

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年7月3日(03.07.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/103608 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/025 (2006.01) A61K 39/29 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/082094
- (22) 国際出願日: 2013年11月28日(28.11.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-280850 2012年12月25日(25.12.2012) JP
- (71) 出願人: 一般財団法人化学及血清療法研究所
(THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市北区
大窪一丁目6番1号 Kumamoto (JP). 国立感染症
研究所長が代表する日本国(JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL
INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒1628640 東京都新宿区戸山一丁目23番1号
Tokyo (JP).

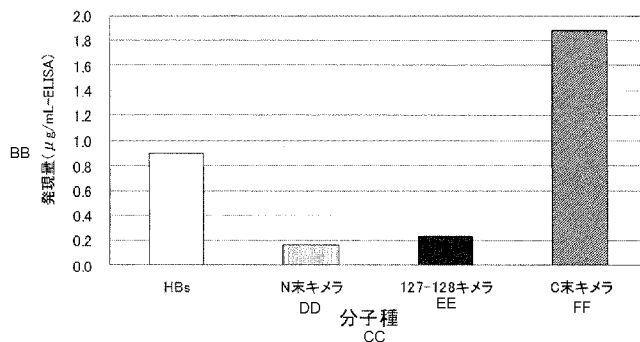
- (72) 発明者: 米村 宏(YONEMURA, Hiroshi); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314番地1
一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所
内 Kumamoto (JP). 坂口 正士(SAKAGUCHI, Masashi); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314
番地1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊
池研究所内 Kumamoto (JP). 今村 孝(IMAMURA,
Takashi); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺131
4番地1 一般財団法人化学及血清療法研究所
菊池研究所内 Kumamoto (JP). 森 清一郎(MORI,
Seiichiro); 〒1628640 東京都新宿区戸山一丁目2
3番1号 国立感染症研究所内 Tokyo (JP). 神田
忠仁(KANDA, Tadahito); 〒1628640 東京都新宿区
戸山一丁目23番1号 国立感染症研究所内
Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅
田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,

[続葉有]

(54) Title: VACCINE FOR HPV INFECTION AND/OR HEPATITIS B CONTAINING HPV/HBS CHIMERIC PROTEIN AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: HPV/HBs キメラタンパク質を有効成分とする HPV 感染症及び/又はB型肝炎用ワクチン

[図1] AA
発現レベルスクリーニング



AA	Expression-level screening	DD	N-terminus chimera
BB	Expression level	EE	127-128 chimera
CC	Molecular species	FF	C-terminus chimera

(57) Abstract: A chimeric protein made from a HPV-L2 peptide and an HBs protein, said HPV-L2 peptide being one of the follow-
ing: (1) a peptide comprising the 20 amino acids of the core sequence region; (2) a peptide comprising part of the core sequence re-
gion, namely the six amino acids glycine, glycine, leucine, glycine, isoleucine, and glycine; or (3) a peptide comprising up to 70
amino acids, obtained by adding amino acids derived from the HPV-L2 protein to the N-terminus and/or the C-terminus of the core
sequence region. Also, a vaccine for HPV infection and/or hepatitis B, said vaccine containing the aforementioned chimeric protein
as an active ingredient. A vaccine containing this chimeric protein exhibits increased expression levels in the host, resulting in im-
proved immunizing capacity (early antibody inducement), and has a wide spectrum, being effective on a large number of HPV types.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2014/103608 A1



LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

HPV-L2 ペプチドと HBs タンパク質とのキメラタンパク質であって、HPV-L2 ペプチドが、(1) 20 アミノ酸のコア配列領域からなるペプチド、(2) Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly なる 6 アミノ酸を有するコア配列領域内のペプチド、または (3) コア配列領域の N 末側及び/又は C 末側に HPV L2 タンパク質由来のアミノ酸が付加された 70 個以下のアミノ酸からなるペプチドである、前記キメラタンパク質; 及び該キメラタンパク質を有効成分として含有する HPV 感染症及び/又は B 型肝炎用ワクチン。本発明のキメラタンパク質を含有するワクチンは、宿主における発現量が増加し、免疫能力が増強しており (早期の抗体誘導)、多くの HPV 型に有効な広いスペクトルを持ったワクチンである。

明 細 書

発明の名称：

HPV/HBsキメラタンパク質を有効成分とするHPV感染症及び／又はB型肝炎用ワクチン

技術分野

[0001] 本願発明は、ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus : HPV) 由来のペプチドとヒトB型肝炎ウイルス表面タンパク質 (HBsタンパク質) とのキメラタンパク質を有効成分とするワクチンに関する。

背景技術

[0002] ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus : HPV) は、パピローマウイルス科に属する小型の環状二本鎖DNAウイルスで、ヒト乳頭腫ウイルスとも呼ばれる。HPVは、ウイルスゲノムが外郭タンパク質 (カプシドタンパク質 : Capsid protein) で覆われた直径 50-55nmの正二十面体構造を取るが、カプシドを覆うエンベロープは存在しない。ゲノムサイズは種類により異なるが約8,000塩基ほどで、この中に初期タンパク質 (E1, E2, E4, E5, E6及びE7) と後期タンパク質 (L1及びL2) がコードされている。L1とL2でHPV粒子のカプシドが形成され、L2はカプシド形成に補助的に働いている。

[0003] HPVの宿主域は厳格でヒト以外の動物に感染しない。HPVは、接触感染により皮膚や粘膜に潜伏持続感染し、子宮頸がん (扁平上皮がん、腺がん) 及びその前駆病変 [cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 及び3]、尖圭コンジローマ等を惹き起こす。日本では、年間19000人が子宮頸がんを発症し、5600人が死亡している (非特許文献5参照)。WHOによる推定では、世界の女性の悪性腫瘍の13% (53万人) にHPVの感染が関わっており、3億人がHPVのキャリアーであるとみられている (非特許文献4参照)。

[0004] ウイルス増殖に関する研究では、HPV感染細胞の分裂時にHPVゲノムは複製し、娘細胞に分配される。潜伏感染細胞が表皮形成の分化を始めると、分化終盤でウイルス増殖が起こる。しかしながら、HPVは、ウイルス粒子として分

離されることは珍しく、ゲノムDNAのみがクローニングされている。これまでにHPVはカプシドタンパク質（L1）遺伝子の塩基配列の相同性に基づいて、100種類以上の遺伝子型に分類されている。HPVは、その遺伝子型により感染部位や発症する病気が異なり、皮膚病変に検出されるもの（上皮型）と粘膜病変に検出されるもの（粘膜型）に大別され、更に、粘膜型のHPVは、種々の癌に検出される高リスク型と良性の尖形コンジローマ等の原因となる低リスク型に分類される。高リスク型HPVには、子宮頸がん、肛門周囲がん及び陰茎がんなどから検出される16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82型が含まれ、低リスク型HPVには、6及び11型等が含まれる（非特許文献1、非特許文献2及び非特許文献3参照）。

[0005] HPV感染予防ワクチンに関しては、2006年6月に米国メルク社により開発されたHPV6, 11, 16, 18型のウイルス様粒子（VLP）を混合したワクチン「商品名Gardasil（登録商標）（ガーダシル）」がアメリカ食品医薬品局（FDA）により承認され、2007年5月に英国グラクソ・スミスクライン社により開発されたHPV16, 18型のVLPを混合したワクチン「商品名Cervarix（サーバリクス）」が、オーストラリアの医薬品審査当局（TGA）により承認された。日本では、2009年10月にCervarix、2011年7月にGardasilが承認されている。

[0006] これらは第一世代ワクチンと呼ばれ、L1タンパク質をコードする遺伝子を酵母菌や昆虫細胞に発現させ、VLPを作らせ、これにアジュバントを加えたものである（非特許文献6参照）。いずれも特定の遺伝子型により引き起こされる癌に対して承認されたものであり、Gardasilなら6, 11, 16及び18型、Cervarixなら16及び18型以外では、ごく一部の型に対する予防効果しか認定されていない（非特許文献新12）。したがって、HPV感染阻止、その後に誘発される癌の発症をより効率良く抑制するために、あらゆる種類の型のHPV感染に有効に働くワクチンの開発が求められる（非特許文献5及び非特許文献6参照）。

[0007] かかる試みの一つとして、神田らの報告がある。彼らは、HPV16型のL2の64-81位及び108-120位のアミノ酸配列中に高リスク型HPVに共通の中和エプトー

プが存在すること、及びHPV16型のL2由来のペプチドを16型HPVのL1に挿入したキメラ蛋白の集合体であるVLPは、HPV16型、18型、31型、33型、35型、52型及び6型の感染を阻害することを明らかにした（特許文献1及び特許文献2参照）。更に、18-38位、56-75位及び96-115位の各L2ペプチドをL1に挿入したキメラタンパク質からなるVLPについても同様の報告を行っている（非特許文献13参照）。一方で、挿入ペプチドの長さが、エピトープ部分の抗原としての提示に影響することも報告している（特許文献1）。

[0008] HPVのL1以外に、種々の粒子形成能を有するタンパク質に外来ペプチドを付加又は挿入して得られるキメラタンパク質の粒子形成やワクチンとしての有用性に関する研究が報告されている。例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）の表面タンパク質（HBsタンパク質）のN末又はC末にHPV16型のL2の一部からなるペプチド（N末より50-220アミノ酸領域及び100-220アミノ酸領域）を付加したキメラ蛋白質をマウスに免疫し、ELISAでL2及びHBsに対する抗体の上昇があることを確認している（特許文献7参照）。その他、HBsタンパク質の親水性領域やHBsAg-Sの外側ループ内の露出部位に外来遺伝子を挿入して得られるキメラタンパク質（特許文献3及び特許文献4参照）、及びHBsタンパク質のN末側に外来ペプチドを結合させたキメラタンパク質のVLP形成に関する報告がある（特許文献5及び特許文献6参照）。

[0009] HBsタンパク質は、酵母由来の組換え沈降B型肝炎ワクチンの有効成分として使用されるなど、ワクチンとしての効果や安全性が高いことが実証されている（非特許文献7参照）。しかしながら、外来ペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質からなるVLPは、挿入される外来ペプチドの種類や長さの違いにより、VLPの安定性、細胞からの発現効率、発現されたものの構造変化等に影響を及ぼすこともあり（特許文献4参照）、必ずしも、ワクチンとしての有用性が担保されるものではない。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：W02005/097987号公報

特許文献2：特開2007-45746号公報

特許文献3：特開平8-198897号公報

特許文献4：特表2004-504067号公報

特許文献5：特開2011-115042号公報

特許文献6：特開2007-209343号公報

特許文献7：W02010/001409号公報

非特許文献

[0011] 非特許文献1：ウイルス第56巻第2号，pp219-230，2006

非特許文献2：医学のあゆみVol.224 No9:669-680，2008

非特許文献3：Munoz, N. et al.: New Engl J Med, 348, 518-527, 2003.

非特許文献4：Monitoring of Cancer Incidence in Japan MCIJ2007 March 2012

非特許文献5：ウイルス第58巻第2号，pp155-164，2008

非特許文献6：産科と婦人科 73 (2) :217-225, 2006

非特許文献7：国立感染症研究所 B型肝炎ワクチンに関するファクトシート
(平成22年7月7日版)

非特許文献8：Kawana, K, et al.: Common neutralization epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus types 16 and 6. J. Virology., 73, 6188-6190, 1999 (L2の106-121)

非特許文献9：Ivonne Rubio et al. : Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20-38) peptide displayed on bacterial thioredoxin. Vaccine, 27, 1949-1956, 2009

非特許文献10：Fujiyama, A. et al.: Nuc. Acid Res., 11(13), 4601-4610, 1983

非特許文献11：Christophe, M. et al.: Emer. Inf. Dis., 14(11), 1777-1780, 2008

非特許文献12：日本耳鼻咽喉科学会会報 Vol. 115 No. 2, 73-84, 2012

非特許文献13：Kondo, K et al.: Journal of Medical Virology 80:841-846

(2008)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本願発明の目的は、HPVのカプシド構成要素の一つでL2と呼ばれるタンパク質（以下、「L2タンパク質」と称することもある）の特定領域の20個のアミノ酸配列からなるペプチドを、HBsタンパク質のN末側又はC末側に付加又はHBsタンパク質内部に挿入して得られるキメラタンパク質を有効成分とする、ヒトパピローマウイルス感染症及び／又はB型肝炎を予防するためのワクチンを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0013] 本願発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、HPV 16型のL2タンパク質の56-75位のアミノ酸配列からなるペプチド（配列番号4；Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-Leu）を、HBsタンパク質のN末側又はC末側に付加して得られるキメラタンパク質、及びHBsタンパク質内部に挿入して得られるキメラタンパク質は、ウイルス様粒子(VLP)を形成し、HBsタンパク質及び該ペプチドに対する（中和）抗体を誘導することを発見した。特にC末側に付加したキメラタンパク質により産生された抗体は、該ペプチドに対する抗体を早期に誘導すること、HBsタンパク質及び該ペプチドの両方に強く結合すること、且つ該抗体は、多種のHPV型由来のL2ペプチドと結合すること、また、HBs内部に挿入されたキメラタンパク質により産生された抗体は、該ペプチド内の2箇所のアミノ酸配列（N末側及びC末側エピトープ）を認識する抗体を誘導することを見出し、本願発明を完成するに至った。

[0014] 本願発明に従えば、HPV L2タンパク質の特定領域の7~20個のアミノ酸配列を含むペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質、該キメラタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA断片、該DNA断片が組み込まれた発現ベクター（ウイルスベクターを含む）、該発現ベクターを有する宿主、該キメラタンパク質及び該DNA断片を用いたHPV感染症及び／又はB型

肝炎を予防するためのワクチン、並びに該ワクチンの製造方法が提供される。

[0015] 本願発明のキメラタンパク質及び該キメラタンパク質をコードするDNAを有する発現ベクターは、B型肝炎及び／又はHPV感染症の予防や治療に有効に利用され得るものである。したがって、本願発明は、以下の通りである。

〔1〕ヒトパピローマウイルス（HPV）L2タンパク質由来のペプチド（HPV-L2ペプチド）とB型肝炎ウイルス表面タンパク質（HBsタンパク質）とのキメラタンパク質であって、HPV-L2ペプチドが、（1）20アミノ酸のコア配列領域からなるペプチド、（2）Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Glyなる6アミノ酸を有するコア配列領域内のペプチド、または（3）コア配列領域のN末側及び／又はC末側にHPV L2タンパク質由来のアミノ酸が付加された70個以下のアミノ酸からなるペプチドである、前記キメラタンパク質。

〔2〕HPV-L2ペプチドが、コア配列領域からなる、〔1〕に記載のキメラタンパク質。

〔3〕前記コア配列領域が、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-X1aa-Gly-X2aa-Gly-X3aa-Gly-Gly-Arg-X4aa-Gly-Tyr-X5aa-Pro-X6aa（X1aa、X2aa、X3aa、X4aa、X5aa及びX6aaは任意のアミノ酸とする）（配列番号3）で示される配列である、〔1〕又は〔2〕に記載のキメラタンパク質。

〔4〕前記コア配列領域が、下記（1）～（6）から選択されるアミノ酸を有する配列である、〔3〕に記載のキメラタンパク質。

- （1）X1aaが、Thr又はSerである、
- （2）X2aaが、Ser、Thr又はAlaである、
- （3）X3aaが、Thr又はSerである、
- （4）X4aaが、Ser、Thr又はAlaである
- （5）X5aaが、Ile又はValである、及び
- （6）X6aaが、Leu又はIleである

〔5〕前記コア配列領域が、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-Leu（配列番号4）からなるアミノ酸配

列である、〔1〕又は〔2〕に記載のキメラタンパク質。

〔6〕前記キメラタンパク質が、1～11個のHPV-L2ペプチドを含む、〔1〕ないし〔5〕のいずれかに記載のキメラタンパク質。

〔7〕前記ペプチドが、HBsタンパク質のN末端アミノ酸、配列番号2の127-128位、又はC末端アミノ酸の少なくとも一箇所に付加又は挿入された、〔1〕ないし〔6〕のいずれかに記載のキメラタンパク質。

〔8〕前記ペプチドが、HBsタンパク質の配列番号2の127-128位に挿入された、〔7〕に記載のキメラタンパク質。

〔9〕前記ペプチドが、HBsタンパク質のC末端アミノ酸に付加された、〔7〕に記載のキメラタンパク質。

〔10〕前記ペプチドが、HBsタンパク質の配列番号2の127-128位に挿入及びC末端アミノ酸に付加された、〔7〕に記載のキメラタンパク質。

〔11〕ヒトパピローマウイルス（HPV）L2タンパク質由来のペプチド（HPV-L2ペプチド）とB型肝炎ウイルス表面タンパク質（HBsタンパク質）とのキメラタンパク質であって、HPV-L2ペプチドが、20アミノ酸からなり、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-Leu（配列番号4）なるアミノ酸配列に対する相同性が50-100%、70-100%又は80-100%である、前記キメラタンパク質。

〔12〕〔1〕ないし〔11〕のいずれかに記載のキメラタンパク質をコードするDNA断片。

〔13〕前記DNA断片にコードされるキメラタンパク質を発現することができる発現ベクター。

〔14〕前記発現ベクターで形質転換したキメラタンパク質産生宿主。

〔15〕〔1〕ないし〔11〕のいずれかに記載のキメラタンパク質を有効成分として含有する、HPV感染症及び／又はB型肝炎用ワクチン。

〔16〕〔8〕に記載のキメラタンパク質及び〔9〕に記載のキメラタンパク質を有効成分として含有する、HPV感染症及び／又はB型肝炎用ワクチン。

〔17〕〔13〕に記載の発現ベクターを有効成分として含有する、HPV感染

症及び／又はB型肝炎用DNAワクチン。

〔18〕下記（1）ないし（5）の工程を含む、ヒトパピローマウイルス（HPV）L2タンパク質由来のペプチド（HPV-L2ペプチド）とB型肝炎ウイルス表面タンパク質（HBsタンパク質）とのキメラタンパク質を有効成分として含有するHPV感染症及び／又はB型肝炎用ワクチンの製造方法；

（1）20アミノ酸のコア配列領域からなるHPV-L2ペプチド、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Glyなる6アミノ酸を有するコア配列領域内のHPV-L2ペプチド、または、コア配列領域のN末側及び／又はC末側にHPV L2タンパク質由来のアミノ酸が付加された70個以下のアミノ酸からなるHPV-L2ペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質をコードするDNA断片を調製する工程、

（2）前記（1）のDNA断片を有する発現ベクターを調製し、該発現ベクターで宿主を形質転換する工程、

（3）前記（2）により得られる形質転換宿主をGeneticin及びMTXの存在下で培養し、キメラタンパク質産生形質転換宿主を選択する工程、

（4）前記（3）により得られるキメラタンパク質産生形質転換宿主を拡張培養し、培養物から前記キメラタンパク質を精製する工程、及び

（5）前記（4）により得られる精製キメラタンパク質にアジュバント、安定化剤、緩衝剤、等張化剤及び保存剤を添加して、ワクチンとする工程。

発明の効果

[0016] 本願発明の態様の一つであるGly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-LeuからなるペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質は、該ペプチドとHBsタンパク質の両方の抗体産生能を有するので、HPV感染症及び／又はB型肝炎の予防薬の好適な材料となり得る。特に、該ペプチドをHBsタンパク質のC末側に付加させた場合、宿主における発現量の増加だけでなく、該ペプチドの免疫能力の増強（早期の抗体誘導）が認められ、また、HBsタンパク質の内部に挿入した場合、該ペプチド内の少なくとも2箇所のアミノ酸配列に対する抗体を誘導することができる点において、ワクチンの生産性を高め、品質を向上させるのに有用である。

[0017] また、上記ペプチドのN末側6個のアミノ酸配列は、HPVの株間でよく保存されており、多くのHPV型に有効である。事実、実施例に示されるように、本願発明のキメラタンパク質により誘導される抗体は多くの型のHPVと反応する。したがって、本願発明に従えば、従来の型特異的なワクチンとは異なり、より広いスペクトルを持ったワクチンの提供が可能となる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]図1は、抗HBsモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAにより、形質転換細胞の培養上清中のキメラタンパク質濃度を測定した結果を示す図面である。

[図2]図2は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）と同じ遺伝子型由来のHPV-L2ペプチドとの反応性を示す図面である。

[図3]図3は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（個体別血清）と同じ遺伝子型由来のHPV-L2ペプチドとの反応性を示す図面である。

[図4]図4は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）と異なる遺伝子型由来のHPV-L2ペプチドとの反応性を示す図面である。

[図5]図5は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）中のHBs抗体価の測定結果を示す図面である。

[図6]図6は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）のエピトープ解析を行った結果を示す図面である。

[図7]図7は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）と異なる遺伝子型由来のHPV-ウイルス様粒子（VLP）との反応性を示す図面である。

[図8-1]図8-1は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）の異なる遺伝子型由来のHPV16-偽ウイルス（PsV）に対する中和能を評価した結果を示す図面である。

[図8-2]図8-2は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）の異なる遺伝子型由来のHPV18-偽ウイルス（PsV）に対する中和能を評価した結果を示す図面である。

[図8-3]図8-3は、キメラタンパク質で免疫したマウス血清（プール血清）の

異なる遺伝子型由来のHPV35-偽ウイルス (PsV) に対する中和能を評価した結果を示す図面である。

発明を実施するための形態

[0019] 本願発明の特徴は、HPV群間で極めてよく保存されたHPVのL2タンパク質由来のペプチドとB型肝炎ウイルス表面タンパク質 (HBsタンパク質) とのキメラタンパク質を、HPV感染症及び／又はB型肝炎を予防するためのワクチンの有効成分とすることにある。

[0020] 前述したように、HPVはウイルス粒子として回収することが難しく、カプシド (L1) 遺伝子の塩基配列の相同性に基づいて遺伝子型が決定されており、これまでに100種類以上の遺伝子型が分離されている。例えば、HPVの16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82型が高リスク型のHPV群に、HPVの6及び11型が低リスク型のHPV群に分類される。HPVのL2タンパク質には、高リスク型のHPV群間で極めてよく保存されたアミノ酸配列からなる領域 (以下、「コア配列領域」と称することもある) が存在しており、低リスク型のHPV群においても同様のコア配列領域が存在する。該コア配列領域からなるHPV L2タンパク質由来のペプチド (以下、「HPV-L2ペプチド」と称することもある) が本願発明に使用される。このようなコア配列領域として、HPV16, 31及び35型では56~75番目の20アミノ酸、HPV39, 45, 51, 52, 56, 58, 66及び6型では55~74番目の20アミノ酸、HPV73型では57~76番目の20アミノ酸、及びHPV11型では54~73番目の20アミノ酸が挙げられる。これらの20アミノ酸の配列は、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-X1aa-Gly-X2aa-Gly-X3aa-Gly-Gly-Arg-X4aa-Gly-Tyr-X5aa-Pro-X6aa (X1aa, X2aa, X3aa, X4aa, X5aa及びX6aaは任意のアミノ酸とする) なる式で表示できる (配列番号3)。前記の任意のアミノ酸は、HPV株の型間で変異が認められる部位であり、

- (1) X1aaはThr又はSer、
- (2) X2aaはSer, Thr又はAla、
- (3) X3aaはThr又はSer、
- (4) X4aaはSer, Thr又はAla、

(5) X5aaはIle又はVal、及び

(6) X6aaはLeu又はIle

から選択される。

[0021] Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-Leu (配列番号4) で示されるアミノ酸配列からなるHPV-L2ペプチドを、動物に免疫して得られた抗体は、一部に変異を有するコア配列領域のペプチドとも反応することから、HPV株の型間で全く変異が見られないN末側から6個のアミノ酸配列 (Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly) に共通のエピトープが存在することは容易に推認される (実施例6参照)。したがって、本願発明に用いられるHPV-L2ペプチドは、20アミノ酸のコア配列領域からなるペプチドに加えて、該6アミノ酸からなるペプチド及び該6アミノ酸からなるペプチドのN末側及び／又はC末側にHPV L2タンパク質由来のアミノ酸が付加された種々のコア配列領域内のペプチドを包含する。

[0022] さらに、コア配列領域のN末側及び／又はC末側にHPV-L2タンパク質由来のアミノ酸が付加されたペプチドも本願発明に使用することが可能であり、HPV-L2ペプチドはこれらのペプチドを包含する。好ましくは、該HPV-L2ペプチドのアミノ酸の総数は70個以下である。

[0023] 該共通エピトープを有するコア配列領域からなるHPV-L2ペプチドは、いずれも本願発明に使用できるが、配列番号4のアミノ酸配列に対して50-100%、70-100%又は80-100%の相同性を有する、20アミノ酸からなるペプチドを用いるのが好ましい。更に好ましくは、上記の式 (配列番号3) で示されるHPV-L2ペプチドのアミノ酸置換体が用いられる。最も好ましくは、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-Leu (配列番号4) で示されるアミノ酸配列からなるHPV-L2ペプチドである。

[0024] また、HPV-L2ペプチドは、後述の条件 (抗原活性及び粒子形態の維持) を満たすものであれば、上記6アミノ酸又は該6アミノ酸のN末側及び／又はC末側にHPV-L2タンパク質由来のアミノ酸が付加された7~19アミノ酸、及び20アミノ酸からなるコア配列領域のN末側又はC末側に更にHPV-L2タンパク質由来

のアミノ酸が付加されたものも包含する。

[0025] 上記のアミノ酸置換体とは別に、HPV-L2ペプチドにシステイン(Cys)を付加又は挿入したHPV-L2ペプチド改変体も本願発明の一態様である。一般に、ペプチド単独で動物を免疫した場合は強い免疫効果を得ることは難しいので、キャリア（例えば、KLH）と結合させ、更にはアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバント）を添加し使用する。あるいは、ペプチド自体の免疫付与能力を高めるために該ペプチドのN末側、C末側、及び／又は内部にシステイン（Cys）を付加又は挿入することが行われる（WO 2010/044464 A1及びWO 2011/024748 A1参照）。例えば、インフルエンザウイルスA型のM2のアミノ酸配列のうち、2～24番目の23アミノ酸から成るペプチドにシステイン残基を挿入したM2ペプチドは、未修飾のM2ペプチドよりも高い免疫原性（2倍から20倍）を有することが報告されている（WO 2011/024748 A1参照）。Cysへの置換やCysの付加により同様の効果が期待される場合は、本願発明のHPV-L2ペプチドにおいてもHPV群間の共通エピトープが保存される条件下でHPV-L2ペプチドの1～数個のアミノ酸をCysに置換又は付加しても良い。具体的には、HPV-L2ペプチドは、N末側6個のアミノ酸はHPV群間で全く同じ配列を有するので、該アミノ酸配列以外の部位にCysを付加又は挿入するのが好ましい。以下、改変、未改変の区別が不要な場合は、これらを総合して、単に、HPV-L2ペプチドと称することもある。

[0026] HPV-L2ペプチドのHBsタンパク質への付加又は挿入部位は、HPV-L2ペプチド及びHBsタンパク質に対する免疫原性が維持されるのであれば、いずれの部位であっても良い。好ましくは、HPV-L2ペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質が粒子を形成し、且つ、HPV-L2ペプチドが該粒子の表面に位置することが好ましい。かかる候補として、HBsタンパク質のN末端側、C末端側、及びHBsタンパク質内部の特定部位（配列番号2の127-128位）が挙げられる。好ましくは、HPV-L2ペプチドは、HBsタンパク質のC末端側に付加及び／又はHBsタンパク質内部の特定部位（配列番号2の127-128位）に挿入される。

[0027] HBsタンパク質のC末端側に該ペプチドを付加することにより、該ペプチド

に対する抗体を早期に誘導することができ、HBsに対する高い抗体価も維持できる（実施例1及び実施例7）。また、HBsタンパク質内部の特定部位（配列番号2の127-128位）に挿入することにより、HBsに対する抗体誘導は低下するものの、該ペプチド内の2箇所のアミノ酸配列（2つのエピトープ）を認識する抗体が誘導される。これは、種々のHPV株に対して、よりスペクトルの広い抗体が誘導されることを意味する（実施例8）。したがって、より効果的にHPVに対する抗体を誘導するためには、HPV-L2ペプチドをHBsタンパク質のC末端側に付加し、且つHBsタンパク質内部の特定部位（配列番号2の127-128位）に挿入するのが好ましい。同様の効果は、HPV-L2ペプチドをHBsタンパク質のC末端側に付加したキメラタンパク質と該ペプチドをHBsタンパク質内部の特定部位（配列番号2の127-128位）に挿入したキメラタンパク質の混合物を免疫原とすることにより得られる。この場合、HBsタンパク質に対して、より高い抗体価の誘導が期待される。最適な効果を得るための両キメラタンパク質の混合比は、通常の方法により適宜調節すれば良い。

[0028] 外来ペプチドをHBsタンパク質のN末端側に付加する場合、該ペプチドは20～70個のアミノ酸であることが好ましい。このサイズより大きいと粒子形成に影響を与える可能性があり、このサイズより小さいと抗原としての活性が低下する可能性がある。したがって、本願発明では抗原活性及び粒子形態が維持されるのであれば、HPV-L2ペプチドを連結して用いることができる。コア配列領域からなるHPV-L2ペプチド（20アミノ酸）の場合、2～3個を連結して用いることができる。

[0029] 前述したように、本願発明にはコア配列領域からなるHPV-L2ペプチドのN末側又はC末側にHPV L2タンパク質由来のアミノ酸が付加された、全長21～70個のアミノ酸からなるペプチドを使用することができるが、アミノ酸の数が21～35個の場合、該HPV-L2ペプチドを2個連結することができる。

[0030] また、コア配列領域内の共通エピトープ配列（Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly）及び該共通エピトープ配列を有する6～19アミノ酸からなるペプチドの場合、アミノ酸の総数が20～70個となるようにペプチドサイズに応じて2～11個のHP

V-L2ペプチドを連結して用いることができる。

- [0031] また、付加または挿入ペプチドのサイズが70アミノ酸までの範囲内ならば、HPV-L2ペプチドに加えて、他のペプチドを付加又は挿入しても良い。例えば、前述のM2ペプチドを付加又は挿入することにより、HPV感染症、B型肝炎及びインフルエンザに有効な三価ワクチンとすることができる。
- [0032] 本願発明のHPV-L2ペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質は以下の方法により、取得することができる。まず、キメラタンパク質の母体となるHBsタンパク質をコードする遺伝子（HBs遺伝子）が作製される。HBs遺伝子の塩基配列は、これまでに多くの特許文献、非特許文献及びデータベース（例えば、非特許文献10及び非特許文献11参照）に開示されているので、該HBs遺伝子の塩基配列に基づいてSambrookらが述べている一般的な遺伝子組換え技術（Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989）を利用して容易に取得することができる。また、使用するHBs抗原は、Large、middle及びsmallのいずれを使用しても良い。
- [0033] 次に、PCR法やDNA合成を用いた方法により、HPV-L2ペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質をコードするDNA断片（以下、「キメラタンパク質DNA断片」と称することもある）が調製される。例えば、PCR法により、HBsタンパク質のN末側又はC末側にHPV-L2ペプチドを付加したキメラタンパク質DNA断片を調製するときは、HPV-L2ペプチドをコードする塩基配列及びHBs遺伝子の一部の塩基配列からなるプライマーとHBs遺伝子のもう一方のプライマー（どちらがN末側にくるかで、プライマーの方向が決定される）が用いられる。HBsタンパク質の内部にHPV-L2ペプチドを付加したキメラタンパク質DNA断片を調整する場合も同様の操作が行われる。
- [0034] HPV-L2ペプチドをコードする塩基配列及びHBs遺伝子の塩基配列に基づき設計されるPCR用プライマーは、DNA合成受託機関（例えば、QIAGEN社）などに依頼すれば容易に入手可能である。このとき、目的に応じて5'側にKOZAK配列（Kozak M, J.Mol.Biol., 196, 947 (1987)）や5'及び3'末側に適切な制限

酵素認識部位の塩基配列が付加される。PCRにより増幅したDNA断片は、クローニングベクター、例えば、pUC119（タカラバイオ社）、pBlueScript（アジレント・テクノロジー社）、又はpCRII-TOP0（Invitrogen社）等にクローニングし、DNAシーケンサー（ABI Prism 377 アプライドバイオシステムズ社）により塩基配列の決定が行われる。目的のキメラタンパク質DNA断片の確認は、得られた塩基配列の結果と、設計されたPCR用プライマー配列及び既存のHBs遺伝子の塩基配列とを比較することにより行われる。

[0035] こうして得られた本願発明のキメラタンパク質DNA断片を適当な発現ベクターに組み込み、これを宿主に導入することによって、キメラタンパク質DNA断片の発現が行なわれる。発現ベクターとしては、プラスミドやウイルスベクター等を用いることができる。該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる微生物又は動物細胞との組み合わせにより、Lac、tac、pho 5、adh、SV40初期、SV40後期、及び β アクチンなどのプロモーターから選択することができる。宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などが常用されるが、使用目的にあわせて選択すればよい。宿主細胞を形質転換するときには公知の方法を利用すればよい。例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン系のリポソームを用いる方法、プロトプラストポリエチレングリコール融合法、エレクトロポレーション法などが利用でき、使用する宿主細胞により適当な方法を選択すれば良い。

[0036] 本願発明では、国立感染症研究所（神田博士及び森博士）から分与された組換えバキュロウイルスベクター（調製例参照）を制限酵素で切断することにより、目的のキメラタンパク質遺伝子、すなわち、HBsタンパク質のN末端、C末端及び内部（配列番号2の127-128位の間）のいずれかにHPV-L2ペプチド（配列番号1の56~75番目の20アミノ酸）が付加又は挿入されたキメラタンパク質DNA断片を取得した。次いで、各キメラタンパク質DNA断片を動物細胞用発現プラスミドpCAGG-S1(Sal).dhfr.neo（W02003/004641参照）に組み込み、該発現プラスミドをリン酸カルシウム法変法によりチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の形質転換処理を行った。

- [0037] 本願発明のキメラタンパク質を発現している形質転換細胞は、以下の2段階の方法でスクリーニングされる。まず、形質転換処理を行った細胞を10~1,000 nmolのLメトトレキサート (MTX) と100~1,000 $\mu\text{g/mL}$ のジェネティシン (Geneticin G418 sulfate) を含む培地で一定期間培養して生存する細胞を選択/増殖させることにより形質転換細胞を選択する。ついで、得られた形質転換細胞中にキメラタンパク質が発現している該細胞が選択される。具体的には、本発明のキメラタンパク質は、培養上清や細胞破砕物につき、HPV-L2ペプチド又はHBsタンパク質と特異的に結合する抗体を用いてELISAやWB等を行うことにより確認される。
- [0038] 形質転換細胞の培養には、通常の細胞を培養するとき用いられる条件を用いれば良い。すなわち、T7m培地、Ex-cell SP2/0培地、YMM-01B培地、YMM-01C培地、OptiCHO培地、Ex-cell 302培地等、あるいはこれらのいくつかを混合した培地が使用される。これに、ウシ胎児血清、カルシウム、マグネシウム、アミノ酸、ビタミン等を添加することもある。培養温度は32°C~38°C、培養期間は2~20日間である。医薬品を製造する段階では、キメラタンパク質発現細胞を無血清培地で維持するのが好ましい。
- [0039] 本願発明のキメラタンパク質の精製は、タンパク質化学において通常使用される方法、例えば、遠心分離、塩析法、限外ろ過法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換クロマト法、ゲルろ過クロマト法、アフィニティークロマト法、疎水クロマト法、ハイドロキシアパタイトクロマト法などを適宜組み合わせることにより達成される。得られたキメラタンパク質の量は、BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Inc)、プロテインアッセイキット (日本バイオ・ラッド株式会社) などを用いて測定される。
- [0040] 本発明のキメラタンパク質は、HPV-L2ペプチドとHBsタンパク質を個別に発現させるか化学合成した後、それらを化学的に結合させたものであっても構わない。個別に発現させる際には、化学合成したDNA配列やプラスミドに挿入されたDNA配列を鋳型として、公知の遺伝子増幅方法で増幅させ、上記の方法でそれぞれの発現プラスミドを構築することが可能である。発現プラスミド

は上記のように宿主に導入して、目的のペプチドやタンパク質を入手することが可能である。

[0041] 化学的に結合させる場合にはクロスリンカーを用いて結合させる方法が例示される。その場合、タンパク質やペプチドに存在するアミノ基、チオール基 (SH基)、糖鎖のアルデヒド基などを利用して結合させる事ができるが、用いる官能基に制限はない。さらにビオチンやアビジンなどの生体分子同士の相互作用を利用した結合を利用することで化学的に結合すること方法も例示される。

[0042] 本願発明のキメラタンパク質のワクチンとしての評価は、抗原を小動物、例えば、ニワトリ、マウス、ラット、モルモット、イヌ、又はサルなどに免疫した後、*in vitro*の系においては、免疫動物から採血後、血清を分離し、当該血清中の本発明のキメラタンパク質に対する抗体価やHPV及びB型肝炎ウイルスに対する中和抗体価を測定することにより、また、*in vivo*の系においては、前記免疫動物に擬似HPVを投与し、その後免疫動物の生死、病状等を観察することにより行われる。一般に*in vitro*の系における抗体の測定には、ELISA法、PHA法、プラークアッセイ法などが常用される。より具体的には、B型肝炎ウイルスに対する中和抗体はHBs抗体を測定することにより、また、HPVに対する中和抗体は、ウイルス様粒子 (Virus like particle : VLP) や感染性偽ウイルス (Buck C B等、Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. J Virol 78: 751-757, 2004.) との結合能を測定することにより行われる。

[0043] 免疫方法 (例えば、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内、経鼻、経口、及び舌下等の投与部位、及び免疫期間等) は、ワクチン等の免疫原性を調べる時に常用される一般的な免疫手法が用いられる。免疫に用いる抗原には、その免疫能を高めるためにアジュバント、例えば、水酸化アルミニウムゲル、リン酸アルミニウムゲル、CpGオリゴヌクレオチド、MDP、QS21、MPL+TDMエマルジョン等、ヒトに対して使用できるものであればいずれのアジュバントを添加しても良い。更に抗原の安定性や形状維持のために医薬品の用途として許容で

きる種々の添加剤を加えることもある。このような添加剤として、安定化剤（アルギニン、ポリソルベート80、マクロゴール4000など）、賦型剤（マンニトール、ソルビトール、ショ糖、及び乳糖）、緩衝剤（リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化ナトリウムなど）、等張化剤（塩化ナトリウムなど）、保存剤（チメロサル、フェノキシエタノールなど）、不活化剤（ホルマリン、 β -プロピオラクトンなど）等が挙げられる。

[0044] こうして得られる本発明のキメラタンパク質は、HPV感染及びB型肝炎の増殖阻止に有効な抗体産生能を有するものであり、HPV感染及びB型肝炎の予防薬の材料として、あるいはHPV及びB型肝炎ウイルスの検出系（例えば、ELISA法、ウェスタンブロット法、及びドットブロット法等の抗体測定法による検出系）を構築するための材料として使用することができる。

[0045] また、キメラタンパク質をコードするDNA断片が、生体内に投与されたときに該キメラタンパク質を発現できる発現ベクターを用いてDNAワクチンとすることもできる。このような発現ベクターとして大腸菌由来のプラスミドが挙げられる。該プラスミドには哺乳類の細胞内で遺伝子を発現させるため、その上流に真核生物における強力なプロモーター、例えば、サイトメガロウイルスのIE(immediate-early)プロモーター、 β -actinプロモーター、CAGプロモーター等が配される。また、該DNA断片をウイルスや細菌などに導入すれば、生ワクチンとすることもできる。このような発現ベクターとして、ウイルス（ワクシニアウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクター、麻疹ウイルスベクター等）、細菌（サルモネラベクター等）、原虫（マラリア原虫ベクター等）等が挙げられる。例えば、本発明のキメラタンパク質をコードするDNA断片が組み込まれたワクシニアウイルスベクター（LC16m8株）を用いた場合、弱毒生ワクチンとしての機能だけでなく、痘瘡ワクチンとしての効果が期待できる。弱毒生ワクチンは、ワクチン材料の精製工程が簡略化でき、製造コストの低減に繋がる。HBsタンパク質が組み込まれた組換えワクシニアウイルスは、HBsタンパク質のみで構成された粒子を発現する（Vaccine 1987 Mar;5(1):65-70）

。したがって、本願発明のキメラタンパク質DNA断片が組み込まれた組換えワクシニアウイルス（LC16m8株）は、同様に粒子を形成することが予測され、HPV-L2ペプチドの強い免疫原性が保持された弱毒生ワクチンとなることが期待される。

[0046] また、本願発明のキメラタンパク質を有効成分とするワクチンは、単独でHPV感染及びB型肝炎を予防するための二価ワクチンとして使用してもよく、他のウイルス（例えば、インフルエンザウイルス、A型肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス等）、細菌（例えば、ヘモフィルスインフルエンザ菌、破傷風菌、ジフテリア菌等）及び原虫（例えば、マラリア等）感染症に対するワクチンよりなる群から選択される少なくとも1種類のワクチンと組み合わせることにより多価混合ワクチンとして使用することもできる。

以下、実施例に従い、本願発明を更に詳細に説明するが、下記の実施例に何ら限定されるものではない。

[0047] （調製例）

《HPV L2 56/75-HBsキメラ遺伝子の構築～バキュロウイルス発現プラスミド構築》

HPV16型のカプシドL2のアミノ酸番号56から75の20アミノ酸をHBsのN末、アミノ酸番号127と128の間、C末に導入する3種のキメラタンパク質をコードする遺伝子及び対照のHBs遺伝子を構築し、バキュロウイルス発現プラスミドに導入した。

[0048] （1）N末導入キメラ遺伝子の構築とバキュロウイルス発現プラスミドpFB1-HBsS56/75-Nの構築

HBs酵母発現プラスミドpYG100L（T. Imamura, et al., J. Virol., 61, 3543-3549p, 1987）をテンプレートに以下のPrimer NF、Primer Rを用いてPCRにより増幅した。

Primer NF ; 5'-gtcgacATGGGTGGGTTAGGAATTGGAACAGGGTCGGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCCATTGGAGAACACAACATCAGGATT（配列番号18）

Primer R ; 5'-ctgcagTTAAATGTATACCCAAAGAC（配列番号19）

[0049] アガロースゲル電気泳動で目的サイズの約750bpのバンドを確認した。このバンドを制限酵素Sal I-Pst Iで消化し、バキュロウイルス発現プラスミドpFastBac1 (Invitrogen)の制限酵素Sal I-Pst I消化断片に導入し、HBsタンパク質のN末端にHPV-L2ペプチド（配列番号1の56～75番目の20アミノ酸）が付加されたキメラタンパク質（以下、「56/75-N末導入キメラ」と称することもある）をコードするDNA断片を有する発現プラスミドpFB1-HBsS56/75-Nを構築した。

[0050] (2) HBs アミノ酸127-128位導入キメラ遺伝子の構築とバキュロウイルス発現プラスミドpFB1-HBsS56/75-127の構築

先述のpYG100Lをテンプレートに、以下に記したPrimer F及びPrimer 127RでPCR増幅した断片、及びPrimer 127Fと先述のPrimer RでPCR増幅した断片を得た。Primer F、Primer 127R、Primer 127Fの配列を以下に示した。

Primer F ;

5' -gtcgcacATGGAGAACACAACATCAGG (配列番号20)

Primer 127R ;

5' -TCCGCCTGTACCCGACCCTGTTCCAATTCCTAACCCACCAGGAATCGTGCAGGTCTTGCA (配列番号21)

Primer 127F ;

5' -CAGGGTCGGGTACAGGCGGACGCACTGGGTATATTCCATTGGCTCAAGGAACCTCTATGT (配列番号22)

[0051] それぞれ増幅した断片を等量混合し、プライマーFとプライマーRで再度PCR増幅することでそれぞれの断片を接続した約750 bpの遺伝子断片を得た。この遺伝子を制限酵素Sal I-Pst Iで消化し、バキュロウイルス発現プラスミドpFastBac1の制限酵素Sal I-Pst I消化断片に導入し、HBsタンパク質の内部（配列番号2の127-128位の間）にHPV-L2ペプチド（配列番号1の56～75番目の20アミノ酸）が挿入されたキメラタンパク質（以下、「56/75-127位導入キメラ」と称することもある）をコードするDNA断片を有するpFB1-HBsS56/75-127を構築した。

[0052] (3) C末導入キメラ遺伝子の構築とバキュロウイルス発現プラスミドpFB1-HBsS56/75-Nの構築

先述のpYG100Lをテンプレートに、先述のPrimer Fと以下に示したPrimer C Rを用いてPCR増幅した。

Primer CR ;

5'-ctgcagTTACAATGGAATATACCCAGTGCCTCCGCTGTACCCGACCCTGTTCCAATTCCTAACCCACCAATGTATACCCAAAGACAAA (配列番号23)

[0053] アガロースゲル電気泳動で目的サイズの約750 bpのバンドを確認した。このバンドを制限酵素Sal I-Pst Iで消化し、バキュロウイルス発現プラスミドpFastBac1の制限酵素Sal I-Pst I消化断片に導入し、HBsタンパク質のC末端にHPV-L2ペプチド (配列番号1の56~75番目の20アミノ酸) が付加されたキメラタンパク質 (以下、「56/75-C末導入キメラ」と称することもある) をコードするDNA断片を有する発現プラスミドpFB1-HBsS56/75-Nを構築した。

[0054] (4) HBs遺伝子の構築とバキュロウイルス発現プラスミドpFB1-HBsSの構築
対照のHBs遺伝子に関しても遺伝子両端に制限酵素認識部位を導入する目的で、先述のpYG100Lをテンプレートに、Primer FとPrimer Rを用いてPCR増幅した。アガロースゲル電気泳動で目的サイズの約690 bpのバンドを確認した。このバンドを制限酵素Sal I-Pst Iで消化し、バキュロウイルス発現プラスミドpFastBac1の制限酵素Sal I-Pst I消化断片に導入し、HBsタンパク質をコードするDNA断片を有する、HBs発現プラスミドpFB1-HBsSを構築した。

実施例 1

[0055] 《動物細胞発現プラスミドの構築》

調製例に記載の(1)~(4)の発現プラスミドを制限酵素Sal I、Xho Iで消化し、HPV-L2ペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質をコードするDNA断片及びHBsタンパク質をコードするDNA断片をアガロース電気泳動にて抽出した。(1)~(4)から得られたDNA断片をそれぞれ56/75-N末導入キメラDNA断片、56/75-127位導入キメラDNA断片、56/75-C末導入キメラDNA断片、及びHBsDNA断片と称する。

[0056] 次いで、上記の各DNA断片と、予め制限酵素 Sal Iで消化し、仔牛小腸由来アルカリホスファターゼ処理により末端脱リン酸化した動物細胞用発現プラスミドpCAGG-S1(Sal).dhfr.neo (W02003/004641) をLigation High (東洋紡) で連結環状化し、56/75-N末導入キメラ動物細胞発現プラスミド (pCAGG.HBs56/75-N.dhfr.neo)、56/75-127位導入キメラ動物細胞発現プラスミド (pCAGG.HBs56/75-127.dhfr.neo)、56/75-C末導入キメラ動物細胞発現プラスミド (pCAGG.HBs56/75-C.dhfr.neo) 及びHBs動物細胞発現プラスミド (pCAGG.HBs56/75-N.dhfr. neo) を構築した。

実施例 2

[0057] 《チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いたキメラ遺伝子の発現》

実施例 1 で得た4種の動物細胞発現プラスミドをそれぞれ制限酵素Pvu Iで消化し線状化した。この線状化したプラスミドを用いて、CHO K1 (FT Kao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275-1281p, 1968) をリン酸カルシウム法変法 (C. Chen et al. , Mol. Cell. Biol. , 7, 2745- 2752p, 1987) で形質転換処理した。形質転換処理後、100、200、500 nmol/Lメトトレキサート (MTX) と500 μ g/mLのジェネティシンを含む透析ウシ胎児血清、及びカルシウム、マグネシウム添加したYMM-01C培地 (核酸不含MEMアルファ培地にアミノ酸、ビタミンを強化し、カルシウム、マグネシウムを含まない自家調製培地; 以下、「選択培地」と称する) で形質転換体を選択した。

得られた形質転換体を、0.25%トリプシンを用いて細胞剥離し、先述の選択培地を用いて細胞の拡張を行った。拡張後、PBS(-)で洗浄し、無血清培地 (T7m:Ex-cell SP2/0;YMM-01B 3種混合培地 (SAFC社製特注培地)) に培地交換した。37°Cで11日間培養後、培養上清中の発現タンパク質の濃度を抗HBsモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAで定量した。その結果、56/75-C末導入キメラの発現量が最も多く、次いで56/75-127位導入キメラ、56/75-N末導入キメラの順であった。56/75-C末導入キメラの発現量は、対照とした未導入HBsタンパク質の2倍以上であった (図1)。

実施例 3

[0058] 《細胞培養上清からキメラタンパク質の精製》

実施例2により得られた3種のキメラタンパク質及びHBsタンパク質を発現するCHO K1細胞を選択培地を用いて拡張した。拡張後、PBS(-)で洗浄後、無血清培地 (T7m ; Ex-cell SP2/0 ; YMM-01B 3種混合培地) に培地交換し、37℃、10日間以上培養した。培養液を遠心分離で清澄化した後、ベンゾナーゼ (Merck社製) 共存下、排除限界1,000 kDaのカートリッジ式UF (ビバセル100 ; ザルトリウス製) で培養上清を濃縮した。濃縮後、PBS(-)にバッファ置換を実施し、塩化セシウムを1.2 g/Lの密度となるように添加した後、4℃、23,000×gで超遠心分離を行った。キメラタンパク質又はHBsタンパク質を含むバンドを抽出し、排除限界300 kDaのUFカートリッジ (ビバスピン ; ザルトリウス社製) による脱塩、PBS(-)へのバッファ置換後、60%、50%、40%、20%ショ糖を含むPBS(-)を重層した遠心管にキメラタンパク質又はHBsタンパク質を含むPBS(-)を加えた不連続密度勾配ショ糖の超遠心分離を行った。4℃、120,000×gの遠心条件で分離を行った後、キメラタンパク質又はHBsタンパク質を含むバンドを抽出し、排除限界300 kDaのUFカートリッジで脱糖、PBS(-)へのバッファ交換を行った。得られたキメラタンパク質及びHBsタンパク質は、いずれもウイルス様粒子(VPL)を形成していた。

実施例 4

[0059] 《キメラタンパク質のマウスへの免疫》

実施例3で得られたキメラタンパク質及びHBsタンパク質にアルミニウムアジュバントを加えて50 μ g/mlの各免疫原を調製し、各0.1 mlをメスBalb/cマウスの大腿部に筋注した (各群10匹ずつ)。接種後、4週目で採血して得た抗血清 (1次免疫血清) 及び初回接種から4週目に同免疫原を上記と同様に接種後、8週目で採血して得た抗血清 (2次免疫血清) を得た。対照として、非投与群、及びHPV-L2由来配列 (配列番号4) のN末端にCysを付加させた合成ペプチドとKLHとのコンジュゲートにアルミニウムアジュバントを添加した免疫原を投与した群を用いた。

実施例 5

[0060] 《同遺伝子型由来HPV-L2ペプチドと抗血清の反応性》

実施例4で得られた個体別の1次免疫血清又はこれらのプール抗血清（個体別の抗血清を等量ずつ混合）を用いて、ELISAにより、同遺伝子型由来のHPV-L2ペプチドに対する抗体産生能を評価した。より具体的には、96 well ELISAプレートの各wellに、PBSで希釈したHPVの16型のL2タンパク質（配列番号1）の56～75番目の20アミノ配列からなる合成ペプチド（配列番号4）（1.0 μ g/well）を加え、4°Cで一晩静置した。ブロッキング溶液（1% BSA、0.05% Tween20を含むPBS）で室温、2時間ブロッキングし、抗原固相化プレートとした。ブロッキング溶液で1:100に希釈した各血清を、固相化したペプチドと室温で2時間反応させた。PBST（0.05% Tween20を含むPBS）で洗浄後、ブロッキング溶液で1:2000に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識抗マウスIgG抗体（Santa Cruz: sc-2031）を加え、室温で1時間反応させた。PBSTで洗浄後、基質溶液（TMB+（DAKO社製））を加え、室温で10分反応させた後、450nmの吸光度を測定した。その結果、56/75-C末導入キメラ免疫群では早期に抗体が誘導され、このプール血清は、KLHコンジュゲート免疫群より5倍程度高い抗体価を示した（図2）。また、個体別の抗血清で得られた抗体価の平均値を用いてt検定による検証を行った結果、両者間に有意差が認められた（ $p < 0.05$ ）（図3）。また、56/75-127位導入キメラ免疫群及び56/75-N末導入キメラ免疫群の抗血清中にも該合成ペプチドと結合する抗体が確認された。

実施例 6

[0061] 《異なる遺伝子型由来のHPV-L2ペプチドと抗血清の反応性》

実施例4で得られた個体別の1次免疫血清又はこれらのプール抗血清（個体別の抗血清を等量ずつ混合）を用いて、実施例5と同様の方法により、異なる遺伝子型由来の共通領域のHPV-L2ペプチドに対する結合能を評価した（HPV18型、HPV59型及びHPV68型は、HPVの16型と同じ配列を有する）。以下のアミノ酸配列で示される合成ペプチドを使用した。なお、以下のアミノ酸配列において、*印はHPV16型と同じアミノ酸であることを示す。

[0062] 高リスク型

- HPV16-L2-56/75 56-GGLGIGTGSGTGGRGYIPL (配列
番号4)
- HPV31-L2-56/75 56-*****S*****V** (2アミノ酸置換) (配列番号
5)
- HPV33-L2-55/74 55-*****S*****V*I (3アミノ酸置換) (配列番号
6)
- HPV35-L2-56/75 56-*****S*****S**V** (3アミノ酸置換) (配列番号
7)
- HPV39-L2-55/74 55-*****T***** (1アミノ酸置換) (配列番号
8)
- HPV45-L2-55/74 55-*****S*****V** (2アミノ酸置換) (配列番号
9)
- HPV51-L2-55/74 55-*****S***** (1アミノ酸置換) (配列番号
10)
- HPV52-L2-55/74 55-*****A*S***A**V** (4アミノ酸置換) (配列番号
11)
- HPV56-L2-55/74 55-*****T*S***A**V** (4アミノ酸置換) (配列番号
12)
- HPV58-L2-55/74 55-*****V** (1アミノ酸置換) (配列番号
13)
- HPV66-L2-55/74 55-*****S***A**V** (3アミノ酸置換) (配列番号
14)
- HPV73-L2-57/76 57-*****S***S*****V** (3アミノ酸置換) (配列番号
15)
- 計12種

[0063] 低リスク型

- HPV6-L2-55/74 55-*****V** (1アミノ酸置換) (配列番号

16)

HPV11-L2-54/73 54-*****A*S***A***** (3アミノ酸置換) (配列番号

17)

計2種

[0064] キメラタンパク質免疫群の抗血清は、いずれも上記の全ての合成ペプチドと反応することが確認された。特に56/75-C末導入キメラ免疫群では、他の群と比べ高い抗体価を示した(図4)。

実施例 7

[0065] 《抗血清中のHBs抗体価の測定》

実施例4で得られた個体別の1次免疫血清を等量ずつ混合したプール抗血清について、HBsタンパク質に対する抗体価を測定した。該プール抗血清をPBS(-)で10倍段階希釈して(10、100、1,000倍)、B型肝炎ウイルス表面抗体キットEテスト「TOSOH」II(HBsAb;東ソー株式会社)を用いて、全自動エンザイム免疫アッセイ装置AIA-360にて抗体価を測定した。

[0066] いずれのキメラタンパク質免疫群においても、HBsタンパク質に反応する抗体が検出された。56/75-N末導入キメラ免疫群及び56/75-C末導入キメラ免疫群は、HBsタンパク質単独免疫群と同様の高い抗体価が得られたが、56/75-127位導入キメラ免疫群では抗体価上昇が約1/10に抑えられていた(図5)。

実施例 8

[0067] 《抗血清のエピトープ解析》

実施例4で得られた個体別の2次免疫血清を等量ずつ混合したプール抗血清について、以下のアミノ酸配列で示される合成ペプチドを用いたELISAにより、HPV-L2ペプチドに対する結合能を評価した。具体的には、HPV16 L2のアミノ酸53から75の配列に、欠失、あるいはアラニン置換をもつ変異ペプチドを、N末端に付加したシステインを介してBSAに結合させたものを抗原として用いた。96 well ELISAプレートの各wellに、PBSで希釈したBSA結合ペプチド(500 ng/well)を加え、4°Cで一晩静置した。ブロッキング溶液(5% スキムミルク、0.1% Tween20を含むPBS)で室温、2時間ブロッキングし、抗原固相化

プレートとした。ブロッキング溶液で1:100から1:2500まで段階希釈した各血清を、固相化したペプチドと室温で2時間反応させた。PBST (0.1% Tween20を含むPBS) で洗浄後、ブロッキング溶液で1:2000に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗マウスIgG抗体 (Santa Cruz: sc-2031) を加え、室温で1時間反応させた。PBSTで洗浄後、基質溶液 (2mg/mlのo-フェニレンジアミン、及び、0.0065%の過酸化水素水を含む0.1Mクエン酸3ナトリウム、pH4.8) を加え、室温で10分反応させた後、450nmの吸光度を測定した。

- [0068] HPV16-L2-14/27 14-SATQLYKTCKQAGT (配列番号24)
- HPV16-L2-53/73 53-VFFGGLGIGTGSGTGGRTGYI (配列番号25)
- HPV16-L2-53/70 53-VFFGGLGIGTGSGTGGRTAAA (配列番号26)
- HPV16-L2-53/67 53-VFFGGLGIGTGSGTGAAAAAA (配列番号27)
- HPV16-L2-53/64 53-VFFGGLGIGTGSAAAAAAAAA (配列番号28)
- HPV16-L2-55/75 55-FGGLGIGTGSGTGGRTGYIPL (配列番号29)
- HPV16-L2-58/75 58-AAALGIGTGSGTGGRTGYIPL (配列番号30)
- HPV16-L2-60/75 60-AAAAAAGTGSGTGGRTGYIPL (配列番号31)
- HPV16-L2-64/75 64-AAAAAAAAASGTGGRTGYIPL (配列番号32)

- [0069] その結果、いずれの免疫群も高い抗体価を有し、56/75-127位導入キメラ免疫群では、コア配列領域 (20アミノ酸) のN末側及びC末側の2箇所のアミノ酸配列 (N末側及びC末側エピトープ) を認識する抗体が誘導され、56/75-N末導入キメラ免疫群及び56/75-C末導入キメラ免疫群では、C末側のアミノ酸配列 (C末側エピトープ) を認識する抗体が誘導されることが示された (図6)。

実施例 9

- [0070] 《異なる遺伝子型由来のHPV-ウイルス様粒子 (VLP) と抗血清の反応性》

実施例4で得られた個体別の2次免疫血清 (56/75-127位導入キメラ免疫群) を等量ずつ混合したプール抗血清について、以下の方法により、HPV-VLPに対する結合能を評価した。

- [0071] (1) VLPの作製

HPV16、18、31、33、35、51、52、または58のL1、及び、L2発現プラスミドを293FT細胞 (Invitrogen) にトランスフェクションした。2日後、細胞をLysis Buffer (0.35% Brij58、0.9mM CaCl₂、10mM MgCl₂、1 μl Benzonaseを含むPBS) に溶解し、37°Cで一晩インキュベートした。終濃度0.8Mになるように5M NaClを加え氷中に10分間静置した後、10,000g、4°C、10分間遠心し、上清を回収した。上清を、27%、33%、39%のiodixanol (0.8M NaCl in PBSで調整)の上に乗せ、50,000rpm、16°C、3.5時間超遠心した。超遠心後、VLPを含むフラクションを回収した。

[0072] (2) ELISA

96 well ELISAプレートの各wellに、PBSで希釈したVLP(100 ng/well)を加え、4°Cで一晩静置した。ブロッキング溶液 (5% スキムミルク、0.1% Tween20を含むPBS) で室温、2時間ブロッキングし、抗原固相化プレートとした。ブロッキング溶液で1:20から1:20000まで段階希釈した各血清を、固相化したVLPと室温で2時間反応させた。その後、ペプチドを抗原とするELISAと同様の方法で、VLPに結合した抗体を検出した。その結果、全てのHPV-VLPと結合し、HPVに対して広いスペクトルを有することが示された (図7)。

実施例 10

[0073] 《異なる遺伝子型由来のHPV-偽ウイルス (PsV) と抗血清の反応性》

実施例4で得られた個体別の2次免疫血清 (56/75-127位導入キメラ免疫群) を等量ずつ混合したプール抗血清について、以下の方法により、HPV-PsVに対する中和能を評価した。

[0074] (1) PsVの作製

HPV16、18、または35のL1、及び、L2発現プラスミドと分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)発現プラスミドを混合し、293FT細胞にトランスフェクションした。2日後に、VLPと同様の方法でPsVを精製した。

[0075] (2) 中和試験

細胞培養用培地(10%FBSを含むフェノールレッド不含DMEM)で希釈したPsVと、1:12.5から1:400まで同培地で段階希釈した各血清を等量ずつ混和し、4°C

で1時間反応させた。その後、予め96ウェルプレートに準備した293FT細胞（ 1×10^4 個/well）に感染させた。3日後に、培養上清中のSEAP活性を、Great EscAPE SEAP Assay Kit (Clontech)とプレートリーダー（ARVO MX, PerkinElmer）を用いて測定した。その結果、いずれの偽ウイルスに対しても明確な中和活性が認められた（図8-1～図8-3）。

産業上の利用可能性

[0076] 本願発明のキメラタンパク質は、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染症及びB型肝炎に対する予防薬の材料に利用され得る。

請求の範囲

- [請求項1] ヒトパピローマウイルス (HPV) L2タンパク質由来のペプチド (HPV-L2ペプチド) とB型肝炎ウイルス表面タンパク質 (HBsタンパク質) とのキメラタンパク質であって、HPV-L2ペプチドが、(1) 20アミノ酸のコア配列領域からなるペプチド、
- (2) Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Glyなる6アミノ酸を有するコア配列領域内のペプチド、または(3) コア配列領域のN末側及び/又はC末側に HPV L2タンパク質由来のアミノ酸が付加された70個以下のアミノ酸からなるペプチドである、前記キメラタンパク質。
- [請求項2] HPV-L2ペプチドが、コア配列領域からなる、請求項1に記載のキメラタンパク質。
- [請求項3] 前記コア配列領域が、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-X1aa-Gly-X2aa-Gly-X3aa-Gly-Gly-Arg-X4aa-Gly-Tyr-X5aa-Pro-X6aa (X1aa、X2aa、X3aa、X4aa、X5aa及びX6aaは任意のアミノ酸とする) (配列番号3) で示される配列である、請求項1又は2に記載のキメラタンパク質。
- [請求項4] 前記コア配列領域が、下記(1)～(6)から選択されるアミノ酸を有する配列である、請求項3に記載のキメラタンパク質。
- (1) X1aaが、Thr又はSerである、
- (2) X2aaが、Ser、Thr又はAlaである、
- (3) X3aaが、Thr又はSerである、
- (4) X4aaが、Ser、Thr又はAlaである
- (5) X5aaが、Ile又はValである、及び
- (6) X6aaが、Leu又はIleである
- [請求項5] 前記コア配列領域が、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-Leu (配列番号4) からなるアミノ酸配列である、請求項1又は2に記載のキメラタンパク質。
- [請求項6] 前記キメラタンパク質が、1～11個のHPV-L2ペプチドを含む、請求項1ないし5のいずれかに記載のキメラタンパク質。

- [請求項7] 前記ペプチドが、HBsタンパク質のN末端アミノ酸、配列番号2の127-128位、又はC末端アミノ酸の少なくとも一箇所に付加又は挿入された、請求項1ないし6のいずれかに記載のキメラタンパク質。
- [請求項8] 前記ペプチドが、HBsタンパク質の配列番号2の127-128位に挿入された、請求項7に記載のキメラタンパク質。
- [請求項9] 前記ペプチドが、HBsタンパク質のC末端アミノ酸に付加された、請求項7に記載のキメラタンパク質。
- [請求項10] 前記ペプチドが、HBsタンパク質の配列番号2の127-128位に挿入及びC末端アミノ酸に付加された、請求項7に記載のキメラタンパク質。
- [請求項11] ヒトパピローマウイルス（HPV）L2タンパク質由来のペプチド（HPV-L2ペプチド）とB型肝炎ウイルス表面タンパク質（HBsタンパク質）とのキメラタンパク質であって、HPV-L2ペプチドが、20アミノ酸からなり、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Gly-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Gly-Tyr-Ile-Pro-Leu（配列番号4）なるアミノ酸配列に対する相同性が50-100%、70-100%又は80-100%である、前記キメラタンパク質。
- [請求項12] 請求項1ないし11のいずれかに記載のキメラタンパク質をコードするDNA断片。
- [請求項13] 前記DNA断片にコードされるキメラタンパク質を発現することができる発現ベクター。
- [請求項14] 前記発現ベクターで形質転換したキメラタンパク質産生宿主。
- [請求項15] 請求項1ないし11のいずれかに記載のキメラタンパク質を有効成分として含有するHPV感染症及び／又はB型肝炎用ワクチン。
- [請求項16] 請求項8に記載のキメラタンパク質及び請求項9に記載のキメラタンパク質を有効成分として含有する、HPV感染症及び／又はB型肝炎用ワクチン。
- [請求項17] 請求項13に記載の発現ベクターを有効成分として含有する、HPV

感染症及び／又はB型肝炎用DNAワクチン。

[請求項18]

下記（１）ないし（５）の工程を含む、ヒトパピローマウイルス（HPV）L2タンパク質由来のペプチド（HPV-L2ペプチド）とB型肝炎ウイルス表面タンパク質（HBsタンパク質）とのキメラタンパク質を有効成分として含有するHPV感染症及び／又はB型肝炎用ワクチンの製造方法；

（１）20アミノ酸のコア配列領域からなるHPV-L2ペプチド、Gly-Gly-Leu-Gly-Ile-Glyなる6アミノ酸を有するコア配列領域内のHPV-L2ペプチド、または、コア配列領域のN末側及び／又はC末側にHPV L2タンパク質由来のアミノ酸が付加された70個以下のアミノ酸からなるHPV-L2ペプチドとHBsタンパク質とのキメラタンパク質をコードするDNA断片を調製する工程、

（２）前記（１）のDNA断片を有する発現ベクターを調製し、該発現ベクターで宿主を形質転換する工程、

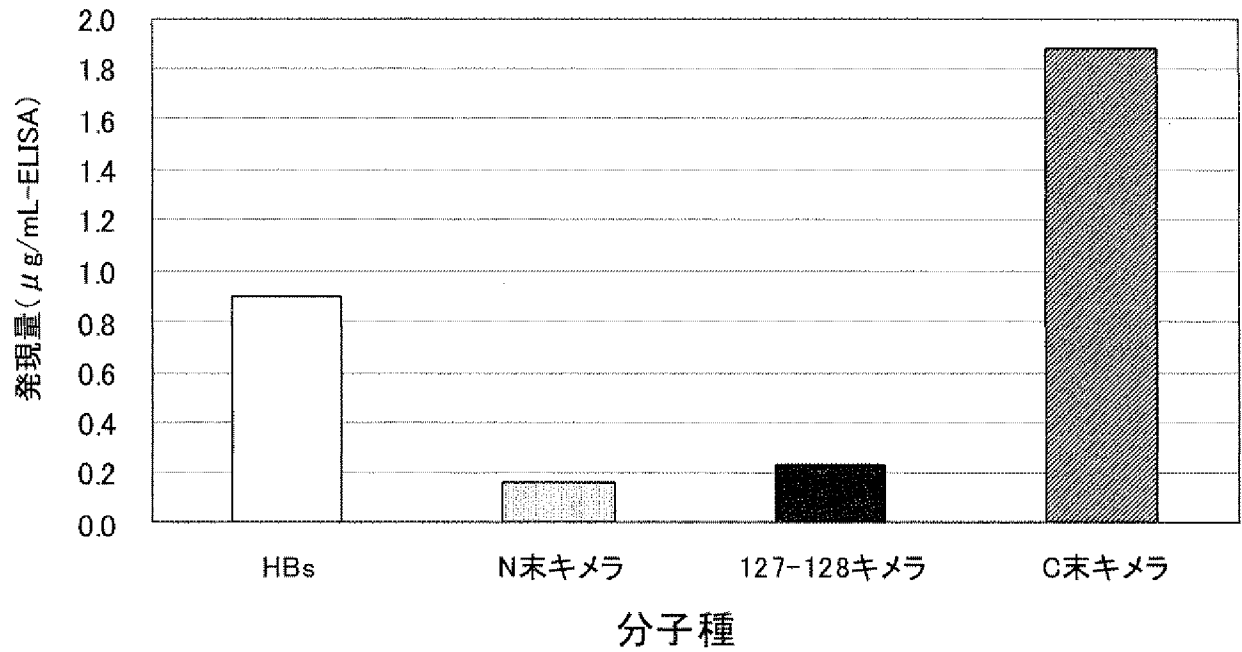
（３）前記（２）により得られる形質転換宿主をGeneticin及びMTXの存在下で培養し、キメラタンパク質産生形質転換宿主を選択する工程、

（４）前記（３）により得られるキメラタンパク質産生形質転換宿主を拡張培養し、培養物から前記キメラタンパク質を精製する工程、及び

（５）前記（４）により得られる精製キメラタンパク質にアジュバント、安定化剤、緩衝剤、等張化剤及び保存剤を添加して、ワクチンとする工程。

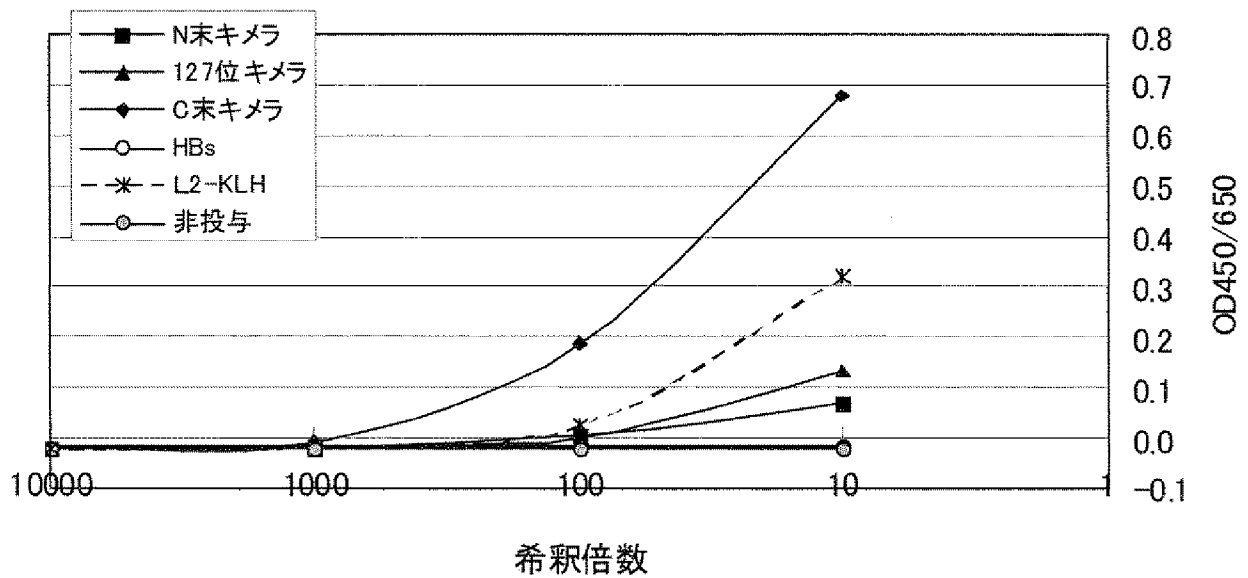
[図1]

発現レベルスクリーニング

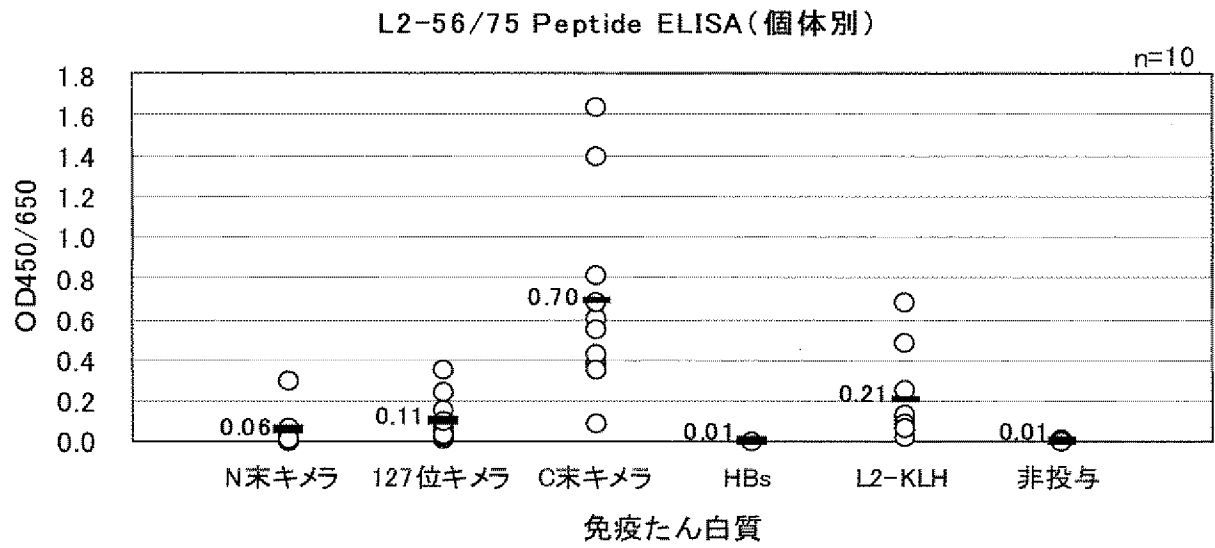


[図2]

L2-56/75 Peptide ELISA(プール血清)

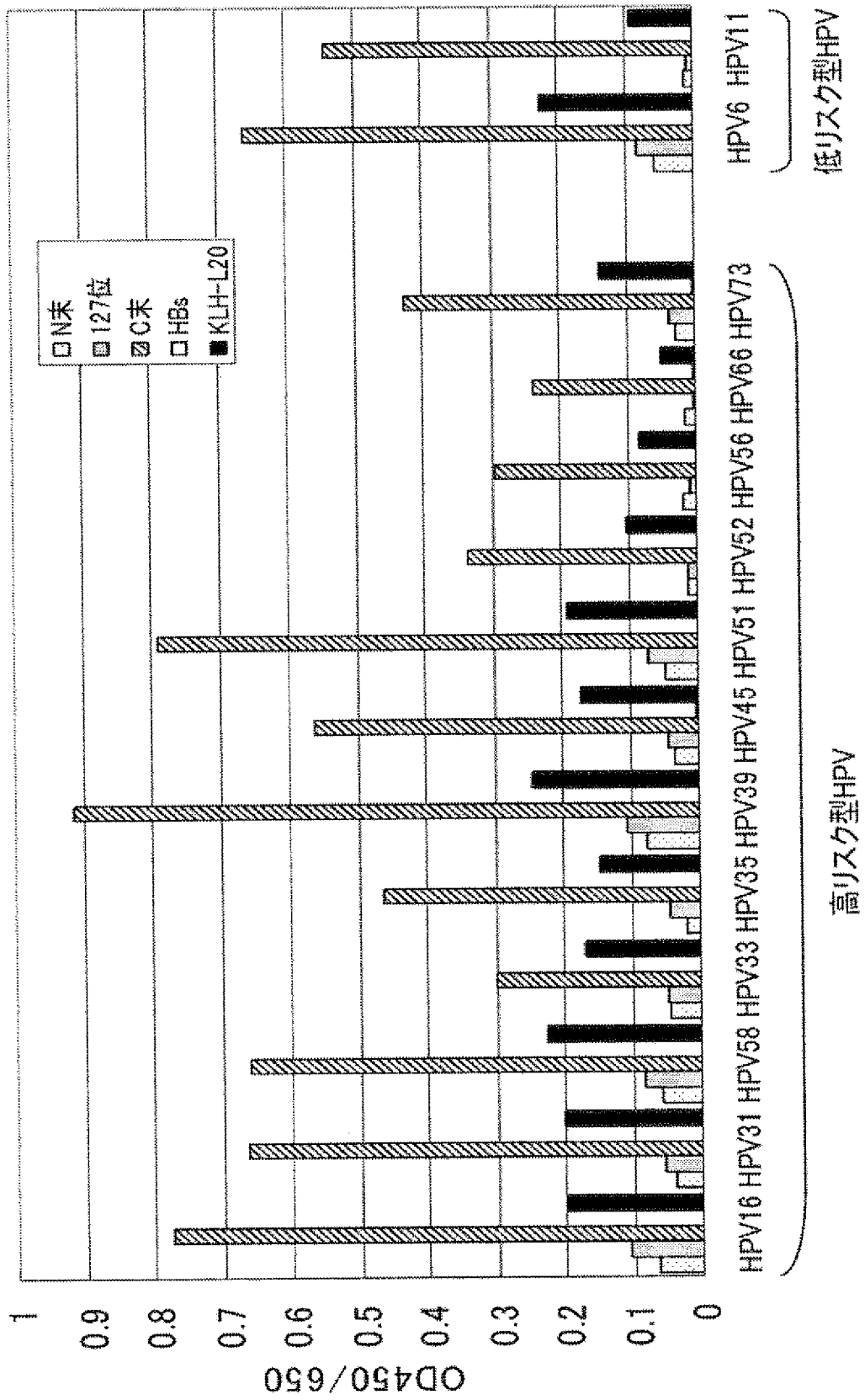


[図3]

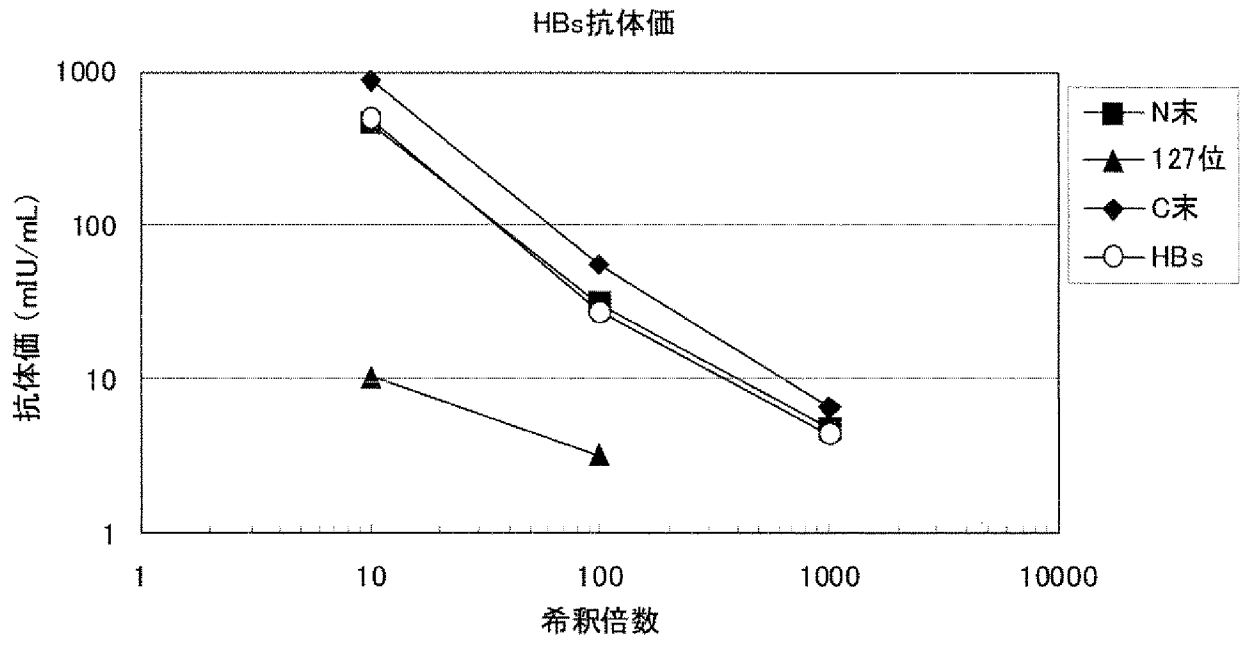


[図4]

HPV L2ペプチドとの反応性

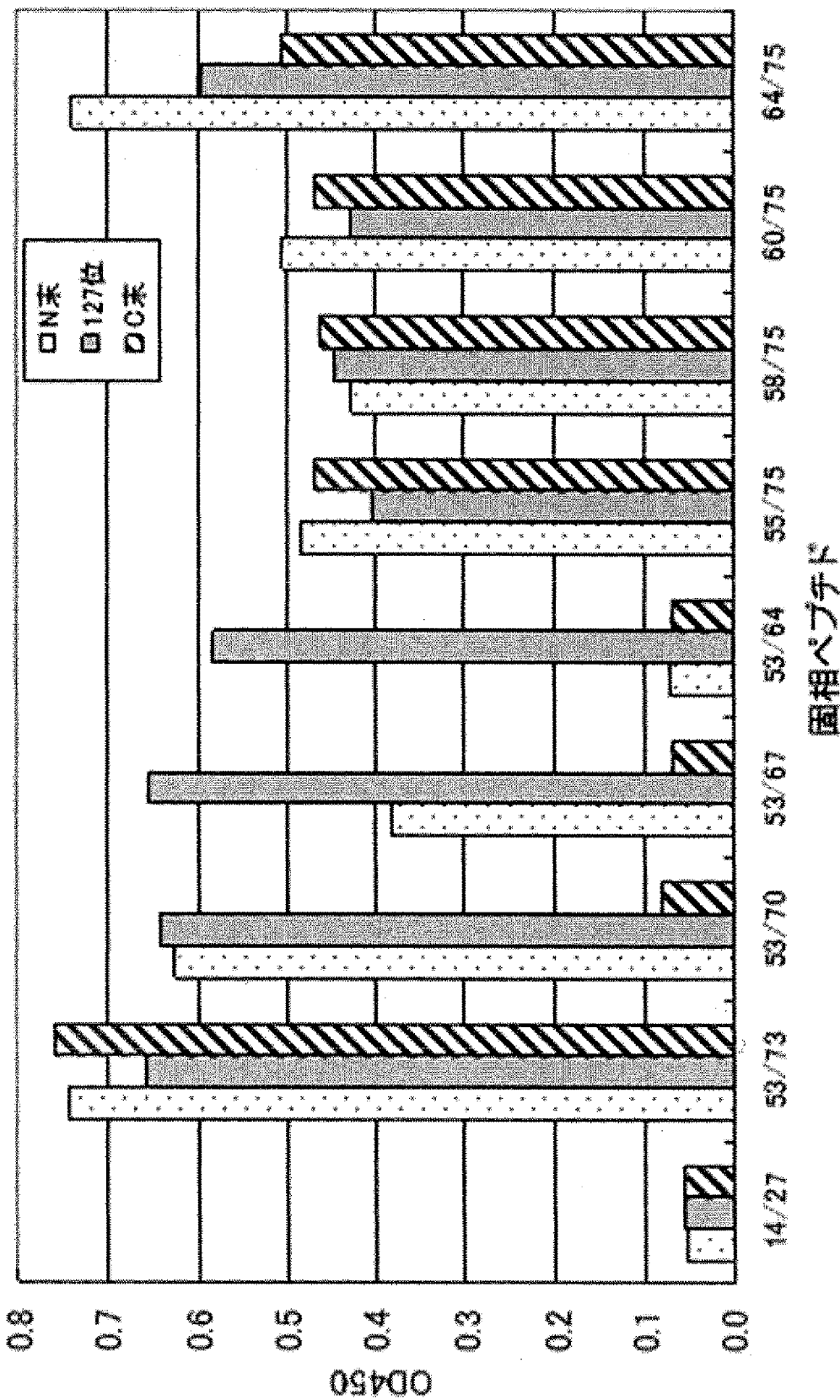


[图5]

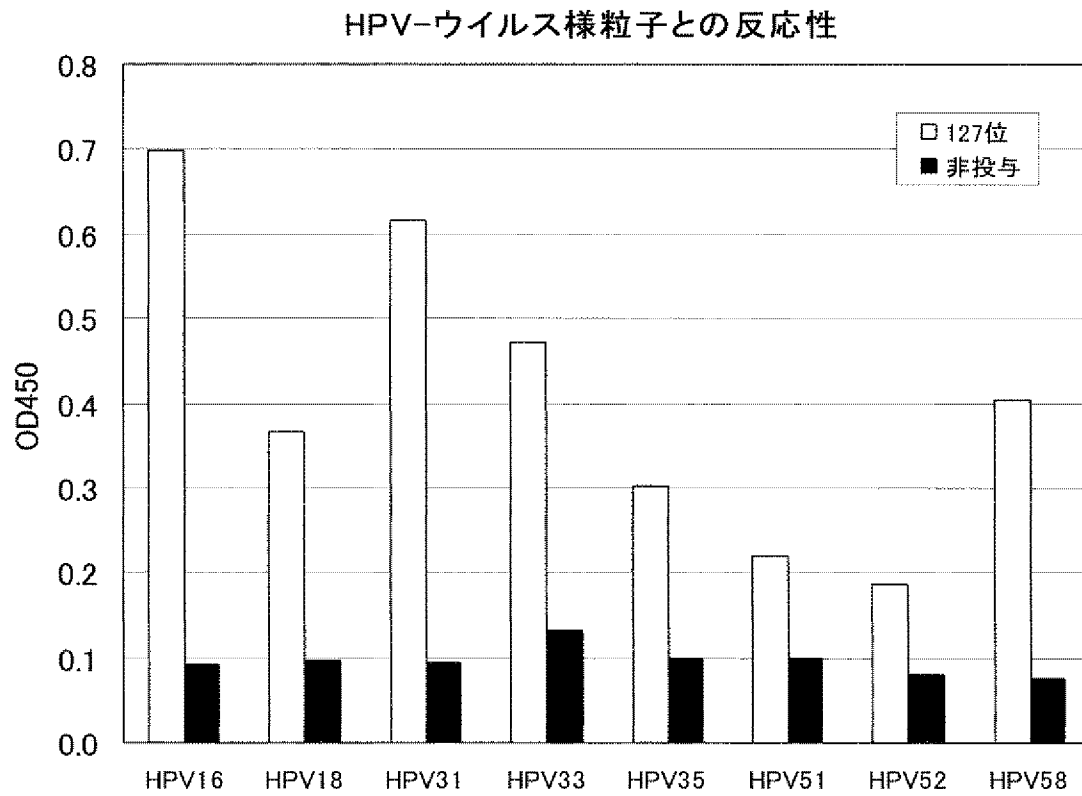


[図6]

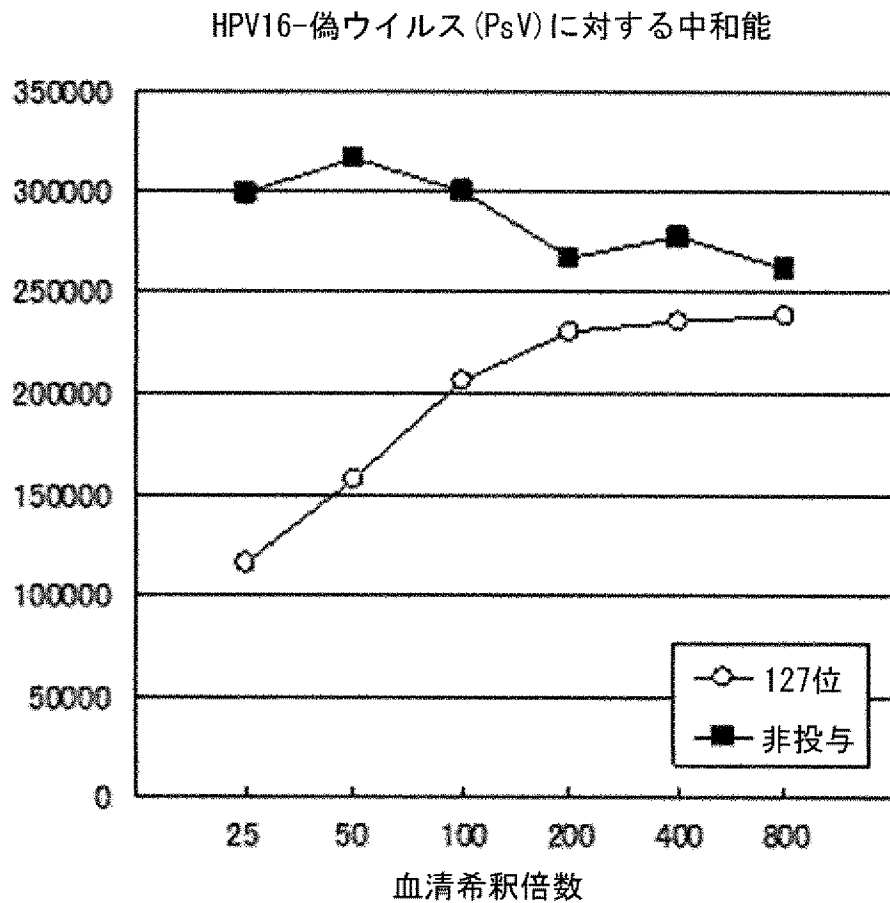
エピトープ解析



[図7]

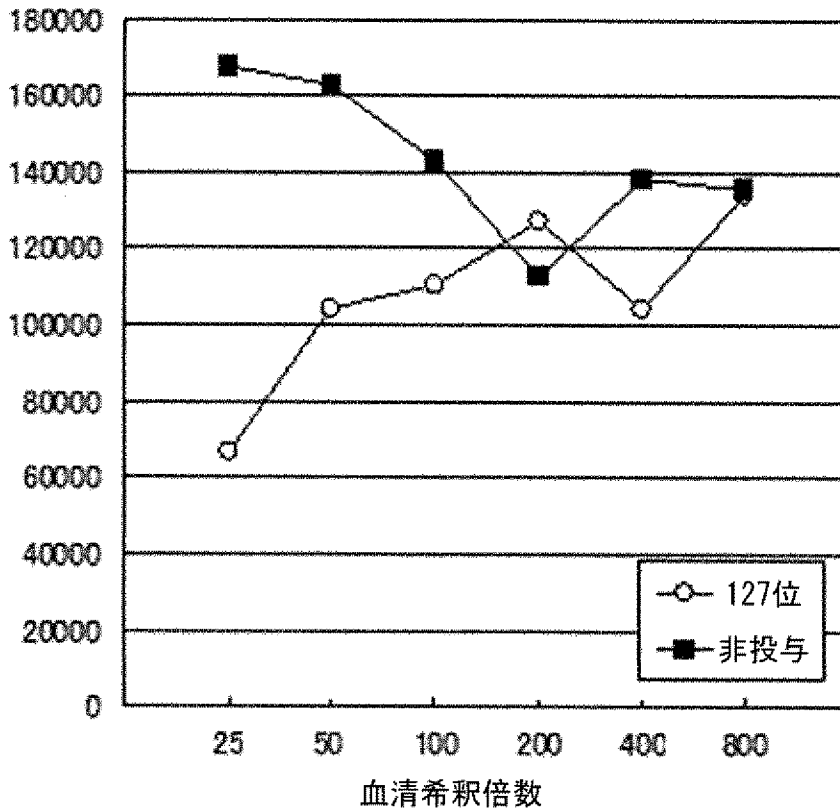


[図8-1]



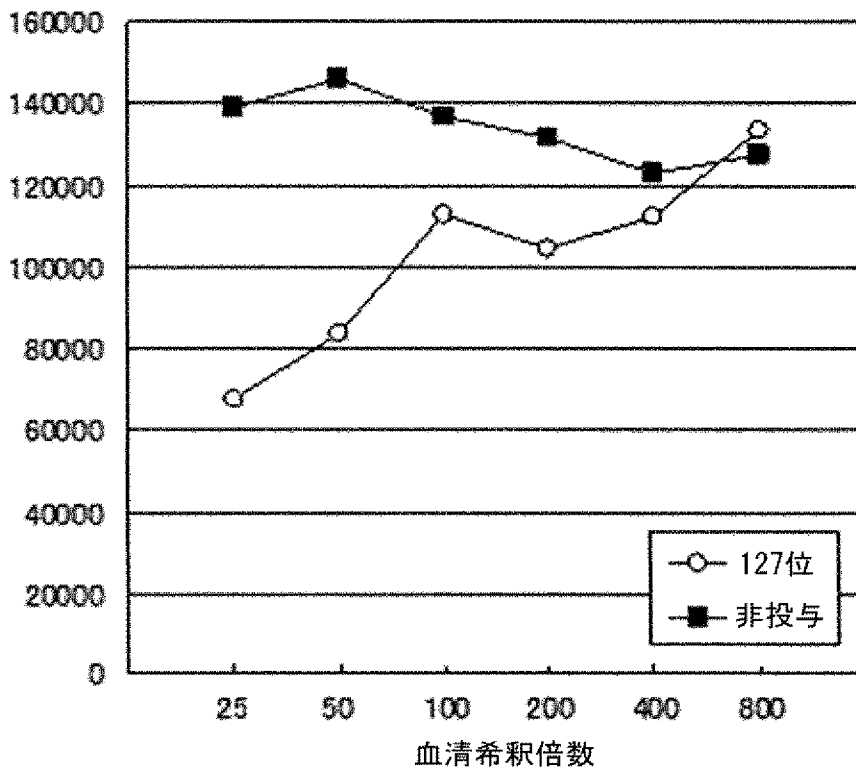
[図8-2]

HPV18-偽ウイルス (PsV) に対する中和能



[図8-3]

HPV35-偽ウイルス (PsV) に対する中和能



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/082094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/00, A61K48/00, A61P31/20, A61P35/00, C07K14/02, C07K14/025, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61K39/12, A61K39/29

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/001409 A2 (BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LTD.), 07 January 2010 (07.01.2010), claims; examples & EP 2288380 A2	1-18
Y	JP 2004-504067 A (The Crown in the Right of the Queensland Department of Health), 12 February 2004 (12.02.2004), claims; examples & US 2003/211996 A1 & EP 1780285 A1	1-18
Y	WO 2009/001867 A1 (Japan Health Sciences Foundation), 31 December 2008 (31.12.2008), claims; paragraph [0034]; examples; fig. 5 & US 2010/183648 A1 & EP 2168977 A1	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 January, 2014 (10.01.14)

Date of mailing of the international search report
21 January, 2014 (21.01.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/082094

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	K. KONDO, et al., Modification of Human Papillomavirus-Like Particle Vaccine by Insertion of the Cross-Reactive L2-Epitopes, Journal of Medical Virology, 2008, vol.80, p. 841-846	1-18
Y	JP 2012-530505 A (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), 06 December 2012 (06.12.2012), claims; examples & US 2012/87937 A1 & EP 2445525 A1	1-18
Y	JP 2000-249704 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 14 September 2000 (14.09.2000), example 7; sequence no.12 (Family: none)	8,10,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/082094

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

*C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i,
A61P31/20(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/02(2006.01)i,
C07K14/025(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i,
C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
A61K39/12(2006.01)n, A61K39/29(2006.01)n*

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

Subject to be covered by this search:

The invention described in claim 13 relates to "an expression vector capable of expressing a chimeric protein encoded by the DNA fragment". In this regard, the DNA fragment is not specified in any way. Therefore, this claim includes a wide variety of expression vectors within its scope. However, only a DNA fragment encoding a chimeric protein recited in any one of claims 1-11 is disclosed in the description as the above-mentioned DNA fragment in the meaning within PCT Article 5. Therefore, this claim is not supported in the meaning within PCT Article 6.

Furthermore, it is unclear as to what substance "the DNA fragment" means. Therefore, claim 13 does not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6, either.

This opinion may be also applied to claim 17 referring to claim 13.

The invention described in claim 14 relates to "a host capable of producing a chimeric protein, which is transformed with the expression vector". In this regard, the expression vector is not specified in any way. Therefore, a wide variety of hosts each capable of producing a chimeric protein are included within the scope of this claim. However, only an expression vector capable of expressing a chimeric protein recited in any one of claims 1-11 is disclosed in the description as the above-mentioned expression vector in the meaning within PCT Article 5. Therefore, this claim is not supported in the meaning within PCT Article 6. Furthermore, it is unclear as to what substance "the expression vector" means. Therefore, this claim does not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6, either.

Such being the case, with respect to claims 13 and 17, the search was carried out on a part in which the DNA fragment is a DNA fragment encoding a chimeric protein recited in any one of claims 1-11. With respect to claim 14, the search was carried out on a part in which the expression vector is an expression vector capable of expressing a chimeric protein recited in any one of claims 1-11.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K39/00, A61K48/00, A61P31/20, A61P35/00, C07K14/02, C07K14/025, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61K39/12, A61K39/29		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2010/001409 A2 (BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED) 2010.01.07, Claims, Examples & EP 2288380 A2	1-18
Y	JP 2004-504067 A (ザ・クラウン・イン・ザ・ライト・オブ・ザ・ クイーンズランド・デパートメント・オブ・ヘルス) 2004.02.12, 特許請求の範囲、実施例 & US 2003/211996 A1 & EP 1780285 A1	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10.01.2014	国際調査報告の発送日 21.01.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 馬場 亮人 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 4043

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2009/001867 A1 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2008. 12. 31, 請求の範囲、[0 0 3 4]、実施例、図 5 & US 2010/183648 A1 & EP 2168977 A1	1-18
Y	K. KONDO, et al., Modification of Human Papillomavirus-Like Particle Vaccine by Insertion of the Cross-Reactive L2-Epitopes, Journal of Medical Virology, 2008, vol. 80, p. 841-846	1-18
Y	JP 2012-530505 A (グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソ シエテ アノニム) 2012. 12. 06, 特許請求の範囲、実施例 & US 2012/87937 A1 & EP 2445525 A1	1-18
Y	JP 2000-249704 A (積水化学工業株式会社) 2000. 09. 14, 実施例 7、配列番号 1 2 (ファミリーなし)	8, 10, 16

発明の属する分野の分類

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/20(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, C07K14/02(2006.01)i, C07K14/025(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i,
A61K39/12(2006.01)n, A61K39/29(2006.01)n

<調査の対象について>

請求項13に係る発明は「前記DNA断片にコードされるキメラタンパク質を発現することができる発現ベクター。」に係るものであり、DNA断片が何ら特定されていないことから、多種多様の発現ベクターを包含するものであるが、該DNA断片として、PCT第5条の意味において明細書に開示されているのは、請求項1～11のいずれかに記載のキメラタンパク質をコードするDNA断片にすぎず、PCT第6条の意味での裏付けを欠いている。

また、「前記DNA断片」が何を意味しているのかが不明であるから、請求項13はPCT第6条における明確性の要件も欠いている。

請求項13を引用する請求項17についても同様である。

さらに、請求項14に係る発明は、「前記発現ベクターで形質転換したキメラタンパク質産生宿主。」に係るものであるが、発現ベクターが何ら特定されていないことから、多種多様のキメラタンパク質産生宿主を包含するものであるが、該発現ベクターとして、PCT第5条の意味において明細書に開示されているのは、請求項1～11のいずれかに記載のキメラタンパク質を発現することができる発現ベクターにすぎず、PCT第6条の意味での裏付けを欠いており、「前記発現ベクター」が何を意味しているのかが不明であるから、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、請求項13、17に関する調査は、上記DNA断片が、請求項1～11のいずれかに記載のキメラタンパク質をコードするDNA断片であるものについて行い、また、請求項14に関する調査は、上記発現ベクターが、請求項1～11のいずれかに記載のキメラタンパク質を発現することができる発現ベクターであるものについて行った。