

(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2006-514078

(P2006-514078A)

(43) 公表日 平成18年4月27日(2006.4.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/10 (2006.01)	C07K 14/10 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B050
C12N 9/50 (2006.01)	C12N 9/50	4C085
A61K 39/29 (2006.01)	A61K 39/29	4H045
A61P 31/14 (2006.01)	A61P 31/14	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-567234 (P2004-567234)	(71) 出願人	304012895
(86) (22) 出願日	平成15年12月19日 (2003.12.19)		セントロ デ インジエニア ジエネ
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月29日 (2005.7.29)		テイカ イ バイオテクノロジー
(86) 国際出願番号	PCT/CU2003/000017		キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ
(87) 国際公開番号	W02004/067747		、プラヤ、キューバナキャン、アベニュー
(87) 国際公開日	平成16年8月12日 (2004.8.12)		31 エントレ 15 8 イ 190
(31) 優先権主張番号	2003-0031	(74) 代理人	100066692
(32) 優先日	平成15年1月31日 (2003.1.31)		弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	キューバ (CU)	(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞内で得られる組換え A 型肝炎ウイルス抗原

(57) 【要約】

本発明は、植物細胞中で得られる組換え A 型肝炎ウイルス抗原に関する。より詳しくは、本発明は、キューバで単離されていた M 2 株を使用する、A 型肝炎ウイルス (H A V) ゲノムの改変断片に基づく遺伝子構築物の生成に関する。適切な位置及び調節シグナルと融合した前記断片のヌクレオチド配列はトランスジェニック植物中で発現し、五量体及び/又は中空被覆物を含む組換え H A V 抗原が生じ、これによって免疫応答を発生させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H A V ゲノム (S E Q I D N O 3) の改変断片に基づくキメラ H A V 遺伝子を含む遺伝子構築物で形質転換した植物細胞中で得られる A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 2】

前記抗原が五量体のみを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 3】

前記抗原が、以下の成分

- a . タンパク V P 2、V P 3、V P 1 及び 2 A をコードするヌクレオチド配列 (S E Q I D N O 2 5) と、
- b . タンパク 3 A、3 B、3 C をコードするヌクレオチド配列 (S E Q I D N O 1 3) との融合物を含む S E Q I D N O 1 7 に記載のキメラ遺伝子の発現から得られることを特徴とする、請求項 1 及び 2 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 4】

前記キメラ遺伝子が適当なプロモーター及び転写終結シグナルによって調節されている植物細胞中で発現される、請求項 3 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 5】

前記抗原が、植物細胞の細胞質中で得られることを特徴とする、請求項 4 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 6】

前記抗原が、双子葉植物中で発現されることを特徴とする、請求項 5 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 7】

前記抗原が、タバコ、ニンジン、及び食用植物の果実中で発現されることを特徴とする、請求項 6 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 8】

前記抗原が、単子葉植物中で発現されることを特徴とする、請求項 5 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 9】

前記抗原が、イネ、及び食用植物の果実中で発現されることを特徴とする、請求項 8 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 10】

前記抗原が、五量体及び中空キャプシドを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 11】

前記抗原が、以下の 2 つの成分

- a . タンパク V P 4、V P 2、V P 3、V P 1 及び 2 A をコードする S E Q I D N O 6 に記載のヌクレオチド配列と、
- b . 請求項 3 b に記載のタンパク 3 A、3 B 及び 3 C をコードするヌクレオチド配列との融合物を含むキメラ遺伝子の発現から得られることを特徴とする、請求項 10 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 12】

前記キメラ遺伝子が適当なプロモーター及び転写終結シグナルによって調節されている植物細胞中で発現される、請求項 11 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 13】

前記抗原が、植物細胞の細胞質中で得られることを特徴とする、請求項 12 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 14】

前記抗原が、双子葉植物中で得られることを特徴とする、請求項 13 に記載の A 型肝炎

10

20

30

40

50

ウイルス組換え抗原。

【請求項 15】

前記抗原が、タバコ、ニンジン、及び食用植物の果実中で発現されることを特徴とする、請求項 14 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 16】

前記抗原が、単子葉植物中で得られることを特徴とする、請求項 13 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 17】

前記抗原が、イネ、及び食用植物の果実中で発現されることを特徴とする、請求項 16 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

10

【請求項 18】

前記抗原が、2つのキメラ遺伝子

a. その 5' 末端でシグナル配列と、その 3' 末端でスペーサー配列、それに続いて KDEL ペプチドをコードする配列と融合した、タンパク VP2、VP3、VP1 及び 2A をコードする配列 ID NO. 24 に記載のヌクレオチド配列と、

b. その 5' 末端でシグナル配列と、その 3' 末端でスペーサー配列、それに続いて KDEL ペプチドをコードする配列と融合した、請求項 3B で言及したタンパク 3A、3B、3C をコードする配列 ID NO. 23 に記載のヌクレオチド配列との協調的発現から得られる、請求項 2 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 19】

キメラ遺伝子が、適当なプロモーター及び転写終結シグナルによって調節されている植物細胞中で発現される、請求項 18 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

20

【請求項 20】

前記抗原が植物細胞の小胞体中で得られる、請求項 18 及び 19 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 21】

前記抗原が、双子葉植物中で得られることを特徴とする、請求項 20 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 22】

前記抗原が、タバコ、ニンジン、及び食用植物の果実中で得られることを特徴とする、請求項 21 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

30

【請求項 23】

前記抗原が、単子葉植物中で得られることを特徴とする、請求項 20 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 24】

前記抗原が、イネ、及び食用植物の果実中で得られることを特徴とする、請求項 23 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 25】

前記抗原が、2つのキメラ遺伝子

a. その 5' 末端でシグナル配列と、その 3' 末端でスペーサー配列、それに続いて KDEL ペプチドをコードする配列と融合した、タンパク VP4、VP2、VP3、VP1 及び 2A をコードする配列 ID NO. 22 に記載のヌクレオチド配列と、

b. 請求項 18b に記載のヌクレオチド配列との協調的発現から得られる、請求項 10 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

40

【請求項 26】

キメラ遺伝子が、適当なプロモーター及び転写終結シグナルによって調節されている植物細胞中で発現されることを特徴とする、請求項 25 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 27】

前記抗原が植物細胞の小胞体中で得られることを特徴とする、請求項 25 及び 26 に記

50

載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 28】

前記抗原が、双子葉植物中で得られることを特徴とする、請求項 27 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 29】

前記抗原が、タバコ、ニンジン、及び食用植物の果実中で得られることを特徴とする、請求項 28 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 30】

前記抗原が、単子葉植物中で得られることを特徴とする、請求項 27 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

10

【請求項 31】

前記抗原が、イネ、及び食用植物の果実中で得られることを特徴とする、請求項 30 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 32】

精製して非経口投与することができる、請求項 1、3、11、18 及び 25 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 33】

他のウイルス抗原と組み合わせて投与することができる、請求項 32 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 34】

経口投与することができる、請求項 1、3、11、18 及び 25 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

20

【請求項 35】

凍結乾燥抽出剤、丸剤又はカプセル剤として投与することができる、請求項 34 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 36】

ジュースの形で投与することができる、請求項 1、3、11、18 及び 25 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 37】

免疫原性があり、A 型肝炎ウイルスに対して保護的免疫応答を引き起こす、請求項 1、3、11、18 及び 25 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

30

【請求項 38】

A 型肝炎診断キットの一部として使用することができる、請求項 32 に記載の A 型肝炎ウイルス組換え抗原。

【請求項 39】

単一及び混合ワクチンを調製するための、請求項 1 から 38 までに記載の抗原の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオテクノロジーの一部門に関し、より具体的には、トランスジェニック植物細胞中での組換えタンパクの発現、及び抗原ワクチンとしてのその植物の使用に関する。具体的には、キューバで単離された M2 株由来 HAV ゲノムの改変断片の発現に由来する、トランスジェニック植物内で得られる組換え A 型肝炎ウイルス抗原が示される。

40

【0002】

また、様々な方法で接種した後の動物における免疫応答を発生させるのにこの抗原が有用であることも実証される。

【背景技術】

【0003】

HAV ゲノムは、極性が正であるシンプル鎖 (simple strain) RNA である。これは、約 7.5 kb であり、253 kDa のポリタンパクをコードしている (C

50

ohenら、Journal of Virology (1987), 61:3035-3039)。このポリタンパクは、翻訳プロセッシングをも翻訳後プロセッシングをも受け、成熟構造タンパク (VP1、VP2、VP3、VP4及び2A) 及び非構造タンパク (2B、2C、3A、3B、3C及び3D) を作り出す。

【0004】

ウイルスポリタンパクのP3ドメインに存在するプロテアーゼ3C (Pr. 3C) は、HAVポリタンパクの切断に関するプロテアーゼ (Martinら、J Virol. (1999), 73(8):6220-7) であり、後にプロセッシングを受ける中間生成物であるP1-2A、2BC及びP3を遊離させる。したがって、エンベロープの十分な形成及びHAVの複製には、HAVのタンパク分解プロセスが示差的に行われることが必要である。P3領域のプロセッシング中に、3C/3D部位だけが効率よく切断される。3A/3B及び/又は3B/3C部位でのプロセッシングは遅れて起こり、それによって、プロテアーゼ3Cに類似した効率でポリペプチドP1-2Aを切断する中間体ポリペプチド3ABCの蓄積が可能となる (Kusovら、Journal of Virology (1999), 73:9867-9878)。このステップで、ペプタマー形成の効率がより高まる。ウイルスの特徴的な形態はこのウイルスタンパクの統合に由来し、その三次元構造は、保護的免疫応答の発生に重要である。HAVのウイルス粒子は、中和に対して免疫優性である抗原部位を示し、この部位は、様々な地域から単離されたHAV株の間で厳密に保存されている。それには5種の高次構造エピトープが配置され、そのうち3種は五量体であり、他の2種は、これらの五量体が集合してエンベロープを形成した後に作り出される。

10

20

【0005】

抗原部位の高次構造が変化することに起因して、又は五量体のアセンブリ中に五量体に存在するエピトープ断片が並列することに起因して、この最後のエピトープが形成されると考えられている。五量体もウイルス粒子も中和抗体を誘導し、したがって、これらはワクチン開発に有用である可能性がある (Stapletonら、Journal of Virology (1993), 67:1080-1085)。HAVの完全なオープンリーディングフレームを含む組換えバキュロウイルスを用いて、HAVの巨大ポリタンパクが発現されている。昆虫細胞でのプロセッシングの結果、他の中間体タンパクも発現されている (Stapletonら、The Journal of Infectious Diseases (1995), 171:9-14)。さらに、哺乳動物細胞中でHAVの同じポリタンパクを発現する、組換えワクシニアウイルスが構築されている。これらの遺伝子構築物の感染細胞抽出物で、ポリタンパクの翻訳後プロセッシングが行われてHAVのものと類似したキャプシドが生じることが判明した (Winokurら、Journal of Virology (1994), 65:5029-5036)。1993年1月21日のWinokurらの国際特許出願公開WO 9301279、米国特許第5294548号 (McLindenら、1994年3月)、国際特許出願公開WO 09844122 (Probst, 2002年8月27日)、国際特許出願公開WO 9111460、米国特許第5605692号 (Thomasら、1997年2月25日) など、バキュロウイルス及びワクシニアウイルスシステム中で発現させる、HAVに対する組換えワクチンの変種を記載している特許があり、その中で、オープンリーディングフレーム (ORF) の配列が免疫原性キャプシド及び五量体の産生に使用され、シス、トランス並びにバイシストロン (bicistronic) 構築物中で構造領域及びP3領域を発現させてHAVキャプシドを得る方法が保護されている。

30

40

【0006】

バイオリクターとしてのトランスジェニック植物

根粒菌のアグロバクテリウムツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) による遺伝子移入から生じる最初のトランスジェニック植物は、1980年代初頭に作成された (Zambryskiら、EMBO J. 1983, 2:2143-2150)。この技術は初め、病原微生物 (Powellら、Science 1

50

986, 232: 738-743)、昆虫(Vaeckら、Nature 1987, 328: 33-37)、及び除草剤に対する(Of Blockら、1987, EMBO J. 6: 2513-2518)耐性を獲得する方法として使用されていた。しかし、植物(vegetable)細胞が、高度に複雑な構造の外來タンパクを正確に集合させることができることが実証されると、産業上及び生物薬剤上関心の高い組換えタンパクの実用的な生産を段階的に増大させる新しい戦略として、これに価値がある可能性があることが速やかに示唆された(Bartaら、Plant Mol. Biol. 1986, 6: 347-357; Cramerら、Ann. N. Acad. Sci. 1996, 792: 62-71; Staubら、Nature Biotechnol. 2001, 18: 333-338)。

10

【0007】

1992年に、サブユニットワクチン生産に関する新しい概念が導入された。これは、トランスジェニック植物がB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)を発現することができることが実証されたことから生じた。この知見に基づいて、食品中にワクチンの候補を産生させ、この食品を摂取することだけで免疫感作を実現するのに植物を使用することができることが考えられた。これらの事実によって、「食用ワクチン」との名称が現れた(Arntzenら、Plants. Vaccine 1994, 94: 339-344)。その後、HBsAgを含むトランスジェニックジャガイモを飼料として与えられたマウスが、市販のワクチンを単回腹腔内投与したときに得られたものと類似した一次免疫応答を示すことが実証された。これらの結果から、食用植物組織中での抗原の発現を、免疫感作の新しい経路とみなすことができることが示唆された(Richterら、Nature Biotechnology 2000, 18: 1167-1171)。

20

【0008】

米国特許第5484719号(Lamら、1996年1月16日);米国特許第5612487号(Lamら、1996年1月16日);米国特許第5612487号の分割出願で、国際特許出願PCT/US94/02332の一部継続出願である米国特許第5914123号(Arntzenら、1999年6月22日);米国特許第6136320号(Arntzenら、1999年6月22日);国際特許出願公開WO 9612801(Arntzenら、2002年5月28日);米国特許出願公開第2002006411号(Lamら、2002年6月4日)など、ワクチンの発現に植物を使用することについて記載している特許がいくつか存在する。

30

【0009】

前記に挙げた文献には、ワクチンとしての植物の使用、並びに植物中でのHBsAg発現が記載され、ある場合では、B型肝炎ウイルス(VHB)を指すのに「ウイルス性肝炎」という用語が使用されている。VHBは、A型肝炎ウイルスとかなり違い、その特徴も非常に異なっている。したがって、これらは、分類学的見地から異なる属に属している。免疫学的に重要な反応を引き起こすことができるHAVの組換えタンパクを得るには、このウイルスゲノムのいくつかのタンパクを発現させ、次いでそのような粒子を五量体又は中空キャプシドとして形成させることが必要である。免疫原性粒子のプロセッシング及び形成は、ワクシニアウイルス及びバキュロウイルスシステムのような真核生物システムでしか実現していず、酵母などのより単純なシステムでは実現していない。トランスジェニック植物では、HAVのような複雑な抗原の発現は行われていなかった。VHBの場合、抗原は、タンパク1つだけで形成され、酵母などの単純な真核生物システムで効率よく粒子化される。前記で触れた議論により、植物において、HBsAgの発現は、HAVの五量体又は中空キャプシドの発現を含まないことが考えられる。他の特許出願では、2001年8月23日のSohnらの国際特許出願公開WO 0161022におけるヒト乳癌ウイルス抗原、2001年10月31日のZhongらの中国特許出願公開CN1319670における口蹄熱ウイルス抗原、2001年8月16日のReadsらの国際特許出願公開WO 0159070におけるロタウイルス(rotavirus)抗原、2001年12月27日のShacharらの国際特許出願公開WO 0197839におけるガ

40

50

ムボロウイルス (gumboro virus) 抗原など、様々なウイルス抗原の発現が具体的に記載されている。

【0010】

植物での組換えタンパク産生は、臨床医学で重要な薬剤化合物又はワクチンを生成するための多くの潜在的な利点を提供する。第1に、植物システムは、発酵システムで又はバイオリアクターで使用される産業基盤よりも経済的である。第2に、産業規模で植物及びその産物を採取し試験する技術はすでに利用可能である。第3に、組換えタンパクを含む植物を(食用ワクチンの場合と同様に)食物として使用すると、化合物を精製する必要性をなくすることができる。第4に、組換えタンパクを、ミトコンドリア、液胞、葉緑体、小胞体のような特定の細胞内区画を対象として発現させることもでき、それをこの区画で(例えば葉緑体で)直接発現させることもできる。第5に、組換え産物のヒト病原体による考えられる汚染に関する健康リスクは最小限である。最後に、製剤上重要な組換えタンパクの発現システムとしての植物は、小胞体レベルでのフォールディング、アセンブリ、糖鎖付加を含めた、分泌経路の多くのステップが哺乳動物細胞と類似しているというさらなる利点を有する(May Hein, Plant Physiol. 1995, 109: 341 - 346; Rayonら、J. Exp. Bot. 1998, 49: 1463 - 1472; Sanderfoot y Raikhel, Plant Cell. 1999, 11: 629 - 641; Vitale及びDenecke, Plant Cell 1999, 11: 615 - 628; Lerougeら、Pharmaceutical Biotechnology 2000, 1: 347 - 354)。

10

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的の基本設計は、構造タンパクの様々な変種及び変異した非構造領域をコードする遺伝子の協調的発現を可能とする遺伝子構築物によって支持され、免疫応答を引き起こすことができる、トランスジェニック植物でのHAVの抗原五量体及びキャプシドの組換え発現を対象とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

基本的に、本発明の新規性は、サイズが小さく、厳密に構造的な領域(最大でもタンパク2Aだけ)、及びタンパク3A/3Bと3B/3Cの間の切断部位が変異しているためにウイルスのプロテアーゼ3Cより大きいサイズを示す、ウイルスの改変プロテアーゼによって形成されるポリタンパクをコードする新規オープンリーディングフレームの高次構造に使用されるウイルスゲノム領域にある。特に使用するプロモーター及び調節シグナルの制御下で、トランスジェニック植物の細胞質ゾル及び小胞体中でのHAVウイルスキャプシドの発現が初めて実現する。構造領域とタンパク分解の原因領域の組合せ発現産物として、小胞体中で五量体及びキャプシドを形成させることから、HAVの場合など、この区画により複雑な構造を構築し保存することができる可能性が実証される。植物中での五量体及びキャプシド産生により、安価かつ確実なワクチンを得るバイオリアクターとしてこれを使用することができる可能性がもたらされる。

30

40

【0013】

本発明は、トランスジェニックタバコ、イネ及びニンジン植物を使用して、植物細胞中でウイルスの免疫原性キャプシド及び五量体が初めて得られた例によって実証される。本発明の結果得られるHAVのキャプシド及び五量体は、抗原ワクチンとして使用することができ、HAV検出のための診断法に使用することもできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

遺伝子構築物

HAVのcDNA取得

キューバで単離されたHAVのM2株RNAから、逆転写技術ポリメラーゼ連鎖反応(

50

R T - P C R) を用いて、このウイルスのオープンリーディングフレーム (O R F) をコードするヌクレオチド配列を増幅した。この断片をプラスミド中でクローン化し、そのヌクレオチド配列を決定した。これは、報告されている配列に比べて 11 アミノ酸残基の変異が生じる違いを示している。配列分析から、アメリカ株のほとんどすべてが属するサブ遺伝子型 I A の一部として M 2 株を分類することができる。この株のゲノムから、改変断片を設計し、構築し、次いで本発明の対象である様々な遺伝子構築物中で使用した。

【 0 0 1 5 】

トランスジェニック植物中でキャプシド及び五量体を発現させるためのベクター遺伝子構築物

H A V の組換えプロテアーゼ

ウイルスキャプシドの形成を可能にするには、ポリタンパクのタンパク分解プロセッシングが示差的に起こり、ウイルスタンパクを順序通りに放出させることが必要である。キャプシド形成の効率は、タンパク 3 A B と膜及びウイルスタンパクの疎水性相互作用のために中間体 3 A B C が存在するときに増大する。プロテアーゼ 3 C を放出せず、H A V の五量体及びキャプシドの形成に必要なそのタンパク分解能を保持するポリペプチド 3 A B C を得るために、タンパク 3 A / 3 B と 3 A / 3 C の間にあるプロテアーゼ 3 C の切断部位に変異を生じさせた。3 A / 3 B 間ではグルタミン酸をバリンで、3 B / 3 C 間ではセリンをロイシンで置き換えた。免疫原性キャプシド及び五量体を形成する H A V タンパク発現についての新規のかつ様々な戦略の設計に、このポリペプチドを使用した。

10

【 0 0 1 6 】

植物細胞の細胞質ゾル中でのキャプシド及び五量体発現のための組換え H A V

H A V において、ポリペプチド P 1 - 2 A は、ウイルスキャプシド形成において重要な機能を有する。このポリペプチド中に、キャプシド形成を調節する 2 つのサインが存在する。そのカルボキシル末端ドメイン中にタンパク 2 A が認められ、これは、キャプシドアセンブリの第 1 段階で五量体の形成に必要である。この五量体は、ポリペプチド P 1 - 2 A のうちプロセッシングを受けない分子を 5 つ組み合わせて形成される。タンパク V P 4 は、第 2 段階で五量体の会合及びキャプシド形成に必要である。

20

【 0 0 1 7 】

植物細胞の細胞質ゾル中で改変ポリタンパクを発現させるために、改変オープンリーディングフレーム (O R F m) 配列を含むベクターを構築した。この構築物は、(元の H A V ポリタンパクと比べて) サイズがかなり小さいポリタンパクをコードしている。この配列は、P 1 - 2 A ポリペプチドコード配列と変異プロテアーゼ 3 A B C をコードする配列を融合させた結果得られる。

30

【 0 0 1 8 】

A . ツメファシエンス (A . t u m e f a c i e n s) を用いて植物を形質転換するのに使用されるプラスミドベクターは、植物中でタンパク発現を調節するシグナルをコードするヌクレオチド配列と融合した H A V のタンパクをコードする D N A 配列を含んでいる。この場合、タンパクをコードする配列は、植物細胞の分泌経路を越えて輸送するためのいずれの特定のシグナルとも融合せず、そのためこれは細胞の細胞質ゾル中で発現される。

40

【 0 0 1 9 】

植物細胞の細胞質ゾル中における五量体の排他的発現のための組換え H A V

自己プロセッシングによって、排他的に免疫原性のウイルス五量体が形成される。キャプシドに比べて五量体のサイズが小さいと、より小さいものの発現が誘発されるので発現レベルをより高くすることができる。前記で記載したように、ポリペプチド V P 0 の一部であるタンパク V P 4 は、五量体の会合及びウイルスキャプシド形成に必要である。

【 0 0 2 0 】

ポリタンパク O R F m をコードするヌクレオチド配列から、タンパク V P 4 をコードする断片を除去して、O R F m と称される配列とした。植物細胞の細胞質ゾル中でのその発現を調節する配列と融合したポリタンパク O R F m を発現させるためのプラスミドベ

50

クターを構築した。これを、タバコ、イネ及びニンジンの葉に A・ツメファシエンスを感染させて、トランスジェニック植物を得るのに使用した。この遺伝子構築物から発現したポリタンパクは、サイズがかなり小さく、植物細胞中で代謝による変化を起こすことができる。得られた産物は、ワクチン開発のための免疫原のように使用することもできる。

【0021】

植物細胞の小胞体中でのキャプシド及び五量体発現のための組換え HAV

分泌経路に、したがって小胞体にタンパクを向かわせる配列を使用し、この小器官中に保持させるシグナルも使用することにより、植物において小胞体中に異種のタンパクが蓄積される。

【0022】

シグナルペプチドとして、サツマイモスポラミンの N 末端ペプチドをコードする配列を使用した。小胞体中にタンパクを保持させるシグナルとして、このタンパクのカルボキシル末端に位置するペプチド KDEL をコードする配列を使用した。

【0023】

サツマイモスポラミンのシグナルペプチドを P1-2Aヌクレオチドコード配列の 5' 領域と融合させ、KDELコード配列と融合させたスパーサーペプチド配列を 3' 領域に挿入した。得られた DNA 断片をバイナリー (binary) ベクターの植物発現シグナルの調節下に置いた。このベクターは、その 5' 末端でサツマイモシグナルペプチドと、その 3' 末端で KDELコード配列と融合した変異ポリペプチド 3ABCコード配列を含んでいた。この成分もすべて植物発現シグナルの調節下に置いた。どちらのポリペプチドも小胞体中に位置し、プロテアーゼ 3ABC は、ポリペプチド P1-2A をプロセッシングし、効率よく粒子を形成することができる。

【0024】

植物細胞の小胞体中で五量体を排他的に発現させるための組換え HAV

P1-2Aポリペプチドコード配列から VP4ヌクレオチドコード配列を除去することにより、ポリペプチド P1-2A を得た。この配列をその 5' 末端でサツマイモスポラミンシグナルペプチドと、その 3' 末端で、KDELコード配列と結合したスパーサーペプチドをコードする配列と融合させた。同様に、同じバイナリーベクター中で、変異ポリペプチド 3ABC をコードする配列を、その 5' 末端でサツマイモスポラミンシグナルペプチドと、その 3' 末端で KDELコード配列と融合させた。すべての成分を植物における発現調節サイン下に置いた。

【0025】

この 2 つのポリペプチドは、小胞体中に位置し、プロテアーゼ 3ABC は、ポリペプチド P1-2A をプロセッシングし、排他的に五量体を発現させることができる。この植物は、より高レベルの発現、並びにより良好な成長及び発達を示し、これによって、より多くのバイオマスが得られる。

【0026】

改変 HAV の遺伝子産物を発現するトランスジェニック植物の同定

A・ツメファシエンスを各バイナリーベクターで形質転換し、このプラスミドを含む細菌コロニーを得た。異なる遺伝子構築物をそれぞれ独立に有する A・ツメファシエンスを使用して植物を形質転換し、最終的に、選択マーカーであるカナマイシンに耐性の植物を得た。サザンブロット及び PCR 技術を使用して、外来 DNA が植物中に組み込まれていることを確認した。

【0027】

特定のタンパク抽出緩衝液中でトランスジェニック植物の葉を液体窒素で粉砕して、その葉から可溶性タンパクの抽出を行った。HAV 特異的抗血清及びモノクローナル中和抗体を使用して、キャプシド及び五量体を同定した。ウェスタンブロット、ELISA、免疫顕微鏡法 (immunomicroscopy) などの免疫学的方法を行い、これより、トランスジェニック植物が、ポリタンパク、又は場合によっては予想されたポリペプチドを発現することが実証され、これらがプロセッシングを受け五量体又はキャプシド中に集

10

20

30

40

50

合することも実証された。

【0028】

高レベルの組換えタンパクを発現する植物を、モノクローナル中和抗体を用いるキャプシド及び五量体の精製に使用した。

【0029】

精製キャプシド及び五量体の免疫原性の決定

タバコ及びイネの植物の葉から精製した産物で免疫感作させたマウスの免疫応答により、H A V キャプシド及び五量体の免疫力を決定した。H A V 抗原を発現するトランスジェニックニンジン飼料として与えたマウスにおける免疫力も評価した。抗原を導入する方法として、経口経路及び非経口経路を用いた。E L I S A 技術を用いて動物の抗血清のH A V に対する反応性、及びH A V 感染を *in vitro* で中和する免疫血清の中和能について決定することにより、免疫応答を調節し確認した。

10

【0030】

本発明の利点

本発明が提供する最も重要な利点は、本発明者らの構築物の発現産物であるエンベロープ及び精製五量体と元のウイルスの間に抗原類似性があること；本発明者らの構築物の発現産物として得られるポリタンパクのサイズが元のウイルスのサイズよりかなり小さいので、本発明者らが特許請求する構築物の産物であるエンベロープ及び五量体の植物での発現レベルが、H A V オープンリーディングフレームを発現させたとき、又はP 1 - 2 A 領域及びP 3 領域を同時に発現させたときに得られるレベルより高いこと；ポリペプチド3 A B C が専らタンパク3 A、3 B 及び3 C によって構成され、タンパク3 A / 3 B と3 B / 3 C の間の自己プロセッシング部位が変異し、それによってこのポリペプチドのプロセッシングが回避され、したがってより効率のよいこのポリペプチド自体によるポリタンパクのタンパク分解能が想定されること；植物細胞の小胞体中での五量体及びH A V ウイルスエンベロープの発現レベルが細胞質中より高いこと；植物細胞中での五量体の排他的発現が、この粒子のサイズがより小さいために、より効率よく行われ、より良好な植物の成長及び発達を可能にすること；植物から薬剤タンパクをスケールアップし産生させることが大量の抗原の産生に適していること；現在使用され、当分野の最先端で述べられている他のシステムと比べて生産コストが低下すること；植物でのH A V 抗原の発現により、ヒトに影響を及ぼす病原体の混入リスクが低下すること；産物を精製することを必要とせず植物を使用できる可能性があるために、H A V に対しての経口免疫感作が、免疫感作にかかるコストを下げるのにかなり貢献することである。

20

30

【0031】

微生物の寄託

微生物の寄託に関するブダペスト条約 (B u d a p e s t T r e a t m e n t f o r M i c r o o r g a n i s m D e p o s i t) の規則に従って、ベルギー微生物保存機関 (B e l g i a n C o o r d i n a t e d c o l l e c t i o n o f M i c r o o r g a n i s m s) B C C M、L M B P - C O L L E C T I O N に、プラスミド p B V H A R E、p B V H A R E、p B M L A m 及び p B M L A m を寄託し、これらは、それぞれ受託番号 L M B P 4 7 2 1、L M B P 4 7 2 2、L M B P 4 7 2 3 及び L M B P 4 7 2 4 で 2 0 0 3 年 5 月 1 9 日 に寄託された。

40

【実施例1】

【0032】

H A V キューバ株 M 2 の O R F のクローン化

プラスミド p M L A 1 の当該の配列を図 1 (A) に示す。キューバで単離され特徴付けられた H A V 株 M 2 から R N A を精製し、H A V の以前に報告された他の配列に特異的なオリゴヌクレオチド (S E Q I D N O 1 及び 2) を使用し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) 技術を用いて 6 . 7 k b の D N A 断片を増幅した。このバンドを予め S m a I エンドヌクレアーゼで消化したベクター B l u e S c r i p t (K S +) 中にクローン化した。得られたプラスミドを p M L A 1 と名付け、H A V キューバ M 2 株の

50

ORFの配列決定に使用した。DNA配列(SEQ ID NO 3)は、報告されているものに比べて変化を示している。これは、異なるアミノ酸が11個生じる変化が認められる。この配列分析から、アメリカ株のほとんどすべてが属するサブ遺伝子型IAに、M2株を分類することができる。実際にキューバ株M2が以前から報告されているものと異なるHAV株であることが、この配列から確認された。

【実施例2】

【0033】

植物細胞の細胞質ゾル中でキャプシド及び五量体を発現させるための遺伝子構築物

プラスミドpP1-2Aの当該の配列を図1(B)に示す。プラスミドpMLA1に由来するタンパクVP4をコードする配列の5'領域及びタンパク2Aをコードする配列の3'領域にそれぞれ相補的な特異的オリゴヌクレオチド(SEQ ID NO 4)を用いて、構造タンパク(P1-2A)をコードする配列をPCRで増幅することによって、このプラスミドを得た。2.5kbの増幅バンド(SEQ ID NO 6)をSmaI消化ベクターBlueScript(KS+)中にクローン化した。

10

【0034】

プラスミドp3ABCの当該の配列を図1(C)に示すが、このプラスミドを得るために、この遺伝子の5'及び3'領域に相補的なオリゴヌクレオチド(SEQ ID NO 7及び8)を用いて、タンパク3Aをコードする0.2kbの領域をPCRで増幅した。これをBamHI/EcoRV消化ベクターBlueScript(KS+)中にクローン化した。その後、同じベクターであるがEcoRV/XbaI部位の間の領域中に、タンパク3Bをコードする合成ヌクレオチド配列(SEQ ID NO 9及び10)をクローン化した。得られたプラスミドをp3ABと名付けた。その一方で、プラスミドpMLA1から、オリゴヌクレオチドSEQ ID NO 11及び12を用いて、タンパク3Cをコードする0.65kbの配列をPCRで増幅した。このバンドをベクターp3ABのXbaI/HindIII部位の間にクローン化した。その結果得られた配列を3ABC(SEQ ID NO 13)と名付けた。

20

【0035】

これは、タンパク分解活性があるが自己プロセッシングを起こし得ないポリタンパクをコードしている。TをCで、GをCでそれぞれヌクレオチド置換することにより、タンパク3A/B及び3B/C間の切断部位に変異が生じているからである。

30

【0036】

プラスミドpMLAmの当該の配列を図1(D)に示す。これを得るために、プラスミドpP1-2AをEcoRI及びClaIで消化した。変異ポリペプチド3ABCをコードする1kbのバンドをEcoRI/ClaI消化によって切り出し、予め消化したpP1-2Aの適切な部位にクローン化した。プラスミドpMLAmは、元のポリタンパクと比べてかなり軽量のHAVポリタンパクをコードする改変配列(SEQ ID NO 14)を含んでいる。

【0037】

ベクターpKTP L-2でSmaI/ClaI消化した3.4kbのORFmのバンドをクローン化することにより、プラスミドpKMLAmを得た。このベクターは、プロモーターである2X35S CaMVプロモーター配列、TEVのリーダー配列及び35S CaMVの転写終結配列を含んでいる。ORFmバンドをクローン化するために、プラスミドpKTP L-2をNcoIで消化し、その後DNA Pol Iのクレノー断片で平滑化し、最後にClaIで消化した。

40

【0038】

バイナリープラスミドpBMLAmの当該の配列を図1(F)に示す。プラスミドpKMLAmをSphIで消化し、続いてマングビーン(Mung Bean)ヌクレアーゼで処理し、4.7kbのバンドを、予めSmaIで消化したバイナリーベクターpBin19中にクローン化して、このプラスミドを得た。

【0039】

50

得られたプラスミド p B M L A m は、カナマイシン耐性をもたらす選択マーカールとして働くネオマイシンホストランスフェラーゼ I I 遺伝子 (N P T I I)、改変 H A V ポリタンパクをコードし、2 X 3 5 S C a M V プロモーター配列及び T E V のリーダー配列並びに C a M V の転写終結配列によって調節される O R F m 遺伝子を含む。これはまた、植物ゲノムへのこの移入を促進する T - D N A の境界配列をも含む。

【実施例 3】

【0040】

植物細胞の細胞質ゾル中で五量体を発現させるための遺伝子構築物

プラスミド p M L A m の当該の配列を図 2 (A) に示す。タンパク V P 4 を除去しこのプラスミドを得るために、酵素 S m a I / P s t I で切断してプラスミド p M L A m から 1 1 4 b p の断片を除去し、それを合成ヌクレオチド配列 (S E Q I D N O 1 5 及び 1 6) で置き換えて、タンパク V P 2 をコードする遺伝子の起始部を回復させた。領域 O R F m の配列は、S E Q I D N O 1 7 に一致する。S m a I / C l a I 消化した O R F m のバンド (3 . 4 6 k b) を、予め N c o I / クレノー / C l a I で消化したプラスミド p K T P L - 2 中にクローン化して、プラスミド p K M L A m を得た。

10

【0041】

バイナリープラスミド p B M L A m の当該の配列を図 2 (B) に示す。B i n 1 9 を酵素 S m a I で消化して、このバイナリープラスミドを得た。酵素 S p h I でプラスミド p K M L A m を消化して 4 . 6 k b の D N A 断片を得、これをマングビーンヌクレアーゼで処理し、次いでクローン化した。

20

【0042】

得られたプラスミド p B M L A m は、カナマイシン耐性をもたらす選択マーカールとして機能するネオマイシンホストランスフェラーゼ I I 遺伝子 (N P T I I)、H A V 改変ポリタンパクをコードし、プロモーターである配列 2 X 3 5 S C a M V 及び T E V リーダー配列並びに 3 5 S C a M V の転写終結配列によって調節される O R F m 遺伝子を含む。これはまた、植物ゲノムに移入される右側及び左側の境界配列をも含む。

【実施例 4】

【0043】

植物細胞の小胞体中でキャプシド及び五量体を発現させるための遺伝子構築物

プラスミド p B V H A R E の当該の配列を図 3 B に示す。このプラスミドを得るために、K D E L 保持シグナルをコードする合成断片 (S E Q I D N O 1 8 及び 1 9) をベクター B S (+) の E c o R V / C l a I 部位にクローン化した。その一方で、プラスミド p P 1 - 2 A の S t y I / E c o R I 部位に、タンパク 2 A の 3 ' 末端を改変し、この領域中のプロテアーゼ切断部位を除去し、かつ遺伝子の結合部と K D E L シグナルをコードする配列との間に間隔を空けるパーとして働く配列を導入する合成断片 (S E Q I D N O 2 0 及び 2 1) をクローン化した。その後、この配列 (2 . 5 k b) を酵素 S m a I / E c o R V で切り出し、ベクター B S - K D E L 中にクローン化し、プラスミド p P 1 - 2 A R E (図 3 A、S E Q I D N O 2 2) を得た。p 3 A B C プラスミドを酵素 X h o I / クレノー / E c o R I で消化し、3 A B C 配列を E c o R I / E c o R V 部位にクローン化して、プラスミド p 3 A B C R E を得た (図 3 A、S E Q I D N O 2 3) 。

30

40

【0044】

対象とする遺伝子に植物発現調節シグナルを供給するために、酵素 S m a I / C l a I でプラスミド p P 1 - 2 A R E から切り出した構造領域 P 1 - 2 A - K D E L (2 . 5 k b) を、N c o I / クレノー / C l a I で消化したプラスミド p K T P L - 2 中にクローン化した。得られたプラスミドを p K P 1 - 2 A R E と名付けた。プラスミド p 3 A B C R E から酵素 N c o I / C l a I で 1 k b の領域 3 A B C - K D E L を切り出し、同じ酵素で消化したプラスミド p K T P L - 2 中にクローン化した。得られたプラスミドは、p K 3 A B C R E であった。

【0045】

50

最後に、A. ツメファシエンスを用いる植物の形質転換のためのプラスミドを得るために、プラスミド pK3ABC RE から酵素 S a l I で切り出した 2 k b の配列を、同じ酵素で予め消化したバイナリーベクター p B i n 19 中にクローン化した。得られたプラスミドを p B 3 A B C R E と名付けた。その後、同じベクターの S p h I 部位に、S p h I 消化でプラスミド p K P 1 - 2 A R E から切り出した配列 P 1 - 2 A - K D E L に相当する発現カセットをクローン化した。得られたプラスミド p B V H A R E は、構造領域もプロテアーゼの機能を有する領域も別個に有し、これらは、植物発現調節シグナルの存在下で小胞体保持シグナルと融合している。またこのプラスミドは、選択マーカーとしてネオマイシンホスホトランスフェラーゼ I I 遺伝子 (N P T I I) を有する。

【実施例 5】

10

【0046】

植物細胞の小胞体中で五量体を発現させるための遺伝子構築物

プラスミド p B V H A R E の当該の配列を図 4 (B) に示す。このプラスミドを得るために、酵素 S m a I / P s t I でプラスミド p P 1 - 2 A R E を切断して、その断片を合成ヌクレオチド配列 (S E Q I D N O 15 及び 16) で置き換えて、タンパク V P 2 をコードする遺伝子の起始部を回復させた。得られたプラスミド p P 1 - 2 A R E (図 4 A 、 S E Q I D N O 24) を S m a I / C l a I で消化し、2.4 k b のバンドを、N c o I / クレノー / C l a I で消化したベクター p K T P L - 2 中にクローン化して、プラスミド p K P 1 - 2 A R E を得た。酵素 S p h I で消化した発現カセットをプラスミド p B 3 A B C R E (3 A B C - K D E L を含むバイナリープラスミド) 中にクローン化した。

20

【0047】

得られたバイナリープラスミドは、植物発現シグナルの存在下で K D E L ペプチドと融合した、タンパク V P 4 をコードする配列を有さない構造領域、同じシグナルの存在下の 3 A B C - K D E L 領域、及び選択マーカーであるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ I I 遺伝子 (N P T I I) を含む。

【実施例 6】

【0048】

タバコ (N i c o t i n a t a b a c u m) トランスジェニック植物中での H A V のキャプシド及び五量体の獲得

30

タバコ (N i c o t i a n a t a b a c u m) 植物の遺伝的形質転換を Z a m b r y s k i ら (1983) の方法に従って実施した。

【0049】

A. ツメファシエンス株 A t 2260 (D e b l a e r e ら、1985) を、液体窒素法 (H o f g e n 及び W i l l m i t z e r、1988) により、開発したバイナリープラスミド (P B V H A R E、P B V H A R E、P B M L A m、P B M L A m) で形質転換した。「i n v i t r o」で培養しているプチハバナ (P e t i t H a v a n a) M R 1 種のタバコ植物の葉原基を、組換えアグロバクテリウム (A g r o b a c t e r i u m) で形質転換した。カナマイシン (100 m g / L) を選択マーカーとして使用した。

40

【0050】

サザンブロット、ウェスタンブロット、E L I S A、免疫顕微鏡法などいくつかの手順を実施して、タバコ植物ゲノム中に対象とする遺伝子が存在し発現しているかどうか、並びにウイルスエンベロップ又は五量体が形成されているかどうかを検出した。

【実施例 7】

【0051】

トランスジェニックニンジン植物 (D a u c u s c a r o t a L .) 中での H A V のキャプシド及び五量体の獲得

バイナリープラスミド (P B V H A R E、P B V H A R E、P B M L A m、P B M L A m) で形質転換した A. ツメファシエンス株 A t 2260 を植物の形質転換に使用し

50

た。新クロダ (NEW KURODA) 種の3週齢の発芽した胚軸を、1 cmの区分に切断し、BAN-9培地 (Murashige及びSkooG、1962 (MS)、NAAを0.5 mg/L補充) に植え、3日間培養した。その後、前記に記載の構築物の各1つを含むAt懸濁液とともにこれを30分間インキュベートした。外植片をBAN-9培地に再び移して72時間培養した。この期間の後、カナマイシン (100 mg/l) を補充した再生培地にこれを植えた。3週間後に苗条が現れ、これを個別化し、やはりカナマイシンを100 mg/L補充したMS培地に植えた。遺伝子が組み込まれたことを、PCR産物のサザンプロットで確認した (図6)。ポリタンパク発現、そのプロセッシング及びウイルスキャプシド及び五量体の形成を、ELISA (図8) 及びウェスタンプロット (図7) で実証した。

10

【実施例8】

【0052】

トランスジェニックイネ植物 (*Oryza sativa* L.) 中でのHAVのキャプシド及び五量体の獲得

Hieiら (1994) が使用した方法に従って、イネ植物の遺伝的形質転換を実施した。A. ツメファシエンス株 At2260 を、液体窒素法を用いて、開発したバイナリープラスミド (pB VHARE、pBVHARE、pB MLAm、pBMLAm) で形質転換した。イネの胚盤から得られたカルスを組換えA. ツメファシエンスで形質転換した。カナマイシン (100 mg/L) を選択マーカーとして用いた。

【0053】

イネ植物ゲノム中に対象とする遺伝子が存在し発現していること、並びにウイルスキャプシド又は五量体が形成されていることを確認するために、下記に記載する様々な手順を実施した。

20

【実施例9】

【0054】

トランスジェニック植物の分子的免疫化学的特徴付け
サザンプロットによる分析

Delaportaら (1983) により記載の方法を使用して、タバコ、ニンジン及びイネ植物から、サザンプロット用の染色体DNAを得た。サンプルとして、選択マーカーに対して耐性を示す前述の構築物を有する形質転換植物の葉を使用した。非形質転換植物の葉を陰性対照として用いた。

30

【0055】

全DNA消化、アガロースゲル電気泳動、Hybond N膜へのトランスファー及びハイブリダイゼーションを標準的手順 (Sambrookら、1989) で行った。タンパクVP1をコードする遺伝子を含む1.2 kbのDNA断片を、Primer-a-Gene Labeling System (Promega Corp、米国) を用いて32pで標識し、放射活性プローブとして用いた。同じ断片を陽性対照として用いた。

【0056】

図5は、細胞質中でHAVのキャプシドと五量体をどちらも発現する構築物PB MLAm及びPBMLAmで形質転換したトランスジェニックタバコ植物のサザンプロットを示している。SmaI及びClaIでのDNA消化によって、3.4 kbのバンドが得られる。小胞体中で発現する構築物PB VHARE及びPBVHAREで形質転換したトランスジェニック植物由来の全DNAをSmaIとI-EcoRIで消化して、2.4 kbのバンドを得た。図5に示す結果は、植物がそのゲノム中に構造タンパクをコードする配列を含むことを実証するものである。

40

【0057】

トランスジェニックニンジンとイネ植物の両方で、SEQ ID NO 4及び5の配列に相当するオリゴヌクレオチドを用いて、PCR増幅産物にサザンプロットを行った。図6に示すように、タンパクVP1をコードする放射活性標識配列は、構造タンパクをコードする配列の予想サイズに相当する2.5 kbのバンドと相補的に結合している。

50

【0058】

ウェスタンブロットによる分析

ウェスタンブロットの結果を図7に示す。Townbinら(1979)により記載の方法に従って、組換え分子を免疫学的に検出するウェスタンブロット法を実施した。ウェスタンブロットのサンプルは、五量体しか発現しない構築物で形質転換したトランスジェニックタバコ、ニンジン及びイネ植物から抽出した全可溶性タンパクからなるものであり、タバコ5、ニンジン7及びイネ3のクローンは、小胞体中で五量体を発現させる構築物pB V H A R Eで形質転換したもの、タバコ25及びニンジン10のクローンは、細胞質中で五量体の発現を可能にする構築物pB M L A mで形質転換したものであった。陰性対照として、非形質転換タバコの葉から抽出したタンパクを使用した。陽性対照として、V P 1タンパクを大腸菌(E. coli)中で発現させた。非常に薄い粉塵を得るまで、葉を液体窒素で粉碎した。Schoutenら(1997)の報告の通りに、葉1g当たりにタンパク抽出緩衝液[pH6.8の61mMトリス-HCl、0.1%トライトン(Triton)、12.5%グリセロール、及び1mMフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)]1mLを加えた。13000rpmで遠心分離することによって、不溶性物質を除去した。

10

【0059】

SDS-PAGEを行った全タンパクをニトロセルロース膜に移し、酵素アルカリホスファターゼ(PhoA)と結合した抗VP1ポリクローナル抗体を用いて、対象とするタンパクを同定した。比色反応を用いて、この酵素の検出を行った。

20

【0060】

図7において、すべての培養物中にVP1タンパクと同じサイズのタンパクバンドが存在すること、並びにポリタンパクの不完全なプロセッシングから他の中間産物が得られることを観察することができる。

【0061】

免疫酵素検定(ELISA)

ELISAの結果を図8に示す。「サンドイッチ」法を行った。モノクローナル抗体7E7の10mg/mL炭酸緩衝液(0.015M Na₂CO₃、0.028M NaHCO₃、pH9.6)溶液で、プレート(Maxisorp、Nunc)をカバーし37°Cで4時間置いた。ミルクの5%PBS(100mM NaCl、80mM Na₂PO₄、20mM NaH₂PO₄、pH7.4)溶液で、ブロッキングを37°Cで2時間実施した。その後、形質転換及び非形質転換タバコ、ニンジン及びイネ植物に対応する(ウェスタンブロットについて記載されたのと同様に調製した)サンプル100µLを加えた。プレートを4°Cで1晩インキュベートした。PBSで洗浄後、1/1000に希釈した(ミルクを0.5%含むPBS中で1mg/mL)アルカリホスファターゼ結合モノクローナル抗体7E7を100µL加えた。プレートを37°Cで1時間インキュベートした。0.1%ジエタノールアミン中で調製した4-ニトロフェニルホスフェート(酵素の基質)を加えることによって、反応を生じさせた。色が現れるかどうかを60分間追跡して調べた。分光光度計で、波長405nmでの吸光度を読み取った。ELISAのあらゆる段階において、トゥイーン(Tween)20を0.1%含むPBSでプレートの洗浄を3

30

40

【0062】

免疫電子顕微鏡法による分析

免疫電子顕微鏡法の結果を図9に示す。プラスミドpBMLAmで形質転換したタバコ及び非形質転換植物の、どちらも組織培養由来のサンプルを4%ホルムアルデヒド溶液で、その後0.2%グルタルアルデヒドで固定した。これをエタノールで脱水し、次いでLowicryl K4M(Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg)溶液中でインキュベートした。超薄切片をニッケル網に置き、モノクローナル抗体7E7とともにインキュベートした。このステップの後、15nmの金コロイド粒子で標識した抗マウスIgGポリクローナル抗体(British Bio-Cell I

50

nternational)とともにインキュベートした。酢酸ウランで5分間、その後クエン酸鉛で7分間処理して、免疫標識切片に対比染色を行った後、透過型電子顕微鏡(Jeol-Jem 2000EX、日本)で検鏡した。その結果、構築物pBMLAmで形質転換したタバコ植物でのみ直径約27nmの粒子が見られ、これによって、このタンパクが細胞の細胞質中に発現していることが示された。

【実施例10】

【0063】

トランスジェニックタバコ及びイネ植物からのキャプシド及び五量体の精製

キャプシド及び五量体を精製するために、粒子及び免疫原性五量体を専ら認識する、CIGB研究所で得られた抗HAVモノクローナル抗体を使用した。ウェスタンブロット分析で説明したプロトコルを用いて、植物細胞タンパクを抽出した。遠心分離から得られた上清を、0.5M塩化ナトリウムに溶解し、抗体を付けた親和性ゲル(Bio-rad Laboratories, Richmond, CA)と混合した。この混合物を4で16時間インキュベートした。このゲルを10倍量のPBS(100mM NaCl、80mM Na₂PO₄、20mM NaH₂PO₄、pH7.4)で洗浄し、その後、pH2.5の0.2Mグリシンで、対象とするタンパクを溶出させた。この溶出物を塩基性トリスで中和し、PBSに対して透析した。HAVウイルスキャプシド及び五量体の認識用の特異的な、市販の7E7モノクローナル抗体(Mediagnost)を用いて、この葉抽出物由来のHAV粒子及び五量体が存在するかどうかを、ELISAで検出した。

10

20

【実施例11】

【0064】

腹腔内投与による、トランスジェニック植物から精製したキャプシド及び五量体の免疫原性の決定

トランスジェニックタバコ及びイネ植物から精製したキャプシド及び五量体750EL.Uを2回投与して、14週齢の白色ICRマウスを免疫感作させた。同様に、一群のマウスに市販のHAV抗原(Mediagnost)を接種し、これを陽性対照として使用した。他群にPBSを接種し、これを陰性対照として用いた。接種から0日後、15日後、30日後、50日後及び70日後に血液サンプルを採集した。

【0065】

抑制ELISAを用いて、抗体レベルを測定した。モノクローナル抗体7E7 5µgでプレートをカバーし、次いで4時間インキュベートした。その後、それを0.1%トゥイーン入りPBSで1回洗浄した。0.1%トゥイーン入りPBS中にミルクを5%加えてブロッキングを行い、37で2時間インキュベートした。このプレートを0.1%トゥイーン入りPBSで3回洗浄した。HAV抗原(Mediagnost)とともに37で20分間予めインキュベートしていた免疫感作マウス血清を加えた。このプレートを16で12時間インキュベートし、0.1%トゥイーン入りPBSで5回洗浄した。最後に、ミルクを0.5%含むPBSで1/1000に希釈したアルカリホスファターゼ結合モノクローナル抗体7E7を100µL加えた。37で1時間インキュベーションを実施した。ジエタノールアミンで調製した4-ニトロフェニルホスフェート(酵素の基質)を加えることによって、反応を生じさせた。色が現れるかどうかを60分間追跡して調べた。分光光度計で、波長405nmでの吸光度を読み取った。図10に、タバコ及びイネ植物によって産生された五量体を接種したマウスの血液中で検出された、トランスジェニック植物から精製した抗原を接種したマウス血清の抑制の平均レベルを示す。同様にして、キャプシド及び五量体の発現を可能にする構築物で形質転換したタバコ及びイネ植物で産生された抗原で免疫感作させたマウスで類似した抗体レベルが認められた。

30

40

【実施例12】

【0066】

経口投与による、トランスジェニック植物から精製したキャプシド及び五量体の免疫原性の決定

50

精製抗原を使用する経路と、抗原を発現しているニンジン動物に飼料として与える経路の2つの経路で、抗原の経口投与を行った。

【0067】

経口投与した精製キャプシド及び五量体の抗原性を決定するために、8週齢のBalb/cマウスに五量体及びキャプシド7500EL.U.を4回投与した。接種から0日後、15日後、30日後、50日後及び70日後に血液200μLを採集して、抑制ELISAにより抗HAV抗体が存在するかどうかを検出した。

【0068】

実施例11で前述した手順を用いて、抑制ELISAを行った。

【0069】

図11に示された結果によれば、トランスジェニック植物中で発現したHAVの五量体の経口投与によって免疫応答が生じ、このことは、この実験に使用したマウス血清の平均抑制レベルによって示されている。経口投与したマウス血清の平均抑制レベルは、腹腔内投与後に得られたものと比べて低かった。植物を介する五量体の経口投与を実施し、(五量体のみを産生するように特別に設計された構築物pBMLAmで形質転換した)生ニンジン5gを週1回4週間与えた。非形質転換ニンジン動物を飼料として与えたマウス血清を、陰性対照として用いた。この植物が免疫反応を引き起こすことができることが、図12に示す抑制ELISAによって実証された。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】植物細胞の細胞質ゾル中でエンベロープ及び五量体を発現させるための遺伝子構築物を示す図である。A)は、HAVのM2株のORFの概略図である。B)は、構造タンパク(P1-2A)をコードする配列の概略図である。C)は、3ABC領域をコードする配列の概略図である。D)は、HAVのORFmの概略図である。E)は、植物発現のためのバイナリーベクター中にクローン化された当該の挿入配列の概略図である。

【図2】植物細胞の細胞質ゾル中で五量体を発現させるための遺伝子構築物を示す図である。A)は、VP4をコードする配列を含まないORFmの概略図である。B)は、ORFmを植物で発現させるためのバイナリーベクター中にクローン化された当該の挿入配列の概略図である。

【図3】植物細胞の小胞体中でエンベロープ及び五量体を発現させるための遺伝子構築物を示す図である。A)は、KDEL配列と融合したP1-2A配列の概略図である。B)は、小胞体中で発現させるためのバイナリーベクター中にクローン化された当該の挿入配列の概略図である。Eはスペーサー、KはKDELを示す。

【図4】植物細胞の小胞体中で五量体を発現させるための遺伝子構築物を示す図である。A)は、KDEL配列と融合した、VP4配列を含まないP1-2A配列の概略図である。B)は、植物発現のためのバイナリーベクター中にクローン化された当該の挿入配列の概略図である。Eはスペーサー、KはKDELを示す。

【図5】トランスジェニック植物のゲノムDNAのサザンプロットを示す図である。

【図6】ニンジン及びイネトランスジェニック植物のPCR産物のサザンプロットを示す図である。

【図7】エンベロープ及び五量体を細胞質ゾル中で発現させるための遺伝子構築物で形質転換したトランスジェニックタバコ、ニンジン及びイネの植物タンパクのウェスタンプロットを示す図である。

【図8】HAVエンベロープ及び五量体を細胞質ゾル中で発現させるための遺伝子構築物で形質転換したタバコ、ニンジン及びイネ植物に行った免疫酵素検定(ELISA)を示す図である。

【図9】構築物pBMLAmで形質転換した、あるタバコ植物の免疫電子顕微鏡法の結果を示す図である。A)は、非形質転換植物である。B)は、形質転換植物である。C)は、形質転換植物である。

【図10】腹腔内経路によってHAVで免疫感作させたマウスの血清の抑制ELISAを

10

20

30

40

50

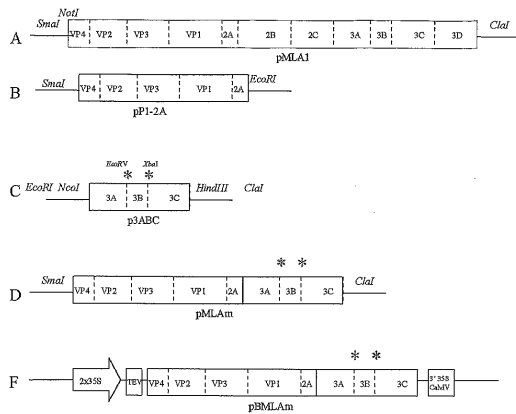
示す図である。

【図11】イネ及びタバコ植物から精製したH A V五量体で経口免疫感作させたマウスの血清の抑制E L I S Aを示す図である。

【図12】H A V五量体を発現している植物から採集したニンジンをもとに経口免疫感作させたマウスの血清の抑制E L I S Aを示す図である。

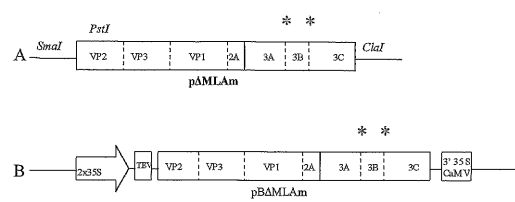
【図1】

Figura 1



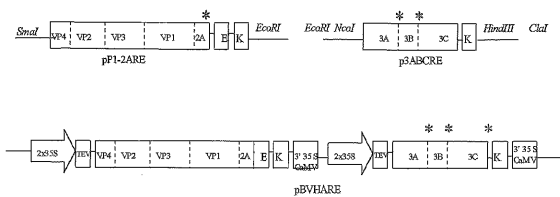
【図2】

Figura 2

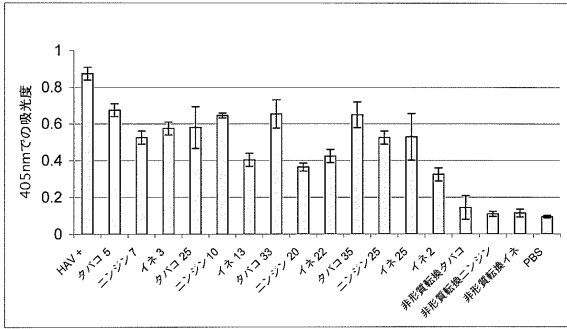


【図3】

Figura 3

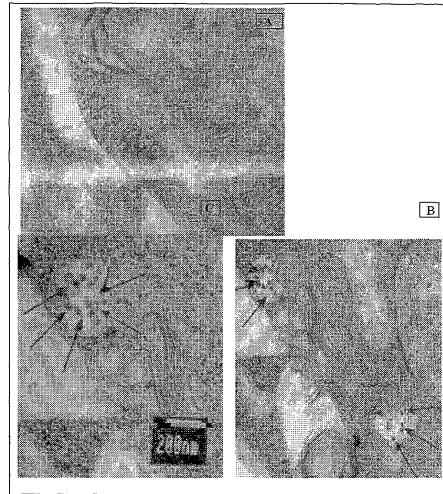


【 図 8 】

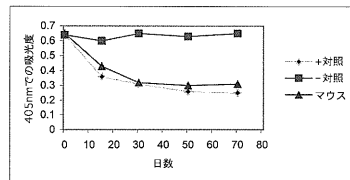


【 図 9 】

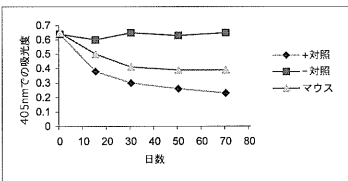
Figura 9



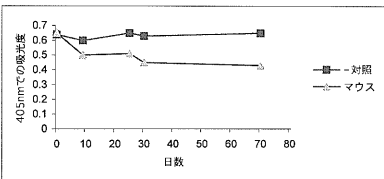
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【配列表】

2006514078000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/CU 03/00017
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/82 C07K14/10		
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) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 276 330 A (INST POLIOMIELITA I VIRUSNYKH ;VNII MOLEKULYARNOI BIOLOG (SU); INS) 3 August 1988 (1988-08-03) the whole document ---	1,3,11, 18,25
A	EP 0 138 704 A (MERCK & CO INC) 24 April 1985 (1985-04-24) the whole document ---	1,3,11, 18,25
A	WO 85/01517 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 11 April 1985 (1985-04-11) the whole document ---	1,3,11, 18,25
A	WO 93/09139 A (EMERSON SUZANNE U ;FEINSTONE STEPHEN M (US); BALTIMORE DAVID (US);) 13 May 1993 (1993-05-13) the whole document ---	1,3,11, 18,25
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 May 2004		Date of mailing of the international search report 26. 05. 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gabriel González Limas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CU 03/00017

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/95933 A (GAUSS MUELLER VERENA ;GILAD MALI KETZINEL (IL); GALUN EITHAN (IL);) 20 December 2001 (2001-12-20) the whole document ---	1-39
A	WO 00/37610 A (RICHTER ELIZABETH ;MASON HUGH S (US); ARNTZEN CHARLES JOEL (US); H) 29 June 2000 (2000-06-29) the whole document ---	1-39
A	US 6 136 320 A (ARNTZEN ET AL) 24 October 2000 (2000-10-24) the whole document -----	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU 03/00017**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 3
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ CU 03/00017

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 3

SEQ ID No. 25 does not appear in the Sequence listings.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CU 03/00017

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0276330	A	03-08-1988	SU 1469856 A1	30-09-1990
			EP 0276330 A1	03-08-1988
			JP 1500485 T	23-02-1989
			WO 8800973 A1	11-02-1988

EP 0138704	A	24-04-1985	US 4614793 A	30-09-1986
			DE 3485948 D1	05-11-1992
			DE 3485948 T2	22-04-1993
			EP 0138704 A2	24-04-1985
			JP 60104020 A	08-06-1985

WO 8501517	A	11-04-1985	AT 61408 T	15-03-1991
			DE 3484244 D1	11-04-1991
			EP 0162054 A1	27-11-1985
			JP 61500053 T	16-01-1986
			WO 8501517 A1	11-04-1985
			US 5849562 A	15-12-1998
			US 5516630 A	14-05-1996

WO 9309139	A	13-05-1993	US 5516630 A	14-05-1996
			AU 3124093 A	07-06-1993
			WO 9309139 A1	13-05-1993
			US 5849562 A	15-12-1998

WO 0195933	A	20-12-2001	US 6368602 B1	09-04-2002
			AU 6628801 A	24-12-2001
			CA 2412343 A1	20-12-2001
			EP 1289547 A2	12-03-2003
			WO 0195933 A2	20-12-2001
			JP 2004503510 T	05-02-2004
			US 2003190332 A1	09-10-2003

WO 0037610	A	29-06-2000	AU 2594900 A	12-07-2000
			BR 9916522 A	24-12-2002
			CA 2357004 A1	29-06-2000
			CN 1378553 T	06-11-2002
			EP 1230257 A2	14-08-2002
			JP 2003512812 T	08-04-2003
			WO 0037610 A2	29-06-2000
			US 2004086530 A1	06-05-2004
			US 6551820 B1	22-04-2003

US 6136320	A	24-10-2000	US 5914123 A	22-06-1999
			US 5612487 A	18-03-1997
			US 5484719 A	16-01-1996
			US 2001053367 A1	20-12-2001
			US 2003138456 A1	24-07-2003
			US 2002006411 A1	17-01-2002
			AU 6813394 A	26-09-1994
			EP 0728014 A1	28-08-1996
			WO 9420135 A1	15-09-1994
			US 6034298 A	07-03-2000

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00017

A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN CIP 7 C12N15/82 C07K14/10		
Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP		
B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) CIP 7 C12N C07K		
Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	EP 0 276 330 A (INST POLIOMIELITA I VIRUSNYKH ;VNII MOLEKULARNOI BIOLOG (SU); INS) 3 Agosto 1988 (1988-08-03) el documento completo ---	1,3,11, 18,25
A	EP 0 138 704 A (MERCK & CO INC) 24 Abril 1985 (1985-04-24) el documento completo ---	1,3,11, 18,25
A	WO 85/01517 A (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 11 Abril 1985 (1985-04-11) el documento completo ---	1,3,11, 18,25
A	WO 93/09139 A (EMERSON SUZANNE U ;FEINSTONE STEPHEN M (US); BALTIMORE DAVID (US);) 13 Mayo 1993 (1993-05-13) el documento completo ---	1,3,11, 18,25
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuerdo C se relacionan documentos adicionales		<input checked="" type="checkbox"/> Véase el Anexo de la familia de patentes.
* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada) "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes		
Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional		Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional
6 Mayo 2004		26.05.2004
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 540-3016		Funcionario autorizado Gabriel González Limas

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CU 03/00017

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría*	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	WO 01/95933 A (GAUSS MUELLER VERENA ;GILAD MALI KETZINEL (IL); GALUN EITHAN (IL);) 20 Diciembre 2001 (2001-12-20) el documento completo ---	1-39
A	WO 00/37610 A (RICHTER ELIZABETH ;MASON HUGH S (US); ARNTZEN CHARLES JOEL (US); H) 29 Junio 2000 (2000-06-29) el documento completo ---	1-39
A	US 6 136 320 A (ARNTZEN ET AL) 24 Octubre 2000 (2000-10-24) el documento completo -----	1-39

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00017

Documento de patente citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación			
EP 0276330	A	03-08-1988	SU 1469856 A1	30-09-1990			
			EP 0276330 A1	03-08-1988			
			JP 1500485 T	23-02-1989			
			WO 8800973 A1	11-02-1988			

EP 0138704	A	24-04-1985	US 4614793 A	30-09-1986			
			DE 3485948 D1	05-11-1992			
			DE 3485948 T2	22-04-1993			
			EP 0138704 A2	24-04-1985			
			JP 60104020 A	08-06-1985			

WO 8501517	A	11-04-1985	AT 61408 T	15-03-1991			
			DE 3484244 D1	11-04-1991			
			EP 0162054 A1	27-11-1985			
			JP 61500053 T	16-01-1986			
			WO 8501517 A1	11-04-1985			
			US 5849562 A	15-12-1998			
			US 5516630 A	14-05-1996			

WO 9309139	A	13-05-1993	US 5516630 A	14-05-1996			
			AU 3124093 A	07-06-1993			
			WO 9309139 A1	13-05-1993			
			US 5849562 A	15-12-1998			

WO 0195933	A	20-12-2001	US 6368602 B1	09-04-2002			
			AU 6628801 A	24-12-2001			
			CA 2412343 A1	20-12-2001			
			EP 1289547 A2	12-03-2003			
			WO 0195933 A2	20-12-2001			
			JP 2004503510 T	05-02-2004			
			US 2003190332 A1	09-10-2003			

WO 0037610	A	29-06-2000	AU 2594900 A	12-07-2000			
			BR 9916522 A	24-12-2002			
			CA 2357004 A1	29-06-2000			
			CN 1378553 T	06-11-2002			
			EP 1230257 A2	14-08-2002			
			JP 2003512812 T	08-04-2003			
			WO 0037610 A2	29-06-2000			
			US 2004086530 A1	06-05-2004			
			US 6551820 B1	22-04-2003			

			US 6136320	A	24-10-2000	US 5914123 A	22-06-1999
US 5612487 A	18-03-1997						
US 5484719 A	16-01-1996						
US 2001053367 A1	20-12-2001						
US 2003138456 A1	24-07-2003						
US 2002006411 A1	17-01-2002						
AU 6813394 A	26-09-1994						
EP 0728014 A1	28-08-1996						
WO 9420135 A1	15-09-1994						
US 6034298 A	07-03-2000						

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/576 (2006.01)	G 0 1 N 33/576	A

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

(72) 発明者 ロペス ケサダ、アリーナ
キューバ国、シウダッド ハバナ、プラヤ、 アベニダ 31 エディフィシオ 18207、アパルトメント 24

(72) 発明者 ゴンザレス バディロ、ベアトリス
キューバ国、シウダッド ハバナ、プラヤ、 カレ 186 ヌメロ 3115、アパルトメント 6ア

(72) 発明者 セルマン - ホウセイン ソーサ、ギリエルモ
キューバ国、シウダッド ハバナ、プラヤ、 カレ 186 ヌメロ 3115、アパルトメント 6ア

(72) 発明者 ヘルナンデス ベラスケス、アベル
キューバ国、シウダッド ドラ ハバナ、ボイエロス、ムルゴバ、 カレ 373、ヌメロ 17843、エディフィシオ 76

(72) 発明者 リオス バカラオ、ハビエル
キューバ国、シウダッド ハバナ、ボイエロス、ムルゴバ、 カレ 375 ヌメロ 17817ア

(72) 発明者 ロザバル アヨン、ヤミルカ
キューバ国、シウダッド ハバナ、プラヤ、 カレ 36、ヌメロ 2308

(72) 発明者 ベレス マルティネス、マルレン
キューバ国、シウダッド ハバナ、プラザ、 カレ 11、ヌメロ 407、ハブ. 13

(72) 発明者 ロドリゲス レイ、リセル
キューバ国、シウダッド ハバナ、ラ リサ、 カレ 312、ヌメロ 2915、リパルトミエント フラガ

(72) 発明者 ガルシア ゴンザレス、ロランド
キューバ国、カマグエイ、コミュニダド シエンティフィカ、 カレ 2ア、ヌメロ 18、エントレ カレ アイ カレ ベ

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA14 BA33 CA04 CA11 CA20 DA01 EA04 FA02 GA11
HA01
4B050 CC04 DD20 LL01
4C085 AA03 BA88 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA02 DA86 DA89 EA20 EA31
FA71

专利名称(译)	在植物细胞中获得的重组甲型肝炎病毒抗原		
公开(公告)号	JP2006514078A	公开(公告)日	2006-04-27
申请号	JP2004567234	申请日	2003-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	遗传工程与生物技术中心		
申请(专利权)人(译)	炫酷德英格埃尼区Jieneteika利生物TECNOLOGIA		
[标]发明人	ロベスケサダアリーナ ゴンザレスバディロベアトリス セルマンホウセイソサギリエルモ ヘルナンデスベラスケスアベル リオスバカラオハビエル ロザバルアヨンヤミルカ ペレスマルティネスマルレン ロドリゲスレイリセル ガルシアゴンザレスロランド		
发明人	ロベス ケサダ、アリーナ ゴンザレス バディロ、ベアトリス セルマン - ホウセイソ ソーサ、ギリエルモ ヘルナンデス ベラスケス、アベル リオス バカラオ、ハビエル ロザバル アヨン、ヤミルカ ペレス マルティネス、マルレン ロドリゲス レイ、リセル ガルシア ゴンザレス、ロランド		
IPC分类号	C07K14/10 C12N15/09 C12N9/50 A61K39/29 A61P31/14 G01N33/531 G01N33/576 A61K39/00 C12N15/82		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/14 C07K14/005 C07K2319/00 C07K2319/04 C12N15/8257 C12N2770/32422 Y02A50/464		
FI分类号	C07K14/10.ZNA C12N15/00.A C12N9/50 A61K39/29 A61P31/14 G01N33/531.A G01N33/576.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA14 4B024/BA33 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B050/CC04 4B050/DD20 4B050/LL01 4C085/AA03 4C085/BA88 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/FA71		
代理人(译)	池田幸		
优先权	20030031 2003-01-31 CU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用在古巴分离的菌株M2，基于甲型肝炎病毒 (HAV) 基因组的修饰片段产生遗传构建体。与适当的定位和调节信号融合的这些片段的核苷酸序列在转基因植物中表达。获得的HAV重组抗原由五聚体和/或空包膜组成，能够产生免疫应答。

