

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6920694号

(P6920694)

(45) 発行日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年7月29日(2021.7.29)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/37 (2006.01)

C 1 2 N 15/37 Z N A

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 K 39/12

A 6 1 P 31/20 (2006.01)

A 6 1 P 31/20

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

請求項の数 17 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-548264 (P2018-548264)
 (86) (22) 出願日 平成28年12月2日(2016.12.2)
 (65) 公表番号 特表2019-502404 (P2019-502404A)
 (43) 公表日 平成31年1月31日(2019.1.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2016/108349
 (87) 国際公開番号 WO2017/092711
 (87) 国際公開日 平成29年6月8日(2017.6.8)
 審査請求日 令和1年7月1日(2019.7.1)
 (31) 優先権主張番号 201510887801.9
 (32) 優先日 平成27年12月4日(2015.12.4)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国(CN)

(73) 特許権者 512287595
 シアメン ユニバーシティ
 XIAMEN UNIVERSITY
 中華人民共和国 フーチェン 36100
 5, シアメン シミン ディストリクト,
 シミン ナン ロード ナンバー 42
 2
 No. 422 Siming Nan R
 oad, Siming District
 Xiamen Fujian, 3610
 05 CHINA

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトパピローマウイルスタイプ11のL1タンパク質の突然変異

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

突然変異型HPV11 L1タンパク質であって、野生型HPV11 L1タンパク質と比較すると、突然変異型HPV11 L1タンパク質は、以下の突然変異を有する：

(1) 3、4、5又は6アミノ酸のN末端切断；そして

(2) (a) 野生型HPV6のL1タンパク質の対応する位置の全てのアミノ酸残基による、野生型HPV11 L1タンパク質の346～351位のアミノ酸残基の置換；又は

(b) 野生型HPV6のL1タンパク質の対応する位置の全てのアミノ酸残基による、野生型HPV11 L1タンパク質の119～140位のアミノ酸残基の置換；
 を有する、上記突然変異型HPV11 L1タンパク質。

10

【請求項2】

(2) (a) に記載の対応する位置のアミノ酸残基が、野生型HPV6 L1タンパク質の345～350位のアミノ酸残基であり；及び/又は、(2) (a) に記載の対応する位置のアミノ酸残基が、野生型HPV6 L1タンパク質の119～139位のアミノ酸残基である、請求項1に記載の突然変異型HPV11 L1タンパク質。

【請求項3】

野生型HPV11 L1タンパク質が、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有し；及び/又は、野生型HPV6 L1タンパク質が、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する、請求項1又は2に記載の突然変異型HPV11 L1タンパク質。

20

【請求項 4】

突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質が、配列番号 6 及び 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 7】

請求項 5 に記載の単離された核酸及び / 又は請求項 6 に記載のベクターを含む宿主細胞。

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を含む又はそれからなる H P V ウイルス様粒子。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質、又は請求項 5 に記載の単離された核酸、又は請求項 6 に記載のベクター、又は請求項 7 に記載の宿主細胞、又は請求項 8 に記載の H P V ウイルス様粒子を含む組成物。

20

【請求項 10】

請求項 8 に記載の H P V ウイルス様粒子、及び場合により医薬として許容される担体及び / 又は賦形剤を含む医薬組成物又はワクチン。

【請求項 11】

H P V ウイルス様粒子が、H P V 感染又は H P V 感染によって引き起こされる疾患の予防に有効な量で存在する、請求項 10 に記載の医薬組成物又はワクチン。

【請求項 12】

H P V 感染が、H P V 1 1 感染及び / 又は H P V 6 感染であり ; 及び / 又は、H P V 感染によって引き起こされる疾患が、子宮頸癌及び尖圭コンジロームからなる群から選択される、請求項 10 又は 11 に記載の医薬組成物又はワクチン。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を調製する方法であって、該方法は、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を宿主細胞で発現させ、次に、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を宿主細胞の培養物から回収することを含む、上記方法。

30

【請求項 14】

宿主細胞が大腸菌である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 8 に記載の H P V ウイルス様粒子を医薬として許容される担体及び / 又は賦形剤と組み合わせることを含む、ワクチンを調製する方法。

【請求項 16】

H P V 感染又は H P V 感染によって引き起こされる疾患に使用するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質、又は請求項 8 に記載の H P V ウイルス様粒子。

40

【請求項 17】

H P V 感染が、H P V 1 1 感染及び / 又は H P V 6 感染であり ; 及び / 又は、H P V 感染によって引き起こされる疾患が、子宮頸癌及び尖圭コンジロームからなる群から選択される、請求項 16 に記載の突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

50

本発明は、分子ウイルス学及び免疫学の分野に関する。特に、本発明は、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質（又はその改変体）、それをコードする配列、それを調製する方法、及びそれを含むウイルス様粒子に関し、ここで、タンパク質（又はその改変体）、ウイルス様粒子は、少なくとも 2 つの H P V タイプ（例えば、H P V 1 1 及び H P V 6）に対する中和抗体の生成を誘導することができ、したがって、少なくとも 2 つの H P V タイプによる感染、及び該感染によって引き起こされる疾患、例えば、子宮頸癌及び尖圭コンジロームを予防するために使用され得る。本発明はさらに、前記少なくとも 2 つの H P V タイプによる感染、及び前記感染によって引き起こされる疾患、例えば子宮頸癌及び尖圭コンジロームを予防するための医薬組成物又はワクチンの製造におけるタンパク質及びウイルス様粒子の使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ヒトパピローマウイルス（H P V）は、主に皮膚及び粘膜にイボを引き起こす。H P V タイプは、腫瘍形成との関連性に依りて、高リスクタイプと低リスクタイプに分けられる。その中で、高リスクの H P V タイプによる感染は、女性の子宮頸癌を含む生殖器癌の主要な原因であることが実証されている。低リスクの H P V タイプは、主に尖圭コンジロームを引き起こす。H P V 感染を予防及び制御する最も効果的な方法は、H P V ワクチン、特に子宮頸癌を引き起こす高リスク H P V タイプに対するワクチンをワクチン接種することである。

【0003】

20

H P V の主要キャプシドタンパク質 L 1 は、中空のウイルス様粒子（V L P）への自己組織化の特徴を有する。H P V V L P は、主要キャプシドタンパク質 L 1 の 7 2 個の五量体で構成される対称二十面体構造を有する（D o o r b a r、J . a n d P . H . G a l l i m o r e、1 9 8 7 . J V i r o l、6 1（9）：2 7 9 3 - 9）。H P V V L P は、天然の H P V と構造的に非常に類似しており、天然ウイルスの中和エピトープの大部分を保持し、高力価の中和抗体の生成を誘導することができる（K i r n b a u e r、R .、F . B o o y ら、1 9 9 2 P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 9（2 4）：1 2 1 8 0 - 4）。

【0004】

しかしながら、既存の研究は、H P V V L P が、主に同じ H P V タイプに対する中和抗体の産生を誘導し、同じ H P V タイプに対して保護免疫を生成し、いくつかの高度に相同な H P V タイプ間で低い交差防御効果しか示さないことを示す（S a r a L B i s s e t t、G i a d a M a t t i u z z o、e t a l、2 0 1 4 V a c c i n e . 3 2：6 5 4 8 - 6 5 5 5）。したがって、既存の H P V ワクチンは、保護範囲が非常に限られている。一般に、1 つの H P V タイプの V L P は、同じ H P V タイプによる感染を防ぐためにのみ使用できる。この場合、H P V ワクチンの保護範囲を広げる必要がある場合、唯一の方法は、より多くの H P V タイプの V L P をワクチンに加えることである。現在、市販されている H P V ワクチン（M e r c k 社の G a r d a s i l（登録商標）（H P V 1 6、1 8、6 及び 1 1 に対する 4 価ワクチン）、G S K 社の C e r v a r i x（登録商標）（H P V 1 6 及び 1 8 に対する 2 価ワクチン）、及び M e r c k 社の G a r d a s i l（登録商標）9（9 価ワクチン）は、複数の H P V タイプの V L P を組み合わせて調製されている。しかし、このような解決策は、H P V ワクチンの製造コストを大幅に増加させ、免疫化用量の増加による安全性の問題を引き起こす可能性がある。

30

40

【0005】

したがって、複数の H P V タイプの感染、該感染によって引き起こされる疾患、例えば、子宮頸癌及び尖圭コンジロームをより経済的にかつ効果的に予防するために、複数の H P V タイプに対する防御的な中和抗体の生成を誘導することができる H P V ウイルス様粒子を開発することが当該技術分野における急務である。

【発明の概要】

【0006】

50

発明の内容

本発明は、少なくとも部分的には、本発明者らの驚くべき発見に基づいている：ヒトパピローマウイルス（HPV）タイプ11のL1タンパク質の特定のセグメントを第2のHPVタイプ（HPV6など）のL1タンパク質の対応するセグメントで置換した後、このようにして得られた突然変異型HPV11 L1タンパク質は、生物におけるHPV11及び第2のHPV型（例えばHPV6）に対する高価価中和抗体の生成を誘導することができ、その保護効果は、HPV11 VLP及び第2のHPVタイプのVLPの混合物のものに匹敵し、HPV11に対するその保護効果は、HPV11 VLP単独のものに匹敵し、第2のHPVタイプ（HPV6など）に対するその保護効果は、第2のHPVタイプ単独のVLPのものに匹敵する。

10

【0007】

したがって、一態様では、本発明は、突然変異型HPV11 L1タンパク質又はその改変体を提供し、ここで、野生型HPV11 L1タンパク質と比較して、突然変異型HPV11 L1タンパク質は、以下の突然変異を有する：

（1）3～6アミノ酸、例えば3、4、5又は6アミノ酸のN末端切断；及び

（2）（a）第2のタイプの野生型HPVのL1タンパク質の対応する位置のアミノ酸残基による、野生型HPV11 L1タンパク質の170～179位のアミノ酸残基の置換；又は

（b）第2のタイプの野生型HPVのL1タンパク質の対応する位置のアミノ酸残基による、野生型のHPV11 L1タンパク質の346～351位のアミノ酸残基の置換；又は

20

（c）第2のタイプの野生型HPVのL1タンパク質の対応する位置のアミノ酸残基による、野生型HPV11 L1タンパク質の119～140位のアミノ酸残基の置換；

ならびに、改変体は、1つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9個）のアミノ酸の置換（好ましくは保存的置換）、付加又は欠失のみによる突然変異型HPV11 L1タンパク質とは異なるが、突然変異型HPV11 L1タンパク質の機能、すなわち少なくとも2つのHPVタイプ（例えば、HPV11及びHPV6）に対する中和抗体の生成を誘導する能力を保持する。

【0008】

いくつかの好ましい実施形態では、突然変異型HPV11 L1タンパク質は、野生型HPV11 L1タンパク質と比較して、N末端で切断された4、5、6個のアミノ酸を有する。

30

【0009】

いくつかの好ましい実施形態では、突然変異型HPV11 L1タンパク質は、野生型HPV11 L1タンパク質と比較して、N末端で切断された4個のアミノ酸を有する。

【0010】

いくつかの好ましい実施形態では、第2のタイプの野生型HPVはHPV6である。いくつかの好ましい実施形態では、（2）（a）に記載の対応する位置のアミノ酸残基は、野生型HPV6 L1タンパク質の169～178位のアミノ酸残基である。

【0011】

いくつかの好ましい実施形態では、第2のタイプの野生型HPVはHPV6である。いくつかの好ましい実施形態では、（2）（b）に記載の対応する位置のアミノ酸残基は、野生型HPV6 L1タンパク質の345～350位のアミノ酸残基である。

40

【0012】

いくつかの好ましい実施形態では、第2のタイプの野生型HPVはHPV6である。いくつかの好ましい実施形態では、（2）（v）に記載の対応する位置のアミノ酸残基は、野生型HPV6 L1タンパク質の119～139位のアミノ酸残基である。

【0013】

いくつかの好ましい実施形態では、野生型HPV11 L1タンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する。

50

【 0 0 1 4 】

いくつかの好ましい実施形態では、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 1 5 】

いくつかの好ましい実施形態では、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 1 6 9 ~ 1 7 8 位のアミノ酸残基は、配列番号 3 5 に記載の配列を有する。

【 0 0 1 6 】

いくつかの好ましい実施形態では、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 3 4 5 ~ 3 5 0 位のアミノ酸残基は、配列番号 3 6 に記載の配列を有する。

【 0 0 1 7 】

いくつかの好ましい実施形態では、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 1 1 9 ~ 1 3 9 位のアミノ酸残基は、配列番号 3 7 に記載の配列を有する。

【 0 0 1 8 】

いくつかの好ましい実施形態では、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質は、配列番号 6、7 及び 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、上記のような突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体をコードする単離された核酸を提供する。別の態様では、本発明は、単離された核酸を含むベクターを提供する。いくつかの好ましい実施形態では、本発明による単離された核酸は、配列番号 1 3、1 4 及び 1 6 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する。

【 0 0 2 0 】

目的のポリヌクレオチドの挿入に有用なベクターは、当該技術分野において周知であり、例えば、限定されないが、クローニングベクター及び発現ベクターが挙げられる。一実施形態では、ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ファージなどである。

【 0 0 2 1 】

別の態様では、本発明はさらに、単離された核酸又はベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞としては、限定されないが、原核細胞、例えば、大腸菌、ならびに真核細胞、例えば、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞及び動物細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えばマウス細胞、ヒト細胞など）が含まれる。本発明に係る宿主細胞は、2 9 3 T 細胞などの細胞株であってもよい。

【 0 0 2 2 】

別の態様では、本発明は、本発明に係る突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体を含む又はそれからなる H P V ウイルス様粒子に関する。

【 0 0 2 3 】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明に係る H P V ウイルス様粒子は、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を含み、該タンパク質は、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質と比較して、3 ~ 6 アミノ酸、例えば、3、4、5 又は 6 アミノ酸の N 末端切断を有し、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 1 6 9 ~ 1 7 8 位のアミノ酸残基のよる、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質の 1 7 0 ~ 1 7 9 位のアミノ酸残基の置換を有する。

【 0 0 2 4 】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明に係る H P V ウイルス様粒子は、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を含み、該タンパク質は、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質と比較して、3 ~ 6 アミノ酸、例えば、3、4、5 又は 6 アミノ酸の N 末端切断を有し、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 3 4 5 ~ 3 5 0 位のアミノ酸残基のよる、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 3 4 6 ~ 3 5 1 位のアミノ酸残基の置換を有する。

【 0 0 2 5 】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明に係る H P V ウイルス様粒子は、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を含み、該タンパク質は、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質と比較して、5 ~ 6 アミノ酸、例えば、3、4、5 又は 6 アミノ酸の N 末端切断を有し、

野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 1 1 9 ~ 1 3 9 位のアミノ酸残基のよる、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質の 1 1 9 ~ 1 4 0 位のアミノ酸残基の置換を有する。

【 0 0 2 6 】

特に好ましい実施形態では、本発明に係る H P V ウイルス様粒子は、配列番号 6、7 又は 1 9 に記載の配列を有する突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質を含む。

【 0 0 2 7 】

別の態様において、本発明はさらに、突然変異 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体、単離された核酸、ベクター、宿主細胞、又は H P V ウイルス様粒子を含む組成物に関する。いくつかの好ましい実施形態では、組成物は、本発明に係る突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体を含む。いくつかの好ましい実施形態では、組成物は、本発明に係る H P V ウイルス様粒子を含む。

10

【 0 0 2 8 】

別の態様では、本発明はさらに、本発明に係る H P V ウイルス様粒子、及び場合により医薬として許容される担体及び / 又は賦形剤を含む医薬組成物又はワクチンに関する。本発明に係る医薬組成物又はワクチンは、H P V 感染、又は H P V 感染によって引き起こされる疾患、例えば、子宮頸癌及び尖圭コンジロームを予防するために使用することができる。

【 0 0 2 9 】

いくつかの好ましい実施形態では、H P V ウイルス様粒子は、H P V 感染又は H P V 感染によって引き起こされる疾患を予防するのに有効な量で存在する。いくつかの好ましい実施形態では、H P V 感染は、1 つ以上の H P V タイプによる感染（例えば、H P V 1 1 感染及び / 又は H P V 6 感染）である。いくつかの好ましい実施形態では、H P V 感染によって引き起こされる疾患は、子宮頸癌及び尖圭コンジロームからなる群より選択される。

20

【 0 0 3 0 】

本発明に係る医薬組成物又はワクチンは、当該技術分野で周知の方法、例えば、限定されないが、経口的に又は注射によって投与することができる。本発明において、特に好ましい投与経路は注射である。

【 0 0 3 1 】

いくつかの好ましい実施形態では、本発明に係る医薬組成物又はワクチンは、単位用量の形態で投与される。例えば、本発明を限定するものではないが、各単位用量は、5 μ g ~ 8 0 μ g、好ましくは 2 0 μ g ~ 4 0 μ g の H P V ウイルス様粒子を含有する。

30

【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明は、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体を宿主細胞で発現させ、次に、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体を宿主細胞の培養物から回収することを含む、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体を調製する方法に関する。

【 0 0 3 3 】

いくつかの好ましい実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。

【 0 0 3 4 】

いくつかの好ましい実施形態では、この方法は、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体が大腸菌で発現させ、次に、大腸菌の溶解物上清を精製することによって突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体を得る工程を含む。いくつかの好ましい実施形態において、突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質又はその改変体は、クロマトグラフィー（例えば、陽イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及び / 又は疎水性相互作用クロマトグラフィー）によって大腸菌の溶解物上清から回収される。

40

【 0 0 3 5 】

別の態様では、本発明は、本発明に係る H P V ウイルス様粒子を医薬として許容される担体及び / 又は賦形剤と組み合わせることを含む、ワクチンを調製する方法に関する。

50

【 0 0 3 6 】

別の態様では、本発明は、本発明に係るＨＰＶウイルス様粒子又は医薬組成物若しくはワクチンの予防有効量を対象に投与することを含む、ＨＰＶ感染又はＨＰＶ感染によって引き起こされる疾患を予防する方法に関する。好ましい実施形態では、ＨＰＶ感染は、１つ以上のＨＰＶタイプによる感染（例えば、ＨＰＶ１１感染及び／又はＨＰＶ６感染）である。別の好ましい実施形態では、ＨＰＶ感染によって引き起こされる疾患には、限定されないが、子宮頸癌及び尖圭コンジロームが含まれる。別の好ましい実施形態では、対象はヒトなどの哺乳動物である。

【 0 0 3 7 】

別の態様では、本発明はさらに、ＨＰＶ感染又はＨＰＶ感染によって引き起こされる疾患を予防するための医薬組成物又はワクチンの製造における、本発明の突然変異型ＨＰＶ１１　Ｌ１タンパク質若しくはその改変体又はＨＰＶウイルス様粒子の使用に関する。好ましい実施形態では、ＨＰＶ感染は、１つ以上のＨＰＶタイプによる感染（例えば、ＨＰＶ１１感染及び／又はＨＰＶ６感染）である。別の好ましい実施形態では、ＨＰＶ感染によって引き起こされる疾患には、限定されないが、子宮頸癌及び尖圭コンジロームが含まれる。

【 0 0 3 8 】

本発明における用語の定義

本発明において、他に特定しない限り、本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有する。さらに、本明細書で使用される細胞培養、分子遺伝学、核酸化学及び免疫学の実験室操作は、対応する分野で広く使用されているルーチン操作である。一方、本発明をよりよく理解するために、関連用語の定義及び説明は以下のように提供される。

【 0 0 3 9 】

本発明によれば、「第２のタイプの野生型ＨＰＶ」という用語は、ＨＰＶ１１以外の野生型ＨＰＶタイプを指す。本発明において、第２のタイプの野生型ＨＰＶは、好ましくは野生型ＨＰＶ６である。

【 0 0 4 0 】

本発明によれば、表現「対応する位置」は、配列が最適に整列された場合に比較される配列の等価な位置を指す。すなわち、配列は最も高いパーセンテージの同一性を得るために整列される。

【 0 0 4 1 】

本発明によれば、用語「野生型ＨＰＶ１１　Ｌ１タンパク質」は、ヒトパピローマウイルスタイプ１１（ＨＰＶ１１）における天然に存在する主要なキャプシドタンパク質Ｌ１を指す。野生型ＨＰＶ１１　Ｌ１タンパク質の配列は当該技術分野で周知であり、公的データベース（ＮＣＢＩデータベースのアクセッション番号Ｍ１４１１９．１、ＡＦ３３５６０３．１、ＡＦ３３５６０２．など）に見出すことができる。

【 0 0 4 2 】

本発明において、野生型ＨＰＶ１１　Ｌ１タンパク質のアミノ酸配列が言及される場合、それは配列番号１に記載の配列を参照して記載される。例えば、「野生型ＨＰＶ１１　Ｌ１タンパク質の１７０～１７９位のアミノ酸残基」とは、配列番号１に記載のポリペプチドの１７０～１７９位のアミノ酸残基をいう。しかしながら、当業者は、野生型ＨＰＶ１１は様々な分離株を含み得て、様々な分離株の間でＬ１タンパク質のアミノ酸配列に差異があり得ることを理解する。さらに、当業者は、配列の相違があり得るが、Ｌ１タンパク質のアミノ酸配列は、様々なＨＰＶ１１分離株の中で、非常に高い同一性（一般に９５％より高い、例えば９６％より高い、９７％より高い、９８％より高い、又は９９％より高い）を有し、実質的に同じ生物学的機能を有することを理解する。したがって、本発明において、「野生型ＨＰＶ１１　Ｌ１タンパク質」という用語には、配列番号１に記載のタンパク質だけでなく、種々のＨＰＶ１１分離株のＬ１タンパク質（ＮＣＢＩデータベースのアクセッション番号Ｍ１４１１９．１、ＡＦ３３５６０３．１、ＡＦ３３５６０２．な

10

20

30

40

50

どによってコードされるH P V 1 1 L 1タンパク質など)も含まれる。さらに、野生型H P V 1 1 L 1タンパク質の配列断片が記載される場合、配列番号1の配列断片だけでなく、様々なH P V 1 1分離株のL 1タンパク質の対応する配列断片も含む。例えば、表現「野生型H P V 1 1 L 1タンパク質の170～179位のアミノ酸残基」は、配列番号1の170～179位のアミノ酸残基及び種々のH P V 1 1分離株のL 1タンパク質の対応する断片を含む。

【0043】

本発明によれば、用語「野生型H P V 6 L 1タンパク質」は、ヒトパピローマウイルス6タイプ(H P V 6)における天然に存在する主要なキャプシドタンパク質L 1を指す。野生型H P V 6 L 1タンパク質の配列は、当該技術分野で周知であり、公的データベース(例えば、NCBIデータベースのアクセッション番号AF067042.1、AF092932.1、L41216.1、XOO203.1によってコードされるH P V 6 L 1タンパク質など)に見出すことできる。

【0044】

本発明において、野生型H P V 6 L 1タンパク質のアミノ酸配列が言及される場合、それは配列番号2に記載の配列を参照して記載される。例えば、表現「野生型H P V 6 3 L 1タンパク質の169～178位のアミノ酸残基」とは、配列番号2に記載のポリペプチドの169～178位のアミノ酸残基をいう。しかしながら、当業者は、野生型H P V 6が、様々な分離株を含み得て、様々な分離株の間でL 1タンパク質のアミノ酸配列に差異があり得ることを理解する。さらに、当業者は、配列の相違があり得るが、様々なH P V 6分離株の中で、L 1タンパク質のアミノ酸配列は非常に高い同一性(一般に95%より高い、例えば96%より高い、97%より高い、98%より高い、又は99%より高い)を有し、実質的に同じ生物学的機能を有することを理解する。したがって、本発明において、用語「野生型H P V 6 L 1タンパク質」には、配列番号2に記載のタンパク質だけでなく、種々のH P V 6分離株のL 1タンパク質(NCBIデータベースのアクセッション番号AF067042.1、AF092932.1、L41216.1、XOO203.1によってコードされるH P V 6 L 1タンパク質など)も含まれる。さらに、野生型H P V 6 L 1タンパク質の配列断片が記載される場合、配列番号2の配列断片だけでなく、様々なH P V 6分離株のL 1タンパク質の対応する配列断片も含む。例えば、表現「野生型H P V 6 L 1タンパク質の169～178位のアミノ酸残基」には、配列番号2の169～178位のアミノ酸残基及び種々のH P V 6分離株のL 1タンパク質の対応する断片が含まれる。

【0045】

本発明によれば、表現「対応する配列断片」又は「対応する断片」は、配列が最適に整列された場合に比較される配列の等価な位置に位置する断片を指す。すなわち、配列は、最大の同一性パーセンテージを得るために整列される。

【0046】

本発明によれば、表現「Xアミノ酸のN末端切断」又は「N末端で切断されたXアミノ酸を有する」とは、(タンパク質翻訳を開始するための)開始コドンによってコードされるメチオニン残基による、タンパク質のN末端での1～X位のアミノ酸残基の置換を指す。例えば、N末端で切断された4アミノ酸を有するH P V 1 1 L 1タンパク質は、開始コドンによってコードされるメチオニン残基による、野生型H P V 1 L 1タンパク質のN末端での1～4位のアミノ酸残基の置換を指す。

【0047】

本発明によれば、「改変体」という用語は、そのアミノ酸配列が1つ又は複数の(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8又は9個お)アミノ酸の置換(好ましくは保存的置換)、付加又は欠失を有し、又は本発明に係る突然変異型H P V 1 1 L 1タンパク質(例えば、配列番号6、7及び9に記載のタンパク質)と比較して、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有し、突然変異型H P V 1 1 L 1タンパク質の機能を保持しているタンパク質を指す。本発明において、「突然変異型H P

V11 L1タンパク質の機能」という用語は、少なくとも2つのHPVタイプ（例えば、HPV11及びHPV6）に対する中和抗体の生成を誘導する能力を指す。「同一性」という用語は、ヌクレオチド配列間又はアミノ酸配列間の類似性の尺度を指す。一般に、配列は最大マッチングを得るために整列された。「同一性」は、当該技術分野で周知の意味を有し、公開されたアルゴリズム（BLASTなど）によって計算することができる。

【0048】

本発明によれば、用語「同一性」は、2つのポリペプチド間又は2つの核酸間の適合度を指す。比較のための2つの配列が、ある部位に塩基又はアミノ酸の同じモノマーサブユニットを有する場合（例えば、2つのDNA分子のそれぞれが特定の部位にアデニンを有するか、又は2つのポリペプチドのそれぞれが特定の部位にリジンを有する）、2つの分子はその部位で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、比較のために部位の総数×100に対して2つの配列によって共有される同一の部位数の関数である。例えば、2つの配列の10部位のうちの6つが一致する場合、これら2つの配列は60%の同一性を有する。例えば、DNA配列：CTGACT及びCAGGTTは、50%の同一性を共有する（6つの部位のうち3つが一致する）。一般に、2つの配列の比較は、同一性を最大に行われる。このようなアラインメントは、例えば、Needleman（J. Mol. Biol. 48: 443-453, 1970）らの方法に基づくAlignプログラム（DNASTAR, Inc.）などのコンピュータプログラムを用いて行うことができる。2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. Meyers及びW. Miller（Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)）のアルゴリズムを用いて決定することもでき、これは、PAM120加重残基表を使用し、ギャップ長ペナルティ12及びギャップペナルティ4を用いる。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム（<http://www.gcg.com>で利用可能）に組み込まれているNeedleman及びWunsch（J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)）のアルゴリズムによって決定することができ、これは、Blossum 62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれかを使用し、ギャップ加重は16、14、12、10、8、6又は4であり、長さ加重が1、2、3、4、5又は6である。

【0049】

本明細書で使用される「保存的置換」という用語は、アミノ酸配列を含むタンパク質/ポリペプチドの本質的な特性に不都合な影響を与えず、又は変化させないアミノ酸置換を指す。例えば、保存的置換は、部位特異的突然変異誘発及びPCR媒介突然変異誘発のような当該技術分野で公知の標準的技術によって導入され得る。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基、例えば対応するアミノ酸残基に物理的又は機能的に類似した残基（例えば、類似のサイズ、形状、電荷、化学的特性、例えば、共有結合又は水素結合等を形成する能力など）で置換さえる置換を含む。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。したがって、一般に、保存的置換とは、対応するアミノ酸残基を同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換することをいう。アミノ酸保存的置換を同定するための方法は、当該技術分野で周知である（例えば、参照により本明細書に援用されるBrummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12

10

20

30

40

50

(10): 879 - 884 (1999); Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412 - 417 (1997)を参照されたい)。

【0050】

本発明によれば、用語「大腸菌発現系」は、大腸菌(株)及びベクターからなる発現系を意味し、ここで、大腸菌は、限定されないが、ER2566、BL21、B834(DE3)、及びBLR(DE3)を含む市販の株に由来する。

【0051】

本発明によれば、「ベクター」という用語は、その中に挿入されたポリヌクレオチドを有することができる核酸担体ツールを指す。ベクターが、そこに挿入されたポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質の発現を可能にする場合、ベクターは発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、形質転換、形質導入、又は宿主細胞へのトランスフェクションによって、宿主細胞において発現された担持遺伝物質を有することができる。ベクターは、当業者に周知であり、例えば、限定されないが、プラスミド、ファージ、コスミドなどが挙げられる。

【0052】

本発明によれば、「医薬として許容される担体及び/又は賦形剤」という用語は、対象及び活性成分に薬理学的及び/又は生理学的に適合する担体及び/又は賦形剤を指し、当該技術分野において周知であり(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995参照)、例えば、限定されないが、pH調整剤、界面活性剤、アジュバント、及びイオン強度増強剤が挙げられる。例えば、pH調節剤としては、限定されないが、リン酸緩衝液;界面活性剤としては、限定されないが、カチオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、又は非イオン界面活性剤、例えば、Tween-80が含まれ;アジュバントには、限定されないが、アルミニウムアジュバント(例えば、水酸化アルミニウム)及びフロイントアジュバント(例えばフロイント完全アジュバント)が含まれ;イオン強度増強剤としては、限定されないが、NaClが挙げられる。

【0053】

本発明によれば、「有効量」という用語は、意図された目的を効果的に達成することができる量を指す。例えば、疾患(HPV感染など)を予防するのに有効な量は、疾患(HPV感染など)の発生を予防、抑制、又は遅延させるのに有効な量を意味する。そのような有効量の決定は、当業者の能力の範囲内である。

【0054】

本発明によれば、用語「クロマトグラフィー」には、限定されないが、イオン交換クロマトグラフィー(陽イオン交換クロマトグラフィーなど)、疎水性相互作用クロマトグラフィー、吸収クロマトグラフィー(ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなど)、ゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル排除クロマトグラフィー)、及びアフィニティークロマトグラフィーなどが含まれる。

【0055】

本発明によれば、用語「溶解物上清」は、以下の工程によって生成された溶液を指す: 宿主細胞(例えば、大腸菌)を溶解緩衝液中で破壊し、次に、不溶性物質が、破壊された宿主細胞を含む溶解された溶液から除去される。様々な溶解緩衝液が当該技術分野において周知であり、例えば、限定されないが、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液、MOPS緩衝液などが挙げられる。さらに、宿主細胞の破壊は、当業者に周知の方法によって達成することができ、例えば、限定されないが、ホモジナイザー破壊、超音波処理、粉碎、高圧押出、リゾチーム処理が挙げられる。当業者には、不溶性物質を除去する方法も周知であり、これに限定されないが、ろ過及び遠心分離が挙げられる。

【0056】

発明の有益な効果

研究は、HPV11と他のHPVタイプ(HPV6など)との間に一定の交差防御があ

10

20

30

40

50

るが、そのような交差防御は非常に低く、一般的に、同HPVタイプのVLPの保護レベルの1%より低く、さらには1000分の1、さらには1000分の1であることを示す。したがって、HPV11ワクチンでワクチン接種された対象は、他のHPVタイプ（HPV6など）に感染するリスクがなお高い。

【0057】

本発明は、突然変異型HPV11 L1タンパク質及びそれによって形成されるHPVウイルス様粒子を提供する。本発明によるHPVウイルス様粒子は、HPV11及び他のHPVタイプ（例えば、HPV6）に対して有意な交差防御を提供することができる。特に、同じ免疫化用量で、本発明によるHPVウイルス様粒子は、生物中の少なくとも2つのHPVタイプ（例えば、HPV11及びHPV6）に対する高価な中和抗体の生成を誘導することができ、その効果は、複数のHPVタイプのVLPの混合物（例えば、HPV11 VLPとHPV6 VLPの混合物）の効果に匹敵する。したがって、本発明によるHPVウイルス様粒子は、同時に少なくとも2種のHPVタイプ（例えば、HPV11及びHPV6）による感染、ならびに該感染に関連する疾患を予防するために使用することができ、大幅に有益な技術的効果を有する。これは、HPVワクチンの保護範囲を拡大し、HPVワクチンの製造コストを削減するという点で特に重要な利点を有する。

【0058】

本発明の実施形態は、図面及び実施例を参照してさらに詳細に説明される。しかしながら、当業者であれば、以下の図面及び実施例は、本発明の範囲を規定するのではなく、単に本発明を例示することを意図していることを理解する。以下の図面及び好ましい実施形態の詳細な説明によれば、本発明の様々な目的及び利点は、当業者にとって明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】図1は、実施例1における精製された変異型タンパク質のSDS-PAGE結果を示す。レーンM：タンパク質分子量マーカー；レーン1：HPV11N4（N末端で切断された4アミノ酸を有するHPV11 L1タンパク質）；レーン2：H11N4-6T1；レーン3：H11N4-6T2；レーン4：H11N4-6T3；レーン5：H11N4-6T4；レーン6：H11N4-6T5。結果は、クロマトグラフィー精製後、タンパク質H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5は95%以上の純度に達したことを示した。

【図2】図2A～2Fは、タンパク質HPV11N4、H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5をそれぞれ含む試料の分子篩クロマトグラフィー分析の結果を示す。図2A：HPV11N4；図2B：H11N4-6T1；図2C：H11N4-6T2；図2D：H11N4-6T3；図2E：H11N4-6T4；図2F：H11N4-6T5。結果は、H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5をそれぞれ含む試料の最初のタンパク質ピークが約12分で現れ、これはHPV11N4 VLPのそれに匹敵していることを示した。これは、これらの全ての突然変異型タンパク質がVLPにアSEMBLすることができたことを示した。

【図3】図3A～3Fは、HPV11N4 VLP、H11N4-6T1 VLP、H11N4-6T2 VLP、H11N4-6T3 VLP、H11N4-6T4 VLP及びH11N4-6T5 VLPの沈降速度分析の結果を示す。図3A：HPV11N4 VLP；図3B：H11N4-6T1 VLP；図3C：H11N4-6T2 VLP；図3D：H11N4-6T3 VLP；図3E：H11N4-6T4 VLP；図3F：H11N4-6T5 VLP。結果は、H11N4-6T1 VLP、H11N4-6T2 VLP、H11N4-6T3 VLP、H11N4-6T4 VLP及びH11N4-6T5 VLPの沈降係数は、それぞれ140S、138S、111S、139S及び139Sであったことを示した。これは、上記で調製した5つの突然変異型HPV11 L1が、サイズ及び形態に関して野生型VLP（HPV11N4 VLP、136.3S

）に類似したウイルス様粒子にアセンブルできることを示した。

【図4】図4A～4Fは、様々なVLPサンプルの透過型電子顕微鏡（TEM）写真（100,000倍、バー＝0.1μmで撮影）を示す。図4A、HPV11N4 VLP；図4B、H11N4-6T1 VLP；図4C、H11N4-6T2 VLP；図4D、H11N4-6T3 VLP；図4E、H11N4-6T4 VLP；図4F、H11N4-6T5 VLP。結果は、H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5が、HPV11N4と類似しており、約25nmの半径を有するVLPにアセンブルし得たことを示した。

【図5】図5A～5Fは、それぞれHPV11N4、H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5によって形成される熱安定性評価の結果を示す。図5A、HPV11N4 VLP；図5B、H11N4-6T1 VLP；図5C、H11N4-6T2 VLP；図5D、H11N4-6T3 VLP；図5E、H11N4-6T4 VLP；図5F、H11N4-6T5 VLP。結果は、これらのタンパク質によって形成された全てのVLPが非常に高い熱安定性を有することを示した。

【図6】図6A～6Dは、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの低温電子顕微鏡（cryoEM）写真及び分析された構造を示す；図6A及び図6Cは、それぞれH11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの低温電子顕微鏡（cryoEM）写真を示す；図6B及び図6Dは、低温電子顕微鏡（cryoEM）を用いて分析したH11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの3次元構造を示し、それぞれ17.38及び20.48の解像度であった。

【図7】図7は、マウスにおける実験グループH11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4とH11N4-6T5、及び対照グループHPV11N4 VLP、HPV6N5 VLPと混合HPV11/HPV6 VLPの免疫防御の評価結果を示す。結果は以下を示した：H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPのいずれかが、マウスにおけるHPV11及びHPV6に対する高力価中和抗体の生成を誘導し得た；それらのHPV11に対する防御効果は、HPV11N4 VLP単独又は混合HPV11/HPV6 VLPのものに匹敵し、HPV6N5 VLP単独のものよりも有意に高かった。HPV6に対するそれらの防御効果は、HPV6N5 VLP単独又は混合HPV11/HPV6 VLPのものに匹敵し、HPV11N4 VLP単独よりも有意に高かった。H11N4-6T2 VLPはまた、マウスにおいてHPV11及びHPV6に対する高力価中和抗体の生成を誘導し得るが、HPV6に対する中和抗体の生成を誘導するその能力は、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPよりも弱かった。これらの結果は、H11N4-6T2 VLP、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPが、HPV11感染及びHPV6感染を予防するための有効なワクチンとして使用でき、HPV11 VLP及びHPV6 VLPを含む混合ワクチンの代わりに使用できることを示した。

【図8】図8A～図8Cは、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPをそれぞれマウスにワクチン接種した後のマウス血清中の中和抗体力価の評価結果を示す。図8A：アルミニウムアジュバントグループ1（10μgの免疫化用量でアルミニウムアジュバントを使用）；図8B：アルミニウムアジュバントグループ2（1μgの免疫化用量でアルミニウムアジュバントを使用）；図8C：アルミニウムアジュバントグループ3（0.1μgの免疫化用量でアルミニウムアジュバントを使用）。結果は以下を示した：H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPのいずれかが、マウスにおけるHPV11に対する高力価中和抗体の生成を誘導することができ、それらの保護効果が、同用量でHPV11N4 VLP単独のもの又は混合したHPV11/HPV6 VLPのものに匹敵し、同用量でHPV6N5 VLP単独のものよりも有意に優れていた。それらは、マウスにおけるHPV6に対して高力価の中和抗体の産生を誘導することができ、それらの保護効果が、同用量でHPV6N5 VLP単独のもの又は混合したHPV11/HPV6 VLPのものに匹敵し、同用量でHPV11N4 VLP単独の

ものよりも有意に優れていた。これは、HPV 11 及び HPV 6 に対して、H 11 N 4 - 6 T 3 VLP と H 11 N 4 - 6 T 5 VLP は、良好な交差免疫原性及び交差防御を有することを示した。

【図 9】図 9 は、カニクイザルを H 11 N 4 - 6 T 3 VLP 又は H 11 N 4 - 6 T 5 VLP でワクチン接種した後のカニクイザル血清中の中和抗体の評価結果を示す。結果は、H 11 N 4 - 6 T 3 VLP 及び H 11 N 4 - 6 T 5 VLP のいずれかが、カニクイザルにおける HPV 11 及び HPV 6 に対する高力価の中和抗体の生成を誘導し得、それらの保護効果が、混合 HPV 11 / HPV 6 VLP のものに匹敵することを示した。これは、H 11 N 4 - 6 T 3 VLP 及び H 11 N 4 - 6 T 5 VLP が、HPV 11 と HPV 6 に対して良好な交差免疫原性及び交差保護を有することを示した。

10

【0060】

配列情報

本発明に關与する配列のいくつかを以下の表 1 に提供する。

【0061】

【表 1】

表 1：配列の詳細

配列番号	詳細
1	野生型 HPV 11 L1 タンパク質
2	野生型 HPV 6 L1 タンパク質
3	N 末端で 4 アミノ酸が切断された HPV 11 L1 タンパク質、HPV 11 N 4
4	N 末端で 5 アミノ酸が切断された HPV 6 L1 タンパク質、HPV 6 N 5
5	HPV 6 L1 タンパク質のセグメント 1 を含む突然変異型 HPV 11 L1 タンパク質、H 11 N 4 - 6 T 1
6	HPV 6 L1 タンパク質のセグメント 2 を含む突然変異型 HPV 11 L1 タンパク質、H 11 N 4 - 6 T 2
7	HPV 6 L1 タンパク質のセグメント 3 を含む突然変異型 HPV 11 L1 タンパク質、H 11 N 4 - 6 T 3
8	HPV 6 L1 タンパク質のセグメント 4 を含む突然変異型 HPV 11 L1 タンパク質、H 11 N 4 - 6 T 4
9	HPV 6 L1 タンパク質のセグメント 5 を含む突然変異型 HPV 11 L1 タンパク質、H 11 N 4 - 6 T 5
10	配列番号 3 をコードする DNA 配列
11	配列番号 4 をコードする DNA 配列
12	配列番号 5 をコードする DNA 配列
13	配列番号 6 をコードする DNA 配列
14	配列番号 7 をコードする DNA 配列
15	配列番号 8 をコードする DNA 配列
16	配列番号 9 をコードする DNA 配列
35	野生型 HPV 6 L1 タンパク質の 169 ~ 178 位の アミノ酸残基の配列
36	野生型 HPV 6 L1 タンパク質の 345 ~ 350 位の アミノ酸残基の配列
37	野生型 HPV 6 L1 タンパク質の 119 ~ 139 位の アミノ酸残基の配列

20

30

40

【0062】

配列 1 (配列番号 1) :

MWRPSDSTVYVPPNPVSKVVATDAYVKRTNIFYHASSRLLAVGHPYYSIKKVNKTVVPKVSQYQYRVFKVVLDPNKF
ALPDSSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKYDDVENSQGGYGGNPGQDNRNVNMGMDYKQTQLCMVGCAP
PLGEHWGKGTQCSNTSVQNGDCPPLELITSVIQDGMVDTGFGAMNFADLQTNKSDVPLDICGTVCYKPYDYLQMAADPYG

50

DRLFFYLKEQMFARHFFNRAGTVGEPVPDDLLVKGGNNRSSVASSIYVHTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGIC
CWGNHLFVTVVDTTRSTNMTLCASVSKSATYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIQFLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNF
GLSPPPNGTLEDYTRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKDMFSFEVNLKEKFSSELDQFPLGRKFLLQSGYRGRTSARTGI
KRPAVSKPSTAPKRKRRTKTKK

【 0 0 6 3 】

配列 2 (配列番号 2) :

MWRPSDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVTRTNI FYHASSSRLLAVGHPYFSI KRANKTVVPKVSQYQYRVFKVVLDPNKF
ALPDSSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGGRQPLGVGVSGHPFLNKYDDVENS GSGGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPP
LGEHWGKGKQCTNTPVQAGDCPPLELITSVIQDGDMDVTGFGAMNFADLQTNKSDVPLDIGTTCCKYPDYQLMAADPYGD
RLFFFYLKEQMFARHFFNRAGEVGEVPDTLIKGSGNRTSVGSSIYVNTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGIC
WGNQLFVTVVDTTRSTNMTLCASVTSSTYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIQFLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFG
LSPPPNGTLEDYTRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKNLSFEVNLKEKFSSELDQYPLGRKFLLQSGYGRSSIRTG
RPAVSKASAAPKRKRKRAKTKR

10

【 0 0 6 4 】

配列 3 (配列番号 3) :

MSDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVTRTNI FYHASSSRLLAVGHPYFSI KKVNTVVPKVSQYQYRVFKVVLDPNKFALP
DSSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGGRQPLGVGVSGHPFLNKYDDVENS GGGYGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPPLG
EHWGKGTQCSNTSVQNGDCPPLELITSVIQDGDMDVTGFGAMNFADLQTNKSDVPLDIGTVCKYPDYQLMAADPYGDRL
FFYLKEQMFARHFFNRAGTVGEPVPDDLLVKGGNNRSSVASSIYVHTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICW
GNHLFVTVVDTTRSTNMTLCASVSKSATYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIQFLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFG
LSPPPNGTLEDYTRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKDMFSFEVNLKEKFSSELDQYPLGRKFLLQSGYGRSSIRTG
RPAVSKPSTAPKRKRRTKTKK

20

【 0 0 6 5 】

配列 4 (配列番号 4) :

MDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVTRTNI FYHASSSRLLAVGHPYFSI KRANKTVVPKVSQYQYRVFKVVLDPNKFALP
DSSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGGRQPLGVGVSGHPFLNKYDDVENS GSGGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPPLG
EHWGKGTQCSNTSVQNGDCPPLELITSVIQDGDMDVTGFGAMNFADLQTNKSDVPLDIGTTCCKYPDYQLMAADPYGDRL
FFYLKEQMFARHFFNRAGEVGEVPDTLIKGSGNRTSVGSSIYVNTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICW
GNLHFVTVVDTTRSTNMTLCASVTSSTYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIQFLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFG
LSPPPNGTLEDYTRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKNLSFEVNLKEKFSSELDQYPLGRKFLLQSGYGRSSIRTG
RPAVSKASAAPKRKRKRAKTKR

30

【 0 0 6 6 】

配列 5 (配列番号 5) :

MSDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVTRTNI FYHASSSRLLAVGHPYFSI KKVNTVVPKVSQYQYRVFKVVLDPNKFALP
DSSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGGRQPLGVGVSGHPFLNKYDDVENS GGGYGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPPLG
EHWGKGTQCSNTSVQNGDCPPLELITSVIQDGDMDVTGFGAMNFADLQTNKSDVPLDIGTVCKYPDYQLMAADPYGDRL
FFYLKEQMFARHFFNRAGTVGEPVPDDLLVKGGNNRSSVASSIYVHTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICW
GNHLFVTVVDTTRSTNMTLCASVSKSATYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIQFLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFG
LSPPPNGTLEDYTRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKDMFSFEVNLKEKFSSELDQYPLGRKFLLQSGYGRSSIRTG
RPAVSKPSTAPKRKRRTKTKK

40

【 0 0 6 7 】

配列 6 (配列番号 6) :

MSDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVTRTNI FYHASSSRLLAVGHPYFSI KKVNTVVPKVSQYQYRVFKVVLDPNKFALP
DSSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGGRQPLGVGVSGHPFLNKYDDVENS GSGGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPPLG
HWGKGTQCSNTSVQNGDCPPLELITSVIQDGDMDVTGFGAMNFADLQTNKSDVPLDIGTVCKYPDYQLMAADPYGDRL
FFYLKEQMFARHFFNRAGTVGEPVPDDLLVKGGNNRSSVASSIYVHTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICW
GNHLFVTVVDTTRSTNMTLCASVSKSATYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIQFLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFG
LSPPPNGTLEDYTRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKDMFSFEVNLKEKFSSELDQYPLGRKFLLQSGYGRSSIRTG
RPAVSKPSTAPKRKRRTKTKK

【 0 0 6 8 】

50

配列 7 (配列番号 7) :

Sequence 7 (SEQ ID NO: 7):

MSDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVKRTNIFYHASSSRLLAVGHPYYSIKKVNKTVVPKVSGYQYRVFKVVLDPNKFALP
DSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKYDDVENSNGGYGGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPPLG
EHWGKGKQCTNTPVQAGDCPPLELITSVIQDGMVDTFGAMNFADLQTNKSDVPLDICGTVCKYPDYLQMAADPYGDRL
FFYLKKEQMFARHFFNRAGTVGEPVPDDLKVGGNNRSSVASSIYVHTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICWG
NHLFVTVVDTRSTNMTLCASVSKSATYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIFQLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFGLS
PPNGTLEDYRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKDMSFWEVNLKEKFSSELDQFPLGRKFLLQSGYRGRTSARTGIKRP
AVSKPSTAPKRKRKTKK

【 0 0 6 9 】

10

配列 8 (配列番号 8) :

MSDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVKRTNIFYHASSSRLLAVGHPYYSIKKVNKTVVPKVSGYQYRVFKVVLDPNKFALP
DSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKYDDVENSNGGYGGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPPLG
EHWGKGKQCSNTSVQNGDCPPLELITSVIQDGMVDTFGAMNFADLQTNKSDVPLDICGTVCKYPDYLQMAADPYGDRL
FFYLKKEQMFARHFFNRAGEVGEPVPTDLIKGSGNRTSVGSSIYVHTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICWG
NHLFVTVVDTRSTNMTLCASVSKSATYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIFQLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFGLS
PPNGTLEDYRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKDMSFWEVNLKEKFSSELDQFPLGRKFLLQSGYRGRTSARTGIKRP
AVSKPSTAPKRKRKTKK

【 0 0 7 0 】

配列 9 (配列番号 9) :

MSDSTVYVPPPNPVSKVVATDAYVKRTNIFYHASSSRLLAVGHPYYSIKKVNKTVVPKVSGYQYRVFKVVLDPNKFALP
DSSLFDPTTQRLVWACTGLEVGRGQPLGVGVSGHPLLNKYDDVENSNGGYGGNPGQDNRVNVGMDYKQTQLCMVGCAPPLG
EHWGKGKQCSNTSVQNGDCPPLELITSVIQDGMVDTFGAMNFADLQTNKSDVPLDICGTVCKYPDYLQMAADPYGDRL
FFYLKKEQMFARHFFNRAGTVGEPVPDDLKVGGNNRSSVASSIYVHTPSGSLVSSEAQLFNKPYWLQKAQGHNNGICWG
NHLFVTVVDTRSTNMTLCASVTSSTYTNSDYKEYMRHVEEFDLQFIFQLCSITLSAEVMAYIHTMNPSVLEDWNFGLS
PPNGTLEDYRYVQSQAITCQKPTPEKEKQDPYKDMSFWEVNLKEKFSSELDQFPLGRKFLLQSGYRGRTSARTGIKRP
AVSKPSTAPKRKRKTKK

【 0 0 7 1 】

配列 10 (配列番号 10) :

ATGAGCGACAGCACAGTATATGTGCCTCCTCCCAACCCTGTATCCAAGGTTGTTGCCACGGATGCGTATGTTAAACGCAC
CAACATATTTTATCACGCCAGCAGTTCTAGACTCCTTGCTGTGGGACATCCATATTACTCTATCAAAAAAGTTAACAAAA
CAGTTGTACCAAAGGTGTCTGGATATCAATATAGAGTGTAAAGGTAGTGTGCCAGATCCTAACAAAGTTTGATTACCT
GATTCATCTCTGTTTGACCCCACTACACAGCGTTTAGTATGGCGGTGCACAGGGTTGGAGGTAGGCAGGGGTCAACCTTT
AGGCGTTGGTGTAGTGGGCATCCATTGCTAAACAAATATGATGATGTAGAAAATAGTGGTGGGTATGGTGGTAATCCTG
GTCAGGATAATAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACCCAGCTATGTATGGTGGGCTGTGCTCCACCGTTAGGT
GAACATTGGGGTAAGGGTACACAAATGTTCAAATACCTCTGTACAAAATGGTGACTGCCCCCGTTGGAATTATTACCAG
TGTTATACAGGATGGGGACATGGTTGATACAGGCTTTGGTCTATGAATTTTGCACTTACAAACCAATAAATCGGATG
TTCCCTTGATATTTGTGGAAGTGTCTGCAAATATCCTGATTATTTGCAAATGGCAGCAGACCCCTTATGGTGATAGTTG
TTTTTTATTTGCGAAAGGAACAAATGTTTGCTAGACACTTTTTTAATAGGGCCGGTACTGTGGGGGAACCTGTGCCTGA
TGACCTGTTGGTAAAAGGGGTAATAATAGGTCATCTGTAGCTAGTAGTATTTATGTACATACACCTAGTGGATCCTTGG
TGTCTTCAGAGGCTCAATTATTTAATAAACCATATTGGCTTCAAAGGCTCAGGGACATAACAATGGTATTTGCTGGGGA
AACCCTTGTTTGTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACAAATATGACACTATGTGCATCTGTGTCTAAATCTGCTAC
ATACACTAATTCAGATTATAAGGAATATATGCGCCATGTGGAGGAGTTTGATTTACAGTTTATTTTCAATTGTGTAGCA
TTACATTATCTGCAGAAGTCATGGCCTATATACACACAATGAATCCTTCTGTTTTGGAGGACTGGAACCTTTGGTTTATCG
CCTCCACCAAATGGTACACTGGAGGATACTTATAGATATGTACAGTCACAGGCCATTACCTGTCAGAAACCCACACCCGA
AAAAGAAAAACAGGACCCCTATAAGGATATGAGTTTTTGGGAGGTTAACTTAAAAGAAAAGTTTTCTTCTGAATTAGATC
AGTTTCCCTTGGACGTAAGTTTTTATTGCAAAGTGATATCGAGGACGGACGTCTGCTCGTACAGGTATAAAGCGCCCA
GCTGTGTCTAAGCCCTCTACAGCCCCCAAACGAAAACGTACCAAAACCAAAAAGTAA

【 0 0 7 2 】

配列 11 (配列番号 11) :

50

ATGGACAGCACAGTATATGTGCCTCCTCCTAACCTGTATCCAAAGTTGTTGCCACGGATGCTTATGTTACTCGCACCAA
CATATTTTATCATGCCAGCAGTTCTAGACTTCTTGCAAGTGGTGCATCCTTATTTTTCCATAAAACGGGCTAACAAAAGT
TTGTGCCAAAGGTGTCAGGATATCAATACAGGGTATTTAAGGTGGTGTACCAGATCCTAACAAATTTGCATTGCCTGAC
TCGTCTCTTTTTGATCCCACAACACAACGTTTGGTATGGGCATGCACAGGCCTAGAGGTGGGACAGGGGACAGCCATTAGG
TGTGGGTGTAAGTGGACATCCTTTCTAAATAAATATGATGATGTTGAAAATTCAGGGAGTGGTGGTAACCCTGGACAGG
ATAACAGGGTTAATGTTGGTATGGATTATAAACAAACACAATTATGCATGGTTGGATGTGCCCCCTTTGGGCGAGCAT
TGGGGTAAAGGTAAACAGTGTACTAATACACCTGTACAGGCTGGTGAAGTGGGCGCCCTTAGAACTTATTACCAGTGTAT
ACAGGATGGCGATATGGTTGACACAGGCTTTGGTGTATGAATTTTGCTGATTTGCAGACCAATAAATCAGATGTTCCCTA
TTGATATATGTGGCACTACATGTAATATCCAGATTATTTACAAATGGCTGCAGACCCCTTATGGTGATAGATTATTTTTT
TTTCTACGGAAGGAACAAATGTTTGCCAGACATTTTTTTAACAGGGCTGGCGAGGTGGGGGAACCTGTGCCTGATACTCT
TATAATTAAGGGTAGTGAAATCGAACGTCTGTAGGGAGTAGTATATATGTTAACACCCCAAGCGGCTCTTTGGTGTCTCT
CTGAGGCACAATTGTTTAATAAGCCATATTGGCTACAAAAAGCCAGGGACATAACAATGGTATTTGTTGGGGTAATCAA
CTGTTTGTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACCAACATGACATTATGTGCATCCGTAACCTACATCTTCCACATACAC
CAATTCTGATTATAAAGAGTACATGCGTCATGTGGAAGAGTATGATTTACAATTTATTTTTCAATTATGTAGCATTACAT
TGTCTGTGAAGTAGTGGCCTATATTCACACAATGAATCCCTCTGTTTTGGAAGACTGGAACCTTTGGGTTATCGCCTCCC
CCAAATGGTACATTAGAAGATACCTATAGGTATGTGCAGTCACAGGCCATTACCTGTCAAAAGCCCACTCCTGAAAAGCA
AAAGCCAGATCCCTATAAGAACCTTAGTTTTTGGGAGGTAAATTTAAAGAAAAGTTTTCTAGTGAATTGGATCAGTATC
CTTTGGGACGCAAGTTTTTTGTACAAAGTGGATATAGGGGACGGTCTCTATTCTGACCGGTGTTAAGCGCCCTGCTGTT
TCCAAAGCCTCTGCTGCCCTAAACGTAAGCGCGCCAAAACCTAAAAGGTAA

10

【 0 0 7 3 】

20

配列 1 2 (配列番号 1 2) :

ATGAGCGACAGCACAGTATATGTGCCTCCTCCCAACCCTGTATCCAAGGTTGTTGCCACGGATGCGTATGTTAAACGCAC
CAACATATTTTATCACGCCAGCAGTTCTAGACTCCTTGCTGTGGGACATCCATATTTTCCATAAAACGGGCTAACAAAA
CTGTTGTGCCAAAGGTGTCAGGATATCAATATAGAGTGTAAAGGTAGTGTGCCAGATCCTAACAAAGTTTGCATTACCT
GATTCATCTCTGTTTGACCCCACTACACAGCGTTTAGTATGGGCGTGACAGGGTTGGAGGTAGGCAGGGGTCAACCTTT
AGGCGTTGGTGTAGTGGGCATCCATTGCTAAACAAATATGATGATGTAGAAAATAGTGGTGGGTATGGTGGTAATCCTG
GTCAGGATAATAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACCCAGCTATGTATGGTGGGCTGTGCTCCACCGTTAGGT
GAACATTGGGGTAAGGTACACAATGTTCAAATACCTCTGTACAAAATGGTGAAGTGGGCGGTTGGAACCTATTACCAG
TGTTATACAGGATGGGGACATGGTTGATACAGGCTTTGGTGTATGAATTTGCAGACTTACAAACCAATAAATCGGATG
TTCCCTTGATATTTGTGGAACGTCTGCAAAATATCCTGATTATTTGCAAAATGGCAGCAGACCCCTTATGGTGATAGGTTG
TTTTTTTATTTGCGAAAGGAACAAATGTTTGCTAGACACTTTTTTAATAGGGCCGGTACTGTGGGGGAACCTGTGCCTGA
TGACCTGTTGGTAAAAGGGGTAAATAAGGTCACTGTAGCTAGTAGTATTTATGTACATACACCTAGTGGATCCTTGG
TGTCTTCAGAGGCTCAATTATTTAATAAACCATATTGGCTTCAAAGGCTCAGGGACATAACAATGGTATTTGCTGGGGA
AACCCTTGTGTTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACAAATATGACACTATGTGCATCTGTGTCTAAATCTGCTAC
ATACACTAATTCAGATTATAAGGAATATATGCGCCATGTGGAGGAGTTTGATTTACAGTTTATTTTTCAATTGTGTAGCA
TTACATTATCTGCAGAAGTCATGGCCTATATACACACAATGAATCCTTCTGTTTTGGAGGACTGGAACCTTTGGTTATCG
CCTCCACCAAAATGGTACACTGGAGGATACTTATAGATATGTACAGTCACAGGCCATTACCTGTGAGAAACCCACACCCGA
AAAAGAAAAACAGGACCCCTATAAGGATATGAGTTTTTGGGAGGTAACTTAAAGAAAAGTTTTCTTCTGAATTAGATC
AGTTTCCCCTTGGACGTAAGTTTTTATTGCAAAGTGGATATCGAGGACGGACGTCTGCTCGTACAGGTATAAAGCGCCCA
GCTGTGTCTAAGCCCTCTACAGCCCCAAACGAAAACGTACCAAAACCAAAAAGTAA

30

40

【 0 0 7 4 】

配列 1 3 (配列番号 1 3) :

ATGAGCGACAGCACAGTATATGTGCCTCCTCCCAACCCTGTATCCAAGGTTGTTGCCACGGATGCGTATGTTAAACGCAC
CAACATATTTTATCACGCCAGCAGTTCTAGACTCCTTGCTGTGGGACATCCATATTACTCTATCAAAAAAGTTAACAAAA
CAGTTGTACCAAGGTGTCTGGATATCAATATAGAGTGTAAAGGTAGTGTGCCAGATCCTAACAAAGTTTGCATTACCT
GATTCATCTCTGTTTGACCCCACTACACAGCGTTTAGTATGGGCGTGACAGGGTTGGAGGTAGGCAGGGGACAGCCATT
AGGTGTGGGTGTAAGTGGACATCCTTTCTAAATAAATATGATGATGTTGAAAATTCAGGGAGTGGTGGTAACCCTGGAC
AGGATAACAGGGTTAATGTTGGTATGGATTATAAACAAACCCAGCTATGTATGGTGGGCTGTGCTCCACCGTTAGGTGAA
CATTGGGGTAAGGTACACAATGTTCAAATACCTCTGTACAAAATGGTGAAGTGGGCGGTTGGAACCTATTACCAGTGT
TATACAGGATGGGGACATGGTTGATACAGGCTTTGGTGTATGAATTTTGCAGACTTACAAACCAATAAATCGGATGTTT

50

CCCTTGATATTTGTGGAAGTGTCTGCAAATATCCTGATTATTTGCAAATGGCAGCAGACCCCTTATGGTGATAGGTTGTTT
TTTTATTTGCGAAAGGAACAAATGTTTGCTAGACACTTTTTTAATAGGGCCGGTACTGTGGGGGAACCTGTGCCTGATGA
CCTGTTGGTAAAAGGGGGTAATAATAGGTCATCTGTAGCTAGTAGTATTTATGTACATACACCTAGTGGATCCTTGGTGT
CTTCAGAGGCTCAATTATTTAATAAACCATATTGGCTTCAAAGGCTCAGGGACATAACAATGGTATTTGCTGGGGAAAC
CACTTGTTTGTTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACAAATATGACACTATGTGCATCTGTGTCTAAATCTGCTACATA
CACTAATTCAGATTATAAGGAATATATGCGCCATGTGGAGGAGTTTGATTTACAGTTTATTTTTCAATTGTGTAGCATT
CATTATCTGCAGAAGTCATGGCCTATATACACACAATGAATCCTTCTGTTTTGGAGGACTGGAACCTTTGGTTTATCGCCT
CCACCAAATGGTACACTGGAGGATACTTATAGATATGTACAGTCACAGGCCATTACCTGTCAGAAACCCACACCCGAAAA
AGAAAAACAGGACCCCTATAAGGATATGAGTTTTTGGGAGGTTAACTTAAAGAAAAAGTTTTCTTCTGAATTAGATCAGT
TTCCCTTGGACGTAAGTTTTTATTGCAAAGTGGATATCGAGGACGGACGTCTGCTCGTACAGGTATAAAGCGCCCAGCT
GTGTCTAAGCCCTCTACAGCCCCAAACGAAAACGTACCAAAACCAAAAAGTAA

10

【 0 0 7 5 】

配列 1 4 (配列番号 1 4) :

ATGAGCGACAGCACAGTATATGTGCCTCCTCCCAACCCTGTATCCAAGGTTGTTGCCACGGATGCGTATGTTAAACGCAC
CAACATATTTTATCACGCCAGCAGTTCTAGACTCCTTGCTGTGGGACATCCATTTACTCTATCAAAAAAGTTAACAAAA
CAGTTGTACCAAAGGTGTCTGGATATCAATATAGAGTGTAAAGGTAGTGTGCCAGATCCTAACAAGTTTGCATTACCT
GATTCATCTCTGTTTGACCCCACTACACAGCGTTTAGTATGGGCGTGCACAGGGTTGGAGGTAGGCAGGGGTCAACCTTT
AGGCGTTGGTGTTAGTGGGCATCCATTGCTAAACAAATATGATGATGTAGAAAATAGTGGTGGGTATGGTGGTAATCCTG
GTCAGGATAATAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAACCCAGCTATGTATGGTGGGCTGTGCTCCACCGTTAGGT
GAACATTGGGGTAAAGGTAAACAGTGTACTAATACACCTGTACAGGCTGGTGAAGTCCCGCCCTTGGAACCTATTACCAG
TGTTATACAGGATGGGGACATGGTTGATACAGGCTTTGGTGTATGAATTTTGCAGACTTACAAACCAATAAATCGGATG
TTCCCTTGATATTTGTGGAAGTGTCTGCAAATATCCTGATTATTTGCAAATGGCAGCAGACCCCTTATGGTGATAGGTTG
TTTTTTATTTGCGAAAGGAACAAATGTTTGCTAGACACTTTTTTAATAGGGCCGGTACTGTGGGGGAACCTGTGCCTGA
TGACCTGTTGGTAAAAGGGGTAATAATAGGTCATCTGTAGCTAGTAGTATTTATGTACATACACCTAGTGGATCCTTGG
TGTCTTCAGAGGCTCAATTATTTAATAAACCATATTGGCTTCAAAGGCTCAGGGACATAACAATGGTATTTGCTGGGGA
AACCCTTGTGTTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACAAATATGACACTATGTGCATCTGTGTCTAAATCTGCTAC
ATACACTAATTCAGATTATAAGGAATATATGCGCCATGTGGAGGAGTTTGATTTACAGTTTATTTTTCAATTGTGTAGCA
TTACATTATCTGCAGAAGTCATGGCCTATATACACACAATGAATCCTTCTGTTTTGGAGGACTGGAACCTTTGGTTTATCG
CCTCCACCAAATGGTACACTGGAGGATACTTATAGATATGTACAGTCACAGGCCATTACCTGTCAGAAACCCACACCCGA
AAAAGAAAAACAGGACCCCTATAAGGATATGAGTTTTTGGGAGGTTAACTTAAAGAAAAAGTTTTCTTCTGAATTAGATC
AGTTTCCCTTGGACGTAAGTTTTTATTGCAAAGTGGATATCGAGGACGGACGTCTGCTCGTACAGGTATAAAGCGCCCA
GCTGTGTCTAAGCCCTCTACAGCCCCAAACGAAAACGTACCAAAACCAAAAAGTAA

20

30

【 0 0 7 6 】

配列 1 5 (配列番号 1 5) :

ATGAGCGACAGCACAGTATATGTGCCTCCTCCCAACCCTGTATCCAAGGTTGTTGCCACGGATGCGTATGTTAAACGCAC
CAACATATTTTATCACGCCAGCAGTTCTAGACTCCTTGCTGTGGGACATCCATTTACTCTATCAAAAAAGTTAACAAAA
CAGTTGTACCAAAGGTGTCTGGATATCAATATAGAGTGTAAAGGTAGTGTGCCAGATCCTAACAAGTTTGCATTACCT
GATTCATCTCTGTTTGACCCCACTACACAGCGTTTAGTATGGGCGTGCACAGGGTTGGAGGTAGGCAGGGGTCAACCTTT
AGGCGTTGGTGTTAGTGGGCATCCATTGCTAAACAAATATGATGATGTAGAAAATAGTGGTGGGTATGGTGGTAATCCTG
GTCAGGATAATAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAACCCAGCTATGTATGGTGGGCTGTGCTCCACCGTTAGGT
GAACATTGGGGTAAAGGTACACAATGTTCAAATACCTCTGTACAAAATGGTGAAGTCCCGCCCTTGGAACCTATTACCAG
TGTTATACAGGATGGGGACATGGTTGATACAGGCTTTGGTGTATGAATTTTGCAGACTTACAAACCAATAAATCGGATG
TTCCCTTGATATTTGTGGAAGTGTCTGCAAATATCCTGATTATTTGCAAATGGCAGCAGACCCCTTATGGTGATAGGTTG
TTTTTTATTTGCGAAAGGAACAAATGTTTGCTAGACACTTTTTTAACAGGGCTGGCGAGGTGGGGGAACCTGTGCCTGA
TACTCTTATAATTAAGGGTAGTGGAAATCGAACGTCTGTAGGGAGTAGTATATATGTACATACACCTAGTGGATCCTTGG
TGTCTTCAGAGGCTCAATTATTTAATAAACCATATTGGCTTCAAAGGCTCAGGGACATAACAATGGTATTTGCTGGGGA
AACCCTTGTGTTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACAAATATGACACTATGTGCATCTGTGTCTAAATCTGCTAC
ATACACTAATTCAGATTATAAGGAATATATGCGCCATGTGGAGGAGTTTGATTTACAGTTTATTTTTCAATTGTGTAGCA
TTACATTATCTGCAGAAGTCATGGCCTATATACACACAATGAATCCTTCTGTTTTGGAGGACTGGAACCTTTGGTTTATCG
CCTCCACCAAATGGTACACTGGAGGATACTTATAGATATGTACAGTCACAGGCCATTACCTGTCAGAAACCCACACCCGA

40

50

AAAAGAAAAACAGGACCCCTATAAGGATATGAGTTTTTGGGAGGTTAACTTAAAAGAAAAAGTTTTCTTCTGAATTAGATC
AGTTTCCCCTTGGACGTAAGTTTTTATTGCAAAGTGGATATCGAGGACGGACGTCTGCTCGTACAGGTATAAAGCGCCCA
GCTGTGTCTAAGCCCTCTACAGCCCCCAAACGAAAACGTACCAAAACCAAAAAGTAA

【 0 0 7 7 】

配列 1 6 (配列番号 1 6) :

ATGAGCGACAGCACAGTATATGTGCCTCCTCCCAACCCTGTATCCAAGGTTGTTGCCACGGATGCGTATGTTAAACGCAC
CAACATATTTTATCACGCCAGCAGTTCTAGACTCCTTGCTGTGGGACATCCATATTACTCTATCAAAAAAGTTAACAAAA
CAGTTGTACCAAAGGTGTCTGGATATCAATATAGAGTGTAAAGGTAGTGTGCCAGATCCTAACAAAGTTTGCATTACCT
GATTCATCTCTGTTTGACCCCACTACACAGCGTTTAGTATGGGCGTGACAGGGTTGGAGGTAGGCAGGGGTCAACCTTT
AGGCGTTGGTGTTAGTGGGCATCCATTGCTAAACAAATATGATGATGTAGAAAATAGTGGTGGGTATGGTGGTAATCCTG
GTCAGGATAATAGGGTTAATGTAGGTATGGATTATAAACAAACCCAGCTATGTATGGTGGGCTGTGCTCCACCGTTAGGT
GAACATTGGGGTAAGGGTACACAATGTTCAAATACCTCTGTACAAAATGGTGACTGCCCCCGTTGGAACCTATTACCAG
TGTTATACAGGATGGGGACATGGTTGATACAGGCTTTGGTGCTATGAATTTTGCAGACTTACAAACCAATAAATCGGATG
TTCCCTTGATATTTGTGGAACCTGTCTGCAAATATCCTGATTATTTGCAAATGGCAGCAGACCCCTTATGGTGATAGGTTG
TTTTTTTATTTGCGAAAGGAACAAATGTTTGCTAGACACTTTTTTAATAGGGCCGGTACTGTGGGGGAACCTGTGCCTGA
TGACCTGTTGGTAAAAGGGGTAAATAAGGTCATCTGTAGCTAGTAGTATTTATGTACATACACCTAGTGGATCCTTGG
TGTCTTCAGAGGCTCAATTATTTAATAAACCATATTGGCTTCAAAGGCTCAGGGACATAACAATGGTATTTGCTGGGGA
AACCCTTGTGTTACTGTGGTAGATACCACACGCAGTACAAATATGACACTATGTGCATCTGTAACCTACATCTCCAC
ATACACCAATTCTGATTATAAGGAATATATGCGCCATGTGGAGGAGTTTGATTTACAGTTTATTTTTCAATTGTGTAGCA
TTACATTATCTGCAGAAGTCATGGCCTATATACACACAATGAATCCTTCTGTTTTGGAGGACTGGAACCTTTGGTTTATCG
CCTCCACCAAATGGTACACTGGAGGATACTTATAGATATGTACAGTCACAGGCCATTACCTGTCAGAAACCCACACCCGA
AAAAGAAAAACAGGACCCCTATAAGGATATGAGTTTTTGGGAGGTTAACTTAAAAGAAAAAGTTTTCTTCTGAATTAGATC
AGTTTCCCCTTGGACGTAAGTTTTTATTGCAAAGTGGATATCGAGGACGGACGTCTGCTCGTACAGGTATAAAGCGCCCA
GCTGTGTCTAAGCCCTCTACAGCCCCCAAACGAAAACGTACCAAAACCAAAAAGTAA

10

20

【 0 0 7 8 】

配列 3 5 (配列番号 3 5) :

KQCTNTPVQA

【 0 0 7 9 】

配列 3 6 (配列番号 3 6) :

TTSSTY

30

【 0 0 8 0 】

配列 3 7 (配列番号 3 7) :

FLNKYDDVENS GSGNPGQDN

【 0 0 8 1 】

本発明を実施するための具体的な形態

本発明は、以下の実施例を参照してさらに説明されるが、これらの実施例は、本発明を限定するのではなく、本発明を説明する目的でのみ使用される。

【 0 0 8 2 】

他に示されない限り、本発明において使用される分子生物学的実験方法及び免疫学的アッセイは、実質的にSambrook J et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 及びF. M. Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995に記載される方法に従って実施される。制限酵素は、製造業者によって推奨される条件下で使用される。当業者であれば、これらの実施例は本発明を説明するために用いられているが、本発明の保護範囲を限定するものではないことを理解する。

40

【 0 0 8 3 】

実施例 1 . 突然変異型 H P V 1 1 L 1 タンパク質の発現及び精製
発現ベクターの構築

H P V 6 L 1 タンパク質由来の特定のセグメントを含む突然変異型 H P V 1 1 L 1
タンパク質 (H 1 1 N 4 - 6 T 1) をコードする発現ベクターは、マルチサイト突然変異

50

誘発のためのPCRによって構築した。使用した初期鋳型は、プラスミドpTO-T7-HPV11N4C(N末端で切断された4アミノ酸を有するHPV11 L1タンパク質をコードする;表2に11L1N4と略記する)であった。各PCRの鋳型及びプライマーを表2に示し、PCRの増幅条件を以下のようにした:94 で10分間の変性;25サイクル(94 で50秒間の変性、一定温度で一定時間のアニーリング、72 で7.5分間の伸長);最後に72 で10分間伸長する。使用したPCRプライマーの配列を表3に列挙した。

【0084】

増幅産物(50 µL)に2 µLの制限エンドヌクレアーゼDpnIを添加し、得られた混合物を37 で60分間インキュベートした。消化産物10 µLを用いて、塩化カルシウム法により調製したコンピテント大腸菌ER2566(New England Biolabsから購入)40 µLを形質転換した。形質転換された大腸菌は、カナマイシンを含む固体LB培地(LB培地の成分:ペプトン10 g/L、酵母粉末5 g/L、NaCl 10 g/L、以下同様)(最終濃度25 mg/mL、以下同様)に播種され、37 で10~12時間静置培養し、単一のコロニーがはっきりと観察できるようにした。単一コロニーを採取し、4 mL液体LB培地(カナマイシン含有)を含むチューブに接種し、37 で220 rpmで10時間、振とう培養した後、1 mLの細菌溶液を採取し、-70 で保存した。大腸菌からプラスミドを抽出し、T7プライマーを用いて、プラスミドに挿入された目的の断片のヌクレオチド配列を配列決定した。配列決定の結果は、構築されたプラスミド(発現ベクター)に挿入された目的の断片のヌクレオチド配列が配列番号12であり、そのコードされたアミノ酸配列が配列番号5である(対応するタンパク質をH11N4-6T1と記す)ことを示した。突然変異型タンパク質H11N4-6T1は、野生型HPV11 L1タンパク質の49~63位のアミノ酸残基の、野生型HPV6 L1タンパク質の49~63位のアミノ酸残基による置換によって、HPV11N4と異なる。

【0085】

Gibsonアセンブリ(Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods. 2009;6:343-5. doi: 10.1038/nmeth.1318)を使用して、他の突然変異型HPV11 L1タンパク質をコードする発現ベクターを構築した。この突然変異型HPV11 L1タンパク質は、HPV6 L1由来の特定のセグメントを含んでいた。要するに、突然変異を含む短い断片及び突然変異を含まない長い断片がPCRによって得られ、次に、Gibsonアセンブリ系を用いて2つの断片を連結して環を形成させた。使用した初期鋳型は、プラスミドpTO-T7-HPV11N4C、及びプラスミドpTO-T7-HPV6N5C(N末端で切断された5アミノ酸を有するHPV6 L1タンパク質をコードする;表2では6L1N5と略記される)を含んでいた。各PCRの鋳型及びプライマーを表2に示し、短い断片を増幅するためのPCRの増幅条件は以下の通りである:94 で10分間の変性;25サイクル(94 で50秒間の変性、一定温度で一定時間のアニーリング、72 で1分間の伸長);最後に72 で10分間伸長する。長い断片を増幅するためのPCRの増幅条件は以下の通りである:94 で10分間の変性;

25サイクル(94 で50秒間の変性、一定温度で一定時間のアニーリング、72 で7.5分間の伸長);最後に72 で10分間伸長する。使用したPCRプライマーの配列を表3に示す。増幅産物を電気泳動に供し、次に、DNA抽出キットを用いて目的の断片を回収し、その濃度を決定した。増幅により得られた短い断片と長い断片を2:1のモル比(総体積3 µL)で混合し、次に、3 µLの2×Gibson Assembly Master Mix(NEBから購入、T5エキソヌクレアーゼ、Phusion DNAポリメラーゼ、Taq DNAリガーゼを含有する)を添加し、50 で1時間反応させた。

【0086】

アセンブルされた生成物(6 µL)を用いて、塩化カルシウム法により調製したコンピ

10

20

30

40

50

テント大腸菌 E R 2 5 6 6 (N e w E n g l a n d B i o l a b s から購入) 4 0 μ L を形質転換した。形質転換された大腸菌は、カナマイシンを含む固体 L B 培地上に播種され、単一のコロニーがはっきりと観察されるまで、37℃で10～12時間静置培養された。単一コロニーを採取し、液体 L B 培地 (カナマイシン含有) 4 mL を含むチューブに接種し、37℃で220 rpm で10時間、振とう培養した後、1 mL の細菌溶液を採取し、-70℃で保存した。大腸菌からプラスミドを抽出し、T7 プライマーを用いて、プラスミドに挿入された目的の断片のヌクレオチド配列を配列決定した。配列決定の結果は、構築されたプラスミド (発現ベクター) に挿入された目的の断片のヌクレオチド配列がそれぞれ配列番号 1 3、1 4、1 5、及び 1 6 であり、それらのコードされたアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 6、7、8、及び 9 であったことを示した (対応するタンパク質はそれぞれ、H 1 1 N 4 - 6 T 2、H 1 1 N 4 - 6 T 3、H 1 1 N 4 - 6 T 4、及び H 1 1 N 4 - 6 T 5 と命名された)。

【 0 0 8 7 】

突然変異型タンパク質 H 1 1 N 4 - 6 T 2 は、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質の 1 1 9 ~ 1 4 0 位のアミノ酸残基の、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 1 1 9 ~ 1 3 9 位のアミノ酸残基による置換によって H P V 1 1 N 4 と異なる。突然変異型タンパク質 H 1 1 N 4 - 6 T 3 は、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質の 1 7 0 ~ 1 7 9 位のアミノ酸残基の、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 1 6 9 ~ 1 7 8 位のアミノ酸残基による置換によって H P V 1 1 N 4 と異なる。突然変異型タンパク質 H 1 1 N 4 - 6 T 6 は、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質の 2 5 7 ~ 2 8 8 位のアミノ酸残基の、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 2 5 7 ~ 2 8 8 位のアミノ酸残基による置換によって H P V 1 1 N 4 と異なる。突然変異型タンパク質 H 1 1 N 4 - 6 T 5 は、野生型 H P V 1 1 L 1 タンパク質の 3 4 6 ~ 3 5 1 位のアミノ酸残基の、野生型 H P V 6 L 1 タンパク質の 3 4 5 ~ 3 5 0 位のアミノ酸残基による置換によって H P V 1 1 N 4 と異なる。

【 0 0 8 8 】

【 表 2 】

表 2. 発現ベクターを構築するための P C R 鋳型及びプライマー

鋳型	上流プライマー	下流プライマー	生成物
11L1N4	H11N4-6T1-F	H11N4-6T1-R	H11N4-6T1
6L1N5	G-H11N4-6T2-F	G-H11N4-6T2-R	H11N4-6T2-短い断片
11L1N4	G-V-H11N4-6T2-F	G-V-H11N4-6T2-R	H11N4-6T2-長い断片
6L1N5	G-H11N4-6T3-F	G-H11N4-6T3-R	H11N4-6T3-短い断片
11L1N4	G-V-H11N4-6T3-F	G-V-H11N4-6T3-R	H11N4-6T3-長い断片
6L1N5	G-H11N4-6T4-F	G-H11N4-6T4-R	H11N4-6T4-短い断片
11L1N4	G-V-H11N4-6T4-F	G-V-H11N4-6T4-R	H11N4-6T4-長い断片
6L1N5	G-H11N4-6T5-F	G-H11N4-6T5-R	H11N4-6T5-短い断片
11L1N4	G-V-H11N4-6T5-F	G-V-H11N4-6T5-R	H11N4-6T5-長い断片

【 0 0 8 9 】

【表 3】

表 3. 使用されるプライマーの配列 (配列番号 17 ~ 34)

配列番号	プライマー名	プライマー配列 (5' - 3')
17	H11N4-6T1-F	GTGGGACATCCATATTTTTCTATCAAACGGGCTAACAAAACAGTTGTAC
18	H11N4-6T1-R	GTACAACTGTTTTGTTAGCCCGTTTGATAGAAAAATATGGATGTCCAC
19	G-H11N4-6T2-F	TCAATATAGAGTGTTTAAGGTAGTGTTACCAGATCCTAACAAATTTGC
20	G-H11N4-6T2-R	CCCACCATACATAGCTGGGTTTGTATAATCCATACCAACAT
21	G-V-H11N4-6T2-F	AAACAAACCCAGCTATGTATGGTGG
22	G-V-H11N4-6T2-R	CACTACCTTAAACACTCTATATTGAT
23	G-H11N4-6T3-F	CTGTACAGAATGGTGACTGCCCGCCCTTAG
24	G-H11N4-6T3-R	AACACTGTGTACCTTTACCCCAATGCTCGC
25	G-V-H11N4-6T3-F	TAATACATCTGTACAGAATGGTGACTGCCCGCCCTTAG
26	G-V-H11N4-6T3-R	GATGTATTAGAACTGTGTACCTTTACCCCAATGCTCG
27	G-H11N4-6T4-F	GGAACAAATGTTTGCTAGACACTTTTTAACAGGGCTGGCGAGGTGG
28	G-H11N4-6T4-R	ACCAAGGATCCACTAGGTGTATGAACATATATACTACTCCCTACAG
29	G-V-H11N4-6T4-F	CATACACCTAGTGGATCCTTGG
30	G-V-H11N4-6T4-R	AAAGTGTCTAGCAAACATTTGTTCTT
31	G-H11N4-6T5-F	TGGTATTTGCTGGGGAACACCTGTTTGTACTGTGGTAGATAC
32	G-H11N4-6T5-R	GAAAAATAAACTGTAATCAAACCTCTCCACATGACGCATGTACTC
33	G-V-H11N4-6T5-F	TTTGATTTACAGTTTATTTTC
34	G-V-H11N4-6T5-R	GTGGTTTCCCAGCAAATACCATTG

【0090】

ラージスケールでの突然変異型タンパク質の発現

組換えプラスミド pTO-T7-H11N4-6T1、pTO-T7-H11N4-6T2、pTO-T7-H11N4-6T3、pTO-T7-H11N4-6T4、及び pTO-T7-H11N4-6T5 をそれぞれ含む大腸菌を -70 の冷蔵庫から取り出し、カナマイシンを含有する 100 mL の LB 液体培地に播種し、200 rpm 及び 37 で約 8 時間インキュベートした。次に、培養物をカナマイシンを含む 500 mL の LB 培地に移し (1 mL の細菌溶液を移した)、さらにインキュベートした。細菌の濃度が約 0.6 の OD₆₀₀ に達したとき、培養温度を 25 に下げ、各培養ボトルに 500 µL の IPTG を添加した。インキュベーションをさらに 8 時間行った。インキュベーションが終了した後、細菌を遠心分離によって回収した。H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4 及び H11N4-6T5 タンパク質を発現する細菌をそれぞれ得た。

【0091】

突然変異型タンパク質を発現する細菌の破碎

得られた細菌は、1 g の細菌 1 g / 10 mL の溶解緩衝液 (20 mM Tris 緩衝液、pH 7.2、300 mM NaCl) の比で再懸濁された。細菌は、超音波装置を用いて 30 分間破碎された。破碎された細菌を含む溶解溶液を 13500 rpm (30000 g) で 15 分間遠心分離し、上清 (すなわち、破碎された細菌の上清) を得た。

【0092】

突然変異型タンパク質のクロマトグラフィー精製

装置: GE Healthcare (すなわち、元の Amersham Pharmacia Co.) によって製造された AKTA Explorer 100 分取液体クロマトグラフィーシステム

クロマトグラフィー媒体: SP Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Co.)、CHT-II (Bio-RAD から購入) 及び Bu

tyl Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Co.)

緩衝液：20 mM リン酸緩衝液、pH 8.0、20 mM DTT；20 mM リン酸緩衝液、pH 8.0、20 mM DTT、2 M NaCl

試料：上記で得られたそれぞれ H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4 及び H11N4-6T5 を含む破碎された細菌の上清。

【0093】

溶出プロトコール：

(1) SP Sepharose 4 Fast Flow による破碎した細菌の上清の陽イオン交換精製：試料をカラムに装填し、次に、400 mM NaCl を含む緩衝液で不要なタンパク質を溶出し、続いて、800 mM NaCl を含む緩衝液で目的のタンパク質を溶出した。800 mM NaCl を含む緩衝液で溶出された画分を回収した；

(2) CHT-II (ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー) による、工程(1)で得られた溶出画分のクロマトグラフィーによる精製：工程(1)で得られた溶出画分は、NaCl 濃度が 0.5 M になるように希釈されるように希釈され；試料をカラムに装填し、500 mM の NaCl を含む緩衝液で溶出した後、1000 mM の NaCl を含む緩衝液で目的のタンパク質を溶出し、1000 mM の NaCl を含む緩衝液で溶出した画分を回収した；

(3) HIC (疎水性相互作用クロマトグラフィー) による、工程(2)で得られた溶出画分の精製：試料をカラムに装填し、次に、不要なタンパク質を 1000 mM NaCl を含む緩衝液で溶出した後、200 mM の NaCl を含む緩衝液で目的のタンパク質を溶出し、200 mM の NaCl を含む緩衝液で溶出された画分を回収した。

【0094】

(3) で得られた 150 µL の溶出画分を 30 µL の 6 × 泳動緩衝液に加えた。得られた溶液を均一に混合し、80 の水浴中で 10 分間インキュベートした。次に、得られた試料の 10 µL を 120 V で 120 分間、10% SDS-PAGE にかき、電気泳動バンドをクーマシーブリリアントブルーで染色した。電気泳動結果を図 1 に示した。結果は、前記精製工程後、H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4 及び H11N4-6T5 タンパク質が 95% 以上の純度を有することを示した。

【0095】

同様の方法により、大腸菌及びプラスミド pTO-T7-HPV11N4C を用いて HPV11N4 タンパク質を調製し、精製した。大腸菌及びプラスミド pTO-T7-HPV6N5C を用いて HPV6N5 タンパク質を調製し、精製した。

【0096】

実施例 2：HPV ウイルス様粒子のアセンブリと粒子の形態学的試験

HPB ウイルス様粒子のアセンブリ

所定体積(約 2 mL)のタンパク質 H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4 又は H11N4-6T5 は、(1) 2 L 保存緩衝液(20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5、0.5 M NaCl)；(2) 2 L 再生緩衝液(50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.0、2 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂、0.5 M NaCl)；及び(3) 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0、0.5 M NaCl に対して連続的に透析した。透析は 3 つの緩衝液のそれぞれで 12 時間行った。

【0097】

同様の方法により、HPV11N4 及び HPV6N5 タンパク質を、HPV11N4 VLP 及び HPV6N5 VLP にそれぞれアセンブルした。

【0098】

モレキュラーシーブクロマトグラフィー分析

透析した試料を、1120 コンパクト LC 高速液体クロマトグラフィーシステム (Ag

10

20

30

40

50

ilent Technologies)によるモレキュラーシーブクロマトグラフィー分析に供し、分析カラムは、TSK Gel PW5000x1 7.8x300mmであった。分析結果を図2A~2Fに示した。結果は、タンパク質H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5をそれぞれ含む試料の最初のタンパク質ピークは約12分で現れたことを、これはHPV11N4 VLPのそれに匹敵することを示した。これは、上記で調製したタンパク質がVLPにアセンブルすることができたことを示した。

【0099】

沈降速度分析

沈降速度分析のための装置は、光学検査システム及びAn-50Ti及びAn-60Tiローターを備えたBeckman XL-A Analytical Ultracentrifugeであった。HPV11N4 VLP、H11N4-6T1 VLP、H11N4-6T2 VLP、H11N4-6T3 VLP、H11N4-6T4 VLP及びH11N4-6T5 VLPの沈降係数を沈降速度法により分析した。結果を図3A~3Fに示した。結果は、H11N4-6T1 VLP、H11N4-6T2 VLP、H11N4-6T3 VLP、H11N4-6T4 VLP及びH11N4-6T5 VLPの沈降係数はそれぞれ140S、138S、111S、139S及び139Sであることを示した。これは、5つの突然変異型HPV11 L1タンパク質が、サイズ及び形態に関して野生型VLP(HPV11N4 VLP、136.3S)に類似したウイルス様粒子にアセンブルすることができることを示した。

【0100】

ウイルス様粒子の形態学的試験

VLPを含む試料100µLを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。使用した装置は、JEOL Ltd.によって供給された100kV透過電子顕微鏡(倍率100,000倍)であった。要するに、13.5µLの試料を2%リンタンゲステン酸(pH7.0)で陰性に染色し、炭素被覆した銅グリッドに固定し、次いでTEMで観察した。結果を図4A~4Fに示した。結果は、H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5がウイルス様粒子にアセンブルし得ることを示した。さらに、これらの結果はまた、これらの突然変異型タンパク質によってアセンブルした粒子が約25nmの半径を有し、サイズが均一であることを示した。これは、これらの突然変異型タンパク質がHPV11 L1タンパク質(HPV11N4 VLP)に類似しており、均一なサイズのVLPにアセンブルすることができたことを示した。

【0101】

実施例3：ウイルス様粒子の熱安定性の評価

HPV11N4、H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5により形成されたVLPは、GE Company(すなわち、もともとはMicroCal Co.)から購入した示差走査熱量計VPキャピラリーDSCを用いてそれらの熱安定性について評価した。タンパク質の保存緩衝液を対照として使用し、タンパク質を10~90の温度範囲内で1.5/分の加熱速度で走査した。検出結果を図5A~5Fに示した。結果は、タンパク質によって形成されたこれらのVLPのすべてが非常に高い熱安定性を有することを示した。

【0102】

実施例4：H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの3次元構造の再構築

以前に報告された方法(Wolf M, Garcea RL, Grigorieff N. et al. Proc Natl Acad Sci U S A. (2010), 107(14): 6298-303)に従って、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの3次元構造は、低温電子顕微鏡法(cryoEM)を用いて再構築された。簡単に述べると、低温電子顕微鏡(cryoEM)を用いて、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPを観察し、次に、H11N4-6T3

VLP及びH11N4-6T5 VLPの低温電子顕微鏡(cryoEM)写真(図6A及び6C)では、コンピュータの重なり及び構造の再構成のために、均一なサイズ及び50nmより大きい直径を有する、それぞれ300個の粒子及び360個の粒子を選択し、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの三次元構造を得た。得られた三次元構造を図6B及び6D(それぞれ17.38及び20.48の解像度にて)に示した。結果は、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの両方が、72個のキャプソマー(形態学的サブユニット、ペンタマー)からなるT=7の二十面体構造(h=1、k=2)を有することを示した。準同値原理に一致する従来の二十面体ウイルスキャプシドとは異なり、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの構造における構成的サブユニットはすべて、六量体を含まず、五量体であった。さらに、前記VLPは、約60nmの外径を有していた。これらは、以前報告された天然のHPVウイルス粒子及び真核生物発現系によって調製されたHPV VLP(例えば、ボックスウイルス発現系)の三次元構造と同様であった(Baker TS, Newcomb WW, Olson NH. et al. Biophys J. (1991), 60(6): 1445-1456. Hagensee ME, Olson NH, Baker TS, et al. J Virol. (1994), 68(7):4503-4505. Buck CB, Cheng N, Thompson CD. et al. J Virol. (2008), 82(11): 5190-7)。

【0103】

実施例5：動物におけるウイルス様粒子の免疫防御の評価

H11N4-6T1、H11N4-6T2、H11N4-6T3、H11N4-6T4及びH11N4-6T5によって形成されたVLPの免疫防御をマウスで評価した。ワクチン接種のための動物は、5～6週齢のBALB/cマウス(正常な等級)(Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. LTDから購入)であった。

【0104】

上記で調製したHPV11N4 VLP、HPV6N5 VLP、H11N4-6T1 VLP、H11N4-6T2 VLP、H11N4-6T3 VLP、H11N4-6T4 VLP、H11N4-6T5 VLP、及び混合したHPV11/HPV6 VLP(すなわち、HPV11N4 VLPとHPV6N5 VLPの混合物)をそれぞれアルミニウムアジュバントに吸収させた。免疫原に応じてマウスを8群に分け、各群に4匹のマウスを含めた。ワクチン接種手順は以下の通りであった：第0週の最初のワクチン接種、ならびにそれぞれ第2週及び第4週のブースターワクチン接種。マウスに皮下注射によりワクチン接種した。使用した免疫原及びその用量を表4に示した。最初のワクチン接種後の8週目に、眼球から静脈血を採取し、血清を分離した。血清中の中和抗体の力価を測定した。検出結果を図7に示した。結果は、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPのいずれかが、マウスにおけるHPV11及びHPV6に対する高力価中和抗体の生成を誘導し得ることを示した。HPV11に対するそれらの防御効果は、HPV11N4 VLP単独又は混合したHPV11/HPV6 VLPのものと同等であり、HPV6N5 VLP単独のものよりも有意に高かった。HPV6に対するそれらの防御効果は、HPV6N5 VLP単独又は混合したHPV11/HPV6 VLPのものに匹敵し、HPV11N4 VLP単独よりも有意に高かった。H11N4-6T2 VLPは、マウスにおいてHPV11及びHPV6に対する高力価の中和抗体の生成を誘導することができたが、HPV6に対する中和抗体の生成を誘導するその能力は、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPよりも弱かった。これらの結果は、H11N4-6T2 VLP、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPが、HPV11感染及びHPV6感染を予防するための有効なワクチンとして使用でき、HPV11 VLP及びHPV6 VLPを含む混合ワクチンの代わりに使用できることを示した。

【0105】

【表 4】

表 4. ワクチン接種スケジュール

ワクチン接種用の抗原	アジュバント	免疫化用量	番号	ワクチン接種手順 (週)
HPV6N5 VLP	アルミニウムアジュバント	5 μ g	4	0、2、4
HPV11N4 VLP	アルミニウムアジュバント	5 μ g	4	0、2、4
混合した HPV11/HPV6 VLP	アルミニウムアジュバント	10 μ g (各VLPについて5 μ g)	4	0、2、4
H11N4-6T1 VLP	アルミニウムアジュバント	5 μ g	4	0、2、4
H11N4-6T2 VLP	アルミニウムアジュバント	5 μ g	4	0、2、4
H11N4-6T3 VLP	アルミニウムアジュバント	5 μ g	4	0、2、4
H11N4-6T4 VLP	アルミニウムアジュバント	5 μ g	4	0、2、4
H11N4-6T5 VLP	アルミニウムアジュバント	5 μ g	4	0、2、4

【0106】

実施例 6 : VLP でワクチン接種したマウスの血清中の中和抗体力価の評価

この実験において、ワクチン接種スケジュールを表 5 に示した。全てのマウス (6 週齢の B a l B / c 雌性マウス) を 3 群に分けた : アルミニウムアジュバントグループ 1 (10 μ g の免疫化用量で、アルミニウムアジュバントを使用する)、アルミニウムアジュバントグループ 2 (1 μ g の免疫化用量で、アルミニウムアジュバントを使用する)、アルミニウムアジュバントグループ 3 (0.1 μ g の免疫化用量で、アルミニウムアジュバントを使用する)。各グループをさらに 5 つのサブグループに分けた。対照サブグループ 1 ~ 3 は、それぞれ HPV11N4 VLP 単独、HPV6N5 VLP 単独、及び混合した HPV11/HPV6 VLP でワクチン接種され、実験サブグループ 1 ~ 2 は、H11N4-6T3 VLP 及び H11N4-6T5 VLP でそれぞれワクチン接種された。

【0107】

6 匹のマウス / サブグループに、それぞれ 10 μ g、1 μ g、0.1 μ g の免疫化用量及び 1 ml の注射容量で、腹腔内注射によりワクチン接種した。すべてのマウスを 0 週目に最初のワクチン接種に付し、次いで 2 週目及び 4 週目に追加免疫ワクチン接種を行った。8 週目に、眼窩出血により血液サンプルを採取し、血清中の HPV11 及び HPV6 に対する抗体の力価を分析した。その分析結果を図 8 A ~ 8 C に示した。結果は以下を示した : H11N4-6T3 VLP 及び H11N4-6T5 が、マウスにおける HPV11 に対する高力価中和抗体の生成を誘導し得、それらの保護効果が、同じ用量で HPV11N4 VLP 単独又は混合した HPV11/HPV6 VLP のものに匹敵し、同じ用量で HPV6N5 VLP 単独のものより有意に優れていた。マウスの HPV6 に対する高力価の中和抗体の生成を誘導することができ、それらの保護効果は同じ用量の HPV6N5 VLP 単独又は混合した HPV11/HPV6 VLP のものに匹敵し、同じ用量の HPV11N4 VLP 単独よりも有意に優れていた。これは、H11N4-6T3 VLP 及び H11N4-6T5 VLP が、HPV11 及び HPV6 に対する良好な交差免疫原性及び交差防御を有することを示した。

【 0 1 0 8 】

【 表 5 】

表 5. ワクチン接種スケジュール

グループ	ワクチン接種用の抗原	アジュバント	免疫化用量	番号	ワクチン接種手順 (週)
アルミニウムアジュバントグループ1	HPV11N4 VLP	アルミニウムアジュバント	10 μ g	6	0、2、4
	HPV6N5 VLP	アルミニウムアジュバント	10 μ g	6	0、2、4
	a mixed HPV11/HPV6 VLP	アルミニウムアジュバント	各々について10 μ g	6	0、2、4
	H11N4-6T3 VLP	アルミニウムアジュバント	10 μ g	6	0、2、4
	H11N4-6T5 VLP	アルミニウムアジュバント	10 μ g	6	0、2、4
アルミニウムアジュバントグループ2	HPV11N4 VLP	アルミニウムアジュバント	1 μ g	6	0、2、4
	HPV6N5 VLP	アルミニウムアジュバント	1 μ g	6	0、2、4
	a mixed HPV11/HPV6 VLP	アルミニウムアジュバント	各々について1 μ g	6	0、2、4
	H11N4-6T3 VLP	アルミニウムアジュバント	1 μ g	6	0、2、4
	H11N4-6T5 VLP	アルミニウムアジュバント	1 μ g	6	0、2、4
アルミニウムアジュバントグループ3	HPV11N4 VLP	アルミニウムアジュバント	0.1 μ g	6	0、2、4
	HPV6N5 VLP	アルミニウムアジュバント	0.1 μ g	6	0、2、4
	a mixed HPV11/HPV6 VLP	アルミニウムアジュバント	各々について0.1 μ g	6	0、2、4
	H11N4-6T3 VLP	アルミニウムアジュバント	0.1 μ g	6	0、2、4
	H11N4-6T5 VLP	アルミニウムアジュバント	0.1 μ g	6	0、2、4

【 0 1 0 9 】

実施例 7 : セロコンバージョンを誘導するための V L P の E C ₅₀ の評価

6 週齢の B a l B / c 雌性マウス (8 匹のマウス) に単回腹腔内注射によりアルミニウムアジュバントを接種した。実験群に H 1 1 N 4 - 6 T 3 V L P 又は H 1 1 N 4 - 6 T 5 V L P (0 . 3 0 0 μ g、0 . 1 0 0 μ g、0 . 0 3 3 μ g 又は 0 . 0 1 1 μ g の免疫化用量で) を用いた。対照群に H P V 6 N 5 V L P 単独又は H P V 1 1 N 4 V L P 単独 (0 . 3 0 0 μ g、0 . 1 0 0 μ g、0 . 0 3 3 μ g 又は 0 . 0 1 1 μ g の免疫化用量で)、又は混合した H P V 1 1 / H P V 6 V L P (すなわち、H P V 6 N 5 V L P と H P V 1 1 N 4 V L P の混合物)、各 V L P について免疫化用量は 0 . 3 0 0 μ g、0 . 1 0 0 μ g、0 . 0 3 3 μ g 又は 0 . 0 1 1 μ g であった) を用いた。免疫容量は 1 m L であった。さらに、ワクチンを希釈するための希釈剤をブランク対照として使用した。8 匹のマスを各グループにおいてワクチン接種し、ワクチン接種から 5 週後に血清を回収した。その後、血清の中和抗体価を中和化試験によって、及び R e e d - M u e n

10

20

30

40

50

c h 法 (Reed LJ MH. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493-7) によって決定し、セロコンバージョンを誘導する(すなわち、マウスにおける抗体の生成を誘導する)ための ED_{50} を各試料について計算した。結果を表 6. 1 ~ 6. 5 に示す。

【 0 1 1 0 】

【表 6】

表 6. 1 : マウスにおける HPV 6 及び HPV 1 1 (セロコンバージョン) に対する抗体の生成を誘導するための HPV 6 N 5 VLP の ED_{50}

抗体	免疫化用量 (μg)	マウスの総数	陽性変換を有するマウスの数	陽性変換率	ED_{50} (μg)
HPV6に対する抗体	0.300	8	7	92.31%	0.090
	0.100	8	5	55.56%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
HPV11に対する抗体	0.300	8	1	22.22%	>0.3
	0.100	8	0	6.25%	
	0.033	8	1	4.35%	
	0.011	8	0	0.00%	

【 0 1 1 1 】

【表 7】

表 6. 2 : マウスにおける HPV 6 及び HPV 1 1 (セロコンバージョン) に対する抗体の生成を誘導するための H 1 1 N 4 - 6 T 3 VLP の ED_{50}

抗体	免疫化用量 (μg)	マウスの総数	陽性変換を有するマウスの数	陽性変換率	ED_{50} (μg)
HPV6に対する抗体	0.300	8	8	100.00%	0.025
	0.100	8	7	92.86%	
	0.033	8	6	66.67%	
	0.011	8	0	0.00%	
HPV11に対する抗体	0.300	8	8	100.00%	0.073
	0.100	8	5	66.67%	
	0.033	8	1	9.09%	
	0.011	8	0	0.00%	

【 0 1 1 2 】

【表 8】

表 6. 3 : マウスにおけるHPV6及びHPV11 (セロコンバージョン) に対する抗体の生成を誘導するためのH11N4-6T5 VLPのED₅₀

抗体	免疫化用量 (μ g)	マウスの総数	陽性変換を有する マウスの数	陽性変換率	ED ₅₀ (μ g)
HPV6に対する 抗体	0.300	8	4	66.67%	0.180
	0.100	8	3	30.70%	
	0.033	8	1	5.88%	
	0.011	8	0	0.00%	
HPV11に対する 抗体	0.300	8	6	81.82%	0.189
	0.100	8	2	27.27%	
	0.033	8	0	5.88%	
	0.011	8	1	4.17%	

10

【0113】

【表 9】

20

表 6. 4 : マウスにおけるHPV6及びHPV11 (セロコンバージョン) に対する抗体の生成を誘導するためのHPV11N4 VLPのED₅₀

抗体	免疫化用量 (μ g)	マウスの総数	陽性変換を有する マウスの数	陽性変換率	ED ₅₀ (μ g)
HPV6に対する 抗体	0.300	8	3	44.44%	>0.3
	0.100	8	1	7.69%	
	0.033	8	0	0.00%	
	0.011	8	0	0.00%	
HPV11に対する 抗体	0.300	8	8	100.00%	0.044
	0.100	8	7	91.67%	
	0.033	8	2	36.36%	
	0.011	8	2	13.33%	

30

【0114】

【表 10】

表 6. 5 : マウスにおけるHPV6及びHPV11（セロコンバージョン）に対する抗体の生成を誘導するための混合したHPV11/HPV6 VLPのED₅₀

抗体	免疫化用量 (μ g)	マウスの総数	陽性変換を有する マウスの数	陽性変換率	ED ₅₀ (μ g)
HPV6に対する 抗体	0.300	8	7	95.24%	0.033
	0.100	8	8	92.86%	
	0.033	8	4	50.00%	
	0.011	8	1	7.69%	
HPV11に対する 抗体	0.300	8	7	95.65%	0.023
	0.100	8	8	93.75%	
	0.033	8	6	70.00%	
	0.011	8	1	9.09%	

10

【0115】

結果は以下を示した：マウスにおけるHPV6に対する抗体の産生を誘導するためのH11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPのED₅₀は、HPV6N5 VLP単独のもの及び混合したHPV11/HPV6 VLPのものに匹敵し、HPV11N4 VLP単独のものよりも有意に優れていた；マウスにおけるHPV11に対する抗体の酸性を誘導するためのH11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPのED₅₀は、HPV11N4 VLP単独のもの及び混合したHPV11/HPV6 VLPのものに匹敵し、HPV6N5 VLP単独のものよりも有意に優れていた。これはさらに、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPが、HPV6及びHPV11に対する良好な交差免疫原性及び交差防御を有することを示した。

20

【0116】

実施例 8：カニクイザルにおけるH11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの免疫防御の評価

30

同体重のカニクイザル18匹を無作為に3グループ（各グループあたり6匹のサル）に分け、グループ1のサルに5 μ gのH11N4-6T3 VLPをワクチン接種した。グループ2のサルに、5 μ gのH11N4-6T5 VLPをワクチン接種した；グループ3のサルに10 μ gの混合したHPV11/HPV6 VLP（5 μ gのHPV6N5 VLP + 5 μ gのHPV11N4 VLP）をワクチン接種した。使用したアジュバントはアルミニウムアジュバントであり、注入量は1mlであり、サルは筋肉内注射によってワクチン接種された。ワクチン接種スケジュールを表7に示した。

【0117】

ワクチン接種から2ヶ月後、静脈血を採取し、血清の中和抗体力価を中和試験により決定した。実験結果を図9に示した。結果は、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPのいずれかが、カニクイザルにおけるHPV11及びHPV6に対する中和抗体の酸性を誘導し得ることを示した。それらによって誘導された中和抗体の力価は、混合したHPV11/HPV6 VLPによって誘導された中和抗体の力価に匹敵した。これらの結果は、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPの両方が良好な免疫原性を有し、カニクイザルにおけるHPV6及びHPV11に対する交差防御を誘導することができ、それらのHPV11及びHPV6に対する防御効果は、混合したHPV11/HPV6 VLPのものに匹敵したことを示した。したがって、H11N4-6T3 VLP及びH11N4-6T5 VLPは、HPV6及びHPV11による感染を予防するために使用することができる。

40

【0118】

50

【表 1 1】

表7. カニクイザル用のワクチン接種スケジュール

免疫原	アジュバント	免疫化用量	数	ワクチン化手順
混合したHPV11/HPV6 VLP	アルミニウム アジュバント	10 μ g (各VLPについて5 μ g)	6	単回注射
H11N4-6T3 VLP	アルミニウム アジュバント	5 μ g	6	単回注射
H11N4-6T5 VLP	アルミニウム アジュバント	5 μ g	6	単回注射

10

【0 1 1 9】

本発明の特定の実施形態について詳細に説明したが、当業者であれば、本明細書に開示された教示によれば、様々な修正及び変更が可能であり、そのような修正及び変更は、本発明の範囲内であることを理解する。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲及びその同等物によって与えられる。

【図 1】

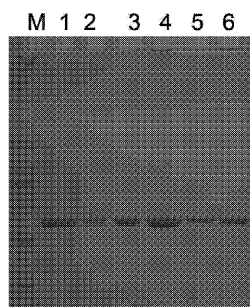


図 1

【図 2】

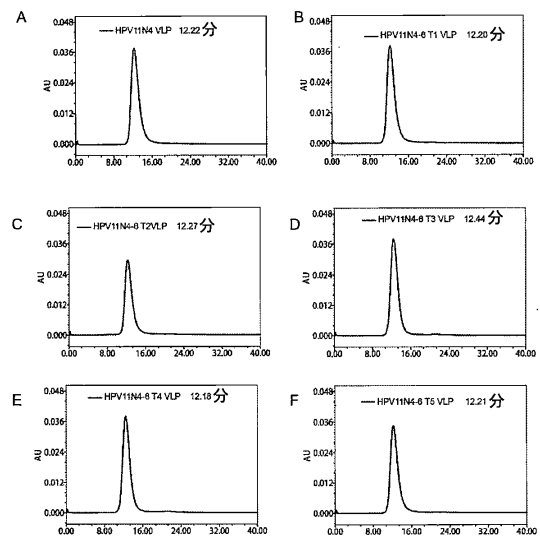


図2

【図 3】

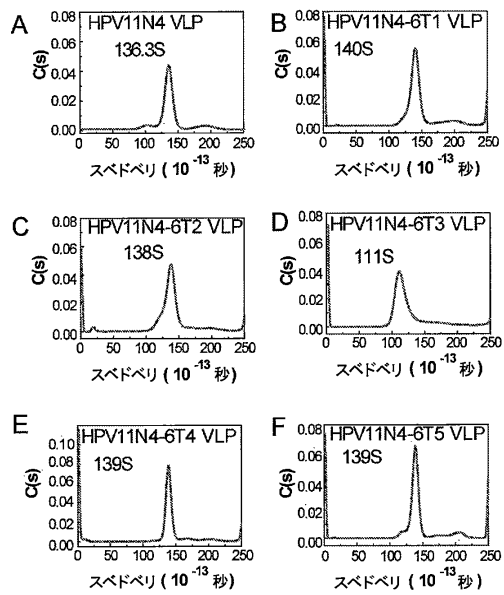
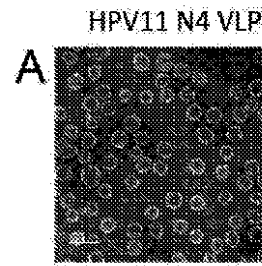
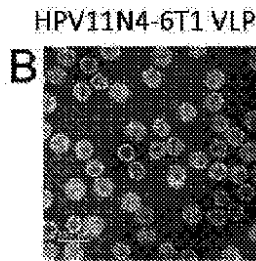


図3

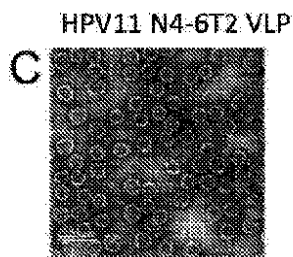
【図 4 A】



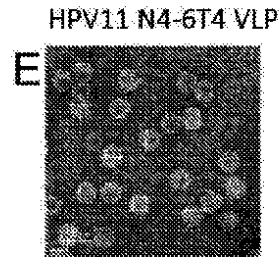
【図 4 B】



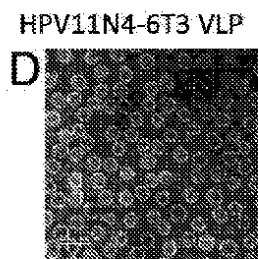
【図 4 C】



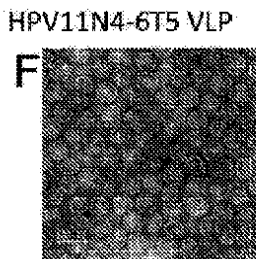
【図 4 E】



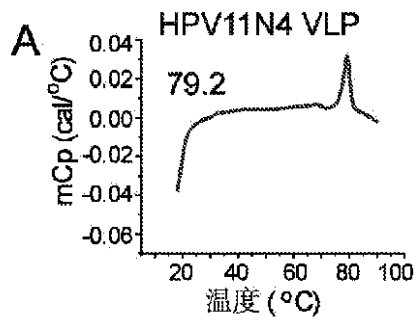
【図 4 D】



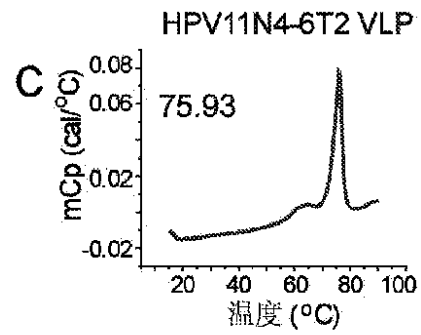
【図 4 F】



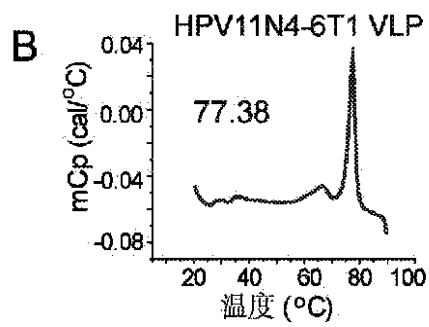
【図 5 A】



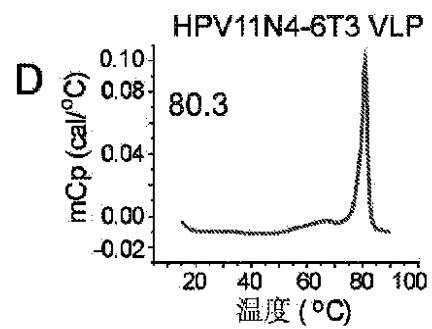
【図 5 C】



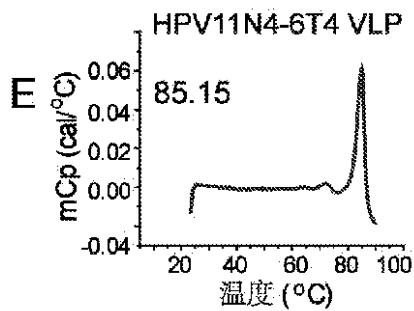
【図 5 B】



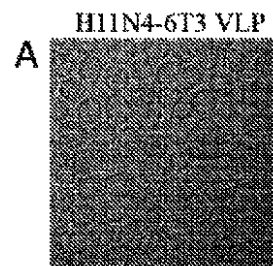
【図 5 D】



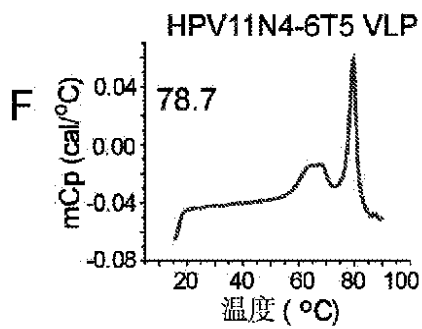
【図 5 E】



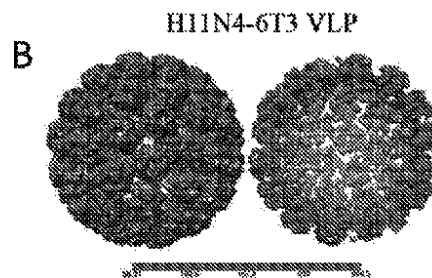
【図 6 A】



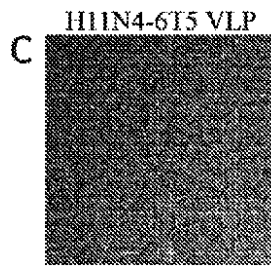
【図 5 F】



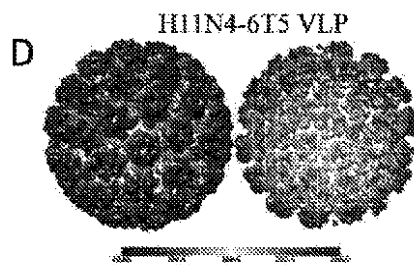
【図 6 B】



【图 6 C】



【图 6 D】



【图 7】

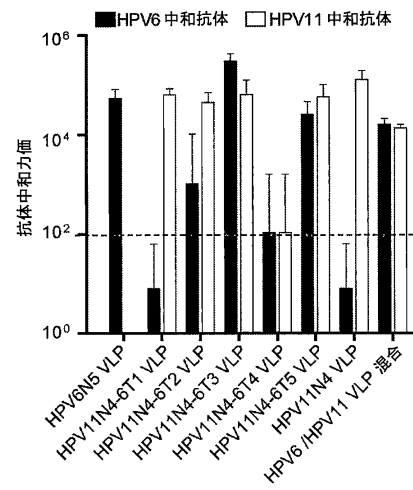


图7

【图 8】

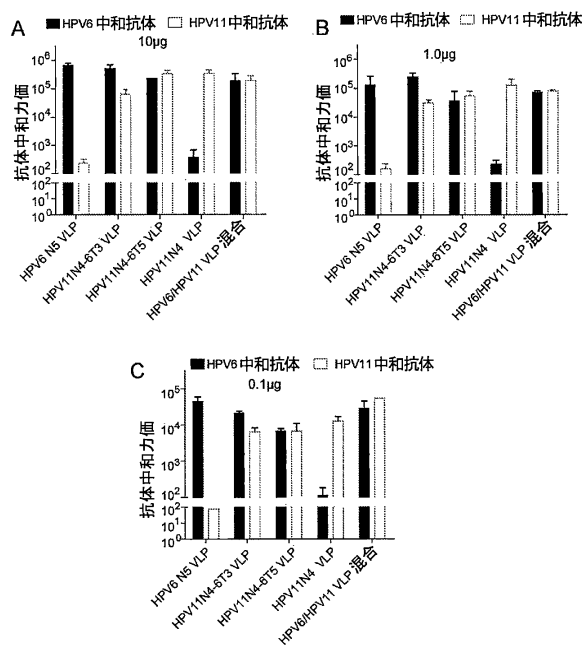


图8

【图 9】

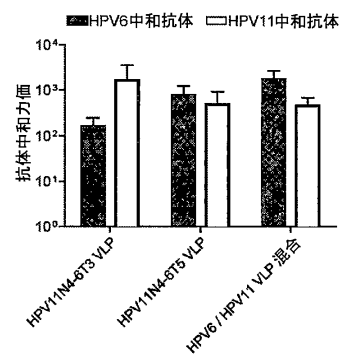


图9

【配列表】

0006920694000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 0 7 K	14/025 (2006.01)	C 0 7 K 14/025
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01

(73)特許権者 518197627

シアメン イノバックス バイオテック カンパニー, リミティド
中華人民共和国, 3 6 1 0 2 2 フーチエン, シアメン, ハイツァン, シンユアン ロード, ナン
バー 1 3 0

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 リー シャオウェイ

中華人民共和国, 3 6 1 0 0 5 フーチエン プロバンス, シアメン, スーミン ディストリクト
, スー ミン ナン ロード ナンバー 4 2 2

(72)発明者 ワン タニン

中華人民共和国, 3 6 1 0 0 5 フーチエン プロバンス, シアメン, スーミン ディストリクト
, スー ミン ナン ロード ナンバー 4 2 2

(72)発明者 リウ シンリン

中華人民共和国, 3 6 1 0 0 5 フーチエン プロバンス, シアメン, スーミン ディストリクト
, スー ミン ナン ロード ナンバー 4 2 2

(72)発明者 リー チーハイ

中華人民共和国, 3 6 1 0 0 5 フーチエン プロバンス, シアメン, スーミン ディストリクト
, スー ミン ナン ロード ナンバー 4 2 2

(72)発明者 チャン チュン

中華人民共和国, 3 6 1 0 0 5 フーチエン プロバンス, シアメン, スーミン ディストリクト
, スー ミン ナン ロード ナンバー 4 2 2

(72)発明者 シア ニンシャオ

中華人民共和国, 3 6 1 0 0 5 フーチエン プロバンス, シアメン, スーミン ディストリクト
, スー ミン ナン ロード ナンバー 4 2 2

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 9 1 1 4 1 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 5 8 9 8 8 (U S , A 1)

特開 2 0 1 5 - 1 7 1 3 6 3 (J P , A)

特表 2 0 0 0 - 5 0 1 2 8 5 (J P , A)

Virology , 2 0 0 0 年, Vol.266, pp.237-245

Virology , 2 0 0 1 年, Vol.289, pp.262-268

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed