

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4480268号  
(P4480268)

(45) 発行日 平成22年6月16日(2010.6.16)

(24) 登録日 平成22年3月26日(2010.3.26)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/02 (2006.01)

C O 7 K 14/02

A 6 1 K 39/29 (2006.01)

A 6 1 K 39/29

A 6 1 K 39/385 (2006.01)

A 6 1 K 39/385

A 6 1 P 31/20 (2006.01)

A 6 1 P 31/20

請求項の数 18 (全 187 頁)

(21) 出願番号 特願2000-531185 (P2000-531185)  
 (86) (22) 出願日 平成11年2月11日(1999.2.11)  
 (65) 公表番号 特表2002-509700 (P2002-509700A)  
 (43) 公表日 平成14年4月2日(2002.4.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/003055  
 (87) 国際公開番号 WO1999/040934  
 (87) 国際公開日 平成11年8月19日(1999.8.19)  
 審査請求日 平成18年2月13日(2006.2.13)  
 (31) 優先権主張番号 60/074,537  
 (32) 優先日 平成10年2月12日(1998.2.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500378867  
 イミューン コンプレックス コーポレイ  
 ション  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 121 サン ディエゴ インダストリアル  
 ル コート 3347  
 (74) 代理人 100059959  
 弁理士 中村 稔  
 (74) 代理人 100067013  
 弁理士 大塚 文昭  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100065189  
 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質及びそれらの誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ハプテンにペンダント結合された、修飾されたB型肝炎コアタンパク質を含む、修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートであって、

前記修飾されたB型肝炎コアタンパク質が配列番号2のB型肝炎コアタンパク質アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含み、

前記配列番号2のB型肝炎コアタンパク質アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列は、配列番号2の10～140の番号を付されたアミノ酸残基を含み、更に配列番号2の50～100の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域にインサートを有するものであり、

前記インサートが(i)長さ1～40のアミノ酸残基であり、かつ(ii)化学反応性アミノ酸残基を含み、

前記ハプテンが前記化学反応性アミノ酸残基にペンダント結合されていることを特徴とする修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲート。

【請求項2】

インサートが70～90の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域にある、請求の範囲第1項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲート。

【請求項3】

インサートが78～82の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域にある、請求の範囲第1項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲート。

【請求項4】

10

20

ハプテンがポリペプチドハプテン、化学ハプテン又は炭水化物ハプテンである、請求の範囲第1項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲート。

【請求項5】

ハプテンが病原体関連ハプテンである、請求の範囲第1項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲート。

【請求項6】

修飾されたB型肝炎コアタンパク質が更に前記B型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列のカルボキシ末端に機能し得る形で連結されたT細胞刺激アミノ酸残基配列を含む、請求の範囲第5項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲート。

【請求項7】

前記T細胞刺激アミノ酸残基配列がペンダント結合された病原体関連ハプテンと同じ病原体に関連している、請求の範囲第6項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲート。

【請求項8】

配列番号2の50～100の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域にインサートを有する修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットを含む、修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子であって、

前記インサートが(i)長さ1～40のアミノ酸残基であり、かつ(ii)化学反応性アミノ酸側鎖を含み、

前記インサートそれ自体が抗原決定基ではなく、

前記化学反応性アミノ酸がリシンであることを特徴とする、修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子。

【請求項9】

ハプテンにペンダント結合された複数の修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットを含むことを特徴とする、修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲートであって、

前記B型肝炎コアタンパク質サブユニットは、配列番号2の50～100の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域にインサートを有するものであり、

前記インサートが(i)長さ1～40のアミノ酸残基であり、かつ(ii)化学反応性アミノ酸残基を含み、

前記ハプテンが前記化学反応性アミノ酸残基にペンダント結合されている、修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲート。

【請求項10】

異なるハプテンにペンダント結合されている複数の修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットを有する、請求の範囲第9項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲート。

【請求項11】

修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットが更に前記B型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列のカルボキシ末端残基にペプチド結合されたT細胞刺激アミノ酸残基配列を含む、請求の範囲第9項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲート。

【請求項12】

T細胞刺激アミノ酸残基がペンダント結合されたハプテンと同じ病原体からのものである、請求の範囲第11項記載の修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲート。

【請求項13】

N末端からの三つのペプチド結合ドメインI、II及びIIIを含む、修飾されたB型肝炎コアタンパク質にペンダント結合されたポリペプチドハプテンを含む免疫原性融合タンパク質コンジュゲートであって、

(a)ドメインIが配列番号2のB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列の残基10～50に相当し、

10

20

30

40

50

(b)ドメインIIがドメインIのカルボキシ末端残基に結合され、かつ化学反応性アミノ酸残基を含む長さ1～40のアミノ酸残基の異種インサートを更に含むB型肝炎コアタンパク質の前記アミノ酸配列の残基50～100に相当し、かつ

(c)ドメインIIIがドメインIIのカルボキシ末端残基に結合され、かつB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列の残基100～140に相当することを特徴とする免疫原性融合タンパク質コンジュゲート。

【請求項14】

修飾されたB型肝炎コアタンパク質が更に第四ペプチド結合ドメイン、ドメインIVを含み、

(d)ドメインIVがドメインIIIのカルボキシ末端残基に結合され、かつT細胞エпитープを含む、請求の範囲第13項記載の免疫原性融合タンパク質コンジュゲート。

【請求項15】

配列番号2のB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列のアミノ酸残基10～アミノ酸残基140に相当するアミノ酸配列を含み、かつB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸残基50～アミノ酸残基100に相当する領域にアミノ酸配列インサートを有する、修飾されたB型肝炎コアタンパク質であって、

そのインサートが化学反応性アミノ酸残基を含み、かつインサートそれ自体が抗原決定基ではなく、前記化学反応性アミノ酸残基がリシンであることを特徴とする、修飾されたB型肝炎コアタンパク質。

【請求項16】

医薬上許される希釈剤中に溶解又は分散された免疫原量の修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートを含む接種物であって、

前記修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートが修飾されたB型肝炎コアタンパク質にペナント結合されたハプテンを含み、

前記修飾されたB型肝炎コアタンパク質が配列番号2のB型肝炎コアタンパク質アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含み、

配列番号2のB型肝炎コアタンパク質アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列は、配列番号2の10～140の番号を付されたアミノ酸残基を含み、更に配列番号2の50～100の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域にインサートを有するものであり、

前記インサートが(i)長さ1～40のアミノ酸残基であり、かつ(ii)化学反応性アミノ酸残基を含み、

前記ハプテンが前記化学反応性アミノ酸残基にペナント結合されていることを特徴とする接種物。

【請求項17】

前記修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートが粒子の形態で存在する、請求の範囲第16項記載の接種物。

【請求項18】

前記ハプテンが病原体からのものであり、かつ哺乳類宿主中の前記接種物の使用が前記哺乳類宿主を前記病原体から保護する、請求の範囲第17項記載の接種物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は免疫学及びタンパク質工学の分野の交差点、特にキャリアタンパク質、更に特別には挿入された化学反応性アミノ酸残基で戦略的修飾されたヘパドナウイルスヌクレオキャプシドタンパク質、そのヘパドナウイルスヌクレオキャプシドタンパク質のペナント結合ハプテンコンジュゲート、及びこれらのコンジュゲートを含む免疫原性粒子に関する。

【0002】

(背景技術)

抗体は大きい免疫原性タンパク質分子をキャリアとして使用することにより小分子に対

10

20

30

40

50

し産生し得ることが知られている。キャリアーに複合されることにより増進された免疫原性を誘導する小分子がハプテンと称される。それが結合される小分子実体の免疫原性を強化する比較的大きい分子の現象が“キャリアー効果”として当業界で知られている。

#### 【0003】

ヘルパーT細胞(Th細胞)により認識される免疫原の部分はT細胞決定基又はエピトープである。抗体により結合される免疫原の部分はB細胞決定基又はエピトープである。キャリアー効果は別の決定基、B細胞決定基に対する免疫応答を増進する多決定基免疫原の一つの決定基、“ヘルパー”又はT(T<sub>h</sub>)細胞決定基に対する免疫と定義し得る。

殆どの免疫原はT細胞がB細胞に抗体を産生することを誘導することを助けることを必要とすることが現在良く証明されている。こうして、T<sub>h</sub>細胞は、免疫原についてヘルパー決定基を認識することによりB細胞が免疫原に対し抗体を産生することを助ける。

Tヘルパー細胞(T<sub>h</sub>)及びB細胞により認識される抗原決定基は会合されて単一分子実体を生成することが必要であるが、それらは共有結合される必要はない。Russellら, Nature, 280:147 (1979)、Lambら, J. Immunol., 129:1465 (1982)、Scherleら, J. Exp. Med., 164:1114 (1986)及びLakeら, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 41:589 (1976)を参照のこと。或る種の免疫原はT細胞が抗体生成を誘導することを助けることを必要とせず、これらはT非依存性抗原である。

#### 【0004】

病原体関連タンパク質は、配列が病原体の決定基の配列に相当する合成ポリペプチドの生成により免疫学上模擬し得る。このようなポリペプチド免疫原がSutcliffeら, Nature, 287:801 (1980)、及びLernerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:3403 (1981)により報告されている。

Gerinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2365 (1983)はHbsAgの決定基部分の配列に相当するアミノ酸残基配列、特に、“S”(表面)領域の残基110-137を有するキャリアー結合された合成ポリペプチドによる免疫化後のB型肝炎ウイルスからのチンパンジーの制限された保護を示した。しかしながら、これらの研究に使用されたキャリアータンパク質はヒトへの医療適用における使用に適しないT細胞依存性キャリアーであるキーホール・リンベット・ヘモシアニン(KLH)であった。何とならば、それがひどい炎症をもたらす刺激の源であるからである。

#### 【0005】

ヒト被験者で許容し得ない副作用を生じないハプテンの免疫原性を増進することができるT細胞刺激キャリアータンパク質はしばしば免疫原性天然タンパク質である。例えば、破傷風トキソイド(TT)はヒト投与に適したキャリアーが必要とされる時に頻繁に使用されていた。しかしながら、キャリアーとしての破傷風トキソイドの使用は投薬量制限及びトキソイドそれ自体に対する感作のリスクによる問題のために制限された。加えて、キャリアーされるハプテンに対する応答のエピトープ特異性抑制が破傷風に対し既に免疫された個体中で生じ得る。

B型肝炎表面タンパク質が異種エピトープのキャリアーとして提案されていた。Delpeyrouxら, Science, 233:472-475 (1986)はポリオウイルスポリペプチドハプテンのキャリアーとしてのHBV表面タンパク質(Sタンパク質)の使用を報告していた。これらの研究者らは真性22-ナノマーHbsAg粒子に近似する粒子を形成することができる、HBsPolioAgと称される、融合タンパク質を生成する組換えデオキシリボ核酸(DNA)タンパク質発現ビヒクルを構築した。HBsPolioAgはポリオウイルス型1(マホニイ株)のキャプシドタンパク質VPIのアミノ酸93-103に相当する11アミノ酸残基配列インサートを有するHBV Sタンパク質からなる。

#### 【0006】

ヘパドナウイルスヌクレオキャプシドタンパク質がハプテンキャリアーとして使用されていた。融合粒子として発現された、B型肝炎コアに内部挿入された異種免疫原性ペプチド配列は、アジュバントの不在下で免疫された動物に非常に高い免疫応答を誘発した。B.E. Clarkeら, Vaccines 91:313-318 (1991); F. Schodelら, J. Virol. 66(1):106-114 (19

10

20

30

40

50

92)を参照のこと。米国特許第4,818,527号、同第4,882,145号、及び同第5,143,726号（これらの開示が参考として本明細書に含まれる）は機能し得る形で連結されたポリペプチドハプテンの免疫原性を増進するためのB型肝炎ウイルスヌクレオキャプシドタンパク質によるキャリアー効果の使用を記載している。これらの特許はB型肝炎ウイルスヌクレオキャプシドタンパク質配列中に自然に生じるアミノ酸残基側鎖によるB型肝炎ウイルスヌクレオキャプシドタンパク質へのポリペプチドハプテンの結合を記載している。

#### 【0007】

ヘパドナウイルスヌクレオキャプシドタンパク質はかなり良く研究されている。配列番号1及び2は米国特許第4,818,527号、同第4,882,145号、及び同第5,143,726号に記載されているようにヒトB型肝炎コアタンパク質(HBc)、サブタイプaywのDNA配列及びアミノ酸配列である。その他のヘパドナウイルスヌクレオキャプシドタンパク質配列がまた当業界で知られている。例えば、配列番号3-13を参照のこと。

当業界で使用されるその他のキャリアー、例えば、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)、BCG、破傷風トキソイド及びジフテリятトキソイドに対しキャリアーとしてヘパドナウイルスヌクレオキャプシドタンパク質を選択するのには理由がある。KLH、BCG、破傷風トキソイド及びジフテリятトキソイドは非粒状であり、一方、ヘパドナウイルスヌクレオキャプシドタンパク質は“粒子”に凝集する傾向がある。HBc粒子はB型肝炎表面抗原(HBsAg)粒子よりも高い免疫原性を有する傾向がある。D.R. Milichら, Science, 234:1398-1401 (1986)を参照のこと。HBcはT細胞非依存性免疫原及びT細胞依存性免疫原の両方である。上記文献を参照のこと。HBcは知られている最も免疫原性のタンパク質の一種である。殆ど全てのB型肝炎に感染された人がコアに対し強力な免疫応答を発生する。J. H. Hoofnagle, Semin. Liver Dis., 1(1):7-14 (1981)を参照のこと。HBcは遺伝子バックグラウンドにかかわらず万能の応答性を与えることができる。上記文献を参照のこと。HBcはT細胞を直接活性化する。HBcは強い $T_H$ 細胞応答を誘発する。HBcは有効にプロセッシングされ、抗原提示細胞により提示される。HBcの本来高い免疫原性のために、複雑なアジュバントが典型的には必要とされず、例えば、普通の安価なミョウバンが充分である。

#### 【0008】

ファミリーヘパドナウイルス科はヒトにB型肝炎を生じるDNAのコアを有するエンベロープ動物ウイルスのファミリーである。ヘパドナウイルス科はヒトA型肝炎（一本鎖RNAエンテロウイルス）、ヒトC型肝炎（一本鎖RNAウイルスのフラビウイルス科ファミリー）、又はヒトD型肝炎（複製にB型肝炎ウイルスを必要とする、密閉環状ネガチブセンスRNAサテライトウイルス、“デルタウイルス”）の原因ではない。ヘパドナウイルス科ファミリーはヒト及びサルにB型肝炎に加えてその他の種、例えば、ウッドチャック、アヒル、地上性リス、及びサギの肝炎ウイルスを含む。以下に使用されるB型肝炎(HB)は、その説明が特別な例に言及していない限り、ファミリーヘパドナウイルス科を表す。

#### 【0009】

B型肝炎コアタンパク質モノマーはB型肝炎コアタンパク質粒子(HBc粒子)として知られている安定な凝集物に自己集合する。例えば、ヒトHBc粒子は直径27ナノメートル(nm)である。Conwayら, Nature, 386:91-94 (1997)はクライオエレクトロン(cryo-electron)顕微鏡写真器により測定して9 Å分解能でヒトHBc粒子の構造を記載している。Bottcherら, Nature, 386:88-91 (1997)はヒトHBcモノマーについてポリペプチド折り畳みを記載し、また $\alpha$ らせん領域及びそれらの結合ループ領域が形成するアミノ酸残基についておよそそのナンバリングスキームを提供する。BottcherらはB型肝炎コアタンパク質の残基約78から82までのループを提案している。

合成ペプチド及びモノクローナル抗体を使用して、HBcの免疫優性ループ領域がアミノ酸残基約75~83にマッピングされた。G. Colucciら, J. Immunol., 141:4376-4380 (1988)を参照のこと。二つの免疫優性線状エピトープがアミノ酸残基75~85及び130~140でその他の研究者らにより報告された。Salfeldら, J. Virol. 63:798 (1989)を参照のこと。

#### 【0010】

B型肝炎コアタンパク質の挿入変異体は、外来エピトープがHBcの免疫優性ループ領域に

クローン化される場合にコア粒子を依然として形成することができる。P. Pumpensら, *Intervirology*, 38:63-74 (1995)を参照のこと。HBc融合タンパク質は原核生物発現系及び真核生物発現系中で粒子を形成する。上記文献を参照のこと。

ペンダント結合されたハプテンのキャリアーとしてタンパク質を使用することができることはHBcに関して研究された幾つかの因子に依存する。化学反応性アミノ酸側鎖、例えば、リシン(K)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、及び還元されたシステイン残基(C)がポリペプチドを修飾するのに有益であり得る官能基を与える。

#### 【0011】

B型肝炎コアタンパク質配列は天然配列中に幾つかの化学反応性アミノ酸側鎖を有する。コアは四つのシステイン残基(C48、C61、C107及びC183)とともに三つの一級アミノ基、即ち、アミノ末端の一つと、二つのリシン残基(K5及びK96)とを有する。幾つかのカルボン酸基、D(2、4、22、29、32、78、83)及びE(8、14、40、43、46、64、77、113、117、145、179)並びにカルボキシ末端がある。

しかしながら、天然の未修飾B型肝炎コアタンパク質粒子は天然配列中のアミノ酸側鎖の認められる化学反応性を示さない。タンパク質中のアミノ酸側鎖の化学反応性はアミノ酸側鎖の性質、及び折り畳まれたタンパク質中のその環境に依存する。

以下に詳しく説明されるように、天然B型肝炎ヌクレオキャプシドタンパク質中のアミノ酸側鎖の低反応性の問題が化学反応性アミノ酸側鎖をHBcタンパク質配列に挿入することにより解決し得ることが今見出された。本発明の戦略的修飾されたヘパドナウイルスコアタンパク質粒子は化学結合されたハプテンによるHBc粒子の誘導体化に関して実質的に増進された反応性を示し、これらの結合されたハプテンに増進された免疫原性を与える。これらの修飾HBcタンパク質及びそれらのペンダント結合されたハプテンコンジュゲート誘導体が以下の開示に説明される。

#### 【0012】

(発明の開示)

本発明はHBc配列に挿入された化学反応性アミノ酸残基によりペンダントハプテンに結合されている戦略修飾されたB型肝炎コア(HBc)タンパク質に関する。HBcの意図される戦略的修飾はHBcタンパク質のインサート突然変異である。意図されるインサートは長さ1～約40アミノ酸残基、好ましくは長さ1～10アミノ酸残基であり、かつ化学反応性アミノ酸残基を含む。

インサートは配列番号2に示されたB型肝炎コアタンパク質配列のアミノ酸残基約50～約100に相当する領域に与えられる。挿入の好ましい領域はアミノ酸残基約70～約90にあるB型肝炎コアタンパク質免疫優性ループ領域、更に好ましくはアミノ酸約78～約82、最も好ましくはアミノ酸78～アミノ酸80にあるループ先端領域に相当する。

#### 【0013】

このような導入された化学反応性アミノ酸残基は、それが戦略的修飾されたHBcをハプテンにペンダント結合するための化学基を与える化学反応性側鎖を有することを特徴とする。典型的には、化学反応性アミノ酸残基はリシン残基、システイン残基、もしくはヒスチジン残基又はカルボキシル含有残基、例えば、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸、好ましくはリシン残基又はカルボキシル含有残基、最も好ましくはリシンである。

化学反応性アミノ酸残基に結合されるハプテンは免疫応答を生じるための関係するあらゆる化合物であり、典型的にはB細胞決定基である。ハプテンはポリペプチドハプテン、炭水化物ハプテン、又は非ペプチド/非サッカリド(化学)ハプテンであることが好ましい。本発明の一実施態様において、ハプテンは病原体関連ハプテン、例えば、病原体のB細胞決定基である。

戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートの別の実施態様において、戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質はまたB型肝炎コアアミノ酸配列のカルボキシ末端に機能し得る形で連結されたT細胞刺激アミノ酸残基配列を有する。ハプテン及びT細胞刺激アミノ酸残基配列の両方が病原体に関連していることが好ましく、両方が同じ病原体に関連していることが最も好ましい。

## 【0014】

本発明の上記実施態様において、B細胞エピトープに対する応答がまたTヘルパー( $T_h$ )細胞決定基を与えることにより増加される。本発明のこの好ましい実施態様において、このような $T_h$ 細胞決定基はB型肝炎コアタンパク質抗原特異性T細胞メモリーに加えて病原体特異性T細胞メモリーを与えるために戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質にペナント結合されるB細胞決定基ハプテンと同じ病原体からのものである。

戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートは戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質にペナント結合されているハプテンを含む。異なると見ると、前記戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質は三つのペプチド結合ドメイン、I、II及びIII（アミノ末端から連続して番号を付された）を有すると考えられる。ドメインIは配列番号2のB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列の約10～50の番号を付された残基に相当し、好ましくはその配列の1～50の番号を付された残基に相当する配列を含む。ドメインIIはドメインIのカルボキシ末端残基に結合される。ドメインIIは配列番号2のB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列の50～100の番号を付された残基に相当する。ドメインIIIはドメインIIのカルボキシ末端残基に結合されている配列を含む。ドメインIIIはB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸配列の100～約140の番号を付された残基に相当し、好ましくはその配列の100～約149の番号を付された残基に相当する。

10

## 【0015】

前に説明された本発明の実施態様において、戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質はドメインIIIのカルボキシ末端残基にペプチド結合されて融合タンパク質を与えるHBcに外因性のドメインIVを更に有する。ドメインIVはT細胞エピトープである。

20

本発明の戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子は集合したB型肝炎コアタンパク質からつくられ、この場合、複数のサブユニットが戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットである。また、戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットとその他のB型肝炎コアタンパク質サブユニットの混合物を含む粒子が意図されている。

意図される戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲートは集合したB型肝炎コアタンパク質サブユニットを含み、この場合、複数のサブユニットが戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットである。この実施態様において、ハプテンがB型肝炎コアタンパク質サブユニットにペナント結合されている。ハプテンが病原体関連であることが好ましい。上記のように、T細胞刺激アミノ酸残基配列はB型肝炎コアタンパク質に相当する配列のカルボキシ末端残基にペプチド結合し得る。その病原体関連T細胞決定基は病原体関連ハプテンと同じ病原体に関連していることが好ましい。

30

## 【0016】

本発明の戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲートはペナント結合されたハプテンを有する。粒子コンジュゲートの意図される実施態様において、粒子はペナント結合されたハプテンを有する戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットと、その他のB型肝炎コアタンパク質サブユニットの混合物から構成される。一実施態様において、戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットの約0.1～約0.5がハプテンにペナント結合される。また、戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質サブユニットとその他のB型肝炎コアタンパク質サブユニットの混合物から構成される粒子コンジュゲートが意図される。

40

## 【0017】

本発明の前記戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質は化学反応性アミノ酸残基を含むペプチドインサートを含む。そのインサートは別のB細胞抗原決定基であってもよいが、典型的にはその抗原決定基それ自体ではないが、インサートの或る種のB細胞免疫原性が単にHBcタンパク質又は粒子へのインサートの配置のために示され得る。このようなインサートはT細胞エピトープであってもよく、幾つかの実施態様においてT細胞エピトープである。HBcループ領域へのインサートの配置は得られる分子のHBc免疫原性及び抗原性を大いに減少する。本発明の接種物は免疫原量の本発明の戦略的修飾されたB型肝炎コアタ

50

ンパク質コンジュゲートを含む。ペンダント結合されるハプテンが病原体関連ハプテンである場合、接種物は接種物で治療された哺乳類をその病原体から保護するためのワクチンとして使用し得る。こうして、本発明の一実施態様において、戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートはハプテンが誘導される病原体に対する保護を与えるためのワクチンとして使用される。接種物は免疫原として戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質粒子コンジュゲートを含むことが更に好ましい。

#### 【0018】

本発明は幾つかの利益及び利点を有する。

意図される修飾HBcタンパク質の一つの利益は、そのタンパク質がHBc粒子の凝集形態のままで誘導体化し得ることである。

10

本発明の利点は、修飾HBcタンパク質が、例えば、N末端一級アミンの使用と較べて誘導体化に関して認められる程に増進された化学反応性を示すことである。

意図される修飾HBcタンパク質の別の利益は、このような側鎖の誘導体化の化学が良く研究され、直接的であり、かつ比較的予測し得ることである。

意図される修飾HBcタンパク質の別の利点は、それがそれを誘導体化する複合ハプテンに対する免疫応答を増進することである。

意図される修飾HBcタンパク質の更に別の利益は、それがヒトに望ましくない免疫副作用を生じそうにないことである。

本発明の更に別の利益及び利点が以下の説明から当業者に明らかであろう。

#### 【0019】

20

(発明を実施するための最良の形態)

#### A. 定義

“抗体”という用語は免疫グロブリンと称されるグリコシル化タンパク質のファミリーの員である分子を表し、これは抗原と特異的に化合し得る。

“抗原”という用語は抗体により結合される実体を表し、また抗体の産生を誘導する実体を表すのに従来使用されていた。更に現在の使用は抗原の意味を抗体により結合されるその実体に限定し、一方、“免疫原”という用語は抗体産生を誘導する実体を使用される。本明細書に説明される実体が免疫原性及び抗原性の両方である場合、免疫原又は抗原としてのそれへの言及は典型的にはその意図される実用性に従ってなされるであろう。

“ハプテン”という用語はタンパク質キャリアーに化学結合された時に免疫応答（例えば、抗体の産生）を刺激することができる分子を記載するのに使用される。その用語は当業界で小さい非抗原性分子についてしばしば使用されるが、本明細書では、それは、たとえそれが抗原性であり、また小さくなくても、キャリアータンパク質にペンダント結合される分子を単に表す。

30

#### 【0020】

“抗原決定基”は抗体化合部位又はT細胞レセプターにより免疫結合される抗原の実際の構造部分を表す。その用語はまた“エピトープ”と互換可能に使用される。

本明細書に使用される“コンジュゲート”という用語はアミノ酸残基側鎖を介してキャリアーにペンダント結合されるハプテンから形成された分子を表す。本明細書に使用される“保存置換”という用語は、一つのアミノ酸残基が別の生物学的に同様の残基により置換されたことを表す。保存置換の例として、別の残基に代えての一つの疎水性残基、例えば、イソロイシン、バリン、ロイシンもしくはメチオニンの置換、又は別の残基に代えての一つの極性残基の置換、例えば、アルギニンとリシンの間、グルタミン酸とアスパラギン酸の間もしくはグルタミンとアスパラギンの間等の置換が挙げられる。また、“保存置換”という用語は未置換親アミノ酸に代えての置換アミノ酸の使用を含むが、但し、このようなポリペプチドに対し産生された抗体がまた未置換アミノ酸を有する相当するポリペプチドと免疫反応することを条件とする。

40

#### 【0021】

ペプチド配列に関して使用される種々の文法形態の“相当する”という用語は記載されたペプチド配列+又は－アミノ末端及びカルボキシ末端のいずれか又は両方にあり、またポ

50

リペプチド配列に沿って特別なアミノ酸残基中に保存置換のみを含む三つまでのアミノ酸残基を意味する。

“エピトープ”はT細胞抗原レセプター又は抗体化合部位により特異的に結合される分子のその部分を表す。“エピトープ”及び“決定基”は互換可能に使用される。

本明細書に使用される“融合タンパク質”という用語はそれらの夫々の末端アミノ酸残基の間でペプチド結合により両端を付き合わせて（頭一尾）一緒に機能し得る形で連結された現実には一緒に結合されて通常見られない少なくとも二つのアミノ酸残基配列を表す。ここに使用される“B型肝炎”という表現はその最も広い状況でヒトにB型肝炎を生じ得るエンベロープDNAを含む動物ウイルスのファミリーであるファミリーヘパドナウイルス科のあらゆる員を表す。

10

#### 【0022】

ここに使用される“HBc”という表現はB型肝炎ウイルス(HBV)ヌクレオキャプシドタンパク質遺伝子によりコードされたアミノ酸残基配列に相当するアミノ酸残基配列を有するT細胞刺激タンパク質を表す。ヒトHBVヌクレオキャプシド遺伝子によりコードされた例示の良く知られた天然産タンパク質は配列番号1及び2の生物学的配列を有する“コア”タンパク質、サブタイプaywである。Galibertら, Nature 281:646 (1979)を参照のこと。HBcの前駆体であるHBeAgタンパク質は地上性リスB型肝炎ヌクレオキャプシド遺伝子の場合には配列番号8及び9に示されるようにB型肝炎コアタンパク質の配列及びそのアミノ末端にある“プレーコア”配列を含む。コアタンパク質配列はその中のアミノ酸位置31で始まり、こうして配列番号2のアミノ酸残基番号1に相当する。その他のB型肝炎コアタンパク質の配列が当業界で知られている。ヒトB型肝炎ウイルスコアタンパク質サブタイプadrが配列番号3及び4に示され、サブタイプadwが配列番号5及び6に示される。Onoら, Nucl. Acids Res. 11:1747 (1983)を参照のこと。これらの配列がまた配列番号7にウッドチャックB型肝炎コアタンパク質 [Schodelら, Adv. Viral Oncol. 8:73-102 (1989)]、配列番号8及び9に地上性リス、配列番号10及び11にサギ、また配列番号12及び13にアヒルについて示される。明瞭化のために、ヒトB型肝炎コアタンパク質サブタイプaywに関して配列番号1及び2に示されたアミノ酸ナンバリング系が本明細書でベンチマークとして使用される。“配列番号2のB型肝炎コアタンパク質配列に相当する”アミノ酸残基を決定するために通常の生物学的配列アライメントプログラム及びプロトコルを使用して、その他のHBc配列がその配列と整列される。例えば、Schodelら, Adv. Viral Oncol. 8: 73-102 (1989)を参照のこと。

20

30

#### 【0023】

言及が上記天然産HBVヌクレオキャプシド遺伝子コードタンパク質のいずれかのポリペプチド部分についてなされる場合、その言及は、例えば、特別なタンパク質のT細胞刺激部分が言及されていることを記載することにより、又は含まれるアミノ酸残基位置の指示によるような配列の特別な部分を明記することにより明瞭である。

種々の形態の“免疫反応する”という用語はリガンドとしての抗原と抗体化合部位、例えば、全抗体のFab部分を含む分子の間の特異的結合を意味する。

本明細書に使用される“機能し得る形で連結された”という表現は、その連結が記載されたように機能する、例えば、T細胞決定基又はB細胞決定基として機能する連結された基のいずれかの能力に干渉しないことを意味する。

40

#### 【0024】

“ペンダント結合された”という表現はHBcタンパク質からアミノ末端又はカルボキシ末端以外にある別の分子への直接の、又はブリッジを介する単一結合を表す。その表現はハプテンと戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質の化学反応性アミノ酸側鎖の間の結合を記載するのに本明細書に使用される。

“巨大分子集合”はタンパク質サブユニットの非共有結合凝集物を表す。典型的には本発明において、タンパク質サブユニットは戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質モノマーである。以下に更に詳しく記載されるように、これらのコアタンパク質モノマーは通常90又は120コアタンパク質ダイマー（合計180又は240のコアタンパク質サブユニット）を

50

有する球形の“コア粒子”に自己集合する。球形のコア粒子は巨大分子集合の例である。本明細書に使用される“病原体関連”という表現は天然形態の病原体と免疫反応する抗体の産生を誘導することができるB細胞免疫原又はT細胞免疫原を表す。例示の病原体関連B細胞免疫原及びT細胞免疫原が以下に示される。

【0025】

本明細書中に互換可能に使用される“ポリペプチド”及び“ペプチド”という用語は隣接アミノ酸の $\alpha$ -アミノ基及びカルボキシ基の間のペプチド結合により互いに連結されたアミノ酸の線状の系列を表す。ポリペプチドはそれらの中性（未変化）形態又は塩である形態の種々の長さのものであってもよく、修飾、例えば、グリコシル化、側鎖酸化、もしくはリン酸化を含まず、又はこれらの修飾を含む。アミノ酸残基配列は酸性基及び塩基性基を含むこと、またペプチドにより示される特別なイオン化状態はそのタンパク質が溶液中にある場合に周囲の媒体のpH、又はそのタンパク質が固体形態である場合にそれが得られた媒体のpHに依存することは当業界で良く理解されている。また、アミノ酸側鎖に結合された付加的な置換基、例えば、グリコシル単位、脂質、又は無機イオン、例えば、リン酸イオン、並びに鎖の化学変換、例えば、スルフヒドリル基の酸化に関する修飾により修飾されたタンパク質がその定義に含まれる。こうして、“ポリペプチド”又はその均等の用語はその機能性を損なわない以上の修飾のこれらを受けるのに適した言及されたアミノ酸残基配列を含むことが意図されている。ハプテンとして使用されるペプチド又はポリペプチドは典型的には70より少ないアミノ酸残基を含み、更に典型的には約5～約40アミノ酸残基、更に好ましくは約10～約25残基の線状鎖を含む。意図されるポリペプチドハプテンは70残基より長くてもよいが、このようなポリペプチドはその配列を共有する天然産タンパク質より短いことが注目される。

【0026】

“タンパク質”という用語は約70以上のアミノ酸残基を有するポリペプチドを表し、天然産物である。

“分泌する”及び“産生する”という用語は、抗体分子が得られる細胞について当業界で互換可能にしばしば使用される。しかしながら、抗体を産生する細胞はこれらの分子をそれらの環境に分泌しなくてもよい。ここでは、抗体分子が分泌され、血流から得られる（体液性抗体）。それにもかかわらず、抗体は一般に当業界で使用される表現と一致して“産生される”と言われる。

ここに同定された全てのアミノ酸残基は天然配置又はL-配置である。通常のポリペプチド命名法〔J. Biol. Chem., 243, 3557-59 (1969)〕と一致して、アミノ酸残基の略号は下記の対応表、表1に示されるとおりである。

【0027】

【表1】

| 対応表  |      |                         |
|------|------|-------------------------|
| 記号   |      |                         |
| 1 文字 | 3 文字 | アミノ酸                    |
| Y    | Tyr  | L-チロシン                  |
| G    | Gly  | グリシン                    |
| F    | Phe  | L-フェニルアラニン              |
| M    | Met  | L-メチオニン                 |
| A    | Ala  | L-アラニン                  |
| S    | Ser  | L-セリン                   |
| I    | Ile  | L-イソロイシン                |
| L    | Leu  | L-ロイシン                  |
| T    | Thr  | L-スレオニン                 |
| V    | Val  | L-バリン                   |
| P    | Pro  | L-プロリン                  |
| K    | Lys  | L-リシン                   |
| H    | His  | L-ヒスチジン                 |
| Q    | Gln  | L-グルタミン                 |
| E    | Glu  | L-グルタミン酸                |
| Z    | Glx  | L-グルタミン酸又は<br>L-グルタミン   |
| W    | Trp  | L-トリプトファン               |
| R    | Arg  | L-アルギニン                 |
| D    | Asp  | L-アスパラギン酸               |
| N    | Asn  | L-アスパラギン                |
| B    | Asx  | L-アスパラギン酸又は<br>L-アスパラギン |
| C    | Cys  | L-システイン                 |

10

20

30

40

## 【0028】

## B. 戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質

本発明はハプテン、例えば、ポリペプチド及び炭水化物とペンダント結合するための挿入された化学反応性アミノ酸残基を有する戦略的修飾されたヘパドナウイルス科コア（“HBc”）タンパク質を意図している。本発明の戦略的修飾は配列番号2のHBc配列のアミノ酸残基50～100に相当する領域のB型肝炎コアタンパク質配列への化学反応性アミノ酸残基を含む1～約40アミノ酸残基の挿入である。このような導入された化学反応性アミノ酸残基はハプテンを戦略的修飾されたキャリアーにペンダント結合するための官能基を与える側鎖を有する。

ヘパドナウイルス科は表面タンパク質を含む脂質エンベロープにより囲まれたヌクレオキ

50

ャプシド、又はコアを有する。ヌクレオキャプシドはコアタンパク質（“コア抗原”、HBcAg）ダイマーの一般に球形の凝集物である。in vitroでは、B型肝炎コアタンパク質は90又は120のB型肝炎コアタンパク質ダイマー、こうして180又は240のタンパク質サブユニットから構成された正二十面体シンメトリーの球形シェルである“粒子”に自己集合する。粒子は夫々直径約280又は310 Åである。B. Bottcherら, Nature, 386:88-91 (1997); J. F. Conwayら, Nature 386:91-94 (1997)を参照のこと。

#### 【0029】

意図される戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質はまた巨大分子集合を形成する。このような粒子は180又は240のタンパク質サブユニットの形態で存在し得るが、それはこのような90又は120のダイマーである必要はない。

アミノ酸残基80付近の領域に挿入された外因性アミノ酸残基を有するハイブリッドコアタンパク質は、長さ46アミノ酸程度に大きいインサートを有しても、規則的なシェルに集合すると報告されている。A. I. Brownら, Vaccine, 9:595-601 (1991); F. Schodelら, J. Virol., 66:106-114 (1992)を参照のこと。

ここでベンチマーク配列として使用されたヘパドナウイルス科コアタンパク質配列は配列番号1及び2に示されたヒトB型肝炎コアタンパク質、サブタイプaywの配列である。ヒトB型肝炎ウイルスのその他のサブタイプが知られている。配列番号3及び4はヒトHBc、サブタイプadrであり、また配列番号5及び6はHBcサブタイプadwである。種々の動物肝炎コアタンパク質の配列がまた公表されている。アヒル肝炎コアタンパク質の生物学的配列が本明細書に配列番号12及び13として開示され、地上性リス肝炎ヌクレオキャプシド遺伝子の一部が配列番号8及び9にあり、ウッドチャック肝炎コアが配列番号7にあり、またサギ肝炎コアが配列番号10及び11にある。例示の動物B型肝炎コアタンパク質がF. Schodelら, Adv. Viral Oncology 8:73-102 (1989)によりヒトB型肝炎コアタンパク質と整列されている。

#### 【0030】

##### i. コアタンパク質の戦略的修飾

本発明は戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質(HBc)にペンダント結合されているハプテンを含む戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートを意図している。戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質それ自体はその配列の約10～約140の番号を付されたアミノ酸残基を含む配列番号2のB型肝炎コアタンパク質アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む。そのHBcアミノ酸残基配列は更にHBcアミノ末端から約50～約100の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域に外因性アミノ酸残基インサートを含み、その外因性インサートは(i)長さ1～約40アミノ酸残基であり、かつ(ii)化学反応性アミノ酸残基を含む。ハプテンがそのインサート中に存在する化学反応性アミノ酸残基により戦略的修飾されたHBcタンパク質にペンダント結合される。

配列番号2の残基1～10は戦略的修飾されたHBcタンパク質分子中に存在することが好ましい。残基が不在であり、又は位置1～10から欠失されている場合、これらの残基が連続に欠失されること、また残りの残基が連続に存在することが更に好ましい。こうして、5残基欠失が意図された場合、欠失された残基は1-5と番号を付され、残基6～存在する所望のHBcカルボキシ末端、+インサートを残すであろう。

#### 【0031】

同様に、配列番号2の位置約140～149の番号を付された残基は戦略的修飾されたHBcタンパク質分子中に存在することが好ましい。本明細書中のいずれかに記載されるように、150～カルボキシ末端の番号を付されたHBcの領域は多数のアルギニン残基を含む。これらの残基は発現後のHBc粒子の精製時に核酸を結合し、これらの残基を含む配列は戦略的修飾されたHBcタンパク質分子から排除されることが好ましい。位置1～10の残基の場合のように、位置約140～149の残基が存在し、従って連続様式で不在であることが好ましい。こうして、カルボキシ末端残基が位置146の残基に相当する場合、位置141-145の残基がまた存在し、かつ147-149の残基が不在である。意図されるHBc配列は位置1～位置149の配列番号2に示された配列、+インサートの配列であることが最も好ましい。

インサートは、既に記載されたように、HBc配列内に約50～約100の番号を付された領域に配置し得る。インサートは約70～約90の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域に存在することが好ましい。インサートは78～82の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域に存在することが更に好ましい。インサートは78～80の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域に配置されることが最も好ましい。

#### 【0032】

本発明の戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質は挿入された1～約40アミノ酸残基を有する。インサートは長さ1～10アミノ酸残基であることが好ましい。インサートは化学反応性アミノ酸残基を含む。一つよりも多い化学反応性アミノ酸残基の挿入がまた意図されている。

制限エンドヌクレアーゼ部位が所望のインサート領域付近に戦略的修飾されたB型肝炎タンパク質の遺伝子構築物中に用意されることが意図されている。制限エンドヌクレアーゼ部位のヌクレオチドが発現後にアミノ酸に翻訳され、その効果がエンドヌクレアーゼの選択について或る種の支持を有する。幾つかの制限エンドヌクレアーゼが市販されており（例えば、ウィスコンシン、マジソンのプロメガ社から）、それらの認識部位配列及び開裂部位が当業界で公知である。実施例1は戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質についてのこのような構築を記載している。

#### 【0033】

一つの好ましい実施態様において、インサートは化学反応性残基として加えられる単一残基である。その他の好ましい実施態様において、制限酵素及びそれらの認識配列の使用は所望の化学反応性残基を含む、約3～約5残基を挿入させる。

化学反応性アミノ酸残基を含むインサートは約50から約100までのアミノ酸残基位置に相当する位置で天然B型肝炎コアタンパク質に挿入される。B型肝炎コアタンパク質への挿入の好ましい領域は免疫優性ループ領域（アミノ酸残基約70～約90）、更に好ましくはアミノ酸約78から約82までの天然B型肝炎コアタンパク質位置に相当するループ領域にある。インサートは配列番号2の78～80の番号を付された残基に配置されることが最も好ましい。

本明細書に使用されるように、インサートが“位置”にあると言われる場合、インサートのアミノ末端がそのアミノ酸残基番号を有するB型肝炎コアタンパク質配列の相当するアミノ酸残基のカルボキシ末端にペプチド結合されることが意味される。換言すれば、そのインサートがその記載された位置にある残基の直後にある。

#### 【0034】

挿入は当業界で一般に使用される方法により行い得る。PCRをベースとする方法による遺伝子操作が実施例1及び5に示される。加えて、J. Sambrookら, Molecular Cloning: a laboratory manual, 第2編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15.51-ff. (1989) に説明されたようなオリゴヌクレオチド媒介部位誘導突然変異誘発が所望のDNA配列をコドンに単一残基に加える鋳型でハイブリダイズし、続いて残りの核酸配列をフィルイン(fill in)することにより一つのコドンを加えるのに使用し得る。Dawsonら, Science 266:776-779 (1994)はポリペプチド鎖をそれらのペプチド主鎖で結合する方法を記載しており、その結果、融合がペプチドフラグメントからつくられる。

#### 【0035】

化学反応性アミノ酸残基はインサート内のあらゆる位置にあってもよい。化学反応性アミノ酸残基は天然（野生型）コアの70～90の番号を付されたアミノ酸残基に相当する位置、最も好ましくは残基位置78～82にあることが好ましい。例えば、10アミノ酸残基長さのインサートが天然コアタンパク質残基73に相当する位置に挿入される場合、化学反応性アミノ酸残基がインサートの位置5～9にあることが好ましい。30アミノ酸残基長さのインサートが天然コアタンパク質残基58に相当する位置に挿入される場合、化学反応性アミノ酸残基がインサートの位置22～24にあることが好ましい。

導入された化学反応性アミノ酸残基は戦略的修飾されたHBcを誘導體化する（即ち、ハプテンを修飾HBcに結合する）ための官能基を与える化学反応性側鎖を有する。有益な側鎖

10

20

30

40

50

官能基として、エプシロン-アミノ基、ベーター又はガンマーカルボキシル基、チオール(-SH)基及び芳香族環（例えば、チロシン及びヒスチジン）が挙げられる。化学反応性アミノ酸残基は典型的にはリシン、システイン、もしくはヒスチジン残基又はカルボキシル含有残基、例えば、アスパラギン酸もしくはグルタミン酸である。リシンが特に好ましい化学反応性アミノ酸残基である。

#### 【0036】

夫々配列番号1及び2によりコードされ、示されるB型肝炎コアタンパク質のアミノ酸残基配列は位置77及び78に二つの連続の内因性カルボキシル含有残基、既存のグルタミン酸(glu, E)及びアスパラギン酸(asp, D)を有することが注目される。しかしながら、本発明は少なくとも一つの付加的な外因性化学反応性アミノ酸残基の導入を意図している。欧州特許第385610号はポリペプチドハプテンをHBc粒子に化学結合しようと試みて不満足な結果が得られたことを報告している。これらの結合の試みはアミノ酸側鎖のカルボキシル基ではなくアミノ基に関するものであったことが注目される。

インサート中の個々の化学反応性アミノ酸残基、例えば、アスパラギン酸又はリシンの使用に加えて、化学反応性アミノ酸残基を含む所望の長さの実質的にあらゆる配列が使用し得る。単一残基より大きい例示のインサートとして、B.E. Clarkeら, Vaccines 91:313-318 (1991)に説明されたB細胞HRV-2 VP2エピトープ、F. Schodelら, J. Virol. 66(1):106-114 (1992)に説明されたHBsAg Pre-S(1)27-53配列及びF. Schodelら, Vaccines 90:193-198 (1990)に説明されたHBsAg Pre-S(2)133-143配列が挙げられる。ハプテンとして以下に説明される適当なT細胞エピトープがまたインサートとして使用し得る。例示の配列として、配列番号28、32、33、34、47、48、49、50及び55の配列が挙げられる。

#### 【0037】

##### ii. コアタンパク質の付加的な修飾

上記のように戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質はその他の修飾を有することがまた意図されている。戦略的修飾されたコアの意図される修飾として、化学反応性アミノ酸残基を含むインサートの性質、アミノ末端のトランケーション、カルボキシ末端のトランケーション、カルボキシ末端における融合、カルボキシ末端領域へのペンダント結合が挙げられる。

ハプテンが結合される化学反応性アミノ酸残基を含むインサートは化学反応性アミノ酸残基を与えることに加えて用途を有し得る。化学反応性アミノ酸残基を含むインサートはT細胞刺激アミノ酸配列であることが意図されている。このようなT細胞刺激アミノ酸配列は複合抗原であるB細胞エピトープと同じ源からのT細胞エピトープ、例えば、両方ともマイコバクテリウム・ツベルクローシスからのものであることが好ましい。例示のエピトープが以下に説明される。

化学反応性アミノ酸残基を含むインサートはまた付加的な望ましい性質、例えば、安定性増進性又は溶解性増進性を与えるために選ばれる。

#### 【0038】

戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質は当業界で公知の方法により化学修飾し得る。多数のこのような技術がRoger L. Lundblad, Techniques in Protein Modification, CRC Press (Ann Arbor, Michigan: 1994)に開示されている。このような化学修飾は性質を増進又は軽減するためになされ、例えば、リシンアミノ基がタンパク質の等電点を変化し、それをクロマトグラフィーイオン交換樹脂で異なって分離させるためにブロックし得る。また、コアタンパク質配列のカルボキシ末端は、好ましくはアミノ酸残基位置約140まで、トランケートされることが意図されている。配列番号2の残基150で始まって存在するアルギニンに富む配列が核酸に結合し、発現されたコアタンパク質の精製及び取扱を妨げることがある。配列番号2では、アルギニンに富むストレッチが位置150で始まる。好ましい戦略的修飾されたHBcタンパク質は残基149のカルボキシ末端バリン(V)残基を有する。

#### 【0039】

##### iii. 戦略的修飾されたコアタンパク質の生成

B型肝炎コアタンパク質の戦略的修飾は典型的にはDNAレベルで当業界で知られている方法により、例えば、挿入されるアミノ酸に相当するコドンを挿入することによりなされる。次いで操作された遺伝子が当業界で知られている好都合な系、例えば、ウイルス培養液中で感染された不死化細胞中で発現される。

一般のHBcAgタンパク質の生成方法並びに特にプレーコアタンパク質、コアタンパク質及びHBeAgタンパク質の生成方法は当業界で公知である。同方法は本発明の修飾コアタンパク質粒子の単離に容易に適していた。加えて、HBcAg及びHBeAgは種々の公知の組換えDNA技術により生成し得る。例えば、Itakuraの米国特許第4,356,270号及びMurrayらの米国特許第4,563,423号を夫々参照のこと。これらの組換えDNA技術は本発明の修飾コア粒子を生成するのに容易に適し得る。修飾コア粒子は粒子形成の前後、好ましくはコア粒子形成及び精製の後にハプテンと結合し得る。

10

#### 【0040】

##### C. 修飾B型肝炎コアタンパク質コンジュゲート

抗体産生が所望されるハプテンは戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質に結合されて本発明の免疫原性の戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートを生成し得る。関係するハプテンは典型的にはB細胞決定基である。ハプテンはポリペプチド、炭水化物（サッカリド）、又は非ポリペプチド、非炭水化物薬品、例えば、2,4-ジニトロベンゼンであってもよい。

個々のハプテンをタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残基側鎖を介してタンパク質又はポリペプチドに機能し得る形で連結してペンダント結合された免疫原性コンジュゲート、例えば、分岐鎖ポリペプチドポリマーを生成する方法は当業界で公知である。これらの方法は種々の側鎖の一つ以上の型の官能基により結合することを含み、ハプテンにペンダント結合--共有結合（カップリング）されているが、少なくとも一つの側鎖により分離されているキャリアタンパク質ポリペプチド主鎖をもたらす。

20

#### 【0041】

上記官能基の夫々を使用してキャリアタンパク質をハプテンに結合する方法がErlanger, Method of Enzymology, 70:85 (1980)、Aurameasら, Scand. J. Immunol., 8巻, Suppl. 7, 7-23 (1978)及びNestorらの米国特許第4,493,795号に記載されている。加えて、Rodwellら, Biotech., 3, 889-894 (1985)に記載されているような部位誘導カップリング反応が行なわれてもよく、その結果、ポリペプチドの生物活性が実質的に減少されない。

30

更に、当業界で公知であるように、HBcAgタンパク質及びポリペプチドハプテンの両方がそれらの天然形態で使用でき、又はそれらの官能基含量がリシン残基のスクシニル化もしくはシステイン-チオラクトンとの反応により変更し得る。また、スルフヒドリル基が2-イミノチオラン又は3-(3-ジチオピリジル)プロピオネートのN-ヒドロキシスクシンイミドエステルとのアミノ官能基の反応によりキャリアタンパク質又はコンジュゲートのいずれかにとり込まれてもよい。

また、HBcタンパク質又はハプテンはペンダント結合を促進するためにスペーサーアーム、例えば、ヘキサメチレンジアミン又は同様のサイズのその他の2官能分子を含むように修飾し得る。

#### 【0042】

40

ポリペプチドハプテン。ポリペプチドハプテンの共有結合方法は極めて多様であり、免疫学分野の当業者により公知である。例えば、米国特許第4,818,527号に従って、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（ICNバイオケミカルズ社）又はスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC、ピラス）が戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質と反応させられて活性化キャリアを生成する。次いでその活性化キャリアが末端システインを含み、又は付加的なアミノ末端又はカルボキシ末端システイン残基が付加されたポリペプチドと反応させられて共有結合された戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートを生成する。別の例として、ポリペプチドハプテンのアミノ基が最初にN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート（SPDP、ファーマシア）と反応させられ、そのチオール含有ポリペプチド

50

が還元後に活性化キャリアーと反応させられる。勿論、その硫黄含有部分と二重結合含有ミカエルアクセプターは可逆であり得る。これらの反応が供給業者らの文献、そしてまたKitagawaら, J. Biochem., 79:233 (1976)及びLachmannら, 1986 Synthetic Peptides as Antigens, (Ciba Foundation Symposium 119), 25-40頁(Wiley, Chichester: 1986)に記載されている。

#### 【0043】

米国特許第4,767,842号はここに有益であるキャリアーとポリペプチドの間の共有結合の幾つかの様式を教示している。一つの方法において、トリレンジイソシアネートがジオキサン-緩衝溶媒中で0℃でキャリアーと反応させられて活性化キャリアーを生成する。ポリペプチドハプテンがその後に混合され、活性化キャリアーと反応させられて共有結合さ

10

れた戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートを生成する。N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を含む、一つの官能基末端でジスルフィド結合を形成し、別の官能基末端でペプチド結合を形成する多数のヘテロ2官能薬剤が特に有益である。この試薬はそれ自体と戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質又はハプテン中のチオール、例えば、ポリペプチドハプテン中のシステイン残基の間でジスルフィド結合を生じ、またカップリングパートナー、例えば、リシンのアミノ又はキャリアータンパク質中のその他の遊離アミノ基とアミド結合を生じる。種々のこのようなジスルフィド/アミド形成剤が知られている。例えば、Immun. Rev. (1982) 62:185を参照のこと。その他の2官能カップリング剤はジスルフィド結合ではなくチオエーテルを形成する。これらのチオエーテル形成剤の多くが市販されており、6-マレイミドカ

20

#### 【0044】

ポリペプチドハプテンは当業界で公知の幾つかの方法で得られる。通常のペプチド合成技術が容易に利用し得る。例えば、長いペプチドを生成する組換え技術及びPCRをベースとする技術が有益である。所望の配列は通常比較的短いので、固相化学合成が有益である。以下に説明されるように、種々のポリペプチドハプテンをコードするDNA配列が当業界で知られている。本明細書に意図される長さのペプチドのコーディング配列は化学技術、例えば、Matteucciら, J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981)のホスホトリエステル方法により容易に合成し得る。勿論、コーディング配列を化学合成することにより、あらゆる所望の修飾が天然ペプチド配列をコードするものに代えて適当な塩基を置換することにより単になし得る。次いでコーディング配列が適当なリンカーを用意され、当業界で現在普通に入手し得る発言ベクターにつながれ、調節ベクターが好適な宿主を形質転換して所望のタンパク質を生成するのに使用される。

30

#### 【0045】

幾つかのこのようなベクター及び好適な宿主系が現在入手し得る。例えば、細菌宿主と適合性のプロモーター配列が所望のコーディング配列の挿入に都合の良い制限部位を含むプラスミド中に用意される。このようなベクタープラスミドの代表例は、例えば、ミネソタ大学のJ. Messingから入手し得るpUC8、及びpUC13(例えば、Messingら, Nucleic Acids Res. 9:309 (1981)を参照のこと)又はニュー・イングランド・バイオラブズから入手し得るpBR322である。好適なプロモーターとして、例えば、ベクターラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)及びラクトース(lac)プロモーター系(Changら, Nature 198:1056 (1977)並びにトリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddelら, Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980))が挙げられる。得られる発現ベクターはCohenら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69:2110 (1972)により記載された塩化カルシウム方法を使用して好適な細菌宿主に形質転換さ

40

50

れる。成功した形質転換体は無傷のピリを通常生じる株で見られるレベルよりも高いレベルで所望のポリペプチドフラグメントを生じ得る。勿論、酵母又は哺乳類細胞宿主がまた好適なベクター及び調節配列を使用して使用し得る。

【0046】

【表2】

### ポリペプチドハプテン

| 生 物                 | 抗 原   | T細胞又は<br>B細胞<br>エピトープ | 配 列                                                                                                                                                                      | 配列<br>番号 |
|---------------------|-------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| ストレプトコッカス・<br>ニウモニエ | PspA  | B                     | KLEELSDKIDELDAE                                                                                                                                                          | 25       |
| ストレプトコッカス・<br>ニウモニエ | PspA  | B                     | SQKKYDEDQKKTEEKALEKA<br>ASEEMDKAVAAVQQA                                                                                                                                  | 26       |
| クリプトスポリジウム<br>・パルバム | P23   | B                     | QDKPADAPAAEAPAAEPAAQQ<br>DKPADA                                                                                                                                          | 27       |
| HIV                 | P24   | T                     | GPKEPFRDYVDRFYKC                                                                                                                                                         | 28       |
| HIV                 | GP120 | B                     | RKRIHIGPGRAFYTITKN                                                                                                                                                       | 29       |
| 口蹄疫ウイルス             | VP1   | B                     | YNGECRYNRNAVFNLRGDLQV<br>LAQKVARTLP                                                                                                                                      | 30       |
| コリネバクテリウム・<br>ジフセリエ | toxin | T                     | FQVVHNSYNRPAYSPGC                                                                                                                                                        | 31       |
| ボレリア・<br>ブルグドルフェリ   | OspA  | T                     | VEIKEGTVTLKREIDKNGKVT<br>VSLC                                                                                                                                            | 32       |
| ボレリア・<br>ブルグドルフェリ   | OspA  | T                     | TLSKNISKSGEVSVELNDC                                                                                                                                                      | 33       |
| インフルエンザ<br>A8/P R 8 | HA    | T                     | SSVSSFERFEC                                                                                                                                                              | 34       |
| インフルエンザ<br>A8/P R 8 | HA    | B                     | YRNLLWLTEK                                                                                                                                                               | 35       |
| エルシア・ベステイス          | V Ag  | B                     | DILKVIIVDSMNHGDAARSLR<br>EELAELETAELKIYSVIOAEIN<br>KHLSSSGTINIHDKSINLMDK<br>NLYGYTDEEIFKASAEYKILE<br>KMPQTTIQVDGSEKKIVSIKD<br>FLGSENKRTGALGNLKNSSYSY<br>NKDNNELSHFATTCSD | 36       |
| ヘモフィルス・<br>インフルエンゼ  | pBOMP | B                     | CSSSNDAAGNGAAQFGGY                                                                                                                                                       | 37       |
| ヘモフィルス・<br>インフルエンゼ  | pBOMP | B                     | NKLGTVSYGEE                                                                                                                                                              | 38       |
| ヘモフィルス・<br>インフルエンゼ  | pBOMP | B                     | NDEAAYSKNRRAYLAY                                                                                                                                                         | 39       |
| モラクセラ・<br>カタラーリス    | copB  | B                     | LDIEKDKKKRTDEQLQAELEDD<br>KYAGKGY                                                                                                                                        | 40       |
| モラクセラ・<br>カタラーリス    | copB  | B                     | LDIEKNKKKRTAELEQLAELEDD<br>KYAGKGY                                                                                                                                       | 41       |
| モラクセラ・<br>カタラーリス    | copB  | B                     | IDIEKKGKIRTEAELLAELELNK<br>DYPGQGY                                                                                                                                       | 42       |

【0047】

【表3】

| 生 物                    | 抗 原     | T 細胞又は<br>B 細胞<br>エпитープ | 配 列                                       | 配列<br>番号 |
|------------------------|---------|--------------------------|-------------------------------------------|----------|
| ボルフィロモナス・<br>ジンジバリス    | HA      | B                        | GVSPKVCKDVTVEGSNEFAPV<br>QNL              | 43       |
| ボルフィロモナス・<br>ジンジバリス    | HA      | B                        | RIQSTWRQKTVDLPAGTKYV                      | 44       |
| トリパノソーマ・<br>クルジ        |         | T                        | SHNFTLVASVIIIEEAPSGNTC                    | 45       |
| トリパノソーマ・<br>クルジ        |         | B                        | KAAIAPAKAAAAPAKAATAPA                     | 46       |
| 熱帯熱マラリア原虫              | MSP1    | T                        | SVQIPKVPYPNGIVYC                          | 47       |
| 熱帯熱マラリア原虫              | MSP1    | T                        | DFNHYYTLKTGLEADC                          | 48       |
| ストレプトコカス・<br>ソブリナス     | AgI/II  | B & T                    | KPRPIYEAKLAQNQKC                          | 49       |
| ストレプトコカス・<br>ソブリナス     | AgI/II  | B & T                    | AKADYEAKLAQYEKDL                          | 50       |
| リンパ球性<br>脈絡髄膜炎ウイルス     | NP      | T                        | RPQASGVYMGNLTAQC                          | 51       |
| シゲラ・<br>フレクスネリ         | Invasin | B                        | KDRTLIEQK                                 | 52       |
| R S ウイルス               | G       | B                        | CSICSNNPTCWAICK                           | 53       |
| 三日熱マラリア原虫              | CS      | B                        | GDRADGQAGDRADGQAG                         | 54       |
| クロストリジウム・<br>テタニ       | tox     | T                        | QYIKANSKFIGITELC                          | 55       |
| 赤痢アメーバ                 | lectin  | B                        | VECASTVCQNDNSCPIIADVE<br>KCNQ             | 56       |
| 日本住血吸虫                 | para    | B                        | DLQSEISLSLENGELIRRAKS<br>AESLASELQRRVD    | 57       |
| マンソン住血吸虫               | para    | B                        | DLQSEISLSLENGELIRRAKA<br>AESLASDLQRRVD    | 58       |
| 三日熱マラリア原虫              |         | B                        | DRAAGQAGDRADGQAG                          | 83       |
| インフルエンザウイルス            | Infl    | B                        | CNNPHRIL                                  | 84       |
| インフルエンザ<br>ウイルス        | Infl    | T                        | CPKYVKQNTLKLATGMRNVPE<br>KQTR             | 85       |
| インフルエンザ<br>ウイルス        | Infl    | B                        | SIMRSDAPIGTCSSECITPNG<br>SIPNDKPFQNVNKITY | 14       |
| インフルエンザ<br>ウイルス        | Infl    | B                        | RGIFGAIAGFIENGWEGMIDG<br>WYGFRHQ          | 15       |
| インフルエンザウイルス            | Infl    | B                        | EKQTRGIFGA                                | 16       |
| マイコバクテリウム・<br>ツベルクローシス |         | T                        | AVLEDPYILLVSSKV                           | 86       |
| マイコバクテリウム・<br>ツベルクローシス |         | T                        | LLVSSKVSTVKDLLP                           | 87       |

【 0 0 4 8 】

【 表 4 】

| 生 物                    | 抗 原  | T細胞又は<br>B細胞<br>エピトープ | 配 列                       | 配列<br>番号 |
|------------------------|------|-----------------------|---------------------------|----------|
| マイコバクテリウム<br>・ツベルクローシス |      | T                     | LLPLLEKVI GAGKPL          | 88       |
| マイコバクテリウム<br>・ツベルクローシス |      | T                     | AILTGGQVISEEVGL           | 89       |
| マイコバクテリウム<br>・ツベルクローシス |      | T                     | IAFNSGLEPGVVAEK           | 90       |
| マイコバクテリウム<br>・ツベルクローシス |      | T                     | ARRGLERGLNALADAVKV        | 91       |
| マイコバクテリウム<br>・ツベルクローシス |      | T                     | EKIGAEVLVKEVAKK           | 92       |
| マイコバクテリウム<br>・ツベルクローシス |      | T                     | GLKRGIEKAVEKVTETL         | 93       |
| マイコバクテリウム<br>・ツベルクローシス |      | T                     | IEDAVRNAKAAVEEG           | 94       |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV | B                     | CDIIGNTNWPSDQEPFPGYG      | 95       |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV | B                     | CIGTVPKTHQALCNETQQGHT     | 96       |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV | B                     | GNYSNQTNPPPS              | 97       |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV | B                     | TDIQALEESISALEKSLTSLSE    | 98       |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV |                       | AKLRERLKKRQQLF            | 99       |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV |                       | DSQQGWFEQWFKSPWFTTLISS    | 100      |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV |                       | QVMTITPPQAMGNLVLP         | 101      |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV |                       | DQKPPSRQSQIESRVTP         | 102      |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV |                       | RRGLDILFLQEGGLC           | 103      |
| ネコ白血病ウイルス              | FeLV |                       | QEGGLCAALEECQIGGLCAALKEEC | 104      |
| 熱帯熱マラリア原虫              |      | B                     | NANPNANPNANP              | 105      |
| サーカスボロゾイト              |      |                       | QAQGDGANAGQP              | 113      |

## 【0049】

化学ハプテン。関連化学が化学化合物をキャリアタンパク質に結合するのに使用される。典型的には、カップリングに適した官能基が化学化合物について設計される。

化合物6-0-ホスホコリンヒドロキシヘキサノエートの抗体がストレプトコッカス・ニッモニエに対して保護する。Randy T. Fischerら, J. Immunol., 154:3373-3382 (1995)を参照のこと。

## 【0050】

## 【表5】

表3

化学ハプテン

10

20

30

40

|                            |                                  |
|----------------------------|----------------------------------|
| 化学ハプテン                     | 引用文献                             |
| ピペリジンN-オキサイド               | 米国特許第5,304,252号                  |
| ホスホラクトン又はラクタミド             | 米国特許第5,248,611号                  |
| 金属イオン錯体                    | 米国特許第5,236,825号                  |
| [2.2.1] 又は [7.2.2] 二環式環化合物 | 米国特許第5,208,152号                  |
| イオン荷電されたヒドロキシル含有化合物        | 米国特許第5,187,086号                  |
| カルボキシレートエステルのホスホネート類縁体     | 米国特許第5,126,258号                  |
| コカイン類縁体                    | Carrera ら, Nature 378:725 (1995) |

10

20

## 【0051】

炭水化物ハプテン。キャリアタンパク質を多糖に結合するのに当業界で知られている多くの方法がある。アルデヒド基がオリゴ糖又は比較的小さい多糖の還元末端〔Anderson, Infect. Immun., 39:233-238 (1983); Jenningsら, J. Immunol., 127:1011-1018 (1981); Porenら, Mol. Immunol., 22:907-919 (1985)〕又は末端〔Andersonら, J. Immunol., 137:1181-1186 (1986); Beuveryら, Dev. Bio. Scand., 65:197-204 (1986)〕で生成でき、これらが還元アミン化によりキャリアタンパク質に結合し得る。

30

大きい多糖は末端活性化〔Andersonら, J. Immunol., 137:1181-1186 (1986)〕又は多糖鎖に沿った幾つかの官能基のランダム活性化〔Chuら, Infect. Immun., 40:245-256 (1983); Gordonの米国特許第4,619,828号(1986); Marburgの米国特許第4,882,317号(1989)〕により結合し得る。多糖鎖に沿った幾つかの官能基のランダム活性化は多糖鎖に沿ったランダム結合のために高度に架橋されているコンジュゲートをもたらし得る。多糖対キャリアタンパク質の最適の比は使用される特別な多糖、キャリアタンパク質、及びコンジュゲートに依存する。キャリアタンパク質へのサッカリドの結合の方法の詳細な総説についてDickら, Contributions to Microbiology and Immunology, 10巻, Cruseら編集, (S. Karger: 1989), 48-114頁; Jenningsら, Neoglycoconjugates: Preparation and Applications, Leeら編集, (Academic Press: 1994), 325-371頁; Aplinら, CRC Crit. Rev. Biochem., 10:259-306 (1981); 及びStowellら, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 37:225-281 (1980)を参照のこと。

40

## 【0052】

炭水化物それ自体は当業界で知られている方法、例えば、Witteら, J. Am. Chem. Soc., 119:2114-2118 (1997)により記載されているような酵素糖タンパク質合成により合成し得る。

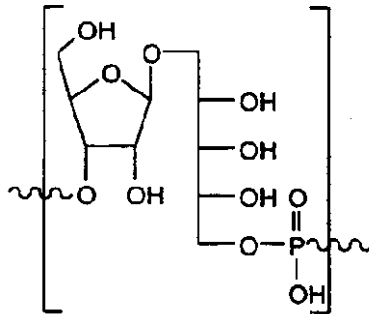
幾つかの合成及び半合成、並びに天然のオリゴ糖が本発明の戦略的修飾されたコアタンパク質コンジュゲートをつくるのに使用されることが意図されているハプテンであるオリゴ糖の例として以下の節に説明される。

50

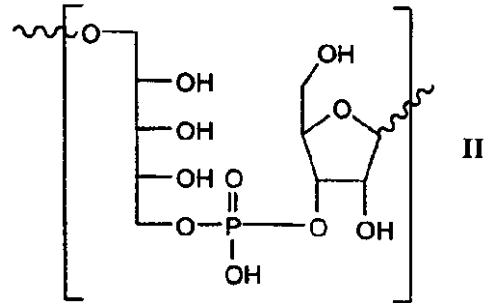
ヘモフィルス・インフルエンザ型b (Hib)の治療用のワクチンを調製するのに適したオリゴ糖ハプテンはD-リボース-D-リビトール-ホスフェート（下記のI）、D-リビトール-ホスフェート-D-リボース（下記のII）、又はホスフェート-D-リボース-D-リビトール（下記のIII）の2～20リピートから構成される。Eduard C. Beuveryら、EP-0276516-B1を参照のこと。

【0053】

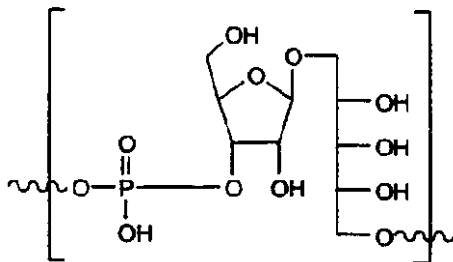
【化1】



I



II



III

【0054】

また、米国特許第4,220,717号はヘモフィルス・インフルエンザ型b用のポリリボシルリビトールホスフェート (PRP)を開示している。

Ellena M. Petersonら、Infection and Immunity, 66(8):3848-3855 (1998)はクラミジア・ニューモニエからの保護を与える三糖ハプテン、 $\alpha$  Kdo(2 8)  $\alpha$  Kdo(2 4)  $\alpha$  Kdoを開示している。クラミジア・ニューモニエは咽頭炎から致死性肺炎までの範囲のヒト呼吸感染症の原因である。Kdoは3-デオキシ-D-マンノ-オクト-2-ウロソ酸である。

Bengt AnderssonらのEP-0126043-A1はストレプトコッカス・ニューモニエにより引き起こされる細菌感染症の治療、予防又は診断に使用し得るサッカリドを開示している。有益なサッカリドの一つのクラスは二糖GlcNAc  $\beta$  1 3Galから誘導される。また、Anderssonらはネオラクトテトラオシルセラミドが有益であることを見出し、これはGal  $\beta$  1 4GlcNAc  $\beta$  1 3Gal  $\beta$  1 4Glc-Cerである。

欧州特許第0157899-B1（その開示が参考として本明細書に含まれる）は本発明に有益である肺炎球菌多糖の単離を開示している。下記の表は本発明においてハプテンとして有益なきょう膜多糖を生じる肺炎球菌培養型をリストする。

【0055】

【表6】

表4

多糖ハプテン源

10

20

30

40

| デンマーク式<br>命名法 | 米国<br>命名法 | 1978ATCC カタログ番号 |
|---------------|-----------|-----------------|
| 1             | 1         | 6301            |
| 2             | 2         | 6302            |
| 3             | 3         | 6303            |
| 4             | 4         | 6304            |
| 5             | 5         |                 |
| 6A            | 6         | 6306            |
| 6B            | 26        | 6326            |
| 7F            | 51        | 10351           |
| 8             | 8         | 6308            |
| 9N            | 9         | 6309            |
| 9V            | 68        |                 |
| 10A           | 34        |                 |
| 11A           | 43        |                 |
| 12F           | 12        | 6312            |
| 14            | 14        | 6314            |
| 15B           | 54        |                 |
| 17F           | 17        |                 |
| 18C           | 56        | 10356           |
| 19A           | 57        |                 |
| 19F           | 19        | 6319            |
| 20            | 20        | 6320            |
| 22F           | 22        |                 |
| 23F           | 23        | 6323            |
| 25            | 25        | 6325            |
| 33F           | 70        |                 |

10

20

30

40

## 【0056】

モラクセラ（ブランハメラ）・カタラーリスは幼児の中耳炎及び副鼻腔炎並びに成人の下部呼吸道感染症の知られている原因である。その細菌のリポオリゴ糖表面抗原(LOS)の脂質A部分は3-デオキシ-D-マンノ-オクツロソン酸-グルコサミン結合の位置で開裂される。開裂生成物が温和なアルカリで処理されてエステル結合脂肪酸を除去するとともにアミド結合脂肪酸を保存してM.カタラーリスから解毒されたりポ多糖(dLOS)を生じる。dLOSはそれがタンパク質キャリアに結合されるまで免疫原性ではない。Xin-Xing Guら, Infection and Immunity 66(5):1891-1897 (1998)を参照のこと。

グループBストレプトコッカス(GBS)はヒトの敗血症、髄膜炎、及び関連神経障害の原因である。きょう膜多糖特異性抗体がヒト乳児を感染症から保護することが知られている。

50

Jenningsらの米国特許第5,795,580号を参照のこと。GBSきょう膜多糖型IIの反復単位は4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 3)-〔 $\beta$ -D-Galp(1 6)〕- $\beta$ -D-Galp(1 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1 3)- $\beta$ -D-Glcp-(1 2)-〔 $\alpha$ -D-NeupNAc(2 3)〕- $\beta$ -D-galp-(1であり、この場合、括弧部分は直後の括弧されていないサブユニットに連結された分岐である。GBSきょう膜多糖型Vの反復単位は4)-〔 $\alpha$ -D-NeupNAc-(2 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc-(1 6)〕- $\alpha$ -D-Glcp-(1 4)-〔 $\beta$ -D-Glcp-(1 3)〕- $\beta$ -D-Galp-(1 4)- $\beta$ -D-Glcp-(1である。

Helmut Brade博士の欧州特許出願第EU-0641568-A1号はクラミジア・トラコマチス、ニューモニエ及びシッタシからラダー状バンディングパターン抗原を得る方法を開示している。

【0057】

#### D. 修飾HBcへの病原体関連コンジュゲート

10

本発明の一実施態様において、戦略的修飾されたHBcタンパク質に結合されるハプテンは病原体のB細胞決定基である。多数の病原体のB細胞決定基が当業界で知られており、幾つかがポリペプチド及び炭水化物ハプテンの先の説明に示された。

好ましい実施態様において、ハプテンは病原体関連ハプテンである。ハプテンとしての病原体のタンパク質配列又は炭水化物配列の一部の使用は実際の病原体への暴露、及び更には病原体の受動され、又は“死滅された”別型とは異なる利点を有する。

特に重要な例示の病原体関連ハプテンは細菌、例えば、B.ペルツシス、S.チボサ、S.パラチフォイドA及びB、C.ジフテリエ、C.テタニ、C.ボツリナム、C.ペルフリゲンス、B.アントラシス、P.ペスチス、P.ムルトシダ、V.コレラ、N.メニンギチデス、N.ゴノーレア、H.インフルエンゼ、T.パラジウム等から誘導される。

20

【0058】

特に重要な病原体関連ハプテンのその他の源はウイルス、例えば、ポリオウイルス、アデノウイルス、パラインフルエンザウイルス、はしか、おたふくかぜ、RSウイルス、インフルエンザウイルス、ウマ脳脊髄炎ウイルス、豚コレラウイルス、ニューカッスルウイルス、鶏痘ウイルス、狂犬病ウイルス、ネコ及びイヌのジステンバーウイルス、口蹄疫ウイルス(FMDV)、ヒト及びサル免疫不全ウイルス等である。病原体関連ハプテンのその他の重要な源として、リケッチア、発疹チフス及び発疹熱、斑点熱グループ等が挙げられる。

病原体関連ポリペプチドハプテンは当業界で公知であり、多数の開示、例えば、米国特許第3,149,036号、同第3,983,228号及び同第4,069,313号；Essential Immunology, 第3編, Roit著, Blackwell Scientific Publicationsにより発行；Fundamentals of Clinical Immunology, Alexander及びGood著, W.B. Saundersにより発行；並びにImmunology, Bellanti著, W.B. Saundersにより発行に説明されている。

30

【0059】

特に好ましい病原体関連ハプテンは米国特許第4,625,015号、同第4,544,500号、同第4,545,931号、同第4,663,436号、同第4,631,191号、同第4,629,783号並びに特許協力条約国際公開W087/02775及びW087/02892に記載されたものであり、これらの開示の全てが参考として本明細書に含まれる。

B型肝炎ウイルスと免疫反応する抗体はHBsAgの決定基部分の配列、特にGerinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2365 (1983)に開示された“S”（表面）領域の残基110-137に相当するポリペプチドハプテンと結合された修飾HBcを使用することにより得られる。別のコンジュゲートはDelpeyrouxら, Science, 233:472-475 (1986)による研究と同様のポリオウイルス型1 (PV1、マホニイ株)のキャプシドタンパク質VPIのアミノ酸93-103に相当する。このような修飾HBcコンジュゲートはポリオと免疫反応する抗体を与える。ポリオウイルス型1、マホニイ株及びサビン株からのその他の潜在的なハプテンが欧州特許第385610号に記載されている。

40

【0060】

好ましい実施態様において、ハプテンは病原体により誘発された抗体と免疫反応し、即ち、抗体により免疫学的に結合される病原体関連ハプテンである。病原体関連ハプテンは病原体による感染に対する保護を与える抗体応答を誘発することが更に好ましい。

免疫された動物からの生体サンプル中の免疫原の抗体の存在の測定方法は当業界で公知で

50

ある。交差反応性抗体及び保護抗体の両方の存在の測定方法は当業界で公知である。本発明の別の実施態様において、B細胞決定基に対する免疫応答はまたT細胞決定基を与えることにより促進される。

例えば、米国特許第4,882,145号はHBVヌクレオキャプシドタンパク質から誘導されたT細胞刺激ポリペプチドを記載している。その他のT細胞決定基が当業界で公知であり、意図される修飾HBcタンパク質又は粒子中で機能し得る形で連結された決定基として使用し得る。

#### 【0061】

本発明の特に好ましい実施態様において、このようなT細胞決定基は修飾HBcに結合されるB細胞決定基と同じ病原体から誘導される。種々の病原体のT細胞決定基が当業界で報告されている。

10

B細胞決定基及びT細胞決定基は同じ病原体から誘導されることが好ましいが、それらはその病原体の同じタンパク質からのものであることは必要ではない。例えば、口蹄疫ウイルス(FMDV)のVP1タンパク質からのB細胞決定基が修飾HBc粒子に結合され、そのHBcタンパク質はFMDVのVP4タンパク質から誘導されたT細胞決定基を有することにより更に修飾される。

付加的なT細胞決定基が化学反応性アミノ酸残基を導入するために挿入されるDNAの一部として、好ましくはカルボキシ末端で融合タンパク質としてを含む、HBcタンパク質配列の末端（アミノ末端又はカルボキシ末端）内又は末端で公知の方法を使用して遺伝子レベルで修飾HBcタンパク質に導入し得る。また、付加的なT細胞決定基は複合B細胞決定基又は戦略的修飾されたHBcタンパク質に機能し得る形で連結し得る。

20

本発明の融合タンパク質を生成するのに使用し得るDNA配列を遺伝子操作する技術を記載する例示の開示がGalibertらの米国特許第4,428,941号、Cohenらの米国特許第4,237,224号、Manisの米国特許第4,273,875号、Riggsの米国特許第4,431,739号、Goodmanらの米国特許第4,363,877号、並びにRodriguez & Tait, Recombinant DNA Techniques: An Introduction, The Benjamin-Cummings Publishing Co., Inc. Menlo Park, Calif. (1983)に見られ、これらの開示が参考として含まれる。

#### 【0062】

##### E. 接種物及びワクチン

本発明の更に別の実施態様において、ハプテンに結合された修飾HBcタンパク質又は粒子(HBcコンジュゲート)は、ハプテンと免疫反応する抗体の産生を誘導する接種物の免疫原として、又はハプテンが誘導される病原体に対する保護を与えるためのワクチンとして使用される。

30

意図される接種物又はワクチンは典型的にはまた水を含む医薬上許される希釈剤組成物に溶解又は分散されているHBcAgコンジュゲートを含む。免疫原有効量で動物、例えば、哺乳類（例えば、マウス、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシ、サル、類人猿、又はヒト）又は鳥類（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル又はガチョウ）に投与された場合、接種物が複合（ペンダント結合）ハプテンと免疫反応する抗体を誘発する。ワクチンはハプテンが病原体関連であり、誘発された抗体がハプテンと免疫反応するだけでなく、病原体又は疾患細胞と免疫反応し、それらが免疫反応する病原体又は疾患細胞を中和する接種物の型である。

40

#### 【0063】

活性成分としてタンパク質物質を含む接種物及びワクチンの調製がまた当業界で良く理解されている。典型的には、このような接種物又はワクチンは液体溶液又は懸濁液として非経口物として調製される。また、注射の前に液体中の溶解又は懸濁に適した固体形態が調製し得る。また、製剤は乳化し得る。免疫原活性成分は医薬上許され、活性成分と適合性である賦形剤とししばしば混合される。好適な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、等及びこれらの組み合わせである。加えて、所望により、接種物又はワクチンは少量の補助物質、例えば、湿潤剤もしくは乳化剤、pH緩衝剤又は組成物の免疫原有効性を増進するアジュバントを含んでもよい。

50

例示のアジュバントとして、ヒトに使用されない完全フロイントアジュバント(CFA)、不完全フロイントアジュバント(IFA)及びミョウバンが挙げられ、これらは当業界で公知の物質であり、幾つかの源から市販されている。小分子アジュバントの使用がまたここに意図されている。

#### 【0064】

小分子アジュバントの例示の一つのグループは米国特許第4,767,842号に記載された所謂ムラミルジペプチド類縁体である。ここにまた有益である米国特許第4,787,482号に記載された別の型の小分子アジュバントはスクアレン又はスクアランとアラセル<sup>TM</sup>A(マンニドモノオレエート)の4:1混合物(容積基準)である。

ここに有益な更に別の型の小分子アジュバントは米国特許第4,539,205号、同第4,643,992号、同第5,011,828号及び同第5,093,318号(これらの開示が参考として含まれる)に記載された7-置換-8-オキソ又は8-スルホ-グアノシン誘導体である。これらの物質のうち、7-アリル-8-オキソグアノシン(ロキソリビン)が特に好ましい。その分子は抗原(免疫原)特異的応答を誘導するのに特に有効であることが示されていた。

#### 【0065】

接種物及びワクチンは通常注射、例えば、皮下注射又は筋肉内注射により非経口投与される。投与のその他の様式に適している付加的な製剤として、座薬及び或る場合には経口製剤が挙げられ、又は鼻内スプレーによる。座薬について、従来のバインダー及びキャリアとして、例えば、ポリアルカレングリコール又はトリグリセリドが挙げられる。このような座薬は0.5%~10%、好ましくは1-2%の範囲の活性成分を含む混合物から形成されてもよい。経口製剤はこのような通常使用される賦形剤、例えば、医薬銘柄のマンニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、ナトリウムサッカリン、セルロース、炭酸マグネシウム等を含む。

接種物又はワクチン組成物は溶液、懸濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤又は粉末の形態をとり、活性成分として免疫原量の戦略的修飾されたHBcタンパク質コンジュゲート又は戦略的修飾されたHBcタンパク質粒子コンジュゲートを含む。典型的な組成物において、免疫原量の戦略的修飾されたHBcタンパク質コンジュゲート又は戦略的修飾されたHBcタンパク質粒子コンジュゲートは投薬量当り約50 µg~約2mg、更に好ましくは投薬量当り約100 µg~約1mgの活性成分である。

#### 【0066】

粒子及びタンパク質コンジュゲートは中性形態又は塩形態としてワクチンに製剤化し得る。医薬上許される塩として、酸付加塩(ペプチドの遊離アミノ基により生成される)が挙げられ、これらは無機酸、例えば、塩酸もしくはリン酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等の如き有機酸により生成される。遊離カルボキシル基により生成される塩はまた無機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、もしくは水酸化第二鉄、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等の如き有機塩基から誘導されてもよい。

#### 【0067】

接種物又はワクチンは投薬製剤と適合性の様式、かつ治療有効であり、免疫原性であるような量で投与される。投与される量は治療される被験者、抗体を合成する被験者の免疫系の能力、及び所望される保護の程度に依存する。投与されるのに必要とされる活性成分の正確な量は医師の判断に依存し、夫々の個体に特別である。しかしながら、好適な投薬量範囲は個体当り数百マイクログラムのオーダーの活性成分である。初期投与及びブースターショットに適したレジメはまた可変であるが、初期投与、続いて或る間隔(数週又は数ヶ月)のその後の注射又はその他の投与により代表される。

本発明の別の実施態様は動物宿主に接種物を接種する工程を含む動物宿主中の抗体の誘導方法である。その方法に使用される接種物は医薬上許される希釈剤中に溶解又は分散された免疫原量の戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートを含む。その方法に使用される戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質コンジュゲートは戦略的修飾され

たB型肝炎コアタンパク質にペンダント結合されたハプテンを含む。戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質は粒子形態であることが好ましい。戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質は約10～約140の番号を付されたアミノ酸を含み、更に約50～約100の番号を付されたアミノ酸残基に相当する領域にインサートを有する配列番号2のB型肝炎コアタンパク質アミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含み、前記インサートは(i)長さ1～約40アミノ酸残基であり、かつ(ii)化学反応性アミノ酸残基を含む。ハプテンは前記化学反応性アミノ酸残基を介して戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質にペンダント結合される。ハプテンは病原体関連であることが好ましい。動物は抗体が誘導されるのに十分な時間にわたって維持される。

本発明が下記の非限定実施例により説明される。

10

#### 【0068】

(実施例)

##### 実施例1：修飾B型肝炎コアタンパク質発現ベクターの構築

部位誘導突然変異誘発を使用して、戦略的修飾されたハイブリッドHBc粒子を生成するためのその他のコドンの遺伝子挿入を促進するためのEcoRI (GAATTC)及びSacI (GAGCTC)制限エンドヌクレアーゼ部位とともに、リシンコドン(TTT)をHBc遺伝子のアミノ酸D78とP79の間に導入した。こうしてインサートはアミノ酸残基配列GIQKELを有し、GIQはEcoRI部位の人工物であり、ELはSacI部位の人工物である。それ故、戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質は長さ155アミノ酸残基であった。PKK322-HBc155-K81発現プラスミドの構築が以下に記載される。

20

オリゴヌクレオチドプライマーP1F(配列番号17)及びP1R(配列番号18、相補ストランド)を使用してHBc遺伝子の5'末端(塩基1-234、アミノ酸1-78)を増幅し、同時に5'末端にNcoI制限部位(CCATGG)、増幅産物の3'末端にEcoRI制限部位(GAATTC)をとり込んだ。オリゴヌクレオチドプライマー(配列番号19)P2F及びP2R(配列番号20、相補ストランド)を使用してHBc遺伝子の3'末端(塩基232-450、アミノ酸79-149)を増幅し、同時に5'末端にEcoRI制限部位(GAATTC)、それに隣接してSacI制限部位(GAGCTC)、それらの間に挿入されたリシンコドン(AAA)、及び増幅産物の3'末端にHindIII制限部位(AAGCTT)をとり込んだ。

#### 【0069】

二つのPCR産物(アミノ酸1-78及びアミノ酸79-149をコードする)をEcoRIで開裂し、それらの共通のEcoRIオーバーハングで一緒につなぎ、NcoI及びHindIIIで開裂し、通常の技術を使用して発現プラスミドpKK332(ファーマシア)にクローン化した。得られるプラスミドをpKK332-HBc-K81と称した。このプラスミドは免疫優性ループ中にリシンを有する戦略的修飾されたHBcタンパク質の発現に使用し得る。発現された戦略的修飾されたHBcタンパク質は自然に粒子を形成した。こうしてこの実施例の戦略的修飾されたHBcは配列番号2のHBcの位置78に相当するインサート、配列番号2のHBcの位置82に相当する位置に化学反応性リシン残基を有し、配列番号2のHBcの位置149に相当する位置でランケートされた。

30

#### 【0070】

##### 実施例2：修飾B型肝炎コア粒子精製

実施例1の戦略的修飾されたHBc粒子をE. coli、典型的にはノバゲン(マジソン、ウィスコンシン)からのE. coli BLRもしくはBL21又はアメーシャム(アーリントン・ハイツ、イリノイ)からのE. coli TB11中で発現した。HBc155-K81と称されるトランスフェクトされたE. coliは発現されたプラスミドpKK332-HBc155-K81であった。戦略的修飾されたHBcを、確立された操作を使用してセファロースCL-4Bクロマトグラフィーにより精製した。粒子が予測可能な様式で精製するので、プール前に個々のフラクションの純度を評価するSDS-PAGE分析と協力しての、簡単な分光測光法(OD<sub>280</sub>)を使用する粒子溶離の監視が高収率(5-120mg/L細胞培養液)の電気泳動上純粋な粒子のルーチン精製を可能にするのに充分であった。純粋な戦略的修飾されたB型肝炎コア粒子の球形構造が電子顕微鏡写真で明らかに目視できた。

40

#### 【0071】

50

### 実施例 3：合成ペプチドと修飾 B 型肝炎コア粒子の化学カップリング

実施例 1 からの発現プラスミド pKK332-HBc155-K81 の戦略的修飾された B 型肝炎コア粒子生成物を同様に発現され、精製された“野生型”トランケート B 型肝炎コア粒子 HBc149（これはそれが導入されたリシン残基及び隣接する 5 アミノ酸を欠如する以外は HBc155-K81 と同じである）と比較してその化学反応性について評価した。

合成ペプチド（ハプテン）を水溶性のヘテロ 2 官能架橋試薬であるスクシンイミジル 4-（N-マレイミド-メチル）シクロヘキサン 1-カルボキシレート（SMCC）を使用して HBc 粒子に化学結合した。SMCC はスルフヒドリル基及び一級アミノ基の両方に対し反応性であり、一級アミノ基が既に SMCC で修飾された HBc 粒子への合成ペプチドの逐次結合を可能にする。更に、SMCC により与えられた 11.6 Å のスペーサーアームはハプテンと HBc キャリヤーの間の立体障害を低減することを助け、それにより更に高いカップリング効率を可能にする。

簡単に言えば、HBc-K81 粒子及び HBc149 粒子を 50mM リン酸ナトリウム、pH 7.5 中で室温で 2 時間にわたって全アミノ基（天然アミノ基または天然アミノ基＋インサートのリシン残基からのアミノ基）に対して 3 倍過剰の SMCC と別々に反応させてマレイミド活性化 HBc 粒子を形成した。未反応の SMCC を 50mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 に対する反復透析により除去した。HBc 粒子の SMCC 誘導体化は SDS-PAGE により検出できない最小の分子量増加をもたらした。しかしながら、その PAGE 分析はペプチド結合工程に進む前に HBc タンパク質の保全性を確認した。

#### 【0072】

HBc 粒子に結合される合成ペプチドを、それらが N 末端システイン残基を有してハプテンのシステインスルフヒドリルによる導入されたリシン残基の側鎖の一級アミンへのペプチドハプテンの方向性結合を可能にするように設計した。

表 2 は Hbc 粒子に化学結合されたヒトシトクロム P450 酵素から誘導された合成ペプチドを示す。合成ペプチドを 10mg/ml の濃度まで 50mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 に溶解した。次いで合成ペプチドをマレイミド活性化戦略的修飾された HBc155-K81 粒子中の全アミノ基に対し 5 倍過剰で滴下して添加し、室温で 2 時間反応させた。マレイミド活性化 HBc149 粒子を対照として 2 種の 2D6 ペプチド（206 及び 206-C）と反応させた。

#### 【0073】

#### 【表 7】

表 5

シトクロム P-450 ハプテン

10

20

30

| ペプチド名称        | 配列                     | 配列番号 |
|---------------|------------------------|------|
| 1A1 (289-302) | CQEKQLDENANVOL         | 21   |
| 1A2 (291-302) | CSKKGPRASGNLI          | 22   |
| 2D6 (263-277) | CLTEHRMTWDPAQPPRDLT    | 23   |
| 3A4 (253-273) | CVKRMKESRLEDTQKHRVDFLQ | 24   |
| 1A1-c         | CMQLRS                 | 106  |
| 1A2-c         | CRFSIN                 | 107  |
| 2D6-c         | CAVPR                  | 108  |
| 2E1-c         | CIPRS                  | 109  |
| 2C-c          | CFIPV                  | 110  |
| 3A3/4/7-c     | CTVSGA                 | 111  |
| 3A5-c         | CTLSGE                 | 112  |

10

20

## 【0074】

## 実施例4：修飾コア粒子コンジュゲートの分析

実施例3のシトクロムP-450決定基ハプテンにペンダント結合された戦略的修飾されたHBc粒子をSDS-PAGE及びイムノブロットにより分析して、合成ペプチドが成功裏にHBcに結合されたかどうかを測定した。電気泳動の変性条件は粒子をそれらの構成サブユニット、HBcモノマーに分解する。HBcモノマーは約16,000 Daの分子量を有するので、1A1 (289-302) ペプチド、1A2 (291-302) ペプチド、2D6 (263-277) ペプチド又は3A4 (253-273) ペプチドに化学結合されたHBc155-K81粒子を分解することは簡単であった。何とならば、これらのペプチドが約2,000 Daの相対分子量を有し、それ故、HBcタンパク質モノマーの分子量の見られる増大を生じるからである。SDS-PAGEに関する複合バンド及び非複合バンドの相対強さから、HBc-K81モノマーの約50%がハプテンに機能し得る形で連結され、一方、“野生型” HBc粒子のわずかに5%がハプテンに結合されたことが明らかであった。戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質にハプテンをペンダント結合する際に観察された成功の著しい増大は、観察された結合が“野生型”中にまた存在するリシン残基とは反対に挿入されたリシンにより起こるという結論を支持する。

30

## 【0075】

短いC末端P450誘導ペプチド（5量体及び6量体）に結合されたHBc粒子の移動度のシフトはSDS-PAGEでは長い抑制性ペプチドのそれ程顕著ではないが、約700 Daのシフトが成功裏に結合されたHBc155-K81モノマーで明らかであった。戦略的修飾されたHBc155-K81タンパク質は“野生型” HBc149粒子（これは最小の結合を示した）よりもハプテンにペンダント結合する著しく増進された能力を示した。

40

180又は240会合コアタンパク質モノマーの正二十面体粒子のConwayらにより提出されたコア粒子のモデル〔Nature, 386:91-94 (1997)〕では、コアモノマーの比較的露出された免疫優性ループ領域のダイマーがメースのスパイクのように集合コア粒子から溶液に延びている。“スパイク”はHBc粒子に空間上接近して配置される。スパイクの先端における導入されたリシン残基の戦略的配置がハプテンを集合コア粒子に結合する反応に対する立体的な束縛の傾向を最小にする。戦略的修飾されたHBcモノマーの最小50%がCyt P-450の合成ペプチドに成功裏に結合された。ペンダント結合のその量はコア粒子スパイク当りに結

50

合された平均一つのハプテンに相当する。戦略的修飾されたHBc粒子へのハプテン結合のこの提案された分布が、粒子を分解するとともにダイマー会合を維持する半変性条件下のPAGE結果により支持される。

ペプチドカップリングにより調製されたHBc-2D6粒子を、イムノブロットを使用して試験して2D6エピトープの提示を確認した。抗HBc抗血清で探査した場合、化学結合された粒子は2D6ペプチドを含み、また含まない粒子に相当する2種の異なるモノマーを生じた。そのうちの上部バンドのみが抗2D6抗血清とブロットし、それにより移動度シフトと2D6ペプチドの結合の間の相関関係を確認した。

【0076】

#### 実施例6：戦略的リシン挿入

免疫優性の表面露出ループ領域（アミノ酸75-85）の夫々の位置に挿入されたリシン残基を有するHBc粒子を構築するために、PCRを使用してHBc遺伝子の5'フラグメント及び3'フラグメントを増幅し、単一リシンコドンオリゴヌクレオチドプライマーにより導入した。オリゴヌクレオチドプライマー及び得られるアミノ酸配列を配列番号61-82に示す。“野生型”配列は配列番号59-60である。位置75-84（HBc-K75～HBc-K84）にリシンインサートを生じるために、PCRフラグメントの対を制限エンドヌクレアーゼMseI（これは配列AATTを認識する）で消化した。オリゴヌクレオチドプライマー（リシンを含む）をヌクレオチド221-224に配置された好都合のMseI制限部位でつなぐことにより、修飾された遺伝子を修復した。HBc-K85（配列番号85-86）について、野生型遺伝子中に存在しないが、アミノ酸を変化しないで位置239-244に導入し得る共通のXhoI制限部位（CTCGAG）でつながれた二つのフラグメントを生じることが必要であった。

【0077】

【表8】

表6

免疫優性ループ中のHBcのリシン挿入変異体

10

20

| 名称      | 配列                                                                 | 配列番号 |
|---------|--------------------------------------------------------------------|------|
| 野生型 HBc | TWVGVNLEDPASRDLVVSYV                                               | 60   |
| K75     | TWVG <u>V</u> KNLEDPASRDLVVSYV                                     | 62   |
| K76     | TWVG <u>V</u> NKLEDPASRDLVVSYV                                     | 64   |
| K77     | TWVG <u>V</u> NL <u>K</u> EDPASRDLVVSYV                            | 66   |
| K78     | TWVG <u>V</u> NLE <u>K</u> DPASRDLVVSYV                            | 68   |
| K79     | TWVG <u>V</u> NLED <u>K</u> PASRDLVVSYV                            | 70   |
| K80     | TWVG <u>V</u> NLED <u>P</u> KASRDLVVSYV                            | 72   |
| K81     | TWVG <u>V</u> NLED <u>P</u> A <u>K</u> SRDLVVSYV                   | 74   |
| K82     | TWVG <u>V</u> NLED <u>P</u> A <u>S</u> KRDLVVSYV                   | 76   |
| K83     | TWVG <u>V</u> NLED <u>P</u> A <u>S</u> R <u>K</u> DLVVSYV          | 78   |
| K84     | TWVG <u>V</u> NLED <u>P</u> A <u>S</u> R <u>D</u> <u>K</u> LVVSYV  | 80   |
| K85     | TWVG <u>V</u> NLED <u>P</u> A <u>S</u> R <u>D</u> L <u>K</u> VVSYV | 82   |

10

20

## 【0078】

戦略的修飾されたHBcタンパク質を精製するために、1L発酵からの浄化された細胞溶解産物を45%の硫酸アンモニウムで沈殿させ、セファロースCL-4Bクロマトグラフィー(2.5cm x 100cm)を使用して得られるペレットをゲル濾過にかけた。粒状HBcはこの型のカラムを

30

使用して分析した場合に特徴的な溶離位置を有し、これは粒子になされたアミノ酸挿入とは独立であった。この研究のために生成された11の戦略的修飾されたHBc粒子をこの操作を使用して分析し、溶離プロファイルを280nmの吸光度で分光測光した。

構築物の3種(HBc-K75、HBc-K77、及びHBc-K79)を50~100 mg/Lのレベルで生成し、これは野生型の未修飾HBc粒子、例えば、HBc149粒子に典型的な収率に匹敵する。構築物の4種(HBc-K76、HBc-K78、HBc-K81、及びHBc-K82)を1~20 mg/Lの比較的低いレベルで生成した。最後に、粒子の4種(HBc-K80、HBc-K83、HBc-K84、及びHBc-K85)をかりょうじて検出できると考えられるレベル(<1 mg/L)で生成した。

## 【0079】

## 【表9】

40

表7

1L発酵からの精製されたリシン含有HBc粒子の収量

| 粒子           | 収量(mg/L) |
|--------------|----------|
| HBc-150(K75) | 77       |
| HBc-150(K76) | 5        |
| HBc-150(K77) | 74       |
| HBc-150(K78) | 10       |
| HBc-150(K79) | 94       |
| HBc-150(K80) | 0        |
| HBc-150(K81) | 17       |
| HBc-150(K82) | 1        |
| HBc-150(K83) | 0        |
| HBc-150(K84) | 0        |
| HBc-150(K85) | 0        |

10

20

**【 0 0 8 0 】**

特別な実施態様及び実施例を含む、本発明の以上の記載は本発明の例示であることが意図され、限定と解されるべきではない。多数のその他の変化及び改良が本発明の真の精神及び範囲から逸脱しないで行い得る。

## SEQUENCE LISTING

⟨110⟩ Birkett, Ashley J.

10

⟨120⟩ Strategically Modified Hepatitis B Core Proteins and  
their Derivatives

20

⟨130⟩ SYN-101 4564/69529

⟨140⟩ PCT/US99/

⟨141⟩ 1999-02-11

30

⟨150⟩ 60/074537

⟨151⟩ 1998-02-12

40

〈160〉 113

〈170〉 PatentIn Ver. 2.0

10

〈210〉 1

〈211〉 553

〈212〉 DNA

〈213〉 Hepatitis B virus

20

〈220〉

〈221〉 CDS

30

〈222〉 (1)..(549)

〈300〉

〈303〉 Nature

40

〈304〉 281

〈306〉 646-

〈307〉 1979

10

〈400〉 1

atg gac atc gac cct tat aaa gaa ttt gga gct act gtg gag tta ctc 48

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu

20

1

5

10

15

tcg ttt ttg cct tct gac ttc ttt cct tca gta cga gat ctt cta gat 96

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp

30

20

25

30

acc gcc tca gct ctg tat cgg gaa gcc tta gag tct cct gag cat tgt 144

40

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35

40

45

tca cct cac cat act gca ctc agg caa gca att ctt tgc tgg ggg gaa 192

10

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50

55

60

cta atg act cta gct acc tgg gtg ggt gtt aat ttg gaa gat cca gcg 240

20

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala

65

70

75

80

30

tct aga gac cta gta gtc agt tat gtc aac act aat atg ggc cta aag 288

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys

85

90

95

40

ttc agg caa ctc ttg tgg ttt cac att tct tgt ctc act ttt gga aga 336

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

100

105

110

10

gaa aca gtt ata gag tat ttg gtg tct ttc gga gtg tgg att cgc act 384

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115

120

125

20

cct cca gct tat aga cca cca aat gcc cct atc cta tca aca ctt ccg 432

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

130

135

140

30

gag act act gtt gtt aga cga cga ggc agg tcc cct aga aga aga act 480

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr

40

145

150

155

160

ccc tcg cct cgc aga cga agg tct caa tcg ccg cgt cgc aga aga tct 528

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser

10

165

170

175

caa tct cgg gaa tct caa tgt tagt 553

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

20

180

<210> 2

30

<211> 183

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

40

<400> 2

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu

1

5

10

15

10

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp

20

25

30

20

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35

40

45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

30

50

55

60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala

40

65

70

75

80

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys

85

90

95

10

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

100

105

110

20

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115

120

125

30

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

130

135

140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr

40

145

150

155

160

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser

165

170

175

10

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

180

20

<210> 3

<211> 552

<212> DNA

30

<213> Hepatitis B virus

<220>

40

<221> CDS

<222> (1)..(549)

<300>

10

<303> Nucleic Acids Res.

<304> 11

<306> 1747-

<307> 1983

20

<400> 3

atg gac att gac ccg tat aaa gaa ttt gga gca tct gtg gag tta ctc 48

30

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu

1

5

10

15

tct ttt ttg cct tct gac ttc ttt ccg tct att cga gat ctc ctt gac 96

40

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp

20

25

30

acc gcc tct gct ctg tat cgg gag gcc tta gag tct ccg gaa cat tgt 144

10

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35

40

45

tca cct cac cat aca gca ctc agg caa gct att ctg tgt tgg ggt gag 192

20

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50

55

60

tta atg aat ctg gcc acc tgg gtg gga agt aat ttg gaa gac cca gca 240

30

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala

65

70

75

80

40

tcc agg gaa tta gta gtc agc tat gtc aat gtt aat atg ggc cta aaa 288

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys

85

90

95

10

atc aga caa cta ttg tgg ttt cac att tcc tgc ctt act ttt gga aga 336

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

100

105

110

20

gaa act gtt ttg gag tat ttg gta tct ttt gga gtg tgg att cgc act 384

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115

120

125

30

cct ccc gct tac aga cca cca aat gcc cct atc tta tca aca ctt ccg 432

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

40

130

135

140

gaa act act gtt gtt aga cga cga ggc agg tcc cct aga aga aga act 480

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr

10

145

150

155

160

ccc tcg cct cgc aga cga agg tct caa tcg ccg cgt cgc aga aga tct 528

20

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser

165

170

175

caa tct cgg gaa tct caa tgt tag

552

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

30

180

⟨210⟩ 4

40

⟨211⟩ 183

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

10

<400> 4

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu

1

5

10

15

20

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp

20

25

30

30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35

40

45

40

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50

55

60

Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala

65

70

75

80

10

Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys

85

90

95

20

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

100

105

110

30

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115

120

125

40

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

130

135

140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr

10

145

150

155

160

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser

165

170

175

20

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

180

30

<210> 5

<211> 558

40

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<220>

10

<221> CDS

<222> (1)..(555)

20

<300>

<303> Nucleic Acids Res.

<304> 11

<306> 1747-

30

<307> 1983

<400> 5

40

atg gac att gac cct tat aaa gaa ttt gga gct act gtg gag tta ctc 48

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu

1

5

10

15

10

tcg ttt ttg cct tct gac ttc ttt cct tcc gta cga gat ctc cta gac 96

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp

20

25

30

20

acc gcc tca gct ctg tat cga gaa gcc tta gag tct cct gag cat tgc 144

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35

40

45

30

tca cct cac cat act gca ctc agg caa gcc att ctc tgc tgg ggg gaa 192

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50

55

60

40

ttg atg act cta gct acc tgg gtg ggt aat aat ttg caa gat cca gca 240

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Gln Asp Pro Ala

65

70

75

80

10

tcc aga gat cta gta gtc aat tat gtt aat act aac atg ggt tta aag 288

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys

20

85

90

95

atc agg caa cta ttg tgg ttt cat ata tct tgc ctt act ttt gga aga 336

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

30

100

105

110

gag act gta ctt gaa tat ttg gtc tct ttc gga gtg tgg att cgc act 384

40

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115

120

125

cct cca gcc tat aga cca cca aat gcc cct atc tta tca aca ctt ccg 432

10

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

130

135

140

gaa act act gtt gtt aga cga cgg gac cga ggc agg tcc cct aga aga 480

20

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg

145

150

155

160

30

aga act ccc tcg cct cgc aga cgc aga tct caa tcg ccg cgt cgc aga 528

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg

165

170

175

40

aga tct caa tct cgg gaa tct caa tgt tag

558

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

180

185

10

<210> 6

<211> 185

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

20

<400> 6

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu

30

1

5

10

15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp

20

25

30

40

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys

35

40

45

10

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu

50

55

60

20

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Gln Asp Pro Ala

65

70

75

80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys

30

85

90

95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

40

100

105

110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115

120

125

10

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

130

135

140

20

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg

145

150

155

160

30

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg

165

170

175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

40

180

185

⟨210⟩ 7

⟨211⟩ 188

10

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Hepatitis B virus

20

⟨300⟩

⟨301⟩ Schodel, Florian

et al.,

⟨302⟩ Animal Hepatitis B Viruses

30

⟨303⟩ Adv. Viral Oncol.

⟨304⟩ 8

⟨306⟩ 73-102

40

⟨307⟩ 1989

〈400〉 7

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu

10

1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp

20

20 25 30

Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys

30

35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu

40

50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln

65

70

75

80

Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys

10

85

90

95

Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln

20

100

105

110

His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr

115

120

125

30

Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro

130

135

140

40

Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser

145

150

155

160

10

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro

165

170

175

20

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Ala Asn Cys

180

185

<210> 8

30

<211> 654

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

40

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(651)

10

<300>

<302> Animal Hepatitis B Viruses

<303> Adv. Viral Oncol.

20

<304> 8

<306> 73-102

<307> 1989

30

<400> 8

atg tat ctt ttt cac ctg tgc ctt gtt ttt gcc tgt gtt cca tgt cct 48

Met Tyr Leu Phe His Leu Cys Leu Val Phe Ala Cys Val Pro Cys Pro

40

1

5

10

15

act gtt caa gcc tcc aag ctg tgc ctt gga tgg ctt tgg gac atg gac 96

Thr Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Asp Met Asp

10

20

25

30

ata gat ccc tat aaa gaa ttt ggt tct tct tat cag ttg ttg aat ttt 144

Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu Asn Phe

20

35

40

45

ctt cct ttg gac ttt ttt cct gat ctc aat gca ttg gtg gac act gct 192

30

Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp Thr Ala

50

55

60

gct gct ctt tat gaa gaa gaa tta aca ggt agg gag cat tgt tct cct 240

40

Ala Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys Ser Pro

65

70

75

80

cat cat act gct att aga cag gcc tta gtg tgt tgg gaa gaa tta act 288

10

His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Glu Glu Leu Thr

85

90

95

20

aga tta att aca tgg atg agt gaa aat aca aca gaa gaa gtt aga aga 336

Arg Leu Ile Thr Trp Met Ser Glu Asn Thr Thr Glu Glu Val Arg Arg

100

105

110

30

att att gtt gat cat gtc aat aat act tgg gga ctt aaa gta aga cag 384

Ile Ile Val Asp His Val Asn Asn Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln

115

120

125

40

act tta tgg ttt cat tta tca tgt ctt act ttt gga caa cac aca gtt 432

Thr Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val

130

135

140

10

caa gaa ttt ttg gtt agt ttt gga gta tgg att aga act cca gct cct 480

Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro

145

150

155

160

20

tat aga cca cct aat gca ccc att tta tca act ctt ccg gaa cat aca 528

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr

30

165

170

175

gtc att agg aga aga gga ggt tca aga gct gct agg tcc ccc cga aga 576

Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ser Arg Ala Ala Arg Ser Pro Arg Arg

40

180

185

190

cgc act ccc tct cct cgc agg aga agg tct caa tca ccg cgt cgc aga 624

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg

10

195

200

205

cgc tct caa tct cca gct tcc aac tgc tga 654

20

Arg Ser Gln Ser Pro Ala Ser Asn Cys

210

215

<210> 9

30

<211> 217

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

40

<400> 9

Met Tyr Leu Phe His Leu Cys Leu Val Phe Ala Cys Val Pro Cys Pro

1

5

10

15

10

Thr Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Asp Met Asp

20

25

30

20

Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu Asn Phe

35

40

45

30

Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp Thr Ala

50

55

60

Ala Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys Ser Pro

40

65

70

75

80

His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Glu Glu Leu Thr

85

90

95

10

Arg Leu Ile Thr Trp Met Ser Glu Asn Thr Thr Glu Glu Val Arg Arg

100

105

110

20

Ile Ile Val Asp His Val Asn Asn Thr Trp Gly Leu Lys Val Arg Gln

115

120

125

30

Thr Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln His Thr Val

130

135

140

40

Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro

145

150

155

160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu His Thr

10

165

170

175

Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ser Arg Ala Ala Arg Ser Pro Arg Arg

180

185

190

20

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg

195

200

205

30

Arg Ser Gln Ser Pro Ala Ser Asn Cys

210

215

40

<210> 10

<211> 918

<212> DNA

10

<213> Hepatitis B virus

<220>

20

<221> CDS

<222> (1)..(915)

<400> 10

30

atg tgg tct cta aga tta cac ccc tct cca ttc gga gct gcg tgc caa 48

Met Trp Ser Leu Arg Leu His Pro Ser Pro Phe Gly Ala Ala Cys Gln

1

5

10

15

40

ggt atc ttt acg tcg acc tcg ctg ttg ttc ctt gtg act gta cct ttg 96

Gly Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Leu Phe Leu Val Thr Val Pro Leu

20

25

30

10

gta tgt acc att gtt tat gat tct tgc tta tat atg gat gtc aat gct 144

Val Cys Thr Ile Val Tyr Asp Ser Cys Leu Tyr Met Asp Val Asn Ala

35

40

45

20

tca aga gct tta gca aat gta tat gat ctg cca gat gat ttc ttt cct 192

Ser Arg Ala Leu Ala Asn Val Tyr Asp Leu Pro Asp Asp Phe Phe Pro

50

55

60

30

cag att gat gat ctt gtt aga gat gct aag gat gct tta gaa cct tat 240

Gln Ile Asp Asp Leu Val Arg Asp Ala Lys Asp Ala Leu Glu Pro Tyr

40

65

70

75

80

tgg aaa gcc gaa aca ata aag aaa cat gtt tta att gct act cac ttt 288

Trp Lys Ala Glu Thr Ile Lys Lys His Val Leu Ile Ala Thr His Phe

10

85

90

95

gtg gat ttg att gag gac ttc tgg cag acc act cag ggt atg agc caa 336

20

Val Asp Leu Ile Glu Asp Phe Trp Gln Thr Thr Gln Gly Met Ser Gln

100

105

110

att gca gac gcc ctc cga gca gta att cca cct act acc gta cca gta 384

30

Ile Ala Asp Ala Leu Arg Ala Val Ile Pro Pro Thr Thr Val Pro Val

115

120

125

40

ccg gag ggt ttt ctc att act cat agt gag gca gaa gag atc ccc ttg 432

Pro Glu Gly Phe Leu Ile Thr His Ser Glu Ala Glu Glu Ile Pro Leu

130

135

140

10

aac gat ctc ttt tca aat caa gag gag agg ata gtc aat ttc caa cct 480

Asn Asp Leu Phe Ser Asn Gln Glu Glu Arg Ile Val Asn Phe Gln Pro

145

150

155

160

20

gac tat ccc att aca gct aga att cat acc cac tta cgt gtt tat act 528

Asp Tyr Pro Ile Thr Ala Arg Ile His Thr His Leu Arg Val Tyr Thr

165

170

175

30

aaa ttg aat gaa caa gct ttg gac aaa gct cgc aga ttg ctt tgg tgg 576

Lys Leu Asn Glu Gln Ala Leu Asp Lys Ala Arg Arg Leu Leu Trp Trp

180

185

190

40

cat tac aat tgc ctc ctc tgg gga gaa gcc act gtt aca aat tat att 624

His Tyr Asn Cys Leu Leu Trp Gly Glu Ala Thr Val Thr Asn Tyr Ile

195

200

205

10

tct cgc ctc cgt act tgg ctt tct act ccc gaa aaa tat cga ggc aag 672

Ser Arg Leu Arg Thr Trp Leu Ser Thr Pro Glu Lys Tyr Arg Gly Lys

20

210

215

220

gat gcc cca acc att gaa gca atc act aga cca atc cag gtg gct caa 720

Asp Ala Pro Thr Ile Glu Ala Ile Thr Arg Pro Ile Gln Val Ala Gln

30

225

230

235

240

gga ggc aga aat caa act aag gga act aga aaa cct cgt gga ctc gaa 768

40

Gly Gly Arg Asn Gln Thr Lys Gly Thr Arg Lys Pro Arg Gly Leu Glu

245

250

255

cct aga aga cga aag gtt aaa acc aca gtt gtc tat ggg aga aga cgt 816

10

Pro Arg Arg Arg Lys Val Lys Thr Thr Val Val Tyr Gly Arg Arg Arg

260

265

270

tct aag tcc cga ggc agg aga tcc tct cca tcc caa cgt gcg ggc tcc 864

20

Ser Lys Ser Arg Gly Arg Arg Ser Ser Pro Ser Gln Arg Ala Gly Ser

275

280

285

30

cct ctc cca cgt aat cgg gga aac cag aca cga tcc ccc tca cct agg 912

Pro Leu Pro Arg Asn Arg Gly Asn Gln Thr Arg Ser Pro Ser Pro Arg

290

295

300

40

gaa tag

918

Glu

305

10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 305

&lt;212&gt; PRT

20

&lt;213&gt; Hepatitis B virus

&lt;400&gt; 11

Met Trp Ser Leu Arg Leu His Pro Ser Pro Phe Gly Ala Ala Cys Gln

30

1

5

10

15

Gly Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Leu Phe Leu Val Thr Val Pro Leu

40

20

25

30

Val Cys Thr Ile Val Tyr Asp Ser Cys Leu Tyr Met Asp Val Asn Ala

35

40

45

10

Ser Arg Ala Leu Ala Asn Val Tyr Asp Leu Pro Asp Asp Phe Phe Pro

50

55

60

20

Gln Ile Asp Asp Leu Val Arg Asp Ala Lys Asp Ala Leu Glu Pro Tyr

65

70

75

80

30

Trp Lys Ala Glu Thr Ile Lys Lys His Val Leu Ile Ala Thr His Phe

85

90

95

Val Asp Leu Ile Glu Asp Phe Trp Gln Thr Thr Gln Gly Met Ser Gln

40

100

105

110

Ile Ala Asp Ala Leu Arg Ala Val Ile Pro Pro Thr Thr Val Pro Val

115

120

125

10

Pro Glu Gly Phe Leu Ile Thr His Ser Glu Ala Glu Glu Ile Pro Leu

130

135

140

20

Asn Asp Leu Phe Ser Asn Gln Glu Glu Arg Ile Val Asn Phe Gln Pro

145

150

155

160

30

Asp Tyr Pro Ile Thr Ala Arg Ile His Thr His Leu Arg Val Tyr Thr

165

170

175

40

Lys Leu Asn Glu Gln Ala Leu Asp Lys Ala Arg Arg Leu Leu Trp Trp

180

185

190

His Tyr Asn Cys Leu Leu Trp Gly Glu Ala Thr Val Thr Asn Tyr Ile

10

195

200

205

Ser Arg Leu Arg Thr Trp Leu Ser Thr Pro Glu Lys Tyr Arg Gly Lys

210

215

220

20

Asp Ala Pro Thr Ile Glu Ala Ile Thr Arg Pro Ile Gln Val Ala Gln

225

230

235

240

30

Gly Gly Arg Asn Gln Thr Lys Gly Thr Arg Lys Pro Arg Gly Leu Glu

245

250

255

40

Pro Arg Arg Arg Lys Val Lys Thr Thr Val Val Tyr Gly Arg Arg Arg

260

265

270

Ser Lys Ser Arg Gly Arg Arg Ser Ser Pro Ser Gln Arg Ala Gly Ser

10

275

280

285

Pro Leu Pro Arg Asn Arg Gly Asn Gln Thr Arg Ser Pro Ser Pro Arg

20

290

295

300

Glu

305

30

<210> 12

<211> 918

<212> DNA

40

⟨213⟩ Hepatitis B virus

⟨220⟩

⟨221⟩ CDS

10

⟨222⟩ (1)..(915)

⟨400⟩ 12

20

atg tgg aac tta aga att aca ccc ctc tcc ttc gga gct gct tgc caa 48

Met Trp Asn Leu Arg Ile Thr Pro Leu Ser Phe Gly Ala Ala Cys Gln

1

5

10

15

30

ggc atc ttt acg tct aca ttg ctg ttg tcg tgt gtg act gta cct ttg 96

Gly Ile Phe Thr Ser Thr Leu Leu Leu Ser Cys Val Thr Val Pro Leu

20

25

30

40

gta tgt acc att gtt tat gat tct tgc tta tat atg gat atc aat gct 144

Val Cys Thr Ile Val Tyr Asp Ser Cys Leu Tyr Met Asp Ile Asn Ala

35

40

45

10

tct aga gcc tta gcc aat gtg tat gat cta cca gat gat ttc ttt cca 192

Ser Arg Ala Leu Ala Asn Val Tyr Asp Leu Pro Asp Asp Phe Phe Pro

50

55

60

20

aaa ata gat gat ctt gtt aga gat gct aaa gac gct tta gag cct tat 240

Lys Ile Asp Asp Leu Val Arg Asp Ala Lys Asp Ala Leu Glu Pro Tyr

30

65

70

75

80

tgg aaa tca gat tca ata aag aaa cat gtt ttg att gca act cac ttt 288

Trp Lys Ser Asp Ser Ile Lys Lys His Val Leu Ile Ala Thr His Phe

40

85

90

95

gtg gat ctc att gaa gac ttc tgg cag act aca cag ggc atg cat gaa 336

Val Asp Leu Ile Glu Asp Phe Trp Gln Thr Thr Gln Gly Met His Glu

10

100

105

110

ata gcc gaa tca tta aga gct gtt ata cct ccc act act act cct gtt 384

20

Ile Ala Glu Ser Leu Arg Ala Val Ile Pro Pro Thr Thr Thr Pro Val

115

120

125

cca ccg ggt tat ctt att cag cac gag gaa gct gaa gag ata cct ttg 432

30

Pro Pro Gly Tyr Leu Ile Gln His Glu Glu Ala Glu Glu Ile Pro Leu

130

135

140

40

gga gat tta ttt aaa cac caa gaa gaa agg ata gta agt ttc caa ccc 480

Gly Asp Leu Phe Lys His Gln Glu Glu Arg Ile Val Ser Phe Gln Pro

145

150

155

160

10

gac tat ccg att acg gct aga att cat gct cat ttg aaa gct tat gca 528

Asp Tyr Pro Ile Thr Ala Arg Ile His Ala His Leu Lys Ala Tyr Ala

165

170

175

20

aaa att aac gag gaa tca ctg gat agg gct agg aga ttg ctt tgg tgg 576

Lys Ile Asn Glu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Leu Trp Trp

180

185

190

30

cat tac aac tgt tta ctg tgg gga gaa gct caa gtt act aac tat att 624

His Tyr Asn Cys Leu Leu Trp Gly Glu Ala Gln Val Thr Asn Tyr Ile

195

200

205

40

tct cgt ttg cgt act tgg ttg tca act cct gag aaa tat aga ggt aga 672

Ser Arg Leu Arg Thr Trp Leu Ser Thr Pro Glu Lys Tyr Arg Gly Arg

210

215

220

10

gat gcc ccg acc att gaa gca atc act aga cca atc cag gtg gct cag 720

Asp Ala Pro Thr Ile Glu Ala Ile Thr Arg Pro Ile Gln Val Ala Gln

20

225

230

235

240

gga ggc aga aaa aca act acg ggt act aga aaa cct cgt gga ctc gaa 768

Gly Gly Arg Lys Thr Thr Thr Gly Thr Arg Lys Pro Arg Gly Leu Glu

30

245

250

255

cct aga aga aga aaa gtt aaa acc aca gtt gtc tat ggg aga aga cgt 816

40

Pro Arg Arg Arg Lys Val Lys Thr Thr Val Val Tyr Gly Arg Arg Arg

260

265

270

tca aag tcc cgg gaa agg aga gcc cct aca ccc caa cgt gcg ggc tcc 864

10

Ser Lys Ser Arg Glu Arg Arg Ala Pro Thr Pro Gln Arg Ala Gly Ser

275

280

285

cct ctc cca cgt agt tcg agc agc cac cat aga tct ccc tcg cct agg 912

20

Pro Leu Pro Arg Ser Ser Ser Ser His His Arg Ser Pro Ser Pro Arg

290

295

300

30

aaa taa 918

Lys

305

40

<210> 13

⟨211⟩ 305

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Hepatitis B virus

10

⟨400⟩ 13

Met Trp Asn Leu Arg Ile Thr Pro Leu Ser Phe Gly Ala Ala Cys Gln

1

5

10

15

20

Gly Ile Phe Thr Ser Thr Leu Leu Leu Ser Cys Val Thr Val Pro Leu

20

25

30

30

Val Cys Thr Ile Val Tyr Asp Ser Cys Leu Tyr Met Asp Ile Asn Ala

35

40

45

40

Ser Arg Ala Leu Ala Asn Val Tyr Asp Leu Pro Asp Asp Phe Phe Pro

50

55

60

Lys Ile Asp Asp Leu Val Arg Asp Ala Lys Asp Ala Leu Glu Pro Tyr

10

65

70

75

80

Trp Lys Ser Asp Ser Ile Lys Lys His Val Leu Ile Ala Thr His Phe

20

85

90

95

Val Asp Leu Ile Glu Asp Phe Trp Gln Thr Thr Gln Gly Met His Glu

100

105

110

30

Ile Ala Glu Ser Leu Arg Ala Val Ile Pro Pro Thr Thr Thr Pro Val

115

120

125

40

Pro Pro Gly Tyr Leu Ile Gln His Glu Glu Ala Glu Glu Ile Pro Leu

130

135

140

10

Gly Asp Leu Phe Lys His Gln Glu Glu Arg Ile Val Ser Phe Gln Pro

145

150

155

160

Asp Tyr Pro Ile Thr Ala Arg Ile His Ala His Leu Lys Ala Tyr Ala

20

165

170

175

Lys Ile Asn Glu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Leu Trp Trp

30

180

185

190

His Tyr Asn Cys Leu Leu Trp Gly Glu Ala Gln Val Thr Asn Tyr Ile

40

195

200

205

Ser Arg Leu Arg Thr Trp Leu Ser Thr Pro Glu Lys Tyr Arg Gly Arg

210

215

220

10

Asp Ala Pro Thr Ile Glu Ala Ile Thr Arg Pro Ile Gln Val Ala Gln

225

230

235

240

20

Gly Gly Arg Lys Thr Thr Thr Gly Thr Arg Lys Pro Arg Gly Leu Glu

245

250

255

Pro Arg Arg Arg Lys Val Lys Thr Thr Val Val Tyr Gly Arg Arg Arg

30

260

265

270

Ser Lys Ser Arg Glu Arg Arg Ala Pro Thr Pro Gln Arg Ala Gly Ser

40

275

280

285

Pro Leu Pro Arg Ser Ser Ser Ser His His Arg Ser Pro Ser Pro Arg

290

295

300

10

Lys

305

20

<210> 14

<211> 37

<212> PRT

30

<213> Influenza virus

<400> 14

Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala Pro Ile Gly Thr Cys Ser Ser Glu Cys

40

1

5

10

15

Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val

20

25

30

10

Asn Lys Ile Thr Tyr

35

20

<210> 15

<211> 29

<212> PRT

30

<213> Influenza virus

<400> 15

Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu

40

1

5

10

15

Gly Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn

20

25

10

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 10

20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Influenza virus

&lt;400&gt; 16

30

Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala

1

5

10

40

⟨210⟩ 17

⟨211⟩ 23

⟨212⟩ DNA

10

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: Hepatitis B

20

virus PCR primer with an NcoI restriction site

⟨400⟩ 17

30

ttgggccaatg gacatcgacc tta

23

⟨210⟩ 18

40

⟨211⟩ 31

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

10

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: Hepatitis B

virus PCR primer with an EcoRI restriction site

20

⟨400⟩ 18

gcggaattcc atcttccaaa ttaacaccca c

31

30

⟨210⟩ 19

⟨211⟩ 41

40

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

10

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: Hepatitis B

virus PCR primer with EcoRI and SacI restriction

sites and an inserted lysine codon

20

⟨400⟩ 19

cgcgaaattca aaaagagctc ccagcgtcta gagagacctt g

41

30

⟨210⟩ 20

⟨211⟩ 31

⟨212⟩ DNA

40

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: Hepatitis B

10

virus PCR primer with HindIII restriction site

⟨400⟩ 20

20

cgcaagctta aacaacagta gtctcggaa g

31

⟨210⟩ 21

30

⟨211⟩ 14

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Hepatitis B virus

40

〈400〉 21

Cys Gln Glu Lys Gln Leu Asp Glu Asn Ala Asn Val Gln Leu

1

5

10

10

〈210〉 22

〈211〉 13

20

〈212〉 PRT

〈213〉 Hepatitis B virus

30

〈400〉 22

Cys Ser Lys Lys Gly Pro Arg Ala Ser Gly Asn Leu Ile

1

5

10

40

⟨210⟩ 23

⟨211⟩ 19

⟨212⟩ PRT

10

⟨213⟩ Hepatitis B virus

⟨400⟩ 23

20

Cys Leu Thr Glu His Arg Met Thr Trp Asp Pro Ala Gln Pro Pro Arg

1

5

10

15

Asp Leu Thr

30

⟨210⟩ 24

⟨211⟩ 22

⟨212⟩ PRT

40

⟨213⟩ Hepatitis B virus

⟨400⟩ 24

Cys Val Lys Arg Met Lys Glu Ser Arg Leu Glu Asp Thr Gln Lys His 10

1 5 10 15

Arg Val Asp Phe Leu Gln 20

20

⟨210⟩ 25 30

⟨211⟩ 15

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Streptococcus pneumoniae 40

〈300〉

〈310〉 EP-0 786 521-A

〈400〉 25

10

Lys Leu Glu Glu Leu Ser Asp Lys Ile Asp Glu Leu Asp Ala Glu

1

5

10

15

20

〈210〉 26

〈211〉 35

〈212〉 PRT

30

〈213〉 *Streptococcus pneumoniae*

〈300〉

〈310〉 EP-0 786 521-A

40

<400> 26

Gln Lys Lys Tyr Asp Glu Asp Gln Lys Lys Thr Glu Glu Lys Ala Ala

1 5 10 15 10

Leu Glu Lys Ala Ala Ser Glu Glu Met Asp Lys Ala Val Ala Ala Val

20 25 30 20

Gln Gln Ala

35 30

<210> 27

<211> 31 40

<212> PRT

⟨213⟩ *Cryptosporidium parvum*

⟨300⟩

10

⟨310⟩ WO 98/07320

⟨400⟩ 27

Gln Asp Lys Pro Ala Asp Ala Pro Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Glu

20

1

5

10

15

Pro Ala Ala Glu Pro Ala Ala Gln Gln Asp Lys Pro Ala Asp Ala

30

20

25

30

⟨210⟩ 28

⟨211⟩ 16

40

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Human immunodeficiency virus

⟨300⟩

10

⟨310⟩ US 5,639,854

⟨400⟩ 28

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Cys

1

5

10

15

20

⟨210⟩ 29

⟨211⟩ 17

30

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Human immunodeficiency virus

⟨300⟩

40

<310> WO 98/07320

<400> 29

Arg Lys Arg Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ile Thr Lys 10

1 5 10 15

Asn 20

<210> 30

<211> 31

<212> PRT 30

<213> Foot-and-mouth disease virus

<300>

<310> US 4,544,500 40

<400> 30

Tyr Asn Gly Glu Cys Arg Tyr Asn Arg Asn Ala Val Pro Asn Leu Arg

1

5

10

15

10

Gly Asp Leu Gln Val Leu Ala Gln Lys Val Ala Arg Thr Leu Pro

20

25

30

20

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

30

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

<300>

40

<310> EP-O 399 011-B1

⟨400⟩ 31

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly

10

1

5

10

15

Cys

20

⟨210⟩ 32

⟨211⟩ 25

⟨212⟩ PRT

30

⟨213⟩ *Borrelia burgdorferi*

⟨300⟩

40

⟨301⟩ Bockenstedt, L. K.

et al.,

⟨303⟩ J. Immunol.

⟨304⟩ 157

10

⟨305⟩ 12

⟨306⟩ 5496-

⟨307⟩ (1966)

20

⟨400⟩ 32

Val Glu Ile Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Lys Arg Glu Ile Asp Lys

1

5

10

15

30

Asn Gly Lys Val Thr Val Ser Leu Cys

20

25

40

⟨210⟩ 33

⟨211⟩ 19

⟨212⟩ PRT

10

⟨213⟩ *Borrelia burgdorferi*

⟨300⟩

20

⟨301⟩ Zhong, W.

et al.,

⟨303⟩ Eur. J. Immunol.

⟨304⟩ 26

30

⟨305⟩ 11

⟨306⟩ 2749-

⟨307⟩ 1996

40

〈400〉 33

Thr Leu Ser Lys Asn Ile Ser Lys Ser Gly Glu Val Ser Val Glu Leu

1

5

10

15

10

Asn Asp Cys

20

〈210〉 34

〈211〉 11

30

〈212〉 PRT

〈213〉 Influenza A virus

〈300〉

40

⟨301⟩ Brumeanu, T. D.

⟨303⟩ Immunotechnology

⟨304⟩ 2

⟨305⟩ 2

10

⟨306⟩ 85-

⟨307⟩ (1996)

20

⟨400⟩ 34

Ser Ser Val Ser Ser Phe Glu Arg Phe Glu Cys

1

5

10

30

⟨210⟩ 35

⟨211⟩ 10

40

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Influenza A virus

⟨300⟩

10

⟨301⟩ Brumeanu, T. D.

⟨303⟩ Immunotechnology

⟨304⟩ 2

⟨305⟩ 2

20

⟨306⟩ 85-

⟨307⟩ (1996)

30

⟨400⟩ 35

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Glu Lys

1

5

10

40

⟨210⟩ 36

⟨211⟩ 142

⟨212⟩ PRT

10

⟨213⟩ *Yersinia pestis*

⟨300⟩

20

⟨301⟩ Hill, J.

et al.,

⟨303⟩ Infect. Immun.

⟨304⟩ 65

30

⟨305⟩ 11

⟨306⟩ 4476-

⟨307⟩ (1997)

40

<400> 36

Asp Ile Leu Lys Val Ile Val Asp Ser Met Asn His His Gly Asp Ala

1

5

10

15

10

Arg Ser Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ala Glu Leu Thr Ala Glu Leu Lys

20

25

30

20

Ile Tyr Ser Val Ile Gln Ala Glu Ile Asn Lys His Leu Ser Ser Ser

35

40

45

30

Gly Thr Ile Asn Ile His Asp Lys Ser Ile Asn Leu Met Asp Lys Asn

50

55

60

Leu Tyr Gly Tyr Thr Asp Glu Glu Ile Phe Lys Ala Ser Ala Glu Tyr

40

65

70

75

80

Lys Ile Leu Glu Lys Met Pro Gln Thr Thr Ile Gln Val Asp Gly Ser

85

90

95

10

Glu Lys Lys Ile Val Ser Ile Lys Asp Phe Leu Gly Ser Glu Asn Lys

100

105

110

20

Arg Thr Gly Ala Leu Gly Asn Leu Lys Asn Ser Tyr Ser Tyr Asn Lys

115

120

125

30

Asp Asn Asn Glu Leu Ser His Phe Ala Thr Thr Cys Ser Asp

130

135

140

40

⟨210⟩ 37

⟨211⟩ 19

⟨212⟩ PRT

10

⟨213⟩ *Haemophilus influenzae*

⟨300⟩

⟨310⟩ EP-0 432 220-B1

20

⟨400⟩ 37

Cys Ser Ser Ser Asn Asn Asp Ala Ala Gly Asn Gly Ala Ala Gln Phe

30

1

5

10

15

Gly Gly Tyr

40

⟨210⟩ 38

⟨211⟩ 11

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Haemophilus influenzae*

10

⟨300⟩

⟨310⟩ EP-0 432 220-B1

20

⟨400⟩ 38

Asn Lys Leu Gly Thr Val Ser Tyr Gly Glu Glu

1

5

10

30

⟨210⟩ 39

⟨211⟩ 16

40

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Haemophilus influenzae*

⟨300⟩

10

⟨310⟩ EP-O 432 220-B1

⟨400⟩ 39

20

Asn Asp Glu Ala Ala Tyr Ser Lys Asn Arg Arg Ala Val Leu Ala Tyr

1

5

10

15

30

⟨210⟩ 40

⟨211⟩ 28

⟨212⟩ PRT

40

⟨213⟩ *Moraxella catarrhalis*

〈300〉

〈310〉 WO 98/06851

10

〈400〉 40

Leu Asp Ile Glu Lys Asp Lys Lys Lys Arg Thr Asp Glu Gln Leu Gln

1

5

10

15

20

Ala Glu Leu Asp Asp Lys Tyr Ala Gly Lys Gly Tyr

20

25

30

〈210〉 41

〈211〉 28

40

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Moraxella catarrhalis*

⟨300⟩

10

⟨310⟩ WO 98/06851

⟨400⟩ 41

20

Leu Asp Ile Glu Lys Asn Lys Lys Lys Arg Thr Glu Ala Glu Leu Gln

1

5

10

15

Ala Glu Leu Asp Asp Lys Tyr Ala Gly Lys Gly Tyr

30

20

25

⟨210⟩ 42

40

⟨211⟩ 28

<212> PRT

<213> *Moraxella catarrhalis*

10

<300>

<310> WO 98/06851

<400> 42

20

Ile Asp Ile Glu Lys Lys Gly Lys Ile Arg Thr Glu Ala Glu Leu Leu

1

5

10

15

30

Ala Glu Leu Asn Lys Asp Tyr Pro Gly Gln Gly Tyr

20

25

<210> 43

40

<211> 25

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Porphyromonas gingivalis*

10

⟨300⟩

⟨304⟩ 110

⟨305⟩ 2

⟨306⟩ 285-

20

⟨307⟩ 1997

⟨400⟩ 43

30

Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Lys Asp Val Thr Val Glu Gly Ser Asn

1

5

10

15

Glu Phe Ala Pro Val Gln Asn Leu Thr

40

20

25

〈210〉 44

10

〈211〉 20

〈212〉 PRT

〈213〉 *Porphyromonas gingivalis*

20

〈300〉

〈304〉 110

〈305〉 2

30

〈306〉 285-

〈307〉 1997

40

〈400〉 44

Arg Ile Gln Ser Thr Trp Arg Gln Lys Thr Val Asp Leu Pro Ala Gly

1

5

10

15

10

Thr Lys Tyr Val

20

<210> 45

20

<211> 20

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

30

<300>

<304> 159

<305> 9

40

⟨306⟩ 4444-

⟨307⟩ (1997)

⟨400⟩ 45

10

Ser His Asn Phe Thr Leu Val Ala Ser Val Ile Ile Glu Ala Pro Ser

1

5

10

15

20

Gly Asn Thr Cys

20

30

⟨210⟩ 46

⟨211⟩ 21

⟨212⟩ PRT

40

⟨213⟩ *Trypanosoma cruzi*

〈300〉

〈310〉 WO 97/18475

10

〈400〉 46

Lys Ala Ala Ile Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Ala Pro Ala Lys Ala

1

5

10

15

20

Ala Thr Ala Pro Ala

20

30

〈210〉 47

〈211〉 16

40

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Plasmodium falciparum*

⟨300⟩

10

⟨303⟩ Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.

⟨304⟩ 114

⟨305⟩ 1

20

⟨306⟩ 15-

⟨400⟩ 47

Ser Val Gln Ile Pro Lys Val Pro Tyr Pro Asn Gly Ile Val Tyr Cys

30

1

5

10

15

⟨210⟩ 48

40

⟨211⟩ 16

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

10

<300>

<303> Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.

<304> 114

<305> 1

20

<306> 15-

<400> 48

30

Asp Phe Asn His Tyr Tyr Thr Leu Lys Thr Gly Leu Glu Ala Asp Cys

1

5

10

15

<210> 49

40

<211> 16

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Streptococcus sobrinus*

10

⟨300⟩

⟨303⟩ Arch. Oral Biol.

⟨304⟩ 35

⟨306⟩ Suppl. 475-

20

⟨307⟩ (1990)

⟨400⟩ 49

30

Lys Pro Arg Pro Ile Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Gln Asn Gln Lys Cys

1

5

10

15

⟨210⟩ 50

40

⟨211⟩ 17

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Streptococcus sobrinus*

10

⟨300⟩

⟨303⟩ Arch. Oral Biol.

⟨304⟩ 35

20

⟨306⟩ Suppl. 475-

⟨307⟩ (1990)

⟨400⟩ 50

30

Ala Lys Ala Asp Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Gln Tyr Glu Lys Asp Leu

1

5

10

15

40

Cys

〈210〉 51

〈211〉 16

10

〈212〉 PRT

〈213〉 Lymphocytic choriomeningitis virus

〈300〉

20

〈303〉 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

〈304〉 94

〈305〉 7

30

〈306〉 3314-

〈307〉 (1997)

〈400〉 51

40

Arg Pro Gln Ala Ser Gly Val Tyr Met Gly Asn Leu Thr Ala Gln Cys

1

5

10

15

10

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

20

<213> *Shigella flexneri*

<300>

<303> J. Biol. Chem.

30

<304> 271

<305> 52

<306> 33670-

40

<307> (1996)

⟨400⟩ 52

Lys Asp Arg Thr Leu Ile Glu Gln Lys

10

1

5

⟨210⟩ 53

20

⟨211⟩ 15

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ respiratory syncytial virus

30

⟨300⟩

⟨304⟩ 234

⟨305⟩ 1

40

<306> 118-

<307> 1997

<400> 53

10

Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys

1

5

10

15

20

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

30

<213> Plasmodium vivax

<300>

40

<303> Vaccine

〈304〉 15

〈305〉 4

〈306〉 377-

10

〈307〉 1997

〈400〉 54

Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln Pro Ala Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln

20

1

5

10

15

Pro Ala Gly

30

〈210〉 55

〈211〉 16

40

<212> PRT

<213> Clostridium tetani

<300>

10

<303> Vaccine

<304> 15

<305> 4

20

<306> 377-

<307> 1997

<400> 55

30

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu Cys

1

5

10

15

40

<210> 56

⟨211⟩ 25

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Entamoeba histolytica*

10

⟨300⟩

⟨303⟩ J. Exp. Med.

⟨304⟩ 185

20

⟨305⟩ 10

⟨306⟩ 1793-

⟨307⟩ 1997

30

⟨400⟩ 56

Val Glu Cys Ala Ser Thr Val Cys Gln Asn Asp Asn Ser Cys Pro Ile

1

5

10

15

40

Ile Ala Asp Val Glu Lys Cys Asn Gln

20

25

10

<210> 57

<211> 34

<212> PRT

20

<213> Schistosoma japonicum

<300>

<303> Vaccine

30

<304> 15

<305> 1

<306> 79-

40

<307> 1997

〈400〉 57

Asp Leu Gln Ser Glu Ile Ser Leu Ser Leu Glu Asn Gly Glu Leu Ile

10

1

5

10

15

Arg Arg Ala Lys Ser Ala Glu Ser Leu Ala Ser Glu Leu Gln Arg Arg

20

25

30

20

Val Asp

〈210〉 58

30

〈211〉 34

〈212〉 PRT

〈213〉 *Schistosoma mansoni*

40

〈300〉

〈303〉 Vaccine

〈304〉 15

10

〈305〉 1

〈306〉 79-

〈307〉 1997

20

〈400〉 58

Asp Leu Gln Ser Glu Ile Ser Leu Ser Leu Glu Asn Ser Glu Leu Ile

1

5

10

15

30

Arg Arg Ala Lys Ala Ala Glu Ser Leu Ala Ser Asp Leu Gln Arg Arg

20

25

30

40

Val Asp

<210> 59

<211> 63

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of Artificial Sequence: MseI

restriction endonuclease site inserted into wild

type Hepatitis B sequence at position 75

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(63)

40

<400> 59

gct acc tgg gtg ggt gtt aat ttg gaa gat cca gcg tct aga gac cta 48

Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp Leu 10

1 5 10 15

gta gtc agt tat gtc 63

20

Val Val Ser Tyr Val

20

30

<210> 60

<211> 21

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

〈400〉 60

Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp Leu

10

1

5

10

15

Val Val Ser Tyr Val

20

20

〈210〉 61

〈211〉 41

30

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

40

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: K inserted at  
amino acid position 75 of Hetatitis B core  
sequence

10

⟨220⟩

⟨221⟩ CDS

⟨222⟩ (1)..(39)

20

⟨400⟩ 61

gct acc tgg gtg ggt gtt aaa aat ttg gaa gat cca gcg tc 41

Ala Thr Trp Val Gly Val Lys Asn Leu Glu Asp Pro Ala 30

1 5 10

40

⟨210⟩ 62

⟨211⟩ 13

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Artificial Sequence

10

⟨400⟩ 62

Ala Thr Trp Val Gly Val Lys Asn Leu Glu Asp Pro Ala

1

5

10

20

⟨210⟩ 63

30

⟨211⟩ 27

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K inserted at

amino acid position 76 of hepatitis B core

10

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(26)

20

<400> 63

tt aat aaa ttg gaa gat cca gcg tct a

27

Asn Lys Leu Glu Asp Pro Ala Ser

30

1

5

<210> 64

<211> 8

40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 64

10

Asn Lys Leu Glu Asp Pro Ala Ser

1

5

20

<210> 65

<211> 27

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: K inserted at

position 77 of hepatitis B virus core

<220>

10

<221> CDS

<222> (3)..(26)

<400> 65

20

tt aat ttg aaa gaa gat cca gcg tct a

27

Asn Leu Lys Glu Asp Pro Ala Ser

1

5

30

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

40

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 66

Asn Leu Lys Glu Asp Pro Ala Ser

10

1

5

20

⟨210⟩ 67

⟨211⟩ 32

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

30

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: K inserted at

40

position 78 of hepatitis B core

<220>

<221> CDS

10

<222> (3)..(32)

<400> 67

tt aat ttg gaa aaa gat cca gcg tct aga gac

32

20

Asn Leu Glu Lys Asp Pro Ala Ser Arg Asp

1

5

10

30

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<400> 68

Asn Leu Glu Lys Asp Pro Ala Ser Arg Asp

10

1

5

10

20

<210> 69

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K inserted at

40

amino acid position 79 of hepatitis B core

<220>

<221> CDS

10

<222> (3)..(35)

<400> 69

tt aat ttg gaa gat aaa cca gcg tct aga gac cta g

36

20

Asn Leu Glu Asp Lys Pro Ala Ser Arg Asp Leu

1

5

10

30

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

40

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 70

Asn Leu Glu Asp Lys Pro Ala Ser Arg Asp Leu

10

1

5

10

20

⟨210⟩ 71

⟨211⟩ 39

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

30

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: K inserted at

40

amino acid position 80 of hepatitis B core

<220>

<221> CDS

10

<222> (3)..(38)

<400> 71

tt aat ttg gaa gat cca aaa gcg tct aga gac cta gta g

39

20

Asn Leu Glu Asp Pro Lys Ala Ser Arg Asp Leu Val

1

5

10

30

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

40

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 72

Asn Leu Glu Asp Pro Lys Ala Ser Arg Asp Leu Val

10

1

5

10

⟨210⟩ 73

20

⟨211⟩ 43

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

30

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: K inserted at

amino acid position 81 of hepatitis B core

40

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(41)

10

<400> 73

tt aat ttg gaa gat cca gcg aaa tct aga gac cta gta gtc ag 43

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Lys Ser Arg Asp Leu Val Val

20

1

5

10

30

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<400> 74

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Lys Ser Arg Asp Leu Val Val

1

5

10

10

<210> 75

<211> 45

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: K inserted at

amino acid position 82 of hepatitis B core

<220>

40

<221> CDS

<222> (3)..(44)

<400> 75

10

tt aat ttg gaa gat cca gcg tct aaa aga gac cta gta gtc agt t 45

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Lys Arg Asp Leu Val Val Ser

1

5

10

20

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

30

<213> Artificial Sequence

<400> 76

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Lys Arg Asp Leu Val Val Ser

40

1

5

10

&lt;210&gt; 77

10

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: K inserted at

amino acid position 83 of hepatitis B core

30

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

40

&lt;222&gt; (3)..(50)

<400> 77

tt aat ttg gaa gat cca gcg tct aga aaa gac cta gta gtc agt tat 47

10

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Lys Asp Leu Val Val Ser Tyr

1

5

10

15

gtc

50

20

Val

30

<210> 78

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<400> 78

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Lys Asp Leu Val Val Ser Tyr Val

1 5 10 15 10

<210> 79

20

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K inserted at

amino acid position 84 of hepatitis B core

40

<220>

<221> CDS

<222> (3)..(50)

10

<400> 79

tt aat ttg gaa gat cca gcg tct aga gac aaa cta gta gtc agt tat 47

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp Lys Leu Val Val Ser Tyr

20

1

5

10

15

gtc

50

30

Val

<210> 80

<211> 16

40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 80

10

Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp Lys Leu Val Val Ser Tyr Val

1

5

10

15

20

<210> 81

<211> 31

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> Description of Artificial Sequence: K inserted at

amino acid position 85 of hepatitis B core

<220>

10

<221> CDS

<222> (2)..(31)

<400> 81

20

c tcg aga gac cta aaa gta gtc agt tat gtc

31

Ser Arg Asp Leu Lys Val Val Ser Tyr Val

1

5

10

30

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

40

<213> Artificial Sequence

<400> 82

Ser Arg Asp Leu Lys Val Val Ser Tyr Val

10

1 5 10

<210> 83

<211> 18

20

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

30

<400> 83

Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln Pro

1 5 10 15

40

Ala Gly

⟨210⟩ 84

⟨211⟩ 8

10

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Influenza virus

⟨400⟩ 84

20

Cys Asn Asn Pro His Arg Ile Leu

1

5

⟨210⟩ 85

30

⟨211⟩ 25

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Influenza virus

40

<400> 85

Cys Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met

1

5

10

15

10

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg

20

25

20

<210> 86

<211> 15

30

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 86

40

Ala Val Leu Glu Asp Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys Val

1

5

10

15

10

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

20

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 87

Leu Leu Val Ser Ser Lys Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro

30

1

5

10

15

40

<210> 88

⟨211⟩ 15

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Mycobacterium tuberculosis*

10

⟨400⟩ 88

Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile Gly Ala Gly Lys Pro Leu

1

5

10

15

20

⟨210⟩ 89

⟨211⟩ 15

30

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ *Mycobacterium tuberculosis*

⟨400⟩ 89

40

Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Ile Ser Glu Glu Val Gly Leu

1

5

10

15

<210> 90

10

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

20

<400> 90

Ile Ala Phe Asn Ser Gly Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu Lys

1

5

10

15

30

<210> 91

40

<211> 18

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

10

<400> 91

Ala Arg Arg Gly Leu Glu Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val

1

5

10

15

20

Lys Val

<210> 92

<211> 14

30

<212> PRT

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

40

<400> 92

Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys

1

5

10

10

<210> 93

<211> 17

<212> PRT

20

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 93

30

Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Lys Val Thr Glu Thr

1

5

10

15

Leu

40

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

10

<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 94

Ile Glu Asp Ala Val Arg Asn Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly

20

1

5

10

15

<210> 95

<211> 20

30

<212> PRT

<213> *Feline leukemia virus*

<400> 95

40

Cys Asp Ile Ile Gly Asn Thr Trp Asn Pro Ser Asp Gln Glu Pro Phe

1

5

10

15

Pro Gly Tyr Gly

10

20

<210> 96

20

<211> 21

<212> PRT

<213> Feline leukemia virus

30

<400> 96

Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr His Gln Ala Leu Cys Asn Glu Thr

1

5

10

15

40

Gln Gln Gly His Thr

20

10

<210> 97

<211> 13

<212> PRT

20

<213> Feline leukemia virus

<400> 97

30

Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr Asn Pro Pro Pro Ser Cys

1

5

10

40

⟨210⟩ 98

⟨211⟩ 22

⟨212⟩ PRT

⟨213⟩ Feline leukemia virus 10

⟨400⟩ 98

Thr Asp Ile Gln Ala Leu Glu Glu Ser Ile Ser Ala Leu Glu Lys Ser 20

1 5 10 15

Leu Thr Ser Leu Ser Glu

20 30

⟨210⟩ 99

⟨211⟩ 14

⟨212⟩ PRT

40

⟨213⟩ Feline leukemia virus

〈400〉 99

Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Lys Gln Arg Gln Gln Leu Phe

10

1

5

10

〈210〉 100

20

〈211〉 23

〈212〉 PRT

〈213〉 Feline leukemia virus

30

〈400〉 100

Asp Ser Gln Gln Gly Trp Phe Glu Gly Trp Phe Asn Lys Ser Pro Trp

1

5

10

15

40

Phe Thr Thr Leu Ile Ser Ser

20

10

<210> 101

<211> 18

<212> PRT

20

<213> Feline leukemia virus

<400> 101

Gln Val Met Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met Gly Pro Asn Leu Val

30

1

5

10

15

Leu Pro

40

⟨210⟩ 102

⟨211⟩ 17

⟨212⟩ PRT

10

⟨213⟩ Feline leukemia virus

⟨400⟩ 102

Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Ile Glu Ser Arg Val Thr

20

1

5

10

15

Pro

30

⟨210⟩ 103

⟨211⟩ 15

⟨212⟩ PRT

40

⟨213⟩ Feline leukemia virus

<400> 103

Arg Arg Gly Leu Asp Ile Leu Phe Leu Gln Glu Gly Gly Leu Cys

10

1

5

10

15

<210> 104

<211> 25

20

<212> PRT

<213> Feline leukemia virus

30

<400> 104

Gln Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Glu Glu Cys Gln Ile Gly Gly

1

5

10

15

40

Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys

20

25

10

<210> 105

<211> 12

<212> PRT

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Cytochrome

30

P-450 fragment

<300>

40

<303> Science

〈304〉 228

〈306〉 1436-1440

〈307〉 1985

10

〈400〉 105

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1

5

10

20

〈210〉 106

30

〈211〉 6

〈212〉 PRT

〈213〉 Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Cytochrome

P-450 fragment

10

<400> 106

Cys Met Gln Leu Arg Ser

1

5

20

<210> 107

<211> 6

30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

40

<220>

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: Cytochrome

P-450 fragment

10

⟨400⟩ 107

Cys Arg Phe Ser Ile Asn

1

5

20

⟨210⟩ 108

⟨211⟩ 5

⟨212⟩ PRT

30

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Description of Artificial Sequence: Cytochrome

40

P-450 fragment

<400> 108

Cys Ala Val Pro Arg

10

1

5

20

<210> 109

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Cytochrome

40

P-450 fragment

<400> 109

Cys Ile Pro Arg Ser

1

5

10

<210> 110

<211> 5

<212> PRT

20

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence: Cytochrome

P-450 fragment

<400> 110

40

Cys Phe Ile Pro Val

1

5

10

<210> 111

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Cytochrome

30

P-450 fragment

<400> 111

Cys Thr Val Ser Gly Ala

40

1

5

〈210〉 112

10

〈211〉 6

〈212〉 PRT

〈213〉 Plasmodium knowlesi

20

〈400〉 112

Cys Thr Leu Ser Gly Glu

1

5

30

〈210〉 113

〈211〉 12

40

〈212〉 PRT

⟨213⟩ Plasmodium knowlesi

〈400〉 113

10

Gln Ala Gln Gly Asp Gly Ala Asn Ala Gly Gln Pro

1

5

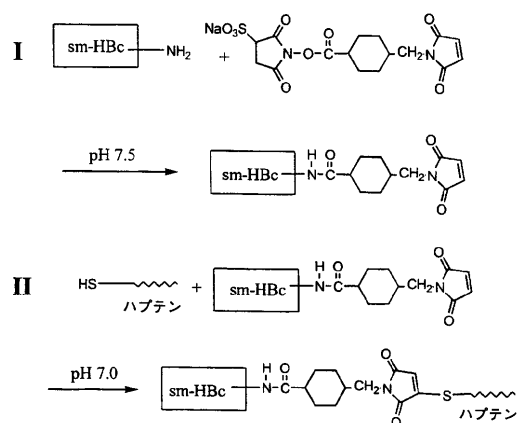
10

【図面の簡単な説明】

【図1】スキーム1はスルホ-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサニル-カルボキシレート（スルホ-SMCC）を使用してハプテンを戦略的修飾されたB型肝炎コアタンパク質（sm-HBc）粒子にペンダント結合するための反応順序を示す。sm-HBc粒子が単一ペンダントアミノ基を有するボックスとして示される（図面の明瞭化の目的のため）。

【图 1】

スキーム 1



---

フロントページの続き

- (74)代理人 100096194  
弁理士 竹内 英人
- (74)代理人 100074228  
弁理士 今城 俊夫
- (74)代理人 100084009  
弁理士 小川 信夫
- (74)代理人 100082821  
弁理士 村社 厚夫
- (74)代理人 100086771  
弁理士 西島 孝喜
- (74)代理人 100084663  
弁理士 箱田 篤
- (74)代理人 100093300  
弁理士 浅井 賢治
- (72)発明者 バーキット アシュレイ ジェイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92075 ソラナ ビーチ スティーヴンス アベニュー  
878 アpartment 3208

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 特開平03-027400 (JP, A)  
特開昭64-025800 (JP, A)  
特開平03-216186 (JP, A)  
J. Virol., 1995年, vol.69, no.11, p.6833-6838  
J. Virol., 1992年, vol.66, no.1, p.106-114

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N 15/00-15/90  
C07K 14/02  
A61K 39/385