって異なる。当然のことながら、複製欠陥肝炎ウイルスの有効性は用量に関連する。複製欠陥ウイルスの用量は最低限検出可能な効果をもたらすに十分なものでなければならぬが、この用量は好ましくは、非特異的ポリクローナルリンパ球応答を活性化する用量よりも低いものでなければならない。

## 【 0 0 7 3 】

宿主に投与する本発明の複製欠陥ウイルスの用量は広い限界にわたって可変である。これらのウイルスは治療上有効な最少量で投与することができ、その用量を所望によりその患者が許容する最大用量まで増加させることができる。複製欠陥ウイルスは比較的高い量として投与し、その後、より低い維持量で投与することができるか、あるいはウイルスは均一な用量で投与することもできる。

10

## 【 0 0 7 4 】

用量および投与頻度は本発明の方法で用いる複製欠陥ウイルスによって異なる。ヒトへの投与量は約 5 0 n g / 体重 K g ~ 約 1 μ g / K g 体重、好ましくは約 1 0 0 n g / K g 体重 ~ 約 5 0 0 n g / K g 体重で可変である。チンパンジーの感染には、 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$  H B V ゲノム当量 ( 約 3 5 ~ 9 0 p g D N A に相当 ) が必要である ( Guidotti L. G., et al, Science, 284:825-29 (1999) )。これは 0 . 7 ~ 1 . 8 p g / K g 体重に相当する。最適量は慣例の用量応答分析技術を用いるか、または疾病の動物モデルに基づく研究からのスケールアップによる、最小限の試験で決定することができる。

20

## 【 0 0 7 5 】

本明細書において用量範囲を記載する際に用いる「約」とは、複製欠陥ウイルスが投与される宿主における慢性ウイルス感染のクリアランス ( 本発明の方法によって処置されていない個体に比べた場合の、in vivoにおける感染性ウイルスの持続の不在もしくは軽減、ならびに / または病原性および臨床的疾患の不在、またはその重篤度の軽減を含む、宿主における病原性の決定因子の不在もしくは軽減を伴う ) によって示されるような、数値で示される量と同じ効果を有する量を意味する。

## 【 0 0 7 6 】

本発明の複製欠陥ウイルスの用量は平均的な大きさの成人に関して特定される。よって、用量は患者の体重の軽い重いで 2 0 ~ 2 5 % まで調整することができる。同様に、小児用の用量は周知の用量計算式を用いて調整することができる。

30

## 【 0 0 7 7 】

本発明の複製欠陥ウイルスは、ヒトおよび感受性のある非ヒト霊長類およびその他の脊椎動物動物および哺乳類の肝炎感染の処置において、丸剤、錠剤、ロゼンジ剤、トローチ剤、カプセル剤、坐剤、服用可能な溶液中の注射液などの形態で療法に使用することができる。

## 【 0 0 7 8 】

適当な薬学上許容される担体、希釈剤およびアジュバントは、本明細書に記載の複製欠陥ウイルスと組み合わせて、動物における病状の処置に用いるための医薬組成物を作製することができる。本発明の医薬組成物は複製欠陥ウイルスを固体または液体の薬学上許容される無毒な担体とともに含む。このような医薬担体は、石油、動物、植物または合成起源のものを含む水および油などの無菌液体であり得る。好適な液体の例としては、落花生油、大豆油、鉱油およびゴマ油などがある。医薬組成物が静脈内投与される場合は、水が好ましい担体である。特に注射溶液には、生理学的溶液も液体担体として使用可能である。

40

## 【 0 0 7 9 】

好適な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリ

50

ウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水およびエタノールなどが挙げられる。これらの組成物は溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤および徐放性製剤などの形態を採り得る。好適な医薬担体はE. W. Martinにより"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。これらの医薬組成物は有効治療量の本発明の複製欠陥ウイルスを、宿主への投与に適当な形態を提供するように好適な量の担体とともに含む。

【0080】

宿主において保護を誘導する本発明の複製欠陥ウイルスの能力は、アジュバントを用いた乳化、リポソームへの封入、好適な担体との組合せまたはこれらの技術の組合せによって増強させることができる。例えば、本発明の複製欠陥ウイルスは、リン酸アルミニウムおよび水酸化アルミニウムゲルなどの慣例のアジュバントとともに投与することができる。同様に、複製欠陥ウイルスは脂質膜と結合させたり脂質膜に組み込んだりしてリポソームを形成することができる。この目的で、核酸および他の外来物質を含まない非発熱性脂質を使用することができる。

10

【0081】

宿主または患者はウイルスによる感染に感受性のある動物であってよく、好ましくは哺乳類である。より好ましくは、哺乳類はヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ブタおよびウマからなる群から選択される。特に好ましい実施態様では、哺乳類はヒトである。

【0082】

本発明の別の態様は、本発明の複製欠陥ウイルスをコードする核酸を担体分子とともにまたは担体分子を伴わずに個体に投与することを含む。当業者は核酸ワクチン（例えば、DNAワクチン）および核酸ワクチン技術ならびにタンパク質およびポリペプチドに基づく技術の概念、適用および有効性を認識している。核酸に基づく技術は、裸のまたは封入された本発明の複製欠陥ウイルスをコードする核酸を、投与前にコードされているタンパク質を生産する必要なく、直接組織および細胞、特に筋肉細胞またはケラチノサイトに投与することを可能とする。この技術はレシピエント生物の細胞によって取り込まれ、レシピエントの免疫系が応答する複製欠陥ウイルスを生産するように発現されるといわれるこれらの核酸の能力に基づく。このような核酸ワクチン技術としては、限定されるものではないが、本発明の複製欠陥ウイルスをコードする発現ベクターの送達が含まれる。この技術は「ワクチン」と呼ばれるが、これは完全な治療応答を生じない免疫原性組成物に対しても同様に適用可能である。このような部分的に保護を誘導する組成物および方法も本発明に包含される。

20

30

【0083】

本発明はまた、より大きなまたはより複雑な組成物の一部としての複製欠陥ウイルスの送達も包含する。これらの送達系には本発明の複製欠陥ウイルスをコードする核酸を含むウイルス、ウイルス様粒子または細菌が含まれる。また、本発明の核酸および担体分子とリポソームなどの細胞浸透性化合物との複合体も本発明の範囲内に含まれる。分子ベクター（EP 696, 191, Samain et al.）などのその他の化合物および核酸ワクチンのための送達系も当業者に知られており、例えば、引用することにより本明細書の一部とするWO 93/06223およびWO 90/11092、米国特許第5,580,859号および同第5,589,466号（Vical特許）に例示されており、余分なまたは過度の実験を行わずに製造および使用することができる。

40

【0084】

複製周期の間、HBVプレゲノムRNAはウイルスコアタンパク質およびポリメラーゼタンパク質の翻訳のためのmRNA鋳型として働く。それは、200サブユニット前後のコアタンパク質からなるヌクレオキャプシド中にウイルスポリメラーゼとともに封入されている。ウイルスエンベロープは大（L）、中（M）および主として小（S）ウイルスエンベロープタンパク質とともに稠密に充填されている。エンベロープタンパク質の他、このウイルスは調節タンパク質（X）をコードし、総てサブゲノムRNAから翻訳される。

【0085】

50

H B Vはヒトおよびチンパンジーにのみ感染する。もう1つの動物モデルとして、本発明は、肝臓においてH B V遺伝子を複製または発現するH B VまたはH B s A gトランスジェニックマウスを提供する。生まれつきの導入遺伝子の発現はこれらの動物におけるd H B V特異的T細胞応答を寛容化する。

【0086】

本発明は、マウス肝臓における遺伝子発現を模倣するためのr H B Vの流体力学的注射はd H B V特異的T細胞応答の寛容化を回避することを示す。

【0087】

本発明はまた、H L Aトランスジェニックマウスにおいて、外来H L A - A 2制限エピートープをコードするD N AベクターによるプライミングがT細胞応答を活性化し、これがその後、組換えH B V ( r H B V )の流体力学的注射後のマウスの肝臓に局在することを示す。r H B Vは野生型H B Vを担持し、かつ、ウイルス周期において同じ機構を共有している肝細胞でだけ複製すると予測されるので、外来ポリエピートープによって惹起された強い免疫応答は、自然H B V持続的感染中に存在する消耗したT細胞応答を抑え込む。

【0088】

B型肝炎慢性感染に対する免疫療法的戦略の開発における重大な問題は、H B V特異的T細胞がワクチン接種またはその他の免疫調節アプローチを用いて機能的に回復可能であるかどうかということである。また、ワクチンまたはそれ以外の活性化T細胞が肝臓に侵入し、H B V感染細胞をクリアランスするかどうかを評価することも重要である。この段階の研究では、本発明者らは、外来免疫原性エピートープと融合した改変型コアタンパク質を肝臓細胞に送達するための免疫療法ベクターとしてH B Vを用いた。この改変型ウイルスの遺伝子発現後、機能的エピートープ特異的T細胞が肝臓に誘引され、そこでそれらは肝細胞におけるH B Vの遺伝子発現を制御することができた。

【0089】

遺伝子療法に理想的なベクターは、健康な隣接細胞に害を与えずに異常な細胞を標的とすることができる。本発明は、一般的なウイルスに由来する免疫優性エピートープをコードする短い配列の挿入によって分断されたコア遺伝子を有する人工r H B Vを提供する。この改変型ウイルスは、野生型ウイルスキャプシドがトランスで提供される肝細胞以外では、複製能を持っていなかった。よって、r H B Vは、健康な肝細胞において維持されるのではなく、慢性的H B V複製を有する患者の細胞においてだけ維持されると予想される。自然H B V感染が排除されれば、その後のr H B V偽ウイルスの命は停止される。

【0090】

3.2 K bのH B Vゲノムは極めてコンパクトであり、構造遺伝子の重複オープンリーディングフレーム( O R F )と種々の調節エレメントを有する。主に空間的な制限のためにこのウイルスを操作することは技術的に難しい。本発明は、r H B V内の外来配列がH B V m R N Aのポリアデニル化シグナルとポリメラーゼリーディングフレームの開始部の間に位置する領域に挿入されたということを示す。この領域に、ウイルス複製に關与している可能性のある明確なシス作用エレメントは見られなかった。しかしながら、リボソーム侵入のための可能性のある内部部位が記載されている。よって、このポリメラーゼの翻訳は、メッセンジャーR N Aへのリボソームシャントの機構を備えた確率の低い事象である。H B Vポリメラーゼは、p g R N Aにおいてシグナルを見つけ、ウイルス複製を開始するためにシスで働く。従って、外来挿入の大きさはH B Vポリメラーゼの翻訳に適合しなければならない。興味深いことに、本発明者らの研究におけるr H B Vは、Will H et alが劇症肝炎で同定した天然H B V変異体( D C - 1 4 4 )と類似する。この変異体は、野生型コアタンパク質で十分補足された場合、野生型H B Vよりも2倍~4.5倍多い後代D N Aを生産することができた(Gunther S., Piwon N., Jung A., Iwanska A., Schmitz H., Will H., 2000, Enhanced replication contributes to enrichment of hepatitis B virus with a deletion in the core gene, Virology 273:286-99)。さらに、r H B Vはp g R N Aのパッケージングに有利な短いウイルスゲノムを有する。従って、r H B Vは細胞核のc c c D N Aプールを支配することができ、野生型H B Vの複製の阻害

10

20

30

40

50

に至ると予測される。

【 0 0 9 1 】

宿主免疫応答はHBV感染の種々の転帰を決定する重要な役割を果たしていることを示唆する証拠が増えている。特に、HBV特異的CD8<sup>+</sup>T細胞応答はウイルスの制御および免疫媒介疾患において極めて重要であると考えられている。しかしながら、慢性感染の際、これらの応答は一般に狭く、焦点が狭い。慢性患者由来のウイルス特異的T細胞はすぐに消耗される。T細胞の機能不全は高レベルの持続的ウイルス抗原のためであるとされている。しかし、慢性患者において、他の病原体に対する免疫応答は健全なままである。よって、本発明者らは、rHBV注射の後にさらに肝臓へ向け直される非HBV特異的T細胞の活性化に基づく新規な治療用アプローチを設計することを考えた。

10

【 0 0 9 2 】

要するに、本発明は、野生型ウイルスの同時感染によって救済することができ、かつ、ウイルス感染細胞の排除およびその後のウイルスのクリアランスに寄与する外来抗原性エピトープを発現する、欠陥のある複製周期を有するウイルスを設計する新規なアプローチを提供する。本発明のベクターは、一般的な病原体に由来するエピトープの発現により、既存のウイルス特異的T細胞応答耐性を迂回する。このベクターはウイルス感染細胞でのみ複製する。

【 0 0 9 3 】

特定の実施態様では、本発明は、野生型肝炎ウイルスの同時感染によって救済することができ、かつ、肝炎ウイルス感染細胞の排除およびその後のウイルスのクリアランスに寄与する外来抗原性エピトープを発現する、欠陥のある複製周期を有する肝炎ウイルスを設計する新規なアプローチを提供する。本発明のベクターは、一般的な病原体に由来するエピトープの発現により、既存の肝炎ウイルス特異的T細胞応答耐性を迂回する。このベクターは肝炎ウイルス感染肝細胞でのみ複製する。

20

【 0 0 9 4 】

本発明によれば、外来抗原性ポリエピトープは肝炎免疫寛容を打破する、または打破を助けることができる。誘導されたT細胞応答は、非細胞溶解性機構により肝炎遺伝子を特異的または非特異的にサイレンシングすることができる。ポリエピトープを担持する組換え肝炎ウイルスは、ヒト肝臓細胞で再構成されたUPA-SCIDマウスの肝臓細胞における複製に関して試験することができる。

30

【 0 0 9 5 】

以下のプラスミドを担持する大腸菌株がthe Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 25, rue du Docteur Roux, F- 75724 Paris, Cedex 15, Franceに寄託され、次のような受託番号を割り当てられた。

【表 2】

<u>プラスミド</u>	<u>受託番号</u>
prHVB1.3-IV	CNCM I-3833
pCMVrHbc-IV	CNCM I-3834
prHVB1.3-III	CNCM I-3832
pCMVrHBc	CNCM I-4077
prHBV1.3	CNCM I-4078
prHBV1.3/HBc	CNCM I-4079

40

【 0 0 9 6 】

値の範囲に関して、文脈がそうではないことを明示していない限り、本発明は、その範囲の上限と下限の間の各中間値を、下限の単位の少なくとも10分の1まで包含する。さらに、本発明は、記載されている他のいずれの中間値も包含する。また、本発明は、記載

50

されている範囲から特に除外されていない限り、その範囲の上限および下限の一方または両方を含む範囲も包含する。

【0097】

それ以外の定義がない限り、本明細書で用いられている総ての技術用語および科学用語の意味は、本発明が属する技術分野の熟練者によって共通に理解されているものである。当業者ならばまた、本明細書に記載されているものと類似または等価の方法および材料はいずれも本発明の実施または試験に使用可能であることが分かるであろう。

【0098】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形「a」、「or」および「the」は、文脈がそうではないことを明示していない限り、複数形を含むことを述べておかなければならない。よって、例えば、「1つの対象ポリペプチド(a subject polypeptide)」は複数のこのようなポリペプチドを含み、「その薬剤(the agent)」は当業者に知られている1以上の薬剤およびその等価物を含むなどである。

10

【0099】

さらに、本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる成分の量、反応条件、純度%、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの長さなどを表す総ての数値は、特に断りのない限り、「約」という言葉によって修飾される。よって、本明細書および添付の特許請求の範囲で示される数値パラメーターは、本発明の所望の特性によって異なり得る概数である。少なくとも、特許請求の範囲への均等論の適用を制限しようとするものではないが、各数値パラメーターは少なくとも、通常概数法を適用し、報告されている有意なディジットの数を鑑みて構成すべきである。そうは言っても、具体例に示される数値は可能な限り正確に報告される。しかしながら、いずれの数値もその実験的測定の標準偏差に由来する一定の誤差を本質的に含んでいる。

20

【実施例】

【0100】

実施例もまた上述の本発明の態様および実施態様を記載および詳説するが、これらの実施例は単に例であり、従って、本発明を何ら限定するものではないと考えるべきである。これらの実施例は、以下の実験が行った総てのまたは唯一の実験であることを表すものではない。用いられている数値(例えば、量および温度)に関しては厳密性を保証すべく努力したが、いくらかの誤差および偏差を見込むべきである。特に断りのない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度はセ氏度であり、圧力は大気圧付近である。

30

【0101】

実施例1：組換えHBV(rHBV)複製のin vitroアッセイ

ポリエピトープ配列を1.3コピーのHBVゲノムの、オリジナルキャプシドをコードするフラグメントのN末端部分に挿入し、組換えHBV(prHBV-1.3およびその誘導体-IIIまたは-IV、図2参照)を作出した。prHBV1.3-IIIとCMVプロモーター下でキャプシド遺伝子を発現するプラスミド(pMASコア)の肝臓細胞系統への同時トランスフェクションを行い、in vitroで野生型HBV複製を模倣する複製周期を開始させた(サザンブロットアッセイによるcccDNAゲノムおよび他の中間形態の検出)。結果を図3Aに示す(分泌されたウイルス粒子における、PCRによるHBVゲノムの検出)。

40

【0102】

ヒト肝細胞系統HuH7(Nakabayashi H., Taketa K., Miyano K., Yamane T., Sato J., 1982, Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium, Cancer Res 42(9):3858-63)をpMAS-コアとともにまたは伴わずにprHBV1.3-IIIで、またはpMAS-コア単独で、またはpFC80(陽性対照、2つのHBVゲノムをタンデムで含むプラスミド)でトランスフェクトした。上清を採取し、PEG8000を用いてウイルス粒子を沈殿させた。残りのプラスミドDNAを除去するためのDNアーゼ処理の後、粒子を溶解させ、HBVゲノムをPCR

50

増幅した (PCRプライマーはコア遺伝子のN部分上およびHBsコード遺伝子の中間部)。あるいは、これらのプライマーはHBVゲノムのいずれの部分にあってもよく、より詳しくは、S遺伝子の前にある)。結果を図3Aに示す。予測されたフラグメントはprHBV1.3とpMAS-コアの同時トランスフェクションの後にのみ検出され、pMAS-コアまたはprHBV1.3のいずれか単独のトランスフェクション後には検出されなかった。

#### 【0103】

また、B型肝炎表面抗原(HBsAg)も、prHBV1.3とpMAS-コアで同時トランスフェクトされた細胞またはpFC80でトランスフェクトされた細胞からの上清で検出されたが、pMASコア単独のトランスフェクション後には検出されなかった(図3B参照)。

10

#### 【0104】

LHBsビリオンの救済を評価するため、同時トランスフェクションに関しては2種類の異なる比率(1:1および1:2)とコアは発現しないがEGFPを発現する対照プラスミドを用いた。prHBV1.3-IIIとpMASコアプラスミドを肝細胞HuH7細胞系統へ同時トランスフェクションした後、トランスフェクト細胞の上清を採取した。大HBVエンベロープタンパク質(LHBs)を含むウイルス粒子を、捕捉抗体としての大HBVエンベロープタンパク質に特異的な2種類のモノクローナル抗体(MoAb5a91およびMoAb18-7)と検出のために標識された抗HBs MoAbを用いる特異的ELISAによって定量した。結果を図3Cに示す。この実験は、LHBsを含む粒子の有効な分泌には用量依存的にコアの発現が必要とされることを示す。LHBsは42nmのHBV Dane粒子の表面に位置することが知られている。

20

#### 【0105】

##### 実施例2: rHBV感染のin vivoアッセイ

in vitroにおいて生産されたrHBVビリオンがin vivoにおいて感染性があり得るかどうかを調べるための検討を行う。小動物モデルがないので、ヒト肝臓組織が移植されたUPAトランスジェニックマウスが有用であり得る(Morosan S., et al, 2006, Liver-stage development of Plasmodium falciparum, in a humanized mouse model, J Infect Dis, 193:996-1004)。感染のためには少量の感染性rHBV保存株が必要である。これは、まず、rHBVゲノムを構成的に発現する安定なHe pG2(ATCC番号HB-8065)細胞系統を作出し、次に、この細胞系統にHBVコア遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを形質導入することにより得られる。

30

#### 【0106】

##### 実施例3: 一連の免疫優性エピトープの作出

HBVの分子生物学に関する知識に基づくと、HBVゲノム内に外来配列を収容するスペースはおよそ195ヌクレオチドに制限される。このスペースの制限のため、強力な免疫応答を誘導するために組換えHBVゲノムに、外来免疫優性エピトープ(ポリエピトープ)をコードする短い配列が導入される。ポリエピトープに関しては、3つのCD8<sup>+</sup>T細胞エピトープと雑多な(promiscuous)CD4<sup>+</sup>T細胞エピトープ(PADRE)とを組み合わせて構成され、これによりいくつかの優勢なMHCクラスII分子に万能的に適合することができる。CD8<sup>+</sup>T細胞応答に関しては、臨床的観点から考えて、一般的なヒトウイルス(HIV gag、インフルエンザ基質、EBV BML-F1)に由来する3つの周知のHLA-A2制限エピトープが選択される。さらに、分子生物学アッセイのための便宜な検出マーカーとして、短いB細胞エピトープ(FLAG)を外来配列に導入する(図2および6A~6D参照)。HLA-A2制限キャプシド由来エピトープ(コア18~27)はキャプシドタンパク質のN末端部分に存在する。

40

#### 【0107】

##### 実施例4: in vitroにおけるポリエピトープ発現の評価

HBVのプレコア-コア領域は、自己組立てを行ってウイルスキャプシドを形成する肝炎コア抗原(HBcAg)と分泌ポリペプチドである肝炎e抗原(HBeAg)をコード

50

する。これら2つのタンパク質はフレームコドンのうちの2者で選択的翻訳開始を行うことによって誘導される(図2参照)。16KdのHB eタンパク質は、第1の開始コドンで開始された前駆タンパク質からのタンパク質分解切断によって誘導される。組換えHBVによるポリエピトープの発現を評価するため、肝細胞腫細胞系統HepG2をprHBV1.3-IVでトランスフェクトし、3日後に細胞溶解液を免疫ブロット分析用に採取した。抗FLAGモノクローナル抗体を用いた組換えrHB eタンパク質の検出を図4に示す。

#### 【0108】

組換えウイルスにより担持されているポリエピトープの発現はまた、Huh7細胞をprHBV1.3でトランスフェクトした後の、抗FLAG MoAbを用いた免疫蛍光アッセイにおいても検出された(図5パネルB参照)。HBsAgの発現はまた、抗HBs MoAbを用い、Huh7細胞でも検出された(図5パネルA)。細胞内HBsAgの局在は細胞質に均一に分散していたが、タグ付きの組換えHBc抗原は、やや分極のある核周辺領域に局在していた。

#### 【0109】

##### 実施例5：in vivoにおけるポリエピトープ発現の評価

組換えウイルスにより担持されているポリエピトープの発現はまた、マウスにprHBV1.3-IIIDNAの流体力学的注射を行った後にも評価した(Yang P.L., et al., 2002, Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection, Proc Natl Acad Sci, U.S.A., 99:13825-30; Pajot A., et al., 2004, A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I/class II-knockout mice, Eur J Immunol, 34(11):3060-9)。

#### 【0110】

prHBV1.3-IIIDNAの注射3日後、肝臓を採取し、肝臓切片に対して組織化学的分析を行った。検出のために抗HBs MoAbを用い、肝臓細胞でHBsAg発現が見られた(図6A、6C)。抗FLAG MoAbを用い、外来エピトープを担持する組換えHB eAgが検出された(図6B、6D)。対照マウスにはPBSの流体力学的注射を施した。

#### 【0111】

##### 実施例6：in vivoにおけるポリエピトープに対するT細胞応答の評価

外来ポリエピトープに対するT細胞応答を評価するため、CMVプロモーターにより駆動されるポリエピトープを有するプラスミド(pCMV-rHBe)を、HLA-A2/DRB1\*01トランスジェニックマウス(Pajot et al., 2004)における筋肉内DNA感作(2回の注射)により試験した。外来エピトープに対する特異的T細胞応答を、マウスに2回目の注射を行ってから1週間後に増殖アッセイおよびELISPOTアッセイにより分析した。CD4<sup>+</sup>T細胞エピトープPADREはIFN- $\gamma$ 分泌細胞を活性化し(図7、左のパネル)、免疫マウス由来のリンパ球の増殖を誘導することができた(図7、右のパネル)。

#### 【0112】

ポリエピトープ中に存在するCD8エピトープの中で最も認識頻度が高いのはFlu基質由来エピトープであった(応答性マウス6は匹中4匹)。EBVおよびコア由来エピトープに対するT細胞応答は1匹のマウスでのみ見られた。Flu由来エピトープに対する免疫優性応答は、おそらくHLA-A2分子への固定をめぐるペプチド間の競合の結果であろう。このことを第2の実験で確認したところ、Flu由来エピトープに対してT細胞応答を有する免疫マウスは10匹中8匹であり、HBc<sub>18-27</sub>由来HLA-A2エピトープに対してT細胞応答を有する免疫マウスは10匹中3匹であった(図8、左のパネル)。しかしながらやはり、Gag由来エピトープおよびEBV由来エピトープ活性化T細胞は、IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイ前にin vitroにおいて脾細胞を対応するペプチドで刺激してから1週間後に検出可能であった。

#### 【0113】

10

20

30

40

50

また、Flu基質エピトープに対するT細胞応答も、DNA感作マウス(pCMV-rHBeを2回注射)由来の脾細胞において、Fluエピトープを担持するHLA-A2四量体を用いて定量した。Flu特異的T細胞は脾臓由来CD8<sup>+</sup>T細胞の10%前後に相当する(図8、右のパネル)。

#### 【0114】

組換えウイルスにより発現されたポリエピトープに対する免疫応答も、prHBV1.3-IIIをHLA-A2/-DRB1\*01トランスジェニックマウスに1回流体力学的注射した後に評価した。流体力学的注射から16日後に採取した脾細胞に対してIFN-ELISPOTアッセイを行った。Flu基質エピトープに特異的なT細胞が5匹中4匹のマウスで検出された(図9)。この実験では、対照として2匹のマウスに筋肉内注射によりprHBV1.3-IIIを感作させた(マウス6および7)。組換えHBVの静脈内注射は筋肉内注射よりも免疫原性が低い。これは注射経路と寛容原性器官であることが知られている肝臓における抗原発現に関連するものであり得る。

#### 【0115】

実施例7：in vivoにおけるポリエピトープに対するT細胞応答とFlu特異的T細胞の局在性の評価

HLA-A2/DRB1\*01マウス群(Pajot et al, 2004)の筋肉内にプラスミドpCMV-rHBeを感作させ、外来エピトープに特異的なT細胞応答をプライミングした。プライミング15日後、マウスにprHBV1.3またはpCMV-Gal(対照プラスミド)のいずれかの流体力学的経路による注射、またはpCMV-rHBeの筋肉内注射を行った。図10Aは免疫タイムラインのグラフを示す。

#### 【0116】

肝臓浸潤リンパ球を調製し、FACS分析のために抗CD8、抗CD3抗体、およびFlu四量体で染色した。非免疫対照マウスを対照として用いた。CD8<sup>+</sup>T細胞の定量は抗CD8、抗CD3抗体で染色した後に行った。CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>-</sup>細胞をCD4<sup>+</sup>T細胞とみなした。FACS分析は、CD8<sup>+</sup>T細胞浸潤肝臓の数は、pCMV-Gal受容マウス(図10B、パネルB2、7.31%)および非注射マウス(図10BパネルB1、5.11%)に比べ、prHBV1.3受容マウス(図10BパネルB3、37.4%)ではるかに多いことを示した。非免疫マウス、または流体力学的注射によるpCMV-Gal受容マウス、またはprHBV1.3受容マウスに関する下のパネルにFlu特異的T細胞染色が示されている。prHBV1.3受容マウスでは、T細胞の17%がFlu特異的である。これらの細胞はCD8<sup>+</sup>T細胞の42%に相当する。脾臓由来リンパ球で比較分析を行った。

#### 【0117】

T細胞およびFlu特異的T細胞は脾臓および肝臓に局在した。結果を図10Cに示す。pCMV-GalまたはpCMV-rHBe受容マウスに比べ、prHBV1.3の流体力学的注射後にはCD8<sup>+</sup>T細胞浸潤肝臓の%の著しい増加(それより低い脾臓でも)が示された。これに対し、脾臓または肝臓におけるCD4<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージは3つのマウス群で匹敵するものである。肝臓では、主要なリンパ球集団は、四量体染色により検出されたように、Flu特異的CD8<sup>+</sup>T細胞からなる。これらの実験は、prHBV1.3の流体力学的注射後には、Flu特異的Tリンパ球が脾臓から肝臓へ再局在することを示す。

#### 【0118】

実施例8：外来ポリエピトープを担持するrHBVゲノムの構築

HBV ayw3遺伝子型バックグラウンド(受託番号VO1460、GenBank)においてprHBV1.3を構築した。本発明は、全長ポリメラーゼ遺伝子およびHBVゲノムの総ての下流ウイルスエレメントを担持するプラスミドpCMV-Polを提供する。ポリメラーゼ遺伝子の開始コドンに隣接する配列をKozakのルールと一致するように5'CCGAACATGGAG(配列番号1)と改変した。さらに、外来ポリエピトープをコードする180ヌクレオチドのフラグメントを導入するために、ATG開始コドンの前に2つ

10

20

30

40

50

の制限酵素部位 (Hind III および Pst I) が配置され (Genscript Corp., Piscataway, NJ により合成)、その結果、pCMV-F-Pol と呼ばれる新たなプラスミドが得られた。この包埋された外来配列 (F) は残りの HBV コアフラグメントと同じリーディングフレームを共有する (図 11A ~ 11D)。

#### 【0119】

1.3 コピーの rHBV ゲノムを作製するため、HBV ゲノムの nt 1075 ~ nt 1981 にわたる DNA フラグメントを PCR 増幅し、Nru I および Hind III での消化により、親プラスミドの CMV プロモーターに取って代わらせた。pCMV-rHBc は CMV プロモーターにより駆動される組換え外来抗原 (rHBc) をコードする。pMAS-C は CMV プロモーター下に HBV コア遺伝子を含んでなる。プラスミド p rHBV 1.3 HBc は HBV コアタンパク質の付加的発現カセットを有する。要するに、SV40 初期プロモーター配列 (pCDNA3 由来、Invitrogen) を PCR 増幅し、p rHBV 1.3 の rHBV ゲノムの下流に挿入した (f1 起点により分離)。さらに、この HBV コア遺伝子を BGH ポリアプロセッシング部位とともに SV40 初期プロモーター下にサブクロニングした (図 11D)。プラスミドは Qiagen DNA 精製カラム (Endofree Plasmid Kit (商標); Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。

10

#### 【0120】

PCR 増幅は、QIAamp DNA Blood Kit (商標) (Qiagen) を使い、マウスの血清からウイルス DNA を抽出することによって行った。抽出された DNA を、残留する p rHBV 1.3 DNA 夾雑プラスミドを線状化するために Pvu II 消化で処理した。電気泳動後、ゲルの 2.5 ~ 3.5 kb の領域にわたる DNA バンドを、特異的プライマー (3042 F、5' GTGGAGCCCTCAGGCTCAGGG (配列番号 2); 459 R、5' GGACAAACGGGCAACAT ACC (配列番号 3)) を用いて、PCR 増幅用の鋳型として精製した。

20

#### 【0121】

rHBV は、除去して、一連の免疫優性 T 細胞エピトープをコードするインフレームの 190 bp の外来配列と置換する HBV コア遺伝子内の 325 bp のフラグメントを除き、野生型 HBV ゲノム (図 11A、11B) とそのほとんどの特徴を共有するように構築した (図 11C)。欠失の結果としてポリメラーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームは 135 bp 前に移動し、pol ORF の ATG は HBV プレゲノム RNA の 5' CAP に著しく接近する (図 11A、11B)。このポリメラーゼ遺伝子の ATG 開始シグナルは、翻訳のためのリボソーム侵入を容易にするために Kozak のルールに従って至適化した。

30

#### 【0122】

外来ポリエピトープは 3 つの免疫優性 CD8<sup>+</sup> T 細胞エピトープと雑多な (promiscuous) CD4<sup>+</sup> T 細胞エピトープ (PADRE) とを組み合わせて操作し、これにより優勢な MHC クラス II 分子のほとんどと万能的に調和することができる。臨床的観点から考えて、in vivo において強力な免疫応答を惹起するために、一般的なヒトウイルス (HIV gag、インフルエンザ基質、EBV BML-F1) に由来する 3 つの周知の HLA-A2 制限エピトープが選択された。この構築においては、コア遺伝子のアミノ末端部分に存在する周知の HBc 18-27 HLA-A2 制限エピトープを保存した。さらに、便宜な検出マーカーとして外来配列の N 末端部分に短い B 細胞エピトープ (FLAG) を導入した (図 11C)。HBV のコア遺伝子はプレコア / HBcAg とコアタンパク質の 2 種類のタンパク質をコードし、これらは 2 つの異なるメッセンジャー RNA 種へ翻訳される。この 2 種類のタンパク質の翻訳には 2 つのインフレーム開始コドンが用いられる。コアタンパク質はヌクレオキャプシドの主成分であり、HBcAg を担持する。HBcAg は、コア ORF の最初の ATG で開始される前駆体タンパク質の翻訳後修飾により産生される分泌型タンパク質である。従って、外来ポリエピトープが末端切断型 HBcAg とキャプシドタンパク質とインフレームで融合された rHBc と呼ばれるキメラ抗原性タンパク質が生じ得る (図 11C)。

40

#### 【0123】

50

p r H B V 1 . 3 / H B c は 2 つ の 発 現 カ セ ッ ト ( 一 方 は r H B V ゲ ノ ム 発 現 の た め の も の で 、 も う 一 方 は キ ャ プ シ ド タ ン パ ク 質 の 発 現 の た め の も の で あ る ) を 持 つ プ ラ ス ミ ド で あ る ( 図 1 1 D ) 。 プ ラ ス ミ ド p r H B V 1 . 3 は 1 . 3 コ ピ ー の r H B V ゲ ノ ム の み を 有 す る 。 両 プ ラ ス ミ ド と も i n v i t r o お よ び i n v i v o に お け る 複 製 ア ッ セ イ に 用 い た 。 p C M V r H B c で は 、 r H B c の 発 現 は C M V 初 期 遺 伝 子 プ ロ モ ー タ ー に よ り 駆 動 さ れ る 。 m R N A の ポ リ ア デ ニ ル 化 シ グ ナ ル は H B V 配 列 に よ り 提 供 さ れ る ( 図 1 1 D ) 。 中 で も こ の プ ラ ス ミ ド を マ ウ ス の 免 疫 に 使 用 し た 。

#### 【 0 1 2 4 】

#### 実施例 9 : ポリエピトープを担持する組換えタンパク質の発現

キメラ r H B c タ ン パ ク 質 の 発 現 を ま ず 細 胞 培 養 系 で 検 討 し た 。 ヒ ト 肝 細 胞 腫 細 胞 系 統 H e p G 2 お よ び H u h 7 を 、 1 0 % ウ シ 胎 児 血 清 ( F C S ) を 添 加 し た ダ ル ベ ッ コ の 改 変 イ ー グ ル 培 地 ( D M E M ) で 維 持 し た 。 ポ リ エ チ レ ン イ ミ ン ( P E I ) を S i g m a - A l d r i c h ( S t . L o u i s , M O ) か ら 購 入 し 、 一 時 的 ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン ア ッ セ イ に 用 い た 。 P E I ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン 4 日 後 に 細 胞 培 養 上 清 を 採 取 し 、 r H B V ウ イ ル ス D N A の 調 製 に 用 い た 。

#### 【 0 1 2 5 】

D N A ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン 3 日 後 に 、 公 開 さ れ て い る 方 法 を 用 い て H e p G 2 細 胞 に 対 し て 免 疫 蛍 光 実 験 を 行 っ た 。 要 す る に 、 細 胞 を リ ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 ( P B S ) 中 4 % の パ ラ ホ ル ム ア ル デ ヒ ド で 固 定 し た 。 細 胞 ま た は 組 織 切 片 を 4 で 一 晩 、 抗 F l a g m A b ( 1 0 8 4 ; 1 : 1 0 0 ; S i g m a - A l d r i c h ) ま た は 抗 H B s m A b ( 3 E 7 ; 1 : 1 0 0 ; D a k o , G l o s t r u p , D e n m a r k ) と と も に イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 よ く 洗 浄 し た 後 、 結 合 し た 一 次 抗 体 を A l e x a 4 8 8 標 識 ウ サ ギ 抗 マ ウ ス 免 疫 グ ロ ブ リ ン G ( M o l e c u l a r P r o b e s , C a r l s b a d , C A ) で 検 出 し た 。

#### 【 0 1 2 6 】

新 しく 調 製 し 、 液 体 窒 素 中 で 予 冷 し た イ ソ ペ ン タ ン 中 で 凍 結 さ せ 、 ク リ オ モ ー ル ド ( c r y o m o l d ) 中 の O C T 化 合 物 に 包 埋 し た マ ウ ス 肝 臓 に 対 し て 組 織 学 的 染 色 を 行 っ た 。 5 μ 厚 の ク リ オ ス タ ッ ト 切 片 を ス ー パ ー フ ロ ス ト ・ プ ラ ス ( s u p e r f r o s t p l u s ) ス ラ イ ド に マ ウ ン ト し 、 - 8 0 で 保 存 し た 。 染 色 前 に ス ラ イ ド を 氷 冷 ア セ ト ン 中 で 5 ~ 1 0 分 間 固 定 し た 。 肝 臓 切 片 を ヘ マ ト キ シ リ ン と エ オ ジ ン で 染 色 す る か 、 ま た は F I T C 標 識 抗 H B s 抗 体 ( 1 : 5 0 ; a b 3 2 9 1 4 , A b e a m , C a m b r i d g e , M A ) で 免 疫 染 色 し た 。 P B S T お よ び P B S で よ く 洗 浄 し た 後 、 肝 臓 切 片 を 、 D A P I を 含 有 す る 退 色 防 止 剤 と と も に マ ウ ン ト し た 。

#### 【 0 1 2 7 】

p r H B V 1 . 3 プ ラ ス ミ ド を 肝 細 胞 由 来 H e p G 2 細 胞 系 統 に 一 時 的 ト ラ ン ス フ ェ ク ト し た 後 、 細 胞 溶 解 液 に お い て 、 予 測 さ れ た サ イ ズ ( 1 5 k D ) の 組 換 え タ ン パ ク 質 が 、 抗 F L A G 抗 体 を 用 い た ウ エ ス タ ン プ ロ ッ ト に よ り 検 出 さ れ た ( 図 1 2 A ) 。 ま た 、 r H B c タ ン パ ク 質 が 、 H e p G 2 ト ラ ン ス フ ェ ク ト 細 胞 の 細 胞 質 に お け る 抗 F l a g 抗 体 を 用 い た 抗 体 染 色 お よ び 免 疫 蛍 光 に よ っ て 検 出 さ れ た ( 図 1 2 B 、 下 の パ ネ ル ) 。 r H B V で ト ラ ン ス フ ェ ク ト さ れ た 細 胞 に お け る H B V エ ン ベ ロ ー プ タ ン パ ク 質 の 発 現 は 、 こ の エ ン ベ ロ ー プ の 主 要 抗 原 決 定 基 で あ る H B s A g に 対 す る 抗 体 を 用 い て 検 出 さ れ た ( 図 1 2 B 、 上 の パ ネ ル ) 。 興 味 深 い こ と に 、 細 胞 内 H B s A g の 標 識 は 細 胞 質 に 均 一 に 分 散 し て い た が 、 r H B e は 、 分 極 の あ る 核 周 辺 領 域 に 局 在 し て い た 。 さ ら に 、 H B V 大 エ ン ベ ロ ー プ タ ン パ ク 質 ( L ) を 担 持 す る H B s A g 粒 子 も 、 p r H B V 1 . 3 ト ラ ン ス フ ェ ク シ ョ ン 後 の 細 胞 培 養 上 清 に お け る E L I S A に よ り 検 出 さ れ た ( 以 下 お よ び 図 1 2 D 参 照 ) 。

#### 【 0 1 2 8 】

#### 実施例 10 : r H B V 粒子の救済とトランスキャプシド封入による複製

r H B V は コ ア 遺 伝 子 の 破 壊 に よ る 欠 陥 型 H B V ウ イ ル ス で あ る 。 し か し な が ら 、 そ れ は 、 感 染 肝 細 胞 に お い て ト ラ ン ス 生 産 さ れ た 野 生 型 H B V キ ャ プ シ ド の 助 け で 、 肝 細 胞 に お い て 複 製 し 、 維 持 さ れ る 。 本 発 明 は 、 r H B V ゲ ノ ム と キ ャ プ シ ド タ ン パ ク 質 の 双 方 を

10

20

30

40

50

コードする p r H B V 1 . 3 / H B c プラスミドのトランスフェクション後に、例えば H u h - 7 肝細胞系統からの細胞培養上清中に複製型の r H B V ウイルス D N A を提供するが、p r H B V 1 . 3 のトランスフェクション後にはそのようなウイルス D N A は提供しない。

#### 【 0 1 2 9 】

r H B V ビリオンに関連するウイルス D N A を H e p G 2 - または H u h 7 トランスフェクト細胞の細胞培養上清から抽出した。要するに、培地中のウイルス粒子を、一晚氷上で 1 0 % P E G 8 0 0 0 とともにインキュベートすることにより沈殿させた。1 1 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離した後、ペレットをバッファー ( 1 0 0 m M T r i s / H C l ( p H 8 . 0 ) ) に懸濁させ、さらに、1 0 m M M g C l <sub>2</sub> の存在下、D N A 10  
アーゼ I (Invitrogen, Carlsbad, CA) で処理した。プロテイナーゼ K 消化 ( 1 m g / m l ) の後、ウイルス D N A を、担体としてエタノールおよびグリコーゲンを用いて沈殿させた。サザンプロットアッセイは、H B V ゲノムに特異的な <sup>3 2</sup> P 標識プローブを用い、当技術分野で公知の方法によって行った。

#### 【 0 1 3 0 】

D N A 抽出およびサザンプロットアッセイにおける H B V 特異的プローブハイブリダイゼーションの後、ウイルス D N A はその典型的な弛緩型の環状 ( R C ) と二本鎖直鎖 ( D S L ) 型の双方で検出されたが ( 図 1 3 A )、これらは正常なパッケージングと r H B V 20  
ヌクレオキャプシドの成熟を示す。さらに、コア救済型 r H B V は野生型 H B V よりも効率的なウイルス周期を示した。p w t H B V で同時トランスフェクトした際、r H B V の複製中間体は、野生型の複製型よりも有意に高いレベルで発現したが、これは野生型キャプシドタンパク質の存在下での r H B V ビリオンの救済、パッケージングおよび成熟を示す ( 図 1 3 C )。

#### 【 0 1 3 1 】

流体力学的注射技術 (Liu F., 1999, Gene Therapy) を用いて、マウス肝臓へ r H B V ゲノムを導入した。尾静脈から p r H B V 1 . 3 の流体力学的注射を行って 4 日後に、それぞれ抗 F L A G および抗 H B s 抗体を用いた肝臓切片の免疫蛍光染色により、マウス肝臓で組換え抗原性タンパク質 ( r H B c ) と H B V エンベロープタンパク質の双方が検出された ( 図 1 2 C )。これらの実験を考え合わせると、H B V エンベロープタンパク質と、30  
ポリエピトープを担持する r H B c タンパク質は、1 . 3 コピーの r H B V ゲノムを担持するプラスミドの in vitro または in vivo トランスフェクション後に発現される。

#### 【 0 1 3 2 】

さらに、組換え r H B V ビリオンは、流体力学的注射により p r H B V 1 . 3 と p M A S - C の双方を受容したマウスの血清において、注射 4 日後に特異的 P C R 増幅を用いて検出された。これに対し、p M A S - C の不在下では、p r H B V 1 . 3 単独注射また  
- ガラクトシダーゼをコードするプラスミド ( p C M V - G a l ) の同時注射を行ってもウイルス D N A は検出されなかった ( 図 1 3 D )。従って、r H B V ゲノムは、複製型のウイルス D N A を含むウイルス粒子を完成するように in vitro および in vivo で生成するキャプシドタンパク質によってトランスで補足され得る。

#### 【 0 1 3 3 】

大エンベロープタンパク質 ( L ) は、感染個体の血清中に存在する 4 2 n m H B V 完全ウイルス粒子の表面および繊維状ウイルス粒子下に局在することが知られている。完全なウイルス粒子が r H B V ゲノムから生じ得ることを証明するため、p r H B V 1 . 3 と、40  
コアタンパク質をコードするプラスミド ( p M A S - C ) の同時トランスフェクション実験を H u h - 7 細胞系統で行った。コアコードプラスミドとの同時トランスフェクションの結果、対照としての p r H B V 1 . 3 単独のトランスフェクションまたは p I R E S - G F P との同時トランスフェクションの場合に比べ、細胞培養上清中の L タンパク質担持粒子の生産が増加した。L タンパク質生産の増加は、L タンパク質のアミノ末端部分を認識する 2 つの異なるモノクローナル抗体を用いた特異的 E L I S A で示されるように用量依存的であった ( 図 1 3 B )。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 4 】

実施例 1 1 : ポリエピトープ特異的 T 細胞応答の活性化

I F N - 生産脾細胞は、当技術分野で知られているように、ペプチドで刺激した後に *ex vivo* E l i s p o t アッセイによって定量した。要するに、96 ウェルニトロセルロース H A プレート (Millipore, Bedford, MA) を、4 で一晩、I F N - に対する捕捉抗体 (551216 ; BD Pharmingen, San Diego, CA) とともにインキュベートすることによりコーティングした。新しく単離した脾細胞 (10 / ウェル) を、補足 - M E M 培地中  $1 \mu\text{g} / \text{ml}$  の濃度の個々のペプチドとともに 24 時間インキュベートした。二次ビオチンコンジュゲート抗体 (554410 ; BD Pharmingen, San Diego, CA) とアルカリ性ホスファターゼコンジュゲートストレプトアビジン (Roche, Basel, Switzerland) によりスポットを現像した。Z e i s s E l i s p o t 自動カウンターを用い、スポットを計数した。応答は、3 反復のウェル中のスポット形成細胞 (S F C) 数の中央値が培地のみを含む対照ウェルの場合の少なくとも 2 倍である場合に陽性とみなした。

10

## 【 0 1 3 5 】

増殖アッセイについては、脾細胞 (10 細胞 / ウェル) を、補足 H L 1 血清不含培地 (Biowhitaker, Walkersville, Maryland) 中で 3 日間、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  のペプチドとともにインキュベートした (Pajot et al., 2004)。細胞をウェル当たり  $1 \mu\text{Ci}$  の ( $^3\text{H}$ ) - チミジンで最終 16 時間刺激した。組み込まれた放射活性をマイクロ カウンターで測定した。

## 【 0 1 3 6 】

外来ポリエピトープに対する T 細胞応答を評価するため、r H B c をコードする D N A プラスミド (p C M V - r H B c、実施例 1 に記載のとおり) を用い、H L A - A 2 / D R 1 トランスジェニックマウス (Pajot et al., 2004) に感作させた。筋肉内注射 2 週間後、*ex vivo* I F N - E L I S P O T アッセイを用いて検出したところ、10 匹中 9 匹のマウスがエピトープ特異的 T 細胞応答を惹起したと判定された (図 1 4 A)。

20

## 【 0 1 3 7 】

3 つの外来 C D 8 + T 細胞エピトープのうち F l u 基質由来エピトープが明らかに最も高い頻度で認識され、最も強力である (応答性マウスは 10 匹のうち 9 匹)。F l u 特異的 T 細胞応答は、このタンパク質の N 末端部分に存在する、十分記載されているキャプシド由来 H B c 18 - 27 H L A - A 2 エピトープに対する応答をも支配した。F l u 由来エピトープに対する免疫優性応答はおそらく H L A - A 2 分子への固定をめぐるペプチド間の競合の結果であろう。しかしながらやはり、G a g および E B V 特異的 T 細胞は、個々のペプチドによる *in vitro* 脾細胞の刺激 1 週間後に検出可能であった。また、F l u 基質エピトープに対する T 細胞応答を、D N A 免疫マウス由来の脾細胞を標識するための F l u ペプチドを担持する H L A - A 2 五量体 (Prolimmune, Oxford, UK) を用いて定量した。よって、F l u 特異的 T 細胞は脾臓由来の C D 8 + T 細胞の 10 % 前後に相当する (図 1 4 B、右のパネル)。

30

## 【 0 1 3 8 】

p C M V - r H B e 注射を受容したマウスはまた、I I F N - E L I S P O T アッセイ (図 1 4 A) と、P A D R E ペプチドによる脾細胞の刺激の際の 6 匹のうち 5 匹の免疫マウスで見られた特異的増殖 (図 1 4 C) の双方によって示されたように、M H C クラス II 制限エピトープ P A D R E に対する T ヘルパー 応答を生じさせた。

40

## 【 0 1 3 9 】

実施例 1 2 : 肝臓に対するポリエピトープ特異的 T 細胞応答の再標的化

マウスに心室経路で 20 ml の P B S を灌流させた。肝臓を  $100 \mu\text{m}$  のセルストレーナー (cell strainer) ( $100 \mu\text{m}$  ナイロン、BD, Franklin Lakes, NJ) にてシリンジプランジャーで粉碎した。細胞ペレットを 40 % の P u r c e l l (Sigma, St. Louis, MO)  $15 \text{ml}$  に再懸濁させ、 $2000 \text{rpm}$  で 20 分間遠心分離して肝細胞塊を除去した。ペレット中の肝内リンパ球を、マウス脾細胞の分離の場合と同様に、フィコール勾配遠心分離でさらに精製した。新しく単離したリンパ球を P e r C P 標識抗 C D 3、A P C 標識抗 C

50

D8抗体、またはFluペプチドとコンジュゲートしたPE標識HLAクラスI四量体により染色した。

【0140】

FACS分析については、対象集団にゲートを設けた少なくとも10000事象を、CellQuestプログラム(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)を用い、FACSCaliburサイトメーターにて分析した。rHBVは肝臓中、ならびにHBV感染および複製マウスモデルの不在下で野生型HBVウイルスとともに維持されることを証明するため、本発明はHLA-A2/DR1トランスジェニックマウスにおけるrHBVに基づく能動免疫療法プロトコルを提供する(図15A)。

【0141】

末梢においてポリエピトープ特異的T細胞応答をプライミングするため、0日目にプラスミドpCMV-rHBcの筋肉内注射によりHLA-A2/DR1マウスを免疫した。2週間後、肝細胞感染を迂回し、肝臓におけるHBV複製を模倣するために、prHBV1.3を流体力学的経路により注射した(Yang P., Althage L.A., Chung J., Chisari F.V., 2002, Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection, Proc Natl Acad Sci, U.S.A. 99:13825-30)。よって、rHBVが肝臓細胞において発現可能であり、コードされている外来抗原はペプチドへとプロセッシングされ、in situで提供され、次に、CD8<sup>+</sup>T細胞応答に対する肝内標的となる。pCMV-Galを流体力学的注射の対照プラスミドとして用いた。

【0142】

プライミングおよびprHBV1.3の流体力学的注射の後、マウスは強い肝内T細胞応答を惹起し、多数のCD8<sup>+</sup>Tリンパ球が肝臓に浸潤する。CD8<sup>+</sup>Tリンパ球は、3、4および7日目に採取した肝臓浸潤リンパ球のFACS分析によって検出されるように、マウス肝臓に蓄積した。7日目に肝臓浸潤CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージは、pCMV-Gal受容マウス(7.31%)および非免疫マウス(5.11%)に比べて、prHBV1.3受容マウスでは全リンパ球の37.4%までを占めた(図15B)。prHBV1.3を受容したマウスにおいて、全肝臓浸潤リンパ球の42%に相当する17%のT細胞がFlu特異的であった。これに比べて、筋肉内注射によりプライミングされたFlu特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は0.36%のみが、pCMV-Galの流体力学的注射7日目の肝臓に存在した。

【0143】

図15Cおよび15Dは、流体力学的注射によりprHBV1.3もしくはpCMV-Galのいずれかを受容した、またはpCMV-rHBcの筋肉内注射を2回受容した4群のプライミングマウスからの肝臓および脾臓におけるCD8およびCD4<sup>+</sup>T細胞の相対的分布を示す。pCMV-Gal受容マウスおよびpCMV-rHBcのみを受容したマウスに比べ、prHBV1.3の流体力学的注射後のマウスの肝臓で、そしてそれより程度は低い脾臓でCD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージの著しい増加が見られた。

【0144】

目立ったことでは、prHBV1.3受容マウスの肝臓でFlu特異的CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージの大きな増加が見られた。免疫後、Flu特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は、脾臓リンパ球のパーセンテージに比べ、極めて高いパーセンテージの肝臓リンパ球を含んでいた(p=0.0002)。これに対し、脾臓および肝臓におけるCD4<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージは、3群のマウスで有意には異なっていなかった。CD8<sup>+</sup>T細胞応答が存在する場合、CD4<sup>+</sup>T細胞貯蔵庫は肝臓では相対的に減少するが、脾臓では減少しない。これらの実験は、Flu特異的末梢CD8<sup>+</sup>Tリンパ球の大多数は、rHBVに基づく能動免疫の後に肝臓に再局在することを示す。

【0145】

免疫後に誘導される全リンパ球のパーセンテージの増加は、肝臓および脾臓の双方で統計学的有意に達した。図15Cに示されるように、pCMV-rHBcプライミングおよびその後prHBV1.3の流体力学的注射を施したマウスの肝臓に見られたCD8<sup>+</sup>リ

10

20

30

40

50

ンパ球のパーセンテージは、pCMV rHBV プライミングおよびその後 pCMV Gal の流体力学的注射を施したマウスの肝臓におけるより有意に高く ( $p = 0.0001$ )、筋肉内経路によって pCMV rHBV を 2 回注射したマウスよりも有意に高かった ( $p = 0.0009$ )。

【0146】

pCMV rHBV プライミングおよびその後 p rHBV 1.3 の流体力学的注射を施したマウスの脾臓に見られた CD8<sup>+</sup> リンパ球のパーセンテージの同様の増加も、pCMV rHBV プライミングおよびその後 pCMV Gal の流体力学的注射を施したマウスの脾臓におけるより有意に高く ( $p = 0.0011$ )、筋肉内経路によって pCMV rHBV を 2 回注射したマウスよりも有意に高かった ( $p = 0.0114$ )。

10

【0147】

実施例 13：ポリエピトープ特異的 T 細胞により媒介される肝臓における HBV 遺伝子発現の非細胞溶解性制御

CD8<sup>+</sup> T 細胞は、上記のように流体力学的注射 7 日後における肝臓浸潤物の主要集団である。肝臓浸潤物のさらなる分析は、p rHBV 1.3 注射 4 日後に採取した肝臓切片の組織化学的分析によって行った (図 16A)。炎症細胞の顕著な浸潤が肝臓で見られ、主として様々な大きさのクラスターに集中していたが、このことはそれらが急速に起こり、炎症病巣を形成することを示唆する。事前のプライミング無しで p rHBV 1.3 の流体力学的注射を施したマウスから採取した肝臓切片では細胞クラスターはほとんど見られなかったため、これらの浸潤物の存在は末梢 T 細胞応答のプライミングに依存していた。

20

pCMV - rHBV プライミングおよびその後 pCMV - Gal の流体力学的注射を施したマウスではクラスター化した浸潤物はほとんどまたは全く無かった (図 16A)。

【0148】

F1u 特異的 T 細胞は、in vivo 拡大中の活性化またはエフェクター記憶 T 細胞に相当する CD44<sup>+</sup>、CD62L<sup>low</sup> および CD69<sup>high</sup> としてさらに表現型分類された (図 16B)。F1u ペプチドによる ex vivo 刺激の際、新しく肝臓から単離されたこれらの細胞は主として INF $\gamma$  を生産したが、TNF も生じた (胞内染色により検出) (図 16C)。CD8<sup>+</sup> T 細胞の 58% 前後が、細胞脱顆粒のマーカーである、CD107a での表面染色陽性であった (図 16C)。考え合わせるとこれらのデータは、肝臓浸潤細胞は主として機能的 CD8<sup>+</sup> エフェクター T 細胞であったことを示す。

30

【0149】

肝臓における HBV 遺伝子の発現は、抗原認識後の IFN $\gamma$  分泌 T 細胞による非溶解性の制御を受け得ることが分かっているため、本発明者らはマウスの肝臓および血清における rHBV 発現 (the expression of rHBV expression) をモニタリングした。p rHBV 1.3 の流体力学的注射 4 日後に、HBsAg の肝内発現を、p rHBV 1.3 単独受容マウス (図 16D、右のパネル) と比べたところ、pCMV - rHBV プライミング受容マウスでは検出不能であった (図 16D、左のパネル)。よって、p rHBV 1.3 注射の前に T 細胞がプライミングされたマウスの血清では、HBsAg の 100 倍の減少が見られた (図 16E)。これに対し、末梢プライミングされた T 細胞が存在しない場合、マウスは p rHBV 1.3 の流体力学的注射後に強い HBsAg 発現を示した。HBsAg 発現は肝臓切片の免疫蛍光染色 (図 16D、右のパネル) と、市販の検出キット (Monolisa HBsAg ULTRA, Bio-Rad) を用いた血清における HbsAg 測定 (図 16E、左のパネル) によって証明された。考え合わせるとこれらの実験は、ポリエピトープにより活性化された CD8<sup>+</sup> T 細胞による rHBV 遺伝子発現の迅速な非細胞溶解性制御を示す。

40

【0150】

これらの浸潤 T 細胞は仮説として肝臓傷害の一因である可能性がある。しかしながら、p rHBV 1.3 の流体力学的注射 4 日後、対照としての pCMV - gal 受容マウスに比べ、流体力学的注射による p rHBV 1.3 受容マウスの血清には傷害マーカー ALT の有意な増加は見られなかった (図 16F)。流体力学的注射 4 日後に、平均血清アラニン转スフェラーゼ (ALT) レベルは、rHBV に基づく免疫を施した 11 匹のマ

50

ウスで  $94.18 \pm 30.33$  mU/ml であった。これに対し、pCMV-rHBc プライミングおよびその後 pCMV-Gal の流体力学的注射を施したマウスでは血清 ATL レベルは正常を維持したが (平均 =  $38.00 \pm 5.35$ )、コンカナバリン A 誘導急性肝炎 (Zhu R., et al, 2007, The Pro-Th1 cytokine IL-12 enhances IL-4 production by invariant NKT cells: relevance for T cell-mediated hepatitis, J. Immunol, 178:5435-42) を有するマウスの血清では顕著な増加が見られた (図 16F)。従って、末梢生起された T 細胞応答が存在する場合、rHBV の発現は、大きな肝臓傷害を引き起こすことなく、肝臓の T 細胞応答を急速に誘引したことが示唆される。

#### 【0151】

#### 実施例 14: HBsAg トランスジェニックマウスにおける能動的免疫療法

本発明はさらに、肝臓において HBV エンベロープタンパク質を発現し、血清中に HBsAg を分泌するトランスジェニックマウス系統を用い、本発明の偽ウイルスの器官特異的ウイルスの標的化および発現を証明する。この系統は予め HLA-A2 トランスジェニックマウスと戻し交配され、ネズミ MHC クラス I 分子を欠いている。本研究に用いた HLA-A2/DR1 (HLA-A02.01/DR1 - トランスジェニック、H-2 クラス I/クラス II KO) および HBsAg/HLA-A2 トランスジェニックマウスはパスツール研究所の動物施設で育成されたものである (Pajot et al., 2004)。

#### 【0152】

HBsAg/HLA-A2 二重トランスジェニック系統 (H-2 クラス II KO) は HLA-A2 のバックグラウンドを備えており、導入遺伝子の発現後、マウス肝臓で HBsAg を産生する。筋肉内 DNA 感作は、 $100 \mu\text{g}$  のプラスミド DNA を再生中の (すなわち、心臓毒処理した) 脛側前側筋肉に注射することによって行った。流体力学的注射については、12 ~ 15 週齢前後の雌マウスを用いた。要するに、マウス体重の 8% に相当する量の PBS 中、 $25 \mu\text{g}$  のプラスミド DNA を尾静脈から注射した。全量を 5 秒以内に送り込んだ。示された時間にマウスから採血し、特異的 ELISA により血清を HBsAg に関してアッセイした。マウスを含む総ての実験は欧州ガイドラインに従って行った。

#### 【0153】

プライミングおよび流体力学的注射の後、マウスから毎週採血し、血清中の HBsAg 濃度をモニタリングした。血清中の HBsAg の低下はプライミング 2 週間後に初めて見られ、その後、prHBV1.3 の流体力学的注射 1 ~ 2 週間後に総ての供試マウスで 2 回目の急低下が見られた (図 17B)。プライミング後の低下は、循環から肝臓へのポリペプチド特異的 T 細胞の流入に相当する。この HBsAg の低下は、供試マウスの何匹かの開始レベルに対して 90% までに達した (図 17B)。これに対し、対照としての pCMV-Gal 受容マウスでは、流体力学的注射後に有意な HBsAg 低下は見られなかった (図 17C)。

#### 【0154】

HBsAg のクリアランスは完全ではなく、抗原レベルは 2 か月の追跡調査中に基本レベルの 25% 前後で変動した。しかしながら、感作 8 週間後の pCMV-Gal 対照動物と比較すると、HBsAg のクリアランスは強く、持続的であった ( $p < 0.0001$ )。

#### 【0155】

本発明者らはこれまでに、肝臓の HBV mRNA が、HBsAg 特異的ワクチンにより活性化された T 細胞によって分泌された INF- $\gamma$  によるダウンレギュレーションを受け得ることを示した (Mancini-Bourgine et al., 2004)。また、HBsAg に関してトランスジェニックな HBsAg/HLA-A2 バックグラウンドを有するマウスは、rHBV に基づく能動免疫に対する抗ウイルス応答を示す。

#### 【0156】

本発明の方法によって証明される HBsAg のクリアランスは、Flu 特異的 T 細胞の肝臓への非 HBV ポリエピトープ特異的流入と、HBsAg 発現肝細胞に対する INF

10

20

30

40

50

分泌 T 細胞のバースタンダー効果に関連している可能性がある。これは、これらの機能的エフェクター T 細胞が r H B V 発現を制御するだけでなく、図 1 6 E に示されるように、肝臓における u H B V 導入遺伝子の発現を示すことを示唆する。

【 0 1 5 7 】

要約すると、本願は、当技術分野で長年感じられていた必要性を満たす、持続的ウイルス感染の処置を目的とする能動免疫の使用のための新規で有効、かつ実現可能な戦略を提供する。

【 0 1 5 8 】

本願を通じ、「 r H B e 」および「 r H B c 」の用語は、違いなく、改変型 p r e C C オープンリーディングフレームの翻訳産物を意味する。

【 0 1 5 9 】

#### 参照文献

以下の文献を明細書で引用する。以下に記載した各文献および前記の文献は、その全体を参照により根拠とし、明細書で引用する。

## 【表 3】

1. Bertoletti A., and A.J. Gehring. 2006. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 87:1439-49.
2. Chisari F.V., and C. Ferrari. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 13:29-60.
3. Ganem D., and A.M. Prince. 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350:1118-29. 10
4. Guidotti L.G., and F.V. Chisari. 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19:65-91.
5. Gunther S., N. Piwon, A. Jung, A. Iwanska, H. Schmitz, and H. Will. 2000. Enhanced replication contributes to enrichment of hepatitis B virus with a deletion in the core gene. *Virology* 273:286-99.
6. Mancini M., M. Hadchouel, H. L. Davis, R. G. Whalen, P. Tiollais, and M. L. Michel. 1996. DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12496-12501. 20
7. Mancini-Bourguine M., H. Fontaine, D. Scott-Algara, S. Pol, C. Brechot, and M. L. Michel. 2004. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology* 40:874-82.
8. Morosan S., S. Hez-Deroubaix, F. Lunel, L. Renia, C. Giannini, N. Van Rooijen, S. Battaglia, C. Blanc, W. Eling, R. Sauerwein, L. Hannoun, J. Belghiti, C. Brechot, D. Kremsdorf, and P. Druilhe. 2006. Liver-stage development of *Plasmodium falciparum*, in a humanized mouse model. *J Infect Dis* 193:996-1004. 30
9. Rehmann B., and M. Nascimbeni. 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5:215-29.
10. Yang P.L., A. Althage, J. Chung, and F.V. Chisari. 2002. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 99:13825-30. 40

11. Nakabayashi H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato. 1982. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 42(9):3858-63.

12. ATCC number HB-8065.

13. Pajot A., M.L. Michael, N. Fazilleau, V. Pancre, C. Auriault, D.M. Ojcius, F.A. Lemonnier, and Y.C. Lone. 2004. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I/class II-knockout mice. *Eur J Immunol.* 34(11):3060-9.

10

【 0 1 6 0 】

【 表 4 】

0-1	<b>Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)</b>		
0-1-1	Prepared Using	<b>PCT Online Filing Version 3.5.000.193 MT/FOP 20020701/0.20.5.9</b>	20
0-2	<b>International Application No.</b>		
0-3	<b>Applicant's or agent's file reference</b>	<b>353483D26925</b>	
1	<b>The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:</b>		
1-1	<b>page</b>	<b>29</b>	
1-2	<b>line</b>	<b>27</b>	
1-3	<b>Identification of deposit</b>		
1-3-1	Name of depositary institution	<b>CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes</b>	30
1-3-2	Address of depositary institution	<b>Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France</b>	
1-3-3	Date of deposit	<b>11 September 2007 (11.09.2007)</b>	
1-3-4	Accession Number	<b>CNCM I-3833</b>	
1-5	<b>Designated States for Which Indications are Made</b>	<b>all designations</b>	
2	<b>The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:</b>		
2-1	<b>page</b>	<b>29</b>	
2-2	<b>line</b>	<b>28</b>	40
2-3	<b>Identification of deposit</b>		
2-3-1	Name of depositary institution	<b>CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes</b>	
2-3-2	Address of depositary institution	<b>Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France</b>	
2-3-3	Date of deposit	<b>11 September 2007 (11.09.2007)</b>	
2-3-4	Accession Number	<b>CNCM I-3834</b>	
2-5	<b>Designated States for Which Indications are Made</b>	<b>all designations</b>	

<b>3</b>	<b>The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:</b>		
3-1	page	29	
3-2	line	29	
<b>3-3</b>	<b>Identification of deposit</b>		
3-3-1	Name of depositary institution	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes	
3-3-2	Address of depositary institution	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France	
3-3-3	Date of deposit	11 September 2007 (11.09.2007)	10
3-3-4	Accession Number	CNCM I-3832	
<b>3-5</b>	<b>Designated States for Which Indications are Made</b>	<b>all designations</b>	
<b>4</b>	<b>The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:</b>		
4-1	page	29	
4-2	line	30	
<b>4-3</b>	<b>Identification of deposit</b>		
4-3-1	Name of depositary institution	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes	
4-3-2	Address of depositary institution	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France	20
4-3-3	Date of deposit	11 September 2008 (11.09.2008)	
4-3-4	Accession Number	CNCM I-4077	
<b>4-5</b>	<b>Designated States for Which Indications are Made</b>	<b>all designations</b>	
<b>5</b>	<b>The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:</b>		
5-1	page	29	
5-2	line	31	
<b>5-3</b>	<b>Identification of deposit</b>		
5-3-1	Name of depositary institution	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes	30
5-3-2	Address of depositary institution	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France	
5-3-3	Date of deposit	11 September 2008 (11.09.2008)	
5-3-4	Accession Number	CNCM I-4078	
<b>5-5</b>	<b>Designated States for Which Indications are Made</b>	<b>all designations</b>	

<b>6</b>	<b>The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:</b>	
<b>6-1</b>	<b>page</b>	<b>29</b>
<b>6-2</b>	<b>line</b>	<b>32</b>
<b>6-3</b>	<b>Identification of deposit</b>	
6-3-1	Name of depositary institution	<b>CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes</b>
6-3-2	Address of depositary institution	<b>Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France</b>
6-3-3	Date of deposit	<b>11 September 2008 (11.09.2008)</b>
6-3-4	Accession Number	<b>CNCM I-4079</b>
<b>6-5</b>	<b>Designated States for Which Indications are Made</b>	<b>all designations</b>

10

**FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY**

<b>0-4</b>	<b>This form was received with the international application:</b> (yes or no)	Yes
0-4-1	Authorized officer	Aulbers, Sabine

20

**FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY**

<b>0-5</b>	<b>This form was received by the international Bureau on:</b>	
0-5-1	Authorized officer	

**【図面の簡単な説明】****【 0 1 6 1 】**

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含めた本特許もしくは特許出願公報のコピーは、請求し、必要な手数料を支払えば特許庁から提供される。

30

【図1】外来エピトープを含む本発明の偽ウイルスを形成するようにHBcを発現するプラスミドにより補足されるrHBVと呼ばれる組換えベクターの概略図であり、これは偽ウイルスに感染した肝細胞に対するCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>応答を刺激することができる。

【図2】ポリトープ（ポリエピトープ）を含むprHBV-1.3-IVと呼ばれる構築物ならびにポリトープIVと呼ばれる構築物を示す。

【図3A】図3A～Cは、prHBV 1.3-IIIとキャプシド発現プラスミド（PMASコア）で同時トランスフェクトされたヒト肝細胞系統からのrHBV DNAの救済を示す。図3A：HBV DNAがPCR増幅された。

40

【図3B】図3A～Cは、prHBV 1.3-IIIとキャプシド発現プラスミド（PMASコア）で同時トランスフェクトされたヒト肝細胞系統からのrHBV DNAの救済を示す。図3B：その細胞上清中に粒子を含むHBsAgの生産を示す。

【図3C】図3A～Cは、prHBV 1.3-IIIとキャプシド発現プラスミド（PMASコア）で同時トランスフェクトされたヒト肝細胞系統からのrHBV DNAの救済を示す。図3C：LHBビリオンの救済を示す。これは図12Dにも示される。

【図4】図4は、He p G 2細胞系統（ATCC番号HB-8065）に一時的トランスフェクションした後の、組換え抗原rHBeのウエスタンブロットによる検出を示す。

【図5】図5Aおよび図5Bは、He p G 2細胞系統に一時的トランスフェクションした後の、組換え抗原rHBeの抗体を用いた免疫蛍光染色による検出を示す。これは図12

50

Bにも示される。

【図6】図6A～Dは、prHBV1.3-IIIをマウス(ATCC番号HB-8065)に流体力学的注射した後の、肝臓切片における外来組換え抗原の免疫染色を示す。これは図12Cにも示される。

【図7】ELISPOTアッセイ(左のパネル)および増殖アッセイ(右のパネル;図14Cにも示される)により検出された、HLA-A2/DR1 TgマウスのrHBVゲノム中のポリエピトープに対する細胞応答を示す。

【図8】pCMV-rHBe-IVを感作させたHLA-A2/DRB1 Tgマウスの免疫応答を示す。左のパネルはインフルエンザ基質タンパク質に由来するエピトープに対する免疫優性応答を示す。これは図14Aにも示される。右のパネルは、HLA-A2/DRB1非免疫(右上)または免疫マウス(右下)での、脾臓細胞における、Fluエピトープを担持するHLA-A2四量体で標識されたFlu特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の検出を示す。これは図14Bにも示される。

10

【図9】マウスの尾静脈からのprHBV-1.3IIIの流体力学的注射後のT細胞応答を示す(ELISPOTアッセイ)。

【図10A】図10A～10Cは、in vivoにおけるポリエピトープに対するT細胞応答およびprHBV1.3の流体力学的注射後のマウス肝臓肝臓におけるFlu特異的T細胞の局在を示す。これは図15A～15Dにも示される。図10A:免疫タイムライン; prHBV1.3(ドットの四角)、pCMV-Gal(対照プラスミド、白い四角)、pCMV-rHBe(グレーの四角)。

20

【図10B】図10A～10Cは、in vivoにおけるポリエピトープに対するT細胞応答およびprHBV1.3の流体力学的注射後のマウス肝臓肝臓におけるFlu特異的T細胞の局在を示す。これは図15A～15Dにも示される。図10B:肝臓浸潤リンパ球の蛍光活性化細胞選別(FACS)分析;非注射マウス(パネルB1)、pCMV-Gal受容マウス(パネルB2)、prHBV1.3受容マウス(パネルB3);下のパネルは各処理のFlu特異的T細胞染色を示す。

【図10C】図10A～10Cは、in vivoにおけるポリエピトープに対するT細胞応答およびprHBV1.3の流体力学的注射後のマウス肝臓肝臓におけるFlu特異的T細胞の局在を示す。これは図15A～15Dにも示される。図10C:脾臓(上のパネル)および肝臓(下のパネル)におけるT細胞およびFlu特異的T細胞の局在; prHBV1.3流体力学的注射受容マウス(ドットのバー)、pCMV-Gal受容マウス(白いバー)、pCMV-rHBe受容マウス(グレーのバー)。

30

【図11】図11A～11D:rHBV構築物およびプラスミドの概略図。図11A:HBVプレゲノムRNA(HBV/pgRNA)が細い青い線で表され、キャッピング部位(cap)、キャプシド形成( )シグナルおよびポリアデニル化(A<sub>n</sub>)シグナルが示されている。コアのAUGコドンとポリメラーゼ(pol)オープンリーディングフレームの間の距離は406ヌクレオチド(nt)である。図11B:rHBVプレゲノムRNAが示され、外来抗原性ポリエピトープをコードする短いDNA配列(青)がコアオープンリーディングフレーム内にインフレームで挿入され、キメラタンパク質(rHBc)の発現が可能となっている。図11C:rHBcコードドメインの概略図は、それぞれHBe抗原の発現およびコアタンパク質に対する2つのインフレームATGコドンを示す。検出マーカーとして用いられるB細胞エピトープ(FLAG);それぞれHIV Gag、インフルエンザ基質およびEBV BMLF-1タンパク質に由来する3つのHLA-A2制限CD8<sup>+</sup>T細胞エピトープ;ならびに万能CD4<sup>+</sup>T細胞エピトープPADREを含んでなるポリエピトープ。これらのポリエピトープ配列をコア遺伝子のアミノ末端部分内にインフレームで挿入した。図11D:プラスミドの概略図を示す。pCMV rHBcプラスミドは、CMV初期遺伝子プロモーター(P-CMV)の制御下でrHBcならびにrHBVゲノムの発現を可能とする。prHBV1.3プラスミドは1.3コピーのrHBVゲノムを担持する。prHBV1.3/HBcプラスミドは、1.3コピーのrHBVゲノム、SV40初期遺伝子プロモーター(P-SV40)の制御下で野生型HBV

40

50

コア遺伝子を発現させるためのカセットを担持し、1以上のウシ成長ホルモン遺伝子由来ポリアデニル化シグナル(BGH-pA)を用いる。ポリエピトープをコードする配列が挿入されている位置を矢印で示す。ヌクレオチドの位置はHBVのD遺伝子型aywサブタイプの配列に従って示されている。0番はEcoR1部位に相当し、1981番はHBVゲノムにおけるmRNAに対するポリアデニル化シグナルの3'末端に相当する。

【図12】図12A~12D: rHBVおよびキメラ抗原性タンパク質の発現を示す。図12A: HepG2細胞系統(ATCC番号HB-8065)をpFLAG-PCNAまたはprHBV1.3プラスミドでトランスフェクトした後に得られた細胞溶解液のウエスタンブロット解析。Flagと融合された増殖細胞核抗原(PCNA)(レーン1;対照)とrHbc(レーン2)の分子量は分子量マーカー(キロダルトン(KDa))に従って評価する。図12B: prHBV1.3プラスミドでトランスフェクトされたHepG2細胞の、抗HBs(上のパネル)または抗FLAG抗体(下のパネル)を用いた免疫蛍光染色。DAPI染色核は青色である。図12C: prHBV1.3の流体力学的注射4日後のマウス(ATCC番号HB-8065)から採取した肝臓切片に対する抗体標識(抗HBs、左のパネルおよび抗FLAG、右のパネル)および免疫蛍光染色。図12D: HBV-Lタンパク質を含むHBsAg粒子の、サンドイッチELISAによる定量。PreS1特異的モノクローナル抗体(5a91および18-7)を捕捉抗体として用い、2種類の異なる比率のprHBV1.3(rHBV)およびpMAS-C(コア)プラスミドで、または対照プラスミドpIRES-EGFP(EGFP)でトランスフェクトされたHuH-7細胞の培養上清中のLタンパク質を検出した。結果はELISAによる450nmでの光学密度(OD)として表す。

10

20

【図13】図13A~13D: 野生型コアタンパク質によるキャプシド形成rHBVゲノムを示す。図13A: 2種類の異なる濃度のprHBV1.3(レーン1、3)またはprHBV1.3/Hbcプラスミド(レーン2、4)でトランスフェクトされたHuH-7細胞の細胞培養上清におけるHBV特異的プローブを用いたサザンブロットアッセイにより検出されたウイルスDNA。対照として、HepAD38細胞系統から野生型HBVDNAを抽出した(レーン5)。弛緩環状(RC)、二本鎖直鎖(DSL)および一本鎖(SS)HBVDNAに相当するバンドが示されている。M: 分子量マーカー(Kb)。Hbc+は、トランスフェクション実験に用いたベクターによるキャプシドタンパク質の発現を示す。図13B: prHBV1.3(白い柱)またはprHBV1.3/Hbc(グレーの柱)のいずれかでトランスフェクトされたHuH-7細胞の培養培地(3~5日)でのHBsAg(左)およびLHBsAg(右)の産生を比較するELISAアッセイ。HBsAg(ng/ml)はMonolisa検出キット(Bio-Rad, Hercules, CA)によって定量した。LHBsAgの産生は450nmでの光学密度(OD)として表した。図13C: payw1.2およびprHBV1.3での同時トランスフェクション3日後のHuH-7細胞中のウイルスDNAのサザンブロットアッセイ。各濃度をブロットの下表に示す。図13D: prHBV1.3をpMAS-C(レーン1~3)またはpCMV-bGal(レーン4~6)のいずれかとともに流体力学的注射して4日後のC57/BL6マウスの血清におけるPCRによるウイルスDNAの検出。pFC80プラスミドを陽性対照として用いた(レーン7)。

30

40

【図14】図14A~14C: pCMV-rHBeを注射したマウスにおけるポリエピトープ特異的T細胞応答を示す。図14A: pCMV-rHBeの1回の筋肉内注射から15日後に採取した10個体のHLA-A2/DR1トランスジェニックマウスからの脾細胞に対して行ったELISPOTアッセイ。各バーは、各マウス個体の脾細胞100万個当たりのIFN- $\gamma$ 分泌T細胞の数を表す。ex vivoで脾細胞の刺激に用いたペプチドはHIV-gag(HIV-G)、インフルエンザ基質(FIu-M)、EBV-BMLF1(EBV-B)、HBVキャプシド(Hbc/18-27)およびHBVエンベロープ(HBs5)タンパク質に由来する。PADREは雑多な(promiscuous)HLAクラスII結合ペプチドである。図14B: pCMV-rHBeの1回の筋肉内注射から15日後に採取した非免疫マウス(左のパネル)および代表的なHLA-A2/DR1トランス

50

ジェニックマウス（右のパネル）由来Flu特異的T細胞のFACS分析。脾臓細胞を、APCで標識された抗CD8抗体、およびFluペプチドを担持するHLA-A2五量体で染色した。Flu特異的T細胞は脾臓由来CD8<sup>+</sup>T細胞の10%前後に相当する（赤い丸）。図14C：PADREペプチドでin vitro刺激された後のpCMV-rHBc-免疫HLA-A2/DR1トランスジェニックマウス由来脾細胞の増殖応答。応答は増殖指数として表す。点線は刺激指数の平均値に相当する。SI>2であれば陽性とみなされる。

【図15A】図15A~Dは、rHBVの流体力学的注射後の、HLA-A2/DR1トランスジェニックマウスの肝臓および脾臓におけるT細胞応答を示す。図15A：能動免疫プロトコールは、0日目(D0)にpCMV-rHBcの筋肉内注射によりT細胞応答をプライミングすることを含む。15日目(D15)に、マウスに流体力学的経路によって、prHBV1.3または対照pCMV-Galプラスミドのいずれかを注射した。22日目(D22)に、脾臓および肝臓由来のリンパ球をFACS分析用に採取した。

【図15B】図15A~Dは、rHBVの流体力学的注射後の、HLA-A2/DR1トランスジェニックマウスの肝臓および脾臓におけるT細胞応答を示す。図15B：抗CD3-PerCPと抗CD8-APC抗体（上のパネル）、およびPE標識Flu特異的四量体とAPC標識抗CD8（下のパネル）で染色した肝内リンパ球のFACS分析。リンパ球は非免疫マウス（B1、左のパネル）、pCMV-rHBcプライミング/pCMV-Gal流体力学的注射受容マウス（B2、真ん中のパネル）およびpCMV-rHBcプライミング/prHBV1.3流体力学的注射受容マウス（B3、右のパネル）から調製した。脾細胞のCD8<sup>+</sup>（丸）およびCD4<sup>+</sup>（四角）T細胞のパーセンテージを示す。

【図15C】図15A~Dは、rHBVの流体力学的注射後の、HLA-A2/DR1トランスジェニックマウスの肝臓および脾臓におけるT細胞応答を示す。図15C：3群のマウスに由来する肝内リンパ球の分析。第1の群はpCMV-rHBcプライミング/pCMV-Gal流体力学的注射を受け（白いバー、n=5）、第2の群はpCMV-rHBcプライミング/prHBV1.3流体力学的注射を受け（ドットのバー、n=6）、第3の群は筋肉内経路により2回目のpCMV-rHBc注射を受けた（グレーのバー、n=3）。結果は、全リンパ球集団におけるCD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>およびFlu特異的T細胞の平均±SEMパーセンテージとして表す。

【図15D】図15A~Dは、rHBVの流体力学的注射後の、HLA-A2/DR1トランスジェニックマウスの肝臓および脾臓におけるT細胞応答を示す。図15D：図15Cに記載のマウス由来の脾臓内リンパ球の分析。

【図16A】図16A~Fは、肝臓浸潤リンパ球の分析を示す。図16A：流体力学的注射4日後に採取した肝臓切片の組織学的分析。pCMV-rHBcプライミング/pCMV-Gal流体力学的注射を受けた代表的なHLA-A2/DR1マウス（左のパネル、100倍）、およびpCMV-rHBcプライミング/prHBV1.3流体力学的注射を受けた代表的なマウス（真ん中のパネル、100倍）からの肝臓切片のヘマトキシリン/エオジン染色。右のパネルは真ん中のパネルの領域を200倍で示す。炎症病巣の細胞クラスターを枠内に示す。矢印は変性を受けている細胞を示す。

【図16B】図16A~Fは、肝臓浸潤リンパ球の分析を示す。図16B：pCMV-rHBcプライミング/prHBV1.3流体力学的注射後の代表的なマウスから採取した肝内リンパ球表現型。Flu五量体標識後のFlu<sup>+</sup>またはFlu<sup>-</sup>細胞の分析のためCD8<sup>+</sup>T細胞をゲートで制御した（左のパネル）。五量体陽性CD8<sup>+</sup>T細胞（真ん中のパネル）および五量体陰性CD8<sup>-</sup>T細胞（右のパネル）に対してCD69<sup>+</sup>およびCD62L<sup>+</sup>細胞の定量を行った。

【図16C】図16A~Fは、肝臓浸潤リンパ球の分析を示す。図16C：CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>肝内T細胞の機能特性。ポリエピトープ由来ペプチド（3つの混合物）によるex vivo刺激の後（下のパネル）または刺激無し（上のパネル）で、細胞を表面マーカーCD107、細胞内INF $\gamma$  およびTNF $\alpha$  に関して分析した。

【図16D】図16A~Fは、肝臓浸潤リンパ球の分析を示す。図16D：prHBV1

10

20

30

40

50

． 3 の流体力学的注射前に p C M V r H B c 筋肉内注射でプライミングされたか（左のパネル）またはプライミングされていない（右のパネル）マウスからの、p r H B V 1 . 3 流体力学的注射 4 日後に採取された肝臓切片に対する H B s A g の免疫染色。

【図 1 6 E】図 1 6 A ~ F は、肝臓浸潤リンパ球の分析を示す。図 1 6 E : p r H B V 1 . 3 の流体力学的注射前における、プライミング有り（白い）またはプライミング無し（グレーの柱）の、図 1 6 D のマウスの血清中の H B s A g の平均レベル（n g / m l）。

【図 1 6 F】図 1 6 A ~ F は、肝臓浸潤リンパ球の分析を示す。図 1 6 F : p C M V - r H B c プライミング / p r H B V 1 . 3 流体力学的注射後のマウス（グレーの柱、n = 1 1）および p C M V - r H B c プライミング / p C M V - G a l 流体力学的注射を行ったマウス（白い柱、n = 4）の血清中のトランスアミナーゼの平均レベル（A L T m U / m l）。コンカナバリン A（C o n A）注射を A L T 増加の陽性対照として用いた。

【図 1 7 A】図 1 7 A ~ C は、H B s A g / H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける H B s A g 発現の制御を示す。図 1 7 A : H B s A g / H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける能動免疫のプロトコール。

【図 1 7 B】図 1 7 A ~ C は、H B s A g / H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける H B s A g 発現の制御を示す。図 1 7 B : 0 週間目（W 0）に p C M V - r H B c の筋肉内注射によるプライミングと 2 週間（W 2）後の p r H B V 1 . 3 流体力学的注射の後の、個々の H B s A g / H L A - A 2 トランスジェニックマウスの血清における H B s A g の低下。マウスを毎日採血し、市販の E L I S A を用いて H B s A g（n g / m l）を定量した。

【図 1 7 C】図 1 7 A ~ C は、H B s A g / H L A - A 2 トランスジェニックマウスにおける H B s A g 発現の制御を示す。図 1 7 C : p r H B V 1 . 3（黒いバー）または p C M V - G a l（白いバー）受容マウスの血清において、H B s A g のパーセンテージは 8 週間にわたって低下する。0 週目の H B s A g 濃度を 1 0 0 % とし、結果を平均 ± S E M で表す。

【図 1 8】p r H B V - 1 . 3 - I I I の配列（配列番号 4）（ポリエピトープ（ポリトープ）配列に網掛け（配列番号 5））を示す。

【図 1 9】r H B e \_\_ I I I \_\_ の配列（配列番号 6）（組換えタンパク質；ポリエピトープ（ポリトープ）配列に網掛け（配列番号 7））を示す。

【図 2 0】ポリトープ I I I の配列（配列番号 8）（小文字のアミノ酸はフランキング残基である）を示す。

【図 2 1】ポリトープ I V の配列（配列番号 9）（小文字のアミノ酸はフランキング残基である）を示す。

【図 2 2】p r H B V - 1 . 3 - I V の配列（配列番号 1 0）（ポリエピトープ（ポリトープ）配列に網掛け（配列番号 1 1））を示す。

【図 2 3】r H B e \_\_ I V \_\_ の配列（配列番号 1 2）（組換えタンパク質；ポリエピトープ（ポリトープ）配列に網掛け（配列番号 1 3））を示す。

【図 2 4】N C B I 受託番号：V 0 1 4 6 0 B 型肝炎ウイルス（a y w 株）ゲノム、D N A 配列（A C C E S S I O N V 0 1 4 6 0 J 0 2 2 0 3 V E R S I O N V 0 1 4 6 0 . 1 G L 6 2 2 7 6 , V R L 2 8 - J A N - 2 0 0 3）（配列番号 1 4）を示す

。

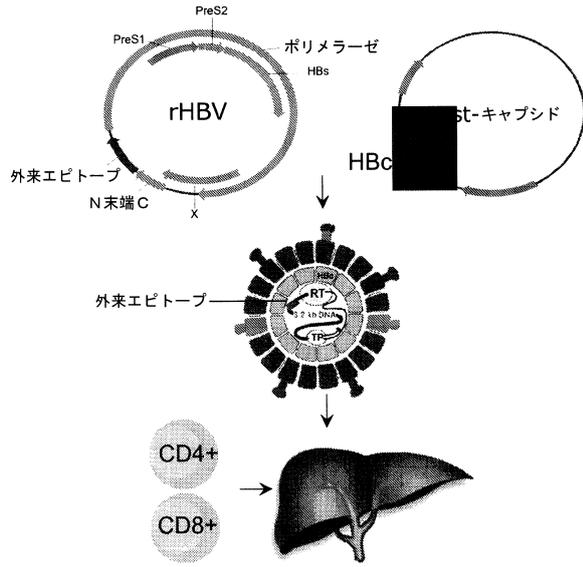
10

20

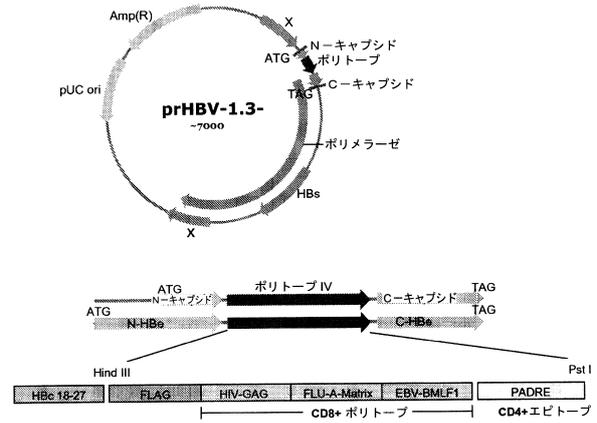
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 A 】

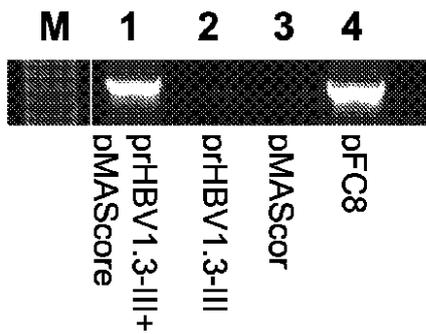


FIGURE 3A

【 図 3 B 】

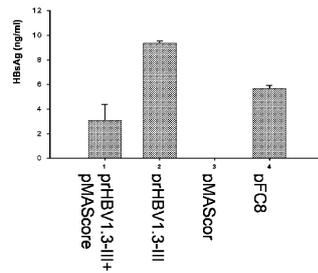
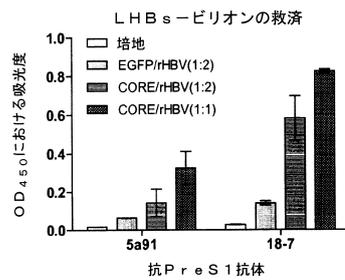


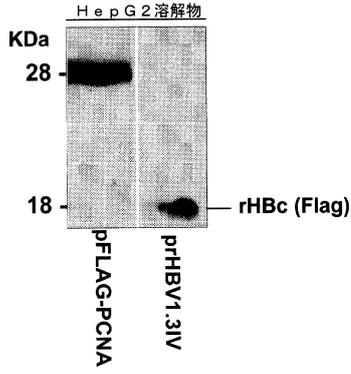
FIGURE 3B

【 図 3 C 】

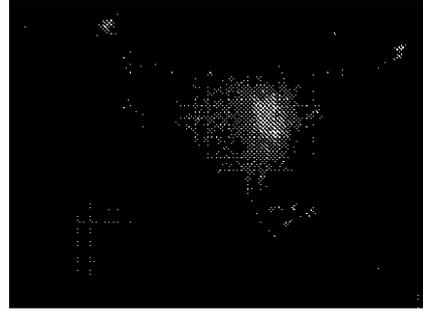


抗PreS1抗体

【 図 4 】



【 図 5 B 】



【 図 5 A 】

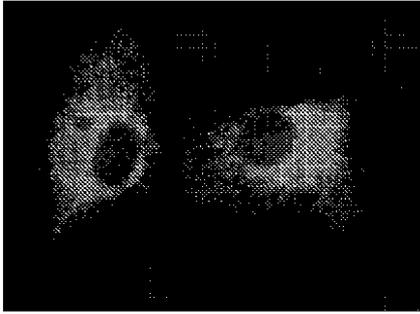
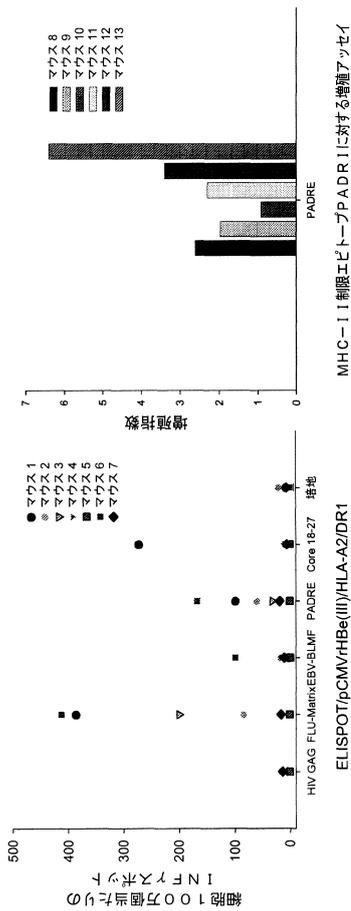


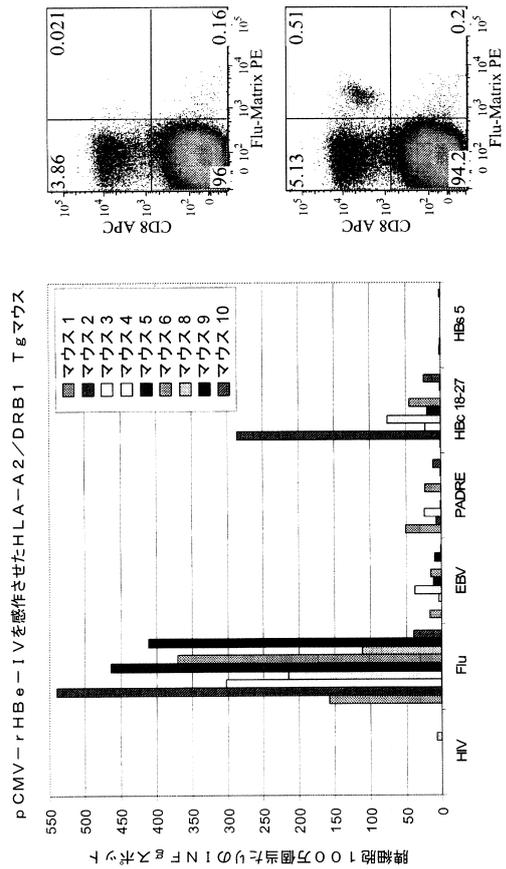
FIGURE 5B

FIGURE 5A

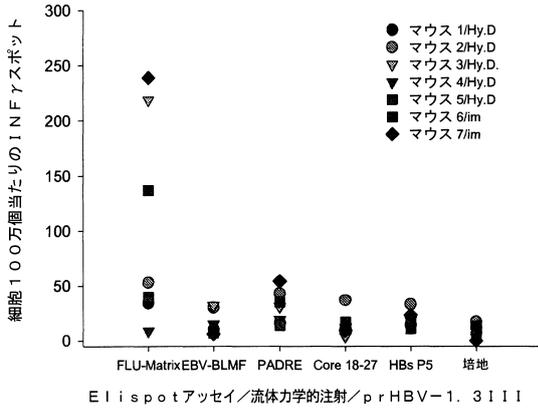
【 図 7 】



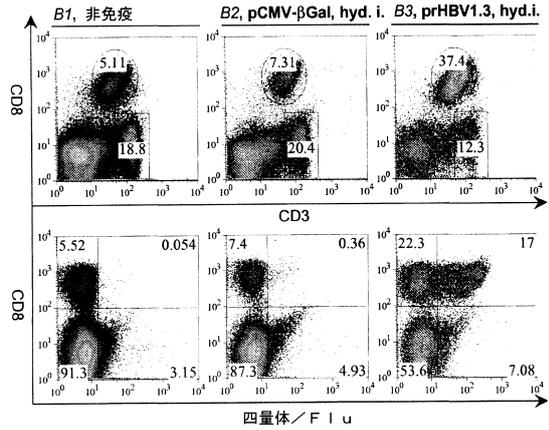
【 図 8 】



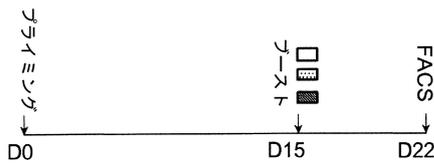
【図9】



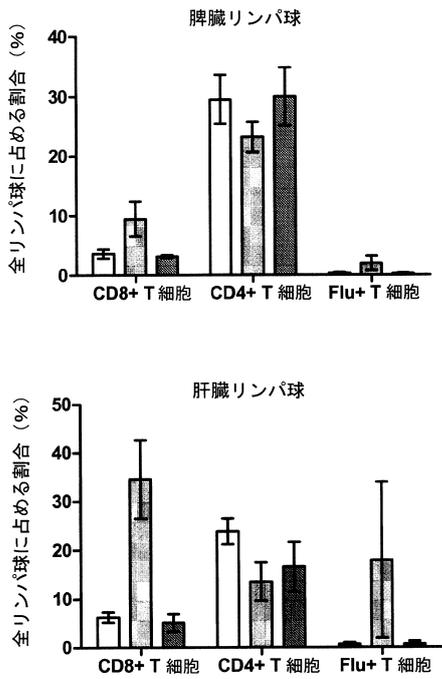
【図10B】



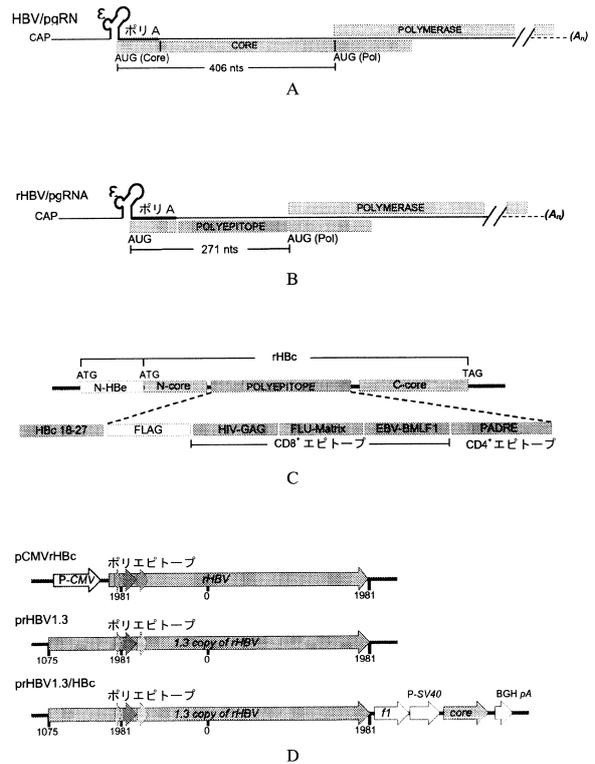
【図10A】



【図10C】



【図11】



【 13 A 】

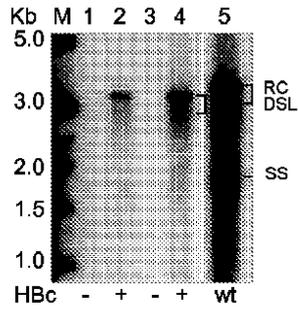


FIGURE 13A

【 13 B 】

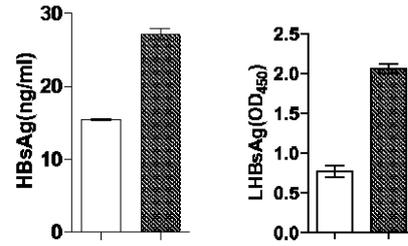


FIGURE 13B

【 13 C 】

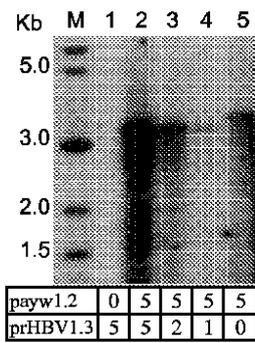


FIGURE 13C

【 13 D 】

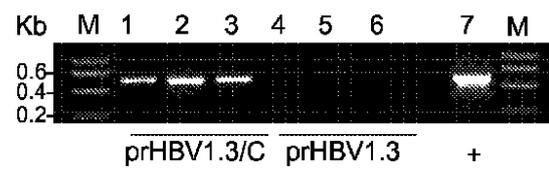
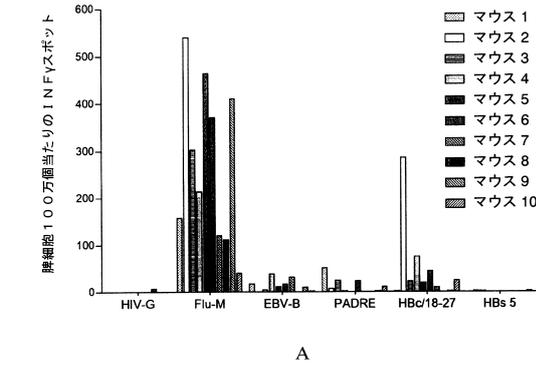
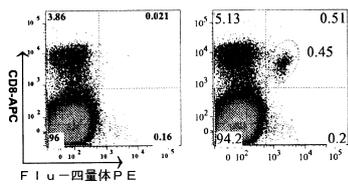


FIGURE 13D

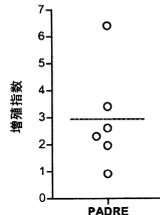
【 14 】



A

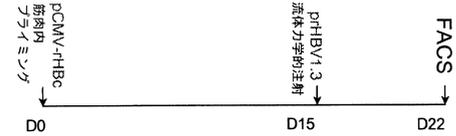


B

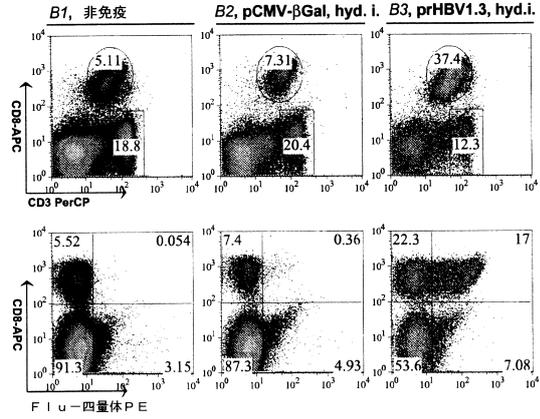


C

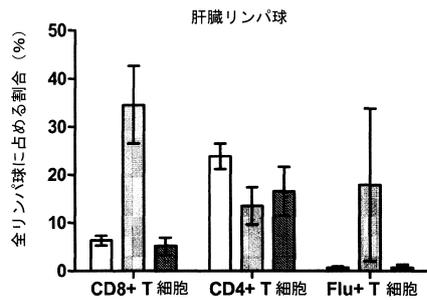
【 15 A 】



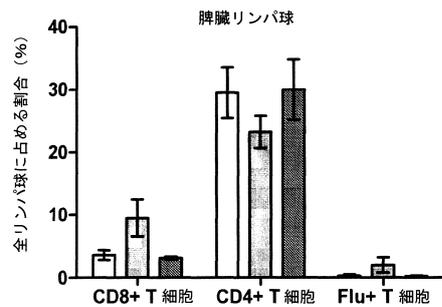
【 15 B 】



【 15 C 】



【 15 D 】



【 16 A 】

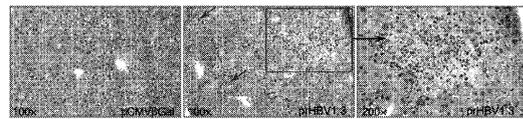


FIGURE 16A

【 16 B 】

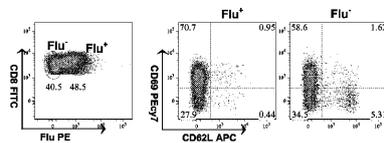
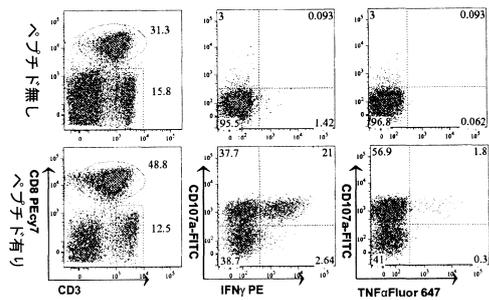


FIGURE 16B

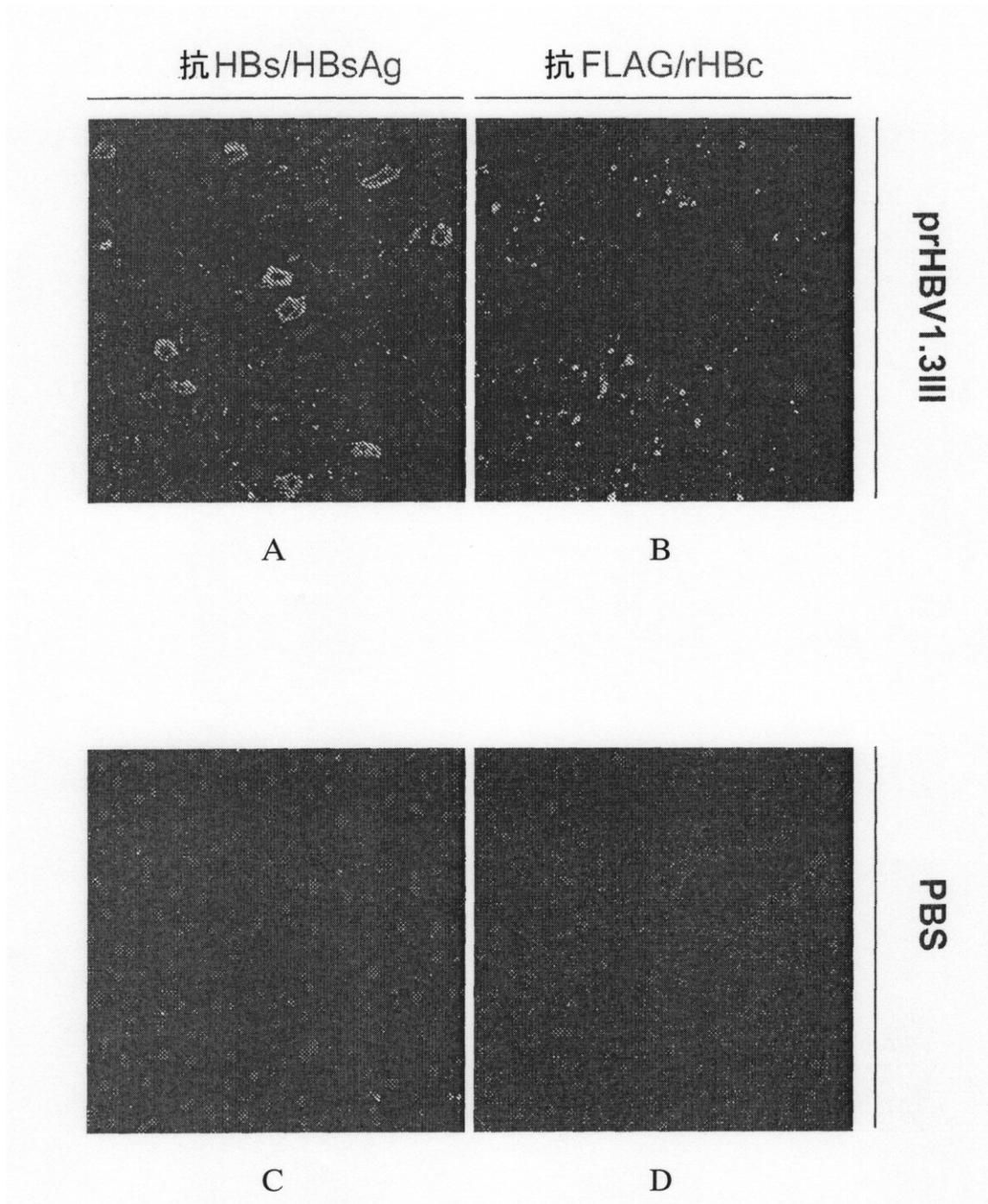
【 16 C 】



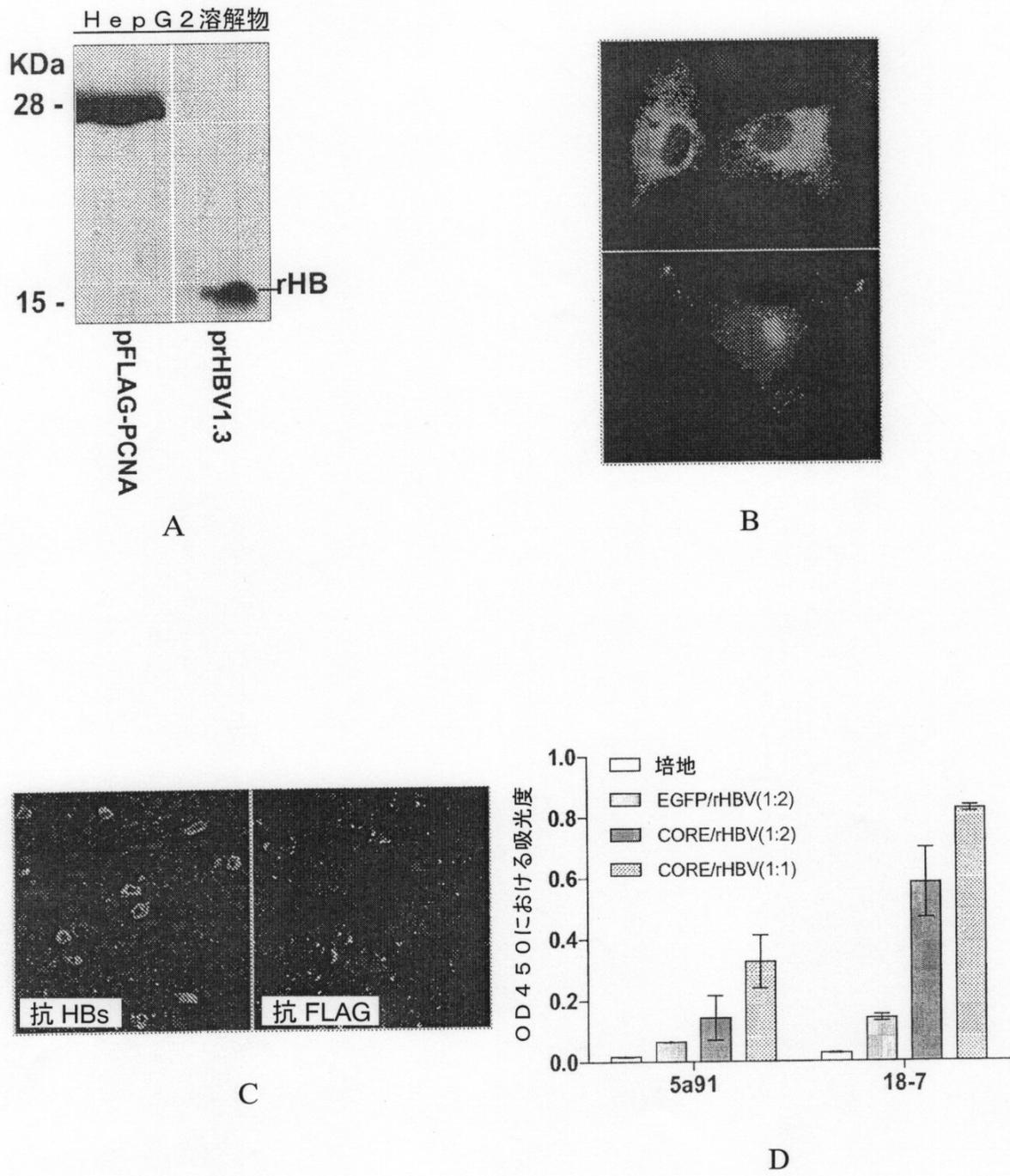




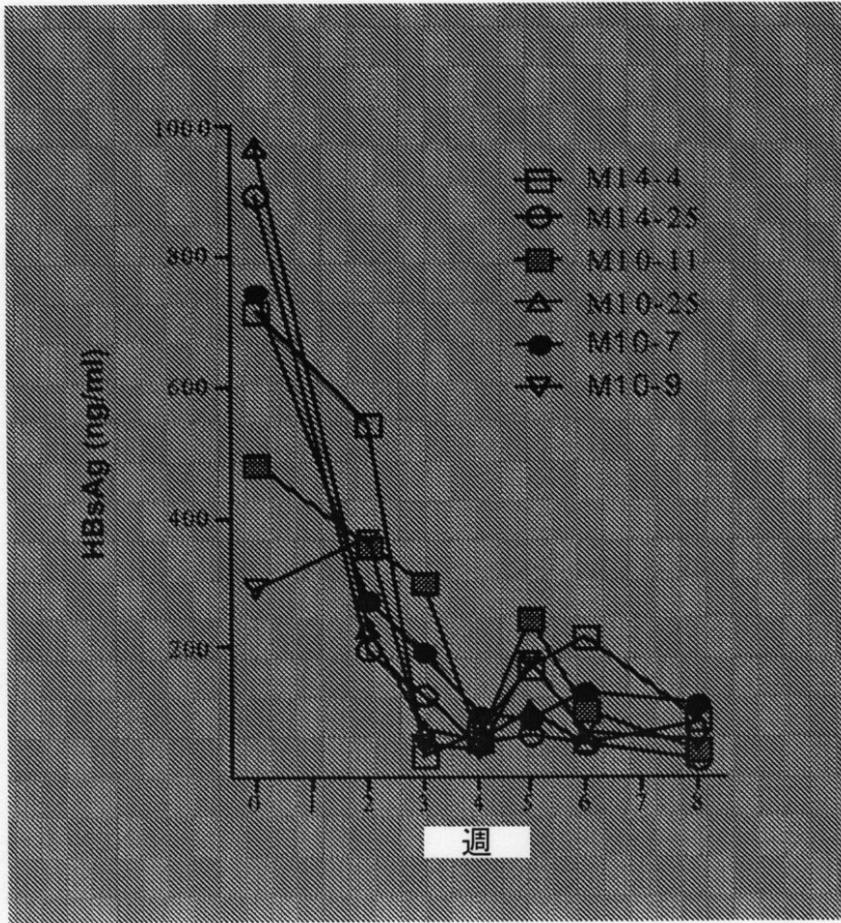
【图6】



【 図 1 2 】



【 図 17 B 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 39/245	(2006.01)	A 6 1 K 39/245
A 6 1 K 39/29	(2006.01)	A 6 1 K 39/29
A 6 1 P 31/20	(2006.01)	A 6 1 P 31/20

(31)優先権主張番号 61/136,154  
 (32)優先日 平成20年8月14日(2008.8.14)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

## 前置審査

(74)代理人 100117787  
 弁理士 勝沼 宏仁  
 (74)代理人 100091487  
 弁理士 中村 行孝  
 (74)代理人 100126099  
 弁理士 反町 洋  
 (72)発明者 デン、チャン  
 中華人民共和国上海、サウス、チョンキン、ロード、225、チャイニーズ、アカデミー、オブ、サイエンス、アンスティテュ、パストゥール、オブ、シャンハイ、ラボラトリー、オブ、テューマー、パイロロジ  
 (72)発明者 マリー ルイーズ、ミシェル  
 フランス国パリ、リュ、ド、ラ、プロセスイオン、31

審査官 北田 祐介

(56)参考文献 特表平11-505114(JP,A)  
 特開2002-320480(JP,A)  
 特表2003-509470(JP,A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90  
 C12N 7/04  
 A61K 35/76  
 A61P 31/20  
 CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq  
 PubMed