

(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2014-527072
(P2014-527072A)

(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)
C07K 14/02 (2006.01)	C O 7 K 14/02 Z N A	4 B O 2 4
C12N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 7 6
A61K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A61K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A61P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-529962 (P2014-529962)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月10日 (2012. 9. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月9日 (2014. 4. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/054534
 (87) 国際公開番号 W02013/036973
 (87) 国際公開日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (31) 優先権主張番号 61/532, 986
 (32) 優先日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514058902
 バイオメド リアルティー, エル. ピー
 .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
 28, サンディエゴ, バーナード セ
 ンター ドライブ 17190
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルスタンパク質の集合を制御するための方法および組成物

(57) 【要約】

本明細書において、例えばウイルス性カプシドまたはナノケージへの修飾ウイルスコアタンパク質の集合を制御するための方法および組成物が提供される。いくつかの実施形態では、開示される修飾ウイルスコアタンパク質は、集合が所望されるまで、ウイルスコアタンパク質の集合を実質的に防止することができる少なくとも1つの変異または修飾を含む。いくつかの実施形態では、ウイルスコアタンパク質の集合は、例えばウイルスコアタンパク質を還元剤と接触させることにより、および/または変性剤の濃度を低下させることにより作動させることができる。ウイルスコアタンパク質は、ウイルス性カプシドまたはナノケージを形成するように自己集合することができる。

【選択図】 図1

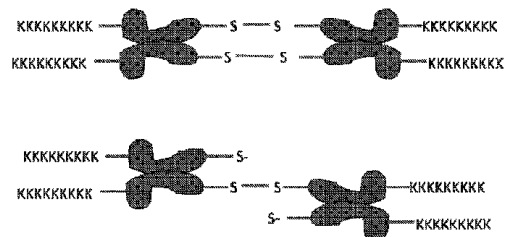


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修飾 B 型肝炎ウイルス (H B V) コアタンパク質をカプシド構造に集合させるための方法であって、

修飾 H B V コアタンパク質および第 1 の濃度の变性剤を含む溶液を提供することであって、前記修飾 H B V コアタンパク質のスパイク領域がシステイン残基を含むことと、

前記溶液に還元剤を添加し、

それによって、集合カプシド構造を形成することと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記修飾 H B V コアタンパク質が、アミノ酸配列の配列番号 1 および配列番号 2 のうちの少なくとも 1 つの 1 つ以上の修飾を含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記スパイク領域が、配列番号 1 および配列番号 2 のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸 7 4 ~ 8 4 を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記修飾 H B V コアタンパク質が、配列番号 1 および配列番号 2 のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸位置 7 7、7 9、または 8 0 にシステインを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記修飾 H B V コアタンパク質が、配列番号 1 および配列番号 2 のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸位置 7 7 にシステインを含む、請求項 2 に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記還元剤が、 β -メルカプトエタノール (B M E)、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P)、グルタチオン (G S H)、ジチオスレイトール (D T T)、2 - メルカプトエチルアミン (B M A)、および遊離システインのうちの少なくとも 1 つである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記還元剤の前記濃度が、約 0 . 1 モル当量 ~ 約 1 0 0 モル当量である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

第 1 の濃度の变性剤を第 2 の濃度に希釈し、それによって、集合カプシド構造を形成することをさらに含み、前記变性剤が前記還元剤の添加前、添加中、および添加後のうちの少なくとも 1 つの時点で希釈される、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記第 1 の濃度の变性剤が、前記還元剤の添加前、添加中、および添加後のうちの少なくとも 1 つの時点で前記第 2 の濃度に希釈される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 0】

負に荷電されたポリマーを前記溶液に添加することをさらに含み、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記溶液の pH が、約 pH 7 . 0 以下である、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 1 2】

薬物を前記溶液に添加することをさらに含み、前記薬物が前記還元剤の添加前、添加中、または添加後のうちの少なくとも 1 つの時点で添加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記薬物が、前記修飾 H B V コアタンパク質の前記アミノ酸尾部に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記薬物が、前記還元剤の前記添加後に拡散により前記カプシド構造にカプセル封入される、および前記アミノ酸尾部に結合され、前記還元剤の添加後に前記カプシド構造にカプセル封入される、のうちの少なくとも 1 つである、請求項 1 に記載の方法。 50

- 【請求項 15】
前記薬物が、核酸、ペプチド、タンパク質、および小分子からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。
- 【請求項 16】
修飾 B 型肝炎ウイルス (HBV) コアタンパク質をカプシド構造に集合させるための方法であって、
修飾 HBV コアタンパク質、および第 1 の濃度の変性剤を含む溶液を提供することと、
前記第 1 の濃度の変性剤を第 2 の濃度に希釈し、
それによって、集合カプシド構造を形成することと、を含む、方法。 10
- 【請求項 17】
前記変性剤が、尿素、グアニジン塩酸塩 (GuHCl)、グアニジンチオシアン酸塩 (GITC)、メタノール、エタノール、トリフルオロエタノール (TFE)、アセトニトリル、およびリチウム過塩化物のうちの少なくとも 1 つである、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 18】
前記変性剤の第 1 の濃度が、約 2 M ~ 約 8 M である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 19】
前記希釈ステップ後の前記変性剤の第 2 の濃度が、約 0.25 M ~ 約 4 M である、請求項 16 に記載の方法。 20
- 【請求項 20】
負に荷電されたポリマーを前記溶液に添加することをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 21】
前記溶液の pH が、約 pH 7.0 以下である、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 22】
前記希釈ステップ前に薬物を前記溶液に添加することをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。
- 【請求項 23】
前記薬物が、前記 HBV コアタンパク質の前記アミノ酸尾部に結合する、請求項 22 に記載の方法。 30
- 【請求項 24】
前記薬物が、前記アミノ酸尾部に結合され、前記希釈ステップ後に前記カプシド構造にカプセル封入される、および前記希釈ステップ後に拡散により前記カプシド構造にカプセル封入される、のうちの少なくとも 1 つである、請求項 23 に記載の方法。
- 【請求項 25】
前記薬物が、核酸、ペプチド、タンパク質、および小分子からなる群から選択される、請求項 22 に記載の方法。
- 【請求項 26】
前記 HBV コアタンパク質が、アミノ酸配列の配列番号 1 および配列番号 2 のうちの少なくとも 1 つにおいて 1 つ以上の修飾を含む修飾 HBV コアタンパク質である、請求項 16 に記載の方法。 40
- 【請求項 27】
前記修飾 HBV コアタンパク質が、C 末端切り詰め変異体である、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 28】
1 ~ 4 つのアルギニンに富む反復が、前記修飾 HBV コアタンパク質のカルボキシル末端から切り詰められる、請求項 27 に記載の方法。
- 【請求項 29】
前記 C 末端切り詰め変異体が、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、および配列 50

番号 6 のうちの少なくとも 1 つから選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

前記修飾 H B V コアタンパク質が、カルボキシル末端アミノ酸尾部をさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 31】

前記アミノ酸尾部が、野生型尾部および合成尾部のうちの少なくとも 1 つである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記アミノ酸尾部が、正に荷電される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記正に荷電されたアミノ酸尾部が、リジンに富む尾部およびアルギニンに富む尾部のうちの少なくとも 1 つである、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記リジンに富む尾部が、約 4 ~ 約 30 リジン、および約 4 ~ 約 30 リジンのリジンドメインのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記リジンドメインが、約 9 リジンである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記集合カプシド構造の形成を測定すること、および前記集合カプシド構造を精製すること、のうちの少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 37】

請求項 1 に記載の方法により生成されるウイルス性カプシド。

【請求項 38】

請求項 16 に記載の方法により生成されるウイルス性カプシド。

【請求項 39】

B 型肝炎ウイルス (H B V) コアタンパク質をカプシド構造に集合させるための方法であって、

修飾 H B V コアタンパク質および第 1 の濃度の変性剤を含む溶液を提供することであって、前記修飾 H B V コアタンパク質のスパイク領域がシステイン残基を含むことと、

薬物を前記溶液に添加することと、

還元剤を前記溶液に添加することであって、前記薬物が、前記還元剤の前記添加前に前記溶液に添加されることと、

前記還元剤の前記添加後に前記第 1 の濃度の前記変性剤を第 2 の濃度に希釈することであって、前記薬物が前記変性剤の希釈前に前記溶液に添加され、

それによって、集合カプシド構造を形成し、前記薬物が前記カプシド構造にカプセル封入されることと、を含む、方法。

【請求項 40】

治療の方法であって、

治療を必要とする患者に、適切な治療薬を保持し、薬学的に許容される担体を伴う修飾 B 型肝炎ウイルス (H B V) コアタンパク質ウイルス性カプシドを投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、Miguel de los Rios、Stephanie de los Rios、Jacek Ostrowski、Kenneth J. Oh、およびIlan Zipkinの「METHODS AND COMPOSITIONS FOR CONTROLLING ASSEMBLY OF VIRAL PROTEINS」と題され、2011年9月9日に出願された米国仮特許出願第61532986号の利益を

10

20

30

40

50

主張し、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、ウイルス性カプシドの操作に関し、より具体的にはコアタンパク質修飾ウイルス性カプシドを用いた治療用調製物に関する。

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

ウイルスタンパク質系治療薬は、癌、感染性疾患、神経障害、炎症障害および免疫障害、ならびに心臓血管疾患を含む様々な疾患および障害を治療するための有望な新規薬物である。これらの薬物は、ウイルスタンパク質内部への治療薬のカプセル封入、またはウイルスタンパク質への治療薬の遺伝的もしくは生化学的結合をもたらすことができる。しかしながら、ウイルスタンパク質に由来する薬物の生成は、そのようなタンパク質の合成の制御および効率的な集合を必要とする。ウイルスタンパク質（または複数のタンパク質）の多くのコピーから構成されるウイルス性カプシド粒子は、典型的には、それらのサブユニットタンパク質が生体内または生体外で発現されるとき、または生化学的に精製されるとき、自己集合する。自己集合するこの性質のため、これらの粒子は、薬物送達またはリガンド提示の目的に関して操作が難しい。例えば、ペプチドまたはタンパク質活性のスクリーニングのためのファージ提示は、多くの場合、融合タンパク質として、粒子サブユニット自体と同じ細胞のファージ粒子表面上に提示されるリガンド（複数可）の同時発現を必要とする。ウイルス性カプシド粒子から薬物を生成するときの課題は、どの治療薬が粒子と会合し、どのような様式、およびどの位置で治療薬が会合するかを制御することを含む。

10

20

【0004】

そのようなものとして、ウイルス性カプシド粒子の集合がより具体的に制御され、サブユニットタンパク質発現系とは独立し得る系が今も求められている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

前の考察から、ウイルスサブユニットタンパク質の集合を制御する方法および組成物の必要性が存在することは明らかであろう。有利に、そのような方法および組成物は、治療上の使用に含まれるウイルスサブユニットタンパク質の修飾を可能にするだろう。

30

【0006】

本発明は、当該技術分野の現状に応じて、特に現在利用可能な方法および組成物により尚十分に解決されていない当該技術分野における問題および必要性に応じて開発された。したがって、本発明は、当該技術分野における上述の欠点の多くまたは全てを克服する、ウイルスタンパク質発現系とは独立したウイルスサブユニットタンパク質の集合を制御するための方法および組成物を提供するために開発された。

【0007】

本開示は、少なくとも一部、ウイルス性カプシド（本明細書において「ナノケージ」とも称される）を形成するために、ウイルスコアタンパク質の自己集合を制御するための方法および組成物を対象とする。ウイルス性カプシドの自己集合は、操作可能な形態もしくはオリゴマー形態（例えば非カプシド構造）でウイルスコアタンパク質を維持するために、ある修飾をウイルスコアタンパク質に導入することにより、および/または変性溶液中に維持される修飾ウイルスコアタンパク質を、自己集合反応を作動させるある状態に曝すことにより制御され得ることがここで理解される。

40

【0008】

一態様では、開示される方法は、修飾ウイルスコアタンパク質（例えば修飾B型肝炎ウイルス（HBV）コアタンパク質）をウイルス性カプシド構造に集合させるための方法を提供する。本方法は、変性剤を含む溶液中の修飾HBVコアタンパク質を提供することと、還元剤を溶液に添加して、集合カプシド構造を形成することを含む。修飾ウイルスコ

50

アタンパク質は、集合が所望されるまで、ウイルスコアタンパク質の集合を実質的に防止することができる少なくとも1つの変異または修飾を含み得る。例えば、修飾HBVウイルスコアタンパク質は、システイン残基、例えば変性条件下でタンパク質を固定された開口状態に維持するためにジスルフィド結合を形成することができる、HBV構造コアのスパイク領域にシステイン残基を含み得る。ウイルス性カプシドへのウイルスコアタンパク質の集合は、例えばウイルスコアタンパク質を還元剤と接触させることにより作動させることができる。いくつかの実施形態では、カプシドの自己集合は、集合溶液に存在する変性剤の濃度を減少させる（例えば変性剤の第1の濃度を変性剤の第2の濃度に希釈することによりさらに制御され得る。本方法は、集合溶液に負に荷電されたポリマーを添加することも含み得る。

10

【0009】

別の態様では、開示される方法は、集合を制御するためにシステイン修飾を必要としないカプシド構造への修飾ウイルスコアタンパク質（例えば修飾HBVコアタンパク質）の集合を制御する方法を提供する。本方法は、変性剤を含む溶液中の修飾HBVコアタンパク質を提供することと、溶液中の変性剤を希釈して、集合カプシドを形成することを含む。拘束ジスルフィド結合は存在しないため、還元剤は、カプシド形成を開始するために、この方法においては必要とされない。本方法は、集合溶液に負に荷電されたポリマーを添加することも含み得る。

【0010】

本明細書に開示される方法のそれぞれにおいて、治療薬は、集合プロセス中に集合カプシド構造にカプセル封入され得る。いくつかの実施形態では、治療薬は、コアタンパク質が固定された開口状態にある間にHBVコアタンパク質に結合され得る（例えば共有結合）。他の実施形態では、治療薬は、集合反応物に添加され、拡散により集合カプシドにカプセル封入され得る（例えば治療薬は、集合中、HBVコアタンパク質に結合されないが、溶液中の薬剤の濃度に基づき、集合カプシドに捕捉される）。例示的な治療薬は、核酸薬物（例えばsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸等）、ペプチド、タンパク質、および小分子を含む。

20

【0011】

本開示に添付される特許請求の範囲は、参照により組み込まれ、本開示の一部を形成する。本明細書を通して、特徴、利点、または類似する言語に対する参照は、本発明により実現され得る特徴および利点の全てが本発明のいずれか1つの実施形態にあるべきである、またはそうであることを意味しない。むしろ、特徴および利点に関する言語は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、利点、または特性が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味することを理解する。よって、本明細書を通して、特徴および利点ならびに類似する言語の考察は、必ずではないが、同じ実施形態を指し得る。

30

【0012】

さらに、本発明の記載される特徴、利点、および特性は、1つ以上の実施形態において、いずれの好適な様式で組み合わせられ得る。当業者は、本発明が特定の実施形態の特定の特徴または利点のうち1つ以上なしに実践され得ることを認識するだろう。他の場合では、追加の特徴および利点は、本発明の全ての実施形態において存在しない可能性がある、ある実施形態において認識され得る。

40

【0013】

本発明のこれらの特徴および利点は、次の説明および添付の特許請求の範囲からより完全に明らかになるか、または以下に記載される本発明の実践により学ぶことができるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0014】

本発明の利点が容易に理解されるために、簡潔に上に記載される本発明のより具体的な説明が、添付の図面に図示される特定の実施形態を参照に提供される。これらの図面は単に本発明の典型的な実施形態を図示し、したがって、その範囲を制限するものと考えられ

50

ないことを理解し、本発明は、添付の図面の使用を通してさらに具体的かつ詳細に記載され、説明される。

【0015】

【図1】固定状態のポリリシン尾部（例えばK9尾部）を有する修飾HBVコアタンパク質二量体を概略的に描写したものである。

【図2】10× -メルカプトエタノール（BME）の存在下における修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示す動的光散乱（DLS）のプロットである。

【図3】BME添加後の修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示すDLSのプロットである。

【図4】BME添加後の修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示すDLSのプロットである。

【図5】BMEの添加、および変性剤の希釈後の修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示すDLSのプロットである。

【図6】BMEの添加、および変性剤の希釈後の修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示すDLSのプロットである。

【図7】BMEの添加、および変性剤の希釈後の修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示すDLSのプロットである。

【図8】負のポリマーの存在下で変性剤を希釈した後の修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示すDLSのプロットである。

【図9】負のポリマーの不在下でBMEを添加した後の修飾HBVウイルス性カプシドの形成を示すDLSのプロットである。

【図10】4×BME、10×BME、および40×BMEでのカプシド形成の速度を示すDLSのプロットである。

【図11】ポリ-リジン尾（例えばK9尾）部分を有する修飾HBVコアタンパク質（薄い点）と、配列番号2変異形にC48A、C61A、およびC107A変異体およびポリ-リジン尾（例えばK9尾）部分を有する修飾HBVコアタンパク質（暗い点）との間のウイルス性カプシド形成の速度を示すDLSプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本明細書を通して、「一実施形態（one embodiment）」、「1つの実施形態（an embodiment）」、または類似する言語への参照は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。よって、本明細書を通して、句「一実施形態では」、「1つの実施形態では」、および類似する言語の出現は全て、必ずではないが、同じ実施形態を指し得る。

【0017】

さらに、本発明の記載される特徵、構造、または特性は、1つ以上の実施形態において、いずれの好適な様式で組み合わせられ得る。以下の説明では、本発明の実施形態の十分な理解を提供するために、多くの具体的な詳細が提供される。しかしながら、当業者は、本発明が具体的な詳細のうち1つ以上なしに、または他の方法、成分、材料等と共に実践され得ることを認識する。他の場合では、周知の構造、材料、または操作は、本発明の態様を曖昧にするのを避けるため、示されないか、または詳述されない。加えて、特定の方法が生じる順序は、示される対応するステップの順序に厳密に順守されても、されなくてもよい。

【0018】

本開示は、少なくとも一部、ウイルス性カプシド構造への修飾ウイルスコアタンパク質の自己集合を制御するための方法および組成物を対象とする。例えば、一実施形態では、ウイルスコアタンパク質の自己集合の速度が制御され得る。別の実施形態では、ウイルスコアタンパク質の自己集合は、自己集合が所望される時点まで本質的に遅らせることができる。ウイルスコアタンパク質は、いくつかの場合では、例えば各カプシドにカプセル封

10

20

30

40

50

入される薬物の量を制御するために、集合前に治療薬に抱合されるか、または充填され得る。本明細書において、ウイルスコアタンパク質の1つ以上の領域は、ナノケージ形成後と比較して、ナノケージ形成前に治療薬に容易に抱合されるか、または充填され得ることが想定される。例えば、ある実施形態では、ウイルスコアタンパク質は、例えばキメラ治療薬を形成するために、集合前に核酸治療薬で充填され得る。また有利に、高純度（例えば非集合ウイルスコアタンパク質の低多分散性および低画分）のナノケージは、開示される方法を用いて調製され得る。ウイルスコアタンパク質の自己集合は、例えばウイルスコアタンパク質を作動薬（例えば還元剤）と接触させることにより、および/またはウイルスコアタンパク質を含む溶液に存在する変性剤の濃度を減少させる（例えば希釈する）ことにより作動させることができる。

10

【0019】

本明細書を通して、本明細書において想定される集合ウイルス性カプシドは、「カプシド」、「ナノケージ」、「ケージ」、「粒子」、「治療用粒子」、および「治療用キメラ粒子」とも称され得る。

【0020】

ウイルス性カプシドの自己集合

本明細書に想定される方法および組成物は、ウイルス性カプシドへのウイルスコアタンパク質（例えばB型肝炎ウイルスコアタンパク質）の自己集合に対する制御を提供する。例えば、様々な実施形態では、ウイルス性カプシドへの修飾ウイルスコアタンパク質の自己集合を制御するための開示される方法は、（1）修飾ウイルスコアタンパク質を還元剤に曝露すること、（2）還元剤への修飾ウイルスコアタンパク質の曝露と、ウイルスコアタンパク質が保存される（例えば非集合状態を維持するために）変性剤の希釈の組み合わせ、および（3）還元剤を添加せずに保存緩衝剤の変性剤を希釈することを含む。

20

【0021】

本明細書において、例えば修飾HBVコアタンパク質を含むウイルス性カプシドを集合させる開示される方法のいくつかの実施形態では、いくつかの自己集合の方法は、集合溶液のイオン強度（例えば集合溶液のイオン強度を上昇させることにより、例えばウイルス性カプシドの自己集合を促進するためにNaClを添加することにより）に依存しないことが想定される。

【0022】

本明細書に提供される、ウイルスコアタンパク質は、集合カプシド構造の形成（例えばナノケージ形成）が所望されるまで本質的に阻害され得るように修飾され得る。例えば、修飾は、ウイルスコアタンパク質の多量体を形成するために、ウイルスコアタンパク質を多量体化させることができる。例えば、いくつかの場合では、2つのウイルスコアタンパク質は二量体を形成し得、3つのウイルスコアタンパク質は三量体を形成し得、4つのウイルスコアタンパク質は四量体を形成し得る。多量体は、ホモ多量体またはヘテロ多量体であり得る。いずれの理論に拘束されるものではないが、ウイルスコアタンパク質の多量体化は、カプシド形成におけるウイルスコアタンパク質の関与を本質的に防止することができる（例えばウイルスコアタンパク質の自己集合の天然の性質を防止する）と考えられる。修飾ウイルスコアタンパク質がオリゴマー形態にあるとき、修飾ウイルスコアタンパク質はカプシド集合を防止する固定状態にあると説明され得る。

30

40

【0023】

ある実施形態では、ウイルスコアタンパク質は、第1のウイルスコアタンパク質を第2のウイルスコアタンパク質に結合して、オリゴマー形態または固定状態になるように使用され得る部分を含むように修飾され得る。例えば、第1のウイルスコアタンパク質は、第2のウイルスコアタンパク質とジスルフィド架橋を形成することができるシステイン残基を含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、修飾は、オリゴマー形成を誘導するために、ウイルスコアタンパク質内に置換変異または挿入変異を含み得る。修飾は、コアタンパク質のアミノ酸配列において、いずれの好適な位置で生じ得る。ある実施形態では、修飾は、修飾がオリゴマー形成を誘導する第2のウイルスコアタンパク質と相互作用

50

することができるように、第1のウイルスコアタンパク質の表面上に位置する。

【0024】

単独で、または別のウイルスコアタンパク質と共にのいずれかで、ウイルス性カプシドへの自己集合を可能にするあらゆるウイルスコアタンパク質が開示される方法における使用に好適である。例示的なウイルスコアタンパク質は、肝炎コアタンパク質（ヒトおよびアヒルのB型肝炎ウイルスコアタンパク質、C型肝炎ウイルスコアタンパク質等）を含み、またヒトパピローマウイルス（HPV）6型L1およびL2タンパク質ならびにササゲクロロティックモトルウイルス被覆されたタンパク質も含み得る。

【0025】

例示的なウイルスコアタンパク質は、B型肝炎ウイルス（HBV）コアタンパク質（本明細書において、「Cタンパク質」または「CP」とも称される）である。HBVの異なる株はCタンパク質の配列においてわずかな変化を有し得、HBV Cタンパク質のいずれの株が利用され得ることが理解されよう。HBVコアタンパク質の例示的な配列は、それぞれ、NCBIタンパク質データベースの受託番号BAD86623およびAY741795に対応するアミノ酸配列1~183を有する配列番号1および2を含む。

【化1】

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPHCSPHHTA
LRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVVS YVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFG
RETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETT VVRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSP
RRRRSQSRE (配列番号: 1)

【化2】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPHCSPHHT
ALRQAILCWGELMNLATWVGNLEDPASRDVNVYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLT
FGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETT VVRRRGRSPRRRTSPRRRRSQ
SPRRRRSQSRESQC (配列番号: 2)

【0026】

配列番号1および2の対応する核酸配列は、それぞれ、下に示される。

配列番号1の核酸配列

【化3】

atggacattg acccttataa agaatttggga gcttctgtgg agttactctc ttttttgcct tctgactttt
ttcctttctat tcgagatctc ctcgacaccg cctccgctct gtatcgggag gcttttagagt ctccggaaca
ttggtcacct caccatacag cactcaggca agctattctg tgttgggggtg agttaatgaa tctggccacc
tgggtgggaa gtaatttggga agatccagca tccagggaat tagtagtcag ctatgtcaat gttaatatgg
gcctaaaaat gagacaacta ctgtggtttc acatttctctg tcttactttt ggaagagaaa ctgttcttga
gtatttgggtg tcttttgggag tgtggattcg cactcctcct gcttacagac caccaaatgc ccctatctta
tcaaaccttc cggaaactac tgttggttaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact ccctcgcctc
gcagacgaag gtctcaatcg ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa tctcaatggt ag

(配列番号: 3)

配列番号2の核酸配列

【化4】

atggacattg atccttataa agaatttggga gctactgtgg agttactctc gtttttgcct tctgactttt
ttcctttcact acgagatctt ctagataccg cctcagctct gtatcgggaa gccttagagt ctctcgagca
ttggttcagct caccatacag cactcaggca agcaattctt tgcctgggggg aactaatgaa tttagccacc
tgggtgggtg gtaatttggga agatccaata tccagagacc tagtagtcag ttatgttaac actcatatgg
gcctaaagt tcaaggcaacta ttgtggtttc acatttctctg tctcactttt ggaagagaaa cggtcataga
gtatttgggtg tctttcgggag tgtggattcg cactcctcct gcttatagac caccaaatgc ccctatctta
tcaaaccttc cggagactac tgttggttaga cgacgaggca ggtcccctag aagaagaact ccctcgcctc
gcagacgaag gtctcaatcg ccgcgtcgca caaaatctca atctcgggga tctcaatggt ag

(配列番号: 4)

【0027】

10

20

30

40

50

当業者は、ウイルスコアタンパク質が単量体として（例えばウイルスコアタンパク質が単一のアミノ酸鎖を含み得る）、または二量体として（例えばウイルスコアタンパク質が2つのアミノ酸鎖を含み得る）存在し得ることを理解するだろう。二量体は、ホモ二量体またはヘテロ二量体であり得る。

【0028】

ウイルスコアタンパク質がHBVコアタンパク質であるとき、当業者は、HBVコアタンパク質が溶液中で自然に二量体を形成することを理解するだろう。HBVコアタンパク質はカプシド構造集合（例えばナノケージ形成）を防止するために自然に二量体を形成するため、HBVコアタンパク質は、図1A～Bに示されるように、HBVコアタンパク質の二量体-二量体複合体を生成するように修飾され得る。

10

【0029】

ある実施形態では、HBVコアタンパク質の二量体-二量体複合体は、HBVコアタンパク質配列のスパイク領域を修飾することにより形成され得る。HBVコアタンパク質のスパイク領域は、配列番号1または配列番号2の約アミノ酸74～84を含む。ある実施形態では、HBVコアタンパク質のスパイク領域は、システイン残基を含むように修飾される。例えば、HBVコアタンパク質のスパイク領域は、配列番号1または配列番号2のアミノ酸位置77、79、または80にシステイン残基を含むように修飾され得る。本明細書において、スパイク領域へのシステイン残基の導入（例えばE77C変異）がHBVコアタンパク質二量体を、ジスルフィド結合の形成によりナノケージに自己集合する能力がない高次構造に固定することが想定される。このジスルフィド結合の減少時、タンパク質二量体は、高次構造的に、自由に他のコアタンパク質二量体と会合し、ナノケージに自己集合することができる。

20

【0030】

1つの実施形態では、ウイルス性カプシドへのHBVコアタンパク質の集合を制御するための方法は、変性剤（例えば修飾HBVコアタンパク質を保存するために使用される緩衝剤に存在する変性剤）を希釈することなく、修飾ウイルスコアタンパク質を還元剤に曝露することを含む。自己集合方法は、変性剤を含む溶液中の修飾HBVコアタンパク質を提供することと、還元剤を溶液に添加して、集合カプシド構造を形成することとを含むがこれらに限定されない。例示的な修飾HBVコアタンパク質は、本明細書に記載されるように、スパイク領域にシステインを含む。例えば、スパイク領域内、例えば配列番号1または配列番号2のアミノ酸位置77にシステイン残基、およびポリ-リジン尾部を含むように修飾されたコアタンパク質は、還元剤の添加時に強いケージを迅速に形成する。還元剤の添加後にウイルス性カプシドを形成する他の例示的な修飾コアタンパク質は下に記載される。これらの修飾コアタンパク質に関して、還元剤の存在は、変性剤の存在下（例えば2～6Mの尿素）でケージ形成を開始する。

30

【0031】

いくつかの実施形態では、ウイルス性カプシドへのHBVコアタンパク質の集合を制御するための方法は、修飾ウイルスコアタンパク質を還元剤に曝露することと、集合溶液に存在する変性剤を希釈することとを含む。自己集合方法は、（1）変性剤を含む溶液中の修飾HBVコアタンパク質を提供すること、（2）還元剤を溶液に添加すること、および（3）第1の濃度の変性剤から第2の濃度の変性剤に溶液中の変性剤を希釈し、それによって、集合カプシド構造を形成することを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、変性剤は、還元剤の添加前に希釈され得る。他の実施形態では、変性剤は、還元剤の添加後に希釈され得る。

40

【0032】

還元剤の添加および変性剤の希釈後にウイルス性カプシドを形成するために自己集合する修飾HBVコアタンパク質は、下に記載される1つ以上の安定化および/または不安定化変異を含む修飾コアタンパク質を含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、例示的な修飾HBVコアタンパク質は、スパイク領域にシステインと、下に記載されるように、コアタンパク質に安定化および/または不安定化変異とを含む。

50

【0033】

ある実施形態では、ウイルス性カプシドへのHBVコアタンパク質の集合を制御するための方法は、還元剤を添加することなく、変性剤を希釈することを含む。自己集合方法は、変性剤を含む溶液中の修飾HBVコアタンパク質を提供することと、還元剤を溶液に添加して、溶液中の変性剤を希釈して、集合カプシド構造を形成することを含むがこれらに限定されない。変性剤の希釈後に自己集合する修飾HBVコアタンパク質は、場合によっては、ジスルフィド結合を形成するシステイン残基を含まなくてもよい。これらの修飾HBVコア間に存在する弱いタンパク質-タンパク質相互作用は、変性剤の存在下でナノケージの形成を防止するのに十分であり、その後の変性剤の希釈（例えば変性剤の開始濃度の約25%、50%、75%、または80%希釈）は、ナノケージの形成を作動させることができる。例示的な非限定的な修飾HBVコアタンパク質は下に記載される。

10

【0034】

ウイルスコアタンパク質は、自己集合を不安定化させる、および/またはウイルスコアタンパク質の非集合形態もしくは固定形態を安定化させる状態に、ウイルスコアタンパク質を曝すことによって、自己集合するのを本質的に阻害させることができる。例えば、変性剤が、ウイルスコアタンパク質の自己集合を防止するために使用され得る。前述の実施形態のそれぞれにおいて、HBVコアタンパク質は、カプシド集合の開始前、変性剤（例えば2~6Mの尿素）を含む保存緩衝剤において維持され得る。

【0035】

ウイルスコアタンパク質の自己集合を本質的に防止するのに好適であるいずれの変性剤および変性剤の濃度が使用され得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の不安定化剤、洗剤、離液剤（lyotropic agent）、有機変性剤、および/または洗剤が変性剤として使用され得る。

20

【0036】

不安定化剤の非限定的な例としては、尿素、チオシアン酸塩（例えばグアニジンチオシアン酸塩（GITC））、トリクロロ酢酸塩、グアニジン塩酸塩（GuHCl）、硝酸塩、および過塩素酸塩（例えば過塩素酸リチウム）が挙げられる。

【0037】

離液剤の非限定的な例としては、硫酸塩、リン酸塩、および酢酸塩が挙げられる。

【0038】

有機変性剤の非限定的な例としては、アセトニトリル、メタノール、エタノール、およびトリフルオロエタノール（TFE）が挙げられる。

30

【0039】

洗剤の非限定的な例としては、アニオン性、カチオン性、非イオン性、または双性イオン性の洗剤が挙げられる。アニオン性洗剤は、例えばデオキシコール酸、コール酸、およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を含み得る。カチオン性洗剤は、例えば臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）を含み得る。非イオン性洗剤は、例えばジキトニン、トリトン、およびツイーンを含み得る。双性イオン性洗剤は、例えばCHAPSを含み得る。

【0040】

いくつかの実施形態では、変性剤は、例えばウイルスコアタンパク質が特に安定したナノケージを形成することができる場合、本質的に自己集合を防止するために、ウイルスコアタンパク質への修飾と組み合わせて使用され得る。

40

【0041】

ナノケージの形成を防止するためにジスルフィド架橋を採用する実施形態では、ジスルフィド架橋を安定化させるために、酸化環境が使用され得る。いくつかの実施形態では、溶液中に溶解された酸素ガスは、酸化環境を維持するのに十分であり得る。しかしながら、酸化環境を維持するいずれの好適な酸化体が添加され得るが、ウイルスコアタンパク質を損傷しないことを理解するべきである。酸化体の非限定的な例はヨウ素である。

【0042】

50

ウイルスコアタンパク質の自己集合は、所望される時間点で作動することができる。例えば、自己集合を防止するために（例えばジスルフィド結合）還元部分が使用されるウイルスコアタンパク質の場合において、還元剤が、自己集合を作動させるために使用され得る。よって、ジスルフィド結合は、 β -メルカプトエタノール（BME）、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）、グルタチオン（GSH）、ジチオスレイトール（DTT）、2メルカプトエチルアミン（BMA）、および/または遊離システイン等のチオールを用いて破壊され得る。他の好適なチオールは、当業者に既知である。場合によっては、ジスルフィド結合を破壊するためにチオレドキシン等のタンパク質が使用され得る。

【0043】

いくつかの実施形態では、還元剤は、ウイルスコアタンパク質に対して過剰なモル比で添加され得る。還元剤の範囲は、約0.1モル当量～約100モル当量であり得る。例えば、いくつかの場合では、ウイルスコアタンパク質に対して少なくとも約1モル当量、少なくとも約4モル当量、少なくとも約10モル当量、少なくとも約20モル当量、少なくとも約30モル当量、または少なくとも約40モル当量の還元剤が添加され得る。いくつかの実施形態では、還元剤の濃度は、約0.1モル当量～約100モル当量、約1モル当量～約100モル当量、約1モル当量～約50モル当量、約10モル当量～約100モル当量、約10モル当量～約50モル当量、または約10モル当量～約20モル当量であり得る。

【0044】

カプシドの自己集合を少なくとも部分的に阻害するために変性剤を採用する実施形態では、変性剤の濃度の減少（例えば変性剤の少なくとも一部を除去する、および/または変性剤を希釈する）が、ウイルスコアタンパク質の自己集合を作動させるために使用され得る。例えば、変性剤の濃度は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%減少され得る。ある実施形態では、変性剤の濃度は、約10%～約90%の範囲で減少され得る。

【0045】

本明細書に記載されるように、ある実施形態では、変性剤は、集合反応中にカプシド形成を促進するために第1の濃度から第2の濃度に希釈され得る。第2の濃度への希釈は、1つ以上の希釈ステップ（例えば、1、2、3、4、5以上の希釈ステップ）を含み得る。例えば、変性剤の濃度を減少させる（例えば変性剤を希釈する）前、変性剤は、約2M～約8M、約2M～約6M、約2M～約4M、約4M～約6M、および約4M～約8Mの濃度、または前記範囲内に配置されるいずれの整数を有し得る。変性剤の濃度を減少させた（例えば変性剤を希釈する）後、変性剤は、約0.25M～約4M、約0.25M～約2M、約0.25M～約1M、約0.5M～約4M、約1M～約4M、いくつかの場合では、約0.25M未満の濃度、または前記範囲内に配置されるいずれの整数を有し得る。いくつかの実施形態では、変性剤は、還元剤の添加前に希釈され得る。他の実施形態では、変性剤は、還元剤の添加後に希釈され得る。

【0046】

ウイルス性カプシド構造の集合を調節する方法は、負に荷電された（例えばアニオン性）ポリマーを集合溶液に添加することをさらに含み得る。ある実施形態では、負に荷電されたポリマーは、カプシドにカプセル封入され得るRNAまたはDNA治療薬（例えばsiRNA）である。他の実施形態では、負に荷電されたポリマーは、ホスホン酸、スルホン酸、アクリル酸、マレイン酸、硫酸塩、および/またはリン酸塩を含み得る。負に荷電されたポリマーは、ポリ（ビニルホスホン酸）、ポリ（ビニルスルホン酸、ナトリウム塩）、ポリ（4-スチレンスルホン酸）アンモニウム塩、ポリ（4-スチレンスルホン酸）リチウム塩、ポリ（4-スチレンスルホン酸）、ポリ（4-スチレンスルホン酸-コ-マレイン酸）ナトリウム塩、ポリアネトールスルホン酸ナトリウム塩、ポリエポキシコハク酸、ポリ（2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸）、ポリ（2アクリ

10

20

30

40

50

ルアミド - 2 - メチル - 1 - プロパンスルホン酸 - コ - アクリロニトリル) アクリロニトリル、ポリ(ニソプロピルアクリルアミド) - カルボン酸終結、ポリ(N - イソプロピルアクリルアミド - コ - メタクリル酸)、ポリ(N - イソプロピルアクリルアミド - コ - メタクリル酸 - コ - オクタデシルアクリレート)、ポリ(アクリルアミド - コ - アクリル酸)、ポリ(アクリル酸ナトリウム塩)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(アクリル酸)、部分ナトリウム塩 - グラフト - ポリ(エチレンオキシド) 架橋、ポリ(アクリル酸 - コ - マレイン酸)、ポリ(イソブチレン - コ - マレイン酸) ナトリウム塩、ポリ(メチルビニルエーテル - alt - マレイン酸モノブチルエステル)、ポリ(メチルビニルエーテル - alt - マレイン酸モノエチルエステル)、ポリ(メチルビニルエーテル - alt - マレイン酸)、ポリ(スチレン - alt - マレイン酸) ナトリウム塩、ポリ(2エチルアクリル酸)、ポリ[(2 - エチルジメチルアンモニオエチルメタクリレートエチル硫酸塩) - コ - (1ビニルピロリドン)]、ポリ[エチルアクリレート - コ - メタクリル酸 - コ - 3 - (1 - イソシアナト - 1 - メチルエチル) a - メチルスチレン]、ポリ(ビス(4カルボキシフェノキシ)ホスファゼン)、ポリ(ビス(4カルボキシフェノキシ)ホスファゼン) 二ナトリウム塩、ポリ(スチレン) - ブロック - ポリ(アクリル酸)、リグノスルホン酸ナトリウム塩、リグノスルホン酸、酢酸ナトリウム塩、リグノスルホン酸、糖ナトリウム塩、アクリル酸 - コ - メチルメタクリレートポリマー(AAMMA)、ポリ(メチルアクリル酸)(PMAA)、ポリ(エチルアクリル酸)(PEAA)、ポリ(プロピルアクリル酸)(PPAA)、ポリ(ブチルアクリル酸)(PBAA)、およびヘパリンも含み得るが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0047】

ある実施形態では、負に荷電されたポリマーは、アクリル酸ポリマー、アクリル酸 - コ - メチルメタクリレートポリマー(AAMMA)、ポリ(メチルアクリル酸)(PMAA)、ポリ(エチルアクリル酸)(PEAA)、ポリ(プロピルアクリル酸)(PPAA)、およびポリ(ブチルアクリル酸)(PBAA)のうち少なくとも1つであり得る。

【0048】

いくつかの実施形態では、カチオン性ポリマーは、集合溶液に添加され得る。カチオン性ポリマーは、ポリ(エチレンジアミン)等のアミン系(例えばPEI系)、または別のポリカチオン性アミノ酸であり得る。PEI系ポリマーは分枝状であり得、それぞれ、25%、50%、および25%の割合の1級、2級、および3級アミン基からなる。例示的なカチオン性ポリマーは、ポリ(アクリルアミド - コジアルジメチルアンモニウムクロリド)、ポリ(アリルアミン塩酸塩)、ポリ(ジアルジメチルアンモニウムクロリド)、ポリ(ジメチルアミン - コ - エピクロロヒドリン - コエチレンジアミン)、分枝状または直鎖状ポリ(エチレンジアミン)、ポリ[ビス(2 - クロロエチル)エーテル - alt 1, 3 - ビス[3 - (ジメチルアミノ)プロピル]尿素]、ポリ(アルギニン)、ポリ(リジン)、およびポリ(ヒスチジン)を含むが、これらに限定されない。

【0049】

集合溶液のpHは、約7.0 ~ 約9.5であり得る。例示的な方法では、溶液のpHは、約7.0 ~ 約9.0、約7.0 ~ 約8.5、約7.4 ~ 約8.0、および約7.4 ~ 約7.6であり得る。本明細書において、集合溶液のpHは、集合反応中に調節され得る(例えばpHは、集合反応の開始時には第1のpH(例えばpH9.5)であり得、集合反応の経過中に第2のpH(例えばpH7.4)に調節され得る)ことが想定される。

【0050】

いくつかの実施形態では、集合溶液のpHは、約pH7.0以下であり得、例えばカプシド集合は、6.8以下、6.5以下、6.3以下、または6.0以下のpHで行われ得る。ある実施形態では、集合溶液のpHは、約5.0 ~ 約7.0であり得る。本明細書において、低pHで、例えばヒスチジンのpKaを下回るpH、例えば6.0で、二量体 - 二量体界面でカプシドを不安定化するために、ある変異がHBVコアに導入され得る(例えばF18HまたはA137H変異)ことが想定される。理論に拘束されるものではないが、二量体 - 二量体界面でヒスチジンを導入するHBVコアタンパク質における変異は、

低 pH でケージを形成することができないであろうことが想定される（例えばそのような修飾コアタンパク質は低 pH で、例えば約 6.0 ~ 約 7.0 の pH で開口状態に固定され得る）。ある実施形態では、カプシド集合は、集合溶液の pH を修飾することにより（例えば pH は、カプシド集合を防止するために約 7.0 以下に下げられ、カプシド集合を促進するために約 7.0 以上に上げられる場合がある）、制御され得る。

【0051】

様々な実施形態では、ナノケージを形成するためのウイルスコアタンパク質の集合は、管理された速度で生じる。例えば、モル当量の作動薬（例えば還元剤）の数および/または変性剤の希釈速度は、所望される自己集合の速度を達成するように調節され得る。いくつかの場合では、少なくとも約 95% のウイルスコアタンパク質は、約 3 時間未満、約 2 時間未満、約 1 時間未満、約 30 分未満、約 15 分未満、または約 10 分未満で自己集合され得る。

10

【0052】

ナノケージ（例えばウイルス性カプシド）の形成も測定され得る。例えば、動的光散乱（DLS）は、溶液中の粒子の大きさを測定するために使用され得る（実施例においてより詳細に記載される）。いくつかの実施形態では、集合ウイルスコアタンパク質（すなわち、ナノケージ）は、DLS により測定されるように、非集合ウイルスコアタンパク質より小さい大きさを有する。ナノケージの平均粒子半径は、約 10 nm ~ 約 100 nm、約 10 nm ~ 約 50 nm、約 15 nm ~ 約 50 nm、約 15 nm ~ 約 40 nm、約 15 nm ~ 約 30 nm、および約 15 nm ~ 約 20 nm であり得る。

20

【0053】

ウイルスコアタンパク質の自己集合により形成されたウイルス性カプシドは精製され得る場合がある。ある実施形態では、集合ウイルス性カプシドは、分子ふるいクロマトグラフィー、遠心分離、および/または濾過により精製される。本明細書において想定される方法は、ナノケージ（例えばウイルス性カプシド）を精製ステップの不在においても高純度で調製することを可能にし得る。例えば、いくつかの実施形態では、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満の多分散性を有する粒子が調製され得る。いくつかの実施形態では、約 5% ~ 約 20%、約 10% ~ 約 20%、および約 5% ~ 約 15% の多分散性を有する粒子が調製され得る。

【0054】

本明細書において、本明細書に開示される集合ウイルス性カプシド粒子は、実質的に非複製であり、実質的に弱毒化した野生型ウイルスを組み込まないことが想定される。ウイルスコアタンパク質は、実質的に非免疫原性であるように設計され得る、および/または粒子が一旦崩壊し始めると、あらゆる免疫応答を制限するために迅速に分解されるように設計され得る。

30

【0055】

本明細書において想定される集合ウイルス性カプシドは、実質的に形態が球体であり得る、および/または正二十面体であり得る。いくつかの実施形態では、修飾 HBV コアタンパク質は、本明細書に記載される、配列番号 1 または配列番号 2 の最初の 149 個のアミノ酸を含み得る。ウイルスコアタンパク質が下に論じられる尾部と組み合わせられて約 149 個のアミノ酸を含むとき、例えば実質的な T = 4 幾何学を有するカプシドまたはケージ構造が、例えば複数の修飾ウイルスコアタンパク質から形成され得る。

40

【0056】

ある実施形態では、修飾 HBV コアタンパク質は、本明細書に記載される、配列番号 1 または配列番号 2 の最初の 138 個のアミノ酸を含み得る。ウイルスコアタンパク質が下に論じられる尾部と組み合わせられて約 138 個のアミノ酸を含むとき、例えば実質的な T = 3 幾何学を有するカプシドまたはケージ構造が、例えば複数の修飾ウイルスコアタンパク質から形成され得る。

【0057】

第 1 のウイルスコアタンパク質を第 2 のコアタンパク質に結合することができるいずれ

50

の切断可能な化学種がナノケージ形成を防止するために使用され得ることも、本明細書において想定される。例えば、いくつかの場合では、第1のウイルスコアタンパク質はアルデヒド基を含み得、第2のウイルスコアタンパク質はヒドラジン基を含み得る。アルデヒド基およびヒドラジン基は、第1のウイルスコアタンパク質を第2のウイルスコアタンパク質に結合するヒドラゾン基を形成するように反応することができる。いくつかの実施形態では、ヒドラゾン基は、ウイルスコアタンパク質を、約7未満、またはいくつかの実施形態では、約6未満のpHを有する溶液と接触させることにより切断され得る。

【0058】

ウイルスコアタンパク質を固定状態に維持し、カプシド集合を調節するために、それを修飾するように使用され得るさらなる切断可能な化学種は、光切断可能なリンカー、キレート化リンカー、ssDNAリンカー、dsDNAリンカー、ペプチドリナー、自己切断可能なリンカー、および糖リンカーの使用を含むが、これらに限定されない。例えば、ビスマレイミド等の光切断可能なリンカーは、集合を防止するために、ウイルスタンパク質を開口状態に固定するために使用され得る。光切断可能なリンカーは、ケージ形成を作動させるために、光を適用することにより切断され得る。キレート化リンカー、例えば第1のウイルスタンパク質上のマレイミド連結、および第2のウイルスタンパク質上のキレート化部分は、集合を防止するために、2つのウイルスタンパク質を開口状態に固定するように金属とリンカーの錯体を作り出すために使用され得る。ケージ形成は、金属を除去することにより調節され得る。(ss)1本鎖または(ds)2本鎖DNAリンカー等のDNAリンカーも使用され得る。例えば、ビス-マレイミド等の切断可能なリンカーは、2つのマレイミド部分間にssDNAまたはdsDNAのいずれかを含み得る。ssDNAまたはdsDNAリンカーは、ナノケージ形成を作動させるエンドヌクレアーゼで切断され得る。dsDNAリンカーは、dsDNAの融点まで熱を加えることによっても破壊され得る。同様に、2つのマレイミド部分間のペプチドリナーが使用され、その後エンドプロテアーゼの添加により切断され得る。糖リンカーも2つのマレイミド部分間に使用され、ケージ形成を作動させるために、その後NaIO₄を添加することにより切断され得る。

【0059】

修飾ウイルスコアタンパク質

野生型HBVコアタンパク質は、典型的に、183個のアミノ酸(本明細書において「コアタンパク質183」または「CP183」と称される)である。アミノ末端の149個のアミノ酸は、球状折り畳み(globular-fold)または構造コアを形成する。本明細書において、例えば、1つ以上の修飾を含み得る、配列番号1または配列番号2のアミノ酸1~149(本明細書において「構造コア部分」、「コアタンパク質149」、または「CP149」とも称される)に基づくHBVコアタンパク質の構造コア部分が提供される。配列番号1および配列番号2の構造コア部分は、それぞれ、下に示される。

配列番号1に基づくCP149は、次のアミノ酸配列を有する。

【化5】

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAIL
CWGELMNLATWVGSNLEDPASRELVS YVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRET VLEYLV
SFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 5)

配列番号2に基づくCP149は、次のアミノ酸配列を有する。

【化6】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRET VLEYLV SFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 6)

【0060】

コアタンパク質に関して使用されるとき、用語「部分」とは、そのタンパク質の断片を指す。数字が続く用語「コアタンパク質」または「CP」は、HBVコアタンパク質のアミノ末端部分を指す。例えば、CP183は183個のアミノ酸を有するHBVコアタンパク質（例えば野生型HBVコアタンパク質）を指し、CP149はアミノ末端の149個のアミノ酸を有するHBVコアタンパク質（例えばHBVコアタンパク質の構造コア部分）を指す。

【0061】

いくつかの実施形態では、構造コア部分は、HBVコアタンパク質の最初のアミノ末端の138個のアミノ酸を含み得ることに留意する。ウイルスコアタンパク質の想定される修飾された構造的部分は、本明細書に記載される1つ以上の修飾を含み得る、配列番号1または配列番号2のアミノ酸1～138（「コアタンパク質138」、または「CP138」と称される）を含み得ることを理解する。配列番号1および配列番号2に対応するCP138配列は、下に示される。

【0062】

配列番号1に基づくCP138は、次のアミノ酸配列を有する。

【化7】

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM

NLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFVWIRTPPAY

RPPNAP（配列番号：7）

【0063】

配列番号2に基づくCP138は、次のアミノ酸配列を有する。

【化8】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM

TLATWVGNNLCDPASRDVNVYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFVWIRTPPA

YRPPNAP（配列番号：8）

【0064】

カルボキシル末端の34個のアミノ酸は、典型的に、HBVコアタンパク質の「尾部分」と称される。HBVコアタンパク質の尾部分は、下に記載されるように、野生型尾部分（例えばHBVコアタンパク質カルボキシル末端の34個のアミノ酸またはその断片を含む）、もしくは合成の尾部分（例えば非HBVコアタンパク質配列、例えばリジン尾部、アルギニン尾部）、またはそれらの組み合わせであり得る。ある実施形態では、修飾HBVコアタンパク質は、ヒスチジntagを含み得る。

【0065】

ある実施形態では、修飾HBVコアタンパク質は、34個のアミノ酸尾部分の全て、または一部を除去するために、カルボキシル末端で切り詰められる。例えば、配列番号1または配列番号2の約アミノ酸残基150～約アミノ酸残基183を含むC末端尾部分は、修飾HBVコアタンパク質から切り詰められ得る。C末端尾部分は、4つのアルギニンに富む反復をさらに含む。本明細書において、アルギニンに富む反復のうちの一つ、二つ、三つ、または四つが修飾HBVコアタンパク質のカルボキシル末端から切り詰められ得ることが想定される。例示的な切り詰め変異体（配列番号2に基づく）はCP170に変異を含み、1つのアルギニンに富む反復は、下に示されるように、HBVコアタンパク質のカルボキシ末端から切り詰められる（残りの3つのアルギニンに富む反復には下線が引かれている）：

【化9】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM

TLATWVGNNLEDPASRDVNVYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFVWIRTPPA

YRPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQS（配列番号：9）。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 6 】

C P 1 6 2 での変異は、2つのアルギニンに富む反復が、下に示されるように、H B V コアタンパク質のカルボキシ末端から切り詰められる（残りの2つのアルギニンに富む反復には下線が引かれている）：

【 化 1 0 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVVRRRRGRSPRRRTPS（配列番号：10）。

【 0 0 6 7 】

C P 1 5 5 での変異は、3つのアルギニンに富む反復が、下に示されるように、カルボキシ末端 H B V コアタンパク質から切り詰められる（残りの1つのアルギニンに富む反復には下線が引かれている）：

【 化 1 1 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVVRRRRGRS（配列番号：11）。

【 0 0 6 8 】

上述の構造コア部分または C P 1 4 9 は、4つ全てのアルギニンに富む反復がカルボキシ末端から切り詰められるときに生成され得る。

【 0 0 6 9 】

簡潔化のため、本明細書に記載される実施形態は、H B V C タンパク質変異形配列番号2の切り詰めおよび/または修飾を例示する。同じ切り詰めおよび/または修飾は、H B V C タンパク質変異形配列番号1内で操作され得ることを理解する。

【 0 0 7 0 】

上述のように、ある実施形態では、H B V コアタンパク質の構造コア部分（例えば H B V コアタンパク質のアミノ酸 1 ~ 1 4 9 ）は、カプシド構造の集合を制御するために、例えば H B V コアタンパク質のスパイク領域にシステイン残基を含むように修飾され得る。スパイク領域は、配列番号1または配列番号2の約アミノ酸残基 7 4 ~ 約アミノ酸残基 8 4 を含む。ある実施形態では、H B V コアタンパク質のスパイク領域は、配列番号1または配列番号2の約アミノ酸残基 7 4 ~ 約アミノ酸残基 8 4 のいずれのアミノ酸位置にシステイン残基を含むように修飾され得、例えば、H B V コアタンパク質は、配列番号1または配列番号2のアミノ酸位置 7 7、7 9、または 8 0 にシステイン残基を含むように修飾され得る。配列番号2のスパイク領域にシステイン残基を含む例示的な構造コアタンパク質配列は、アミノ酸位置 7 7（下線付き）にグルタミン酸のシステインへの変異を有する C P 1 4 9 を含み、これは次のアミノ酸配列を有する：

【 化 1 2 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLCDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVV（配列番号：12）。

【 0 0 7 1 】

アミノ酸位置 7 8（下線付き）にアスパラギン酸のシステインへの変異を有する C P 1 4 9 は、次のアミノ酸配列を有する：

【 化 1 3 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLECPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVV（配列番号：13）。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

アミノ酸位置 8 0 (下線付き) にアラニンのシステインへの変異を有する C P 1 4 9 は、次のアミノ酸配列を有する：

【 化 1 4 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLEDPCSRLVNVYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号：1 4)。

【 0 0 7 3 】

本明細書に論じられる実施形態のそれぞれにおいて、野生型 H B V コア配列が存在する場合、野生型 H B V コア配列は、例えば集合を制御するために、システイン残基を含むようにスパイク領域において修飾され得ることが想定されることに留意する。本明細書において、H B V コアタンパク質は、図 1 A ~ B に図示される、固定された H B V コアタンパク質二量体 - 二量体複合体を生成するために、別の H B V コアタンパク質とジスルフィド結合を形成するのに十分ないずれの位置でスパイク領域の外側にシステイン残基を含むように変異され得ることも想定される。

10

【 0 0 7 4 】

ある実施形態では、H B V コアタンパク質の構造コア部分はまた、例えば、(a) ウイルスコアタンパク質、例えば H B V コアタンパク質単量体のカプシドへの集合を強化し、さらに促進する (本明細書において「安定化変異」とも称される)、(b) カプシド構造を不安定化させる、(c) 脂質または脂質 / コレステロールを含む層で 1 つ以上のカプシドの被覆を強化し、促進する、(d) 他の部分、例えば化学修飾因子および / もしくは標的剤の結合を容易にする、ならびに / または (e) 投与後の血流における全カプシドの解体を容易にするためにも、修飾され得る。これらの修飾のそれぞれは、下にさらに詳細に論じられる。

20

【 0 0 7 5 】

修飾された構造コアタンパク質は、いくつかの実施形態では、配列番号 1 5 により表され得、ここで、X は、各発生に関して独立して、アミノ酸を表す。想定されるウイルスコアタンパク質は、配列番号 1 5 により表される構造部分を含み得、修飾または未修飾の尾部分、例えば下に記載されるもの等の修飾された C 末端尾部分をさらに含む得ることを理解する。

30

【 化 1 5 】

MDIDPYKEFGATVXLLSXLPDXFPSVRXLLDXASXXYREALSPEHXSPHHTALRQAILXWGEL
MTLATWVGNNLXXPXSRDLVNVYVNTNMGLKIRQLLWFHISXLTFGRETVLEXLV
XXGXWIXTPPAXRPPNXPXLXTLPETTVV (配列番号：1 5)

ここで、X は、所与の位置で、

1 4 で X : X = E、H

1 8 で X : X = F、H

2 3 で X : X = F、C、H

2 9 で X : X = D、C

3 3 で X : X = T、C、H

3 6 で X : X = A、H

3 7 で X、X = L、C、H

4 8 で X : X = C、A

6 1 で X : X = C、A

7 7 で X : X = E、C

7 8 で X : X = D、C、S、E

7 9 で X : X = P、C

8 0 で X : X = A、C

40

50

1 0 7 で X : X = C、A
 1 1 8 で X : X = Y、H
 1 2 1 で X : X = S、C
 1 2 2 で X : X = F、H
 1 2 4 で X : X = V、C
 1 2 7 で X : X = R、C
 1 3 2 で X : X = Y、A、V、I、F、C
 1 3 7 で X : X = A、H
 1 3 9 で X : X = I、A
 1 4 1 で X : X = S、C から選択される。

10

【0076】

カプシド集合修飾

いくつかの実施形態では、HBVカプシドは、タンパク質二量体から形成され得る。例えば、二量体間の分子間相互作用は、集合を安定化させ、ジスルフィド結合、塩架橋、およびタンパク質間の疎水性相互作用により形成され得る。いくつかの実施形態では、構造コア部分は、相互作用を安定化させる、および/または不安定化するいずれか、したがって、カプシドまたは粒子集合のために、相互作用アミノ酸側鎖に変異を含み得る。ある実施形態では、そのような変異は、そのようなウイルス構造タンパク質を含むウイルスコアタンパク質から形成されたカプシドまたは粒子の長期安定性に影響を及ぼす場合がある。そのような安定化および/または不安定化変異は、例えば単独で、および/または組み合わせで導入され得る。

20

【0077】

例えば、安定化変異は、ウイルスタンパク質コアタンパク質間の二量体間の会合を安定化させ得るジスルフィド結合を形成するために、HBVコアタンパク質の構造コア部分のアミノ酸位置121および/または141（例えば配列番号2のS121Cおよび/またはS141C）に導入され得る。いくつかの実施形態では、安定化変異は、HBVコアタンパク質の構造コア部分のアミノ酸位置14（例えば配列番号2のE1411）に導入され得る。HBVコアタンパク質変異形配列番号2のCP162に基づく安定化配列は、これらに限定されないが次を含む：

配列番号2変異形においてE77C、S121C、およびS141C変異を有するCP162

30

【化16】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 CFGVWIRTPP AYRPPNAPIL CTLPETT VVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 16)、

配列番号2変異形においてE77CおよびE1411変異を有するCP162

【化17】

MDIDPYKEFG ATVHLLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETT VVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 17)、および

40

配列番号2変異形においてE77CおよびS121C変異を有するCP162

【化18】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 CFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETT VVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 18)。

【0078】

上に示される例示的な安定化変異配列は、アミノ酸位置77にシステイン残基を含む。

50

本明細書において、アミノ酸 77 はグルタミン酸であり得ることが想定される。本明細書において、アミノ酸 77 はグルタミン酸であり得、システイン残基はスパイク領域内の別のアミノ酸位置（例えばスパイク領域の約アミノ酸 74 ~ 約アミノ酸 84）に導入され得ることも想定される。

【0079】

ある実施形態では、不安定化変異は、HBV コアタンパク質の構造コア部分に導入され得る。例示的な不安定化変異は、HBV コアタンパク質の構造コア部分のアミノ酸位置 18、23、33、36、37、118、122、137、132、および/または 139（例えば配列番号 2 の F1811、F2311、T33H、A36H、L37H、Y118H、F12211、Y132F、Y132A、Y132V、A13711、および/または I139A）に導入され得る。HBV コアタンパク質変異形配列番号 2 の CP162 に基づく例示的な不安定化配列は、これらに限定されないが、次を含む：

配列番号 2 変異形において E77C および Y132A 変異を有する CP162
【化 19】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AARPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRT PS（配列番号：19）、

配列番号 2 変異形において E77C および Y132V 変異を有する CP162
【化 20】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AVRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRT PS（配列番号：20）、

配列番号 2 変異形において E77C および Y132F 変異を有する CP162
【化 21】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AFRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRT PS（配列番号：21）、

配列番号 2 変異形において E77C および I139A 変異を有する CP162
【化 22】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPAL STLPETTVVR RRGSRPRRT PS（配列番号：22）、

配列番号 2 変異形において E77C および F1811 変異を有する CP162
【化 23】

MDIDPYKEFG ATVELLSHLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRT PS（配列番号：23）、

配列番号 2 変異形において E77C および F2311 変異を有する CP162
【化 24】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDHFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRT PS（配列番号：24）、

配列番号 2 変異形において E77C および T3311 変異を有する CP162

10

20

30

40

【化 2 5】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDHASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGRSPRRRT PS (配列番号: 25)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および A 3 6 1 1 変異を有する C P 1 6 2

【化 2 6】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASHLYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGRSPRRRT PS (配列番号: 26)、

10

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および L 3 7 1 1 変異を有する C P 1 6 2

【化 2 7】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASAHYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGRSPRRRT PS (配列番号: 27)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および Y 1 1 8 1 1 変異を有する C P 1 6 2

【化 2 8】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEHLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGRSPRRRT PS (配列番号: 28)、

20

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および F 1 2 2 1 1 変異を有する C P 1 6 2

【化 2 9】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 SHGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGRSPRRRT PS (配列番号: 29)、および

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および A 1 3 7 H 変異を有する C P 1 6 2

【化 3 0】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL
 SFGVWIRTPP AYRPPNHPILSTLPETTVVR RRGRSPRRRT PS (配列番号: 30)。

30

【0080】

上に示される例示的な不安定化変異配列も、アミノ酸位置 77 にシステイン残基を含む。本明細書において、アミノ酸 77 はグルタミン酸であり得ることが想定される。本明細書において、アミノ酸 77 はグルタミン酸であり得、システイン残基はスパイク領域内の別のアミノ酸位置 (例えばスパイク領域の約アミノ酸 74 ~ 約アミノ酸 84) に導入され得ることも想定される。

40

【0081】

いくつかの実施形態では、安定化および不安定化の両方の変異は、HBV コアタンパク質の構造コア部分に導入され得る。HBV コアタンパク質変異形配列番号 2 の C P 1 6 2 に基づく安定化および不安定化の両方の変異を有する例示的な構造コアタンパク質は、次を含む:

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、Y 1 3 2 F、S 1 2 1 C、および S 1 4 1 C 変異を有する C P 1 6 2

【化 3 1】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AFRPPNAPIL CTLPETTVVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 31)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、F 1 8 H、S 1 2 1 C、および S 1 4 1 C 変異を有する C P 1 6 2

【化 3 2】

MDIDPYKEFG ATVELLSHLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AYRPPNAPIL CTLPETTVVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 32)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、Y 1 3 2 A、S 1 2 1 C、および S 1 4 1 C 変異を有する C P 1 6 2

【化 3 3】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AARPPNAPIL CTLPETTVVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 33)、および

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、A 1 3 7 H、S 1 2 1 C、および S 1 4 1 C 変異を有する C P 1 6 2

【化 3 4】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AYRPPNHPIL CTLPETTVVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 34)。

【0 0 8 2】

上に示される例示的な安定化および不安定化の変異配列も、アミノ酸位置 77 にシステイン残基を含む。本明細書において、アミノ酸 77 はグルタミン酸であり得ることが想定される。本明細書において、アミノ酸 77 はグルタミン酸であり得、システイン残基はスパイク領域内の別のアミノ酸位置 (例えばスパイク領域の約アミノ酸 74 ~ 約アミノ酸 84) に導入され得ることも想定される。

【0 0 8 3】

ある実施形態では、位置 48、61、および / または 107 の未変性システイン残基は、コアタンパク質がカプシドまたは粒子を形成する能力に実質的に影響を及ぼすことなく、(例えばアラニンに) 変異させることもできる。配列番号 2 に基づく H B V コアタンパク質変異形の C P 1 4 9 構造コア部分に基づく例示的な配列は、次を含む:

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および C 4 8 A 変異を有する C P 1 6 2

【化 3 5】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPHHTALRQAILCWGELM
 TLATWVGNNLCDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVVSFGVWIRTPPA
 YRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 35)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および C 6 1 A 変異を有する C P 1 6 2

【化 3 6】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPHHTALRQAILAWGELM
 TLATWVGNNLCDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVVSFGVWIRTPPA
 YRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 36)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および C 1 0 7 A 変異を有する C P 1 6 2

10

20

30

40

50

【化37】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMT
LATWVGNNLCDPASRDLLVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISALTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
RPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 37)、

配列番号2変異形においてE77C、C48A、およびC61A変異を有するCP162

【化38】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHASPHTALRQAILAWGELM
TLATWVGNNLCDPASRDLLVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVVD (配列番号: 38)、

配列番号2変異形においてE77C、C48A、およびC107A変異を有するCP162

【化39】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHASPHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLCDPASRDLLVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISALTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 39)、

配列番号2変異形においてE77C、C61A、およびC107A変異を有するCP162

【化40】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILAWGELM
TLATWVGNNLCDPASRDLLVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISALTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 40)、および

配列番号2変異形においてE77C、C48A、C61A、およびC107A変異を有するCP162

【化40-2】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHASPHTALRQAILAWGELM
TLATWVGNNLCDPASRDLLVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISALTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
YRPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 41)。

【0084】

ウイルスコアタンパク質の構造コア部分の修飾は、例えば形成された二量体のスパイク領域への一对のシステインの導入、または二量体間の結合(interface)を含み得る。例えば、第1のシステイン(例えばアミノ酸23)は、隣接する分子において第2のシステイン(この場合アミノ酸132)とジスルフィド結合を形成するために、第1の位置に導入される。同様に、第2の位置もジスルフィド結合に関与し得、二量体が4つのジスルフィド架橋および合計180の安定化共有結合相互作用に関与することを可能にする。少なくとも4つの異なる種類のジスルフィド結合を作り出すことができる。

【0085】

例えば、修飾構造コア部分を含む例示的な修飾ウイルスコアタンパク質は、次を含む:
変異1(フェニルアラニン23をシステイン、チロシン132をシステイン)を含む配列番号2のHBV Cタンパク質変異形

【化41】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLEDPASRDLLVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPA
CRPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQRESQC (配列番号: 42)、

10

20

30

40

50

変異 1 (フェニルアラニン 2 3 をシステイン、チロシン 1 3 2 をシステイン) を含む配列番号 1 の H B V C タンパク質

【化 4 2】

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELMN
LATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETIVLEYLVSFVWIRTTPAC
RPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSRESQC (配列番号: 4 3)、

変異 2 (アスパラギン酸 2 9 をシステイン、アルギニン 1 2 7 をシステイン) を含む配列番号 2 の H B V C タンパク質変異形

【化 4 3】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRCLLDTASALYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELMT
LATWVGNNLEDPASRDVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHI
SCLTFGRETIVLEYLVSFVWICTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRR
RRSRESQC (配列番号: 4 4)

10

変異 2 (アスパラギン酸 2 9 をシステイン、アルギニン 1 2 7 をシステイン) を含む配列番号 1 の H B V C タンパク質変異形

【化 4 4】

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRCLLDTASALYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELMN
LATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETIVLEYLVSFVWICTPPAY
RPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSRESQC (配列番号: 4 5)、

20

変異 3 (スレオニン 3 3 をシステイン、バリン 1 2 4 をシステイン) を含む配列番号 2 の H B V C タンパク質変異形

【化 4 5】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDCASALYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLEDPASRDVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETIVLEYLVSFVWIRTTPA
YRPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSRESQC (配列番号: 4 6)、

変異 3 (スレオニン 3 3 をシステイン、バリン 1 2 4 をシステイン) を含む配列番号 1 の H B V C タンパク質

【化 4 6】

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDCASALYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELMN
LATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETIVLEYLVSFVWIRTTPAY
RPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSRESQC (配列番号: 4 7)、

30

変異 4 (ロイシン 3 7 をシステイン、バリン 1 2 0 をシステイン) を含む配列番号 2 の H B V C タンパク質変異形

【化 4 7】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASACYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELM
TLATWVGNNLEDPASRDVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETIVLEYLVCSFVWIRTTPA
YRPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSRESQC (配列番号: 4 8)、および

40

変異 4 (ロイシン 3 7 をシステイン、バリン 1 2 0 をシステイン) を含む配列番号 1 の H B V C タンパク質

【化 4 8】

MDIDPYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASACYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELMN
LATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETIVLEYLVCSFVWIRTTPAY
RPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSPRRRRSQRPRRRRSQSRESQC (配列番号: 4 9)。

50

【 0 0 8 6 】

本明細書において、前述の修飾 H B V コアタンパク質配列のそれぞれにおいて、アミノ酸 77 はグルタミン酸であり得、システイン残基はスパイク領域内の別の位置に導入され得、例えば、システイン残基は約アミノ酸位置 74 ~ 約アミノ酸位置 84、例えばアミノ酸位置 78 または 80 で置換され得ることが想定される。

【 0 0 8 7 】

カプシド結合部位の修飾

いくつかの実施形態では、ウイルスコアタンパク質の構造コア部分は、部分、例えば脂質リンカー部分（例えばマレイミド中間体）等の化学リンカー部分の結合を可能にする抱合部分を含むように修飾され得る。例えば、アミノ酸システインまたはリジンのいずれかは、カプシドまたは粒子に形成されるとき、これらの修飾がカプシド表面から離れて、例えば原形質膜に向かって突出し得るような方式で構造コアに配置され得る。

10

【 0 0 8 8 】

1つの実施形態では、そのような修飾は、脂質層を促進する、または容易にするように作用する1つ以上の脂質リンカー部分の付加を可能にし得る。集合ウイルス性カプシドは、1つ以上の脂質を含む粒子上に配置された被覆剤の一部または実質的に全てを含み得る。例えば、少なくとも1つの脂質分子は、化学リンカー部分、例えば脂質リンカー部分を通してウイルスコアタンパク質、例えば開示されるウイルスコアタンパク質の構造コア部分に共有結合され得る。非限定的な例として、脂質は、結合または化学リンカー部分を介して、例えば上述のB型肝炎構造コア部分のアミノ酸位置77、78、または80で、ウイルスコアタンパク質の構造コア部分上の操作された位置に結合され得る。

20

【 0 0 8 9 】

ある実施形態では、ウイルスコアタンパク質の構造コア部分上の3つの位置は、1つ以上のシステインおよび/またはリジン、例えば H B V コアタンパク質（例えば配列番号 2）上のアミノ酸残基 77 のグルタミン酸をシステインもしくはリジンに、アミノ酸残基 78 のアスパラギン酸をシステインもしくはリジンに、および/またはアミノ酸残基 80 のアラニンにシステインもしくはリジンに導入するために使用され得る。いくつかの実施形態では、そのようなシステイン修飾はさらに官能化され得る。システイン変異は、Cタンパク質の他の位置でも導入され得る。H B V コアタンパク質変異形配列番号 2 の例示的な修飾構造コア部分 C P 1 4 9 は、以下を含む：

30

E 7 7 C 変異（下線付き）を有する C P 1 4 9

【 化 4 9 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMT
LATWVGNNLCDPPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFVWIRTTPPAY
RPPNAPILSTLPETTVV（配列番号：12）、

D 7 8 C 変異（下線付き）を有する C P 1 4 9

【 化 5 0 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMT
LATWVGNNLECPPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFVWIRTTPPAY
RPPNAPILSTLPETTVV（配列番号：13）、

40

A 8 0 C 変異（下線付き）を有する C P 1 4 9

【 化 5 1 】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMT
LATWVGNNLEDCSRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLE
YLVSFVWIRTTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV（配列番号：14）、

D 7 8 S 変異を有する C P 1 4 9

【化52】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMT
LATWVGNNLESPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAY
RPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 50)、および

D78E変異を有するCP149

【化53】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELMT
LATWVGNNLEEPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAY
RPPNAPILSTLPETTVV (配列番号: 51)。

10

【0090】

想定される脂質リンカー部分は、本明細書に論じられるものを含み得る。例示的な脂質リンカー部分は、例えばスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)酪酸塩(SMPB)またはm-マレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスクシンイミドエステル等のスクシンイミジル誘導体をウイルスコアタンパク質の修飾構造コア部分と接触させることから形成され得る。

【0091】

1つの実施形態では、化学リンカー、例えば二官能性リンカーは、別の部分を、修飾構造コア部分を含む、例えば1つ以上のシステイン残基を含むウイルスコアタンパク質から形成された粒子に結合することができる。例示的な化学リンカーは、システイン残基をホスファチジルエタノールアミン-マレイミド(PE-マレイミドまたはPEmal)等のマレイミド含有化合物と接触させることにより形成されるもの等の部分を含む。例えばリン脂質は、例えば脂質分子および/または標的剤を連結するために、化学リンカーを通して修飾構造コア部分に直接連結され得る。

20

【0092】

集合カプシドは、1つ以上の脂質、例えば中性脂質、アニオン性脂質、および/もしくはカチオン性脂質を含む層または被覆剤を有し得る。例えば、中性脂質および/または両親媒性脂質、例えばホファチジル(phosphatidyl)セリン等のリン脂質は脂質リンカー部分に共有結合され得る。そのような共有結合脂質分子は、例えばさらに1つの中性脂質を含み得る、および/またはPOPG等の表面が中性であるアニオン性脂質を含み得る被覆剤の配置を誘導し得る。

30

【0093】

使用に好適な例示的なリン脂質は、水素添加大豆ホスファチジルコリン(HSPC)、卵ホスファチジルコリン(EPC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジリンイノシトール(PI)、モノシアログリオリド(monosialoganglioside)、スフィンゴミエリン(SPM)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)、またはジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)を含むが、これらに限定されない。

40

【0094】

いくつかの実施形態では、本明細書において想定される集合カプシドは、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(POPG)、水素添加大豆ホスファチジルコリン(HSPC)等の1つ、2つ以上の脂質を含む、1つ以上の脂質で被覆され得る。想定される脂質は、ポリ(エチレングリコール)-誘導体化ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(PEG-DSPPE)および/またはポリ(エチレングリコール)-誘導体化セラミド(PEG-CER)を含む、PEG-リン脂質を含む。

【0095】

本明細書において、例えば1つ以上の脂質およびコレステロールを含む被覆剤を含み得る、様々な量のコレステロール、HSPC、またはPOPGを含み得る集合カプシドが提供

50

される。脂質被覆剤は、約5%～約40%のコレステロール、約10%～約80%のHSPC、および/もしくは約5%～約80%のPOPG、または前記範囲内のいずれの特定のパーセンテージを含み得る。いくつかの実施形態では、被覆剤は、例えば、(a)約20%のコレステロールと約80%のHSPC、(b)約50%のコレステロールと約50%のHSPC、(c)約20%のコレステロールと、約20%のHSPCと、約60%のPOPG、(d)約50%のコレステロールと約50%のPOPG、(e)20%のコレステロールと80%のPOPG、または(f)約10%のコレステロールと、約15%のHSPCと、約65%のPOPGを含み得る。1つの実施形態では、被覆剤は、約20%のコレステロール、約20%のHSPC、および約60%のPOPGを含み得る。

【0096】

被覆組成物は、粒子質量値に対して総タンパク質(w/w)の約10%～約60%、約10%～約50%、約15%～約40%、約20%～約35%、または記載される範囲のいずれの特定のパーセンテージの被覆剤を有し得る。例えば、脂質被覆組成物は、約30%～約100%(w/w)の質量値で粒子を被覆することができる。

【0097】

様々な実施形態では、被覆プロセスに好適なタンパク質：脂質(w:w)の比率は、約1:1のタンパク質：脂質～約1:30のタンパク質：脂質(w:w)の範囲であり得る。タンパク質：脂質の比率は、時には、0.1:1～1:100、またはそのような範囲内のいずれの中間比率であり得る。

【0098】

用語「脂質」とは、これに限定されないが、脂肪酸のエステルを含む有機化合物の群を指し、水に不溶性であるが、多くの有機溶媒に可溶性であることを特徴とする。それらは、通常、少なくとも3つのクラス：(1)脂肪および油ならびにワックスを含む「単純脂質」、(2)リン脂質および糖脂質を含む「複合脂質」、および(3)ステロイド等の「誘導脂質」に分類される。

【0099】

用語「中性脂質」とは、選択されたpHで無電荷または中性双極性イオン形態のいずれかで存在する多くの脂質種のうちのいずれかを指す。生理学的pHで、そのような脂質は、例えばジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド、およびジアシルグリセロールを含む。

【0100】

用語「両親媒性脂質」とは、一部、脂質性材料の疎水性部分が疎水性相内に配向され、一方で、親水性部分が水相に向かって配向される、いずれの好適な材料を指す。親水性の特性は、炭水化物、リン酸塩、カルボキシル基、スルファト基、アミノ基、スルフヒドリル基、ニトロ基、ヒドロキシル基、および他の同様の基等の極性または荷電基の存在に由来する。疎水性は、これに限定されないが、長鎖の飽和および不飽和脂肪族炭化水素基を含む無極性を含むことによって付与され得、そのような基は1つ以上の芳香族、脂環式、または複素環の基(複数可)によって置換される。両親媒性化合物の例としては、リン脂質、アミノ脂質、およびスフィンゴ脂質が挙げられるが、これらに限定されない。リン脂質の代表的な例としては、卵ホスファチジルコリンまたは水素添加大豆ホスファチジルコリン等のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジン酸、パーニトイル(pahnitoyl)オレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミンジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、モノシアロガングルゴリオシド(monosialoganglioside)、スフィンゴミエリン、ジミリストイルホスファチジルコリン、およびジリノレオイルホスファチジルコリンが挙げられるが、これらに限定されない。スフィンゴ脂質、グリコスフィンゴ脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、および(3-アシルオキシアシド等のリンを欠く他の化

10

20

30

40

50

合物も、両親媒性脂質として命名される群内である。加えて、上述の両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールを含む他の脂質と混合され得る。

【0101】

用語「アニオン性脂質」とは、生理学的 pH で負に荷電されるいずれの脂質を指す。これらの脂質は、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N - ドデカノイルホスファチジエタノールアミン、N - スクシニルホスファチジエタノールアミン、N グルタリルホスファチジエタノールアミン、リジルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレイルホスファチジルグリセロール (palmitoyl oleoyl phosphatidyl glycerol) (POPG)、および中性脂質に接合された他のアニオン性修飾基を含むが、これらに限定されない。

10

【0102】

用語「カチオン性脂質」とは、生理学的 pH (例えば約 7.0 の pH) 等の選択された pH で正味の正電荷を持つ多くの脂質種のうちのいずれかを指す。カチオン性脂質の例としては、N, N - ジオレイル - N, N - ジメチル塩化アンモニウム (DODAC)、ジオクタデシルジメチルアンモニウム (DODMA)、ジステアリルジメチルアンモニウム (DSDMA)、N - (1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピル) - N, N, N - トリメチル塩化アンモニウム (DOTMA)、N, N - ジステアリル - N, N - ジメチル臭化アンモニウム (DDAB)、N - (1 - (2, 3 - ジオレイルオキシ)プロピル) N, N, N - トリメチル塩化アンモニウム (DOTAP)、3 - (N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) - カルバモイル) コレステロール (DC - Chol)、N - (1, 2 - ジミリスチルオキシプロピ - 3 - イル) - N, N - ジメチル - N ヒドロキシエチル臭化アンモニウム (DMRIE)、1, 2 - ジリノレイルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLINDMA)、1, 2 - ジリノレニルオキシ - N, N - ジメチルアミノプロパン (DLENDMA)、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、アニオン性脂質は、内部負電荷を有する表面上で中性であり得る。

20

【0103】

カプシド解体修飾

さらなる変更または変異は、例えば生体内投与後、例えばカプシドまたは粒子形成された開示されるウイルスコアタンパク質の解体を容易にし得る、例えばウイルス性構造コアに対して行うことができる。例えば、血液プロテアーゼ認識配列、例えばヒンジ領域およびループ領域でプロテアーゼ認識部位を導入し得る変異が想定される。そのような配列は、例えば HBV C タンパク質のスパイク領域に挿入され得る (例えばアミノ酸 79 および 80 をそれらの 12 のアミノ酸挿入ループと置換する)。いくつかの実施形態では、ウイルスコアタンパク質は、最大約 40、または約 46 のそのような挿入残基を含み得、またいくつかの実施形態では、粒子またはカプシドを形成することができる。

30

【0104】

例示的な血液プロテアーゼ認識配列は、例えばトロンピン (GPGAPGLVPRGS、配列番号 52) および因子 Xa (GPASGPGIEGRA、配列番号 53) を含む。例えば、そのような血液プロテアーゼ認識配列を含む配列番号 2 変異形からの想定される HBV C タンパク質は、

40

【0105】

アミノ酸 78 と 79 との間に導入される E77C 変異およびトロンピン認識部位を含む CP162

【化 54】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRT PS (配列番号: 54)、および

アミノ酸 78 と 79 との間に導入される E77C 変異および因子 Xa 認識部位を含む C

50

P 1 6 2

【化 5 5】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRRGRSPRRRT PS (配列番号: 55)

によって表され得る。

【0106】

修飾尾部分

開示されるHBVコアタンパク質の末端尾部の様々な修飾、および切り詰め変異、またはその構造コア部分が想定される。例えば、B型肝炎コアタンパク質のC末端尾部は、例えば核酸および/またはタンパク質を修飾ウイルスコアタンパク質に結合するための適切な性質を提供するように操作され得る。例えば、修飾尾部分、および例えば修飾尾部分への結合と会合する核酸を有するウイルスコアタンパク質を含む治療用キメラが提供される。

10

【0107】

野生型HBV-Cタンパク質の34アミノC末端尾部は、完全に形成されたウイルス性カプシド内部に垂れ下り、例えばウイルス性核酸に結合すると推測され、下に示される：

C末端尾部アミノ酸配列150~183：

【化 5 6】

RRRGRSPRRRTPSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQ (配列番号: 56)。

20

【0108】

この野生型尾部は、構造コア部分と一緒に、修飾HBVウイルス性カプシドの集合に使用するためのウイルスコアタンパク質を提供する、修飾尾部分を提供するように、修飾される、切り詰められ得る、および/または変異され得る。

【0109】

いくつかの実施形態では、修飾尾部分、例えば修飾C末端尾部分は、1つ以上のポリ-リジンを含む修飾を含み得る。例えば、修飾尾部分は、約4~約30のリジン、または約5~約20のリジン、例えば約7、8、9、または10のリジンを含み得る。

30

【0110】

ある実施形態では、修飾尾部分は、1つ以上のリジンドメインを含み得る。例えば、各ポリ-リジンドメインは、約1~約30のリジン残基を含み得る。いくつかの実施形態では、ポリ-リジンドメインは、約5つのリジン残基~約20のリジン残基を含み得る。2つ以上のポリリジンドメインが存在するとき、ポリ-リジンドメインは、約1~約20のアミノ酸残基で分離され得る。いくつかの実施形態では、2つ以上のポリ-リジンドメインが存在するとき、各ポリ-リジンドメインは、約4つのリジン残基~約20のリジン残基(またはその範囲に配置されるいずれの特定のアミノ酸長)を含み得る。いくつかの実施形態では、少なくとも4つまたは少なくとも5つの連続するリジン残基が修飾C末端尾部に含まれる。

40

【0111】

ポリ-リジンおよびポリ-リジンドメインならびに/またはポリ-ヒスチジントグは、個別に、または組み合わせで、修飾C末端尾部の一部を形成し得る。ポリ-ヒスチジントグは、いくつかの実施形態では、タンパク質の精製を容易にし得る。

【0112】

例示的なC末端尾部分は、例えば5つのリジン(K5)、7つのリジン(K7)、9つのリジン(K9)、10のリジン(K10)、11のリジン(K11)、13のリジン(K13)、20のリジン(K20)を有するものを含む。他の例示的なC末端尾部分は、9つのアラニン(KA9)を有するポリ-アラニン領域と交互に起こる9つのリジンを有するポリ-リジン領域、9つのグリシン(KG9)を有するポリ-グリシン領域と交互に

50

起こる 9 つのリジンを有するポリ - リジン領域、および第 4 と第 5 のリジン (K 4 ~ 5) との間で少なくとも 4 つのアミノ酸の配列によって中断される 9 つのリジンを有するポリ - リジン領域を有するものを含む。いくつかの実施形態では、K 4 ~ 5 尾部の第 4 と第 5 のリジンとの間の約 4 つのアミノ酸伸長は、アミノ酸 Ser - Gln - Ser - Pro (配列番号 5 7) であり得る。例えば、修飾尾部分は、

【化 5 7】

KLAAA[KKKKK]_iLE[H]_j (配列番号: 58)

によって表すことができ、i は 4 ~ 21 の整数であり、j は 0 ~ 10 の整数である。例えば、i は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 であり得、j は、0、1、2、3、4、5 以上であり得る。

10

【0113】

様々な実施形態では、修飾尾部分は、交互に起こるリジンから形成され得る。例えば、一実施形態では、修飾尾部分は、

【化 5 8】

DKLAA[AK]_pLE[H]_j (配列番号: 59)

によって表すことができ、p は 5 ~ 12 の整数であり、j は 0 ~ 10 の整数である。例えば、p は、5、6、7、8、9、10、11、または 12 であり得、j は、0、1、2、3、4、5 以上であり得る。

【0114】

修飾尾部分を有する H B V コアタンパク質の例示的な CP 1 4 9 構造コア部分は、以下を含む：

20

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 5 尾部分、およびヒスチジントグを有する CP 1 4 9

【化 5 9】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVD KLAAAKKKKK LEHHHHHH (配列番号: 60)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 7 尾部分を有する CP 1 4 9

【化 6 0】

30

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVD KLAAAKKKKK KLEHHHHHH (配列番号: 61)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 9 尾部分、およびヒスチジントグを有する CP 1 4 9

【化 6 1】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVD KLAAAKKKKK KKKLEHHHH HH (配列番号: 62)、

40

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 10 尾部分、およびヒスチジントグを有する CP 1 4 9

【化 6 2】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHH HHH

(配列番号: 63)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 11 尾部分、およびヒスチジントグを有す

50

る C P 1 4 9

【化 6 3】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKKKLEHH HHHH

(配列番号：64)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 1 3 尾部分、およびヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 6 4】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKKKKKLE HHHHHH

(配列番号：65)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 2 0 尾部分、およびヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 6 4 - 2】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKKKKKK KKKKKKLEHHH

HHH (配列番号：66)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K 4 ~ 5 尾部分、およびヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 6 5】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKS QSPKKKKKLE HHHHHH

(配列番号：67)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K A 9 尾部分、およびヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 6 6】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKAKAK AKAKAKAKAK AKLEHHHHHH

(配列番号：68)、および

配列番号 2 変異形において E 7 7 C 変異、K G 9 尾部分、およびヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 6 7】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKGK GKKGKKGK GKLEHHHHHH

(配列番号：69)。

【0 1 1 5】

カプシド集合変異(例えば安定化変異および不安定化変異)、ならびに/または化学結合部位および修飾尾部分の変異を有する H B V コアタンパク質の例示的な C P 1 4 9 構造

10

20

30

40

50

コア部分は、以下を含む：

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および F 1 8 1 1 の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジンタグを有する C P 1 4 9

【化 6 8】

MDIDPYKEFG ATVELLSHLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：70)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および Y 1 3 2 A の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジンタグを有する C P 1 4 9

【化 6 9】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AARPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：71)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および Y 1 3 2 V の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジンタグを有する C P 1 4 9

【化 7 0】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AVRPPNAPILSTLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：72)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および Y 1 3 2 I の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジンタグを有する C P 1 4 9

【化 7 1】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AIRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：136)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および Y 1 3 2 F の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジンタグを有する C P 1 4 9

【化 7 2】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AFRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH

(配列番号：137)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および I 1 3 9 A の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジンタグを有する C P 1 4 9

【化 7 3】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AYRPPNAPALSTLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH

(配列番号：73)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および C 4 8 A の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジンタグを有する C P 1 4 9

10

20

30

40

【化 7 4】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHASP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：74)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、C 4 8 A、C 6 1 A および C 1 0 7 A の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 7 5】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHASP HHTALRQAIL
 AWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISALTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：75)、

10

配列番号 2 変異形において E 7 7 C および S 1 2 1 C の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 7 6】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH

(配列番号：76)、

20

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、S 1 2 1 C、および S 1 4 1 C の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 7 7】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AYRPPNAPIL CTLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH

(配列番号：77)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、S 1 2 1 C、S 1 4 1 C、および Y 1 3 2 F の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジntagを有する C P 1 4 9

30

【化 7 8】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AFRPPNAPIL CTLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：78)、

配列番号 2 変異形において E 7 7 C、S 1 2 1 C、S 1 4 1 C、および F 1 8 1 1 の変異、K 9 尾部分、ならびにヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 7 9】

MDIDPYKEFG ATVELLSHLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 CFGVWIRTPP AYRPPNAPILCTLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号：79)、

40

配列番号 2 変異形において D 7 8 E 変異、K 9 尾部分、およびヒスチジntagを有する C P 1 4 9

【化 8 0】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLEEPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH

(配列番号：80)、および

50

配列番号 2 変異形において E 7 7 K 変異、K 9 尾部分、およびヒスチジントグを有する
C P 1 4 9

【化 8 1】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFPFSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLKDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYL

SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVD KLAAAKKKKK KKKKLEHHHH HH (配列番号: 81)。

【0 1 1 6】

本明細書において、前述の実施形態のそれぞれのポリ-リジン尾部は、様々な長さ（例えば K 5、K 7、K 1 0、K 1 1、K 1 3、もしくは K 2 0）、または交互に起こるリジン配列（例えば K G および K A）のものであり得、異なるリンカーを含み得、ヒスチジントグを有しても、有さなくてもよいことが想定される。

10

【0 1 1 7】

他の実施形態では、修飾尾部分は 1 つ以上のポリ-アルギニンを含む。例えば、修飾尾部分は、約 4 ~ 約 3 0 のアルギニン、または約 5 ~ 約 2 0 のアルギニン、例えば約 7、8、9、または 1 0 のアルギニンを含み得る。

【0 1 1 8】

いくつかの実施形態では、修飾尾部分は、1 つ以上のアルギニンドメインを含み得る。2 つ以上のポリアルギニンドメインが存在するとき、ポリ-アルギニンドメインは、約 1 ~ 約 2 0 のアミノ酸残基で分離され得る。例えば、各ポリ-アルギニンドメインは、約 1 ~ 約 3 0 のアルギニン残基を含み得る。いくつかの実施形態では、2 つ以上のポリアルギニンドメインが存在するとき、ポリ-アルギニンドメインは、約 4 つのアルギニン残基 ~ 約 2 0 のアルギニン残基（またはその範囲内に配置されるいずれの特定のアルギニン長）を含むことができる。いくつかの実施形態では、修飾 C 末端尾部は、少なくとも 4 つまたは少なくとも 5 つの連続するアルギニン残基を含む。別の実施形態では、修飾 C 末端尾部は、アルギニンとリジン、例えば、1 つ以上のアルギニンドメインと 1 つ以上のリジンドメインの混合物を有し得る。

20

【0 1 1 9】

ポリ-アルギニンドメインおよび/またはポリ-ヒスチジントグは、別個に、または組み合わせで、C 末端尾部に付加され得る。ポリ-ヒスチジントグは、いくつかの実施形態では、タンパク質の精製を容易にし得る。例示的な C 末端尾部分は、5 つのアルギニン (R 5)、7 つのアルギニン (R 7)、9 つのアルギニン (R 9)、1 1 のアルギニン (R 1 1)、1 3 のアルギニン (R 1 3)、および 2 0 のアルギニン (R 2 0) を含み得る。ポリ-アルギニンドメインを含むそのような修飾された尾部分は、

30

【化 8 2】

DKLAAA[R]_qLE[H]_j 配列番号: 8 2

によって表すことができ、q は 4 ~ 2 1 以上の整数であり、j は 0 ~ 1 0 の整数である。例えば、q は、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、または 2 0 であり得、j は、0、1、2、3、4、5 以上であり得る。

40

【0 1 2 0】

本明細書において、単独で、または組み合わせてのいずれかで、切り詰め変異、集合突異（例えば安定化変異および/または不安定化変異）、カプシド結合変異、解体変異を含む修飾 H B V コアタンパク質を説明する前述の実施形態のそれぞれは、本明細書に記載されるポリ-リジン尾部またはポリアルギニン尾部で修飾されることが想定される。

【0 1 2 1】

リンカー断片は、任意に、例えば修飾構造コア部分と修飾尾部分との間、例えばアミノ酸残基 1 4 9 と別の修飾尾部分ドメインとの間に存在し得る。いくつかの実施形態では、リンカー断片は、長さが約 3 つのアミノ酸 ~ 約 1 5 のアミノ酸（またはその範囲に配置されるいずれの特定のアルギニン長）であり、例えば C 末端尾に柔軟性を提供するために、例えばポリ-リジンドメインおよび/もしくはポリ-アルギニンドメインを含む修飾尾部分

50

を、例えばHBVコアタンパク質のアミノ酸149に連結することができる。例えば、ポリ-リジンドメインには、その後にポリヒスチジンタグが続く、および/またはその後にXhoI制限部位が続き得る。いくつかの実施形態では、ポリヒスチジンタグは、C末端尾に付加される少なくとも6つのヒスチジン残基を含む。例えば、そのようなリンカー断片は、

【化83】

[SAG]_s (配列番号: 83)

[TAG]_r (配列番号: 84)

[GAG]_t (配列番号: 85)

によって表され、r、s、およびtは、それぞれ独立して、1~6以上の整数である。

【0122】

ある実施形態では、修飾HBVコアタンパク質は、C末端システイン残基を含み得る。このシステインは、天然または合成の尾部分のC末端上に含まれ、したがって、集合ケージにカプセル封入され得る。C末端システイン残基は、治療薬への抱合または尾部分の変異を安定化させるために使用され得る。E77CおよびF181Iの変異を有するCP162切り詰め変異体(配列番号2変異形に基づく)に基づくC末端システイン残基を含む例示的な修飾HBVコアタンパク質は、次の通りである:

【化84】

MDIDPYKEFG ATVELLSHLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETT VVR RRGSRPRRT PSLEHHHHHH C (配列番号: 86)。

【0123】

前述の実施形態のそれぞれにおいて、同じ切り詰めおよび/または修飾がHBV Cタンパク質変異形配列番号1内で操作され得ることを理解する。

【0124】

本明細書において、前述の実施形態のそれぞれに関して、当業者は、開示されるウイルスコアタンパク質に対して例えば約75%~約99%同一、約80%~約95%同一、約85%~約90%同一、もしくは約95%~約99%同一、またはそれらの範囲内に配置されるいずれの特定のパーセントの特定の修飾ウイルスコアタンパク質の核酸およびアミノ酸配列がカプシドを形成することができ、本発明の範囲内であることを認識することも想定される。

【0125】

ウイルスコアタンパク質の発現

開示されるウイルスコアタンパク質は、通常分子生物学および生化学技法を用いて、発現され、精製され得る。例えば、ウイルスコアタンパク質の発現を提供するために、ウイルスコアタンパク質遺伝子を宿主細胞に運ぶように操作され得る組換え発現ベクターを使用することができる。そのようなベクターは、例えば熱ショック、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、電気穿孔、またはリポソーム媒介移動を含むがこれらに限定されないトランスフェクション手段により宿主細胞に導入され得る。組換え発現ベクターは、BL21(DE3)pLysS等の大腸菌系発現ベクター、CDM8もしくはpDC201等のCOS細胞系発現ベクター、pEDベクター等のCHO細胞系発現ベクターを含むが、これらに限定されない。例えばCタンパク質遺伝子コード領域は、選択された細胞系において活性化され得る発現ベクターにおいて任意の数のプロモーターのうちの一つに連結され得る。1つの実施形態では、カセット(カプシド遺伝子およびプロモーター)は、ベクターを受容する細胞が識別され得る選択マーカを含むベクターによって保持される。

【0126】

例えば、細胞系内にカプシドタンパク質を発現させるためのプロモーターは、宿主細胞内で官能的に活性であるものから得ることができる。そのようなプロモーターは、T7プ

10

20

30

40

50

ロモーター、CMVプロモーター、SV40初期プロモーター、ヘルペスTKプロモーター、および組換えDNA技術に既知のその他を含むが、これらに限定されない。誘導プロモーターが使用され得、メタロチオニンプロモーター(MT)、マウス乳房腫瘍ウイルスプロモーター(MMTV)、および当業者に既知のその他等のプロモーターを含む。例示的な選択マーカーおよびそれらの付随する選択薬剤は、例えばアンピシリン、カナマイシン、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ/G418、ハイグロマイシン-Bホスホトランスフェラーゼ/ハイグロマイシン-B、およびジヒドロ葉酸レダクターゼ/メトトレキサート等の増幅可能な選択マーカー、ならびに当業者に既知のその他を含むが、これらに限定されない群から得ることができる。

【0127】

様々な真核生物、原核生物、昆虫、植物、および酵母発現ベクター系(例えばウイルスコアタンパク質コード配列の複製、転写、および翻訳を指示するために必要な要素を含むベクター)が、ウイルスコアタンパク質コード配列を発現するために、当業者によって利用され得る。これらは、カプシドタンパク質コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌等の微生物、カプシドタンパク質コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母、カプシドタンパク質コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)で感染させた昆虫細胞系、組換えウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーマザイクウイルスCaMV、タバコモザイクウイルスTMV)で感染させた、またはカプシドタンパク質コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えばTiプラスミド)で形質転換された植物細胞系を含むが、これらに限定されない。

【0128】

治療薬

治療薬(例えば薬物)は、集合ウイルス性カプシド構造にカプセル封入され得る。薬物は、クーロン力または共有結合によって修飾ウイルスコアタンパク質に結合され得る。薬物のカプセル封入は、場合によっては、自己集合前に(すなわち、ウイルスコアタンパク質が集合前の開口された固定状態にあるとき)、薬物をウイルスコアタンパク質の領域に抱合し、その後、得られたウイルス性カプシドが薬物を含むように自己集合を作動させることによって生じ得る。例えば、いくつかの実施形態では、薬物は、修飾HBVコアタンパク質のアミノ酸尾部分に結合され得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸尾部分に結合された薬物は、還元剤の添加後にカプセル封入され得る。

【0129】

ある実施形態では、薬物は、集合溶液に添加されるアニオン性またはカチオン性のポリマーに結合され得る。アニオン性またはカチオン性のポリマーに結合された薬物は、アニオン性もしくはカチオン性のポリマーの修飾コアタンパク質もしくは修飾尾部分との会合に基づき、集合ウイルス性カプシドにカプセル封入され得る。

【0130】

様々な実施形態では、薬物と非集合ウイルスコアタンパク質の溶液が混合され、カプシドの自己集合は、得られたウイルス性カプシドによって、薬物の一部がカプセル封入され、薬物の一部がカプセル封入されないように作動され得る、すなわち、薬物は作動薬(例えば還元剤)の添加後、拡散によってカプシド構造にカプセル封入され得る。例えば、薬物は、還元剤の添加前に溶液に添加され得る。

【0131】

本明細書において、集合ウイルス性カプシドにカプセル封入され得る治療薬は、核酸、ペプチド、タンパク質、および/または小分子を含むことが想定される。核酸薬物の非限定的な例としては、哺乳類に投与されたとき、標的の発現の減少(例えば10%、25%、50%、75%、90%、95%、または100%)をもたらす1本鎖もしくは2本鎖のRNA、siRNA(低分子干渉RNA)、shRNA(ショートヘアピンRNA)、もしくはアンチセンスRNA、またはそれらの一部等の阻害性核酸、あるいはそれらの類似体または模倣物が挙げられる。典型的に、阻害性核酸は、標的核酸もしくは遺伝子、ま

10

20

30

40

50

たはそれらのオルソログの少なくとも一部を含むか、またはそれに対応するか、あるいは標的核酸もしくは遺伝子の相補的鎖の少なくとも一部を含む。阻害性核酸は、典型的に、標的核酸に対して実質的に、もしくは完全な同一性または相同性（例えば60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%）を有する。本明細書で使用される、用語「標的」とは、治療薬による治療的介入の部位もしくは潜在的な部位であるポリペプチドの発現に必要とされる核酸もしくはその変異形、または微生物、ウイルス、細菌、もしくは単細胞寄生生物（ウイルスの全ゲノムが標的と見なされ得る）を含む非ペプチド実体、および/または天然に存在する干渉RNAもしくはマイクロRNAまたはそれらの前駆体を指す。例えば、標的は、遺伝子のコードmRNAの部分に対応するヌクレオチドの配列を指し得る。

10

【0132】

ナノケージにカプセル封入され得る薬物の非限定的な例としては、心血管薬、呼吸器薬、交感神経刺激薬、コリン作用薬、アドレナリンもしくはアドレナリン取り込み薬、鎮痛剤/解熱剤、麻酔剤、抗喘息薬、抗生物質、抗うつ剤、抗糖尿病剤、抗真菌、降圧剤、抗炎症剤、抗悪性腫瘍薬、抗不安剤、免疫抑制剤、免疫調節剤、抗片頭痛薬、鎮静剤/催眠薬、抗狭心症薬、抗精神病薬、抗躁薬、抗不整脈薬、抗関節炎薬、抗痛風剤、抗凝固薬、血小板溶解薬、抗線溶剤、血液動態薬、抗血小板薬、抗痙攣薬、抗パーキンソン病薬、抗ヒスタミン剤/鎮痒薬、カルシウム調節に有用な薬剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、抗菌剤、抗感染薬、気管支拡張薬、ホルモン剤、血糖降下薬、低脂血症剤、赤血球生成刺激に有用な薬剤、抗潰瘍薬/抗逆流薬、抗嘔吐薬/制吐薬、および油溶性ビタミン、またはそれらの組み合わせ等の生理活性剤が挙げられる。

20

【0133】

化学療法剤の非限定的な例としては、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、プレドニゾン、ブスルファン、シスプラチン、メトトレキサート、ダウノルビシン、メルファラン、クラドリピン、ピンブラスチン、アウリスタチン、プレオマイシン、カリチアマイシン、およびクロラムブシルが挙げられる。

【0134】

使用することができる酵素的に活性な毒素およびその断片の非限定的な例としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌から）、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカアメリカナ(Phytolacca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ(momordica charantia)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(sapaonaria officinalis)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテシンが挙げられる。

30

【0135】

製剤および送達

本明細書において、集合ウイルス性カプシドは、当該技術分野において周知の方法を使用して、治療用組成物に製剤化され得ることが想定される。この技術は、ウイルス性カプシド内部に隔離され得る薬物の送達に適用され得る。非限定的な例として、DNAおよびRNA(sRNAを含む)は、カプシドの内部に隔離され、その後、適切な核局在化分子なしに、またはそれと会合するかのいずれかで、所望される時間に放出され得る。用途は、癌療法、痛み制御における制御薬物放出、マーカー送達、および抗炎症送達、ならびに細胞培養物への生体外遺伝子送達、および生体外操作組織へのシグナルまたは薬物送達を含む。

40

【0136】

ウイルス性カプシドは、薬学的に許容される担体または化合物と共にを含んで、送達用に製剤化され得る。本明細書で使用される、用語「薬学的に許容される担体」とは、薬学的投与と適合性がある溶媒、分散培地、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸

50

収剤等を含む。補足的な活性化合物も組成物に組み込むことができる。

【0137】

薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性があるように製剤化される。投与形態の例としては、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所）、経粘膜、経鼻、眼球、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下用途に使用される溶液または懸濁液は、次の成分を含み得る：滅菌希釈剤（注射用水、食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒等）、抗菌剤（ベンジルアルコールまたはメチルパラベン等）、抗酸化剤（アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム等）、キレート化剤（エチレンジアミン4酢酸等）、緩衝剤（酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩等）、および張度を調節するための薬剤（塩化ナトリウムまたはデキストロース等）。pHは、塩酸および水酸化ナトリウム等の酸または塩基で調節され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い切りシリンジ、または多用量バイアルに封入され得る。

10

【0138】

経口用組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療投与の目的に関して、活性化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、錠剤、トローチ剤、またはカプセル、例えばゼラチンカプセルの形態で使用され得る。経口用組成物は、口腔洗浄剤として使用するための液体担体を用いても調製され得る。薬学的に適合性がある結合剤および/またはアジュバント材料は、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、ピル、カプセル、トローチ剤等は、次の成分、または類似する性質の化合物のうちのいずれかを含むことができる：結合剤（微結晶セルロース、トラガントガム、またはゼラチン等）、賦形剤（デンプンもしくはラクトース等）、崩壊剤（アルギン酸、プリモゲル、もしくはコーンスターチ等）、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウムもしくはステロテス等）、流動促進剤（コロイド状二酸化ケイ素等）、甘味剤（スクロースもしくはサッカリン等）、または風味剤（ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ風味等）。

20

【0139】

注射可能な使用に好適な薬学的組成物は、滅菌水溶液（水溶性である場合）、または分散液、および滅菌注射可能溶液もしくは分散液の即時調製物用の滅菌粉末を含む。静脈内投与に関して、好適な担体は、生理学的生理食塩水、静菌性水、クレモフォアE.L.T.M.（BASF, Parsippany, N.J.）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、組成物は滅菌でなくてはならず、かつ容易に注射が可能な程度に流体でなくてはならない。製造および保存の状態下で安定していなければならず、細菌および真菌等の微生物の汚染作用を防がなければならない。担体は、例えば水、ウイルス性カプシドの一体性を保護するように構成される他の流体、および好適なそれらの混合物を含む溶媒または分散培地であり得る。適切な流動性は、例えばレシチン等の被覆剤を使用することにより、分散の場合は、要求される粒径を維持することにより、および界面活性剤を使用することにより維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。多くの場合において、等張剤、例えばマンニトール、ソルビトール、および塩化ナトリウム等の糖類、ポリアルコールが組成物に含まれる場合がある。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含むことによってもたらすことができる。

30

40

【0140】

滅菌の注射可能な溶液は、必要に応じて、上に列挙される成分のうちの1つまたはその組み合わせを含む適切な溶媒に要求される量の活性化合物を組み込み、続いて滅菌濾過することにより調製され得る。一般に、分散液は、活性化合物を、塩基性分散培地および上に列挙されるものから必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことにより調製される。

【0141】

吸入による投与に関して、化合物は、好適な推進剤、例えば二酸化炭素等のガスを含む

50

加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザからのエアゾール噴霧の形態で送達される。

【0142】

全身投与は、経鼻および眼球を含む経粘膜または経皮手段によるものであり得る。経粘膜または経皮の投与に関して、浸透するバリアに適切である浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は、一般に、当該技術分野において既知であり、例えば経粘膜投与に関しては、洗剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、経鼻スプレーまたは坐剤の使用を通して達成され得る。経皮投与に関して、活性化合物は、一般に当該技術分野において既知である、軟膏、油薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。送達ビヒクルは、直腸送達に関して、坐剤（例えばココアバターおよび他のグリセリド等の従来の座剤基材）または滞留浣腸の形態でも調製され得る。

10

【0143】

いくつかの実施形態では、経口または非経口組成物は、投与の容易性および投薬量の均一性のために投薬単位形態に製剤化される。本明細書で使用される、投薬単位形態とは、治療される対象に対する単位投薬量として適切に物理的に分離している単位のことを指し、各単位は、必要とされる薬学的担体と共に所望される治療効果をもたらすように計算された活性化合物の既定量を含む。

【0144】

そのような化合物の毒性および治療有効性は、例えばLD50値（集団の50%に対して致死である用量）、およびED50値（集団の50%において治療的に有効である用量）を決定するために、細胞培養物または実験動物において、標準的な薬学的手順により決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指数であり、LD50/ED50比で表すことができる。多くの場合、高い治療指数を示す分子が利用される。毒性副作用を示す分子が使用され得るが、未感染細胞への損傷の可能性を最小にし、それによって、副作用を減少させるために、そのような化合物が患部組織の部位を標的とする送達系を設計する注意が払われるべきである。

20

【0145】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータは、ヒトにおいて使用するための様々な投薬量を製剤化するのに使用され得る。そのような分子の投薬量は、多くの場合、毒性がほとんどない、または毒性がないED50値を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、採用される投薬形態および利用される投与形態により、この範囲内で変動し得る。本明細書に記載される方法に使用されるいずれの分子に関して、治療有効量は、細胞培養アッセイから最初に推定され得る。用量は、細胞培養において決定される、IC50値（すなわち、症状の最大阻害の半値を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて製剤化され得る。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定され得る。個体における治療有効量を決定する別の例は、試験対象の血清における「遊離」および「結合」化合物のレベルを直接アッセイする能力である。そのようなアッセイは抗体摸倣物および/またはバイオセンサーを利用し得る。

30

【0146】

抗体抱合体は、所与の生物学的応答を修飾するために使用され得、ウイルス性カプシドを介して送達される薬物部分は、古典的な化学治療薬に限定されるように解釈されない。例えば、薬物部分は、所望される生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質は、例えば毒素（アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、もしくはジフテリア毒素等）、ポリペプチド（腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン活性因子）、または生物学的応答修飾因子（例えばリンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の成長因子等）を含み得る。別の方法と

40

50

しては、抗体は、抗体ヘテロ抱合体を形成するために、第2の抗体に抱合され得る。

【0147】

化合物に関して、例示的な用量は、対象またはサンプル重量の1キログラム当りミリグラムまたはマイクログラム量の化合物、例えば1キログラム当り約1マイクログラム～1キログラム当り約500ミリグラム、1キログラム当り約100マイクログラム～1キログラム当り約5ミリグラム、または1キログラム当り約1マイクログラム～1キログラム当り約50マイクログラムを含む。小分子の適切な用量は、特にそれが細胞の細胞基質に分子を直接送達するとき、調節される発現または活性に対する小分子の効力に依存することを理解する。本明細書に記載されるポリペプチドもしくは核酸の発現または活性を調節するために、これらの小分子のうちの一つ以上が動物（例えばヒト）に投与されるとき、医師、獣医、または研究者は、例えば最初に比較的低い用量を処方し、その後、適切な応答が得られるまで、用量を増加する。加えて、いずれの特定の動物対象に対する特定の用量レベルは、採用される特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、および食事、投与の時間、投与形態、排出速度、任意の薬物併用、および調節される発現または活性の程度を含む、様々な因子に依存することを理解する。

10

【0148】

核酸分子は、ウイルス性カプシドに挿入され、これに限定されないが癌を含む治療のための遺伝子療法の方法において使用され得る。遺伝子療法用カプシドは、例えば静脈内注射、および局所投与により対象に送達され得る。遺伝子療法用カプシドの薬学的調製物は、許容される希釈剤中に遺伝子療法用カプシドを含むことができるか、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる持続放出マトリックスを含むことができる。

20

【0149】

薬学的組成物は、投与の説明書と共に、容器、パック、または DISPENSER に含まれ得る。活性成分の薬学的組成物は、治療のために治療方法および予防方法に関して本明細書に記載される経路のうちの一つ以上によって投与され得る。治療の予防方法および治療方法の両方に関して、そのような治療は、本明細書に記載される薬理ゲノム学的分析から得られた知識に基づき、具体的に調整され、修飾され得る。本明細書で使用される、用語「治療」は、疾患、疾患の症状、もしくは疾患に対する素因を治療する、治癒する、緩和する、軽減する、変更する、矯正する、寛解させる、改善する、または影響を及ぼす目的で、疾患、疾患の症状、もしくは疾患に対する素因を有する患者への治療薬の適用もしくは投与、または患者からの単離された組織または細胞系への治療薬の適用もしくは投与として定義される。治療薬は、小分子、ペプチド、抗体、リボザイム、オリゴヌクレオチド、および鎮痛剤を含むが、これらに限定されない。

30

【0150】

癌を含む障害の治療の成功は、標的遺伝子生成物の発現または活性を阻害するように作用する技法によりもたらされ得る。阻害分子は、ペプチド、ホスホペプチド、小有機分子もしくは小無機分子、または抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、もしくは単鎖抗体、ならびに Fab、F(ab')₂、および Fab 発現ライブラリ断片、scFv 分子、ならびにそれらのエピトープ結合断片）を含み得るが、これらに限定されない。

40

【0151】

さらに、標的遺伝子の発現を阻害するアンチセンスおよびリボザイム分子は、標的遺伝子の発現レベルを減少させ、よって効率的に標的遺伝子の活性を減少させるためにも使用され得る。またさらに、3重らせん分子は、標的遺伝子の活性レベルを減少させるのに利用され得る。

【0152】

変異体遺伝子発現を減少させる、または阻害するためのアンチセンス、リボザイム、および/または3重らせん分子の使用は、存在する正常な標的遺伝子生成物の濃度が正常な表現型に必要である濃度より低くてよいように、正常な標的遺伝子の対立遺伝子により生成された mRNA の転写 (t 3重らせん) および/または翻訳 (アンチセンス、リボザイ

50

ム)を減少させるか、または阻害し得ることも可能である。そのような場合、正常な標的遺伝子活性を示す標的遺伝子ポリペプチドをコードし、発現する核酸分子は、本明細書のウイルス性カプシド遺伝子療法の方法を介して細胞に導入され得る。

【0153】

核酸分子が異常な遺伝子発現を特徴とする疾患を治療する、または防止するのに利用され得る別の方法は、欠損したポリペプチドに特異的なアダマー分子の使用を通してである。アダマーは、ポリペプチドリガンドに特異的に結合することを可能にする3次構造を有する核酸分子である。核酸分子は、多くの場合において、治療用ポリペプチド分子より標的細胞により簡単に導入され得るため、アダマーは、異常なポリペプチド活性が多能性作用を有し得る薬物または他の分子を導入することなく具体的に減少され得る方法を提示する。

10

【0154】

両方とも標的遺伝子生成物に特異的であり、標的遺伝子生成物の活性を減少させる抗体が生成され得る。したがって、そのような抗体は、負の調節技法が癌および関連する障害の治療に適切である場合に投与され得る。

【0155】

標的抗原が細胞内である、および全抗体が使用される場合において、ウイルス性カプシドは、抗体または標的抗原に結合するFab領域の断片を細胞に送達するために使用され得る。抗体の断片が使用される場合、標的抗原に結合する最小阻害断片が多くの場合利用される。例えば、抗体のFv領域に対応するアミノ酸配列を有するペプチドが使用され得る。別の方法としては、細胞内標的抗原に結合する単鎖中和抗体も投与され得る。そのような単鎖抗体は、例えば標的細胞集団内に単鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を発現することによって投与され得る。

20

【実施例】

【0156】

次の実施例は、本発明の範囲を決して制限することが意図されないが、本明細書において想定される調製物および治療薬の使用を含む、本発明の異なる特徴を図示するために提供される。本発明の多くの他の実施形態は、当業者には明らかであろう。

【0157】

実施例1：HBV E77C Hisタグ付けされたコアタンパク質のクローン化

30

A. HBV E77C Hisタグ付けされたコアタンパク質

E77C Hisタグ付けされたHBVコアタンパク質は、ベクターpET21b (Novagen)のNdeI/XhoI制限部位にクローン化された。このプラスミドは、タンパク質発現のために、大腸菌BL21 (DE3) PlysS細胞 (Stratagene)に形質転換された。E77C Hisタグ付けされたコアタンパク質の核酸および対応するアミノ酸配列は下に示される：

【化85】

ATG GAT ATC GAT CCG TAT AAA GAA TTT GGC GCC ACC GTG GAA CTG CTG AGC TTT
 CTG CCG AGC GAT TTC TTT CCG AGC GTG CGT GAT CTG CTG GAT ACC GCG AGC GCG
 CTG TAT CGC GAA GCG CTG GAA AGC CCG GAA CAT TGT AGC CCG CAC CAT ACC GCC
 CTG CGT CAG GCG ATT CTG TGC TGG GGT GAA CTG ATG ACC CTG GCG ACC TGG GTT
 GGC AAC AAC CTG TGT GAT CCG GCG AGC CGC GAT CTG GTT GTG AAC TAT GTG AAT
 ACC AAC ATG GGC CTG AAA ATT CGT CAG CTG CTG TGG TTT CAT ATC AGC TGC CTG
 ACC TTT GGC CGC GAA ACC GTG CTG GAA TAT CTG GTG AGC TTT GGC GTT TGG ATC
 CGT ACC CCG CCG GCG TAT CGT CCG CCG AAT GCG CCG ATT CTG AGC ACC CTG CCG
 GAA ACC ACC GTT GTG CGT CGC CGT GGT CGC AGC CCG CGC CGT CGT ACC CCG AGC
 CCG CGT CGT CGT CGT AGC CAG AGC CCG CGT CGT CGC CGC AGC CAG AGC CGC GAA
 AGC CAG CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC (配列番号：87)

40

50

【化 8 6】

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFPFSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWG
 ELMTLATWVGNNLCDPASRDLVVNYVNTNMGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGV
 WIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTIVRRRRGRSPRRRTSPRRRRRSQSPRRRRRSQSRESQLEHHHH
 HH (配列番号: 88)

【0158】

B. ポリ-リジン尾部変異体のクローン化および発現

前述の K5、K7、K9、K10、K11、K13、K20、KA9、KG9、および K4-5 コアタンパク質変異体に関する遺伝子を含む DNA 断片は、カセット1のテンプレートおよび表1に記載されるプライマー配列を用いたPCRを介して合成された。各PCR反応物は、12.5 μlの5×GCポリメラーゼ緩衝液(Finnzyme)、1.25 μlの10 mM dNTP混合物、1.5 μlの5 μM順方向プライマー、1.5 μlの5 μM逆方向プライマー、0.6 μlのStratageneミニプレッププレート、0.8 μlの2単位/μl Phusion Hot Startポリメラーゼ(Finnzyme)、および44.25 μlの水から構成された。PCR反応は、98で1分間のインキュベーション1回、続いて98で25秒間のインキュベーション、70で30秒間のインキュベーション、ならびに72で1分間および10秒間のインキュベーションからなる。これらの最後3回のステップは、24回繰り返され、後に72で7分間のインキュベーションが続いた。

10

20

【0159】

カセット1のテンプレートは、ベクターpET22bのNde1/Xho1制限部位に挿入された次の核酸配列からなる：

【化 8 7】

ATGGATATCGATCCGTATAAAGAATTTGGCGCCACCGTGGAAGCTGCTGAGCTTTCTGCCGAGC
 GATTTCTTTCCGAGCGTGCCTGATCTGCTGGATACCGCGAGCGCGCTGTATCGCGAAGCGCTG
 GAAAGCCCCGGAACATTGTAGCCCCGACCATACCGCCCTGCGTCAGGCGATTCTGTGCTGGGGT
 GAACTGATGACCCTGGCGACCTGGGTTGGCAACAACCTGTGCGATCCGGCGAGCCGCGATCT
 GGTTGTGAACTATGTGAATACCAACATGGGCCTGAAAATTCGTCTGCTGCTGTGGTTTTCATAT
 CAGCTGCCTGACCTTTGGCCGCGAAACCGTGCTGGAATATCTGGTGAGCTTTGGCGTTTGAT
 CCGTACCCCGCCGGCGTATCGTCCGCCGAATGCGCCGATTCTGAGCACCCCTGCCGGAACCAC
 CGTTGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA (配列番号: 89)。

30

【表 1 - 1】

表 1

尾部変異体	順方向プライマー (5' → 3')	逆方向プライマー (5' → 3')
K5	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTTTTCTTCTT TGC GGCCGCAAGCTTGTCGAC (配列番号: 91)
K7	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTTTTCTT CTTCTTTGCGGCCGCAAGCTTGTC GAC (配列番号: 92)
K9	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTTTTCTT CTTCTTTTTCTTTGCGGCCGCAAG CTTGTCGAC (配列番号: 93)
K10	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGTTTCTTCTTCTTCTT CTTCTTCTTTTTCTTTGCGGCCGC AAGCTTGTCGAC (配列番号: 94)
K11	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTTTTCTT CTTCTTTTTCTTCTTTGCGGCC GCAAGCTTGTCGAC (SEQ ID NO: (配列番号: 95)
K13	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTTTTCTT CTTCTTTTTCTTCTTTTTCTTT GCGGCCGCAAGCTTGTCGAC (配列番号: 96)

10

20

【表 1 - 2】

K20	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTTTTCTTCTTCTT CTTCTTCTTCTTCTTTTTCTTCTTC TTCTTCTTCTTCTTTTTCTTTGCGG CCGCAAGCTTGTCGAC (配列番号: 97)	
KA9	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCGCCTTAGCCTT CGCCTTAGCCTTTGCCTTCGCCTT AGCCTTTGCCTTTGCGGCCGCAA GCTTGTCGAC (配列番号: 98)	
KG9	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGC CTC GAG CTT ACC CTT GCC CTT GCC CTT ACC CTT GCC CTT ACC CTT GCC CTT ACC CTT TGC GGC CGC AAG CTT GTC GAC (配列番号: 99)	10
K4-5	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGTTTCTTCTTCTTCTT CGGGCTCTGGCTCTTCTTTTTCTT TGCGGCCGCAAGCTTGTCGAC (配列番号: 100)	
CP155	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	ATTCTCGAGGCTGCGACCACGGC GACGCAC (配列番号: 101)	
CP162	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	ATTCTCGAGGCTCGGGGTACGAC GGCGCGG (配列番号: 102)	20
CP170	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	ATTCTCGAGGCTCTGGCTACGAC GACGACGCGGGCTCGGGGT (配列番号: 103)	
リンカー1	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTCTTTTTCTT CTTCTTTTTCTTGCCGGCGCTGCC CGCGCTGACAACGGTGGTTTCCG GCAG (配列番号: 104)	
リンカー2	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTCTTTTTCTT CTTCTTTTTCTTGCCGGCGGTGCC CGCGGTGACAACGGTGGTTTCCG GCAG (配列番号: 105)	30
リンカー3	CGACTCACTATAGGGGAATT GTGAGCGG (配列番号: 90)	GGCCTCGAGCTTCTTCTTTTTCTT CTTCTTTTTCTTGCCGGCGCCGCC CGCGCCGACAACGGTGGTTTCCG GCAG (配列番号: 106)	

【0160】

PCR生成物およびpET22bベクターは、両方とも37 で2時間、制限酵素Nde IおよびXho Iで消化された。消化された生成物はアガロースゲルに泳動され、バンドが切り出され、ゲル抽出(Stratagene)を介して精製された。連結反応物は、5 μlの消化され、精製されたPCR生成物、1 μlの消化され、精製されたpET22bベクター、1 μlのT4 DNAリガーゼ緩衝液(NEB)、1 μlのT4 DNAリガーゼ(NEB)、および2 μlの水から構成され、室温で12時間インキュベートされた。

40

【0161】

連結反応物は、XLI Blue大腸菌細胞(Stratagene)に形質転換され、得られたコロニーをIX LBプロス中で成長させた。プラスミドは、ミニプレップ(Stratagene)を介して精製された。精製されたプラスミドは、配列決定され(下を参照)、タンパク質発現のために、大腸菌BL21(DE3)PlusS細胞(Stratagene)に形質転換された。この戦略は、0~30のリジン残基を含むタンパク質に使用され得る。

50

【 0 1 6 2 】

C . 修飾構造コア変異体のクローン化

K 9 構築物の点変異を含む DNA 断片は、K 9 テンプレート（または 2 重もしくは 3 重変異体の場合、適切な単一もしくは 2 重変異体 K 9 テンプレート）および表 2 に記載されるプライマー配列を用いて、PCR を介して合成された。各 PCR 反応物は、5 μ l の 10 \times Pfu Turboポリメラーゼ緩衝液（Stratagene）、1 μ l の 10 mM dNTP 混合物、1.5 μ l の 5 μ M 順方向プライマー、1.5 μ l の 5 μ M 逆方向プライマー、1 μ l の Stratagene ミニプレップテンプレート、1 μ l の 2.5 単位 / μ l Pfu Turboポリメラーゼ（Stratagene）、および 39 μ l の水から構成された。PCR 反応は、98 で 1 分間のインキュベーション 1 回、続いて 98 で 30 秒間のインキュベーション、64 ~ 72 で 1 分間のインキュベーション（プライマー Tm による）、および 72 で 6 分間のインキュベーションからなる。これらの最後 3 つのステップは、20 回繰り返された。

10

【 0 1 6 3 】

K 9 テンプレートは、ベクター pET22b の Nde I / Xho I 制限部位に挿入された次の核酸配列からなる：

【 化 8 8 】

ATGGATATCGATCCGTATAAAGAATTTGGCGCCACCGTGGAAGCTGCTGAGCTTTCTGCCGAGC
GATTTCTTTCCGAGCGTGCGTGATCTGCTGGATACCGCGAGCGCGTGTATCGCGAAGCGCTG
GAAAGCCCGGAACATTGTAGCCCGCACCATACCGCCCTGCGTCAGGCGATTCTGTGCTGGGGT
GAACTGATGACCCTGGCGACCTGGGTTGGCAACAACCTGTGCGATCCGGCGAGCCGCGATCT
GGTTGTGAACTATGTGAATACCAACATGGGCCTGAAAATTCGTCAGCTGCTGTGGTTTCATAT
CAGCTGCCTGACCTTTGGCCGCGAAACCGTGCTGGAATATCTGGTGAGCTTTGGCGTTTGGAT
CCGTACCCCGCCGGCGTATCGTCCGCCGAATGCGCCGATTCTGAGCACCCTGCCGAAACCAC
CGTTGTGACAAGCTTGC GGCCGCAAAGAAAAAGAAGAAGAAAAAGAAGCTCGAGCAC
CACCACCACCACCAC (配列番号：107)。

20

【表 2】

表 2

尾部変異体	順方向プライマー (5'→3')	逆方向プライマー (5'→3')
F18H	AACTGCTGAGCCATCTGCCGAGCG ATTT (配列番号: 108)	AAATCGCTCGGCAGATGGCTCAGC AGTT (配列番号: 109)
Y132A	TACCCCGCCGGCGGCTCGTCCGCC GAAT (配列番号: 110)	ATTCGGCGGACGAGCCGCCGGCGG GGTA (配列番号: 111)
Y132V	TACCCCGCCGGCGGTTTCGTCCGCCG AAT (配列番号: 112)	ATTCGGCGGACGAACCGCCGGCGG GGTA (配列番号: 113)
Y132I	TACCCCGCCGGCGATTTCGTCCGCCG AAT (配列番号: 114)	ATTCGGCGGACGAATCGCCGGCGG GGTA (配列番号: 115)
Y132F	TACCCCGCCGGCGTFTTCGTCCGCCG AAT (配列番号: 116)	ATTCGGCGGACGAAACGCCGGCGG GGTA (配列番号: 117)
I139A	TCCGCCGAATGCGCCGGCTCTGAG CACCT (配列番号: 118)	AGGGTGCTCAGAGCCGGCGCATTC GGCGGA (配列番号: 119)
S121C	TGGAATATCTGGTGTGCTTTGGCGT TT (配列番号: 120)	AAACGCCAAAGCACACCAGATATT CCA (配列番号: 121)
S141C	ATGCGCCGATTCTGTGCACCCTGCC GGAAA (配列番号: 122)	TTCCCGGCAGGGTGCACAGAATCG GCGCAT (配列番号: 123)
C48A	AGCCCGGAACATGCGAGCCCGCAC CAT (配列番号: 124)	ATGGTGCGGGCTCGCATGTTCCGG GCT (配列番号: 125)
C61A	AGGCGATTCTGGCGTGGGGTGAAC T (配列番号: 126)	AGTTCACCCACGCCAGAATCGCC T (配列番号: 127)
C107A	TTTCATATCAGCGCGCTGACCTTG GCCGCGA (配列番号: 128)	TCGCGGCCAAAGGTCAGCGCGCTG ATATGAAA (配列番号: 129)
C77E D78S	TGGCAACAACCTGGAAAGCCCGGC GAGCCGCGA (配列番号: 130)	TCGCGGCTCGCCGGGCTTCCAGGT TGTTGCCA (配列番号: 131)
C77E D78E	TTGGCAACAACCTGGAAGAACCGG CGAGCCGCGAT (配列番号: 132)	ATCGCGGCTCGCCGGTTCCTCCAGG TGTTGCCA (配列番号: 133)

10

20

30

40

【0164】

PCR生成物は、いずれの未変異のテンプレートを排除するために、37 で1.5時間、制限酵素DpnIで消化された。消化された生成物は1%のアガロースゲルに泳動され、バンドが切り出され、ゲル抽出(Stratagene)を介して精製された。

【0165】

次に、PCR生成物は、大腸菌BL21(DE3)PlysS細胞(Stratagene)に形質転換され、得られたコロニーを1×LBプロス中で成長させ、プラスミドをミニプレップ(Stratagene)を介して精製した。次に、精製したプラスミドは、核酸配列における変化を確認するために配列決定された。この戦略は、単一のアミノ酸変化、またはポリ-ヒスチジntagの除去等の、複数のアミノ酸残基の欠失もしくは挿入に適用され得る(表3に示されるプライマー)。

【表 3】

表 3

	順方向プライマー (5'→3')	逆方向プライマー (5'→3')
His タグ除去	AAGAAAAAGAAGAAGTGAGA TCCGGCT (配列番号: 134)	AGCAGCCGGATCTCACTTCTTCTTT TTCTT (配列番号: 135)

【0166】

実施例 2 : H B V コアタンパク質の発現

本明細書に記載される様々な野生型および修飾コアタンパク質は、次のプロトコル 1 またはプロトコル 2 に従い、発現され、精製された。

【0167】

プロトコル 1 : 完全長 H B V C タンパク質遺伝子を含む p E T - 1 1 a ベクターを、大腸菌 D E 3 細胞に形質転換し、2 ~ 4 % のグルコース、微量元素、および 2 0 0 μ g / m L のカルベニシリンで強化された L B 培地中で 3 7 ° C で成長させた。タンパク質発現は、2 m M の I P T G (イソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシド) を添加することにより誘導された。細胞は、誘導 3 時間後にペレット化することにより採取された。S D S - P A G E は、C タンパク質の発現を評価するために使用された。

【0168】

コアタンパク質は、5 0 m M のトリス - H C I (p H 7 . 4)、1 m M の E D T A、5 m M の D T T、1 m M の A E B S F、0 . 1 m g / m L の D N a s e I、および 0 . 1 m g / m L の R N a s e の溶液に再懸濁することにより、大腸菌から精製された。次に、細胞は、フレンチプレス細胞破砕機 (F r e n c h p r e s s u r e c e l l) を通過させることにより溶解された。懸濁液を 2 6 , 0 0 0 × G で 1 時間遠心分離した。ペレットを廃棄し、0 . 1 5 M の最終濃度になるように固体のスクロースを上清に添加し、1 0 0 , 0 0 0 × G で 1 時間遠心分離した。ペレットを破棄し、次に固体 (N H 4) 2 S O 4 を 4 0 % 飽和の最終濃度に達するように添加した。混合物を 1 時間攪拌し、次に 2 6 , 0 0 0 × G で 1 時間遠心分離した。ペレットを 1 0 0 m M のトリス - H C I (p H 7 . 5)、1 0 0 m M の N a C l、5 0 m M のスクロース、および 2 m M の D T T の溶液 (緩衝液 A) に再懸濁し、緩衝液 A で平衡されたセファロース C L - 4 B (P h a n n a c i a B i o t e c h , P i s c a t a w a y , N J) カラム (直径 5 c m × 9 5 c m) 上に充填した。カラムを 2 m L / 分で溶出した。この精製スキームを用いて、H B V ウイルス性カプシドを大きな凝集物および低分子量の可溶性タンパク質から分離した。クロマトグラフプロファイルおよび S D S - P A G E 分析に従い、画分をプールした。D i a f l o Y M 1 0 0 限外濾過膜 (A m i c o n , B e v e r l y , M A) を用いて約 1 0 m g / m L に限外濾過することにより、溶液を濃縮した。濃縮した C タンパク質を 5 0 m M のトリス - H C I (p H 7 . 5)、および 0 . 1 5 M のスクロースに対して透析した。次に、3 . 5 M の最終濃度に達するように 1 0 N の N a O H および尿素を添加することにより、溶液を p H 9 . 5 に調節した。次に M i l l i p o r e - H A 0 . 4 5 μ m 孔径フィルタ単位 (M i l l i p o r e , B e d f o r d , M A) を用いて溶液を濾過し、1 0 0 m M の重炭酸ナトリウム (p H 9 . 5) および 2 m M の D T T からなる溶液で平衡された S u p e r d e x 7 5 (P h a r m a c i a B i o t e c h , P i s c a t a w a y , N J) のカラム (直径 6 . 0 c m × 6 0 c m) に適用した。カラムを 5 m L / 分で溶出した。S D S - P A G E によって評価された二量体タンパク質を含む画分をプールした。これらの手順は全てのコアタンパク質変異体の発現および精製に使用することができる。代替的に、このタンパク質の発現は、当業者に周知の方法に従い酵母細胞において行うことができる。

【0169】

プロトコル 2 : C 末端 6 - ヒスチジンタグを含む全てのタンパク質構築物は次のように精製された。K 9 タンパク質の遺伝子を含む p E T ベクターを発現のために B L 2 1 (D

10

20

30

40

50

E3) P1yS細胞に維持した。初期培養物を1×Luriaブロス(1×LB)寒天プレート上のコロニーから、または10%のグリセロールストックから播種し、-80で保存した。1×LBを2Lのフラスコ中でオートクレーブし、冷却した。100mgのアンピシリン(Amp)を1×LBに添加した。初期培養物を播種し、200rpmで振盪させながら、最大24時間37で成長させた。

【0170】

0.8Lの2×酵母t-トリプトン(2XYT)ブロスが入った15個の2Lのフラスコをオートクレーブし、1mLの100mg/mL Ampを各フラスコに添加した。次に、50mLの初期培養物を各フラスコに添加した。600nmでの光学密度(OD)が0.4~0.6に達するまで、培養物を200rpmで振盪しながら37でインキュベートした。このプロセスは約2時間かかった。ODが0.4~0.6に達したとき、培養物を1mLの1M IPTGで誘導した。ODが2.0以上に達するまで、振盪をさらに4時間続けた。500mLの遠心分離ボトルで、11,300×Gで8分間遠心分離することにより細胞を採取した。細菌ペレットを50mLの三角管2つに移した。各管に日付/構築物/調製番号のラベルを貼り、-20で凍結した。

10

【0171】

50mL管2つ(それぞれ約20mL)の細胞のペーストを解凍した。次のステップを各管に適用した。40mLの再懸濁緩衝液(5Mの尿素、50mMのNaHCO3(pH9.5)、10mMのイミダゾール)を各管に添加した。細胞を連続ピペット操作により再懸濁し、400mLのビーカーに注いだ。ビーカーの細胞再懸濁液が合計-100mLになるまで、再懸濁緩衝液をさらに添加した。再懸濁された細胞を含むビーカーを氷浴に設置し、Branson probe sonifier(負荷サイクル約40%のパルスモード、および電力設定5)を用いて5分間音波処理した。細胞混合物を数回の間隔で音波処理し、サンプルが室温より高く加熱されたようであれば、氷上で休ませた。細胞可溶化物を合計200mLに2倍希釈し、200μLの100mg/mL DNaseを懸濁液に添加した。この懸濁液を氷上で10分間攪拌した。音波処理ステップは、氷上にある間、さらに5分間繰り返された。可溶化液を50mLのプラスチックの遠心分離管6つに移し、32,000×gで45分間遠心分離した。上清を破棄した。

20

【0172】

精製のために、50mLのNi²⁺-NTAアガロース(Qiagen)カラムを洗浄し、再懸濁緩衝液中で平衡した。カラムの各実行用に、12Lの細胞を溶解した。12Lの細胞からの遠心分離した可溶化液を混合し、再懸濁緩衝液で500mLに希釈した。遠心分離した細胞可溶化液をカラム上に充填し、タンパク質溶液をニッケルマトリクスの上に沈ませた。50mLの再懸濁緩衝液をカラムに通した。任意の塩洗浄は、カラムを250mLのNaCl洗浄緩衝液(5Mの尿素、50mMのNaHCO3(pH9.5)、20mMのイミダゾール、250mMのNaCl)で洗浄することにより実施され得る。この塩洗浄は、最終精製タンパク質のA260/A280比率を値0.1A.U減少させた。カラムを250mLの洗浄緩衝液(5Mの尿素、50mMのNaHCO3(pH9.5)、20mMのイミダゾール)で洗浄した。その後、200mLの溶出緩衝液(5Mの尿素、2mMのNaHCO3(pH9.5)、250mMのイミダゾール)をカラムに通した。画分を5mL毎に収集し、それらのうち、8つの画分のうちの5つがタンパク質を含んだ。

30

40

【0173】

タンパク質の存在および/または濃度は、画分の吸光度を測定することによって検出された。純度を決定するために、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS PAGE)分析をタンパク質に対して実施した。タンパク質を含む画分をプールし、透析管に移した。透析を4で少なくとも4時間、4Lの保存緩衝液(5Mの尿素、1mMのEDTA、2mMのNaHCO3(pH9.5))において実施した。次に、タンパク質をAmicon攪拌型細胞濃縮器(Millipore)において、最大75mg/mLの最終タンパク質濃度に濃縮した。12Lの細胞成長は、約500mgの純タンパク質をもたら

50

した。純透析タンパク質は、-80 で6~8ヶ月間保存された。

【0174】

実施例3：修飾HBVコアタンパク質の集合および精製

この実施例は、修飾HBVコアタンパク質から生成された集合および精製カプシドを形成するための一般方法を説明する。プロトコル1では、修飾HBVコアタンパク質は、修飾HBVコアタンパク質、および溶液中の変性剤の量を減少させるための希釈ステップなしの変性剤を含む溶液に還元剤を添加した後、カプシド構造に自己集合した。プロトコル2では、修飾HBVコアタンパク質は、修飾HBVコアタンパク質、および溶液中の変性剤の濃度を減少させるための希釈ステップがある変性剤を含む溶液に還元剤を添加した後、カプシド構造に自己集合した。プロトコル3では、修飾HBVコアタンパク質は、還元剤を添加せず、修飾HBVコアタンパク質を含む溶液中の変性剤の希釈後にカプシド構造に自己集合した。

10

【0175】

理論に拘束されるものではないが、還元剤の存在下で強いケージを形成することができるHBVコアタンパク質変異体は、プロトコル1を用いてカプシドに集合するが、一方、弱いケージを形成する変異体、例えば二量体-二量体界面で変異が存在するため、プロトコル2および3を用いてカプシドに集合する。

プロトコル1：還元剤に曝露することによるウイルス性カプシドの自己集合の方法

【0176】

4M~6Mの尿素のタンパク質保存緩衝液中で保存された修飾HBVコアタンパク質を室温で30分間解凍した。-20で保存されたsiRNAも30分間解凍した。32mgの修飾HBVコアタンパク質を測定し、コアタンパク質単量体当たり0.1siRNAの割合でsiRNAをタンパク質に添加し、60分間結合させた。10モル当量の13-メルカプトエタノールをsiRNAタンパク質溶液に添加し、15分間還元させ、カプシド構造を形成させた。さらに10モル当量の13-メルカプトエタノールを溶液に添加し、少なくとも12時間平衡した。

20

【0177】

集合カプシド構造を含む溶液を0.2ミクロンのポリエーテルスルホンシリンジフィルタ(Nalgene 25mmディスク)で濾過した。DSB2緩衝液(1Mの尿素、25mMのグリシン、20mMのNaCl、1mMのEDTA、pH9.5)の移動相を含む固定相セファロースCL-6B(16x300mm)カラムを用いて、集合カプシド構造をAktapurification System上で精製した。20~32mLの溶出液を用いて、画分を収集し、プールした。プールした画分を0.2ミクロンのポリエーテルスルホンシリンジフィルタ(Nalgene 25mmディスク)で濾過した。次に、一部の集合カプシド構造は表面官能化を受けた。

30

【0178】

プロトコル1は、E77C変異を有する修飾HBVコアタンパク質(CP183)；E77C変異およびK5(配列番号60)、K7(配列番号61)、K9(配列番号62)、K10(配列番号63)、K11(配列番号64)、K13(配列番号65)、K20(配列番号66)、K4-5(配列番号67)、KA9(配列番号68)、またはKG9(配列番号69)尾部を含むポリ-リジン尾部を有するCP149タンパク質(配列番号2変異形に基づく)；K9尾部分(配列番号77)を有するE77C、S121C、およびS141Cに変異を有するCP149タンパク質(配列番号2変異形に基づく)；K9尾部分(配列番号75)を有するE77C、C48A、C61A、およびC107Aに変異を有するCP149タンパク質(配列番号2変異形に基づく)；E77Cに変異を有するCP162タンパク質(配列番号2変異形に基づく)；

40

【化89】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFPFSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETT VVR RRRGRSPRRRT PSLEHHHHHHH (配列番号：138)、

50

E 7 7 C および F 1 2 2 1 1 で変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）：

【化 9 0】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SHGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETT VVR RRGSRPRRT PSLEHHHHHH (配列番号：139)、および

E 7 7 C および E 1 4 1 1 で変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）：

【化 9 1】

MDIDPYKEFG ATVHLLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETT VVR RRGSRPRRT PSLEHHHHHH (配列番号：140)。

を含む修飾 H B V コアタンパク質を用いてカプシド構造を集合させるために使用され得る。

【0179】

プロトコル 2：還元剤への曝露および変性剤の希釈によるウイルス性カプシドの自己集合の方法

4 M ~ 6 M の尿素のタンパク質保存緩衝液中で保存された修飾 H B V コアタンパク質を室温で 30 分間解凍した。- 20 で保存された S i R N A も 30 分間解凍した。32 mg の修飾 H B V コアタンパク質を測定し、タンパク質単量体当たり 0.1 s i R N A の割合で s i R N A をタンパク質に添加し、60 分間結合させた。10 モル当量の 13 -メルカプトエタノールを s i R N A タンパク質溶液に添加し、15 分間還元させ、カプシド構造を形成させた。次に、1 ml の D S B 2 緩衝液（1 M の尿素、25 mM のグリシン、20 mM の N a C l、1 mM の E D T A、p H 9.5）を溶液に添加し、15 分間平衡した。1 ml の 1 x T A E 緩衝液（40 mM のトリス酢酸塩、1 mM の E D T A、p H 8.8）を溶液に添加し、続いて 15 分間平衡した。1 ml の 0.5 x P B S (p H 9.5) を溶液に添加して、続いて 15 分間平衡した。尿素の最終濃度は 1.25 M であった。さらに 10 モル当量の 13 -メルカプトエタノールを溶液に添加し、少なくとも 12 時間平衡した。

【0180】

集合カプシド構造を含む溶液を 0.2 ミクロンのポリエーテルスルホンシリンジフィルタ (Nal gene 25 mm ディスク) で濾過した。D S B 2 緩衝液の移動相を含む固定相セファロース C L - 6 B (16 x 300 mm) カラムを用いて、集合カプシド構造を A k t a P u r i f i c a t i o n S y s t e m 上で精製した。20 ~ 32 mL の溶出液を用いて、画分を収集し、プールした。プールした画分を 0.2 ミクロンのポリエーテルスルホンシリンジフィルタ (Nal gene 25 mm ディスク) で濾過した。次に、一部の集合カプシド構造は表面官能化を受けた。

【0181】

プロトコル 2 は、K 9 尾部分を有する E 7 7 C および F 1 8 H に変異を有する C P 1 4 9 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）（配列番号 70）；K 9 尾部分を有する E 7 7 C および Y 1 3 2 F に変異を有する C P 1 4 9 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）（配列番号 137）；K 9 尾部分を有する E 7 7 C および Y 1 3 2 I に変異を有する C P 1 4 9 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）（配列番号 136）；K 9 尾部分を有する E 7 7 C および Y 1 3 2 V に変異を有する C P 1 4 9 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）（配列番号 72）；K 9 尾部分を有する E 7 7 C、F 1 8 H、S 1 2 1 C、および S 1 4 1 C に変異を有する C P 1 4 9 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）（配列番号 79）を含む修飾 H B V コアタンパク質を用いてカプシド構造を集合するために使用された。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 2 】

プロトコル 2 は次の H B V コアタンパク質を集合させるためにも使用された：

E 7 7 C および F 1 8 H 変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）

【 化 9 2 】

MDIDPYKEFG ATVELLSHLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRRT PSLEHHHHHHH（配列番号：141）、

E 7 7 C および Y 1 3 2 F 変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく） 10

【 化 9 3 】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AFRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRRT PSLEHHHHHHH（配列番号：142）、

E 7 7 C および A 1 3 7 H 変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）

【 化 9 4 】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNHPIL STLPETTVVR RRGSRPRRRT PSLEHHHHHHH（配列番号：143）、

20

E 7 7 C および Y 1 1 8 H 変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）

【 化 9 5 】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEHLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRRT PSLEHHHHHHH（配列番号：144）、

30

E 7 7 C および L 3 7 1 1 変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）

【 化 9 6 】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFFPSVRDL LDTASAHYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRRT PSLEHHHHHHH（配列番号：145）、

E 7 7 C、C 1 7 1 および F 1 8 1 1 変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）

【 化 9 7 】

MDIDPYKEFG ATVELLSHLP SDFFPSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVVR RRGSRPRRRT PSLEHHHHHHH C

40

（配列番号：146）、および

E 7 7 C、C 1 7 1 および A 1 3 7 H 変異を有する C P 1 6 2 タンパク質（配列番号 2 変異形に基づく）

【化98】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFPFSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL
 CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV
 SFGVWIRTPP AYRPPNHPIL STLPETTVVR RRRGRSPRRRT PSLEHHHHHH C (配列番号：147)。

【0183】

プロトコル3：変性剤の希釈によるウイルス性カプシドの自己集合の方法

4 M ~ 6 M の尿素のタンパク質保存緩衝液中で保存された修飾HBVコアタンパク質を室温で30分間解凍した。-20℃で保存されたsiRNAも30分間解凍した。32 mg の修飾HBVコアタンパク質を測定し、タンパク質単量体当たり0.1 siRNA の割合でsiRNAをタンパク質に添加し、60分間結合させた。1 ml のDSB2緩衝液(1 M の尿素、25 mM のグリシン、20 mM のNaCl、1 mM のEDTA、pH 9.5)をsiRNAタンパク質溶液に添加し、15分間平衡し、カプシド構造を形成させた。1 ml のDSB2緩衝液の添加、続く15分間の平衡化はさらに2回繰り返され、合計3回のサイクルであった。尿素の最終濃度は1.25 M であった。3回のサイクル後、溶液を少なくとも12時間平衡した。

10

【0184】

集合カプシド構造を含む溶液を0.2ミクロンのポリエーテルスルホンシリンジフィルタ(Nalgene 25 mm ディスク)で濾過した。DSB2緩衝液の移動相を含む固定相セファロースCL-6B(16 x 300 mm)カラムを用いて、集合カプシド構造をAkta Purification System 上で精製した。20 ~ 32 mL の溶出液を用いて、画分を収集し、プールした。プールした画分を0.2ミクロンのポリエーテルスルホンシリンジフィルタ(Nalgene 25 mm ディスク)で濾過した。次に、一部の集合カプシド構造は表面官能化を受けた。

20

【0185】

プロトコル3は、E77K変異およびK9尾部(配列番号81)を有するCP149タンパク質(配列番号2変異形に基づく)を含む修飾HBVコアタンパク質を用いてカプシド構造を集合させるために使用された。

【0186】

実施例4：ウイルス性カプシド集合を監視するための動的光散乱測定

この実施例は、実施例3に記載されるプロトコル1~3を用いて、動的光散乱(DLS)によりウイルス性カプシド構造の半径を測定する。DLSは、溶液中の小さい(サブマイクロメートル)粒子の大きさの特性を検査するためのツールである。

30

【0187】

図2は、実施例3のプロトコル1に記載される、タンパク質(E77C変異およびK9尾部を有する修飾HBVコアタンパク質CP149(配列番号62))および阻害dsRNA溶液に10モル当量のBMEを添加した後の時間の関数としての粒子半径の動的光散乱(DLS)のプロットを示す。データは、粒径の変化により示されるように、ケージ形成がBMEの存在に依存することを示す。

【0188】

図3は、実施例3のプロトコル1に記載される、BMEを溶液(E77C変異を有する修飾HBVコアタンパク質CP162(配列番号138))および阻害dsRNA(20 siRNA/ケージ)溶液を添加した後の時間の関数としての、粒子半径(nm)(右側の垂直軸、暗いデータ点)およびシグナル強度(CPS)(左側の垂直軸、淡いデータ点)のDLSプロットを示す。カプシド集合は、粒子半径が約15~20 nm に変化したことにより示されるように、100~150分で観察された。

40

【0189】

図4は、実施例3のプロトコル1に記載される、10モル当量のBMEをタンパク質(E77C、C48A、C61A、およびC107A変異を有する修飾HBVコアタンパク質CP149(配列番号75))および阻害dsRNA溶液を添加した後の時間の関数と

50

しての、粒子半径 (nm) (右側の垂直軸、暗いデータ点) およびシグナル強度 (CPS) (左側の垂直軸、淡いデータ点) の DLS プロットを示す。(A) 阻害 dsRNA (0.1 当量) を、2.5 M の尿素濃度を有する溶液に添加した。(B) カプシド集合は、粒子半径が約 20 nm に変化したことにより示されるように、BME の添加後、3000 ~ 4000 秒で観察された。(C) pH 9.5 で、0.5 x PBS で 1.25 M に尿素濃度を低下させることにより、さらなるカプシドの形成を促進したが、カプシドを形成する必要はなかった。

【0190】

図 5 は、実施例 3 のプロトコル 2 に記載される、10 モル当量の BME をタンパク質 (K9 尾部を有する E77C および F1811 変異を有する修飾 HBV コアタンパク質 CP149 (配列番号 70)) および阻害 dsRNA 溶液を添加した後の時間の関数としての、粒子半径 (nm) (右側の垂直軸、暗いデータ点) およびシグナル強度 (CPS) (左側の垂直軸、淡いデータ点) の DLS プロットを示す。(A) 阻害 dsRNA (0.1 当量) を、2.5 M の尿素濃度を有する溶液に添加した。(B) 10 モル当量の BME を添加した。(C) カプシド集合は、粒子半径が約 15 ~ 20 nm に変化したことにより示されるように、尿素を 0.5 x PBS (pH 9.5) で 1.25 M に希釈した後、秒で観察された。

10

【0191】

図 6 は、実施例 3 のプロトコル 2 に記載される、10 モル当量の BME をタンパク質 (K9 尾部を有する E77C および Y132F 変異を有する修飾 HBV コアタンパク質 CP149 (配列番号 137)) および阻害 dsRNA 溶液を添加した後の時間の関数としての、粒子半径 (nm) (右側の垂直軸、暗いデータ点) およびシグナル強度 (CPS) (左側の垂直軸、淡いデータ点) の DLS プロットを示す。(A) 阻害 dsRNA (0.1 当量) を、2.5 M の尿素濃度を有する溶液に添加した。(B) 10 モル当量の BME を添加した。(C) カプシド集合は、粒子半径が約 15 ~ 20 nm に変化したことにより示されるように、尿素を 0.5 x PBS (pH 9.5) で 1.25 M に希釈した後に観察された。

20

【0192】

図 7 は、実施例 3 のプロトコル 2 に記載される、10 モル当量の BME をタンパク質 (E77C および Y132F 変異を有する修飾 HBV コアタンパク質 CP162 (配列番号 142)) および阻害 dsRNA 溶液を添加した後の時間の関数としての、粒子半径 (nm) (右側の垂直軸、暗いデータ点) およびシグナル強度 (CPS) (左側の垂直軸、淡いデータ点) の DLS プロットを示す。阻害 dsRNA (0.1 当量) を添加し、溶液を 2.5 M の尿素濃度に希釈した (ステップ 2)。10 モル当量の BME を添加した (ステップ 3)。カプシド集合は、粒子半径が約 15 ~ 20 nm に変化したことにより示されるように、尿素を 0.5 x PBS (pH 9.5) で 1.25 M に希釈した後、秒で観察された (ステップ 4 ~ 6)。

30

【0193】

図 8 は、各ケージ形成反応成分を、監視されるタンパク質溶液に添加した後の時間の関数としての、粒子半径 (nm) (右側の垂直軸、暗いデータ点) およびシグナル強度 (CPS) (左側の垂直軸、淡いデータ点) の DLS プロットを示す。簡潔に、実施例 3 のプロトコル 3 に記載されるように、6 M の尿素を含むタンパク質保存緩衝液中で -80 で保存された修飾 HBV コアタンパク質 (K9 尾部を有する E77K 変異 (配列番号 81)) (38.4 mg/mL ストック) を 30 分間解凍し、100 μL をキュベット (cuvette) に設置した (A)。次の反応成分が順次キュベットに添加され、大きさおよび強度の両方が各添加間で測定された: 3.75 μL のヘパリン (100 mg/mL ストック) (B); 100 μL の DS B2 緩衝液 (1 M の尿素、25 mM のグリシン、20 mM の NaCl、1 mM の EDTA、pH 9.5) (C); 100 μL の 0.5 x PBS、pH 9.5 (D)、および 100 μL の 1 x PBS、pH 7.4 (E)。粒子の半径測定値は、HBV カプシドの形成と一致した。十分に形成されたケージは、系を含む最初の P

40

50

B S の添加後に初めて検出された。これらのデータは、これらの E 7 7 K / K 9 ナノケージの形成が尿素の希釈に依存することを示唆する。対照として、ナノケージが形成された後、1.5 μ L の 1.42 M (3 M E が反応混合物に添加された (F))。粒径は、還元剤の添加により変化せず、またサンプルの強度も変化せず、ケージ形成プロセスが溶液の酸化還元状態の制御下でないことを示す。

【0194】

図9は、負に荷電されたポリマーの不在下で、各ケージ形成反応成分をタンパク質溶液に添加した後の時間の関数としての、粒子半径 (右側の垂直軸、暗いデータ点) およびシグナル強度 (左側の垂直軸、淡いデータ点) の D L S プロットを示す。E 7 7 C 変異を有する修飾 H B V コアタンパク質 C P 1 4 9 がこの実験に使用された:

【化99】

MDIDPYKEFG ATVELLSFLP SDFPFSVRDL LDTASALYRE ALESPEHCSP HHTALRQAIL

CWGELMTLAT WVGNNLCDPA SRDLVVNYVN TNMGLKIRQL LWFHISCLTF GRETVLEYLV

SFGVWIRTPP AYRPPNAPIL STLPETTVE HHHHHH (配列番号: 148)。

【0195】

簡潔に、6 M の尿素を含むタンパク質保存緩衝液中で - 8 0 で保存した E 7 7 C 変異を有する修飾 H B V コアタンパク質 C P 1 4 9 (38.4 mg / mL ストック) を 3 0 分間解凍し、100 μ L をキュベットに設置した。次の反応成分が順次キュベットに添加され、大きさおよび強度の両方が各添加間で測定された: d H 2 0 (ポリマーの容量を置換する) (B); 10 M 当量の B M E (C); 100 μ L の D S B 2 緩衝液 (1 M の尿素、25 mM のグリシン、20 mM の N a C l、1 mM の E D T A、p H 9.5) (D); 100 μ L の 0.5 x P B S、p H 9.5 (E); および 100 μ L の 0.5 x P B S、p H 7.4 (各添加後の平衡ステップ後 5 回、100 μ L を添加) (F = J)。粒子の半径測定値は、H B V カプシドの形成と一致した。十分に形成されたケージは、集合反応物に 3 回目の P B S を添加した後に初めて検出された (ステップ H を参照)。これらのデータは、C P 1 4 9 が負に荷電されたポリマーの不在下でケージを形成することを示唆する。

【0196】

精製された治療用粒子の溶液は、予測された物質が得られたかを確認するために分析された。データは、大きさ排除カラムにより精製された選択画分が単分散されたことを示す。表4は、集合プロセス中修飾 H B V コア (例えば後にケージ形成後に被覆された脂質である、E 7 7 C 変異および K 9 尾部を有する C P 1 4 9) に関して得られたデータを示す。

。

10

20

30

【表 4】

表 4

集合方法	粒径 半径 (nm)	粒径 標準偏差 (nm)	多分散性 (パーセント)
タンパク質の解凍	検出されず	該当せず	該当せず
タンパク質の希釈	検出されず	該当せず	該当せず
siRNA を添加	59.7	10.5	8.0
還元剤 (例えば BME) を添加	21.6	3.6	11.0
カプシド溶液の脱塩	19.3	0.9	8.6
PE-マレイミドを添加	23.9	1.2	11.1
スルフヒドリルを NEM でキャッピング	23.9	1.7	13.3
脂質で被覆	33.2	3.5	8.4
シリンジフィルタ	31.6	2.2	10.8

10

20

【 0 1 9 7 】

実施例 5 : カプシド形成の速度

この実施例は、様々な還元条件下でのカプシド形成の速度を測定する。

【 0 1 9 8 】

カプシド形成の速度は、修飾 H B V タンパク質溶液に添加された還元剤の量に基づき制御され得る。修飾 H B V タンパク質二量体は、変性溶液の存在下で開口または固定状態に維持される。図 10 に示されるように、13 -メルカプトエタノール (B M E) の増加濃度が、s i R N A タンパク質溶液に添加された (すなわち、4 ×、10 ×、および 40 × B M E)。カプシド形成の速度は、カプシドの半径が経時的に測定された動的光散乱を用いて測定された。データは、ケージ形成の速度が溶液中の B M E の濃度に依存することを示す。4 × B M E で、集合カプシドは 42 . 9 分の $t_{i/2}$ で、10 × B M E では、2 . 5 分の $t_{i/2}$ で、40 × B M E では、1 . 6 分の $t_{i/2}$ で形成された。

30

【表 5】

表 5

4X			10X			40X		
y=m1 + m2*exp(-m3*x)			y=m1 + m2*exp(-m3*x)			y=m1 + m2*exp(-m3*x)		
	値	誤差		値	誤差		値	誤差
m1	23.876	0.080147	m1	25.008	1.5874	m1	18.769	0.10072
m2	68.747	0.67357	m2	78.539	14.606	m2	33.012	0.7372
m3	1.0311	0.017611	m3	16.819	3.8046	m3	26.912	1.2126
chisq	179.1	該当せず	chisq	748.35	該当せず	chisq	31.544	該当せず
R ²	0.98883	該当せず	R ²	0.80237	該当せず	R ²	0.97571	該当せず

10

【 0 1 9 9 】

表 5 および 10 の結果は、カプシド集合の速度は、BME 濃度の増加とともに増加することを示す。

20

【 0 2 0 0 】

カプシド形成の速度は、修飾 HBV コアタンパク質のある変異の存在によっても影響を受けた。図 11 に示されるように、修飾 HBV コアタンパク質、例えば K9 尾部を有する E77C、C48A、C61A、および C107A 変異（配列番号 75）を有する CP149 は、E77C 変異および K9 尾部を有する修飾 HBV コアタンパク質（配列番号 62）より速くカプシドを形成した。両方の修飾 HBV コアタンパク質は、配列番号 2 変異形に基づいた。

【 0 2 0 1 】

参考文献の組み込み

30

下に列挙されるそれらの項目を含む本明細書に記載される全ての刊行物および特許は、各個別の刊行物または特許が具体的かつ個別に参照により組み込まれるかのように、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、本明細書のいずれの定義を含む本願が優先する。

【 0 2 0 2 】

米国特許第 7,964,196 号、米国特許公開第 US 2007-0269370 号、および第 2009-0226525 号、ならびに PCT 特許出願公開第 W02010/120874 号。

【 0 2 0 3 】

等価物

40

対象発明の具体的な実施形態が論じられたが、上の明細書は例示的なものであり、限定的なものではない。本発明の多くの変形は、本明細書を見直すことにより当業者には明らかとなるであろう。本発明の全範囲は、等価物のそれらの全範囲と共に特許請求の範囲、およびそのような変形と共に本明細書を参照することにより決定されるべきである。特許請求の範囲の等価の意味および範囲内に入る全ての変更は、それらの範囲内に包含される。

【 0 2 0 4 】

特に記載のない限り、本明細書および特許請求の範囲に使用される成分の量、反応条件等を表す全ての数字は、全ての場合において、用語「約」によって修飾されるものと理解されるものとする。したがって、逆が示されない限り、本明細書および添付の特許請求の

50

範囲に記載される数的パラメータは、本発明により得られることが求められる所望される性質により変動し得る近似である。

【0205】

本発明を記載する文脈において（具体的には、次の特許請求の範囲の文脈において）使用される、用語「a」、および「an」、ならびに「the」は、本明細書に記載されない限り、または文脈により明確に矛盾しない限り、単数形および複数形の両方を網羅すると解釈されるものとする。本明細書における値の範囲の記述は、単に、範囲内に入る各別個の値を個別に参照する簡潔な方法として機能することが意図される。本明細書において特に記載の限り、各個別の値は、本明細書に個別に列挙されるかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に特に記載のない限り、ないしは別の方法で文脈により明確に矛盾しない限り、いずれの好適な順序で実施され得る。本明細書に提供されるいずれのおよび全ての実施例または例示的な言語（例えば「等」）の使用は、単に本発明をより良く明らかにすることが意図され、主張されなければ、本発明の範囲を制限するものではない。本明細書における言語は、本発明の實踐に不可欠ないずれの主張されない要素を示すものと解釈されるべきではない。

10

【0206】

本明細書を通して、「一実施形態（one embodiment）」、「1つの実施形態（an embodiment）」、または類似する言語への参照は、実施形態に関連して記載される特定の特徵、構造、または特性が本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。よって、本明細書を通して、句「一実施形態では」、「1つの実施形態では」、および類似する言語の出現は全て、必ずではないが、同じ実施形態を指し得る。

20

【0207】

さらに、記載される本発明の特徵、構造、または特性は、1つ以上の実施形態において、いずれの好適な様式で組み合わせられ得る。次の説明において、多くの具体的な詳細が提供される。しかしながら、当業者は、本発明が具体的な詳細のうちの1つ以上なしに、または他の方法、成分、材料等と共に実践され得ることを認識する。他の場合では、当該技術分野において既知の構造、材料、または操作は、本発明の態様を曖昧にするのを避けるため、示されないか、または詳述されない。

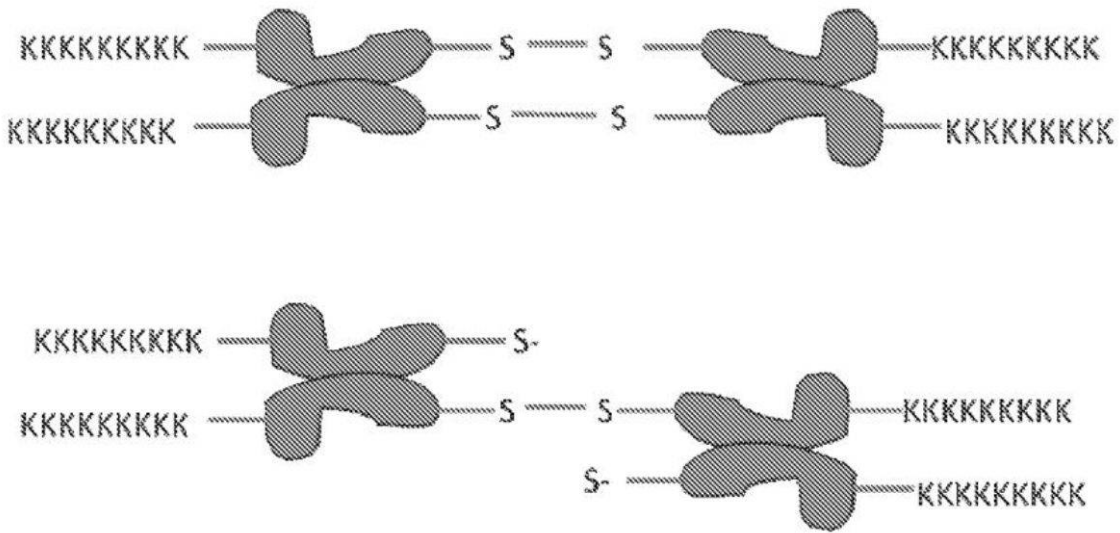
【0208】

本発明は、その趣旨または本質的な特性から逸脱することなく、他の具体的な形態に具体化され得る。記載される実施形態は、全ての点において、単に例示的であり、限定的ではないと考慮されるものとする。したがって、本発明の範囲は、前述の説明ではなく、むしろ付属の特許請求により示される。

30

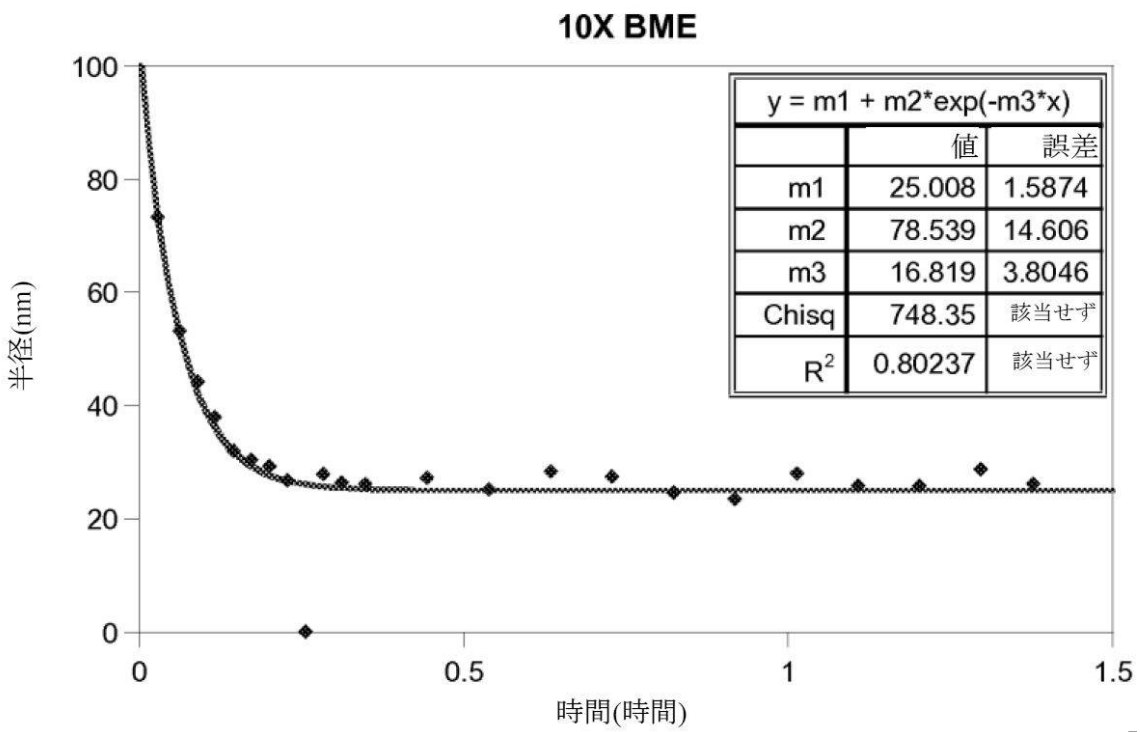
【 図 1 】

【 図 1 】

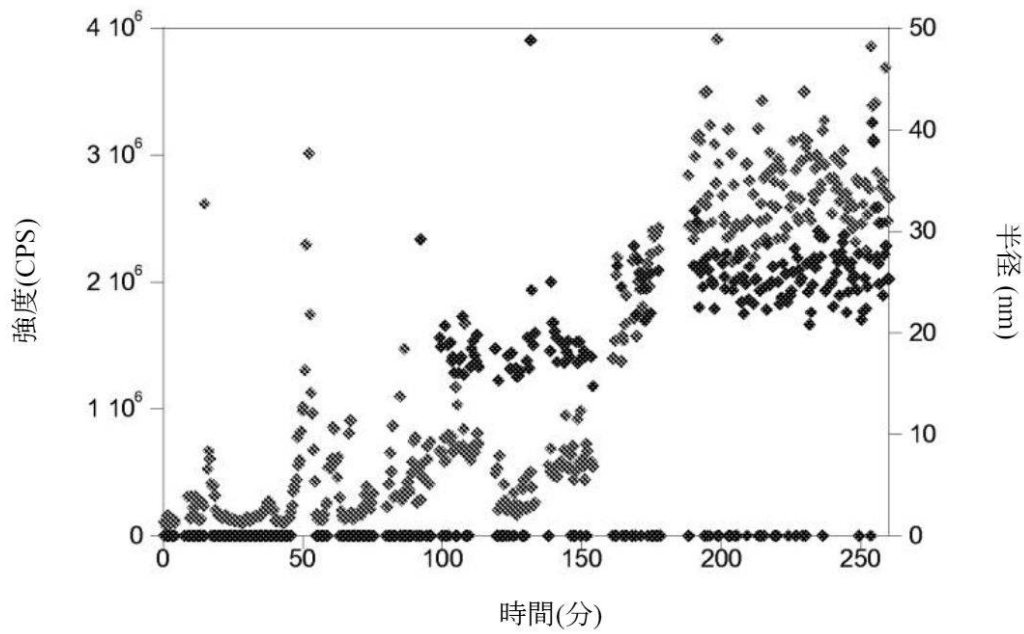


【 図 2 】

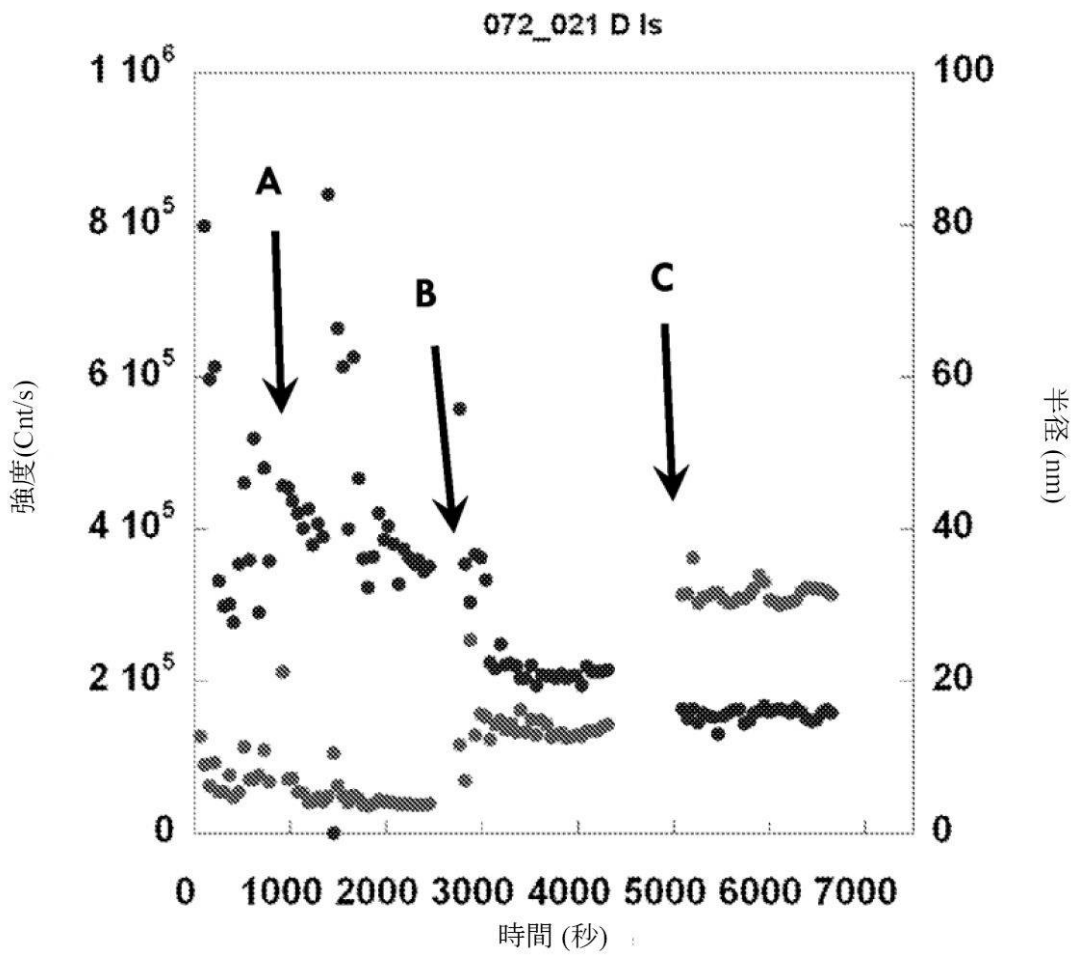
【 図 2 】



【 図 3 】
【 図 3 】

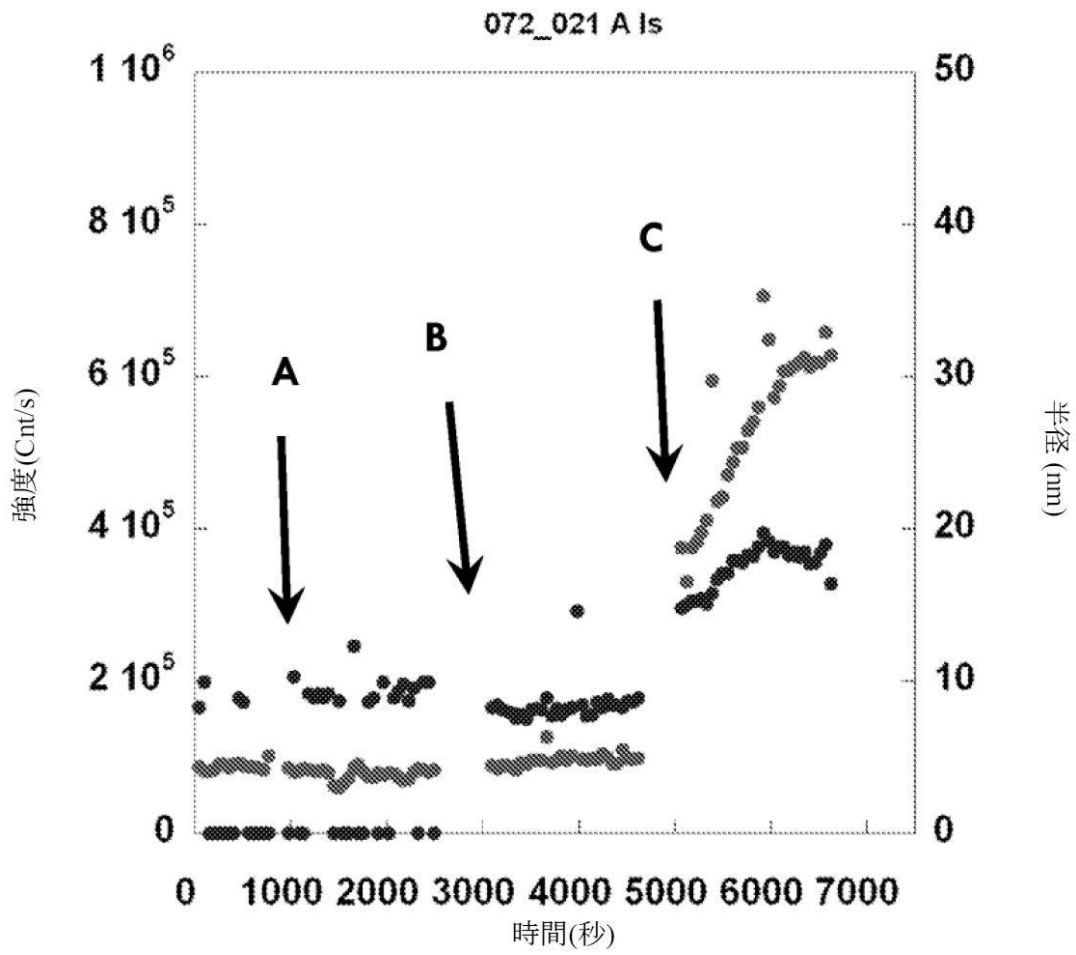


【 図 4 】
【 図 4 】



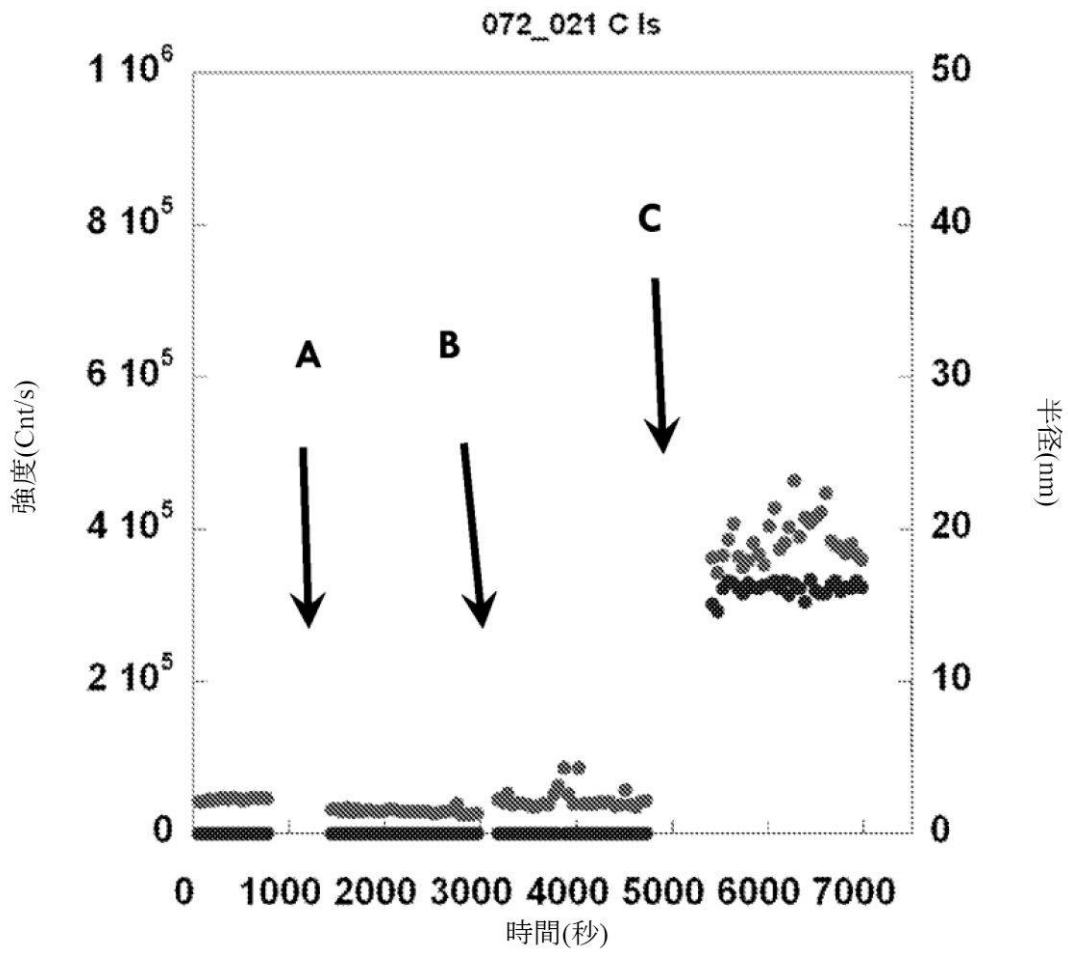
【図5】

【図5】



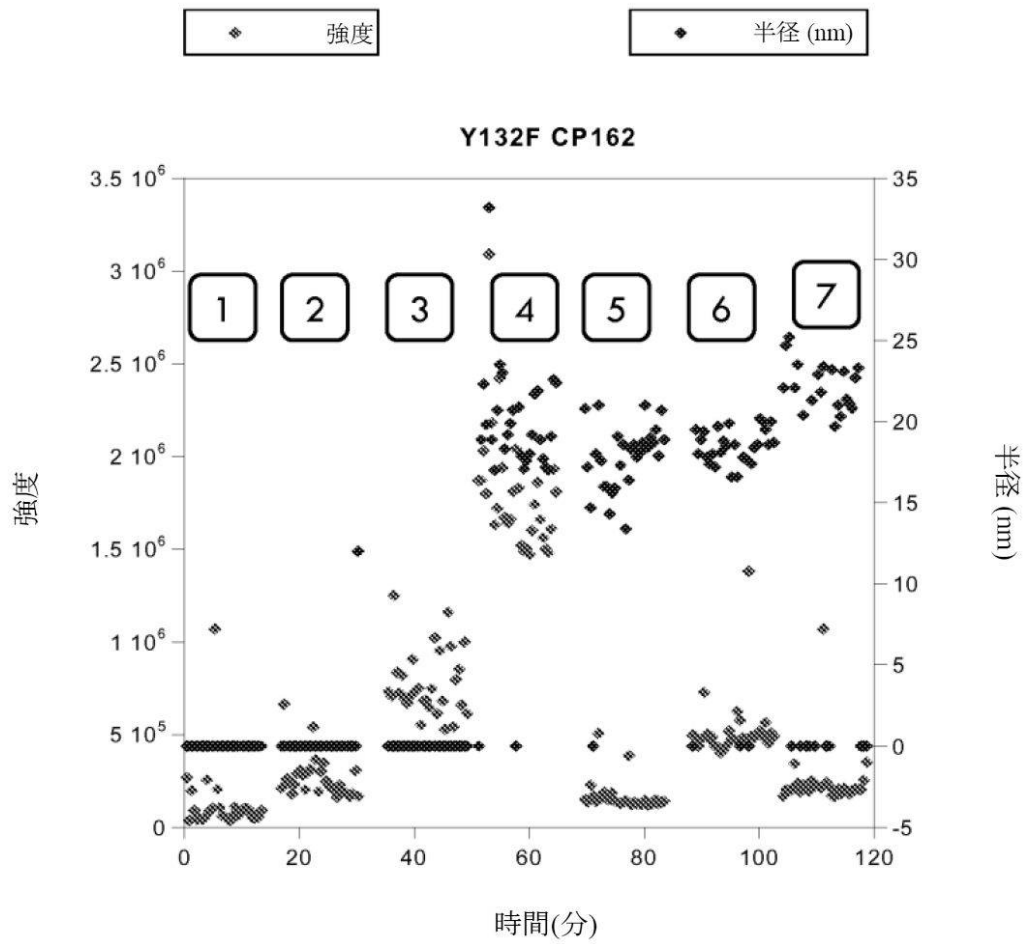
【図6】

【図6】



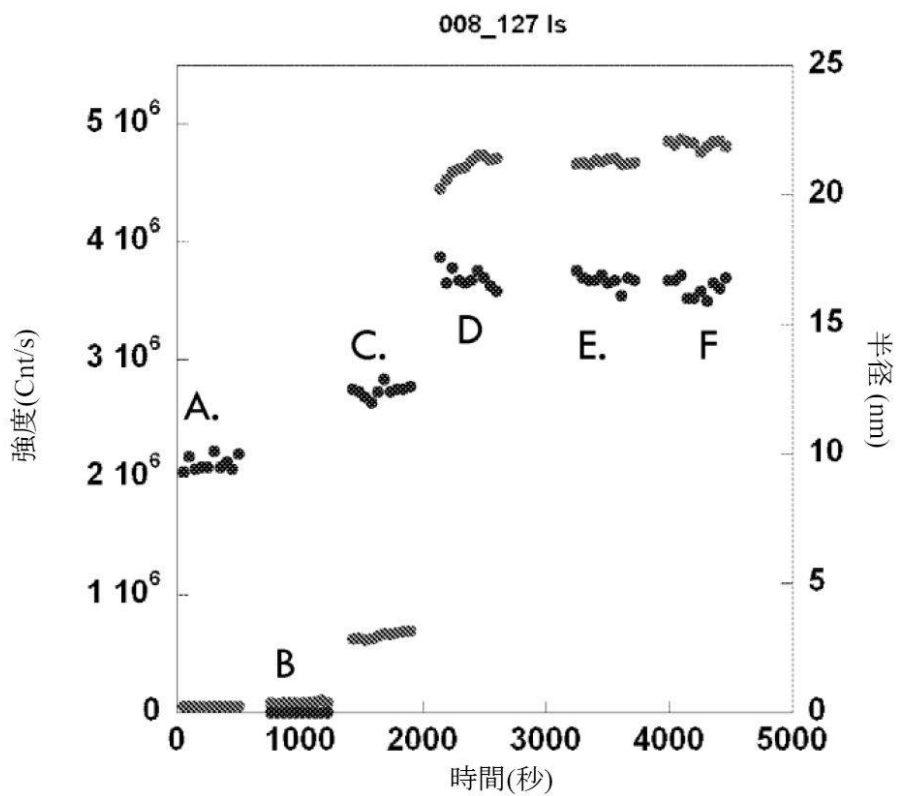
【 図 7 】

【 図 7 】



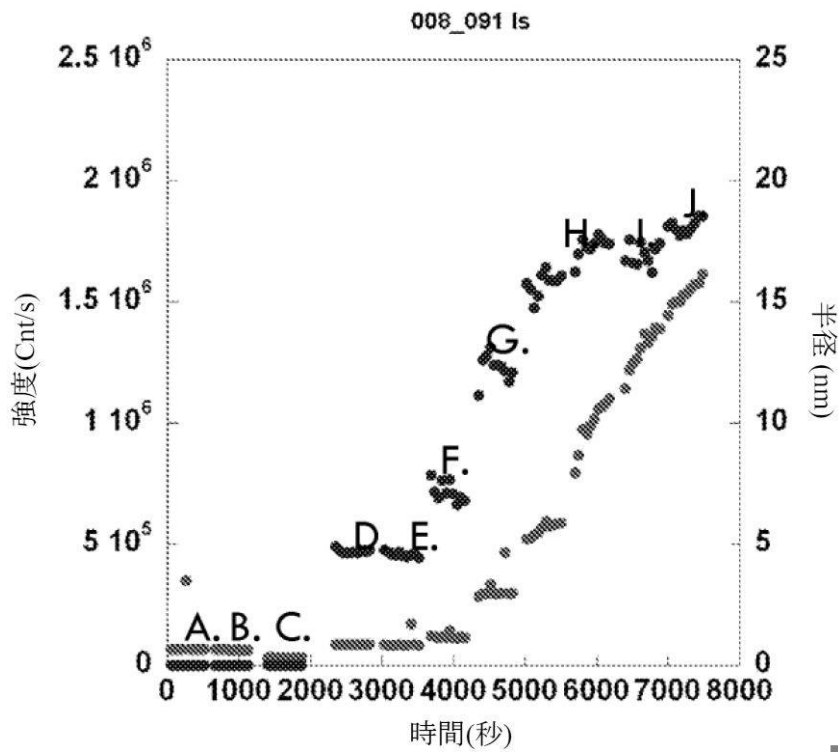
【 図 8 】

【 図 8 】



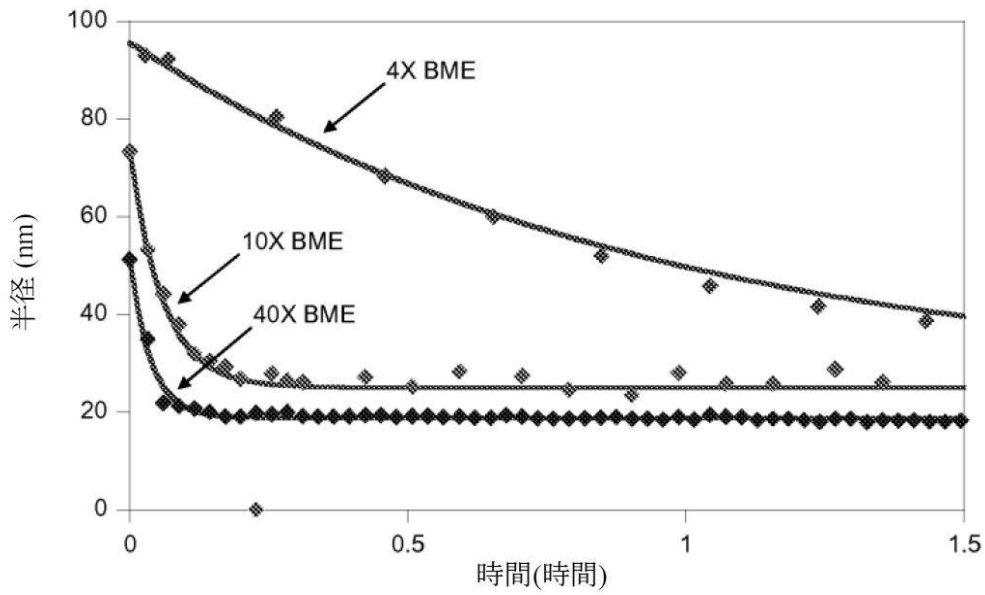
【 図 9 】

【 図 9 】



【 図 1 0 】

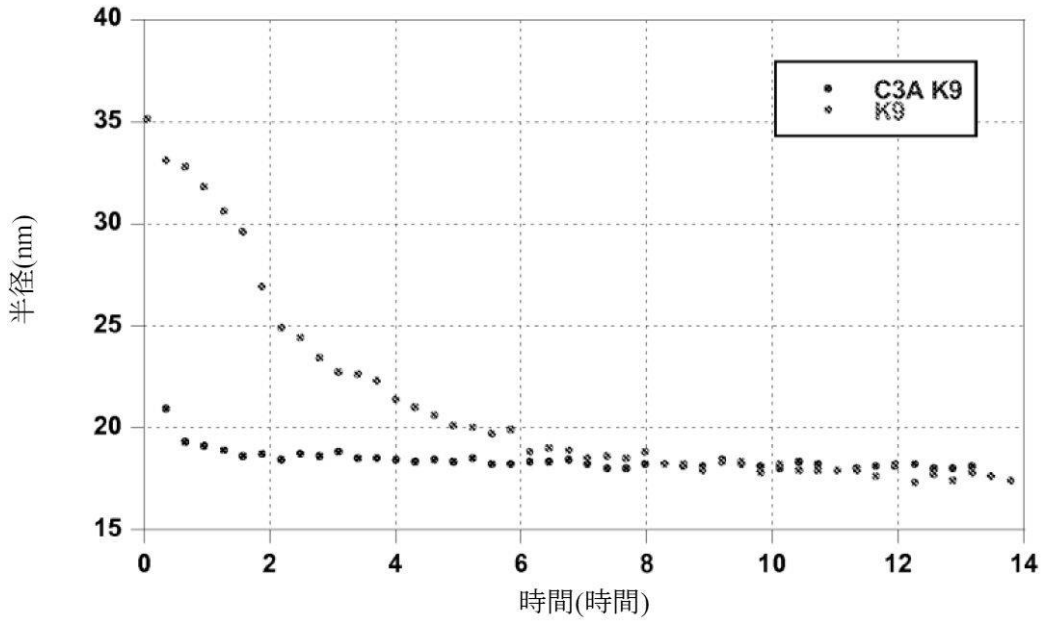
【 図 1 0 】



【図 1 1】

【図 1 1】



ケージ形成速度比較



【配列表】

2014527072000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/054534
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 31/12(2006.01)i, A61P 31/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 38/17; A61K 39/395; A61K 9/14; A61K 51/00; C07K 14/00; A61K 39/12; C12Q 1/68		
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) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: HBV core protein, nanocage, drug delivery, denaturing agent, reducing agent, betamercaptoethanol, urea, guanidine		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009-0226525 A1 (DE LOS RIOS, M. et al.) 10 September 2009 See paragraphs [0040]-[0112], [0120]-[0132], [0190]-[0193], [0210]-[0213]; claims.	1-12, 16-39
A	US 2007-0269370 A1 (DAVIS, C.G. et al.) 22 November 2007 See Examples 1-2.	1-12, 16-39
A	US 2006-0292174 A1 (DE LOS RIOS, M. et al) 28 December 2006 See the whole document.	1-12, 16-39
<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 25 April 2013 (25.04.2013)		Date of mailing of the international search report 29 April 2013 (29.04.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LEE, Soo Jung Telephone No. 82-42-481-8158 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/054534

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.: 40
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 40 pertains to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.: 13-15
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 13-14 are worded in reference to the drug of claim 1. However, said drug has not been worded in claim 1. Claim 15 is dependent on claim 14. Therefore, claims 13-15 do not clearly define the matter for which protection is sought (PCT Article 6).
3. Claims Nos.:
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

International application No.

PCT/US2012/054534

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/054534

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0226525 A1	10.09.2009	AU 2008-236566 A1	16.10.2008
		CA 2683063 A1	16.10.2008
		EP 2134740 A2	23.12.2009
		WO 2008-124165 A2	16.10.2008
		WO 2008-124165 A3	16.10.2008
		WO 2008-124165 A3	04.12.2008
		WO 2008-124165 A9	16.10.2008
		WO 2008-124165 A9	30.04.2009
US 2007-0269370 A1	22.11.2007	AT 460922 T	15.04.2010
		AU 2007-348315 A1	12.09.2008
		CA 2648581 A1	12.09.2008
		DE 602007005366 D1	29.04.2010
		EP 2018156 A1	28.01.2009
		EP 2018156 B1	17.03.2010
		JP 2009-533350 A	17.09.2009
		JP 2009-533350 T	17.09.2009
		US 8067011 B2	29.11.2011
		WO 2008-108776 A1	12.09.2008
US 2006-0292174 A1	28.12.2006	AU 2005-287383 A1	30.03.2006
		AU 2005-287383 B2	22.09.2011
		CA 2567741 A1	30.03.2006
		EP 1773303 A2	18.04.2007
		JP 2008-500364 A	10.01.2008
		US 2011-293733 A1	01.12.2011
		US 7964196 B2	21.06.2011
		WO 2006-033679 A2	30.03.2006
		WO 2006-033679 A3	30.03.2006

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	

(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, TM), 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, RS, 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, 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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 デロス リオス, ミゲル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014, デルマー, カラマス ドライブ 750

(72) 発明者 デロス リオス, ステファニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014, デルマー, カラマス ドライブ 750

(72) 発明者 オストロウスキ, ジャセク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92024, エンシニータス, ブルー アッシュ コート
108

(72) 発明者 オー, ケネス ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92126, サンディエゴ, トーマス ヘイズ レーン
11686

(72) 発明者 ジップキン, イラン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94002, ベルモント, ノーター デイム アベニュー
2007エー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA33 CA11 DA06 EA04 GA11 HA01 HA09

4C076 AA95 CC01 CC07 CC11 CC27 CC31 EE41 EE59

4C084 AA02 AA03 AA17 BA44 NA05 NA13 ZA012 ZA362 ZB072 ZB262

ZB322

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA02 EA20 FA74