

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-526885

(P2014-526885A)

(43) 公表日 平成26年10月9日(2014.10.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
<b>C O 7 K 17/10 (2006.01)</b>	C O 7 K 17/10	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-518775 (P2014-518775)	(71) 出願人	506379781 グリーン・クロス・コーポレーション GREEN CROSS CORP. 大韓民国446-855キョンギド、ヨン インシ、キフング、イヒョンロ30ボンギ ル107番
(86) (22) 出願日	平成23年7月25日 (2011.7.25)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月24日 (2014.2.24)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(86) 国際出願番号	PCT/KR2011/005477	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 国際公開番号	W02013/002449	(74) 代理人	100157956 弁理士 稲井 史生
(87) 国際公開日	平成25年1月3日 (2013.1.3)		
(31) 優先権主張番号	10-2011-0064671		
(32) 優先日	平成23年6月30日 (2011.6.30)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型肝炎ウイルス表面抗原のエピトープおよびその使用

## (57) 【要約】

B型肝炎ウイルス(HBV)ウイルスに特異的なエピトープおよびその使用に関する。開示されるエピトープは、変異が起こらない保存的な位置であり、それゆえ、前述のエピトープに対する抗体を含む組成物またはエピトープを含むワクチン組成物はHBV変異による治療効果の悪化を起こす可能性が非常に低く、それゆえ、HBV治療に非常に有用である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

R F L W E (配列番号: 4) または K F L W E (配列番号: 5) を含む、B 型肝炎ウイルス (H B V) 特異的エピトープ。

**【請求項 2】**

F A R F L W E W A S V R F S W (配列番号: 6) または F G K F L W E W A S A R F S W (配列番号: 7) で示される配列を含む、請求項 1 に記載のエピトープ。

**【請求項 3】**

請求項 1 または 2 に記載の H B V 特異的エピトープと担体の組み合わせを含む複合体。

**【請求項 4】**

担体が、ペプチド、血清アルブミン、免疫グロブリン、ヘモシアニンおよび多糖類から選択される少なくとも 1 つである、請求項 3 に記載の複合体。

**【請求項 5】**

請求項 1 または 2 に記載の H B V 特異的エピトープをコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

**【請求項 7】**

微生物細胞またはウイルス、または哺乳動物細胞の表面での H B V 特異的エピトープの発現を導くプロモーターまたはシグナルタンパク質をコードする配列をさらに含む、請求項 6 に記載の組換えベクター。

**【請求項 8】**

請求項 6 または 7 に記載の組換えベクターで形質転換された組換え微生物またはウイルスまたは哺乳動物細胞。

**【請求項 9】**

形質転換された組換え微生物またはウイルスまたは哺乳動物細胞が、組換え大腸菌 (E . c o l i )、組換え酵母、組換えバクテリオファージ、および組換え哺乳動物細胞から選択される、請求項 8 に記載の組換え微生物またはウイルスまたは哺乳動物細胞。

**【請求項 10】**

請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組換えベクター、組換え微生物またはウイルスまたは哺乳動物細胞を培養する段階を含む、配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープを生産する方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のエピトープ、エピトープを含む複合体、またはエピトープをコードするポリヌクレオチドを含むワクチン組成物。

**【請求項 12】**

i n v i v o で注入されたときに抗体の形成を促進する、医薬上許容されるアジュバントをさらに含む、請求項 11 に記載のワクチン組成物。

**【請求項 13】**

アジュバントが、アルミニウム塩 (A l ( O H ) <sub>3</sub>、A l P O <sub>4</sub>)、スクワレン、ソルビタン、ポリソルベート 80、C p G、リボソーム、コレステロール、モノホスホリル脂質 A (M P L)、およびグルコピラノシル脂質 A (G L A) から選択される少なくとも 1 つである、請求項 12 に記載のワクチン組成物。

**【請求項 14】**

ポリヌクレオチドが医薬上許容される担体中に含まれる、請求項 11 に記載のワクチン組成物。

**【請求項 15】**

医薬上許容される担体がウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである、請求項 14 に記載のワクチン組成物。

**【請求項 16】**

配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープ、前記エピトープ

10

20

30

40

50

を含む複合体、または前記エピトープをコードするポリヌクレオチドを使用する、配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープに特異的に結合する抗体または抗体断片を製造するための方法。

【請求項 17】

抗体が、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープ、前記エピトープを含む複合体、または前記エピトープをコードするポリヌクレオチドを使用する抗体の製造方法が、H B V 特異的エピトープ、複合体またはポリヌクレオチドを動物に接種し、接種された動物から配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープに特異的に結合する抗体をスクリーニングおよび生成することを含む、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 19】

ヒト化または脱免疫化工程をさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ヒト化工程が、動物から生産された抗体の C D R 配列を、ヒト抗体のフレームワークに接合することを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

親和性を増加させ、免疫原性を減少させるために、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を置換、挿入および欠失させる工程をさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 22】

動物が、ヒト由来配列と同じ抗体を生産できるトランスジェニック動物である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

トランスジェニック動物が、トランスジェニックマウスである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

ディスプレイ技術が用いられる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 25】

ディスプレイ技術がファージディスプレイ、バクテリアディスプレイまたはリボゾームディスプレイのいずれかから選択される、請求項 24 に記載の方法。

30

【請求項 26】

ディスプレイ技術に用いられるライブラリーが、ヒト由来抗体の配列を有するように設計される、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 27】

配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープまたは前述のエピトープを含む複合体を使用して、配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープに特異的に結合する抗体をスクリーニングする（すなわち、パニングを実施する）ことをさらに含む、請求項 24 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 28】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のエピトープ、エピトープを含む複合体またはエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む、H B V 特異的エピトープ検出のための組成物。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のエピトープ、エピトープを含む複合体またはエピトープをコードするポリヌクレオチドを検出可能な、H B V 検出キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

## 技術分野

本発明は、B型肝炎ウイルス（以下、「HBV」と称す）に特異的なエピトープおよびその使用に関する。本明細書に開示されたエピトープが、変異による改変から保存的な位置（「変異誘発」による変異が起こらない）であるため、エピトープに対する抗体を含む組成物または上述のエピトープを含むワクチン組成物は、HBV変異による治療効果の悪化を起こす可能性が非常に低く、それゆえ、HBV治療に非常に有用である。

### 【0002】

本発明はまた、上記のエピトープに対する抗原特異的抗体の製造方法にも関し、本発明によって製造されたそのようなエピトープに対する抗原特異的抗体は *in vivo* で投与されたときに優れた特異性を示す。

### 【背景技術】

### 【0003】

#### 背景技術

HBVは、ヘパドナウイルス科ファミリーに属するDNAゲノムを有するウイルスであり、急性および/または慢性肝炎を引き起こす。一般に、HBVは少なくとも8%の互いに異なる遺伝子配列を有する8つの遺伝子型に分類されるか、他方では、HBV表面抗原(HBsAg)の2つの抗原決定基(すなわち、エピトープ)(d/y、w/r)に基づいて9つの抗原型(すなわち、adw、adr、ayw、ayr、など)に分類される。世界中の3億5000万人が慢性のHBVに感染し、特に、韓国および中国の人口の約5~8%が慢性HBV感染を有している。HBV感染はこれらの地域の肝疾患と肝臓癌の主な原因である。現在、ワクチンの開発によって上記の感染がいくらか保護できるが、多くの患者が、まだHBVによって引き起こされた慢性のB型肝炎感染に罹患している。HBVによって引き起こされた慢性感染は、肝炎ならびに肝硬変および肝がんを誘発し得、非感染の人々と比べると、慢性感染症の人は約300倍の肝臓癌の増加を示す。WHO調査によると、慢性B型肝炎は肝臓癌の主な原因の約80%であるとされる。

### 【0004】

ヌクレオシドアナログとして最近開発され、市場で利用できる慢性B型肝炎薬として、例えばラミブジン、アデフォビル・ジピボキシルなどを含み得る。これらの薬物は、HBVポリメラーゼの逆転写酵素を阻害し、HBV DNA複製を阻害し得る。しかしながら、上記の薬物のいずれも3年などの長期間に投与される場合に、患者の約75%が薬物耐性ウイルスを有し、それゆえ、治療効果の悪化の問題を伴う。肝移植の後の垂直感染または感染を防ぐため、上記の薬は一般的にB型肝炎免疫グロブリン(HBIG)と共に使用される。

### 【0005】

現在のHBIGは高い抗HBsAg抗体力価(titer)の提供者の血漿からイオン交換精製およびウイルス不活化により製造される。

### 【0006】

しかしながら、現在利用可能なHBIGは、その限られた利用性、低い特異的活性および感染性病原体の混入の可能性により、治療抗体の理想的な源ではない。

### 【0007】

現在この分野で使用されているワクチンにより *in vivo* で生成される抗体は、ほとんどがHBVのエピトープを認識する抗体であることが知られている。しかしながら、そのような抗体から逃れる変異体、例えば、HBsAgの位置145のグリシンをアルギニンで置換することにより生成されたG145変異体が最近報告されている。加えて、さまざまなエスケープ変異体が見出され、それゆえ、既存のHBV薬は、十分な治療効果を表すことの制限を伴う。したがって、HBV複製に関連するHBVの生存に必要な部位に対応するエピトープに特異的に結合し、その結果、変異による治療効果の悪化を引き起こさないHBV治療抗体および/またはHBVワクチンへの要求が高まっている。

### 【発明の概要】

### 【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 8 】

発明の開示

技術課題

上記の問題を解決するために、本発明は、R F L W E（配列番号：4）またはK F L W E（配列番号：5）および、特にH B Vの生存に必要な部位であり、それゆえ変異が起こらない保存的位置に相当する、F A R F L W E W A S V R F S W（配列番号：6）またはF G K F L W E W A S A R F S W（配列番号：7）などのアミノ酸配列を有するエピトープを含む、H B V特異的エピトープを提供する。

## 【 0 0 0 9 】

本発明の他の目的は、上記のエピトープ、エピトープを含むH B Vワクチン組成物またはワクチン、および上記のエピトープを適用することによりエピトープに特異的に結合できる抗体の製造方法、ならびに上記の方法で製造された抗体を含むH B V治療組成物または治療剤を提供することである。

10

## 【 0 0 1 0 】

本発明のまたさらなる目的は、上記のエピトープまたはエピトープをコードするポリヌクレオチドを有するH B V検出のための組成物またはキットを提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 1 1 】

課題の解決手段

本発明の発明者らは；H B V表面抗原に特異的に結合するヒト抗体（P C T / K R 2 0 1 0 / 0 0 4 4 4 5を参照、以下、「発明の抗体」と称する）のエピトープがR F L W E（配列番号：4）またはK F L W E（配列番号：5）を含む配列、および、特にF A R F L W E W A S V R F S E（配列番号：6）またはF G K F L W E W A S A R F S E（配列番号：7）またはその部分に相当し；そのようなエピトープ部位が有利に保存的であり、H B V複製に重要でH B V生存に必要であることを見出した。その結果、本発明は上記の発見により完成された。前述のエピトープのうち、配列番号：4および配列番号：6を有するエピトープはH B Vのa d rサブタイプ（配列番号：1）である一方で、配列番号：5および配列番号：7を有するエピトープは、H B Vのa y wサブタイプのエピトープに相当する。

20

## 【 0 0 1 2 】

本発明による、配列番号4から7のいずれかによって決定されるH B V特異的エピトープは、ワクチンなどの組成物として使用される場合に有効性を増加させるために、三次元構造を保持し得るかまたは担体との結合形態（c o n j u g a t e d f o r m）として使用され得る。本明細書で使用される担体は、生物利用可能であり、本発明の所望の効果を示すいかなるものも含み得、ペプチド、血清アルブミン、免疫グロブリン、ヘモシアニン、多糖類などから選択できるが、特に限定されない。

30

## 【 0 0 1 3 】

配列番号4から7のいずれかによって決定されるH B V特異的エピトープそれ自体またはそれらの担体との複合体は、H B V治療のためのワクチン組成物として有効であり得る。この点で、ワクチン組成物はさらに薬学的に許容できるアジュバントまたは賦形剤を含み得る。そのようなアジュバントは、i n v i v oでアジュバントを注入することによって抗体の形成を促進する役目を果たし、本発明の目的の達成を可能にするいかなるもの、より具体的に、アルミニウム塩（A l（O H）<sub>3</sub>、A l P O<sub>4</sub>）、スクワレン、ソルビタン、ポリソルベート80、C p G、リポソーム、コレステロール、モノホスホリル脂質（M P L）A、およびグルコピラノシル脂質（G L A）Aから選択される少なくとも1つを含み得るが、それに特に限定されない。

40

## 【 0 0 1 4 】

配列番号4から7で定義されて、本発明により提供されるH B V特異的エピトープをコードするポリヌクレオチドは、D N Aワクチンとして使用され得る。ここで、ポリヌクレオチドは、そのものとしていかなるベクターもなしで使用されるか、また他方では、ウイ

50

ルス性または非ウイルスベクターで補助され得る。本明細書で使用されるウイルス性または非ウイルスベクターは、(本発明が関係する)当分野で一般的に利用可能ないかなるものも含み得る。ウイルスベクターは、好ましくは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、レトロウイルスなどを含み、一方で、非ウイルスベクターはカチオン性ポリマー、非イオン性ポリマー、リボソーム、脂質、リン脂質、親水性ポリマー、疎水性ポリマー、および前述の材料から選択された少なくとも1つとの組み合わせを含み得るが、それらに限定されない。

#### 【0015】

本発明は、本発明による配列番号4から7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープをコードするポリヌクレオチドを含む組換えベクター、組換えベクターを含む宿主細胞、および上記の組換えベクターまたは宿主細胞を使用する、本発明による配列番号4から7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープの製造方法を提供する。

10

#### 【0016】

本発明において、「組換え型ベクター」は、遺伝子挿入物を発現するために遺伝子挿入物と動作可能に結合した(operably linked)必要な調節要素を含む遺伝子産物である適当な宿主細胞から標的タンパク質を示す発現ベクターである。本発明において、用語、「動作可能に結合した」は、一般的な機能を実行するために、標的タンパク質をコードする核酸配列に機能的に結合した核酸発現制御配列を示す。組換え型ベクターの動作可能な結合は、本発明が関係する技術で周知の遺伝子組み換え技術で実施され得る。また、部位特異的DNA開裂および結合は、本発明が関係する技術で一般的に知られている酵素を使用することで容易に実施され得る。

20

#### 【0017】

本発明で使用可能な適切な発現ベクターは、プロモーター、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化信号、エンハンサーなどの発現調節要素ならびに膜標的化または分泌のためのシグナル配列を含み得る。開始コドンおよび終止コドンは一般的に免疫原性標的タンパク質をコードするヌクレオチド配列の一部であるとみなされ、遺伝子産物が投与される時、コード配列とインフレームでありながら個体中で動作を示す必要がある。一般的なプロモーターは、構成的であるか、または誘導的であり得る。原核細胞は、例えばlac、tac、T3およびT7プロモーターを含み得るが、これらに特に限定されるというものではない。真核細胞は、例えば、サルウイルス40(SV40)、マウス乳がんウイルス(MMTV)プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)および、特にHIVの長い末端反復(LTR)プロモーター、モロニーウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、エプスタイン・バー・ウイルス(EBV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターならびに、アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、ヒト金属結合性タンパク質プロモーターを含み得るが、これらに特に限定されるというものではない。

30

#### 【0018】

発現ベクターは、ベクターを含む宿主細胞を選択するために選択マーカールを含み得る。選択マーカールは、ベクターで形質転換された細胞の選別のために機能し、薬物耐性、栄養要求、細胞毒性への耐性、表面タンパク質の発現などの選択可能な表現型を提供するマーカールを含み得る。選択マーカール発現する細胞が選択剤で処理された条件下でのみ生存可能であるため、形質転換細胞がスクリーニングされ得る。反復可能な発現ベクターのために、ベクターは複製が開始される特定の核酸配列としての複製開始点を含み得る。発現された組換えベクターはプラスミド、ウイルス、コスミドなどのさまざまなベクターを含み得る。原核細胞および真核生物の様々な宿主細胞が所望の遺伝子を発現し、所望のタンパク質を作成する限り、組換えベクターは特に制限されないが、ベクターが強大な発現を実現する強大な活性を有するプロモーターを所有し、自然界のものと同様に多量の外来タンパク質を生産することが好ましい。

40

#### 【0019】

特に、配列番号4から7のいずれか一つで決定されるHBV特異的エピトープを発現す

50

るために、様々な発現宿主ベクターの組み合わせが使用され得る。真核生物に好適な発現ベクターは、例えば、SV40、ウシバピローマウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルス、レンチウイルス、および/または、レトロウイルス由来の発現調節配列を含み得るが、これらに特に限定されるというものではない。バクテリア宿主に使用される発現ベクターは、例えば、pET、pRSET、pBluescript、pGEX2T、pUCベクター、colE1、pCR1、pBR322、pMB9などの大腸菌 (*Escherichia coli*) から得られる細菌プラスミドおよびそれらの派生物；広い宿主をもつRP4プラスミド；gt10およびgt11、NM980などの様々なファージ・ラムダ派生物として例示されるファージDNA；一本鎖のフィラメント型DNAファージ、M13など、を含み得る。昆虫細胞に有用なベクターはpVL941であり得る。

10

#### 【0020】

組換えベクターは、形質転換細胞を形成するために宿主細胞に挿入され、本明細書で好適に使用される宿主細胞は、例えば、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*) またはスタフィロкокカス属 (*Staphylococcus* sp.) などの原核細胞；アスペルギルス属 (*Aspergillus* sp.) などのカビ；ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*)、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス属 (*Schizosaccharomyces* sp.)、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) などの酵母；低級真核細胞、高等真核細胞、すなわち、昆虫細胞などの真核細胞、を含み得る。宿主細胞は、好ましくは、植物、および/または、哺乳動物由来、特に、サル腎細胞7 (COS7)、NSO細胞、SP2/O、チャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、W138、ベビーハムスター腎臓 (BHK) 細胞、MDCK、骨髓腫細胞株、HuT78細胞、および/または、HEK293細胞由来であるが、これらに特に限定されるというものではない。最も好ましくは、CHO細胞が使用される。

20

#### 【0021】

本発明における、用語「宿主細胞への形質転換」は、有機体、細胞、組織および/または期間に核酸を導入するためのいかなる技術を含み、当分野においてよく知られるように、形質転換を実施する宿主細胞により、標準的技術が好適に選択され得る。そのような技術のうち、電気穿孔法、原形質溶解、リン酸カルシウム ( $\text{CaPO}_4$ ) 沈殿、塩化カルシウム ( $\text{CaCl}_2$ ) 沈殿、炭化ケイ素繊維を用いる攪拌、アグロバクテリウム介在形質転換、PEGで仲介された形質転換、デキストラン硫酸塩およびリポフェクタミン、ならびに乾燥/阻害があるがこれらに特に限定されない。培地中で組換えベクターを発現する形質転換体を培養することにより、配列番号4から7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープが多量に形成され得る。培地および培養条件は、使用される宿主細胞によって、一般的に使用されるものから適当に選ばれ得る。培養の間、温度、培地のpH、培養時間などのいくつかの条件が、適切な細胞の成長とタンパク質の大量生産を可能にするために調整され得る。上記のとおり、配列番号4~7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープは、培地または細胞分解物から、組換え方法によって回収され、いかなる従来の生化学的分離技術で分離または精製され得る (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Deuschler, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, Vol. 182, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1990))。この目的のため、電気泳動、遠心分離、ゲル濾過、沈殿、透析、クロマトグラフィー(イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、

30

40

50

免疫吸着クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなど)、等電点収束、それらの様々な変化、およびそれらの組み合わせなどの様々な方法が利用され得るが、これらに特に限定されるというものではない。

#### 【0022】

本発明は、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープを、微生物またはウイルス表面で発現する方法を提供する。この場合、誘導プロモーターまたはシグナルタンパク質をコードする配列を含む組換えベクターならびに上記の組換えベクターを含む様々な微生物またはウイルスが使用され得る。特に、組換え大腸菌、酵母および/またはバクテリオファージが適切な微生物および/またはウイルスであるが、これらに特に限定されるというわけではない。配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープの上述の微生物またはウイルスの表面上での発現のために、本発明が関係する技術でよく知られているディスプレイ技術が使用され得る。特に、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープをコードするポリヌクレオチド配列は、微生物細胞またはウイルス表面での発現を導くプロモーターまたはシグナルタンパク質をコードする配列と組み合わせられ(または、結合され)、その結果、HBV特異的エピトープを発現し得る。あるいは、表面発現タンパク質をコードする遺伝子部位の一部を削除した後、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープをコードするポリヌクレオチド配列が削除された部分に挿入され得る。しかしながら、本発明は特に以上の方法に限定されるというものではない。上述の方法により、微生物またはウイルス表面で発現する、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープそのものが分離され、本発明の所望の使用のために精製され得る。さらに、本発明のエピトープは、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、表面で発現され、その後スクリーニングされた抗体を得るように、使用され得る。

10

20

#### 【0023】

さらに、本発明は、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープ、前述のエピトープを含む複合体、または前述のエピトープをコードするポリヌクレオチドを使用することを含む、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープと特異的に結合した抗体またはその抗体断片を製造するための方法を提供する。そのような抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープに結合する特性を有する限り、それらの断片もまた、本発明の範囲に含まれる。特に、発明の抗体または断片は、例えば：それらの全てが配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープに結合する特性を有する、一本鎖抗体、二重特異性抗体(dia body)、三重特異性抗体(tri a body)、四重特異性抗体(tetra body)、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fd、scFv、ドメイン抗体、二重特異性抗体(dual - specific antibody)、低分子化抗体(mini body)、scap、IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体、IgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体、IgG4抗体、抗体非可変領域の派生物、およびタンパク質足場に基づく合成抗体を含み得るが、これらに特に限定されるというものではない。発明の抗体の特性が維持される限り、可変領域で変異する抗体もまた、本発明の範囲に含まれ得る。これは可変領域でのアミノ酸の保存的置換で例示され得る。

30

40

#### 【0024】

ここで、そのような「保存的置換」は通常アミノ酸を、元のアミノ酸配列と同様の特性を有する別のアミノ酸残基に置換することを意味する。例えば、リジン、アルギニン、およびヒスチジンは、塩基側鎖を有し、順に同様の特性を示す。他方で、アスパラギン酸およびグルタミン酸の両方は、酸性側鎖を有し、互いに同様の特性を示す。加えて、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システインおよびトリプトファンは、それらが非帯電極性側鎖を有することから互いに類似である一方で、アラニン、バリン、ロイシン、トレオニン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニンおよ

50

びメチオニン、それらが無極性側鎖を有することから、互いに類似である。さらに、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびヒスチジンは、それら芳香族側鎖を有することから、互いに類似である。結果として、アミノ酸置換が上記の類似の特性を有する群のいずれかに起こっても、特性における著しい変化が見出され得ないことは、当業者に明白であろう。したがって、発明の抗体の特定の性質が保持されるなら、可変領域での保存的置換により変異している、抗体の作成のための方法もまた、本発明の範囲の中に含まれ得る。

#### 【0025】

配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープに結合する抗体は、（本発明が関係する）当業者に既知のいかなる方法によって作製され得る。特に、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープ、エピトープを含む複合体または上述されたエピトープをコードするポリヌクレオチドを動物に接種後、接種された動物から、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープに結合する抗体が生産され、スクリーニングされ、順に得られる。

10

#### 【0026】

本明細書で使用される動物は、トランスジェニック動物、特にヒト由来配列と同じ抗体を生産できるトランスジェニックマウス、を含み得る。トランスジェニックマウスを用いて得られる、減少した免疫原性を有するいわゆる完全ヒト抗体は、米国特許番号5,569,825号；5,633,425号および7,501,552号等に記載のいずれか1つにより生産され得る。上述の動物がヒト由来配列と同じ抗体を生産するように好ましく形質転換されていない場合、動物から得られた抗体を用いて、米国特許番号5,225,539号；5,859,205号；6,632,927号；5,693,762号6,054,297号；6,407,213号；および国際公開番号1998/52976号に記載されるいずれか1つの方法によりヒト化または脱免疫化工程がさらに実施され得、その結果、*in vivo*処理に有用な抗体が好適に生産され得る。特に、そのようなヒト化または脱免疫化は、動物から生産された抗体のCDR配列を、ヒト抗体のフレームワークに接合するためのCDR接合を含み得、親和性を増加させ、免疫原性を減少させるために、さらに少なくとも1つのアミノ酸配列を置換、挿入および欠失させるCDRウォーキング(CDR-walking)工程を含み得る。

20

#### 【0027】

配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープ、エピトープを含む複合体および/またはエピトープをコードするポリヌクレオチドの代わりに、全HBVが免疫原性として用いられる場合、HBV結合能（時々、「結合」と省略される）を有する抗体をほとんどスクリーニング（よく「パニング」と称す）し、次いで第一にスクリーニングされた抗体のうち、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープを特異的に認識する抗体を追加でパニングする工程、が使用され得る。あるいは、第一にスクリーニングされたHBV結合抗体のうち、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープの重要な部位が変異されたHBVと結合しないかまたは減少した結合を有する抗体をスクリーニングする方法であって、方法が配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープの重要な部位の変異を引き起こすことを含む、方法もまた使用され得る。

30

40

#### 【0028】

一方で、当分野で周知のディスプレイ技術により、配列番号4～7のいずれか1つで決定されるHBV特異的エピトープに結合するヒト抗体が生産および選別され得る。そのようなディスプレイ技術はファージディスプレイ、バクテリアディスプレイまたはリボゾームディスプレイから選択され得るが、これらに特に制限されるというものではない。ライブラリーの作成およびディスプレイは、例えば：米国特許番号5,733,743号、7,063,943号、6,172,197号、6,348,315号、6,589,741号等に関示される、慣用技術により容易に実施され得る。特に、上述のディスプレイに使用されるライブラリーは、ヒト由来抗体の配列を有するように設計され得る。特に、上

50

記の方配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V エピトープまたはエピトープを含む複合体を適用することによる、配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定される H B V 特異的エピトープのみに特異的に結合する抗体をスクリーニング（またはパニング）することによって特徴付けられ得る

【 0 0 2 9 】

最終的に、本発明は、配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定されるエピトープ、エピトープを含む複合体またはエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む H B V 検出組成物またはキットを提供する。本発明の H B V 検出組成物またはキットは、H B V 変異の有意な影響下でなくても、H B V 感染の迅速および正確な診断を可能にするという利点を有し得る。配列番号 4 ~ 7 のいずれか 1 つで決定されるエピトープ、エピトープを含む複合体またはエピトープをコードするポリヌクレオチドを含む H B V 検出キットは、例えば一般的な酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、蛍光活性化細胞分類法（F A C S）などを含む様々な方法を利用するために製造され得る。さらに、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチドが使用されている場合、ハイブリダイゼーションは一般的なハイブリダイゼーション技術で検出され得る。

10

【発明の効果】

【 0 0 3 0 】

発明の有利な効果

詳細な説明から明らかのように、本発明により提供される H B V 特異的エピトープは実質的に、突然変異誘発を起こさない保存的位置である。したがって、前述のエピトープに対する抗体を含む組成物またはワクチン組成物は、H B V 変異などによる治癒効果の悪化を起こす可能性が比較的 low、結果として H B V 治療および / または診断に友好的に使用される。

20

【 0 0 3 1 】

図面の簡単な説明

本発明の上記および他の目的、特徴、および利点は添付の図面に関連して提供される好ましい実施形態の以下の記載から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 2 】

【図 1】図 1 は、発明の抗体のエピトープを特定するための H B V 表面抗原タンパク質変異体への結合能の変化の分析結果を示す。

30

【 0 0 3 3 】

【図 2】図 2 は発明のエピトープを含む H B V 表面抗原タンパク質のループ構造を示す。

【 0 0 3 4 】

【図 3】図 3 は表面抗原タンパク質をコードするゲノム S O R F が、ポリメラーゼをコードするゲノム P O R F に部分的に重なる H B V ゲノム構造を示す。

【 0 0 3 5 】

【図 4】図 4 は H B V ポリメラーゼ変異体を作製する工程を示す。

【 0 0 3 6 】

【図 5】図 5 は H B V P o l フリーレプリコンおよび H B V ポリメラーゼ変異体の、H e p G 2 細胞への同時の感染により実施される相補性試験工程を示す。

40

【 0 0 3 7 】

【図 6】図 6 はサザンプロット分析によるそれぞれの H B V ポリメラーゼ変異体の H B V 複製能力の試験結果（H B V D N A 複製中間体、すなわちグラフ右側の R C、D L、S S D N A、の比較）を示す。

【 0 0 3 8 】

【図 7】図 7 は、R N a s e 保護アッセイでのそれぞれの H B V ポリメラーゼ変異体によるプレゲノム R N A パッケージングへの影響の試験結果を示す。

【 0 0 3 9 】

【図 8】図 8 はマウスで H B V ウイルス粒子を発生させるための水圧注入で使用する H

50

B V 遺伝子ベクターの連鎖地図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の好ましい実施形態が実施例を詳細に参照して説明されるが、そのような実施例は説明に役立つ目的だけのためであり、本発明の範囲を限定する意図ではない。

【実施例】

【0041】

【表1】

【表1】 エピトープ特定のために用いたライブラリーの特性

ライブラリー中のクローンの数	441
変異HBV表面抗原のアミノ酸残基 (AA)	223 (全体で226)
クローン当たりのAA変異の平均数	1.2
AA残基当たりの変異の平均数	2.4
少なくとも1回のAA変異の数 (百分率)	223 (99%)
少なくとも2回のAA変異の数 (百分率)	216 (96%)
1個のAA変異を含むクローンの数 (百分率)	357 (81%)
2個のAA変異を含むクローンの数 (百分率)	76 (17%)
2個を超えるAA変異を含むクローンの数 (百分率)	8 (2%)

10

20

【0042】

表から、発明の抗体が、HBV表面抗原タンパク質の3個のアミノ酸残基(AA)で起こった変異を有する8個(8)のクローンで結合能を失ったことが見出された(図1参照)。すなわち、図1に示される8つのクローンに関して、ウサギポリクローナル抗体が結合能を示したことが確認され、順に変異HBV表面抗原タンパク質を通常に発現したが、発明の抗体はそれに結合しなかった。

【0043】

8個のクローンをアッセイした結果、各々が、それぞれ160R(160Rは、位置160に位置するアミノ酸Rを意味する、以下同じ)、163Wおよび164E(配列番号1)に少なくとも1回の変異を有することが見出された。すなわち、上記の配列は発明の抗体のエピトープに対応する部位として決定され得る。そのような結果から、発明の抗体のエピトープが、RFLWE(配列番号4)を含み、結合能があるHBVのaywサブタイプにおけるエピトープがKFLWE(配列番号5)を含むことが見出された。

30

【0044】

具体的に、配列番号4または5で決定される配列を有するエピトープは、上記のエピトープが存在するHBV表面部位の2つのループのうちのマイナー・ループに対応するFARFLWEWASVRF SW(配列番号6)またはFGKFLWEWASARFSW(配列番号7)であり得る(図2参照)。

【0045】

【実施例2】

【0046】

発明の抗体のエピトープの特性の特定

【0047】

(1) HBVポリメラーゼ(HBV Pol)変異体の作製

【0048】

発明の抗体のエピトープは、HBV aywサブタイプの表面抗原ORF(S ORF)に160K、163W、および164E(配列番号2)を含み、ここでは、エピトープをコードするHBV表面抗原のORF配列がHBVポリメラーゼをコードするHBV Pol ORFに重なる。特に、HBVポリメラーゼの504I、506M、507G、および

40

50

508V (配列番号3参照)はエピトープがエピトープをコードするORF遺伝子によってコードされる部位に対応し得る(図3参照)。簡潔に、HBV S ORFの上述の部位での変異もまた、HBV P ORFの変異に關与する。

#### 【0049】

HBVポリメラーゼは、他のウイルス性ポリメラーゼと著しく異なる特徴を有する。第一に、HBVポリメラーゼは、RNA(プレゲノムRNA: pgRNA)からそのDNAを合成する逆転写酵素活性を有し;第二に、逆転写開始の間、HBVポリメラーゼは、タンパク質プライミングを行うプライマーとしてそれ自体を使用し;第三に、正しいメカニズムはまだ特定されていないが、プライマー転移およびテンプレートスイッチングが複製の間実行される。

10

#### 【0050】

一方で、上記の通り、HBVを中和する発明の抗体のエピトープ部位をコードするオープン・リーディング・フレーム(「ORF」)、すなわち、HBV表面抗原の中の発明的な抗体のエピトープ部位、は、HBVポリメラーゼをコードする別のORFに重なり得る。したがって、発明の抗体のエピトープをコードするORFと重なるHBV P ORFによってコードされる、HBVポリメラーゼ部位の影響を調査するため、HBVウイルス複製の際に、前述のエピトープの変異可能性を調査した。

#### 【0051】

この目的のため、HBV P ORFで発明の抗体のエピトープに重なる部位に存在するアミノ酸をアラニンに置換した変異体をマニピュレーションで作製し、HBVポリメラーゼ(「HBV Pol」)の逆転写酵素活性への作製された変異体の影響の調査に供された。第一に、HBV Polポリメラーゼの503K、504I、506M、507G、および508Vを置換することによって得られる、K503A(K503Aは、位置503のアミノ酸KがAに変異したことを意味する、以下同じ)I504A、M506A、G507AおよびV508Aなどの変異体、ならびに自然に発生した変異体V508Lが、図4に示されるように、作製された。次いで、前述のエピトープ部位に変異を有する、HBVポリメラーゼのゲノム複製機能の変化が相補性試験で調査された。特に、フレーム・シフト変異がHBV P ORFに由来し、HBVポリメラーゼが欠失した活性を示す、HBV Polヌルレプリコン、ならびに、変異が上記に由来するHBVポリメラーゼを発現するプラスミドが、He p G 2細胞で感染された(図5参照)。その後、HBVゲノム複製はサザンブロット分析およびRNase保護アッセイ(RPA)によって検査された。

20

30

#### 【0052】

##### (2) サザンブロット分析

#### 【0053】

上記の通り、HBV PolヌルレプリコンおよびHBVポリメラーゼ変異を導く変異体が同時にHe p G 2細胞に感染され、続いて、4日後に複製されたウイルスDNAを回収した。回収された材料はHBV DNA複製の調査に供された。

#### 【0054】

その結果、K503A変異体に関して、野生型と比べて、ウイルスDNA複製は約17%であった。この結果は、HBVポリメラーゼの503K部位がウイルスDNA模写のメカニズムに有意に關与することを示す。これに対して、M506AおよびG507A変異体はほとんどウイルスDNA複製を示さなかった。この事実は、506Mおよび507GがHBVポリメラーゼのウイルスDNA複製機構のための必須部位であることを示す。I504A、V508A、およびV508L変異体はそれぞれ、野生型と比べて約65%、70%および82%のウイルスDNA複製を示した。すなわち、これらの変異体が発見的に野生型のものと同様のウイルスDNA模写を受けたと認められた。その結果、上記の変異体はHBV DNA複製において比較的低い關与を有することが決定された(図6を参照)。

40

#### 【0055】

50

## (3) RPA (RNase 保護アッセイ) の結果

## 【0056】

DNA複製の前の予備段階として、RNA (プレゲノムRNA: pgRNA) のカプシド形成がRPA方法で検査された (Kim et al., 2009, J. Virol. 83: 8032-8040を参照)。

## 【0057】

上記の通り、HBV PolヌルレプリコンおよびHBVポリメラーゼ変異を導く変異体が同時にHe p G 2細胞に感染され、続いて、3日後に細胞のウイルスコアおよび全pgRNAを回収した。回収された材料は、pgRNAがHBV DNA模写にテンプレートとして使用されるpgRNAパッケージング範囲の定量分析に供された。

10

## 【0058】

結果より、K503AおよびG507A変異体が、野生型と比べて約25%のpgRNAパッケージングを示した。これは、503Kおよび507Gがウイルスのコア粒子へのpgRNAのパッケージングに有意に関与することを示す。他方で、M506A変異体は、野生型と比較して約71%のpgRNAパッケージングを示した。すなわち、506MのpgRNAパッケージングへの関与が比較的低いことが見出された。他の変異体、例えばI504A、V508AおよびV508L変異体は野生型とほぼ同じpgRNAパッケージングを示し、それゆえ、これらの部位がほんのわずかしがpgRNAパッケージングに関与しないと考えられる (図7参照)。

20

## 【0059】

## (4) HBV複製の際のHBVポリメラーゼ変異体の影響の総括的なレビュー

## 【0060】

HBVポリメラーゼのK503A変異体について、野生型と比べて、25%だけのpgRNAパッケージングが結果として生じた。ウイルス複製の最終産物としてのウイルスDNAの定量化の結果、複製がpgRNAパッケージングの範囲だけ実行されたことが見出された。したがって、503K部位は初期のpgRNAパッケージングに強くすると考えられる (表2参照)。一方、HBVポリメラーゼのM506A変異体は、実質的に野生型と同様の、約71%のpgRNAパッケージングを示した。しかしながら、ウイルス複製の最終産物としてのウイルスDNAの定量化の結果は複製を全く示さなかった。この事実は、HBVポリメラーゼのM506はpgRNAパッケージングに全く関与しないが、M506が、pgRNAをテンプレートとして用いる(-)ストランドDNAを合成するためのウイルスDNA複製のメカニズム、すなわち、タンパク質プライミングまたはプライマー転移などの逆転写メカニズム、にかなり関与し得ることを意味する。

30

## 【0061】

HBVポリメラーゼのG507A変異体について、pgRNAパッケージングは野生型の24%にすぎず、ウイルスDNA複製はほんのわずかしが実施されておらず、それゆえ、M507部位がpgRNA結合とポリメラーゼの逆転写の両方に重要な機能を有すると考えられ得る。さらに、M507部位には、カプシド形成の間、宿主因子としてのHsp90などのタンパク質、および/または、HBVのコアタンパク質との相互作用における役割があり得る。

40

## 【0062】

その間、HBVポリメラーゼの残りの変異体、I504A、V508A、およびV508Lは実質的に野生型のもと同様のpgRNAパッケージング、および/またはウイルスDNA複製を示す。したがって、発明の抗体のエピトープとして見出されたHBV表面抗原タンパク質部位、160K、163Wおよび164EをコードするHBV S ORFに重なるHBV P ORFによってコードされるHBVポリメラーゼの配列のうち、160Kおよび163W部位がウイルス複製と深く関連していることが見出された。変異がこれらの部位で引き起こされる場合、ウイルス複製が実施されない場合もあり、その結果、高い保存的位置である。したがって、上記の2個の変異体は存在せず、前述の部位への特異的結合抗体は、自然に発生した変異体および/または、抗ウイルス薬に耐性を示す

50

変異体を治療するのに有効であり得る。

【 0 0 6 3 】

【 表 2 】

【表2】- HBVポリメラーゼ変異体の複製能およびRNAパッケージング特性

	変異体	RNAパッケージング	DNA複製*
HBVポリメラーゼ	K503A	+	+
	I504A	+++	++
	M506A	++	-
	G607A	+	-
	V509A	+++	++
	V508L	+++	+++

10

(\*)野生型との比較、+++：70～100%； ++：30～70%； +：10～30%；および-：<1%

【 0 0 6 4 】

[ 実施例 3 ]

【 0 0 6 5 】

発明の抗体のエピトープ変異体への結合および中和効果

【 0 0 6 6 】

( 1 ) 変異体の調製

20

【 0 0 6 7 】

発明の抗体のエピトープである、HBV表面抗原タンパク質(HBsAg)の163Wおよび164E(配列番号1)の少なくとも1つが、変異体の作製の際にアラニンに置換された。血清型に関連している160Kは、変異において問題を有するため、その変異体は除かれた。加えて、164Eを164Dとする変異により得られた変異体が最近報告されたので、E164D変異体もまた作製され、使用された。上記のとおりに変異体を得たので、変異はまた、前述の変異体をコードするHBV S ORFに重なる、HBV P ORFによってコードされたHBVポリメラーゼの506M、507Gおよび508V(配列番号2)でも導かれた。ここで、HBV表面抗原タンパク質の163Wおよび164Eの異形コドンによって、同じアミノ酸変異が起こるときでさえ、HBVポリメラーゼの変異体は、異なったアミノ酸配列を有する(表3を参照)。

30

【 0 0 6 8 】

【 表 3 】

【表3】- HBsAgの変異体および対応するHBVポリメラーゼの変異

変異体	HBsAg変異		HBVポリメラーゼの変異	
	前	後	前	後
M5-1	WE	AA	MGV	SRL
M5-2		AA		SRV
M5-3		AA		SGL
M5-4		AA		SGV
M5-5		AE		SRV
M5-6		AE		SGV
M5-7		WA		MGL
M5-8		WA		MGM
M5-9		WA		MGV
M6-1		WD		MGL

40

【 0 0 6 9 】

( 2 ) 急性B型肝炎由来マウスを使用するin vivo効果の試験およびバリデーシ

50

ョン

【0070】

急性B型肝炎と同様の症状を導くために水圧注入でC57BL6マウスにHBV DNAを注入することにより、処置されたマウスはエプトープ変異が上記のように導かれるところで、発明の抗体の結合、HBVの結合および/またはマウスの血中のHBV中和能を調査するために使用された。使用されたC57BL6マウスはCharles Liver Laboratory（米国）から購入された、約20gの6週齢のメスであった。表4に示されているように、1群あたり5匹のマウスの合計12のグループが試験された。

【0071】

【表4】

【表4】- C57BL6マウスを用いる試験条件

対象	個体の数	試験材料および投与経路	用量
野生型HBV	5	PBS、IV	0.2 mL
野生型HBV	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-1	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-2	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-3	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-4	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-5	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-6	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-7	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-8	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M5-9	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL
M6-1	5	0.1gの発明の抗体、IV	0.2 mL

【0072】

各々のマウスは、マウスの体重当たり9.5用量%の比で0.3mL/分で尾静脈を通して、pcDNA3.1(Invitrogen、米国)が挿入されたHBV DNA配列を含み、その結果急性B型肝炎を引き起こす、20μgのpHBV-MBRIベクター(Shin et al., Virus Research 119, 146-153, 2006;表8参照)を注入することによって、処理された。48時間後、表4に示すように、0.2mLの発明の抗体をマウスの尾静脈を通して静脈に(IV)投与された。発明の抗体の注射の前(24時間、48時間)とその注射後(72時間、96時間)に、血清が分離され、ヤギ血清中に10倍希釈され、次いでGenedia HBsAg ELISA 3.0(Green Cross Corp. MS(韓国))を通してHBV表面抗原タンパク質(表面抗原)の血液における濃度が測定された。HBV DNAに関して、本発明の抗体の注射の前(48時間)と後(72時間)に、血液は分離され、血中のHBV DNAの定量アッセイを実施するためにリアルタイムPCRの後、発明の抗体のHBV中和能力の比較アッセイで分析された。

【0073】

Genedia HBsAg ELISA 3.0による血中のHBsAgの検出の結果、10個の変異体が挿入されるならば、すべてのHBsAgが適切に発現されることが確認された。10変異型HBsAgが発明の抗体との結合をアッセイされたとき、163Wと164Eの両方がアラニンで置換されたHBsAg変異体は発明の抗体への結合を示さなかった。一方、163Wのみがアラニンで置換されたHBsAg変異体が、野生型と比べて70%以上の結合能を示すことが見出された。加えて、アラニンで置換された164Eを有するHBsAg変異体は、野生型と比べて約30%の結合能を示した。E164D変異体について、結合特性は実質的に野生型と同様であった(表5参照)。

10

20

30

40

50

【0074】

HBsAgでの変異は、上記のHBVポリメラーゼ配列に影響を及ぼす。したがって、HBV DNA複製で、HBsAgのアミノ酸残基がアラニンで置換されて作成され得る、ポリメラーゼ変異体の影響がアッセイされた。アッセイの結果は、163Wと164Eがすべて変異するならHBV DNA複製が全く起こらないことを明らかにした。163Wおよび164Eの各々がアラニンで置換されたとき、163W変異体が複製を全く示さなかった一方で、164E変異体は、約30~70%のHBV DNA複製があった。したがって、複製に、163W部位に対応するポリメラーゼのアミノ酸部位が非常に重要であることが特定された。

【0075】

HBsAg発現とHBV DNA複製がある164E変異体が、発明の抗体のHBV中和能力を特定するためにアッセイされた。その結果から、発明の抗体は野生型と比べて結合能が約70%減少するので、HBV中和能力が顕著に減少することが確認された。しかしながら、当分野で知られている天然の変異体である164D変異体について、発明の抗体は野生型と同様の結合能を示した。

【0076】

【表5】

【表5】 HBsAg変異に関する発明の抗体の中和効果およびHBV DNA複製の際のそれらの影響

変異	HBsAg変異		ポリメラーゼ変異		発明の抗体	Genedia plate	HBV DNA複製	中和効果
	前	後	前	後				
M5-1	WE	AA	MGV	SRL	-	結合	-	ND
M5-2		AA		SRV	-	結合	-	ND
M5-3		AA		SGL	-	結合	-	ND
M5-4		AA		SGV	-	結合	-	ND
M5-5		AA		SRV	+++	結合	-	ND
M5-6		AE		SGV	++	結合	-	ND
M5-7		WA		MGL	+	結合	++	無
M5-8		WA		MGM	+	結合	+	無
M5-9		WA		MGV	+	結合	++	無
M6-1		WD		MGL	+++	結合	+++	有

(\*)野生型との比較、+++：70~100%； ++：30~70%； +：10~30%；および-：<1%  
 ND：中和能の確認試験は実施されず（決定されない）

【0077】

前述の明細書に記載されるように、HBsAgの発明の抗体のエピトープは160K (ayw)または160R (adr)、163Wおよび164Eを含む。特に、164E部位は、アラニン置換変異体を使用する実験で、発明の抗体を結合するための最も有力な位置として特定された。現在のところ、この位置が164Dに変異することが知られており、発明の抗体は164D変異体への中和能力を示した。一方、163W部位は発明の抗体の結合に有意に関与しないが、この部位での変異は、複製に重要な役割を果たすポリメラーゼ配列の変異をもたらし、それは順に、HBV DNA複製に影響を及ぼす。したがって、以上の部位が非常に保存的な位置、すなわち、変異がほんのわずかしき起こらない位置であると予測され得る。事実、163Wでのいかなる変異もまだ報告されていない。最後に、160K (aywサブタイプのため)または160R (adrサブタイプのため)が、抗原型を決定するアミノ酸部位である。機能アッセイの結果から、これらは、HBV複製と深く関連しているように特定され、その結果、変異がほんのわずかしき起こらない

非常に保存的な位置として、予測される。

【配列表フリーテキスト】

【0078】

配列番号1はHBV表面抗原タンパク質のアミノ酸配列(a d rサブタイプ)を示す。

【0079】

配列番号2はHBV表面抗原タンパク質のアミノ酸配列(a y wサブタイプ)を示す。

【0080】

配列番号3はHBVポリメラーゼタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0081】

配列番号4は発明の抗体のエピトープ(a d rサブタイプ)を示す。

10

【0082】

R F L W E

【0083】

配列番号5は発明の抗体のエピトープ(a y wサブタイプ)を示す。

【0084】

K F L W E

【0085】

配列番号6は発明の抗体のエピトープ(a d rサブタイプ)を示す。

【0086】

F A R F L W E W A S V R F S W

20

【0087】

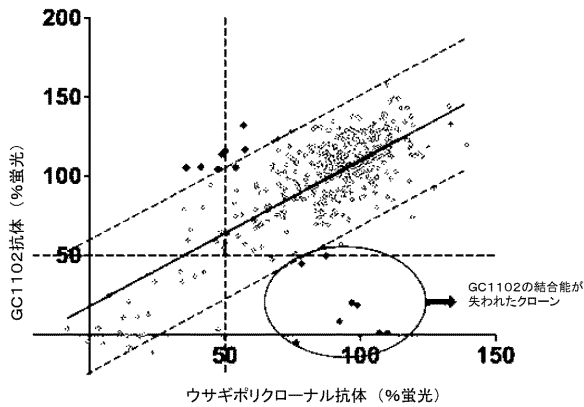
配列番号7は発明の抗体のエピトープ(a y wサブタイプ)を示す。

【0088】

F G K F L W E W A S A R F S W

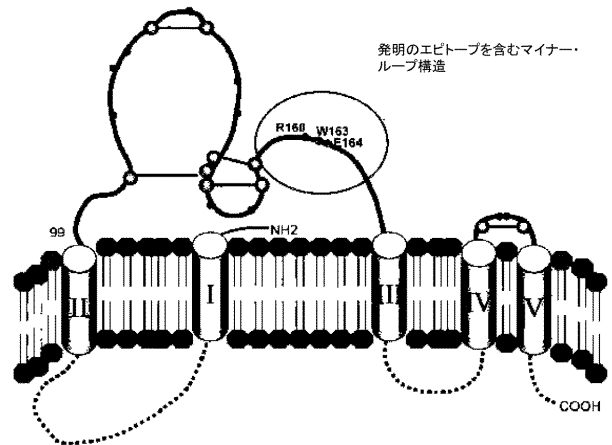
【図1】

[Fig. 1]



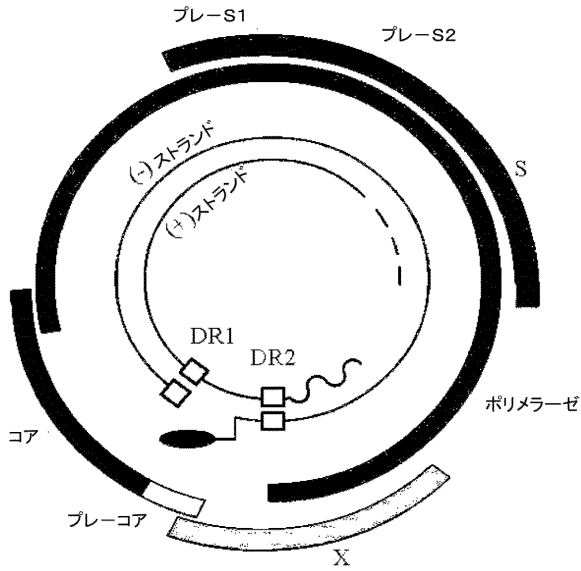
【図2】

[Fig. 2]



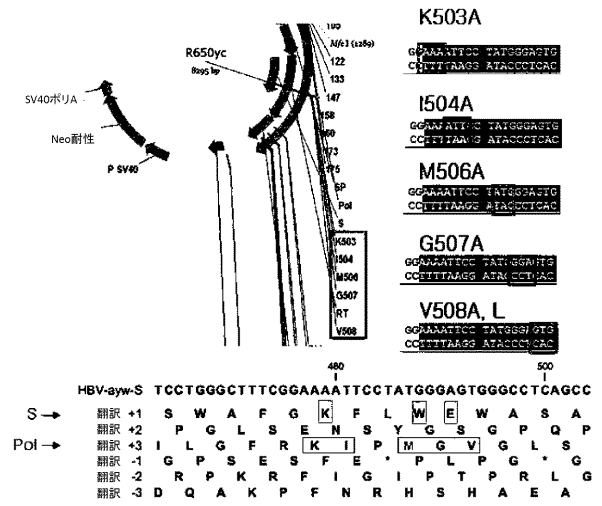
【 図 3 】

[Fig. 3]



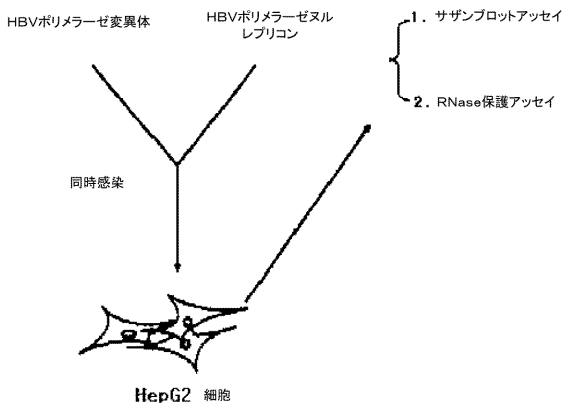
【 図 4 】

[Fig. 4]



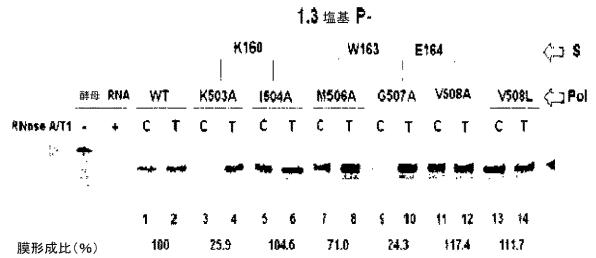
【 図 5 】

[Fig. 5]



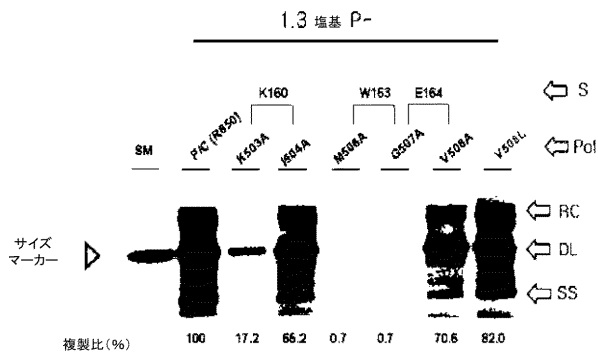
【 図 7 】

[Fig. 7]





【 図 6 】

[Fig. 6]





## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2011/005477</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C07K 14/02(2006.01)i, C07K 17/02(2006.01)i, C12N 15/36(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, C12N 7/01(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, A61K 39/42(2006.01)i, A61P 31/20(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/02, C07K 16/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: HBV, hepatitis B virus, epitope, RFLWE, KLFWE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SZOMOR et al., `Mutation spectra of the surface-protein-coding region of the HBV genome in HBV-vaccinated and non-vaccinated individuals in Hungary` Archives of Virology, Vol.153, pp.1885-1892 (24 September 2008) See the whole document, especially figure 1 and table 3.	1-7, 16-26
A	NCBI, GenBank accession No. AAF15849.1 (08 December 1999) See the whole document.	1-7, 16-26
A	NCBI, GenBank accession No. AAF15606.1 (08 December 1999) See the whole document.	1-7, 16-26
A	KR 10-1999-0008648 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 05 February 1999 See the whole document.	1-7, 16-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 JUNE 2012 (13.06.2012)		Date of mailing of the international search report <b>13 JUNE 2012 (13.06.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Kim Seung Beom Telephone No. 82-42-481-8746 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/005477

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 9, 12-15  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Claims 9, 12-15 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).
  
3.  Claims Nos.: 8, 10, 11, 27-29  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2011/005477**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-1999-0008648 A	05.02.1999	KR 10-0246127 B1	15.03.2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/02 (2006.01)	C 0 7 K 14/02	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 S	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
G 0 1 N 33/576 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	G 0 1 N 33/576 B	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 16/08 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 0 7 K 16/08	
	A 0 1 K 67/027	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 キム・セホ

大韓民国 4 4 6 - 7 7 0 ギョンギド、ヨンインシ、ギフング、ボジョンドン、グリーン・クロス・コーポレーション

(72)発明者 ホン・カンウォン

大韓民国 4 4 6 - 7 7 0 ギョンギド、ヨンインシ、ギフング、ボジョンドン、グリーン・クロス・コーポレーション

(72)発明者 シン・ヨンウォン

大韓民国 4 4 6 - 7 7 0 ギョンギド、ヨンインシ、ギフング、ボジョンドン、グリーン・クロス・コーポレーション

(72)発明者 チャン・キファン

大韓民国 4 4 6 - 7 7 0 ギョンギド、ヨンインシ、ギフング、ボジョンドン、グリーン・クロス・コーポレーション

(72)発明者 キム・ミンス

大韓民国 4 4 6 - 7 7 0 ギョンギド、ヨンインシ、ギフング、ボジョンドン、グリーン・クロス・コーポレーション

(72)発明者 イム・チョンエ

大韓民国 4 4 6 - 7 7 0 ギョンギド、ヨンインシ、ギフング、ボジョンドン、グリーン・クロス・コーポレーション

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA14 BA10 BA33 CA02 CA11 DA03 EA02 EA04

FA20 GA11 HA17



专利名称(译)	乙型肝炎病毒表面抗原的表位及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014526885A</a>	公开(公告)日	2014-10-09
申请号	JP2014518775	申请日	2011-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	绿十字公司 绿十字		
申请(专利权)人(译)	绿十字公司		
[标]发明人	キムセホ ホンカンウオン シンヨンウオン チャンキファン キムミンス イムチョンエ		
发明人	キム・セホ ホン・カンウオン シン・ヨンウオン チャン・キファン キム・ミンス イム・チョンエ		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/08 C12N1/21 C12N1/19 C07K17/10 C07K14/02 C12P21/02 C12N5/10 C12N7/00 C12Q1/68 A61P31/20 A61K39/395 A61P1/16 G01N33/53 G01N33/576 C07K7/06 C07K7/08 C12N15 /02 C07K16/08 A01K67/027		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/53 C07K14/005 C07K16/082 C07K2317/34 C07K2317/76 C12N2730/10122 C12N2730/10134 A01K67/027 A01K2207/05 A01K2227/105 A01K2267/0337 A61P1/16 A61P31/20 C07K7/06 A61K39/292 C12N7/00 C12N2730/10151		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/08 C12N1/21 C12N1/19 C07K17/10 C07K14/02 C12P21/02.C C12N5/00. 102 C12N7/00 C12Q1/68.A A61P31/20 A61K39/395.S A61P1/16 A61K39/395.D G01N33/53.D G01N33 /576.B C07K7/06 C07K7/08 C12N15/00.C C07K16/08 A01K67/027		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA14 4B024/BA10 4B024/BA33 4B024/CA02 4B024/CA11 4B024 /DA03 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA20 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QQ43 4B063/QQ44 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064 /AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA02 4H045 /DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	1020110064671 2011-06-30 KR		
其他公开文献	JP5977346B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

表位特异性针对乙型肝炎病毒 (HBV) 病毒及其使用。所公开的表位是不发生突变的保守位置，因此，含有针对上述表位的抗体的组合物或含有该表位的疫苗组合物很可能导致HBV突变引起的治愈效果的恶化。它对治疗HBV非常有用。

[表1] エピトープ特定のために用いたライブラリーの特性

ライブラリー中のクローンの数	441
変異HBV表面抗原のアミノ酸残基 (AA)	223 (全体で226)
クローン当たりのAA変異の平均数	1.2
AA残基当たりの変異の平均数	2.4
少なくとも1回のAA変異の数 (百分率)	223 (99%)
少なくとも2回のAA変異の数 (百分率)	216 (96%)
1個のAA変異を含むクローンの数 (百分率)	357 (81%)
2個のAA変異を含むクローンの数 (百分率)	76 (17%)
2個を超えるAA変異を含むクローンの数 (百分率)	8 (2%)