

(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2016-528176**

**(P2016-528176A)**

(43) 公表日 **平成28年9月15日(2016.9.15)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00 ZNA	4B064
<b>C07K 16/08 (2006.01)</b>	C07K 16/08	4B065
<b>C07K 14/02 (2006.01)</b>	C07K 14/02	4C084
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4C085
<b>C12N 7/04 (2006.01)</b>	C12N 7/04	4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-517683 (P2016-517683)  
 (86) (22) 出願日 平成26年6月5日 (2014.6.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年2月1日 (2016.2.1)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/051739  
 (87) 国際公開番号 W02014/195713  
 (87) 国際公開日 平成26年12月11日 (2014.12.11)  
 (31) 優先権主張番号 61/831, 707  
 (32) 優先日 平成25年6月6日 (2013.6.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515338346  
 ローランズ、デビッド ジェイ  
 イギリス国、エルエス2 9ジェーティー  
 、リーズ、ユニバーシティ オブ リーズ  
 、ザ ファキュリティー オブ バイオロ  
 ジカル サイエンス  
 (71) 出願人 515338357  
 ロモノソフ、ジョージ  
 イギリス国、ノーウィッチ エヌアール4  
 7ユーエイチ、ノーウィッチ リサーチ  
 パーク、ジョン イネス センター、バ  
 イオロジカル ケミストリー ディパート  
 メント

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シングルドメイン抗体ディスプレイ

(57) 【要約】

本発明は、B型肝炎コア抗原 (HBcAg) の第一及び第二のコピーをタンデムに含むタンパク質であって、HBcAgコピーの一方又は両方が、e1ループにおいてシングルドメイン抗体フラグメントを含む、タンパク質を提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

B型肝炎コア抗原 (HBcAg) の第一及び第二のコピーをタンデムに含むタンパク質であって、HBcAgコピーの一方又は両方が、e1ループにおいてシングルドメイン抗体フラグメントを含む、タンパク質。

## 【請求項 2】

HBcAgの両方のコピーが、e1ループにおいてシングルドメイン抗体フラグメントを含む、請求項1に記載のタンパク質。

## 【請求項 3】

HBcAgの第一のコピーが、e1ループにおいて前記シングルドメイン抗体フラグメントを含み、HBcAgの第二のコピーが、e1ループにおいて異種タンパク質を含む、請求項1に記載のタンパク質。

10

## 【請求項 4】

異種タンパク質が、エピトープを含むか、又は蛍光若しくは生物発光タンパク質である、請求項3に記載のタンパク質。

## 【請求項 5】

シングルドメイン抗体フラグメントが抗原と結合される、請求項1~4のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 6】

(a) HBcAgのタンデムコピーがリンカーにより結合され；且つ/或いは  
(b) HBcAgの一方又は両方のコピーのe1ループにおけるシングルドメイン抗体フラグメントが、一方又は両方の側面でリンカーと隣接する、  
請求項1~5のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

## 【請求項 7】

(a) リンカー又は各リンカーが、少なくとも1.5 nmの長さであり；且つ/或いは  
(b) リンカー又は各リンカーが、配列Gly<sub>n</sub>Ser (G<sub>n</sub>S) (ここで、nは2から8である)の複数のコピーを含む、  
請求項6に記載のタンパク質。

## 【請求項 8】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質の複数のコピーを含む、粒子。

30

## 【請求項 9】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする、核酸分子。

## 【請求項 10】

発現ベクターである、請求項9に記載の核酸分子。

## 【請求項 11】

請求項9又は10に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

## 【請求項 12】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質を製造するためのプロセスであって、該タンパク質が発現される条件下、該タンパク質をコードする核酸分子を含有する宿主細胞を培養すること、及び該タンパク質を回収することを含む、プロセス。

40

## 【請求項 13】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項8に記載の粒子、又は請求項9若しくは10に記載の核酸分子と、医薬上許容される担体又は希釈剤とを含む、医薬組成物。

## 【請求項 14】

請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項8に記載の粒子、又は請求項9若しくは10に記載の核酸分子と、医薬上許容される担体又は希釈剤とを含む、ワクチン。

## 【請求項 15】

アジュバントをさらに含む、請求項13又は14に記載の医薬組成物又はワクチン。

## 【請求項 16】

治療によりヒト又は動物対象を治療する方法であって、請求項1~7のいずれか一項に記

50

載のタンパク質、請求項8に記載の粒子、又は請求項9若しくは10に記載の核酸分子を対象に投与することを含む、方法。

【請求項17】

対象において免疫応答を誘導する方法であって、請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項8に記載の粒子、又は請求項9若しくは10に記載の核酸分子を対象に投与することを含む、方法。

【請求項18】

投与が、アジュバントとの組み合わせである、請求項16又は17に記載の方法。

【請求項19】

ヒト又は動物の体を治療する方法に使用するための、請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項8に記載の粒子、又は請求項9若しくは10に記載の核酸分子。 10

【請求項20】

ヒト又は動物の体にワクチン接種する方法に使用するための、請求項1~7のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項8に記載の粒子、又は請求項9若しくは10に記載の核酸分子。

【請求項21】

サンプル中の抗原を検出するための、請求項1~3のいずれか一項に記載のタンパク質の、又は請求項1~3のいずれか一項に記載のタンパク質の複数のコピーを含む粒子の、使用。

【請求項22】 20

サンプル中の抗原を検出する方法であって、請求項1~3のいずれか一項に記載のタンパク質を、又は請求項1~3のいずれか一項に記載のタンパク質の複数のコピーを含む粒子を、サンプルに適用することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、シングルドメイン抗体フラグメントを含む融合タンパク質、該タンパク質をコードする核酸分子、該タンパク質を製造するためのプロセス、該タンパク質を含有する医薬及びワクチン組成物、並びに治療（therapy）、ワクチン接種及び診断における該タンパク質の使用に関する。 30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

抗体は、実験的研究及び医学的応用のための重要なツールである。殆どの抗体は、2本の重鎖と2本の軽鎖から構成され、それらはともに2つの同一の抗原結合部位に寄与する。これら通常の抗体に加えて、ラクダ科動物（camelids）及びある種の軟骨魚類（サメなど）はまた、重鎖のみから構成される抗体を産生する。これらの重鎖抗体（hcAbs）の抗原結合部位は、シングルドメインのみにより形成され、ラクダ科動物hcAbsではVHH（Variable domain of the Heavy chain of the Heavy-chain antibody）と、軟骨魚類hcAbsではVNAR（Variable domain of the shark New Antigen Receptor）と称される。VHH及びVNARは組換えタンパク質として作製でき、シングルドメイン抗体（sdAbs）と称される。 40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

発明の簡単な要旨

本発明は、タンデムB型肝炎（HBV）コアタンパク質に基づく高度に柔軟な抗体提示システムに関する。本発明者らは、タンデムHBVコア構築物（constructs）を使用することにより、HBVコア抗原（HBcAg）粒子の表面上にシングルドメイン抗体（sdAb）フラグメントを活性（すなわち、抗原結合）型で提示可能であることを実証した。このタイプの抗体デ 50

ディスプレイは、治療、ワクチン接種及び診断用途での使用を含む様々な用途を有する。

【0004】

興味深いことに、より一般に使用される一本鎖可変フラグメント抗体 (scFv) を用いて、植物におけるタンデムコアタンパク質の表面上での抗体ディスプレイが試みられた。しかしながら、発現量は非常に低く、いずれの粒子形成も観察されなかった。これはおそらく、sdAbフラグメントが重鎖可変領域に対応するシングルドメインしか有さないのに対して、軽鎖及び重鎖可変領域に対応する2つのドメインを有するというscFvのより複雑な構造に起因する。興味深いことにはまた、sdAbフラグメント (VHH) は、植物において、単量体 (すなわち、非タンデム) HBcAg粒子の表面上ではディスプレイされ得ず：組換えタンパク質を検出できず (図7)、これはおそらくフォールディングの問題又は立体障害の問題により、タンパク質において即時の分解が引き起こされたことを示す。

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

従って、本発明は、B型肝炎コア抗原 (HBcAg) の第一及び第二のコピーをタンデムに含むタンパク質であって、HBcAgコピーの一方又は両方が、e1ループにおいてsdAbフラグメントを含む、タンパク質を提供する。

【0006】

当該技術の柔軟性とは、HBcAgコピーの一方又は両方が、e1ループにおいてsdAbフラグメントを含んでよいことを意味する。基本的には、HBcAgコピーの一方がe1ループにおいてsdAbフラグメントを含む限り、HBcAgの第二のコピーは、関心のある任意のタンパク質を含んでよい。従って、HBcAgの第二のコピーはまた、HBcAgの第一のコピーのe1ループにおけるsdAbフラグメントと同一の又は異なるsdAbフラグメントをe1ループにおいて含んでもよい。或いは、HBcAgの第二のコピーは、e1ループにおいて異なる異種タンパク質を含んでよい。

20

【0007】

抗体ディスプレイ技術は複数の用途を有し、そのうちのいくつかは、タンデムコアタンパク質上に提示されるsdAb上に抗原がロードされることを必要としてよく、そのうちのいくつかはそれを必要としない。

【0008】

例えば、タンデムコアタンパク質は、ヒト又は動物の体の疾患又は状態の治療に使用するために、治療用抗体フラグメントを提示するよう改変 (engineered) されてよい。治療用抗体フラグメントをディスプレイするためにタンデムコアタンパク質を使用することの利点は、ウイルス様粒子 (Virus-Like Particle (VLP)) 又はコア様粒子 (Core-Like Particle (CLP)) 中にタンパク質の複数のコピー (multiple copies) が存在でき、高用量の治療用抗体フラグメントを投与することが可能となることである。各粒子は抗体フラグメントを90~120コピー含有することから、当該技術により、ユニットあたりの生物学的活性が著しく増加する。さらに、上記のようなシステムの柔軟性とは、2以上のタイプのsdAbフラグメントが、正確に1:1の比率で同時に投与され得ることを意味する。

30

【0009】

別例として、タンデムコアタンパク質は、哺乳動物免疫系に抗原を提示するためのワクチンとして使用するために、抗原をロードし得るsdAbフラグメントを提示するよう改変されてよい。言い換えれば、抗原は、抗体-抗原相互作用により、VLP又はCLP表面上にディスプレイされ、そこに保持され得る。抗原は、タンデムコアの表面上で提示される場合に、より免疫原性であるので、かかるシステムは、固有の免疫原性が低い抗原をディスプレイするのに適切であり得る。この技術は、免疫系により認識されるために特定のコンフォメーションで提示されることを必要とする抗原に特に適し得る。

40

【0010】

本発明のタンパク質はまた、診断目的に使用され得る。例えば、タンデムコアタンパク質は、抗原の存在を検出するために使用され得る、関心のある抗原と結合できるsdAbフラグメントを提示するよう改変されてよい。HBcAgの第二のコピーは、タンパク質を可視化

50

する手段を含んでよい。例えば、HBcAgの第二のコピーは、e1ループにおいて、蛍光又は生物発光タンパク質を含み得る。タンデムコアにより、大きな緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein (GFP)）が運ばれ得ることが以前に示されている。従って、第二のコア中のそれと一緒に一本鎖抗体が運ばれた場合、任意のアナライトについて単純な蛍光アッセイが設計され得る。例えば、標的アナライトをELISAプレートと結合させ、次いで蛍光VLPを添加し得る。単純な蛍光の測定により、標的の存在が決定され得る。これは、最初は通常のELISAと類似するよう見えるが、抗体の複数のコピーが存在することによる感受性の大幅な増加という追加の利点を有する。コンパレーター（comparator）として、ストレプトアビジン-ビオチンは、ELISAsの感受性を4倍増加させる；本発明は、これを×100倍増加させ得る。

10

#### 【0011】

本発明はまた、以下を提供する：

- 本発明のタンパク質の複数のコピーを含む粒子；
- 本発明のタンパク質をコードする核酸分子；
- 本発明の核酸分子を含む宿主細胞；
- 本発明のタンパク質を製造するためのプロセスであって、該タンパク質が発現される条件下、該タンパク質をコードする核酸分子を含有する宿主細胞を培養すること、及び該タンパク質を回収することを含む、プロセス；
- 本発明のタンパク質、本発明の粒子又は本発明の核酸分子と、医薬上許容される担体又は希釈剤とを含む医薬組成物；
- 本発明のタンパク質、本発明の粒子又は本発明の核酸分子と、医薬上許容される担体又は希釈剤とを含むワクチン；
- 治療（therapy）によりヒト又は動物対象を治療する方法であって、本発明のタンパク質、本発明の粒子又は本発明の核酸分子を対象に投与することを含む、方法；
- 対象において免疫応答を誘導する方法であって、本発明のタンパク質、本発明の粒子又は本発明の核酸分子を対象に投与することを含む、方法；
- ヒト又は動物の体を治療する方法に使用するための、本発明のタンパク質、本発明の粒子又は本発明の核酸分子；
- ヒト又は動物の体にワクチン接種する方法に使用するための、本発明のタンパク質、本発明の粒子又は本発明の核酸分子；
- サンプル中の抗原を検出するための、本発明のタンパク質の、又は本発明のタンパク質の複数のコピーを含む粒子の、使用；並びに
- サンプル中の抗原を検出する方法であって、本発明のタンパク質を、又は本発明のタンパク質の複数のコピーを含む粒子を、サンプルに適用することを含む、方法。

20

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【図1】潜在的なタンデムコア構築物の略図。sdAbフラグメントは、インサート（Insert）I及び/又はインサートIIに挿入されてよい。

【図2】（A）X線結晶構造解析データにより、HBVコアタンパク質により形成される天然二量体を示す。これは、結果として生じるウイルス様粒子の主要なビルディングブロックである。（B）分子モデリングにより、タンデムコア構築物のフォールディングは、単量体コアと区別できないように見えることが示唆される。2つのコア間にリンカー配列を付加することにより、それらが単一のタンパク質として発現されることを確実にすることに留意。

40

【図3】（A）単量体（左）及びタンデム（右）コアタンパク質により形成されるVLPsの電子顕微鏡法。VLPsは、同一の形態を有するよう見える。（B）クライオ電子顕微鏡により、単量体（左）及びタンデム（右）コア構築物が同一の様式でフォールディングされることが確認される。

【図4】tHB-VHHコア様粒子の電子顕微鏡像。上：GFPを伴わない粒子（スケールバー20 nm）；下：GFPを伴う粒子（スケールバー100 nm）。

50

【図5】異なる植物抽出物をショ糖クッション (sucrose cushions) 上に流す。超遠心分離後、tHB-VHH (抗GFP抗体フラグメントをディスプレイする粒子) 存在下での場合のGFPのみが高濃度ショ糖へと下部に流れる。結果により、tHB-VHH粒子がGFPと結合することが実証され、VHHが、コア様粒子 (CLPs) の表面上で適切にフォールディングされ、活性であることが示される。

【図6】ショ糖勾配フラクションのウェスタンブロット。上部メンブレン：抗GFP抗体でのブロット；下部メンブレン：抗HBcAg抗体でのブロット。S：抽出物を清澄化した上清、Top：ショ糖クッションの上部フラクション、Mid：中間部フラクション、Bott：下部フラクション。GFPは、そのままでは又はtHBとともにある場合には、勾配の上清中にその大部分が残るが、tHB-VHHの存在下では、クッションの下部に引きずられ、抗体を有する粒子とともに共局在化する。

10

【図7】粗植物抽出物の抗HBcAg抗体でのウェスタンブロット。EV：エンブティベクターコントロール - T-DNAマルチプルクローニングサイトにおいていずれの異種配列も含有しないpEAQ-HTベクターで植物をアグロインフィルトレーションした (agroinfiltrated)。tHB-VHH：C末端E1ループにおいて抗GFP VHHを有するタンデムHBcAg構築物。HB-VHH：e1ループにおいて抗GFP VHHを含有する単量体HBcAg；数1~3は、接種材料が由来する個別のアグロバクテリウム (Agrobacterium) 形質転換体コロニーをいう (3つ別個のクローンを試験した)。39 kDaのバンドは、エンブティベクターコントロールを含むすべてのサンプルにあり、非特異的シグナルを反映することを示す。

【図8】以下の実施例に記載のtHBcAg-抗GFP構築物をコードする配列。該構築物のVhH部分をコードする配列に下線を付す。

20

【図9】以下の実施例に記載のtHBcAg-抗GFP構築物のアミノ酸配列。該構築物のVhH部分の配列に下線を付す。タンデムコア間のリンカーを太字イタリック体で示す。

【図10】以下の実施例に記載の実験で使用する抗GFP VhHのアミノ酸配列。

【0013】

配列の簡単な説明

配列番号1は、aywサブタイプの183アミノ酸タンパク質プラスHBcAgの29アミノ酸プレ配列、及び対応するヌクレオチド配列である。

【0014】

配列番号2は、aywサブタイプの183アミノ酸タンパク質プラスHBcAgの29アミノ酸プレ配列である。

30

【発明を実施するための形態】

【0015】

発明の詳細な説明

タンデムコア構築物は、2つのB型肝炎 (HBV) コア遺伝子の遺伝的融合物であって、結果として生じる組換えタンパク質が、天然で二量体化する野生型コアタンパク質と区別できない2つのパラレルな「スパイク」を形成するようなものである (図2)。タンデムコアタンパク質は、単量体HBVコアタンパク質と類似の様式でウイルス様粒子 (VLPs) を形成する (図3)。

【0016】

本発明者らは、タンデムHBVコア構築物を使用することにより、HBVコア抗原 (HBcAg) 粒子の表面上にsdAbフラグメントを活性型で提示可能であることを実証した。

40

【0017】

より詳細には、本発明者らは、HBcAGコピーの一方のe1ループにおいてsdAbフラグメント (VHH) を含むタンデムコア構築物を設計した。該VHHは抗GFP VHHであり、免疫化アルパカ由来VHHファージディスプレイライブラリーから単離された。このVHHをコードする遺伝子をタンデムコア構築物のC末端単量体にクローニングした。この構築物 (tHB-VHH) をベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) にて一過性に発現させ、表面上にVHHをディスプレイするコア様粒子 (CLPs) の産生を導いた (図4)。

【0018】

50

粒子は、シヨ糖勾配下部へとGFPを移動させることが示され、それは、そのままでは又はVHHを有さないtHB粒子の存在下では十分に高密度でないことから通常はそうならない(図5)。これは明らかに、tHB-VHH粒子がGFPと結合することを示しており、従って、VHHが、CLPsの表面上で適切にフォールディングされ、活性であることを示す。シヨ糖クッションフラクションのウェスタンプロット分析により、GFPをそのままでは又はtHBとともに流した場合にはその大部分が上清中に残るが、tHB-VHHとともに流した場合には、GFP及びCLPsがクッション下部に共同在化することが確認された(図6)。

【0019】

従って、本発明者らは初めて、タンデムHBVコア構築物を使用することにより、HBcAg粒子の表面上にVHHを提示可能であることを実証した。本実験により、VHHが正確にフォールディングされ活性であることが示された。

10

【0020】

初期実験は、HBcAgのe1ループにおいてscFv抗体をディスプレイすることを目的とした。しかし、これは疑問であった。発現量は非常に低く、いずれの粒子形成も観察されなかった(データ示さず)。これはおそらく、VHHが重鎖可変領域に対応するシングルドメインしか有さないのに対して、軽鎖及び重鎖可変領域に対応する2つのドメインを有するというscFvのより複雑な構造に起因する。scFvのこのより一層の複雑さによっておそらく、両方のN及びC末端がHBcAgのe1ループと結合される場合に、インサートの適切なフォールディングが妨げられ、タンデム分子全体の不適切なフォールディングが導かれた。

【0021】

さらに、VHHは、植物において、単量体(すなわち、非タンデム)HBcAg粒子の表面上ではディスプレイされ得ず：組換えタンパク質を検出できず(図7)、これはおそらくフォールディングの問題又は立体障害の問題により、タンパク質において即時の分解が引き起こされたことを示す。

20

【0022】

従って、本発明は、タンデムHBVコアタンパク質に基づく新規抗体提示システムに関する。特に、本発明は、HBcAgの第一及び第二のコピーをタンデムに含むタンパク質であって、HBcAgコピーの一方又は両方が、e1ループにおいてsdAbフラグメントを含む、タンパク質を提供する。図1は、sdAbフラグメントをコードする核酸が、一方又は両方のインサート部位に挿入されてよいタンデムコア構築物の一例を示す。

30

【0023】

#### コアタンパク質

本発明のタンパク質の基本的なビルディングブロックはHBcAgであり、これはHBVのサブタイプによって183又は185アミノ酸(aa)を有する。aywサブタイプの183アミノ酸タンパク質プラス29アミノ酸プレ配列の配列を配列番号2に示す。成熟HBcAgは、位置30のMet残基からC末端の端のCys残基まで及び、プレ配列である位置1から29までの配列を有する。

【0024】

HBcAgの二量体がコア粒子の構造的なビルディングブロックを形成することから、当該タンパク質は、通常、HBcAgコピーを2つのみ含み、それにより二量体が形成される。HBcAgユニットは、通常、ヘッド・トゥ・トゥ(head-to-toe)様式で一緒に結合され、すなわち、1つのユニットのC末端が隣接ユニットのN末端と結合される。ユニットは、共有結合(例えば、ペプチド結合)により直接結合されてよいが、好ましくは、それらは、隣接ユニットの間にスペースを空けさせるリンカーにより結合され、それにより、隣接ユニットのパッキングの破壊に関連するいずれの問題も予防する。リンカーの性質は、以下に記載する。

40

【0025】

本発明のタンパク質において、HBcAgユニットの一方又は両方は、天然の全長HBcAgであってよい。しかし、ユニットの少なくとも一方は、e1ループに挿入されたsdAbフラグメントを有する、HBcAgの修飾型である。HBcAgユニットの両方が、e1ループに挿入されたsdAbフラグメントを有してよい。HBcAgユニットのうち一方のみが、e1ループに挿入されたsdA

50

bフラグメントを有する場合、他方のユニットは、天然のHBcAgであってよく、或いはe1ループに挿入された異種タンパク質を有してよい。可能性のある異種タンパク質の例を以下に記載する。

【0026】

一般的なルールとして、HBcAgのコンフォメーション及び粒子へと組み立てるその能力を妨害しないように、任意の修飾が選択される。かかる修飾は、コンフォメーションの維持に重要でないタンパク質の部位、例えば、e1ループ、C末端及び/又はN末端にて行われる。HBcAgのe1ループは、タンパク質の粒子形成能を破壊することなく、例えば1から120アミノ酸などの挿入に耐えることができる。

【0027】

HBcAg配列は、置換、挿入、欠失又は伸張によって修飾されてよい。挿入、欠失又は伸張のサイズは、例えば、1から200 aa、3から100 aa又は6から50 aaなどであってよい。置換は、HBcAg配列の長さによって、例えば、1、2、5、10、20又は50アミノ酸までの複数のアミノ酸に参与してよい。伸張はHBcAgのN又はC末端であってよい。欠失は、タンパク質のN末端、C末端又は内部の部位であってよい。置換は、タンパク質配列の任意の位置で行われてよい。挿入もまた、タンパク質配列の任意のポイントで行われてよいが、典型的には、e1ループなど、タンパク質の表面暴露領域において行われる。2以上の修飾が各HBcAgユニットに対して行われてよい。従って、末端伸張又は欠失と、内部挿入もまた行うことが可能である。例えば、切断 (truncation) がC末端で行われてよく、且つ挿入がe1ループで行われてよい。

【0028】

本発明のタンパク質において、HBcAg配列の各部分は、配列番号2に示す配列を有するタンパク質など、天然のHBcAgタンパク質の対応する配列と、好ましくは、少なくとも70%の配列同一性 (identity) を有する。より好ましくは、同一性は、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも98%、少なくとも97%又は少なくとも99%である。タンパク質相同性 (homology) を測定する方法は当分野で周知であり、当業者であれば、本文脈において、相同性はアミノ酸同一性 (「ハード・ホモロジー (hard homology)」と称されることもある) に基づいて計算されることを理解するだろう。

【0029】

例えば、UWCGCパッケージ (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12 : 387-395) は、相同性を計算するために使用され得るBESTFITプログラムを提供する (例えば、デフォルト設定で使用される)。例えば、Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36 : 290-300; Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215 : 403-10などに記載されるように、PILEUP及びBLASTアルゴリズムを用いて、相同性を計算又は配列を整列させることができる (典型的にはデフォルト設定で)。

【0030】

BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を介して公的に入手可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列させた場合に、あるポジティブに評価された閾値スコアTと合致するか、又はそれを満たす問合わせ配列中の長さWの短いワードを同定することによって、ハイスコアリングシーケンスペア (high scoring sequence pair) (HSPs) を最初に同定することを伴う。Tは、近傍ワードスコア閾値 (neighbourhood word score threshold) と称される (Altschul et al、上記)。これらの最初の近傍ワードヒットは、それらを含むHSPsを見出すために検索を開始するための種 (seeds) として働く。ワードヒットは、累積アライメントスコアが増加し得る限り、各配列に沿って両方向に延長される。各方向におけるワードヒットの延長は、以下の場合に停止される : 累積アライメントスコアがその最大限に達成された値から量Xだけ低下する場合 ; 1以上のネガティブのスコアリング残基アライメントの累積によって累積スコアが0以下になる場合 ; 又はいずれかの配列の末端に達する場合。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T及びXは、アライメントの感度及び速度を決定する。BLASTプログラムは、デフォルトとして、

10

20

30

40

50

ワード長 (W) 11、BLOSUM62スコアリングマトリクス (Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919を参照) アライメント (B) 50、期待値 (E) 10、M = 5、N = 4及び両鎖の比較を用いる。

【0031】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計学的分析を実施する；例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の尺度の一つは、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の一致が偶然によって生じる確率の指標となる最小合計確率 (smallest sum probability) (P(N)) である。例えば、第1の配列を第2の配列と比較して、最小合計確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満の場合、その配列はもう1つの配列と類似であると考えられる。

10

【0032】

HBcAgのe1ループは位置68から90であり、異種タンパク質、例えば、sdAbフラグメント又は異なる異種タンパク質は、これらの位置の間のいずれの場所に挿入されてよい。好ましくは、タンパク質は、位置69から90、71から90、又は75から85の領域内に挿入される。最も好ましいのは、アミノ酸残基79と80の間、又は残基80と81の間にタンパク質を挿入することである。異種タンパク質が挿入される場合、HBcAgの配列全体が維持されてよく、或いはまたe1ループ配列の全部又は一部が欠失され、異種配列に置き換えられてよい。従って、アミノ酸残基69から90、71から90、又は75から85は、異種タンパク質に置き換えられてよい。異種タンパク質がe1ループ配列を置き換える場合、該タンパク質は通常、それが置き換える配列よりも短くはない。

20

【0033】

HBcAgのC末端切断は通常、aa 144を超えないだろう。なぜなら、任意の更なる切断が行われる場合に、粒子を形成しないかもしれないからである。従って、欠失されるアミノ酸は、例えば、aa 144からC末端aa (aa 183又は185)、aa 150からC末端aa、aa 164からC末端aa、又はaa 172からC末端aaなどを含んでよい。HBcAgのC末端はDNAと結合することから、C末端の切断により、HBcAg及びHBcAgハイブリッドタンパク質の調製物からDNAが減じられるか又は完全に除去される。

【0034】

本発明のタンパク質は、天然のHBcAgによって形成される粒子と好ましくは類似する粒子を形成する。本発明の粒子は、典型的には、少なくとも直径10 nm、例えば、直径10から50 nm又は20から40 nmであるが、好ましくは、それらは直径約27 nm (天然HBcAg粒子のサイズである) である。それらは、複数のHBcAgユニット、例えば、150から300ユニットを含むが、通常、約180又は約240ユニット (天然HBcAg粒子のユニット数である) に固定される。本発明のタンパク質は二量体であるので、これは、粒子中のタンパク質単量体の数が75から150であってよいことを意味するが、通常、約90又は約120である。

30

【0035】

隣接するHBcAgユニット間及び/又はe1ループにおけるインサートの側面に位置するリンカーは、通常、少なくとも長さ1.5 nm (15 Å)、例えば1.5から10 nm、1.5から5 nm、又は1.5から3 nmのアミノ酸鎖である。それは、例えば、4から40 aa、又は10から30 aa、好ましくは15から21 aaを含んでよい。リンカーは通常フレキシブルである。リンカーにおけるアミノ酸は、例えば、グリシン、セリン及び/又はプロリンを含むか、又は完全にそれらから構成されてよい。例えば、リンカーは、配列Gly<sub>n</sub>Ser (G<sub>n</sub>S) (ここで、nは2から8である) の1回以上の反復を含んでよい。好ましいリンカーは、配列GlyGlyGlyGlySer (GGGS) の1回以上の反復を含む。或いは、リンカーは、1回以上のGlyPro (GP) ジペプチド反復を含んでよい。反復の数は、例えば、1から18、好ましくは3から12であってよい。GGGS反復の場合、5、6又は7回の反復の使用が、粒子の形成を可能にすることが発見されている。リンカーは、抗体のヒンジ領域に相当し得る；このヒンジ領域は、抗体の抗原結合ドメインとテイルドメイン間のフレキシブル・ジョイントを提供すると考えられる。

40

【0036】

50

### シングルドメイン抗体 (sdAb) フラグメント

本発明のタンパク質は、少なくとも1つのsdAbフラグメントを提示し、例えば、治療、ワクチン接種及び/又は診断方法などにおける複数の潜在的用途を有する。本発明のタンパク質は、HBcAgの一方又は両方のコピーのe1ループに挿入されるsdAbフラグメントを有する。本発明のタンパク質は、HBcAgの両方のコピーのe1ループに挿入されるsdAbフラグメントを有し得る。

#### 【0037】

sdAbフラグメントは、ラクダ科動物及び軟骨魚類の重鎖抗体に由来する。重鎖抗体の抗原結合部位は、ラクダ科 (Camelidae) ではVHHと、軟骨魚類ではVNARと称される1つのシングルドメインに限局する。これらの可変ドメインは、細菌、酵母又は他の宿主において、組換えシングルドメイン抗体として容易に発現され得る。sdAbフラグメントは、通常の抗体と同様に、高い標的特異性、及びその標的に対する高い親和性を有し得る。しかし、その小さなサイズの結果として、sdAbフラグメントは、はるかに大きな通常の抗体からは隠される又は遮蔽される (shielded)、標的上の稀なエピトープを認識できる。sdAbフラグメント及びそれらの適用は、Eyer and Hruska, 2012に詳細にレビューされる。

10

#### 【0038】

任意のsdAbフラグメントを本発明で使用し得る。sdAbフラグメントは、軽鎖を欠く免疫グロブリンの重鎖ポリペプチドの可変ドメインである。sdAbフラグメントは、ラクダ科又は軟骨魚類の重鎖抗体に由来してよい。

#### 【0039】

sdAbフラグメントは、特定の抗原に特異的であってよく、又は特定の抗原に対してもたらされてよい。sdAbフラグメント及び/又はそれが結合する抗原の選択は、当然ながら、本発明のタンパク質の目的とする用途によって決まるだろう。例えば、目的とする用途が治療である場合、sdAbフラグメントは治療用抗体であるだろう。本発明のタンパク質は、任意の疾患又は状態の治療に有用なsdAbフラグメントを含んでよい。

20

#### 【0040】

本発明のタンパク質がワクチンとしての使用を意図される場合、使用されるsdAbフラグメントは、ワクチン接種が希望される疾患によって決まるだろう。sdAbフラグメントは、例えば、病原生物由来の抗原、癌関連抗原又はアレルゲンと結合してよい。病原生物は、例えば、ウイルス、細菌又は原生動物であってよい。

30

#### 【0041】

sdAbフラグメントは、関心のある抗原と結合する能力を有するだろう。好ましくは、sdAbフラグメントは、関心のある抗原と特異的に結合するだろう。すなわち、sdAbフラグメントは、好ましくは、関心のある抗原と、それが別の分子と結合する場合よりも大きな結合親和性で結合するだろう。

#### 【0042】

用語「結合親和性」とは、標的と結合する又は標的と結合しない抗体フラグメントの傾向をいうことが意図される。結合親和性は、抗体フラグメント及びその標的についての解離定数 (Kd) を決定することにより定量化されてよい。同様に、抗体フラグメントとその標的との結合の特異性は、抗体フラグメントと別の非標的分子に関する解離定数と比較した場合の、その標的に対する抗体フラグメントの比較解離定数 (Kd) の点から定義されてよい。

40

#### 【0043】

典型的には、標的に関する抗体フラグメントについてのKdは、他の非標的分子 (例えば、環境中の非関連物質又は付随物質など) に関するKdよりも2倍、好ましくは5倍、より好ましくは10倍未満であるだろう。より好ましくは、Kdは50倍未満、さらにより好ましくは100倍未満、なおより好ましくは200倍未満であるだろう。この解離定数の値は、周知の方法により直接決定され得る。

#### 【0044】

タンデムコア構築物へとクローニングするためのsdAbフラグメントの配列は、当分野で

50

既知の任意の方法により決定又は設計されてよい。例えば、sdAbsは、ラクダ又はラマなどの免疫化動物から得られた血液、リンパ節又は脾臓のcDNAからの可変ドメインレパートリーをファージ又はリボソームディスプレイベクターへとPCRクローニングすることにより生成されてよい。抗原特異的sdAbsは、固定化抗原（例えば、試験チューブのプラスチック表面上にコーティングされた抗原、ストレプトアビジンビーズ上に固定化されたビオチン化抗原、又は細胞表面上に発現される膜タンパク質など）上にファージ又はリボソームライブラリーをパンニングすることにより選択されてよい。それはまた、相補性決定領域（CDRs）のカセット変異導入により半合成ライブラリーを構築することも可能にする。これは、有毒な又は発現が困難な抗原に対して抗体フラグメントを選択するという利点を提供する。さらに、所望の抗原に対するsdAbsの親和性は、CDRsの部位特異的変異誘発、及びストリンジェンシーを増加させた条件下（より高い温度、高い又は低い塩濃度、高い又は低いpH、及び低い抗原濃度）での、固定化抗原に対する更なるパンニングラウンドによって改善され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0045】

本発明のタンパク質が、ヒト対象に投与するためのものである場合、sdAbフラグメントは、好ましくはヒト化される。sdAbフラグメントをヒト化するための方法は、当分野で既知である。

#### 【0046】

全長sdAbフラグメントが、HBcAgのe1ループに挿入されてよい。sdAbフラグメントは、天然に生じるsdAbフラグメントの配列を有してよく、或いは天然に生じるsdAbフラグメント配列のパリアントであってよい。

#### 【0047】

sdAbフラグメントの配列は、図10に示す配列と相同性を有してよく、例えば、配列全体にわたって、又は少なくとも20、好ましくは少なくとも30、例えば少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、又は少なくとも80若しくはそれ以上の連続アミノ酸にわたって、少なくとも60%の同一性、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%又は少なくとも99%の同一性などであってよい。タンパク質相同性を測定する方法は当分野で周知であり、HBVコアタンパク質に関連して上述する。

#### 【0048】

本発明のタンパク質に挿入されるべきsdAbフラグメントは、VLP形成を妨害しない任意の適切なサイズのものであってよく、例えば、5から20 kDaなどである。sdAbsは、典型的には、12から15 kDaの範囲の分子量を有する。

#### 【0049】

本発明のタンパク質は、例えば、HBcAgの各コピーに1つのsdAbフラグメントを含むことなどにより、2つのsdAbフラグメントを含んでよい。これは、1つ以上の抗原に対する本発明のタンパク質の親和性を改善し得る。2つのsdAbフラグメントは、同一又は異なってよい。2つのsdAbフラグメントが異なる場合、それらは同一又は異なる抗原と結合してよい。

#### 【0050】

#### 他の異種タンパク質又はエピトープ

タンデムコアシステムの柔軟性とは、本発明のタンパク質が、sdAbフラグメントを含むことに加えて、1つ以上の更なる異種タンパク質又はエピトープを含んでよいことを意味する。1つ以上の異種タンパク質又はエピトープは、HBcAgの第一又は第二のコピー中であってよい。好ましくは、1つ以上の異種タンパク質又はエピトープは、sdAbフラグメントを含まないHBcAgコピー中にある。

#### 【0051】

例えば、本発明のタンパク質は、1つ以上の異種エピトープに対する免疫応答を誘導するために、1つ以上の異種エピトープを含んでよい。従って、対象において抗原に対する免疫応答の誘導に使用するための、sdAbフラグメントが抗原と結合される本発明のタンパク質を含むワクチンを創出することが可能であるだろう。さらに、タンパク質は、やはり

免疫応答を誘導し得る1つ以上の異種エピトープを含み得る。異種エピトープは、sdAbフラグメントと結合されるものと同一又は異なる抗原と関連してよい。

【0052】

別例として、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質を可視化する手段として作用する異種タンパク質を含んでよい。これは、診断方法で有用であり得る。かかる異種タンパク質の例は、蛍光又は生物発光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）などである。

【0053】

従って、本発明のタンパク質は、HBcAgの少なくとも一方のコピーのe1ループにsdAbフラグメントが挿入されなければならないが、タンパク質におけるHBcAgの他方のコピーのe1ループは、任意の他のタイプの異種タンパク質又はエピトープを含んでよい。

10

【0054】

「異種」タンパク質又はエピトープは、HBcAgにおいて位置する場所に通常位置しないタンパク質又はエピトープである；それは通常、HBcAg以外のタンパク質に由来するが、HBcAgにおける異なる場所由来のものであってもよい。例えば、それはHBV表面抗原（sAg）であってよい。本発明のタンパク質が異種エピトープを含む場合、それは免疫応答を生じさせるアミノ酸配列を含む。エピトープは、立体構造（conformational）又は直鎖状であってよい。それは、例えば、6から120 aa、6から50 aa、又は6から20 aaの配列などにあってよい。本発明の大きな利点は、e1ループへと挿入される大きな配列上、例えば、30から120 aa、40から120 aa、又は60から120 aaの配列上でエピトープが運ばれることを可能

20

【0055】

インサートとして使用されるべき異種タンパク質又はエピトープは、VLP形成を妨害しない任意の適切なサイズのものであってよい。それは好ましくは、40 kDa未満、20 kDa未満、15kDa未満、10 kDa未満、又は5 kDa未満である。

【0056】

本発明のタンパク質は、2以上の異種タンパク質又はエピトープ、例えば、最大で2、3、5又は8個の異種タンパク質又はエピトープなどを含有してよい。タンパク質又はエピトープの2以上のコピーがHBcAgユニット中に挿入されてよい；例えば、2から8コピーが挿入されてよい。本発明のタンパク質中に2以上の異種タンパク質又はエピトープが存在する

30

【0057】

エピトープは、T細胞又はB細胞エピトープであってよい。それがT細胞エピトープである場合、それは、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）エピトープ又はTヘルパー（Th）細胞エピトープ（例えば、Th1又はTh2エピトープ）であってよい。本発明の好ましい実施態様において、エピトープのうち1つはTヘルパー細胞エピトープであり、もう1つはB細胞又はCTLエピトープである。Tヘルパー細胞エピトープの存在により、B細胞又はCTLエピトープに対する免疫応答が高められる。

【0058】

エピトープの選択は、ワクチン接種が希望される疾患によって決まる。エピトープは、

40

【0059】

本発明のタンパク質の作製

本発明のタンパク質は、通常、組換えDNA技術により作製される。本発明は、本発明のタンパク質をコードする核酸分子（例えば、DNA又はRNA）（例えば、発現ベクターなど）を含む。核酸分子は、核酸を操作するための既知の技術を用いて作製されてよい（或いは、単純に購入されてよい）。典型的には、2つのHBcAgユニットをコードする2つの別個のDNA構築物を作製し、次いで、オーバーラップPCR（overlapping PCR）により一緒に結合する。

50

## 【0060】

本発明のタンパク質は、該タンパク質が発現される条件下、該タンパク質をコードする核酸分子 (nucleic molecule) を含有する宿主細胞を培養し、該タンパク質を回収することによって製造されてよい。適切な宿主細胞には、大腸菌 (E. coli) などの細菌、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) などの酵母、哺乳動物細胞及びその他の真核細胞、例えば、昆虫のSf9細胞などが含まれる。核酸分子は、ベンサミアナタバコ (N. benthamiana) などの植物において発現され得る。

## 【0061】

本発明に従う核酸分子を構成するベクターは、例えば、プラスミド又はウイルスベクターなどであってよい。それらは、複製起点、タンパク質をコードする配列の発現のためのプロモーター、エンハンサーなどのプロモーターの調節因子、転写停止 (transcription stop) シグナル、翻訳開始シグナル及び/又は翻訳停止シグナルを含有してよい。ベクターはまた、1以上の選択可能マーカー遺伝子、例えば、細菌性プラスミドの場合にはアンピシリン耐性遺伝子、又は哺乳動物ベクターの場合にはネオマイシン耐性遺伝子などを含有してもよい。ベクターは、in vitroで、例えばRNAの作製のために使用されてよく、或いは宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために使用されてよい。ベクターはまた、例えば、遺伝子治療又はDNAワクチン接種の方法などにおいて、in vivoで使用するために適合されてもよい。

## 【0062】

プロモーター、エンハンサー及び他の発現制御シグナルは、発現ベクターが設計された宿主細胞と適合するように選択されてよい。例えば、原核生物プロモーター、特に、E. coli株 (例えば、E. coli HB101) での使用に適したものが使用されてよい。嫌気的条件など、周辺環境の変化に応じてその活性が誘導されるプロモーターが使用されてよい。好ましくは、htrA又はnirBプロモーターが使用されてよい。これらのプロモーターは特に、例えばワクチンとして使用するために、弱毒化細菌においてタンパク質を発現させるために使用されてよい。本発明のタンパク質の発現が、哺乳動物細胞においてin vitro又はin vivoのいずれかで実施される場合、哺乳動物プロモーターが使用されてよい。組織特異的プロモーター、例えば、肝細胞特異的プロモーターなどが使用されてもよい。ウイルスプロモーター、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルスの長い末端反復配列 (MMLV LTR)、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTRプロモーター、SV40プロモーター、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) IEプロモーター、単純ヘルペスウイルスプロモーター、及びアデノウイルスプロモーターなどが使用されてもよい。これらのプロモーターはすべて、当分野で容易に入手可能である。

## 【0063】

本発明に従うタンパク質は、タンパク質を精製するための従来技術を用いて精製されてよい。タンパク質は、例えば、精製された、純粋な、又は単離された形態で提供されてよい。ワクチンで使用するために、タンパク質は通常、高レベルの純度で、例えば、調製物においてタンパク質の80%超、90%超、95%超、又は98%超を占めるレベルで提供されなければならない。しかしながら、最終的なワクチン製剤においては、該タンパク質を他のタンパク質と混合することが望ましい場合がある。

## 【0064】

治療における、又は疾患に対するワクチン接種における使用

本発明のタンパク質は、治療において又はワクチンとして使用されてよい。本発明は、本発明のタンパク質、本発明のタンパク質の複数のコピーを含む粒子又は本発明のタンパク質をコードする核酸分子と、医薬上許容される担体又は希釈剤とを含む、医薬組成物又はワクチン組成物を含む。本発明のタンパク質が治療用sdAbフラグメントを含む場合、組成物は、治療によるヒト又は動物の体の治療のために使用され得る。本発明のタンパク質が、対象において免疫応答を誘導することができる抗原と結合するsdAbフラグメントを含む場合、組成物はワクチンとして使用され得る。ワクチン組成物は、好ましくは、sdAbフラグメントと結合する抗原を含む。

10

20

30

40

50

## 【0065】

ワクチン接種の背後にある原理は、宿主において免疫学的記憶を生じさせるために、宿主において免疫応答を誘導することである。これは、宿主が悪性病原体に暴露される際に、効果的な（防御）免疫応答、すなわち、病原体を不活性化及び/又は死滅させる免疫応答を備えることを意味する。本発明は、関心のある任意の抗原（病原体、癌関連抗原又はアレルゲンなど）に対するワクチンの基礎を形成する。本発明のタンパク質におけるsdAbフラグメント及び任意の他の異種タンパク質又はエピトープは、ワクチンにより防御を提供することが意図される疾患又は状態に対して適切であるように選択される。

## 【0066】

本発明は、対象において免疫応答を誘導する方法であって、本発明のタンパク質、粒子又は核酸を対象に投与することを含む、方法を提供する。好ましくは、sdAbフラグメントと結合する抗原は、本発明のタンパク質が投与される際に、sdAbフラグメントと結合される。従って、本発明のタンパク質をワクチンとして投与するために、本発明のsdAbフラグメントを提示するタンパク質は、対象に投与される前に、関心のある抗原と結合されてよい。sdAbフラグメントは、高親和性で抗原と結合する。しかしながら、例えば、改変ジスルフィド結合などの化学的コンジュゲーションを用いるなどして、sdAbフラグメントを抗原とさらにつなげる（tether）ことも可能であるだろう。

10

## 【0067】

本発明はまた、ヒト又は動物対象における疾患又は状態を治療又は予防する方法であって、本発明のタンパク質、粒子又は核酸を対象に投与することを含む、方法を提供する。

20

## 【0068】

用語「個体」及び「対象」は、本明細書において交換可能に使用されて、脊索動物亜門（subphylum chordata）の任意の一員をいい、これには、ヒト及び他の霊長類（チンパンジー及び他の類人猿並びにサル種などの非ヒト霊長類を含む）；家畜、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ及びウマ；飼育哺乳動物、例えば、イヌ及びネコ；齧歯類（例えば、マウス、ラット及びモルモット）及びブタを含む実験動物；飼育鳥、野鳥及び狩猟鳥（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ及び他のキジ類の鳥類（gallinaceous birds）、カモ（ducks）、ガン（geese）など）を含む鳥類、が含まれるが、これらに限定されない。該用語は、特定の年齢を意味しない。従って、成人個体及び新生児個体の両方をカバーすることが意図される。本明細書に記載の方法は、これらの脊椎動物全ての免疫系が同様に機能することから、上記脊椎動物種のいずれにおける使用も意図される。

30

## 【0069】

いくつかの例において、本発明は、任意の適切な対象、特に、所与の種の任意の適切な対象、好ましくは適切なヒト対象に投与されてよい。従って、できるだけ多くの対象が、例えば、対象のいずれかが特定のグループに重点を置くことなく、投与対象となってよい。例えば、対象集団は全体として又はできるだけ多くが投与対象となってよい。

## 【0070】

本発明のタンパク質、粒子又は核酸は、対象への投与のためのものである。それは、アジュバントと同時に又は連続的に投与されてよい。従って、タンパク質、粒子又は核酸を含む本発明の組成物はまた、アジュバントを含んでもよい。本発明の組成物は、注射（例えば、皮内、皮下、筋肉内、静脈内、骨内及び腹腔内）、経皮粒子デリバリー、吸入、局所的、経口的、又は経粘膜的（例えば、鼻、舌下、膣又は直腸）によりデリバリーされるべきものであってよい。

40

## 【0071】

組成物は、通常の医薬調製物として製剤化されてよい。これは、当業者に利用可能である標準的な医薬製剤化学及び方法論を用いて実施され得る。例えば、タンパク質、粒子又は核酸をアジュバントとともに又はアジュバントを含めずに含有する組成物は、1以上の医薬上許容される賦形剤又はビヒクルと組み合わせられて、液体調製物を提供することができる。従って、タンパク質、粒子又は核酸を、医薬上許容される担体又は希釈剤とともに含む医薬組成物も提供する。組成物は、任意選択で、アジュバントを含む。

50

## 【0072】

補助物質、例えば、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝物質などが存在してよい。これらの担体、希釈剤及び補助物質は、通常、過度の毒性を伴わずに投与され得る製薬用薬剤であり、抗原性組成物の場合には、それ自体では、該組成物を受ける個体において免疫応答を誘導しないであろう製薬用薬剤である。医薬上許容される担体には、液体、例えば、水、生理食塩水 (saline)、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、グリセロール及びエタノールなどが含まれるが、これらに限定されない。医薬上許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの鉱酸塩；及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸塩をその中に含めることもできる。また、該調製物は、必要というわけではないが、特にペプチド、タンパク質又はその他同様の分子が組成物中に含まれるべき場合には、それらに対する安定剤として働く医薬上許容される担体を含有するであろうことが好ましい。ペプチドに対する安定剤としても働く適切な担体の例としては、医薬品グレードのデキストロース、スクロース、ラクトース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストランなどが挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な担体には、デンプン、セルロース、リン酸ナトリウム又はカルシウム、クエン酸、酒石酸、グリシン、高分子量ポリエチレングリコール (PEGs)、及びそれらの組み合わせが含まれるが、この場合もこれらに限定されない。医薬上許容される賦形剤、ビヒクル及び補助物質の十分な考察は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991) (参照により本明細書に組み込まれる) において利用可能である。

10

## 【0073】

核酸取込み及び/又は発現の特定の促進物質 (facilitators) (「トランスフェクション促進剤」) も組成物中に含めることができ、それは、例えば、プピバカイン、カルジオトキシン及びスクロースなどの促進物質、並びに核酸分子をデリバリーするためにルーチンに使用されるリポソーム調製物又は脂質調製物などのトランスフェクション促進性ビヒクルなどである。アニオン性及び中性のリポソームが広く利用可能であり、核酸分子のデリバリーに関して周知である (例えば、Liposomes: A Practical Approach, (1990) RPC New Ed., IRL Pressを参照)。カチオン性脂質調製物も、核酸分子のデリバリーに使用するための周知ビヒクルである。適切な脂質調製物には、商品名Lipofectin<sup>TM</sup>で入手可能なDOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)、及びDOTAP (1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン) が含まれる (例えば、Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7416; Malone et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6081; 米国特許第5,283,185号及び同第5,527,928号、並びに国際公開番号WO 90/11092、WO 91/15501及びWO 95/26356を参照)。これらのカチオン性脂質は、好ましくは、中性脂質、例えば、DOPE (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン) などと関連して使用されてよい。前記脂質又はリポソーム調製物に加えることができる、なお更なるトランスフェクション促進性組成物には、スペルミン誘導體 (例えば、国際公開番号WO 93/18759を参照) 及び膜透過性化合物、例えば、GALA、グラミシジンS及びカチオン性胆汁酸塩 (例えば、国際公開番号WO 93/19768を参照) が含まれる。

20

30

## 【0074】

或いは、タンパク質、粒子若しくは核酸、及び/又はアジュバントは、粒子状担体にカプセル化され、吸着され又は会合 (associated) されてよい。適切な粒子状担体には、ポリメチルメタクリレートポリマーから誘導されたもの、並びにポリ(ラクチド)及びポリ(ラクチド-コ-グリコリド)から誘導されたPLG微粒子が含まれる。例えば、Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10: 362-368を参照。他の粒子系及びポリマー、例えば、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジンなどのポリマー、及びこれらの分子のコンジュゲートなども使用され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド縮合剤及び金属イオンキレート剤の存在下で担体上に沈殿させることができる。好ましい縮合剤には、カチオン性ポリマー、特にポリアミン、及び特にポリアルギン (polyarginine) 又はポリリシンが含まれる。好ましい例において、ポリアミンは、(Ar

40

50

g) 4又は(Arg) 6である。WO2004/208560で論じられる技術が言及されてよく、これが実施されてよい。

【0075】

組成物は、製剤化されると、種々の既知の経路及び技術を用いてin vivoで対象にデリバリーされ得る。例えば、液体調製物は、注射用溶液、懸濁液又はエマルジョンとして提供され得、通常のニードル及びシリンジを用いて、又は液体ジェット式注射システムを用いて、非経口注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、静脈内注射、骨内注射及び腹腔内注射を介して投与され得る。液体調製物はまた、皮膚若しくは粘膜組織（例えば、鼻、舌下、膣又は直腸）に局所的に投与され得るか、又は呼吸器投与若しくは肺内投与に適した微細に分割されたスプレーとして提供され得る。他の投与様式には、経口投与、坐剤、及び能動的又は受動的な経皮デリバリー技術が含まれる。

10

【0076】

本発明のタンパク質、粒子又は核酸は、疾患若しくは状態を治療するのに、又は免疫応答を調節するのに有効な量で対象に投与される。適切な有効量は比較的広範囲であるが、ルーチンな試験によって当業者により容易に決定され得る。「Physicians Desk Reference」及び「Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics」は、必要量を決定する目的のために有用である。典型的には、タンパク質又は粒子は、0.1から200 mg、好ましくは1から100 mg、より好ましくは10から50 mg 体重の用量で投与される。本発明の核酸は、当分野で既知の技術を用いて、又は当分野で既知のベクターを用いて、裸(naked)の核酸構築物として直接投与されてよい。投与される核酸の量は、典型的には、1 µgから10 mgの範囲、好ましくは100 µgから1 mgの範囲である。組成物は、単回用量スケジュール又は複数回用量スケジュール、例えば、2から32の用量、又は4から16の用量で与えられてよい。上記で示す投与経路及び用量は参考とすることのみを意図しており、経路及び用量は、最終的には医師の裁量に委ねられてよい。

20

【0077】

いくつかの場合、本発明の組成物の初回投与後に、それに続く投与が実施されてよい。特に、初回投与後、対象は、「ブースター」を与えられてよい。ブースターは、例えば、本明細書で言及したもののいずれかから選択される用量であってよい。ブースター投与は、例えば、初回投与から少なくとも1週間後、2週間後、4週間後、6週間後、1ヶ月後、2ヶ月後又は6ヶ月後であってよい。

30

【0078】

本発明のタンパク質、粒子又は核酸、及びアジュバントは、連続的に又は同時に、好ましくは同時に投与されてよい。2つのエンティティ(entities)は、同一又は異なる組成物中で、好ましくは同一組成物中で投与されてよい。アジュバントは、アジュバント作用が見られるように、すなわち、観察される治療効果又は免疫応答が、アジュバントが抗原とともに投与されない場合に観察されるものと異なるように、デリバリーされる。2つのエンティティは、同一又は異なる部位で、好ましくは同一部位で投与されてよい。好ましくは、2つのエンティティは、同一組成物中、同一部位で、同時に、好ましくは注射を介して、投与される。

【0079】

任意の適切なアジュバントが使用されてよい。現在使用されるワクチンアジュバントには、以下が含まれる：

40

- アルミニウム塩（例えば、水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウム）又はリン酸カルシウムなどの無機化合物。アルミニウム塩は、別名アラムとしても知られる。
- オイルエマルジョン及び界面活性剤ベースの製剤、例えば、MF59（マイクロ流動化洗剤安定化水中油滴型エマルジョン）、QS21（精製サポニン）、AS02 [SBAS2]（水中油滴型エマルジョン + MPL + QS-21）、Montanide ISA-51及びISA-720（安定化油中水滴型エマルジョン）など。
- 粒子状アジュバント、例えば、ピロソーム（例えばインフルエンザヘマグルチニンなどを組み込んだ単層リポソームビヒクル）、AS04（MPLを有する[SBAS4] Al塩）、ISCOMS

50

(サポニン及び脂質の構造形成複合体 (structured complex) )、及びポリラクチドコグリコリド (polylactide co-glycolide (PLG) ) など。

- 微生物誘導體 (天然及び合成)、例えば、モノホスホリルリピドA (MPL)、Detox (MPL + M. フレイ (M. Phlei) 細胞壁骨格)、AGP[RC-529] (合成アシル化単糖類)、DC\_Chol (リポソームに自己組織化できるリポイド免疫賦活剤)、OM-174 (リピドA誘導體)、CpGモチーフ (免疫賦活性CpGモチーフを含有する合成オリゴヌクレオチド)、並びに改変LT及びCT (非毒性のアジュバント作用を提供するために遺伝的に改変された細菌性毒素) など。
- 内因性ヒト免疫調節物質、例えば、hGM-CSF又はhIL-12 (タンパク質又はコード化プラスミドのいずれかとして投与され得るサイトカイン)、及びImmudaptin (C3dタンデムアレイ) など。
- 不活性ビヒクル、例えば、金粒子など。

10

#### 【0080】

好ましくは、使用されるアジュバントはアラムである。最も好ましくは、アジュバントは、水酸化アルミニウムと水酸化マグネシウムの混合物、例えば、Inject alum (Pierce Laboratories) である。

#### 【0081】

#### 診断ツール

本発明のタンパク質は、診断試薬として、例えば、疾患、病原体又は毒素を検出するのに有用であってよい。従って、本発明は、例えばサンプルにおいて、抗原を検出するための、本発明のタンパク質の、又は本発明のタンパク質の複数のコピーを含む粒子の、使用を提供する。本発明はまた、サンプル中の抗原を検出する方法であって、本発明のタンパク質を、又は本発明のタンパク質の複数のコピーを含む粒子を、サンプルに適用することを含む、方法も提供する。

20

#### 【0082】

上述のように、当該技術の柔軟性とは、本発明のタンパク質が、sdAbフラグメントを含むことに加えて、任意の他の有用な異種タンパク質を含み得ることを意味する。従って、本発明のタンパク質が、診断ツールとして使用するためのものである場合、それは、異種タンパク質、例えば、本発明のタンパク質を可視化する手段を提供する異種タンパク質などを含んでよい。これは、例えば、本発明のタンパク質の位置を *in vivo* で追跡するため、又はサンプルが本発明のタンパク質を含有するかどうかを決定するためなどに有用であり得る。かかる異種タンパク質の例として、蛍光又は生物発光タンパク質 (GFPなど) が挙げられる。

30

#### 【0083】

本発明を以下の実施例により説明する：

#### 【実施例】

#### 【0084】

#### 実施例

タンデムHBcAgタンパク質ディスプレイ技術を、HBcAgコア様粒子の表面上にラクダ科動物 (Camelid) シングルドメイン抗体フラグメント (VHH) を提示するよう適合させた。抗GFP「エンハンサー」VHHは、免疫化アルパカ由来VHHファージディスプレイライブラリーから単離され、Kirchhofer et al (2010) により十分に特徴付けられた (GFPに対するその親和性がサブナノモル範囲であることが決定された)。このVHHをコードする遺伝子をタンデムコア構築物のC末端単量体にクローニングした。この構築物をtHB-VHHと名付け、ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) にて一過性に発現させ、表面上にVHHをディスプレイするコア様粒子 (CLPs) の生産を導いた (図4)。

40

#### 【0085】

粒子は、新鮮重量組織 (fresh weight tissue) 1キログラムあたり数百ミリグラムの範囲で生成されると推定され、粒子は、ショ糖勾配下部へとGFPを移動させることが示され、それは、そのままでは又はVHHを有さないtHB粒子の存在下では十分に高密度でないこと

50

から通常はそうならない(図5)。これは明らかに、tHB-VHH粒子がGFPと結合することを示しており、従って、VHHが、CLPsの表面上で適切にフォールディングされ、活性であることを示す。シヨ糖クッションフラクションのウェスタンブロット分析により、GFPをそのままではtHBとともに流した場合にはその大部分が上清中に残るが、tHB-VHHとともに流した場合には、GFP及びCLPsがクッション下部に共局在化することが確認された(図6)。

#### 【0086】

注目すべきは、より一般に使用される一本鎖可変フラグメント抗体(scFv)を用いて、植物におけるタンデムコアの表面上での抗体ディスプレイも試みられたが、発現量は非常に低く、いずれの粒子形成も観察されなかった(データ示さず)。これはおそらく、VHHが重鎖可変領域に対応するシングルドメインしか有さないのに対して、軽鎖及び重鎖可変領域に対応する2つのドメインを有するというscFvのより複雑な構造に起因する。scFvのこのより一層の複雑さによっておそらく、両方のN及びC末端がHBcAgのe1ループと結合される場合に、インサートの適切なフォールディングが妨げられ、タンデム分子全体の不適切なフォールディングが導かれた。

#### 【0087】

興味深いことにはまた、VHHは、植物において、単量体(すなわち、非タンデム)HBcAg粒子の表面上ではディスプレイされ得ず：組換えタンパク質を検出できず(図7)、これはおそらくフォールディングの問題又は立体障害の問題により、タンパク質の即時の分解が引き起こされたことを示す。

#### 【0088】

方法

抗GFP VHHのアミノ酸配列をGenBankタンパク質データベース(アクセッション3K1K\_C)から得て、ベンサミアナタバコ(*N. benthamiana*)での発現のために最適化されたコドン使用頻度を用いて、GeneArt(Life Technologies)により遺伝子を合成した。次いで、VH遺伝子を、VHH配列の各末端上の(GlyGlyGlyGlySer)<sub>3</sub>リンカーとともに、タンデムコア構築物のC末端単量体のe1ループへとインフレーム(in-frame)でクローニングした。VHH遺伝子を含有するタンデムコア構築物をtHBcAg-VHHと称す。

#### 【0089】

tHBcAg-VHH構築物を、pEAQ-HTベクター(Sainsbury, Thuenemann et al. 2009)を用いて、3週齢のベンサミアナタバコ(*N. benthamiana*)植物で発現させた(その使用は、Peyret and Lomonosoff(2013)でレビューされている)。インフィルトレーション後7日後(7 dpi)、インフィルトレーションされた葉組織を採取し、cOmplete EDTA-フリー・プロテアーゼインヒビターカクテル錠(Roche)を補充した、3倍量の0.1 Mリン酸ナトリウムバッファー(pH 7)と混合した。粗抽出物をMiracloth(Calbiochem)にて濾過し、濾液を9,000 g、4、10分間遠心分離することにより清澄化した。次いで、UltraClear 14X 89 mm 超遠心用チューブ(ultracentrifuge tubes)(Beckman Coulter)中、清澄化した抽出物の下側に2 ml 25%、次いで0.5 ml 70%のシヨ糖溶液とし(underlain)、TH641超遠心スイングアウトローター(Sorvall)にて、273,800 g、4、2時間30分間遠心分離した(結果を図5に示す)。

#### 【0090】

ウェスタンブロットティング(図6)のために、シヨ糖勾配を下部から4つのフラクションへと分画した(シヨ糖クッションの下部0.5 µl、中間部0.5 µl及び上部1.5 µl、並びに粗抽出物上清)。2連の4~12%グラジエントNuPage(Life Technologies)SDS-PAGEゲルに、各フラクションについて5 µlの変性サンプル(1.25 µlの各フラクションを、1:3のLDS:β-メルカプトエタノール(3.75 µl)中、25分間沸騰させた)をロードした。タンパク質をAmersham Hybond-ECLニトロセルロースメンブレン(GE Healthcare)に転写し、抗HBcAgモノクローナル一次抗体(クローン10E11, Abcam)をヤギ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体(Invitrogen)とともに用いるか;又は抗GFP西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体(Life Technologies)を用いるかのいずれかによりブロッ

ティングした。化学発光シグナルをAmersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) で検出した。

【0091】

電子顕微鏡法(図4)のために、粒子を連続的シヨ糖クッションに対して精製し、その後、重炭酸アンモニウムに対して透析し、Speed Vac (Savant) で濃縮した。次いで、濃縮した粒子を、Tecnai 20電子顕微鏡(FEI)にて、400メッシュの銅/パラジウムグリッド上、酢酸ウラニルで染色することにより画像化した。

【0092】

HB-VHH発現についての試験は、エンブティベクター-pEAQ-HTコントロール、tHB-VHH、又は単量体HB-VHH(3つの異なるアグロバクテリウム(Agrobacterium)クローンのうちの1つに由来)のいずれかを発現する6 dpiの植物に対して実施した。葉を採取し、コルク穿孔器で葉のインフィルトレーション領域から6つの葉片(90 mg)を切り出し、これらに270 µlの抽出バッファー及びセラミックビーズを追加した。Omni Bead Ruptor 24ホモジナイザー(Camlab)にて、スピード4で30秒間、葉片を破碎した。次いで、サンプルを16,000 gで10分間遠心分離し、100 µlの上清を、3:1のLDS:β-メルカプトエタノール(50 µl)と混合し、次いで30分間沸騰させ、各変性サンプル(20 µl)をゲル上に流した。抗HBcAg抗体を用いて、上記のようにウェスタンブロットを実施した(図7)。

10

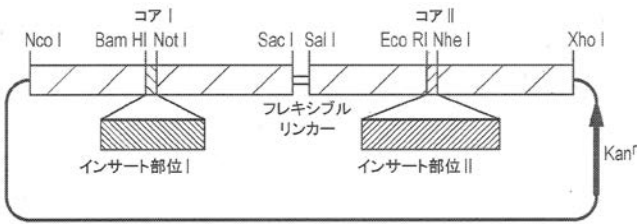
【0093】

参考文献

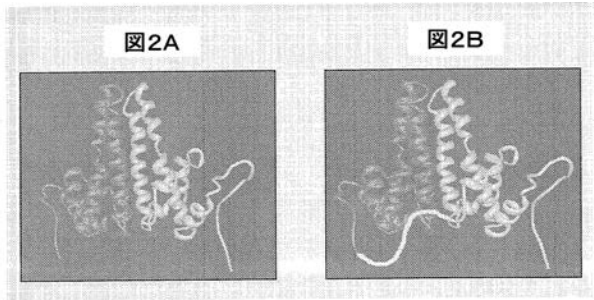
- Eyer, L. and K. Hruska (2012). "Single-domain antibody fragments derived from heavy-chain antibodies: a review". Vet. Medicina 57(9):439-513.
- Kirchhofer, A., J. Helma, et al. (2010). "Modulation of protein properties in living cells using nanobodies." Nat Struct Mol Biol 17(1): 6.
- Peyret, H. and G. Lomonossoff (2013). "The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants." Plant Molecular Biology: 1-8.
- Sainsbury, F., E. C. Thuenemann, et al. (2009). "pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants." Plant Biotechnology Journal 7(7): 682-693.

20

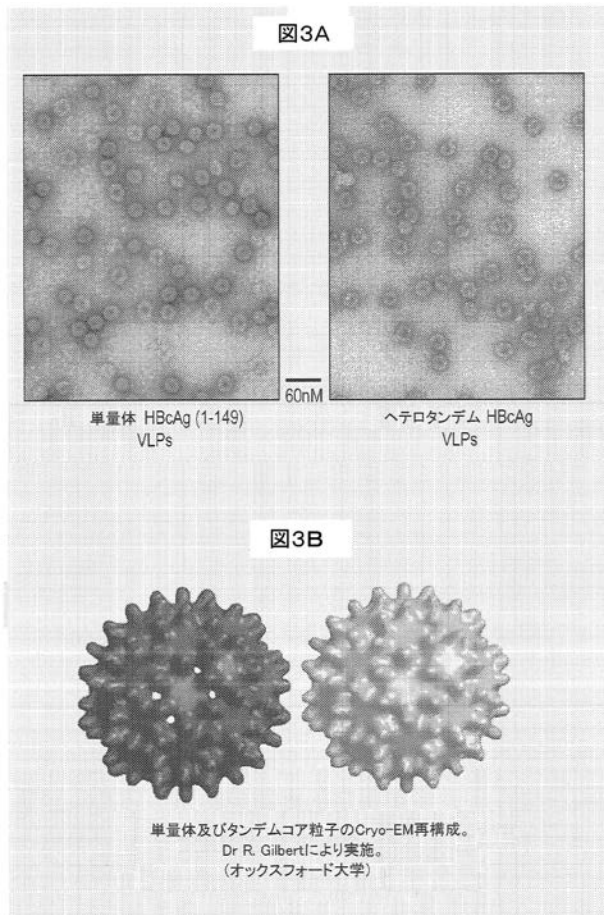
【 図 1 】



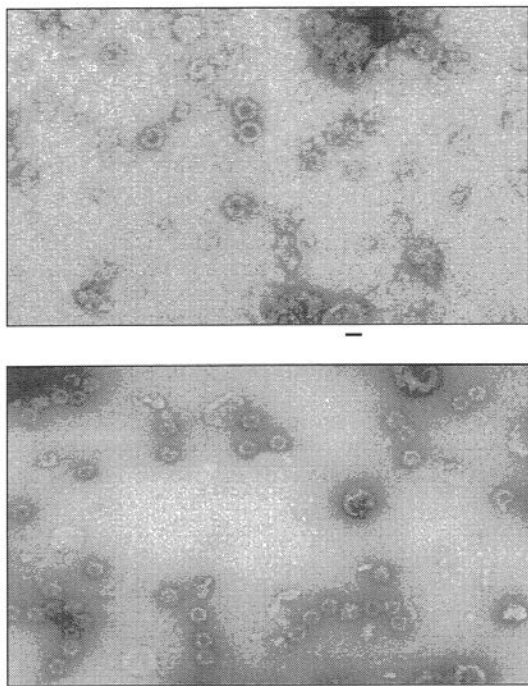
【 図 2 】



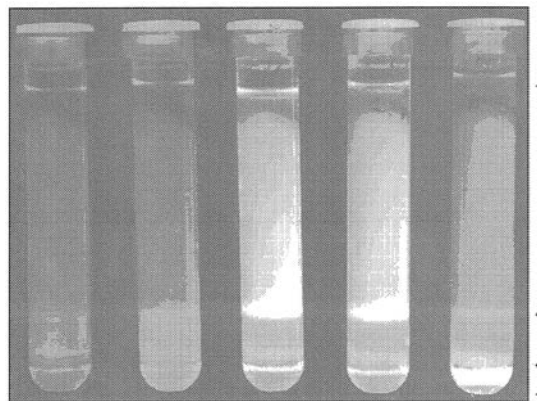
【 図 3 】



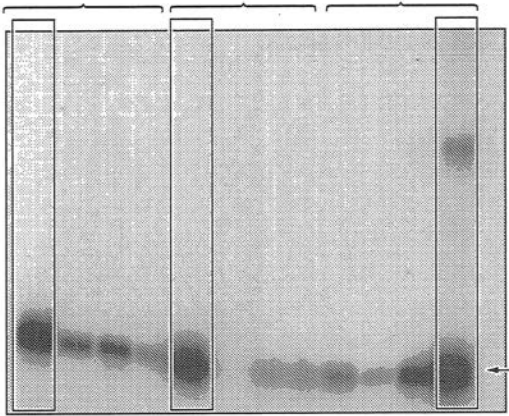
【 図 4 】



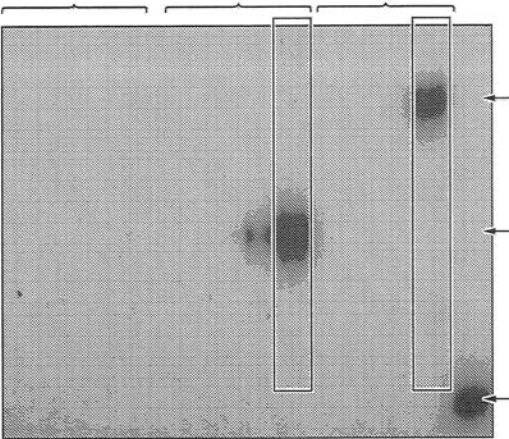
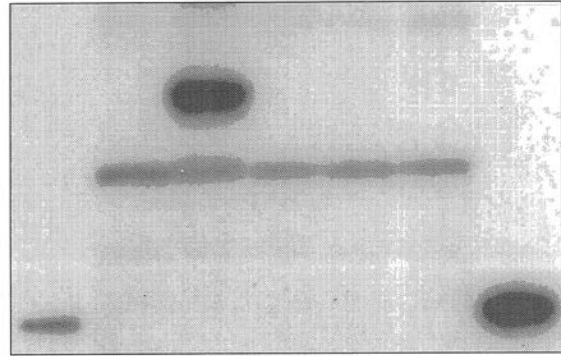
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

atggacattgatccgtacaaagaatttggcgcgaccgtcgagctgctgagcttctgccgag  
 cgatttttccaagcgtgctgacactgctggacaccgogagcgcactgtatcgtgaagcac  
 tggaaagcccagagcactgtagcccgaccacaccgocctgcgccaggcgattctgtgctgg  
 ggtgaactgatgacctggccacctgggtgggtataatctggaaccggggctggtggaag  
 tctggtcaattggaccggcgagccgtgatctggtcgtcaactatgtaataccaacatgg  
 gtctgaaaattcgtcagctgctggttcatattagctgctgacctcggtcgtgaaacc  
 gtgctggagtatcgtgagctcgggtggtggtatcgcaccccgcagcgtatcgtccgcc  
 gaacgcgcaattctgagcacgctgcccggagaccaccgtggtggtggaagtctggtggtg  
 gtggaaggaagtggtggttctggtggaagcgggtgtagtgggtggactggtacaatggatc  
 gaccataataagaatttggcgcgacggtgagctgctgagcttctgccaaagcatttctt  
 tccgagcgtccgcgacctgctggataccgcagcgcactgtatcgtgaaaccctggagacc  
 cggaacatgcagcccgcatacagccctgctcaggaacatcctgtgctgggccaactg  
 atgaccctggcaaccctgggtcggcaataatctggtcgacgctggtggtggaagcggagggtg  
 tggttctggtggtggttcaatggctcaagttagctggtgagagcgggtggtgctctg  
 tcaacctggtggatctcttagcttagctgctgcttctggttccctggaacaggtac  
 tctatgaggtggtatagacaggtcctggtaaagaaagggaatgggtggcaggtatgagcag  
 cgctggtgatagatctagctacgaggttctgtgaaggaaggtcaccatcagcaggggat  
 atgctaggaacaccgtgacctgcagatgaactctctgaagcctgaggataccgctgtgtac  
 tactgcaatgtgaacgtgggttctgagtagtgggtcaggtactcaggttaccgttcttc  
 aggtggtggtggtgtagtgggtggtggtcaggtggtggtggtatctataatgaccacgcaa  
 ccgctgtagtgggtggttaattacgtgaacaccaacatggcctgaaatccgcaactgctg  
 tggttcatatcagctgctgacgttggccgcgagacggtgctggaatacctggttagctt  
 tggcgtttggattcgtacgccaccgctaccgccaccaaacgcaccgattctgagcaagc  
 tgccgaaacagcgttgttctgctcggctgatcgcggcgtagcccgcgccctgacgcc  
 agccacgtcgtcgccgagccagagcccgcgccgctcgagccagagccgtgaaagcca  
 atggttag

【 図 9 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLLDTASALYREALSPHCSPHHTALRQAIL  
 CWGELMTLATWVGNLEPGAGSSGQLDPASRDLVVNVYNTNMGKIRQLLWFHISCLTF  
 GRETVLEYLVSFGWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVVGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGG  
 TGTMDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLLDTASALYREALSPHCSPHHTALRQ  
 AILCWGELMTLATWVGNLVDGGSSGGSSGGSSGGSSMAQVQLVESGGALVQPGGSLRLSC  
 AASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQ  
 MNSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSSGGSSGGSSGGSSGGSSINDPASRDLVVN  
 YVNTNMGKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETT  
 VVRRDRGRSPRRRTSPRRRRSQQSPRRRRSQQSRESQC

【 図 10 】

MAQVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPGKEREWVAGMSSAGDRS  
 SYEDSVKGRFTISRDDARNTVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNVGFYWGQGTQVTVSS

【配列表】

2016528176000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/051739
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/46	C07K14/005	C12N15/62 A61K39/00 G01N33/50
ADD.		
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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
<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	WO 01/77158 A1 (MEDEVA EUROP LTD [GB]; GEHIN ANNICK [GB]; GILBERT ROBERT [GB]; STUART) 18 October 2001 (2001-10-18) the whole document -----	1-22
A	WO 2011/116226 A2 (STC UNM [US]; PEABODY DAVID S [US]; CHACKERIAN BRYCE [US]) 22 September 2011 (2011-09-22) the whole document -----	1-22
A	GOYVAERTS C ET AL: "Development of the Nanobody display technology to target lentiviral vectors to antigen-presenting cells", GENE THERAPY, vol. 19, no. 12, December 2012 (2012-12), pages 1133-1140, XP002729509, the whole document -----	1-22
<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 another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  10 September 2014		Date of mailing of the international search report  09/10/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Saame, Tina

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2014/051739

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0177158	A1	18-10-2001	AP 1836 A 14-03-2008
			AT 336502 T 15-09-2006
			AU 784345 B2 16-03-2006
			AU 4670601 A 23-10-2001
			BR 0109919 A 11-03-2003
			CA 2405438 A1 18-10-2001
			CN 1441807 A 10-09-2003
			DE 60122300 T2 30-08-2007
			DK 1268530 T3 13-11-2006
			EP 1268530 A1 02-01-2003
			ES 2269371 T3 01-04-2007
			JP 4713809 B2 29-06-2011
			JP 2003530123 A 14-10-2003
			KR 20030009429 A 29-01-2003
			MX PA02009895 A 06-09-2004
			PT 1268530 E 29-12-2006
			US 2004223965 A1 11-11-2004
			WO 0177158 A1 18-10-2001
			ZA 200208967 A 08-10-2003
			-----
WO 2011116226	A2	22-09-2011	US 2013017210 A1 17-01-2013
			WO 2011116226 A2 22-09-2011
-----	-----	-----	-----

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/576 (2006.01)	G 0 1 N 33/576	B
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (71) 出願人 515338368  
 ペイレット、ハドリエン  
 イギリス国、ノーウィッチ エヌアール4 7ユーエイチ、ノーウィッチ リサーチ パーク、ジ  
 ヨン イネス センター、バイオロジカル ケミストリー ディパートメント
- (74) 代理人 100080791  
 弁理士 高島 一
- (74) 代理人 100125070  
 弁理士 土井 京子
- (74) 代理人 100136629  
 弁理士 鎌田 光宜
- (74) 代理人 100121212  
 弁理士 田村 弥栄子
- (74) 代理人 100117743  
 弁理士 村田 美由紀
- (74) 代理人 100163658  
 弁理士 小池 順造
- (74) 代理人 100174296  
 弁理士 當麻 博文
- (72) 発明者 ローランズ、デビッド ジェイ  
 イギリス国、エルエス2 9ジェーティー、リーズ、ユニバーシティ オブ リーズ、ザ ファキ  
 ユリティー オブ バイオロジカル サイエンス
- (72) 発明者 ロモノソフ、ジョージ  
 イギリス国、ノーウィッチ エヌアール4 7ユーエイチ、ノーウィッチ リサーチ パーク、ジ  
 ヨン イネス センター、バイオロジカル ケミストリー ディパートメント

(72)発明者 ペイレット、ハドリエン

イギリス国、ノーウィッチ エヌアール4 7ユーエイチ、ノーウィッチ リサーチ パーク、ジ  
ョン イネス センター、バイオリジカル ケミストリー ディパートメント

F ターム(参考) 4B064 AG26 AG31 CA11 CA19 CC24 CE02 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AA96Y AB01 AC14 BA02 CA24  
CA45

4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 NA14 ZB09

4C085 AA03 AA38 BB11 BB23 EE01 FF24

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB09

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA01 CA40 DA75 DA86 EA20

FA74 GA01 GA15

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016528176A5</a>	公开(公告)日	2017-07-13
申请号	JP2016517683	申请日	2014-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	ローランズ大卫杰伊 俄罗斯单软件乔治 ペイレットハドリエン		
申请(专利权)人(译)	罗兰兹, 大卫·杰伊 罗蒙诺索夫, 乔治· Peiretto, Hadorien		
[标]发明人	ローランズデビッドジェイ ロモノソフジョージ ペイレットハドリエン		
发明人	ローランズ、デビッド ジェイ ロモノソフ、ジョージ ペイレット、ハドリエン		
IPC分类号	C07K19/00 C07K16/08 C07K14/02 C12N15/09 C12N7/04 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61P37/04 A61K39/39 A61K39/00 G01N33/53 G01N33/576 G01N33/531		
CPC分类号	C07K14/005 C07K14/02 C07K16/00 C07K2317/22 C07K2319/735 C07K2319/75 C12N2730/10123 C12N2730/10142 C07K16/18 C07K2317/569 C07K2319/35 C12N7/00 C12N2730/10122 C12N2730 /10134 C12N2730/10151 G01N33/6857 G01N2333/02		
FI分类号	C07K19/00.ZNA C07K16/08 C07K14/02 C12N15/00.A C12N7/04 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02.C A61K37/02 A61K31/7088 A61K48/00 A61P37/04 A61K39/39 A61K39/00.H G01N33/53.D G01N33/576.B G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/AG31 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/DA01 4B065 /AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065 /AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/EE01 4C085 /FF24 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB09 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045 /DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA15		
代理人(译)	高岛肇 当麻 博文		
优先权	61/831707 2013-06-06 US		
其他公开文献	JP2016528176A		

摘要(译)

本发明提供了一种蛋白质，其包含串联的第一和第二拷贝的乙型肝炎核心抗原（HBcAg），其中一个或两个HBcAg拷贝在e1环中包含单结构域抗体片段。要做。[选择图]无

