

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-194672

(P2004-194672A)

(43) 公開日 平成16年7月15日(2004.7.15)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/23	A 6 1 K 39/23	4 B 0 6 4
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-47227 (P2004-47227)	(71) 出願人	501129088
(22) 出願日	平成16年2月24日 (2004.2.24)		アメリカ合衆国
(62) 分割の表示	特願平6-507481の分割		アメリカ合衆国 20852 メリーランド州, ロックビル, エグゼクティブ ブールバード 6011 ボックス 13
原出願日	平成5年9月3日 (1993.9.3)		ナショナル インスティテューツ オブヘルス オフィス オブ テクノロジー
(31) 優先権主張番号	07/941, 371		トランスファー
(32) 優先日	平成4年9月3日 (1992.9.3)	(74) 代理人	100100549
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	08/032, 869	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成5年3月16日 (1993.3.16)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 自己組立て組換えパピローマウイルスキャプシッド蛋白質

(57) 【要約】

【課題】 ウイルス感染症の診断、予防および治療における使用に適した組換えウイルスタンパク質を提供する。

【解決手段】 下記の遺伝子構成物を含む非哺乳動物宿主細胞：

パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルス L 1 立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、前記構成物が、前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てにより天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、前記組換えベクターが非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ前記細胞が非哺乳動物真核宿主細胞であり、同宿主細胞は前記立体配座エピトープを有するキャプソメア構造を産生することを特徴とする、パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルス L 1 立体配座コード配列を含む遺伝子構成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の遺伝子構成物を含む非哺乳動物宿主細胞：

パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルス L 1 立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、前記構成物が、前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てにより天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、前記組換えベクターが非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ前記細胞が非哺乳動物真核宿主細胞であり、同宿主細胞は前記立体配座エピトープを有するキャプソメア構造を産生することを特徴とする、パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルス L 1 立体配座コード配列を含む遺伝子構成物。 10

【請求項 2】

前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質は野生型である請求項 1 記載の非哺乳動物宿主細胞。

【請求項 3】

前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質は、配列番号 1 に示す変異型 H P V 1 6 L 1 タンパク質のアミノ酸配列の 2 0 2 位に相当する位置に、ヒスチジン残基以外のアミノ酸残基を有する請求項 2 に記載の非哺乳動物宿主細胞。

【請求項 4】

前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質は、前記 2 0 2 位に相当する位置を除いて、配列番号 2 に示すアミノ酸配列、又は同アミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 3 に記載の細胞。 20

【請求項 5】

天然のパピローマウイルスに対する高力価の中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造を製造する方法であって、該方法は、該キャプソメア構造の発現を指示する遺伝子構成物のための条件を準備することを含み、該遺伝子構成物はパピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルス L 1 立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、該パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質を含む該キャプソメア構造の自己組み立てによる天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有する該キャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、該組換えベクターが非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ該細胞が非哺乳動物真核宿主細胞である当該方法。 30

【請求項 6】

前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質は野生型である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質は、配列番号 1 に示す変異型 H P V 1 6 L 1 タンパク質のアミノ酸配列の 2 0 2 位に相当する位置に、ヒスチジン残基以外のアミノ酸残基を有する請求項 6 に記載の方法。 40

【請求項 8】

前記パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質は、前記 2 0 2 位に相当する位置を除いて、配列番号 2 に示すアミノ酸配列、又は同アミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含むアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記のキャプソメア構造を単離するステップを更に含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記の組換えベクターが昆虫用ベクターであり且つ前記の宿主細胞が昆虫細胞である、請求項 5～9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記の昆虫用ベクターが、バキュロウイルスベクターである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記のバキュロウイルスベクターが、昆虫宿主細胞の組換えバキュロウイルス DNA と野生型バキュロウイルス DNA の同時トランスフェクションにより形成される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記の組換えベクターが酵母細胞用ベクターであり且つ前記の宿主細胞が酵母宿主細胞である、請求項 5～9 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 14】

前記の配列が、ヒトパピローマウイルス L1 遺伝子、ウシパピローマウイルス L1 遺伝子又はサルパピローマウイルス L1 遺伝子から導かれる、請求項 5～13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記のキャプソメア構造が、パピローマウイルス L2 キャプシッドタンパク質の同時発現を必要としない、請求項 5～14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記のキャプソメア構造が、更に、パピローマウイルス L2 キャプシッドタンパク質を含む、請求項 5～13 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 17】

前記の配列が、前記のパピローマウイルス L1 キャプシッドタンパク質と前記のパピローマウイルス L2 キャプシッドタンパク質を二重にコードする、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

免疫化投与スケジュールに従って投与した場合に少なくとも約 10^3 のパピローマウイルス中和抗体価を誘導するのに十分な有効な免疫原濃度のキャプソメア構造を含む単位投与量のワクチンであって、該キャプソメア構造が、下記の遺伝子構成物の指示の下に発現された天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有する当該ワクチン： 30

パピローマウイルス L1 キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルス L1 立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、前記構成物は、前記パピローマウイルス L1 キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てによる天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、前記組換えベクターが非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ前記細胞が非哺乳動物真核宿主細胞である遺伝子構成物。

【請求項 19】

患者のパピローマウイルス感染に対する液性免疫を検出する方法であって、下記：

(a) 有効な抗体検出量のキャプソメア構造を用意し； 40

(b) 該キャプソメア構造をパピローマウイルス感染について試験すべき患者からの体液試料と接触させ、該試料中に含まれるパピローマウイルス抗体をそれに結合させて抗原抗体複合体を形成させ；そして

(c) 該試料中の該パピローマウイルス抗体の存在を該複合体の形成を測定することにより測定する

ことを含み、上記のキャプソメア構造が、下記の遺伝子構成物の指示の下に発現された天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有する当該方法：

パピローマウイルス L1 キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルス L1 立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、前記構成物は、前 50

記パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てによる天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、前記組換えベクターが非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ前記細胞が非哺乳動物真核宿主細胞である遺伝子構成物。

【請求項20】

パピローマウイルス感染の疑いのある患者からの試料において該ウイルスを検出する方法であって、該方法は、下記：

(a)キャプソメア構造に対して高めた有効なパピローマウイルス検出量の抗体を用意し；

(b)該試料を該抗体と接触させ、該試料に含まれるパピローマウイルスをそれに結合させて抗原抗体複合体を形成させ；そして

(c)該試料中の該パピローマウイルスの存在を該複合体の形成を測定することにより測定する

ことを含み、上記のキャプソメア構造が、下記の遺伝子構成物の指示の下に発現された天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有する当該方法：

パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルスL1立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、前記構成物は、前記パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てによる天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、前記組換えベクターが非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ前記細胞が非哺乳動物真核宿主細胞である遺伝子構成物。

【請求項21】

患者におけるパピローマウイルス感染を検出するための、即座に使えるようにパッケージされた診断用キットであって、第1のコンパートメントに有効な抗体検出量のキャプソメア構造を含み且つ第2のコンパートメントに該キャプソメア構造と患者から得られた試料中のパピローマウイルス抗体との結合を検出する材料を含み、上記のキャプソメア構造が、下記の遺伝子構成物の指示の下に発現された天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有する当該キット：

パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルスL1立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、前記構成物は、前記パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てによる天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、前記組換えベクターが非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ前記細胞が非哺乳動物真核宿主細胞である遺伝子構成物。

【請求項22】

患者におけるパピローマウイルス感染を検出するための、即座に使えるようにパッケージされた診断用キットであって、第1のコンパートメントに有効なパピローマウイルス検出量のキャプソメア構造に対して高めた抗体を含み且つ第2のコンパートメントに該抗体と患者から得られた試料中のパピローマウイルスとの結合を検出する材料を含み、上記のキャプソメア構造が、下記の遺伝子構成物の指示の下に発現された天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有する当該キット：

パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質をコードするパピローマウイルスL1立体配座コード配列を組換えベクター中に含む遺伝子構成物であって、前記構成物は、前記パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てによる天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示し、但し、前記組換えベクター

10

20

30

40

50

が非哺乳動物真核細胞用ベクターであり且つ前記細胞が非哺乳動物真核宿主細胞である遺伝子構成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は組換えウイルスタンパク質に関する。特に、本発明はウイルス感染症の診断、予防および治療における使用に適した組換えウイルスタンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

パピローマウイルスはヒトを含むさまざまな種の動物の上皮に感染し、一般に感染部位に良性の上皮および腺維上皮腫細胞、すなわちいぼ状組織を誘発する。脊椎動物の種はそれぞれ、はっきりと区別できる一群のパピローマウイルスに感染する。各パピローマウイルス群は、いくつかの型のパピローマウイルスを含む。例えば、60種類を超える数のヒトパピローマウイルス（HPV）遺伝子型が単離されている。パピローマウイルスは上位種に特異的な感染因子である。例えば、ウシパピローマウイルスがヒトなどの異種において乳頭腫を誘発することはできない。また、パピローマウイルスの型も、あるパピローマウイルス型による感染に対する中和免疫性は通常は他の型に対する免疫性を持たせることはないという点で免疫抗原としては極めて特異的であることが分かっている。これらの型が相同種に感染するとしても、である。

【0003】

ヒトでは、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる性器疣贅は性的に伝播する疾病である。性器疣贅はごく普通に起こり、無症状すなわち不顕性のHPV感染は臨床感染よりもさらに一般的に見られるものである。ヒトにおける良性病変、特にある特定のパピローマウイルス型から生じる良性病変は、進行して悪性になる。このため、悪性腫瘍関連パピローマウイルス型の1つによる感染は、世界的に見て女性で2番目に多いガンである子宮頸部ガンの発達における最も危険な要因であると考えられている（zur Hausen, H., 1991; Schiffman, M., 1992）。子宮頸部ガンでは何種類かのHPV遺伝子型が発見されたが、HPV16は子宮頸部ガンの50%から単離される最も一般的な型である。

【0004】

パピローマ抗原に対する中和抗体の産生についての免疫学的研究から、脊椎動物ではパピローマウイルス感染およびこれらの感染に関連した悪性腫瘍は、免疫処置によって防止可能であるということが分かっている。しかしながら、効果的なパピローマウイルスワクチンの開発はさまざまな困難さが原因で滞っている。

【0005】

まず、効果的なワクチンの開発には必須であるパピローマウイルスの構造および免疫遺伝学的特徴を特定するために必要な感染性ウイルスの多量のストックをin vivoで生成するのは不可能であった。培養細胞はパピローマウイルスオンコタンパク質およびその他の非構造的タンパク質を発現するが、これらの細胞はin vitroにおいて熱心に研究されてきた。しかしながら、構造的ウイルス蛋白質L1およびL2の発現（およびそれに続く感染性ウイルスのアセンブリ）は、感染した上皮組織の最終的に分化した層においてのみ起こる。従って、ウイルス遺伝子、タンパク質および構造の特徴は、必然的に乳頭腫から採集したウイルスについての研究から集められたものであった。特に、パピローマウイルス構造およびこれに関連した免疫性についてはウシパピローマウイルス系において研究されていた。なぜなら、このウシパピローマウイルス（BPV）いぼ状組織からであれば多量の感染性ウイルス粒子を単離することができるからである。

【0006】

今日までのパピローマウイルス構造についての研究によって得られた情報から、パピローマウイルスは、全て、保存されたL1主要キャプシッドタンパク質およびこれよりは保存されないL2副次的キャプシッドタンパク質からなる（Baker, C., 1987）

非エンベロープ状態の50～60nmの20面体構造であることが分かる(Crawford, L., et al., 1963)。これら2つのタンパク質の配列は互いに全く関連がない。キャプシッドにおけるL2の機能および位置は明らかになっていない。しかしながら、免疫学的データからL2のほとんどはL1に対して内部にあるのではないと思われる。

【0007】

近年、BPV1およびHPV1ビリオンについての高解像度低温電子顕微鏡解析によって、これら2つのウイルスは、72個の5量体キャプソメアを持つ極めてよく似た構造を有し、おそらくそれぞれのキャプソメアがT=7対称性のビリオン外被を形成する5個のL1分子から構成されていることが分かってきた(Baker, T., 1991)。副次的L2キャプシッドタンパク質のビリオンにおける位置はまだ特定されておらず、L2やその他のウイルスタンパク質がキャプシッドアセンブリに必要であるか否かもはっきりしていない。表面上、パピローマウイルス構造は対称性およびキャプソメア数が同一である、ポリオーマ45nmビリオンの構造に似ている(Liddington, R., et al., 1991)。しかしながら、ポリオーマウイルスとパピローマウイルス種のキャプソメア内部の接触のシステムは異なっており、ポリオーマウイルスの主要および副次的のキャプシッドタンパク質は遺伝的にL1およびL2に関連していない。

10

【0008】

ウシパピローマウイルスについての研究は、BPV用に開発された、定量的な病巣形質転換感染アッセイによって促進されているが、HPVには利用できない(Dvoretzky, I., et al., 1980)。従って、パピローマウイルスに対する免疫についての理解は、ウシパピローマウイルス系に基づいて導き出されていた。そのままのウシパピローマウイルスを使用する限られた研究から、分娩時の上皮BPV感染を防止するワクチンとして感染性あるいはホルマリン不活性化したBPVウイルスを非皮膚接種するのが効果的であることが分かった(Olson, C., et al., 1960; Jarrett, W. et al., 1990)。残念なことに、他の種に感染するパピローマウイルスに対するワクチンの開発にも、他のウシ型に対するワクチンの開発にせよ、BPVビリオンを使用することはできない。なぜなら、これらのウイルスは極めて特異性が高くインタクト(無傷)なウイルス粒子の発癌可能性に関連しているためである。

20

【0009】

これらパピローマウイルス免疫性についての研究の有意な結論は、乳頭種ウイルスを中性化する抗体の能力が、型特異的なビリオン表面の立体配座依存的エピトープに対する反応能力に関連しているようである。例えば、感染性BPV1ビリオンに対して高められたウサギ抗血清は、C127細胞の病巣形質転換(Dvoretzky, I., et al., 1980)およびウシ胎児皮膚移植片の形質転換を抑制するが、変性ビリオンに対して高められた抗血清は抑制しない(Ghim, S., et al., 1991)。

30

【0010】

これとは対照的に、細菌で発現させたBPVL1およびL2(Pilacinski, W., et al., 1984; Jin, X., et al., 1989)と、in vivoで合成されたワタオウサギパピローマウイルス(CRPV)L1およびL2(Christensen, N., et al., 1991; Lin Y. L. et al., 1992)とに対して中和血清が生成されたが、これらの血清はいずれも天然のビリオンの構造的な特徴は有しておらず、力価は小さく、細胞性免疫反応性を検出するためにE. coliにおいて発現された組み換えHPV L1融合ペプチドを使用して成功する例は極めて限られていた(Hopfl, R., et al., 1991)。BPV系において得られた結果は、マウス異種移植アッセイにおいてHPV11感染を中和する単一クローン性の抗体は変性されたHPV11ビリオンではなく天然のHPV11ビリオンであると認識された(Christensen, N., et al., 1990)、HPV系において得られた結果と一致している。

40

【0011】

50

パピローマウイルスキャプシッドはin vitroで産生するために単離されている。Zhou, J., et al (1991) および (1992) は、HPV L1 および L2 遺伝子と、HPV E3/E4 遺伝子を組み合わせた HPV L1 および L2 遺伝子とをワクシニアウイルスベクターにクローニングし、この組み換えワクシニアウイルスで CV-1 哺乳類細胞を感染することによってウイルス様の粒子 (virus-like particle) を産生した。これらの研究は Zhou によって解釈され、上皮細胞における HPV16 の L1 および L2 タンパク質の発現はビリオン型の粒子の組立てを可能にするために必要で十分なものであるということが確立された。L1 および L2 タンパク質を発現する二重組み換えワクシニアウイルスを感染させた細胞では、HPV キャプソメアの不完全に組み立てられたアレイであると思われる核中に小さな (40 nm) ウイルスの粒子認められた。L1 タンパク質のみあるいは L2 タンパク質のみを発現させても、ウイルス様粒子は産生されなかった。また、L1 および L2 遺伝子を含有する単一組み換えワクシニアウイルスを二重に感染させた細胞でも粒子を産生させることはできなかった。中和活性は全く報告されなかった。

10

【0012】

Ghim et al. (1992) は、哺乳類細胞において、HPV1、すなわち主に手足のいぼ状組織に関連した非生殖器型ウイルスから L1 が発現すると、L1 タンパク質はインタクトなビリオンに認められる立体配座エピトープを含有していたと報告した。Ghim は、粒子が産生されるか否かは特定しておらず、L1 タンパク質が中和抗体を誘導できるか否かについても評価していなかった。もっと最近になって、Hagensee et al. (1993) は、ヒト細胞において HPV1 から L1 が発現されると、L1 は自己組み立てされてウイルス様の粒子になると報告した。中和抗体についての研究は行われなかった。

20

【0013】

例えばパルボウイルスなどの他のウイルス系における研究は、キャプシッドアセンブリだけでは免疫原性を持たせることはできないだろうということが分かる。パルボウイルス VP2 は、昆虫細胞において発現させるとそれ自体で自己組み立てされるが、VP1 および VP2 の両方を含有する粒子のみが中和抗体を誘導できた (Kajigaya, S., et al., 1991)。

【0014】

細胞培養において選択した種および型の更新可能なパピローマウイルス試薬を産生するための方法を開発することには利点がある。また、サブユニットワクチンとして利用可能な立体配座天然ウイルス粒子の特性を付与する免疫を有するこのようなパピローマウイルス試薬を産生することにも利点がある。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の目的は、このような組み換え立体配座パピローマウイルスタンパク質と、その産生および使用方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

40

【0016】

本発明は、自己組み立てし、極めて特異的かつ極めて免疫原的な立体配座エピトープを有するキャプソメア構造を形成する組み換えパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を提供することによって、パピローマウイルス感染とその良性および悪性の後遺症とを診断および防止することを目的としたものである。従って、本発明によれば、パピローマウイルスの L1 立体配座コード化配列を含む遺伝子構成物が提供される。パピローマウイルス L1 立体配座コード化配列は、ウシ、サル、ヒトの遺伝子から単離することができる。好ましい実施態様において、パピローマウイルス L1 立体配座コード化配列は、野生型 HPV16 遺伝子から単離される。特に好ましい実施態様において、パピロ

50

ーマウイルス L 1 立体配座コード化配列は、配列番号 2 である。遺伝子構成物は、さらにパピローマウイルス L 2 コード化配列を有することができる。

【0017】

本発明の他の態様によれば、本発明による遺伝子構成物によって形質転換された非哺乳類真核性宿主細胞が提供される。

本発明の他の態様によれば、キャプソメア構造またはその一部に組み立てられる、組み換えパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を産生するための方法であって、(1) L 1 立体配座キャプシッドタンパク質をコード化するパピローマウイルス遺伝子を転移ベクターにクローニングするステップであって、前記遺伝子のオープンリーディングフレームは前記ベクターの制御下にある前記ステップと、(2) 組み換えベクターを宿主細胞に転移するステップであって、クローン化したパピローマウイルス遺伝子はパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を発現する前記ステップと、(3) 宿主細胞からパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を含有するキャプソメア構造を単離するステップと、を含む方法が提供される。好ましい実施態様において、クローン化したパピローマウイルス遺伝子は本質的に立体配座 L 1 コード化配列からなり、発現タンパク質は組み立てられて本質的に L 1 キャプシッドタンパク質からなるキャプソメア構造になる。他の好ましい実施態様において、上述した方法のクローニングするステップは、L 2 キャプシッドタンパク質をコード化するパピローマウイルス遺伝子をクローニングすることをさらに含み、それによって前記 L 1 および L 2 タンパク質を同時に宿主細胞に発現させる、前記宿主細胞が哺乳類細胞である時に前記転移ベクターはワクシニアウイルスではないという条件で、単離されたキャプソメア構造は L 1 および L 2 キャプシッドタンパク質を有する。立体配座 L 1 コード化配列は、ウシ、サル、ヒトパピローマウイルスからクローンすることができる。好ましい実施態様によれば、立体配座 L 1 コード化配列は野生型 HPV 16 パピローマウイルスからクローニングされる。特に好ましい実施態様において、立体配座 L 1 コード化配列は配列番号 2 である。また、好ましい実施態様において、転移ベクターはパキキュロウイルスに基づく形質転換ベクターであり、パピローマウイルス遺伝子は昆虫細胞において活性であるプロモーターの制御下にある。従って、この実施態様では、組み換えパキキュロウイルス DNA は Sf-9 昆虫細胞にトランスフェクションされる。

【0018】

本発明による方法の別の実施態様において、形質転換ベクターは酵母の転移ベクターであり、組み換えベクターは酵母細胞にトランスフェクションされる。

本発明のさらに他の態様によれば、本発明の方法によって産生される、本質的にパピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質からなるウイルスキャプソメア構造またはその蛋白質が提供される。また、ウイルスキャプソメア構造は本発明の方法により生成される本質的にパピローマウイルス L 1 および L 2 キャプシッドタンパク質からなるものであってもよい。特に好ましい実施態様において、ウイルスキャプソメア構造は、野生型ウイルスからクローニングされた HPV 16 L 1 DNA の発現産生物であるパピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質を含む。

【0019】

本発明によるこのウイルスキャプシッドまたはキャプソメア構造若しくはその一部あるいは断片は、本質的にパピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質からなるものであってもよい。一方、これらのキャプシッドまたはキャプソメア構造若しくはその断片は、本質的に野生型 HPV 16 パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質からなるものであってもよい。

【0020】

上述した本発明のいずれかの方法によるウイルスキャプシッド構造は、未変性(天然の)パピローマウイルスに対する中和抗体を誘導可能な免疫原立体配座エピトープを有するキャプシッドタンパク質を含む。キャプシッドタンパク質は、ウシ、サル、ヒトのパピローマウイルス L 1 タンパク質であることができる。好ましい実施態様において、パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質は、野生型 HPV 16 遺伝子の発現産生物である

。特に好ましい実施態様において、H P V 1 6 遺伝子は配列番号 2 の配列を含む。

【0021】

本発明のさらに他の態様によれば、免疫治療スケジュールに沿って投与した場合に少なくとも約 10^3 のパピローマウイルス中和抗体力価を誘導できるだけの効果的な免疫原濃度において、パピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質または L 1 タンパク質および L 2 キャプシッドタンパク質の立体配座エピトープを有するペプチドを含む単回量のワクチンが提供される。好ましい実施態様において、ワクチンは H P V 1 6 キャプシッドタンパク質である L 1 キャプシッドタンパク質を含む。特に好ましい実施態様において、このワクチンは野生型 H P V L 1 タンパク質の L 1 キャプシッドタンパク質を含む。

本発明の方法によれば、野生型 H P V 1 6 パピローマウイルスゲノムからの L 1 オープンリーディングフレーム (O R F) を使用することで、ワクチンの使用に適したスケールでの調製量のウイルス様粒子の産生を特に促進できる。 10

【0022】

本発明のさらに他の態様によれば、脊椎動物におけるパピローマウイルス感染を防止または治療するための方法であって、本発明によるパピローマウイルスキャプソメア構造またはその断片を、免疫生成管理に基づいて脊椎動物に投与するステップを含む方法が提供される。好ましい実施態様において、パピローマウイルスキャプソメア構造は野生型 H P V 1 6 L 1 キャプシッドタンパク質を含む。

【0023】

本発明によれば、さらに、脊椎動物においてパピローマウイルス感染を防止または治療するための方法であって、本発明によるパピローマウイルスキャプソメア構造すなわちキャプソメア構造を含むワクチン産生物を、免疫生成管理に基づいて脊椎動物に投与することを含む方法が提供される。好ましい実施態様において、パピローマウイルスワクチンは野生型 H P V 1 6 L 1 キャプシッドタンパク質を有する。 20

【0024】

また、本発明の範囲内で、パピローマウイルス感染に対して脊椎動物を免疫感作するための方法であって、立体配座パピローマウイルス L 1 コード化配列を有する本発明の組み換え遺伝子構成を脊椎動物に投与し、前記コード化配列が前記脊椎動物の細胞または組織において発現できるようにすることで、パピローマウイルスに対して効果的な中和免疫応答を誘導することを含む方法が提供される。好ましい実施態様において、立体配座パピローマウイルス L 1 コード化配列は、ヒトパピローマウイルス H P V 1 6 から誘導される。特に好ましい実施態様において、ヒトパピローマウイルス H P V 1 6 は野生型パピローマウイルスである。 30

【0025】

本発明のさらに他の態様によれば、脊椎動物におけるパピローマウイルス感染に対するヒトの液性免疫を検出するための方法であって、(a) パピローマウイルスキャプソメア構造の少なくとも 1 つの立体配座エピトープを有するパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を抗体検出に有効な量で供給するステップと、(b) ステップ (a) のペプチドを、パピローマウイルス感染についての検査対象となる脊椎動物から得られた体液の標本と接触させ、前記標本に含有されるパピローマウイルス抗体がこれに結合して抗原-抗体複合体を形成させるステップと、(c) ステップ (b) の複合体を、検出可能に標識した免疫グロブリン結合試薬と接触させるステップと、(d) 前記複合体に結合する標識した免疫グロブリン結合試薬によって前記標本中の抗パピローマウイルス抗体を検出するステップと、を含む方法が提供される。本発明のこの態様の好ましい実施態様において、ペプチドは本質的にパピローマウイルス L 1 キャプシッドタンパク質からなる。他の実施態様において、ペプチドは本質的にヒトパピローマウイルス H P V 1 6 の発現産生物からなる。特に好ましい実施態様において、ペプチドは本質的に野生型ヒトパピローマウイルス H P V 1 6 遺伝子の発現産生物からなり、例えばこのペプチドは本質的に配列番号 2 の発現産生物からなる。 40

【0026】

本発明のさらに他の態様によれば、パピローマウイルスの感染が疑わしい動物由来の標本においてパピローマウイルスを検出するための方法であって、前記パピローマウイルスのキャプシッドの立体配座エピトープの1つまたは複数に対する特異性を有する抗体と標本とを接触させるステップであって、抗体は検出可能なシグナルを発生させる標識を有し、あるいは検出可能に標識された試薬に結合されるステップと、抗体をパピローマウイルスに結合できるようにするステップと、検出可能なラベルによって標本中に存在するパピローマウイルスの存在を決定するステップと、を含む方法が提供される。

【0027】

本発明のさらに他の態様によれば、パピローマウイルスの感染が疑わしい動物におけるパピローマウイルスに対する細胞免疫応答を決定するための方法であって、前記動物の免疫適格細胞と野生型の組み換えパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質すなわち本発明の結合された組み換えL1およびL2キャプシッドタンパク質とを接触させるステップと、キャプシッドタンパク質に対する前記細胞の増殖によってパピローマウイルスに対する細胞性免疫を評価するステップとを有する方法が提供される。本発明のこの態様の好ましい実施態様にいにおいて、組み換えパピローマウイルスタンパク質を動物の皮膚に導入する。

【0028】

本発明のさらに別の態様によれば、本質的にパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質からなるキャプソメア構造またはパピローマウイルスL1タンパク質およびL2キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造、またはこれらのキャプソメア構造のいずれかに対する抗体を単体または組み合わせで有し、単一包装のパッケージ容器にパピローマウイルスに対する体液性または細胞性免疫についてのアッセイを実施するための材料と共に備えるパピローマウイルス感染診断キットが提供される。

【発明の効果】

【0029】

本発明により、組み換え立体配座パピローマウイルスタンパク質と、その産生および使用方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

我々は、BPVまたはHPV16のL1主要キャプシッドタンパク質をコード化する遺伝子は、適当な転移ベクターによって宿主細胞に導入された後に、高いレベルでL1を発現することができ、また組換えL1は自己組み立てされて、そのままのビリオンのキャプシッド構造物に極めてよく似た無核キャプシッド構造物を形成する能力を本質的に有することを発見した。

【0031】

さらに、本発明の自己組み立てされた組換えL1キャプシッドタンパク質は、組換え細菌より抽出したL1タンパク質や変性型ビリオンとは異なり、パピローマウイルス感染症から守ることができる多量の中和抗血清を誘導する能力において、インタクトなパピローマウイルス粒子と同じ有効性を有する。本発明におけるキャプシッドタンパク質の高レベルの免疫原性は強い抗体結合性を意味し、それにより、本タンパク質は血清学的スクリーニング検査で立体配座ビリオンエピトープに対する抗体を検出し測定するための感応剤となる。また、この免疫原性により、本発明のキャプシッドタンパク質はパピローマウイルスによる感染症から宿主動物を守る高効果ワクチンまたは中和抗体を誘引する免疫原として使用することもできる。これら見解は最近Kirnbauerらによって報告され(1992)、米国出願番号07/941,371の根拠になった。

【0032】

今回我々は、良性のパピローマウイルス病変より単離された野生型HPV16ゲノムから発現されるキャプシッドタンパク質L1は、前述のバキュロウイルス系で発現された場合、これまで明らかにされていない効果によって自己組み立てされ、ウシパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質が有する効果に匹敵することを明らかにした。

10

20

30

40

50

【0033】

<1>HPV16 L1 遺伝子の塩基配列

HPV16 L1 DNA源は、例えばZhouら(1991)が報告した研究で開示された通り、プロトタイプクローン、GenBank Accession No. K02718で、子宮頸部癌より単離されている(Seedprfら、1985)。我々は、野生型HPV16ゲノム由来のL1は、単一点での突然変異によりプロトタイプゲノムとは異なるが、BPV1またはBPV L1/L2でみられる効果と同様の効果により、自己組み立てされてウイルス様粒子を形成する。プロトタイプHPVゲノム由来のL1をL2と共に使用した場合に見られる自己組み立てと比較すると、野生型ゲノム由来のL1は少なくとも100倍以上の効率で自己組み立てされる。

10

【0034】

種々のHPV16 L1発現産物の自己組み立て効率を遺伝子レベルで考察するため、良性病変及び異形成もしくは癌関連病変の両者より単離したHPV16 L1 遺伝子のオープンリーディングフレームについて塩基配列を調べた。

分析の結果、プロトタイプ株の報告されているL1の塩基配列の内、下記の通り2箇所にエラーが検出された。

【0035】

(1) nt6902とnt6903の間に3つのヌクレオチド(CAT)の挿入がなければならぬ、これはL1タンパク質中にセリンの挿入をもたらす。

【0036】

(2) 報告されているプロトタイプ塩基配列中には、L1タンパク質の配列からアスパラギン酸を欠失させる、nt6952-6954からなる3つのヌクレオチドの欠失がなければならないが、nt5637-7155からなるプロトタイプHPV16 L1ゲノムの正確なヌクレオチド配列は配列番号1のヌクレオチド配列で、配列表に掲載されている。

20

【0037】

配列番号1中のヌクレオチド塩基の番号付けは、1番から始めており、報告されているHPV塩基配列のヌクレオチド塩基の番号付けは、nt5638-7156の配列であるが、配列表の1-1518に対応している。従って元の塩基配列中で対応する部位は当業者により容易に同定される。

【0038】

この他3つのHPV16 L1ゲノム、クローン16PAT及びクローン114/16/2及びクローン114/16/11について塩基配列を調べて、これらの塩基配列を、修正したプロトタイプの配列と比較した。

30

【0039】

クローン16PATはUniversity of Rochester School of MedicineのDennis McCance氏より供与されたもので子宮頸部の異形成(前悪性)病変よりクローニングされたものであるが、効率的な自己組み立てを行わないL1を発現する。

【0040】

クローン114/16/2及び114/16/11はハイデルベルク German Cancer Research CenterのMatthias Du"rst氏より供与されたものであるが、非悪性病変よりクローニングされ両者とも効率的に自己組み立てされるL1を発現する。

40

【0041】

<2>異形成、悪性進行癌及び良性病変に関連するHPV16 L1 遺伝子の特徴の比較
パピローマウイルス感染異形成病変より単離したクローン16PATと、悪性子宮頸部癌より単離したプロトタイプHPV16は両者ともnt6242-6244の位置でヒスチジンをコード化しているのに対し、良性のパピローマウイルス感染病変より単離したクローン2及び11は(他の多くのパピローマウイルスと同様に)同位置でアスパラギン酸をコード化している。

【0042】

プロトタイプ、悪性関連のHPV16種と良性病変由来のHPV16種との間にあるこ

50

のただ一個のアミノ酸の違いにより、自己組み立ての効率に差が生じているのは明かである。きわめて近縁のHPVタイプの間では、この場所にアスパラギン酸があることが効率的な自己組み立てを得るのに必要で、アスパラギン酸をヒスチジンに置き換えるとキャプシッドタンパク質からこの能力が失われる。悪性関連ウイルスにおいてキャプシッド組み立てが失われることは、中和抗体産生に必要な立体配座エピトープの喪失と関連しており、またこれはパピローマウイルスが免疫制御を逃れるための免疫原性の低下と関係していると思われる。

【0043】

従って、効率的に自己組み立てされるキャプシッドタンパク質を発現するHPV L1遺伝子は、(1) パピローマウイルス感染症の良性病変から野生型HPV16 L1のオープンリーディングフレームを単離するか、または(2) プロトタイプ塩基配列のnt6242-6244部位でアスパラギン酸をコード化する様に部位特異的突然変異を行うことにより得ることができる。

【0044】

<3>組換えキャプシッドタンパク質

本発明の方法により、任意のパピローマウイルスの組換えキャプシッド粒子も調製することができる。L1またはL2キャプシッドタンパク質のいずれか一方のみ、またはL1及びL2キャプシッドタンパク質の両者からなる粒子を調製することができる。L1/L2キャプシッドタンパク質粒子は天然のパピローマウイルスビリオンの組成とより一層密接に関係するが、おそらくL2のほとんどはキャプシッド構造内でL1よりも内部にあるため、L2はL1ほど免疫に関して重要とは思われない。L2が存在しなくてもL1は自身で自己組み立てされることが出来るが、自己組み立てされたL1/L2キャプシッドタンパク質粒子はさらに天然のパピローマウイルスビリオンの組成と密接に関係している。従って、L1のみを含む粒子の方がより単純であり、L1/L2を含む粒子の方が一層真正の構造を有していると思われる。自己組み立てされたL1及びL1/L2粒子は両者とも高力価の中和抗体を誘導し、従ってワクチン産生に適している。野生型HPVゲノムにより発現されるL1キャプシッドタンパク質を含む粒子は、L1のみの場合でもL1/L2のいずれの場合でも、特に望ましい。

【0045】

組換え型L1またはL1/L2結合キャプシッド粒子の作成はL1(またはL1及びL2)遺伝子を適当なベクターにクローニングしてベクターを形質転換した真核細胞内で両タンパク質に対応する立体配座をコード化する塩基配列を発現させることにより行う。キャプシッド様構造を形成する能力はキャプシッドタンパク質が高力価の中和抗体を産生する能力と密接に関係しており、自己組み立てされて立体配座エピトープを有するキャプシッド構造を形成させる能力を持つキャプシッドタンパク質を産生するためには、実質的に全てのキャプシッドタンパク質をコード化する塩基配列を発現させなければならないと思われる。従って、実質的に全てのキャプシッドタンパク質をコード化する塩基配列がクローニングされる。遺伝子は、真核細胞系で発現されるのが望ましい。昆虫の細胞は望ましい宿主細胞であるが、適当な酵母発現ベクターが使用される場合は酵母細胞も宿主細胞として適切である。同様に適当な哺乳動物発現ベクターを用いて形質転換した哺乳動物細胞も組み立てされたキャプシッドタンパク質を産生するために用いることができるが、哺乳動物培養細胞は非哺乳動物細胞よりも哺乳動物に感染する可能性のある未知のウイルスを有していると思われるため、哺乳動物培養細胞は余り有利ではない。

【0046】

好ましいプロトコールに従えば、バキュロウイルス系が使用される。クローニングされる遺伝子、ウシパピローマウイルス(BPV1)またはヒトパピローマウイルス(HPV16)L1キャプシッドタンパク質またはヒトパピローマウイルスHPV16 L1及びL2をコード化する実質的にすべの塩基配列を、フランキングバキュロウイルス配列を含むバキュロウイルス転移ベクターに挿入して遺伝子構築物を形成し、組換えDNAを野生型バキュロウイルスDNAと共に実施例1記載のSf-9昆虫細胞に同時形質転換させて感

染時に挿入遺伝子を大量に発現することの出来る組換えウイルスを作成する。実際のタンパク質生産は新しい昆虫細胞を組換えバキュロウイルスに感染させることによって行う。従って、L1キャプシッドタンパク質及びL1及びL2キャプシッドタンパク質は、実施例2に記載されている通り組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞内で発現される。

【0047】

実施例1の操作では、BPV1の全L1遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応(PCR; Saikiら、1987)により増幅し、AcMNPV(Autographa californica 核多角体病ウイルス)に基づくバキュロウイルスベクター(Summers. M.ら、1987)内にクローニングした。L1オープンリーディングフレームをバキュロウイルスポリヘドリンプロモーターの制御下においた。L1クローンを野生型(Wt)バキュロウイルスDNAと共にSf-9昆虫細胞(ATCC Accession No. CR L 1711)内に同時形質転換して組換えクローンのプラークを精製した後、高力価の組換えウイルスが生産された。Wt AcMNPVまたはBPV1 L1組換えウイルス(AcBPV-L1)を感染させた細胞の抽出物(実施例2)をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。クーマシーブルー染色後、AcBPV1-L1ウイルスを感染させた培養物の抽出物中に、予想したサイズ55キロダルトンのユニークなタンパク質が検出された。このタンパク質のBPV L1との同定はBPV L1特異的モノクローナル抗体(Nakai.Y.ら、1986)を用いたイムノブロットにより確認した。即ち、組換えウイルスによるBPV L1の発現が感染昆虫細胞溶解物のSDS-PAGE電気泳動によって認められた。

【0048】

パピローマウイルスL1が異種細胞内に過剰発現された場合、自己組み立てされてウイルス様粒子を形成するという仮説を確かめるために、AcBPV-L1感染細胞の薄切片を電子顕微鏡下で観察してパピローマウイルス様構造物の存在を調べた。BPV組換えウイルスを感染させた細胞が選択的に核内に局所化した多くのおよそ50nmの環状構造物を含み、これらの構造物は野生型バキュロウイルス感染細胞からは認められなかった。in vivo パピローマウイルスビリオンの組み立ては核内で起こること、ビリオンの直径は55nmと報告されていることから、これらの結果からL1のウイルス様粒子への組み立てが起こったことが示唆された。

【0049】

宿主細胞内で形成したキャプシッドタンパク質の発現後、実施例4記載の通りウイルス粒子を感染細胞の溶解物から精製した。さらにL1タンパク質が自己組み立てされた証拠を得るために、勾配遠心により感染昆虫細胞からウイルス様粒子を単離した。真正のBPVビリオンと比較し、電子顕微鏡により精製組換えBPV L1及びHPV16 L1キャプシッドタンパク質の構成が示された。

【0050】

高分子量の構造物を、40%ショ糖中の遠心分離によりL1組換えまたは野生型感染細胞の溶解物から分離し、沈澱物に対してCsCl密度勾配遠心分離を行った。分画を集めて、イムノブロットによりBPV L1特異性モノクローナル抗体に対する反応性を調べた。

【0051】

勾配から得たL1陽性分画を炭素膜格子に吸着させ、1%酢酸ウラニルで染色して透過型電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡観察では、陽性分画は、たくさんのキャプソメアが規則的に配置されている環状構造を含んでいた。ウイルス様粒子のピークを含むCsCl分画の密度はおよそ1.3mg/mlで、前報の無核BPVビリオン(Larsen.P.ら、1987)の密度と一致した。もっと小さな環状物及び部分的に組み立てされた構造物も見られたが、多くは直径がおよそ50nmであった。電子顕微鏡では、大きい方の粒子のサイズ、サブユニット構造が感染性BPVビリオンときわめてよく類似しており、染色と写真撮影を同時に行った。これらの粒子は非感染またはWtAcMNPV感染細胞の調製物中では認められなかった。これらの結果より、BPV L1は、L2または他のパピローマウイルスタンパク質非存在下で組み立てられてウイルス様粒子を形成する能力を本質的に有することが示唆された。さらに、分化している上皮または哺乳動物細胞に制限される特異的因子はパピローマウイルスキャプシッドの組み立てには必要ではなかった。

【0052】

昆虫細胞内での自己組み立て能がパピローマウイルス L 1 の一般的性質であるかどうかを調べるため、H P V 1 6 (ヒト性器癌において最も多く検出される H P V タイプ) の L 1 も、類似の組換えバキュロウイルスにより発現させた。SDS-PAGEにより、予想された58kdのサイズのタンパク質が H P V 1 6 L 1 組換えウイルスを感染させた昆虫細胞内で大量に発現された。このタンパク質はイムノブロット上で H P V 1 6 L 1 モノクローナル抗体と強く反応した。このモノクローナル抗体は見かけの分子量がおよそ28kdからおよそ48kdの範囲にある別の5つのバンドをも僅かに染色した。この抗体はBPV L 1 とも若干反応し、従ってこの抗体は同イムノブロット上で B P V の55kdのタンパク質を僅かに染色した。CsCl勾配精製後、免疫反応分画を電子顕微鏡で観察し、電子顕微鏡上で本分画に50nmのパピローマウイルス様粒子が含まれていることが認められた。BPV L 1 調製物に比べるとヒトの系では、いくらか不完全で小さな組み立て粒子が見られたが、おそらくこれは、発現の量が少ないか、かなりの程度の H P V 1 6 L 1 の分解 (SDS-PAGE上で見られた) のためであり、この結果から H P V 1 6 の L 1 及びおそらく他のタイプの L 1 タンパク質は組み立てされてビリオンタイプの構造物を形成する能力を本質的に有していることが示唆される。また、実施例に記載の通り、アカゲザルPVの組換えパピローマウイルスキャプシッド粒子の調製も行った。

10

【0053】

< 4 > 免疫原としての組換え配座キャプシッドタンパク質

異種細胞内で合成された自己組み立て主要キャプシッドタンパク質に基づくサブユニットワクチンはヒトB型肝炎を含む多くの病原ウイルスによる感染の予防に有効であることが明らかにされている (Stevens.C.ら、1987)。非感染性またはホルマリン不活性化 B P V はワクチンとして有効であるが B P V 形質転換細胞は有効ではないことを明らかにする研究により、初期の遺伝子産物よりもウイルスキャプシッドタンパク質は免疫応答を誘引することが示唆されている。他の論文のデータからも、細菌から抽出された L 1 タンパク質は中和抗体の力価が低いにもかかわらず一部免疫応答を誘引することが示唆されている。従って、昆虫細胞内で発現してウイルス様粒子に組み立てられる BPV L 1 について家兎中の中和抗体を誘導する能力を調べた。2種類の調製物について試験を行った。それらは、L 1 組換えまたは野生型感染 Sf-9 細胞の全細胞抽出物と種々の遠心分離及び硫酸沈澱により単離した部分的精製粒子である。1次接種後、家兎に隔週毎に2回追加接種を行った。

20

30

【0054】

家兎血清を、マウスC127細胞への B P V の感染を阻害する能力について、標準量の B P V ウイルスから誘導されるフォーカス数の減少を測定することにより、調べた。代表的なアッセイを行い、組換えBPV L 1 を接種した動物で誘導される中和抗血清の力価を生体の B P V ビリオン及び変性 B P V ビリオンに対する抗血清と比較した。バキュロウイルス由来 L 1 を接種して作成した免疫血清では、少なくとも1:11,000希釈 (力価11,000; 表1) で B P V ウイルスの感染性を50%減少させることができたが、同じ家兎の免疫前血清では最も低い希釈試験である1:20の希釈率でもフォーカス形成形質転換を阻害できなかった。粗調製物及び部分精製粒子は高力価中和抗体を含み、最高力価が測定値で290,000であり、共に有効であった。この値は感染性 B P V ビリオンに対する陽性コントロール抗血清の中和力価と同じ値であって、これと比較して、細菌で誘導した L 1 を用いた前報の試験での最高力価は36であった (Pilancinski.W.ら、1984)。野生型バキュロウイルス感染細胞からの抽出物を接種した家兎から得た血清では、1:20の希釈率で感染性を阻害することができなかったことから、中和活性は L 1 に特異的であることが示唆された。1%SDS中で煮沸して部分精製 L 1 粒子を破碎したところ、調製物は中和抗体を誘導する能力を失った (表1)。L 1 は自己組み立てされてビリオン様粒子を形成することができ、誘導する中和抗体の力価が少なくとも以前の in vitro 産生抗原よりも3桁高いことから組換え L 1 キャプシッドタンパク質は自然に伝染したパピローマウイルスに対して効果的な長期間の抑制効果を誘導する能力を潜在的に有することが示唆される。これらの結果から、昆虫細胞内で組み立てられた L 1 粒子は立体配座依存性の免疫優性エピトープの提示において感染性ウイルス

40

50

に近い形状になることが明らかである。またこれらの結果から、L 2 は高力価の中和抗体の産生には必要ないことが明かである。細菌により誘導された L 1 の中和免疫原性が弱いことが報告されたが、これはコンフォメーションが適切ではなく、また組み立てされてビリオン様構造物を形成しないと思われることが原因である。また、L 1 の多数の電気泳動の変異体がビリオン内で検出された(Larsen.P.ら、1987)。これら修飾物のいくつかはおそらく細菌により誘導された L 1 内には存在しないと思われるが、これは中和抗体の産生を促進すると思われる。

【0055】

ここで開示された高力価の中和抗血清を誘導する組換え L 1 (または L 2)パピローマウイルスキャプシッドタンパク質は伝染性乳頭腫症に対する予防のためのワクチンとしての使用するのに適した能力を有している。危険な状態にある集団で、免疫処置により恩恵を受けることの出来る集団の例は乳頭腫疣贅の恐れのあるウシの群、非生殖器型の H P V 感染に対する全てのヒト、及び生殖器型 H P V の感染に対する性的活動性のあるヒトである。

10

【0056】

治療目的のワクチン処理は、通常 L 1 (及び L 2)キャプシッドタンパク質を発現する生産的パピローマウイルス病変に対して有用であり得る。このような病変は疣贅または咽頭乳頭腫症などの良性感症に最も発症しやすい。新生児の咽頭乳頭腫症は通常、ちつ分泌物内に感染性のパピローマウイルスが存在する産道内を幼児が通過する際に伝染する。パピローマウイルスに対する感染症の妊娠婦人への治療目的のワクチン処理により、胎盤関門を通過し、胎児の循環系に入ってこの種のパピローマウイルス感染症に対する幼児への予防的受動免疫を行う能力を有する中和 IgG 抗体を誘導することができる。さらにちつ液や乳汁に分泌される母性 IgA により幼児保護機構が供給される。Jarrett(1991)は B P V 誘導性疣贅の治療時に働く L 2 の何等かの有効性を示した。一般に悪性腫瘍は L 1 または L 2 を発現せず、子宮頸部癌などの状態における組換え L 1 または L 2 でのワクチン処理の有効性については明らかにされていない。

20

【0057】

良性及び悪性パピローマウイルス疾患に対する保護免疫は組換え L 1 キャプシッドタンパク質の有効量をパピローマウイルス感染症の恐れのある個体に投与することによって誘導される。

30

【0058】

キャプシッドタンパク質を含むワクチンは、従来の免疫処置プロトコルに従って、非経口的あるいは局所的に直接投与される。もう一つの実施態様では、立体配座をコードする L 1 の塩基配列を転移ベクター、例えば(軽度の一過性感症を引き起こす)セムリキ森林ウイルスベクターにクローニングされ、組換えウイルスは、受容体の細胞または組織内に導入され、そこで免疫化キャプシッドタンパク質が発現される。ワクシニアウイルスもまた遺伝子ベヒクルとして使用できる。

【0059】

<5>血清学的スクリーニング剤としての組換え形成キャプシッドタンパク質

パピローマウイルスビリオンタンパク質に対するヒト免疫応答に関する公知の血清検査では、原則として細菌で誘導した L 1 および L 2 キャプシッドタンパク質を利用しており、その結果は他の H P V 感染症の測定 (J e n i s o n , S . e t a l . , 1 9 9 0) とはあまりよい相関関係にはない。上記の B P V パピローマウイルス免疫検査により、細菌より抽出されたパピローマウイルスビリオンタンパク質は、タイプ特異的で多くの中和抗体により認識される立体配座依存性エピトープを提示しないことが示唆されている。主に線状エピトープを認識するこのようなアッセイと比較すると、自己組み立てされる L 1 粒子を用いた血清検査は、ヒトの集団において抗 H P V ビリオン免疫性の程度をさらに正確に測定すると思われる。従ってここに開示された組換え L 1 キャプシッドタンパク質は立体配座エピトープを提示しており、いくつかのタイプの結合アッセイにおいてパピローマウイルスに対する中和抗体を与える免疫性を検出するための特異性の高い診断薬として使

40

50

用できる。その操作方法は、一般に抗原抗体対中のキャプシッドタンパク質と特異的に結合する体液中の抗体を検出する手段を提供する固相あるいは液相アッセイとして行われる。循環抗体を評価するための当業者間で公知の手順の例として、二重抗体ラジオイムノアッセイおよび酵素イムノアッセイなどの液相アッセイや、ストリップラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロッティングおよび Gallo et al. に付与された米国特許第 4, 520, 113 号酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、Skold et al. に付与された米国特許第 5, 039, 607 号に開示されている immunochromatographic アッセイなどが挙げられる。抗体の検出用として好ましい ELISA 法は、Harlow E. および Lane, D. 著、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY 10, 1988, pp. 563~578 に開示されているようなものである。

【0060】

ここに開示の組換え L1 または L1 / L2 キャプシッドタンパク質を使用し、例えば Bradley, L., 1980 に開示の抗原誘導 T 細胞増殖応答や、特に Starling に付与された米国特許第 5, 081, 029 ウイルス抗原に対する細胞応答などの in vivo あるいは in vitro のアッセイによってパピローマウイルスに対する細胞性免疫を測定することもできる。パピローマウイルスに対する細胞性免疫は、Stites, D., 1980 に開示されているような従来の in vivo 遅延型過敏性反応皮膚試験や、組換え HPV L1 融合タンパク質の皮内注射による Hopfl, R., et al., 1991 に開示されている好ましい方法によっても特定することができる。 20

また、本発明のキャプシッドタンパク質を免疫原として使用し、周知の方法によって多クローン性あるいは単クローン性抗体を得ることもできる。これらのパピローマウイルス特異抗体は、特に抗体のクラスや種に特異的な第 2 の標識抗体と組み合わせて、免疫組織化学などの様々な周知のアッセイ手順に基づいて、体の組織や体液の標本中におけるキャプシッドタンパク質の存在の検出に診断的に利用することもできる。

【実施例】

【0061】

後述の遺伝子操作は、本発明による遺伝子調節ユニットの要素の調製に対する一般的な用途について述べたものである。上述したように、場合によっては上述の範囲内に含まれる各組換え分子にこの手順を利用できないこともある。このような状態が起こる状況は、 30 当業者らによって簡単に知ることができる。このような場合はいずれも、例えば適当な代替制限酵素の選択、他の周知の試薬への変更、反応条件の日常的な修正など、当業者間で周知の修正法によって操作を成功させる。一方、ここに開示の他の手順や周知の手順なども、本発明の対応の組換え分子の調製に適用することもできる。どの調製方法でも、開始物質は周知のものであるか、あるいは周知の開始物質から簡単に調製可能なものである。後述の実施例において、特に記載のない限りは温度はいずれも摂氏であり、部およびパーセントは重量部および重量パーセントを意味する。

【0062】

さらに労力を要せず、当業者は、上述の開示内容を使用して、本発明を最大限に利用することができる。従って、以下の好ましい実施例は単に一例にすぎず、開示内容の残りの 40 部分を限定するものではない。

【0063】

<1> 実施例 1

BPV1 DNA のクローニングしたプロトタイプ (Chen, E., et al., 1982), GenBank Accession No. X02346 または HPV16 DNA (Seedorf, K., et al., 1985) GenBank Association No. K02718、あるいは野生型 HPV16 DNA (配列番号 2) をテンプレートとして使用して、完全長の L1 あるいは L1 および L2 のオープンリーディングフレーム (ORF) を PCR によって増幅した。単一の制限部位をオリゴヌクレオチドプライマーに組み込んだ (各配列において、6 番目~11 のヌクレオチド)。 50

【0064】

B P V 1 - L 1 プライマー

(配列番号 3)

5'-CCGCTGAATTCAATATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTGTAT-3'

(センス)

(配列番号 4)

5'-GCGGTGGTACCGTGCAGTTGACTTACCTTCTGTTTTACATTTACAGA-3'

(アンチセンス)

【0065】

H P V 1 6 - L 1 プライマー

(配列番号 5)

5'-CCGCTAGATCTAATATGTCTCTTTGGCTGCCTAGTGAGGCC-3'

(センス)

(配列番号 6)

5'-GCGGTAGATCTACACTAATTCAACATACATACAATACTTACAGC-3'

(アンチセンス)

【0066】

L 1 コード化配列は、B P V 1 については第 1 メチオニンコドン (15 ~ 17 番目の塩基)、H P V 1 6 については第 2 メチオニンコドンで開始する。B P V 1 - L 1 を 5' - E c o R I ~ 3' - K p n I 断片として、H P V 1 6 - L 1 を 5' - B g l I I ~ 3' - B g l I I 断片として、A c M N P V ベースのバキュロウイルス転移ベクター p E V m o d (W a n g, X., et al., 1991) のポリヘドリン遺伝子プロモーターの多重クローニング部位の下流にクローニングし、A c M N P V / L 1 接合部を通る配列決定によって確認した。l i p o f e c t i n (G i b c o / B R L, G a i t h e r s b u r g, M a r y l a n d) (H a r t i g, P., et al., 1991) を使用して、2 μg の量の C s C l 精製組換えプラスミドを 1 μg の野生型 A c M N P V D N A (I n v i t r o g e n, S a n D i e g o, C a l i f o r n i a) と共に S f - 9 細胞 (A T C C) に同時トランスフェクションし、組換えバキュロウイルスを上述したようにプラーク精製した (S u m m e r s., M., et al., 1987)。

【0067】

<実施例 2>

昆虫細胞中での L 1 タンパク質または L 1 / L 2 タンパク質の発現

w t A c M N P V (w t) または A c B P V - L 1 (B - L 1)、A c H P V 1 6 - L 1 (16 - L 1) または A c H P V 1 6 - L 1 (16 - L 1) および A c H P V 1 6 - L 2 (16 - L 2) 組換えウイルスによって、S f - 9 細胞を疑似感染 (疑似) させるかあるいは 10 の感染多重度で感染させた。72 時間後、L a e m m l i 緩衝液において煮沸することによって細胞を溶解し、10%ゲル内でライゼートを S D S - P A G E にかけた。タンパク質を 0.25% クーマシーブルーで染色するか、免疫ブロッティングして B P V L 1 m A b A U - 1 (N a k a i, Y., et al., 1986) または H P V 1 6 L 1 m A b C A M V I R - 1 (M c L e a n, C., et al., 1990)、¹²⁵I 標識 F a b 抗マウス I g G (A m e r s h a m) でプローブした。P は、ポリヘドリンタンパク質を示す。抗 B P V L 1 m A b は予測した 55 k d のタンパク質を認識した。抗 H P V 1 6 L 1 m A b は予測した 58 k d のタンパク質を強く染色すると共に、上述したように分子量がこれよりも小さい 5 つのバンドも淡く染色した。また、上述したように、この抗 H P V 1 6 L 1 は、B P V L 1 タンパク質と若干交差反応した。

【0068】

<実施例 3>

抗血清の製造

家兎に対し、凍結 / 溶解を 1 サイクル行い 20 × ダウンス ホモジェナイズ処理をする

10

20

30

40

50

ことにより調製した全細胞 S f - 9 溶解物 (3×10^7 細胞)(家兎 # 1, 2 および 8)、または分画遠心分離および 35% 硫酸沈澱により部分精製した L 1 タンパク質 200 μ g (# 3、4、6 および 7) を、完全フロイントアジュバント中に添加したものを皮下より注入して免疫し、次に不完全フロイントアジュバント中に同様の調製物を添加したものを、用いて 2 週間間隔で 2 回追加免疫を行った。

【0069】

<実施例 4>

粒子の精製及び透過型電子顕微鏡による解析

S f - 9 細胞 (2×10^6 / ml) 500 ml に A c B P V - L 1 または A c H P V 1 6 - L 1 または A c H P V 1 6 - L 1 / L 2 (16 - L 1 / L 2) 組換え体バキュロウイルスを感染させた。72 時間後、回収した細胞を P B S 中で 60 秒間超音波処理した。低速清澄化後、溶解物を 40% (w t / v o l) ショ糖 / P B S クッションで、110, 000 g で 2.5 時間遠心分離を行った (S W - 28)。再懸濁したペレットを 141, 000 g、室温で 20 時間、10~40% (w t / w t) C s C l / P B S 勾配中で平衡になるまで遠心分離を行った。分画を底から回収して S D S - P A G E による分析を行った。免疫反応性分画を P B S に対して透析し、セントリコン 30 (M i l l i p o r e) 限外濾過により濃縮し、(H P V 16 - L 1 の場合) エアーヒュージ (B e c k m a n) で A - 100 ローター中で 10 分間 30 p s i で遠心分離してペレットを形成させた。B P V 1 ビリオンを記述通り (Cowser, L. ら、1987) ウシ疣贅 (A. B. Jensen 氏より供与) より精製した。精製した粒子をカーボンコート T E M グリットに吸着させ、1% 酢酸ウラニルで染色してフィリップ電子顕微鏡 E M 400 T により倍率 36, 000 倍で観察した。電子顕微鏡観察により結果が得られ、上記で考察したとおりである。

【0070】

<実施例 5>

B P V 1 中和アッセイ

第 2 追加免疫 3 週間後に得られた血清の系列希釈物を約 500 フォーカス形成単位の B P V 1 ウイルスと共に 30 分間インキュベートし、ウイルスを C 127 細胞に 1 時間吸着させて、これらの細胞を 3 週間培養した (Dvoretzky, I. ら、1980)。フォーカスを 0.5% メチレンブルー / 0.25% カルボルフクシン / メタノール液で染色した。結果は、フォーカスの数を評価して得た。考察は以下に行う。抗 - A c B P V - L 1 は家兎 # 1 より得られ、抗 - w t A c M N P V は家兎 # 8 より得られた (表 1)。1:400 に希釈した前免疫血清を標準として使用した。抗 - A c B P V - L 1 は希釈率 1:400 または 1:600 で実質的にフォーカスを消失したが、抗 w t A c M N P V は希釈率 1:400 または 1:600 でフォーカスの数が上昇したように思われた。1:00 希釈時の「n r s」と表記した正常家兎血清のネガティブコントロールを抗 B P V - 1 ビリオンの標準として使用したところ、抗 B P V - 1 ビリオンは希釈率 1:400 または 1:600 で実質的にフォーカスを消失したと思われた。抗 B P V - 1 ビリオンは以前の研究 (Nakai, Y. ら、1986) で、野生の B P V ビリオンに対して励起された。最後に、ダコは変性 B P V ビリオンに対して励起された市販の家兎抗血清 (Dako Corp., Santa Barbara, California) である。この血清は、見かけ上抗体を含まないコントロールよりも大量のフォーカスを発生させた。ネガティブコントロールとして、ウイルスを含まない検査では、実質的にフォーカスを発生しなかった。

【0071】

<実施例 6>

B P V 1 に対する血清中和力価

実施例 5 と同様にしてアッセイを行った。家兎 # 1、2 および 8 に粗全細胞 S f - 9 溶解物を接種し、家兎 # 3、4、6 および 7 には部分精製した L 1 タンパク質 (表 1) を接種した。家兎 # 6 および 7 を、1% S D S 中で煮沸変性させた L 1 タンパク質調製物で免疫した。各家兎とも、2 回目の追加免疫後 3~6 週間後に少なくとも 2 回採血して検査を行ったところ、同一の抗体力価であることが認められた。各家兎の免疫前血清の力価は、

20より小さく、最も低い希釈率で検査した。

【0072】

【表1】

抗原	ウサギ	BPV1に対する血清中和力価*
AcBPV-L1	1	11,000
"	2	97,000
"	3	290,000
"	4	97,000
BPV1-ピリオン†	5	290,000
AcBPV-L1/SDS	6	<2
"	7	<2
wt AcMNPV	8	<20

10

* フォーカス数が50%減少する反復希釈

† A.B.Jenson(Nakai,Y.,et al.,1986)より提供

【0073】

<参考文献>

U.S. Patent No. 5,081,029 to Starling et al.

U.S. Patent No. 5,039,607 to Skold et al.

U.S. Patent No. 4,520,113 to Gallo et al.

Baker, C. in The Papovaviridae: Vol.2. The Papillomaviruses (N. Saizman et al., eds.) Plenum Press, New York, 1987. p.321. 20

Baker, T., et al. Biophys. J. 60:1445 (1991).

Bradley, L. et al. in Selected Methods in Cellular Immunology. B. Mishell and S. Shiigi, eds. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1980. pp. 164-166.

Christensen, N., et al. Virology 64:5678 (1990).

Christensen, N., et al. Virology 181:572 (1991).

Crawford, L., et al. Virology 21:258 (1963).

Dvoretzky, I., et al. Virology 103:369 (1980).

Ghim, S., et al. Comparison of neutralization of BPV-1 infection of C127 cells and bovine fetal skin xenografts. Int. J. Cancer 49: 285 (1991). 30

Ghim, S., et al. HPV1-L1 protein expressed in cos cells displays conformational epitopes found on intact virions. Virology 190:548-552 (1992).

Hagensee, M., et al. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. J. of Virology 67(1):315-322.

Hopfl, R., et al. Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. Lancet 337:373 (1991).

Jarrett, W., et al. Veterinary Record 126:449 (1990).

Jarrett, W., et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. Virology 184:33 (1991). 40

Jenison, S., et al. J. Infectious Dis. 162:60 (1990).

Jenson, A., et al. Identification of linear epitopes BPV-1 L1 protein recognized by sera of infected or immunized animals. Pathobiology 59:396 (1991)

Jin, X., et al. J. Gen. Virology 70:1133 (1989).

Kajigaya, S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4646 (1991).

Kirnbauer, R., et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:12180-12184 (1992).

Larsen, P., et al. J. Virology 61:3596 (1987). 50

- Liddington, R., et al. Nature 354:278 (1991).
- Lin, Y-L., et al. Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. Virology 187:612 (1992).
- McLean, C., et al. Production and characterization of a monoclonal antibody to human Papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. J. Clin. Pathol 43:488 (1990).
- Nakai, Y. Interviol. 25:30 (1986).
- Olson, C., et al. Amer. J. Vet. Res. 21:233 (1960).
- Pilacinski, W., et al. Biotechnology 2:356 (1984). 10
- Saiki, R. K., et al. Science 239:487 (1987).
- Seedorf, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. Virology 145:181-185 (1985).
- Shiftman, M. J. National Cancer Inst. 84:394 (1992).
- Stevens, C., et al. JAMA 257:2612 (1987).
- Stites, D. Chapter 27 in Basic and Clinical Immunology 3d Ed. H. Fudenberg et al., eds. Los Altos: Lange Medical Publications, 1980.
- Summers, M., et al. Texas Agricultural Experiment Station, College Station. Texas. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures (1987). Bulletin No. 1555. 20
- Zhou, J., et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. J. Virology 185:251 (1991).
- zur Hausen, H. Science 254:1167 (1991).

【配列表】

20041946720000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	L
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A

(72)発明者 ダグラス アール. ロウイー
アメリカ合衆国 2 0 0 0 7 ワシントン、ディーシー、ノース ウェスト、ガーフィールドスト
リート 3 4 1 4

(72)発明者 ジョン ティー. シラー
アメリカ合衆国 2 0 9 0 2 メリーランド州、シルバー スプリング、メイプルビュードライブ
1 1 3 0 6

(72)発明者 ラインハルト キルンバウアー
アメリカ合衆国 2 0 8 1 4 メリーランド州、ベテスダ、ノースブルックレーン 8 3 1 5 #
9 0 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 CA02 CA05 DA02 EA02 HA11
4B064 AG32 CA19 CC24 DA01 DA15
4B065 AA90X AA95Y AB01 BA02 CA24 CA45 CA46
4C085 AA03 BA76 DD62 EE01

专利名称(译)	自组装重组乳头瘤病毒衣壳蛋白		
公开(公告)号	JP2004194672A	公开(公告)日	2004-07-15
申请号	JP2004047227	申请日	2004-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	ダグラスアールロウイー ジョンティーシラー ラインハルトキルンバウアー		
发明人	ダグラス アール. ロウイー ジョン ティー. シラー ラインハルト キルンバウアー		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/23 A61P17/12 A61P31/12 A61P31/20 A61P35/00 C07K14/025 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/04 C12N15/09 C12N15/37 C12P21/02 C12Q1/70 C12R1/91 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A01K2227/10 A61K39/00 A61K2039/525 A61K2039/5258 A61P17/12 A61P31/12 A61P31/20 A61P35/00 C07K14/005 C07K2319/00 C12N7/00 C12N2710/20022 C12N2710/20023 C12N2710/20034 C12N2800/30 Y10S435/975 Y10S977/795 Y10S977/804 Y10S977/918 Y10S977/927		
FI分类号	C12N5/00.A A61K39/23 A61P31/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.N G01N33/569.L C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/HA11 4B064/AG32 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA90X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA76 4C085/DD62 4C085/EE01		
代理人(译)	川口 义行 远山 勉		
优先权	07/941371 1992-09-03 US 08/032869 1993-03-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供适合用于诊断，预防和治疗病毒感染的重组病毒蛋白。解决方案：公开了一种含有以下遗传构建体的非哺乳动物宿主细胞：其中遗传构建体包括在重组载体中编码乳头瘤病毒L1衣壳蛋白的乳头瘤病毒L1构象编码序列，并且其中构建体指导壳聚糖结构的表达。具有构象表位的宿主细胞通过包括乳头瘤病毒L1衣壳蛋白的壳聚体结构的自组装诱导针对天然乳头瘤病毒的高滴度中和抗体，而重组载体是非哺乳动物真核细胞的载体，并且细胞是非哺乳动物真核宿主细胞，其中宿主细胞的特征在于产生具有构象表位的壳聚糖结构。 Z

(P2004-194672A)			
(43) 公開日 平成16年7月15日 (2004.7.15)			
(51) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (参考)	
C12N 5/10	C12N 5/00	A	4B024
A61K 39/23	A61K 39/23		4B064
A61P 31/12	A61P 31/12		4B065
C12N 1/15	C12N 1/15		4C085
C12N 1/19	C12N 1/19		
審査請求 有 請求項の数 22 OL (全 21 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2004-47227 (P2004-47227)	(71) 出願人	501129088
(22) 出願日	平成16年2月24日 (2004.2.24)		アメリカ合衆国
(62) 分割の表示	特願平6-507481の分割		アメリカ合衆国 20852 メリーランド州, ロックビル, エグゼクティブ プールバード 6011 ボックス 13
原出願日	平成5年8月3日 (1993.8.3)		ナショナル インスティテューツ オブヘルス オフィス オブ テクノロジー
(31) 優先権主張番号	07/941,371		トランスファ
(32) 優先日	平成4年8月3日 (1992.8.3)	(74) 代理人	100100549
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	08/032,869	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成5年3月16日 (1993.3.16)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉