

(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
2020年10月22日(22.10.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/213568 A1

(51) 国際特許分類:

C12P 21/02 (2006.01) *C07K 2/00* (2006.01)
C07K 1/02 (2006.01) *C12N 15/30* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/016297

(22) 国際出願日: 2020年4月13日(13.04.2020)

(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 2019-079549 2019年4月18日(18.04.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人鹿児島大学(KAGOSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 Kagoshima (JP). 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY COR-

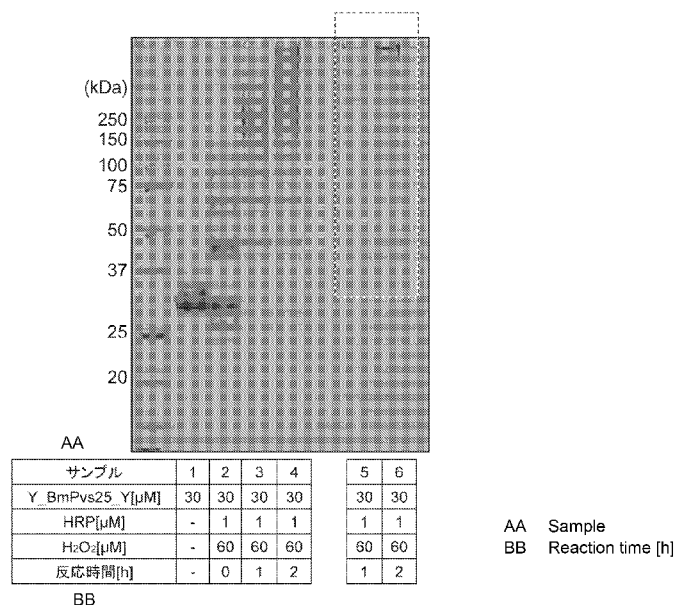
PORATION) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡744 Fukuoka (JP).

(72) 発明者: 宮田 健(MIYATA Takeshi); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 栗原 浩一(KURIHARA Koichi); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 里圭太(SATO Keita); 〒8908580 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内 Kagoshima (JP). 神谷 典穂(KAMIYA Noriho); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 南畑 孝介(MINAMIHATA Kosuke); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 日下部 宜宏(KUSAKABE

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYMERIZED POLYPEPTIDE AGGREGATE AND METHOD FOR INCREASING MOLECULAR WEIGHT OF POLYMERIZED POLYPEPTIDE

(54) 発明の名称: 重合化ポリペプチドの集合体の製造方法及び重合化ポリペプチドを高分子量化させる方法

[図3]



(57) Abstract: Disclosed is a method for producing a polymerized polypeptide aggregate, said method comprising a step for reacting a polypeptide, which has a tag on the N-terminal side and/or C-terminal side, with a polymerase to give a reaction liquid containing a polymerized polypeptide; a step for freezing the reaction liquid; and a step for thawing the frozen reaction liquid, wherein the polymerase recognizes the tag.

[続葉有]

Takahiro); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡 7
4 4 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹 (HASEGAWA Yoshiki);
〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目 1 番 1
号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル)
9 階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (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, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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, ST, 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, 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).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 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))

(57) 要約: N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素と反応させて、重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程、上記反応液を凍結処理する工程、及び凍結処理した上記反応液を融解処理する工程を含む、重合化ポリペプチドの集合体の製造方法であって、上記重合化酵素が上記タグを認識するものである、方法、を開示する。

明 細 書

発明の名称：

重合化ポリペプチドの集合体の製造方法及び重合化ポリペプチドを高分子量化させる方法

技術分野

[0001] 本発明は、重合化ポリペプチドの集合体の製造方法及び重合化ポリペプチドを高分子量化させる方法に関する。

背景技術

[0002] 感染症対策としてこれまで開発されてきたワクチンは主に、弱毒生ワクチンや不活化ワクチンであるが、近年、組換え技術によって作出されたタンパク質をベースにしたコンポーネントワクチンの需要が高まってきている。組換えタンパク質によるコンポーネントワクチンは、従来の弱毒生ワクチンや不活化ワクチンより安全性が高く、従来のワクチンでは対応できない感染症への対応として期待される一方、免疫原性が低いことが問題視されている。免疫原性を向上させる一つの戦略としては、抗原の高分子量化が挙げられる。

[0003] 抗原の高分子量化の方法としては、化学架橋剤を用いる方法がある。例えば、単量体タンパク質のN／Cの両末端にY－t a gを導入することで、H R P 酵素反応により高度に架橋したタンパク質ポリマーが得られることが報告されているように（非特許文献1）、化学架橋剤として酵素を用い、重合化させることにより抗原を高分子量化することが可能である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：K.Minamihata et al., Bioconjugate Chemistry, 5, 1348-1359 (2016)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、酵素反応により重合化させたポリペプチドをさらに高分子量化して、重合化ポリペプチドの集合体を製造する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、驚くべきことに、N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素と反応させて、重合化ポリペプチドを作製した後、凍結処理及び融解処理することで、重合化ポリペプチドをさらに高分子量化できることを発見した。

[0007] すなわち、本発明は、例えば、以下の〔1〕～〔8〕を含む。

〔1〕

N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素と反応させて、重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程、

上記反応液を凍結処理する工程、及び

凍結処理した上記反応液を融解処理する工程

を含む、重合化ポリペプチドの集合体の製造方法であって、

上記重合化酵素が上記タグを認識するものである、方法。

〔2〕

上記ポリペプチドが、N末端側及びC末端側にタグを有するポリペプチドである、〔1〕に記載の方法。

〔3〕

上記N末端側のタグ及びC末端側のタグがペプチドタグである、〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔4〕

上記重合化酵素がフェノール酸化酵素を含み、

上記N末端側のタグ及びC末端側のタグがそれぞれ少なくとも一つのチロシン残基を含む、

〔3〕に記載の方法。

〔５〕

上記ポリペプチドが単量体である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕

上記ポリペプチドが抗原タンパク質又はその断片である、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕

〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の方法により製造された重合化ポリペプチドの集合体。

〔８〕

N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素により重合化させた重合化ポリペプチドを、凍結処理及び融解処理することで、重合化ポリペプチドを高分子量化させる方法であって、

上記重合化酵素が上記タグを認識するものである、方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素により重合化させた重合化ポリペプチドを、凍結処理及び融解処理することで、簡単に重合化ポリペプチドの集合体を製造することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のSDS-PAGEの結果（a）、及び酵母*Pichia pastoris*発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のSDS-PAGEの結果（b）を示す。0hrは室温での反応を行わなかった結果、1hrは室温で1時間反応させた結果である。重合化が確認できる箇所を点線の枠にて示している。

[図2]カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のサイズ排除クロマトグラフィーの結果（上）、及び酵母*Pichia*

a p a s t o r i s 発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のサイズ排除クロマトグラフィーの結果（下）を図2に示す。

[図3]カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを使用した場合における、酵素反応時間がポリペプチドの重合化に与える影響及び凍結融解処理の影響を解析したSDS-PAGEの結果を示す。各反応時間後の重合化ポリペプチドがさらに高分子量化したサンプルを点線の枠にて示している。

[図4]カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを使用した場合における、凍結融解処理のポリペプチドへの影響をゲル濾過クロマトグラフィーにより解析した結果を示す。

[図5]カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを使用した場合における、酵素反応時間がポリペプチドの重合化に与える影響及び凍結融解処理の影響を解析したSDS-PAGEの結果を示す。

[図6]各種P v s 2 5 の免疫原性をE L I S A 法により確認した結果を示す。斜線のマルは平均値、白マルは各マウス個体をそれぞれ示す。

[図7]Y__B m P v s 2 5 __Y (A l u m 添加) のP v s 2 5 抗原特異的抗体力価をE L I S A 法により検証した結果を示す。

[図8]H R P 酵素反応を室温にて1時間行ったY__B m P v s 2 5 __Y (A l u m 添加) のP v s 2 5 抗原特異的抗体力価をE L I S A 法により検証した結果を示す。

[図9]H R P 酵素反応を室温にて1時間行った後冷凍保存した、Y__B m P v s 2 5 __Y (A l u m 添加) のP v s 2 5 抗原特異的抗体力価をE L I S A 法により検証した結果を示す。

[図10]凍結処理及び融解処理したY__B m P v s 2 5 __YをD y n a m i c L i g h t S c a t t e r i n g 測定(DLS)により解析した結果を示す。

[図11]Y-S C-YのH R P 酵素反応による重合化において、H R P 濃度が重合度に与える影響(a)及びH R P 酵素反応処理時間が重合度に与える影

響（b）を評価した結果を示す。

[図12] Y-S-C-Y の T L 酵素反応による重合化において、T L 濃度が重合度に与える影響（a）及び T L 酵素反応処理時間が重合度に与える影響（b）を評価した結果を示す。

[図13] Y-S-C-Y を H R P 又は T L 酵素反応によって重合化させた後、凍結融解を行うことによる分子量の変化を評価した結果を示す。点線部分の拡大図を右に示す。

[図14] Y-p G 2 p A-Y 又は p G 2 p A-Y を使用した場合における、H R P による重合化の条件の違い及び凍結融解処理の有無がポリペプチドの重合化に与える影響を解析した S D S-P A G E の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本実施形態の重合化ポリペプチドの集合体の製造方法は、N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素と反応させて、重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程（重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程）、上記反応液を凍結処理する工程（凍結工程）及び凍結処理した上記反応液を融解処理する工程（融解工程）を含む。ここで、上記重合化酵素は上記タグを認識するものである。

[0011] （重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程）

N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素と反応させると、重合化酵素が上記タグを認識することで、酵素反応によりポリペプチドの重合反応が起こり、反応液中で重合化ポリペプチドが生成される。

[0012] 重合化酵素は、対象とするポリペプチドの種類及びサイズ等に応じて、当業者が適宜選択することができる。重合化酵素としては、例えば、酸化還元酵素、転移酵素及び加水分解酵素が挙げられる。酸化還元酵素としては、例えば、フェノール酸化酵素、グルコース酸化酵素、グルコースデヒドロゲナーゼ及びアスコルビン酸酸化酵素等が挙げられる。転移酵素としては、例えば、メチル基・カルボキシル基転移酵素、アルデヒド基・ケト基転移酵素、

アシル基転移酵素及びリン酸基転移酵素等が挙げられる。加水分解酵素としては、例えば、カルボン酸エステル加水分解酵素、チオエステル加水分解酵素、リン酸モノエステル加水分解酵素、リン酸ジエステル加水分解酵素及び硫酸エステル加水分解酵素等が挙げられる。

[0013] 上記タグは、各重合化酵素が反応する官能基を有することにより、各重合化酵素に認識される。上記タグは、重合化酵素により認識される官能基を有していればよく、重合化酵素に認識される官能基をリンカー等により直接含むものであってもよく、当該官能基を有するアミノ酸残基を含むものであってもよい。ポリペプチドは、N末端側及びC末端側にタグを有するポリペプチドであることが好ましい。この場合、N末端側のタグとC末端側のタグは、同じであってもよく、異なってもよい。

[0014] 重合化酵素と当該酵素に認識される官能基の組み合わせは、当業者であれば公知の情報に基づき適宜設定することができる。例えば、重合化酵素が、酸化還元酵素の一種であるフェノール酸化酵素を含む場合には、タグとしてはフェノール酸化酵素に認識されるフェノール基、カテコール基又はピロガロール基等を有するタグを使用することができる。

[0015] フェノール酸化酵素は、動物、植物又は微生物等任意の生物に由来するものであってよい。フェノール酸化酵素としては、例えば、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、モノフェノールモノオキシゲナーゼ及びカテコールオキシダーゼが挙げられる。フェノール酸化酵素は、ペルオキシダーゼ、ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、モノフェノールモノオキシゲナーゼ及びカテコールオキシダーゼからなる群から選択されてもよく、ペルオキシダーゼ又はラッカーゼであってもよい。

[0016] ペルオキシダーゼ（EC 1. 1. 1. X）は、過酸化水素（ H_2O_2 ）存在下でヘムまたはその他の金属を活性中心として様々な酸化反応を触媒する酵素群である。ペルオキシダーゼとしては、例えばEC 1. 1. 1. 7、EC 1. 1. 1. 13及びEC 1. 1. 1. 14の酵素が挙げられる。EC 1. 1. 1. 7のペルオキシダーゼとしては、例えば、西洋わさび由

来ペルオキシダーゼ（H R P）が挙げられる。ペルオキシダーゼは、H R Pであってよい。H R Pは、分子量約44 k D aのH e m e含有酵素である。H R Pの酵素反応には、過酸化水素（H₂O₂）を必要とし、フェノール類のラジカル化反応を行う。

[0017] ラッカーゼ（E C 1. 10. 3. 2）は、フェノール類を酸化する能力を持つ酸化酵素である。ラッカーゼとしては、例えば、植物、細菌又は真菌等に由来するものが挙げられ、具体的には、例えば、トラメテス（*T r a m e t e s s p*）由来ラッカーゼ（T L）、アスペルギルス（*A s p e r g i l l u s*）由来ラッカゼーゼ及びボツリチス（*B o t r y t i s*）由来ラッカゼーゼ等が挙げられる。ラッカーゼは、T Lであってよい。T Lは、分子量約57 k D aの3核銅クラスター酵素である。T Lの酵素反応には、溶存酸素が使用され、フェノール類のラジカル化反応を触媒する。

[0018] ビリルビンオキシダーゼはマルチ銅タンパク質の一種であり、例えば、植物、細菌又は真菌等に由来するものが挙げられる。ビリルビンオキシダーゼの具体例としては、ペニシリウム属（*P e n i c i l l i u m*）由来ビリルビンオキシダーゼ、ミロセシウム（*M y r o t h e c i u m*）由来ビリルビンオキシダーゼが挙げられる。

[0019] モノフェノールモノオキシゲナーゼは1個の水酸基を有するフェノール性化合物を酸化する機能を有する酸化酵素であり、例えば、植物、細菌又は真菌等に由来するものが挙げられる。モノフェノールモノオキシゲナーゼの具体例としては、茶葉由来のモノフェノールモノオキシゲナーゼ、クロレラ由来のモノフェノールモノオキシゲナーゼが挙げられる。

[0020] カテコールオキシダーゼはカテコールのように2個の水酸基を有するフェノール類を酸化する機能を有する酸化酵素であり、例えば、植物、細菌又は真菌等に由来するものが挙げられる。カテコールオキシダーゼの具体例としては、茶由来のカテコールオキシダーゼが挙げられる。

[0021] 各重合化酵素に認識されるタグは1以上のアミノ酸残基からなるペプチドタグであってもよい。この場合、ペプチドタグは、重合化酵素により認識さ

れる官能基を有する少なくとも1アミノ酸残基を含む。例えば、重合化酵素により認識される官能基がフェノール基である場合には、ペプチドタグは、フェノール基を有するチロシン残基又はフェニルアラニン残基を含むものであってよく、チロシン残基を含むものであってよい。ペプチドタグがチロシンを含む場合、酸化還元酵素の作用により、チロシンの側鎖のフェノール構造上でラジカル化し、重合化する。

[0022] ペプチドタグの長さは、重合化酵素に認識され、重合化反応が適切に起こる限り特に制限されないが、例えば、1～20個のアミノ酸残基、1～15個のアミノ酸残基、1～10個のアミノ酸残基、又は1～6個のアミノ酸残基からなるものであってよく、2個以上、3個以上、4個以上又は5個以上のアミノ酸残基からなるものであってよく、8個以下、7個以下、6個以下又は5個以下のアミノ酸残基からなるものであってもよい。

[0023] ペプチドタグにおける重合化酵素に認識される官能基を有するアミノ酸残基の数は特に制限されないが、1～10個、1～7個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個又は1個であってよい。また、ペプチドタグにおける重合化酵素に認識される官能基を有するアミノ酸残基の位置は、それぞれペプチドタグを有するポリペプチドのN末端及びC末端から1～10番目、1～7番目、1～5番目、1～4番目、1～3番目、1～2番目、2番目又は1番目（すなわちN末端又はC末端のアミノ酸残基）であってよい。

[0024] ペプチドタグはそれぞれ少なくとも一つのチロシン残基を含むものであってよい。ペプチドタグは、YXXX（配列番号：1）、XYXX（配列番号：2）、XXYX（配列番号：3）及びXXXX（配列番号：4）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むものであってよく、上記群から選択されるアミノ酸配列からなるものであってもよい（Xはチロシン残基以外のアミノ酸残基であってよく、チロシン残基であってよい）。Xがチロシン残基以外である場合には、Xは、アスパラギン酸残基（D）、グルタミン酸（E）以外の負電荷を持たないアミノ酸であることが好ましく、例えば、グリシン（G）であってよい。また、ペプチドタグは、配列番号：1～配列番

号：4のアミノ酸配列、及び配列番号：1～配列番号：4のアミノ酸配列のN末端側及び／又はC末端側に1～3、1～2又は1個のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されてもよい。N末端側のペプチドタグは、N末端に近い位置にチロシン残基を含むことが好ましく、N末端を1番目として、N末端から1～3番目、1～2番目、2番目又は1番目（すなわちN末端）にチロシン残基を含んでよい。C末端側のペプチドタグは、C末端に近い位置にチロシン残基を含むことが好ましく、C末端を1番目として、C末端から1～3番目、1～2番目、2番目又は1番目（すなわちC末端）にチロシン残基を含むことがより好ましく、C末端にチロシン残基を含むことが特に好ましい。

[0025] N末端側のペプチドタグは、配列番号：7、配列番号：11及び配列番号：14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むものであってよく、配列番号：7、配列番号：11及び配列番号：14からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。また、N末端側のペプチドタグは、配列番号：7、配列番号：11又は配列番号：14のアミノ酸配列のチロシン残基以外の部分において、1～5、1～3、1～2又は1個のアミノ酸残基の変異（挿入、欠失、置換）を含むものであってもよい。例えば、N末端側のペプチドタグが配列番号：14のアミノ酸配列からなるものである場合には、ポリペプチドにN末端側のペプチドタグを付与した際に、N末端側のペプチドタグにおけるポリペプチドのN末端に最も近い位置にチロシン残基を含む。

[0026] C末端側のペプチドタグは、配列番号：8、配列番号：12及び配列番号：15からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むものであってよく、配列番号：8、配列番号：12及び配列番号：15からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるものであってもよい。また、C末端側のペプチドタグは、配列番号：8、配列番号：12又は配列番号：15のアミノ酸配列のチロシン残基以外の部分において、1～5、1～3、1～2又は1個のアミノ酸残基の変異（挿入、欠失、置換）を含むものであってもよい。例えば、C

末端側のペプチドタグが配列番号：15のアミノ酸配列からなるものである場合には、ポリペプチドにC末端側のペプチドタグを付与した際に、C末端側のペプチドタグにおけるポリペプチドのC末端に最も近い位置にチロシン残基を含む。

[0027] N末端側のタグを挿入する位置はポリペプチドの中心からN末端側であれば特に制限されないが、ポリペプチドのN末端に近い方が好ましく、例えば、ポリペプチドのN末端のメチオニンから10番目以内（メチオニンを1番目とする）のアミノ酸残基若しくはその間、N末端のメチオニンから5番目以内のアミノ酸残基若しくはその間、N末端のメチオニンから3番目以内のアミノ酸残基若しくはその間、N末端のメチオニンと2番目のアミノ酸残基の間若しくはN末端のメチオニンから2番目のアミノ酸残基若しくはその間又はN末端に挿入することができる。

[0028] C末端側のタグを挿入する位置はポリペプチドの中心からC末端側であれば特に制限されないが、ポリペプチドのC末端に近い方が好ましく、例えば、ポリペプチドのC末端から10番目以内のアミノ酸残基若しくはその間、C末端のアミノ酸残基から5番目以内のアミノ酸残基若しくはその間、C末端のアミノ酸残基から3番目以内のアミノ酸残基若しくはその間、C末端のアミノ酸残基から2番目以内のアミノ酸残基若しくはその間又はC末端に挿入することができる。

[0029] 本実施形態において、重合化されるポリペプチドは、上記N末端側のタグ及びC末端側のタグ以外のタグが付加されていてもよい。そのようなタグとしては、例えば、タンパク質精製用のタグ（例えば、Hisタグ、Streptタグ、HAタグ及びMycタグ等）が挙げられる。上記タンパク質精製用のタグを付加する位置は、酵素処理による重合化を妨げない限り特に制限されないが、N末端側のタグよりC末端側及び／又はC末端側のタグよりN末端側であることが好ましい。

[0030] また、本実施形態において、重合化されるポリペプチドは、上記N末端側のタグ及びC末端側のタグ以外の配列が付加されていてもよい。そのような

配列としては、例えば、タグを切断するための酵素により認識される配列（例えば、HRVCプロテアーゼ認識配列及びトロンビン認識配列等）が挙げられる。このようなタグを付加する位置は、酵素処理による重合化を妨げない限り特に制限されないが、N末端側のタグよりC末端側及び／又はC末端側のタグよりN末端側であることが好ましい。

[0031] 本実施形態における重合化ポリペプチドの集合体の製造方法は、タグとそのタグを認識する重合化酵素の反応によりポリペプチドの重合化が起こるものである。したがって、重合化するポリペプチドは、特に制限されず、例えば、単量体であってよく、二量体、三量体等の多量体であってもよい。本実施形態における製造方法によれば、単量体であっても、容易に高分子量化することができる。重合化するポリペプチドとしては、例えば、抗原、抗体、抗原若しくは抗体の断片、酵素、サイトカイン及び増殖因子が挙げられる。本明細書において抗原は、天然に見られるタンパク質若しくはその断片、天然に見られるタンパク質若しくはその断片に基づき作製された人工タンパク質（例えば、組換えタンパク質）若しくはその断片、合成ポリペプチド、融合タンパク質（例えば、キメラタンパク質）、ウイルス全体又はウイルス様粒子を含む。重合化するポリペプチドとしては、一種類のポリペプチドを用いてもよく、2種類以上のポリペプチドを用いてもよい。

[0032] 本実施形態において製造される重合化ポリペプチドの集合体は、ポリペプチドが抗原である場合、集合体となる前の重合化ポリペプチドと比較して安定かつ高い免疫原性を誘導するため、ワクチン抗原の製造にも有効である。ワクチン抗原は、特に制限されず、使用可能なものとして公知の各種抗原を任意に選択し用いることができるが、例えば、三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原（Pvs25、Pvs28）等のマラリア抗原、黄色ブドウ球菌抗原、エロモナス菌抗原、結核菌抗原、アクチノバシラス・プルロニューモニエ抗原、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗原、ボルデテラ・ブロンキセプチカ抗原、パスツレラ・ムルトシダ抗原、マイコプラズマ・ハイオリニス抗原、ヘモフィルス・パラスイス抗原、大腸菌抗原、サルモネラ・

コレラスィス抗原、連鎖球菌抗原、インフルエンザウイルス抗原、SARSウイルス抗原、AIDSウイルス抗原、豚流行性下痢症ウイルス抗原、伝染性胃腸炎ウイルス抗原、豚繁殖呼吸障害症候群ウイルス抗原、日本脳炎ウイルス抗原、豚パルボウイルス抗原、豚サーコウイルス抗原、豚インフルエンザウイルス抗原、オーエスキー病ウイルス抗原、トリパノソーマ抗原、パスツレラ・ムルトシダ毒素、コクシジウム抗原及びタイレリア抗原等が挙げられる。

[0033] 重合化するポリペプチドの大きさは特に制限されないが、例えば、5～1000kDa、10～500kDa、15～200kDa、15～100kDa、15kDa以上、20kDa以上、80kDa以下、50kDa以下、又は30kDa以下であってよい。

[0034] また、重合化するポリペプチドとして、別のタグと結合する部位をさらに含むポリペプチドを用いることができる。上記別のタグと結合する部位をさらに含むポリペプチドは、当該タグを介して、さらに同種又は別のポリペプチドを結合させることができる。そのようなポリペプチドとしては、例えば、SpyCatcher（配列番号：5）が挙げられる。SpyCatcherは、SpyTag（AHIVMVDA YKPTK、配列番号：6）と自発的にイソペプチド結合を形成するため、SpyTagを介して同種又は別のポリペプチドを結合させることができる。また、常法により、N末端側及びC末端側にタグを有するポリペプチドに別のタグと結合する部位を挿入し、別のタグと結合する部位をさらに含むポリペプチドを作製することもできる。

[0035] N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドは、常法により作製することができる。例えば、化学修飾法等により、ポリペプチドへの修飾により重合化酵素により認識される官能基を付与することができる。また、重合化酵素により認識される官能基を有するアミノ酸残基を付与したポリペプチドを発現させるためのベクターを作製し、大腸菌発現系、酵母発現系、昆虫細胞による発現系（例えば、カイコーバキュロウイルス発

現系)、動物細胞による発現系及び無細胞タンパク質合成系等を利用して作製することもできる。大腸菌発現系、酵母発現系、昆虫細胞による発現系、動物細胞による発現系を利用する場合には、例えば、重合化酵素により認識される官能基を有するアミノ酸残基を付与したポリペプチドを発現させるためのベクターを作製し、宿主細胞に形質転換した後、形質転換した宿主細胞を培養し、宿主細胞を破壊することにより目的のポリペプチドを回収する方法により作製することができる。無細胞タンパク質合成系を利用する場合には、例えば、細胞破碎液や抽出液に、エネルギー分子、エネルギー再生系、塩類及びDNA若しくはmRNA等のテンプレートを添加し、インビトロで転写及び翻訳反応を行うことにより目的のポリペプチドを作製することができる。無細胞タンパク質合成系の利用可能なシステムとしては、例えば、Continuous Flow Cell-Free (CFCF) 翻訳システム、Protein synthesis Using Recombinant Elements (PURE) システムが挙げられる。

[0036] N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素と反応させることは、N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチド、重合化酵素及び溶媒を混合して混合液を調製し、反応させることであってもよい。また、N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを溶媒で調製したポリペプチド溶液、重合化酵素を溶媒で調製した重合化酵素溶液を混合して混合液を調製し、反応させることであってもよい。

[0037] 溶媒は緩衝液であってよい。例えば、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、トリス塩酸緩衝液(Tris-HCl緩衝液)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、トリスEDTA緩衝液(TE)、トリス酢酸EDTA緩衝液(TAE)、トリスホウ酸EDTA緩衝液(TBE)、SSC緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸ナトリウム緩衝液、炭酸一重炭酸緩衝液及びホウ酸ナトリウム緩衝液等が挙げられる。

[0038] 混合液は、重合化酵素による処理のため又は処理の効率を向上させるため

の基質及び／又は化合物をさらに含んでいてもよい。そのような化合物としては、酵素触媒活性のために必要でありうる何らかの補助化合物、例えば適当なアクセプター又は補酵素、酵素反応の至適条件下に調整するための安定化剤、アクチベーター、保存剤、金属イオン、緩衝剤、界面活性剤、凝集剤、キレート化剤及び分散剤等が挙げられる。例えば、重合化酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、酵素反応に過酸化水素が必要となるため、過酸化水素供給源を添加してもよい。

[0039] 重合化酵素と反応させるポリペプチドの含有量は、酵素の種類及び反応ボリューム等により当業者が適宜設定できるが、反応液の総量を基準として、例えば、 $1 \sim 1000 \mu\text{M}$ 、 $5 \sim 200 \mu\text{M}$ 又は $10 \sim 50 \mu\text{M}$ であってよい。

[0040] 酵素反応に使用する酵素の含有量は、酵素の種類及び反応ボリューム等により当業者が適宜設定できるが、反応液の総量を基準として、例えば、 $0.1 \sim 30 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \sim 20 \mu\text{M}$ 又は $0.5 \sim 10 \mu\text{M}$ であってよい。

[0041] 酵素処理の反応温度及び反応時間も、酵素の種類及び反応ボリューム等により当業者が適宜設定できるが、反応温度は、例えば、 $15 \sim 50^\circ\text{C}$ 、 $20 \sim 45^\circ\text{C}$ 、 $25 \sim 38^\circ\text{C}$ 又は $30 \sim 37^\circ\text{C}$ であってよく、 30°C 以上又は 35°C 以上であってよく、 42°C 以下、 40°C 以下又は 38°C 以下であってよい。反応時間は、例えば、5秒～3日間、20秒～2日間又は30秒～1日間であってよく、10秒以上、30秒以上、60秒以上、90秒以上又120秒以上であってよく、7日以下、5日以下、2日以下、1日以下、12時間以下、6時間以下又は2時間以下であってよい。

[0042] また、N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドと重合化酵素の反応は、至適条件下により行うことが好ましい。したがって、重合化酵素による処理の効率を向上させるために当該酵素の酵素反応に適切なpHに調整することを含んでもよい。使用する重合化酵素の至適pHは、公知の情報に基づき当業者が適宜選択できる。pHは、溶媒により調整してもよく、添加剤により調整してもよい。例えば、一般的なペルオキシダー

ゼの至適pHは約5.0～約8.0、ラッカーゼの至適pHは約4.0～約7.0とされている。

[0043] (凍結工程)

上記重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程にて得られた反応液を凍結処理する工程である。

[0044] 上記重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程にて得られた反応液は、酵素反応により生成された重合化ポリペプチド、溶媒、場合によって酵素反応の酵素の残りや過酸化水素等の化合物の残りを含む。当該反応液を凍結処理及び融解処理させることで、重合化ポリペプチドの集合体が形成される。重合化ポリペプチドの集合体は、凍結前の重合化ポリペプチドと比較してより高分子量である。

[0045] 重合化ポリペプチドの集合体には複数の重合化ポリペプチドが含まれる。重合化ポリペプチドの集合体には、例えば、2～20、2～15、2～10、2以上、3以上、4以上、5以上の重合化ポリペプチドが含まれてよい。重合化ポリペプチドの集合体に含まれる重合化ポリペプチドは、例えば、2mer(ダイマー)～96mer、3mer(トリマー)～64mer又は3mer(トリマー)～32merであってよく、2mer以上、5mer以上、6mer以上、9mer以上、10mer以上又は12mer以上であってよく、150mer以下、120mer以下、100mer以下、80mer以下又は50mer以下であってもよい。重合化ポリペプチドを含む当該反応液を凍結することにより、重合化ポリペプチドの集合体が形成されるメカニズムについては不明であり、集合体の形成がさらなる重合によるものであるか、重合化ポリペプチドの自己集合又は凝集によるものであるか明らかではない。

[0046] 重合化ポリペプチドの集合体の大きさは特に制限されないが、例えば、30～5000kDa、50～3000kDa、100～2500kDa、150～2200kDa、500～2000kDa、100kDa以上、500kDa以上、800kDa以上、1000kDa以上、10000kDa

以下、7000kDa以下又は4000kDa以下であってよい。

[0047] 上記重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程後、凍結する前に、重合化酵素による酵素反応を停止する工程を含んでもよく、停止する工程を含まなくてもよい。停止する方法としては、反応停止液を添加する方法及び酵素の至適温度よりも高い温度で熱失活させる方法等が挙げられる。

[0048] 反応液を凍結する方法は特に制限されないが、例えば、冷凍庫に一定時間保存することで凍結してもよく、反応液を入れた容器を液体窒素に接触させることで凍結してもよい。凍結処理は、 $-200^{\circ}\text{C}\sim 0^{\circ}\text{C}$ 、 $-100^{\circ}\text{C}\sim -1^{\circ}\text{C}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}\sim -3^{\circ}\text{C}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}\sim -10^{\circ}\text{C}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}\sim -20^{\circ}\text{C}$ で行ってよく、 0°C 以下、 -1°C 以下、 -4°C 以下又は -15°C 以下で行ってよい。また、凍結処理は、0.1秒～100日間、1秒～7日間、3秒～3日間、10秒～2日間又は30秒～1日間行ってもよく、5秒以上、120秒以上、5分以上、1時間以上又は2時間以上行ってもよく、5日以下、2日以下、1日以下、10時間以下、5時間以下又は3時間以下行ってもよい。

[0049] (融解工程)

上記凍結処理をした反応液を融解処理する工程である。

[0050] 凍結処理後に反応液を融解する方法は特に制限されないが、例えば、室温下に置くことで融解してもよく、一定温度下に一定時間置くことで融解してもよく、加熱により融解してもよい。一定温度下に置く方法としては、例えば、一定温度に設定したインキュベータ内に反応液を入れた容器を静置する方法、一定温度に設定したウォーターバス等のヒートブロック内に反応液を入れた容器を置く方法等が挙げられる。また、加熱により融解する場合にも、例えば、高温の液体中に反応液を入れた容器を入れる方法、ヒートブロック等の加熱器に反応液を入れた容器を置く方法により行うことができる。

[0051] 融解処理は、 $1\sim 100^{\circ}\text{C}$ 、 $2\sim 70^{\circ}\text{C}$ 、 $3\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 $3\sim 45^{\circ}\text{C}$ 、 $3\sim 37^{\circ}\text{C}$ 、 $3\sim 15^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ で行ってよく、 0°C 以上、 1°C 以上、 2°C 以上又は 4°C 以上で行ってよく、 90°C 以下、 70°C 以下、 50°C 以下又は 40°C 以下で行ってもよい。また、凍結処理は、1分～1日間、1分～1

2時間、1分～6時間、2分～3時間又は30分～2時間行ってもよく、2分以上、5分以上又は1時間以上行ってもよく、3日以下、2日以下、1日以下、3時間以下又は1時間以下行ってもよい。

[0052] 本実施形態の重合化ポリペプチドの集合体の製造方法は、上記融解工程の後、上記重合化ポリペプチドの集合体を精製する工程をさらに含んでもよい。精製は、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、ゲルろ過法、限外ろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法等公知の方法により行うことができる。

[0053] (重合化ポリペプチドの集合体)

上述した方法により製造された重合化ポリペプチドの集合体は、何らかのメカニズムにより重合化ポリペプチドが集合し、さらに高分子量化されたものである。

[0054] 上記重合化ポリペプチドの集合体は、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を含む医薬組成物として経口又は非経口的に投与することができる。医薬組成物がワクチンである場合には、アジュバンドを含むことが好ましい。アジュバンドとしては、例えば、アルミニウム塩等の粒子型アジュバンド、TLRリガンド分子等リガンド分子アジュバンド、水中油型エマルジョン（乳剤）型アジュバンド、2種類以上のアジュバンドを混合した混合型アジュバンド、リポソームによる膜型アジュバンド等が挙げられる。

[0055] (重合化ポリペプチドを高分子量化させる方法)

本実施形態の重合化ポリペプチドを高分子量化させる方法は、N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素により重合化させた重合化ポリペプチドを、凍結処理及び融解処理することを含む。ここで、上記重合化酵素は上記タグを認識するものである。

[0056] 高分子量化させるとは、重合化されたポリペプチドをさらに高分子量の集合体にすることを意味する。ポリペプチド、重合化酵素、各処理等に関しては、上述したとおりである。

[0057] 以下、実施例にて本発明の内容をより詳細に説明する。ただし、本発明は

、下記の実施例に限定されるものではない。

実施例

[0058] [実施例 1]

Plasmodium vivax のオーキネート表層タンパク質 *Pvs 25*（三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原）の N 末端側及び C 末端に、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）が選択的に認識し得るチロシン残基を含むペプチドタグ（Y-tag）（N 末端側：YGGGGGGGGGS、配列番号：7；C 末端側：GGGGY、配列番号：8）を付与したもの（Tag-Pvs 25 又は Y__Pvs 25__Y）を、カイコーバキュロウイルス発現系を利用して常法により作製した（配列番号：9）。なお、C 末端側に付与したペプチドタグの N 末端側にさらに精製用の His タグ（HHHHHH、配列番号：10）が付加されている。同様に、*Pvs 25* の N 末端側及び C 末端に、ペプチドタグ（Y-tag）（N 末端側：YRRRRGGGGGS、配列番号：11；C 末端側：GGGY、配列番号：12）を付与したもの（Tag-Pvs 25 又は Y__Pvs 25__Y）を酵母 *Pichia pastoris* 発現系を利用して常法により作製した（配列番号：13）。なお、C 末端側に付与したペプチドタグの N 末端側にさらに精製用の His タグ（HHHHHH、配列番号：10）が付加されている。以下、カイコーバキュロウイルス発現系により作製した Tag-Pvs 25 を Tag-BmPvs 25 又は Y__BmPvs 25__Y、酵母 *Pichia pastoris* 発現系により作製した Tag-Pvs 25 を Tag-PpPvs 25 又は Y__PpPvs 25__Y と表す。

[0059]（酵素反応及び SDS-PAGE による重合化の確認）

Total volume が $30\ \mu\text{L}$ 、Tag-Pvs 25、HRP 及び H_2O_2 の最終モル濃度がそれぞれ $30\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ 及び $60\ \mu\text{M}$ になるように PBS で調製した後、反応チューブに、PBS、Tag-Pvs 25、HRP、 H_2O_2 の順に添加した。全て添加した後、室温で 1 時間反応させた。 $10\ \mu\text{L}$ を $2\times\text{SB } 10\ \mu\text{L}$ と混合し、SDS-PAGE アプライ用サンプ

ル20 μ Lを調製した。コントロールは、室温での反応を行わない以外は上記と同様に調製した。

[0060] カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のSDS-PAGEの結果、及び酵母*Pichia pastoris*発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のSDS-PAGEの結果を図1に示す。点線の枠に示されるように、カイコーバキュロウイルス発現系及び酵母*Pichia pastoris*発現系のいずれの発現系により作製したポリペプチドを使用した場合にも、HRP酵素反応により重合化したタンパク質ポリマーが得られたことが確認された。

[0061] (酵素反応及びサイズ排除クロマトグラフィーによる重合化の確認)

Total volumeが750 μ L、Tag-Pvs25、HRP及びH₂O₂を最終モル濃度がそれぞれ30 μ M、1 μ M及び60 μ MになるようにPBSで調製した後、反応チューブに、PBS、Tag-Pvs25、HRP、H₂O₂の順に添加した。全て添加した後、室温で1時間反応させた。0.22 μ mフィルター(Millex (登録商標) Syringe-driven Filter Unit、メルク社)を通した溶液をアプライ用サンプルとして調製した。コントロールは、室温での反応を行わない以外は上記と同様に調製した。

[0062] アプライ用カラムはSuperdex 75 (GE Healthcare社)を使用し、流速0.8 mL/minとし、溶媒はPBSを用いた。検出はUVを用いてA280の吸収により実施した。カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のサイズ排除クロマトグラフィーの結果、及び酵母*Pichia pastoris*発現系により作製したポリペプチドを使用した場合のサイズ排除クロマトグラフィーの結果を図2に示す。カイコーバキュロウイルス発現系及び酵母*Pichia pastoris*発現系のいずれの発現系により作製したポリペプチドを使用した場合にも、HRP酵素反応により重合化したタンパク質ポリマーが得られたことが確認された。特に、カイコーバキュロウイルス発現系により作製

したポリペプチドを使用した場合には、32merの重合化により高分子化したポリペプチドが得られたことが示された。

[0063] [実施例2]

実施例1と同様にカイコーバキュロウイルス発現系によりTag-Pvs25を作製した。Total volumeが30 μ L、Tag-Pvs25、HRP及びH₂O₂の最終モル濃度がそれぞれ30 μ M、1 μ M及び60 μ MになるようにPBSで調製した後、反応チューブに、PBS、Tag-Pvs25、HRP、H₂O₂の順に添加した。全て添加した後、室温で1時間又は2時間反応させた。10 μ Lを2 $\times$ SB10 μ Lと混合し、SDS-PAGEアプライ用サンプル20 μ Lを調製した。コントロールは、室温での反応を行わない以外は上記と同様に調製した。また、凍結保存サンプルとして、それぞれ室温で1時間又は2時間反応させた後、10 μ Lを2 $\times$ SB10 μ Lと混合し、-20℃で約3か月凍結保存し、SDS-PAGEアプライ時に溶解させたサンプルを調製した。

[0064] SDS-PAGEの結果を図3に示す。サンプル1はTag-Pvs25のみ、サンプル2は反応時間なしのコントロール、サンプル3は反応時間1時間、サンプル4は反応時間2時間、サンプル5は反応時間1時間の後凍結融解したサンプル、サンプル6は反応時間2時間の後凍結融解したサンプルを示す。反応時間が長くなる程、ポリペプチドの重合度が増すことが示された（サンプル2～4）。また、驚くべきことに、各反応後に凍結融解したサンプルはゲル上部に位置する超高分子量体を形成していた（サンプル5及び6）。

[0065] [実施例3]

実施例1と同様にカイコーバキュロウイルス発現系によりTag-Pvs25を作製した（Y__BmPvs25__Y）。Total volumeが750 μ L、Y__BmPvs25__Yの最終モル濃度が30 μ MになるようにPBSで調製したサンプル（Y__BmPvs25__Y HRP非処理）、実施例1におけるサイズ排除クロマトグラフィー用の酵素反応処理時間1時

間のサンプルと同様に調製したサンプル（Y__BmP v s 2 5__Y HRP 反応 1 時間）、及び上記「Y__BmP v s 2 5__Y HRP 反応 1 時間」のサンプルを反応後 -20°C で 3 日間凍結し、融解したサンプル（Y__BmP v s 2 5__Y HRP 反応 1 時間+凍結）をゲル濾過クロマトグラフィーにより分子サイズ解析した。

[0066] 結果を図 4 に示す。「Y__BmP v s 2 5__Y HRP 非処理」は、酵素反応を行っていないため、抗原の分子量（約 21 kDa ）のピークとして検出された。「Y__BmP v s 2 5__Y HRP 反応 1 時間」は、酵素反応によって分子量が増大し、約 $150\sim650\text{ kDa}$ の分布となった（平均分子量 500 kDa ）。酵素処理 1 時間後さらに 3 日間凍結保存したサンプル「Y__BmP v s 2 5__Y HRP 反応 1 時間+凍結」は、酵素反応及び凍結によって、カラムの排除限界に近い超高分子量体（約 $1000\sim2000\text{ kDa}$ ）を形成していることが分かった。

[0067] [実施例 4]

実施例 1 と同様にカイコーバキュロウイルス発現系により Tag-P v s 2 5 を作製した（Y__BmP v s 2 5__Y）。Total volume が $30\mu\text{L}$ 、Tag-P v s 2 5、HRP 及び H_2O_2 の最終モル濃度がそれぞれ $30\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 及び $60\mu\text{M}$ になるように PBS で調製した後、反応チューブに、PBS、Tag-P v s 2 5、HRP、 H_2O_2 の順に添加した。全て添加した後、室温で 1 時間反応させた。 $10\mu\text{L}$ を $2\times\text{SB } 10\mu\text{L}$ と混合し、SDS-PAGE アプライ用サンプル $20\mu\text{L}$ を調製した。コントロールは、室温での反応を行わない以外は上記と同様に調製した。また、凍結保存サンプルとして、室温で 1 時間反応させた後、 $10\mu\text{L}$ を $2\times\text{SB } 10\mu\text{L}$ と混合し、 -20°C で 1 時間凍結保存し、SDS-PAGE アプライ時に溶解させたサンプルを調製した。

[0068] SDS-PAGE の結果を図 5 に示す。サンプル 1 は Tag-P v s 2 5 のみ、サンプル 2 は HRP 反応時間なしのコントロール、サンプル 3 は HRP 反応時間 1 時間、サンプル 4 は HRP 反応時間 1 時間の後 1 時間凍結し、

融解したサンプルを示す。反応時間が長くなる程、ポリペプチドの重合度が増すことが示された（サンプル2～4）。室温1時間までの酵素反応による重合効率が良く、より高分子量のバンドパターンが認められた。驚くべきことに、酵素反応1時間後に1時間凍結し、融解したサンプルはゲル上部に位置する超高分子量体を形成していた（サンプル4）。

[0069] [実施例5]

各種P v s 2 5の免疫原性をE L I S A法により確認した。

（マウス免疫用サンプルの調製）

マウス免疫用サンプルを以下のように調製した。H R P処理群は全てT a g - P v s 2 5、H R P、H₂O₂を最終モル濃度30 μM、1 μM、60 μMになるようにP B Sで調製し、室温で1時間反応させた後、A l u m（水酸化アルミニウムゲルアジュバント）を同量添加し、30分間V o l t e xにより攪拌して調製した。凍結サンプルは、免疫3日前にT a g - P v s 2 5、H R P、H₂O₂を最終モル濃度30 μM、1 μM、60 μMになるようにP B Sで調製し、室温で1時間反応させた後、-20℃で3日間保存し、免疫当日にA l u mを同量添加し、30分間V o l t e xにより攪拌して調製した。T a g - P v s 2 5の最終モル濃度が30 μMとなるようにA l u mで調製したサンプルをコントロールとした。

（サンプルの投与及び採血）

[0070] 0、2及び4週目に各サンプル100 μLをマウスに皮下投与した。5週目にマウスの尾を約1 mm切断し、キャピラリー管（M i c r o - H e m a t o c r i t C a p i l l a r y T u b e s、F i s h e r S c i e n t i f i c社）を使用し、採血（尾静脈）した。6週目にサクリファイスし、全採血した。血液は、15,000 rpmで10分間遠心分離し、血餅と血清に分離した。血清部分のみを採取し、得られたマウス抗血清のP v s 2 5抗原特異的応答をE L I S A法により評価した。

[0071] （E L I S A法）

E L I S A法のコート抗原は以下のように準備した。

Y__PpPvs25__Y免疫群：Pichia発現Pvs25コート（25 Ong/well）

Y__BmPvs25__Y免疫群：Bombyx発現Pvs25コート（25 Ong/well）

[0072] また、各種抗体および基質には以下を用いた。

一次抗体：各種免疫血清50倍希釈（Week 6）（50 μ L/well）

二次抗体：Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG（50 μ L/well）

基質：1step Turbo TMB-ELISA（Thermo Scientific社、50 μ L/well）

停止液：2M H_2SO_4 （50 μ L/well）

[0073] ELISA法による結果を図6に示す。酵母Pichia pastoris発現系を利用したY__PpPvs25__Y及びカイコーバキュロウイルス発現系を利用したY__BmPvs25__Yの両方において、高分子量体にすることで抗体応答が上がっていた。また、Y__BmPvs25__YはそれだけでY__PpPvs25__Yと比較して免疫原性が高かったが、HRPによる重合化をさせることで、より抗体応答が向上した。さらに、Y__BmPvs25__YはHRP反応後の凍結保存処理によって、より強い免疫応答を誘導できることが分かった。

[0074] [実施例6]

実施例5において得られた血清を用いて、各種Pvs25のPvs25抗原特異的抗体価をELISA法により検証した。一次抗体として、Week 6で得られた各種免疫血清を50～102400倍まで段階希釈した（50 μ L/well）以外は、実施例5と同様の条件によりELISA法を行った。

[0075] 結果を図7～9に示す。凍結処理をしてないサンプルの誘導抗血清（Group A、B）では、カイコーバキュロウイルス発現系により作製したTa

g-P v s 2 5 「Y B m P v s 2 5 Y / A l u m 免疫マウス血清」及び「H R P 反応1時間（室温）Y B m P v s 2 5 Y / A l u m 免疫マウス血清」は、高い免疫原性を付与するアジュバント不完全フロイントアジュバント（I F A）による誘導P p P v s 2 5 抗血清と高くても同等もしくはほとんどが低い抗体力価であることが分かった（図7及び8）。一方、凍結保存させた超高分子量体免疫サンプル誘導抗血清（G r o u p C）では、H R P 反応1時間（室温）及び凍結させた「H R P 反応1時間（室温）Y B m P v s 2 5 Y 凍結 / A l u m 免疫マウス血清」は、I F A と比べると高い抗体力価であることが分かり、血清濃度を約1万倍希釈した薄い血清濃度でも高い応答を示した（図9）。これら結果から、凍結処理することによって生じた超高分子量体の免疫原性は、I F A が付与する免疫原性を遙かに凌駕することが確認できた。

[0076] [実施例7]

カイコーバキュロウイルス発現系により作製したポリペプチドを重合化させた重合化ポリペプチドを凍結処理及び融解処理したサンプルのD y n a m i c L i g h t S c a t t e r i n g 測定（D L S）により解析した。その結果、重合体のサイズ分布は平均61.8nmにピークを与え、大きな分子サイズのポリマーを形成していることが明らかとなった（図10）。また、これらを投与したマウス個体の免疫応答の結果（各黒丸）から、重合化ポリペプチドの分子サイズが大きくなることで、免疫原性の群における個体差が少なくなる傾向にあることが示された。これは、上記図9に示される結果において、マウスの個体における抗体力価の差が少なくなる傾向にあることから確認できる。したがって、重合化ポリペプチドを凍結処理及び融解処理することにより作製した超高分子量体は、より安定的な免疫応答を誘導できることが示された。

[0077] [実施例8]

S p y C a t c h e r タンパク質（配列番号：9）のN末端側及びC末端に、H R P 及びT r a m e t e r s p 由来ラッカーゼ（T L）が選択的に

認識し得るチロシン残基を含むペプチドタグ（N末端側：Y G G G G、配列番号：14；C末端側：G G G G Y、配列番号：15）を付与し、N末端側にH R V 3 Cプロテアーゼ認識配列（L E V L F Q G P、配列番号：16）、C末端側に精製用のH i s T a g配列（H H H H H H、配列番号：10）及びトロンビン配列（L V P R G S、配列番号：17）を付与したもの（Y－S p y C a t c h e r－Y又はY－S C－Y、配列番号：18）を、大腸菌タンパク質発現系を利用して常法により作製した。

[0078] （H R P濃度及び反応時間が重合度に与える影響の評価）

Y－S C－YのH R P酵素反応による重合化において、H R P濃度が重合度に与える影響を評価した。30 μ MのY－S C－Yに対して、H R Pを0.5、1、2、3、5 μ Mの終濃度で添加した溶液を調製した。そこに過酸化水素を終濃度30 μ Mで添加し、37℃で2時間反応させ、Y－S C－Yの重合化を行った。反応後のサンプル溶液を4×S D Sサンプルバッファー（メルカプトエタノール入）と混合し、98℃で3分間加熱処理を行った後、アクリルアミド濃度10%のゲルを使用し、S D S－P A G E解析を行った。

[0079] その結果、15 k D a付近に確認されるY－S C－Yのバンド強度が、H R Pと過酸化水素を添加したレーン（左から3～7レーン）において低下し、Y－S C－Yダイマーに相当する位置に新たなバンド、さらに高分子量側にラダー上に重合化したY－S C－Yのバンドが現れた（図11左）。H R P濃度が上がるに従い、高分子量側のバンド強度が強くなり、Y－S C－Yの重合度が向上している様子が観察された。以降の実験ではH R P濃度を3 μ Mに固定してポリマー化反応を実施した。

[0080] 次に、Y－S C－YのH R P酵素反応による重合化において、H R P酵素反応処理時間が重合度に与える影響を評価した。30 μ MのY－S C－Yに対して、H R Pならびに過酸化水素を終濃度3 μ Mならびに30 μ Mで添加した。添加後、5秒、10秒、30秒、60秒、120秒においてサンプル溶液を一部採取し、即座に4×S D Sサンプルバッファー（メルカプトエタ

ノール入)と混合し、98℃で3分間加熱処理を行い、HRPを失活させることで反応を停止させた。アクリルアミド濃度10%のゲルを使用し、反応停止後のサンプル溶液についてSDS-PAGE解析を行った。その結果、いずれの反応時間においても高分子量化したY-SC-Yのバンドが観察され、HRP酵素反応によって、Y-SC-Yが極めて迅速に重合化することを確認した(図11右)。

[0081] (TL濃度及び反応時間が重合度に与える影響の評価)

Y-SC-YのTL酵素反応による重合化において、TL濃度が重合度に与える影響を評価した。30μMのY-SC-Yに対して、TLを0.5、1、2、3、5μMの終濃度で添加した溶液を調製し、37℃で2時間反応させ、Y-SC-Yのポリマー化を行った。TLは溶液中の溶存酸素を酸化源として反応を行うため、Y-SC-YとTLを混合するだけで反応は開始する。反応後のサンプル溶液を4×SDSサンプルバッファー(メルカプトエタノール入)と混合し、98℃で3分間加熱処理を行った後に、SDS-PAGE解析(アクリルアミド濃度10%のゲルを使用)を行った。

[0082] その結果、15kDa付近に見えるY-SC-Yのバンド強度が、TLを添加したレーン(左から3～7レーン)において低下し、Y-SC-Yダイマーに相当する位置に新たなバンド、さらに高分子量側にラダー上にポリマー化したY-SC-Yのバンドが現れた(図12左)。TL濃度が上がるに従い、高分子量側のバンド強度が強くなり、Y-SC-Yの重合度が向上している様子が観察された。以降の実験ではTL濃度を3μMに固定して重合化反応を実施した。

[0083] 次に、Y-SC-YのTL酵素反応による重合化において、TL酵素反応処理時間が重合度に与える影響を評価した。30μMのY-SC-Yに対して、TLを終濃度3μMで添加した。添加後、5秒、10秒、30秒、60秒、120秒においてサンプル溶液を一部採取し、即座に4×SDSサンプルバッファー(メルカプトエタノール入)と混合し、98℃、3分間加熱処理を行い、TLを失活させることで反応を停止させた。反応停止後のサンプ

ル溶液をSDS-PAGE解析（アクリルアミド濃度10%のゲルを使用）を行った。その結果、反応時間が伸びるに従って、Y-SC-Yポリマーのバンド強度が増大したことから、120秒では反応が続いていることが示された（図12右）。

[0084] HRPとTLの結果を比較すると、HRPを使用した場合においてポリマー化反応速度がより速いことが示された。

[0085] [実施例9]

Y-SC-YをHRP又はTL酵素反応によって重合化させ、さらに凍結融解を行うことで分子量がどのように変化するかを評価した。HRP（3 μ M）又はTL（3 μ M）をY-SC-Y（30 μ M）と混合し、HRPの場合はさらに過酸化水素（30 μ M）を添加し、37℃で1時間反応させた。その後、4℃で一晩保存したサンプル（4とラベルされたレーン）、-25℃で一晩凍結させたサンプル（-25とラベルされたレーン）、-80℃で一晩凍結させたサンプル（-80とラベルされたレーン）の3種類を調製した。凍結させたサンプルは、4℃で1時間静置して融解させた。また、反応後に即座に4×SDSサンプルバッファーと混合し、98℃で3分間加熱処理を行い、HRP及びTLを失活させたサンプル（37とラベルされたレーン）も調製した。各サンプルをSDS-PAGE（アクリルアミド濃度12.5%のゲルを使用）によって解析した。

[0086] その結果、凍結融解を行った-25℃及び-80℃のサンプルにおいて、高分子量領域におけるバンド強度が、凍結融解を行わなかったサンプルよりも増強している様子が観察され、凍結融解により重合化したY-SC-Yがより高分子量化していることが示唆された（図13）。

[0087] [実施例10]

抗体結合キメラタンパク質であるpG2pAのN末端側及びC末端に、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）が選択的に認識し得るチロシン残基を含むペプチドタグ（Y-tag）（N末端側：YGGGG、配列番号：14；C末端側：GGGGY、配列番号：15）を付与したもの（Y-

pG2pA-Y)を、大腸菌発現系を利用して常法により作製した(配列番号:19)。なお、N末端側に付与したペプチドタグのC末端側にさらに精製用のHisタグ(HHHHHH、配列番号:10)が付加されている。同様に、pG2pAのC末端に、ペプチドタグ(Y-tag)(GGGGY、配列番号:15)を付与したもの(pG2pA-Y)を、大腸菌発現系を利用して常法により作製した(配列番号:20)。なお、N末端側に精製用のHisタグ(HHHHHH、配列番号:10)が付加されている。

[0088] (条件1)

Total volumeが30 μ L、Y-pG2pA-Y又はpG2pA-Y、HRP及びH₂O₂の最終モル濃度がそれぞれ30 μ M、0.1 μ M及び45 μ MになるようにPBSで調製した後、反応チューブに、PBS、Y-pG2pA-Y又はpG2pA-Y、HRP、H₂O₂の順に添加した。全て添加した後、室温で1時間反応させた。10 μ Lを2 $\times$ SB10 μ Lと混合し、SDS-PAGEアプライ用サンプル20 μ Lを調製した。コントロールは、室温での反応を行わない以外は上記と同様に調製した。また、凍結保存サンプルとして、室温で1時間反応させた後、10 μ Lを2 $\times$ SB10 μ Lと混合し、-20 $^{\circ}$ Cで1時間凍結保存し、SDS-PAGEアプライ時に溶解させたサンプルを調製した。

[0089] (条件2)

Total volumeが30 μ L、Y-pG2pA-Y又はpG2pA-Y、HRP及びH₂O₂の最終モル濃度がそれぞれ30 μ M、1 μ M及び60 μ MになるようにPBSで調製した後、反応チューブに、PBS、Y-pG2pA-Y又はpG2pA-Y、HRP、H₂O₂の順に添加した。全て添加した後、室温で1時間反応させた。10 μ Lを2 $\times$ SB10 μ Lと混合し、SDS-PAGEアプライ用サンプル20 μ Lを調製した。コントロールは、室温での反応を行わない以外は上記と同様に調製した。また、凍結保存サンプルとして、室温で1時間反応させた後、10 μ Lを2 $\times$ SB10 μ Lと混合し、-20 $^{\circ}$ Cで1時間凍結保存し、SDS-PAGEアプライ時に

溶解させたサンプルを調製した。

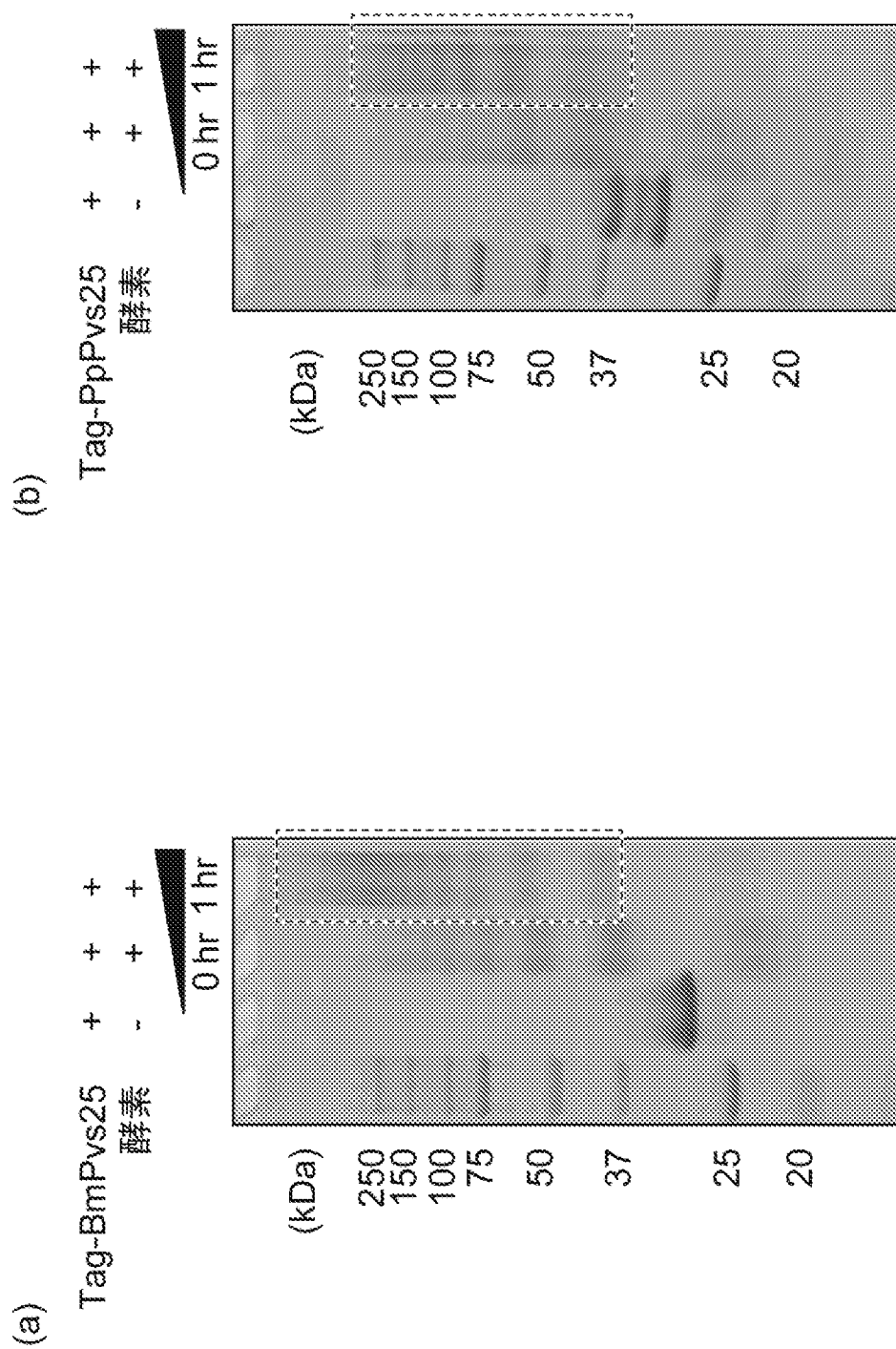
[0090] SDS-PAGEの結果を図14に示す。左のゲルは条件1、右のゲルは条件2の結果である。レーンMはマーカー、レーン1は室温での反応を行わなかったコントロール、レーン2は室温で1時間反応させて酵素による重合反応を行ったサンプル、レーン3は、室温で1時間反応させて酵素による重合反応を行った後、 -20°C で1時間凍結保存したサンプルの結果をそれぞれ示す。

[0091] Y-pG2pA-Y及びpG2pA-Yのいずれの条件においても、凍結融解を行ったサンプルにおいて、高分子量領域におけるバンド強度が、凍結融解を行わなかったサンプルよりも増強している様子が観察され、凍結融解により重合化したY-pG2pA-Y及びpG2pA-Yがより高分子量化していることが示唆された。また、条件1よりも条件2の方が、高分子量領域におけるバンド強度が増強している様子が観察された。これにより、タンパク質によって条件を変えることで凍結重合による高分子量化が可能であることが示された。

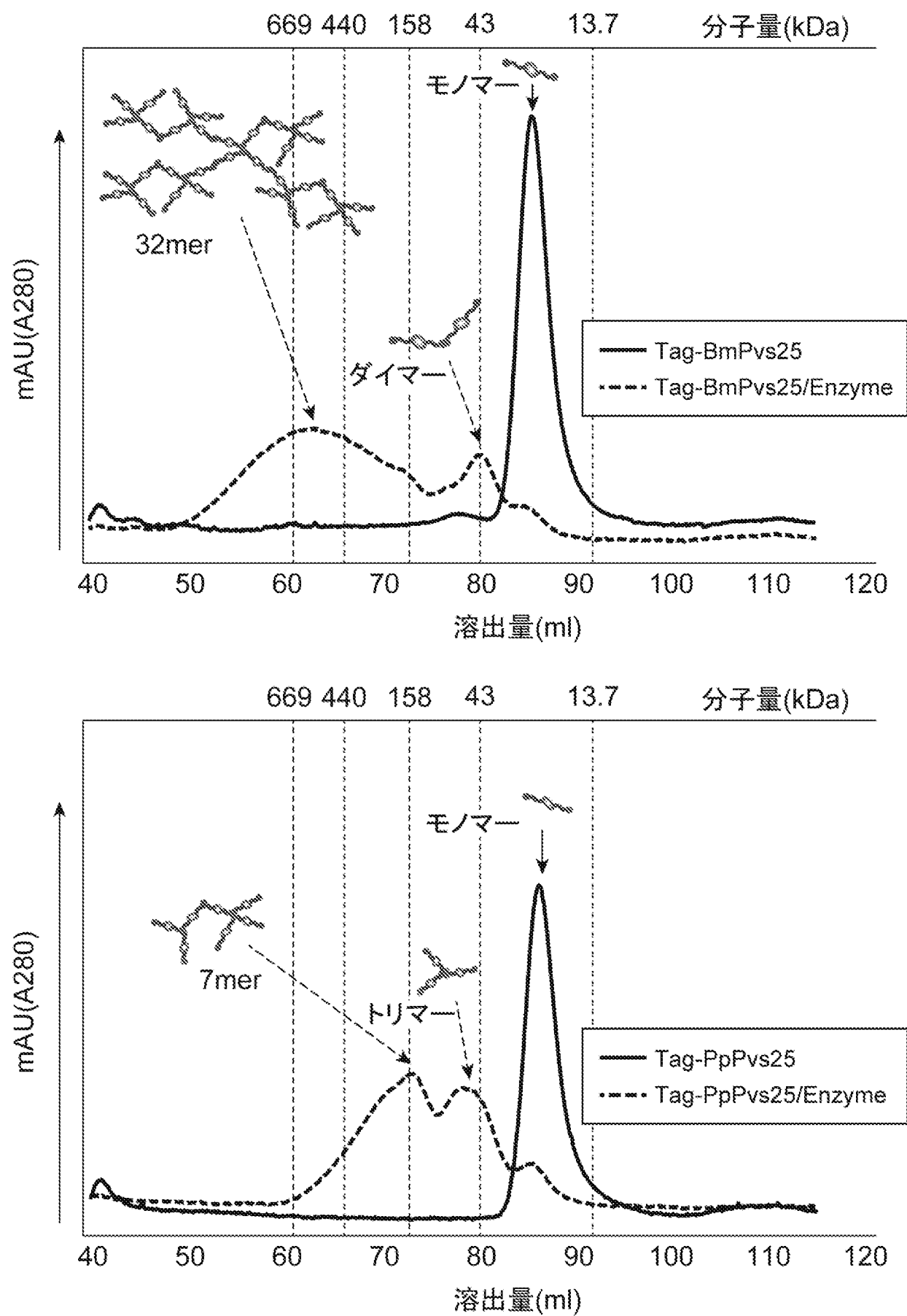
請求の範囲

- [請求項1] N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素と反応させて、重合化ポリペプチドを含む反応液を得る工程、
前記反応液を凍結処理する工程、及び
凍結処理した前記反応液を融解処理する工程
を含む、重合化ポリペプチドの集合体の製造方法であって、
前記重合化酵素が前記タグを認識するものである、方法。
- [請求項2] 前記ポリペプチドが、N末端側及びC末端側にタグを有するポリペプチドである、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記N末端側のタグ及びC末端側のタグがペプチドタグである、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記重合化酵素がフェノール酸化酵素を含み、
前記N末端側のタグ及びC末端側のタグがそれぞれ少なくとも一つのチロシン残基を含む、
請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記ポリペプチドが単量体である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記ポリペプチドが抗原又はその断片である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項に記載の方法により製造された重合化ポリペプチドの集合体。
- [請求項8] N末端側及びC末端側の少なくとも一方にタグを有するポリペプチドを重合化酵素により重合化させた重合化ポリペプチドを、凍結処理及び融解処理することで、重合化ポリペプチドを高分子量化させる方法であって、
前記重合化酵素が前記タグを認識するものである、方法。

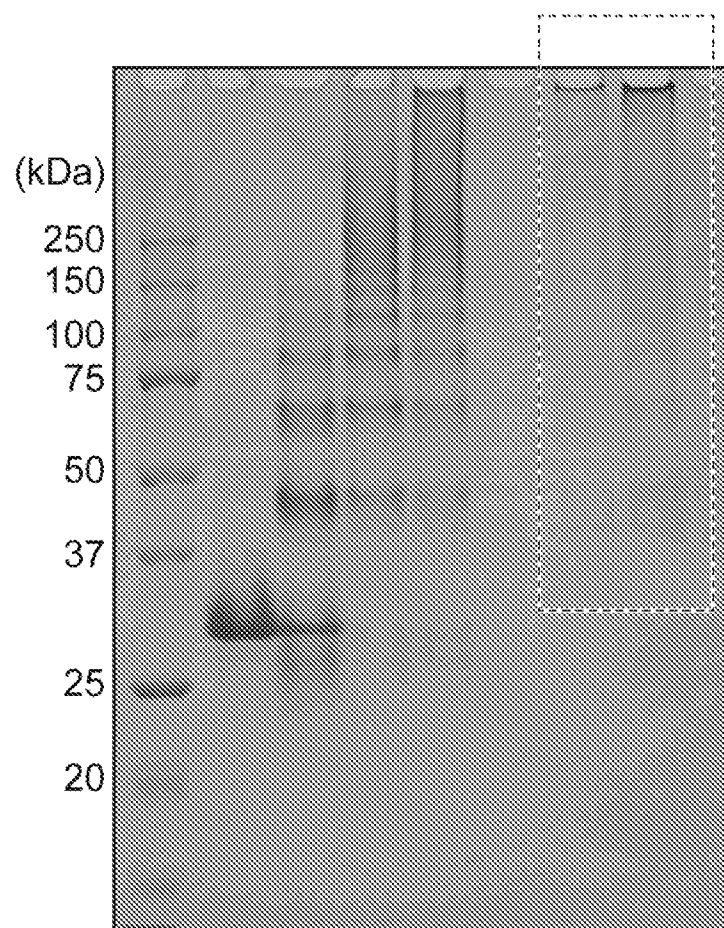
[図1]



[図2]



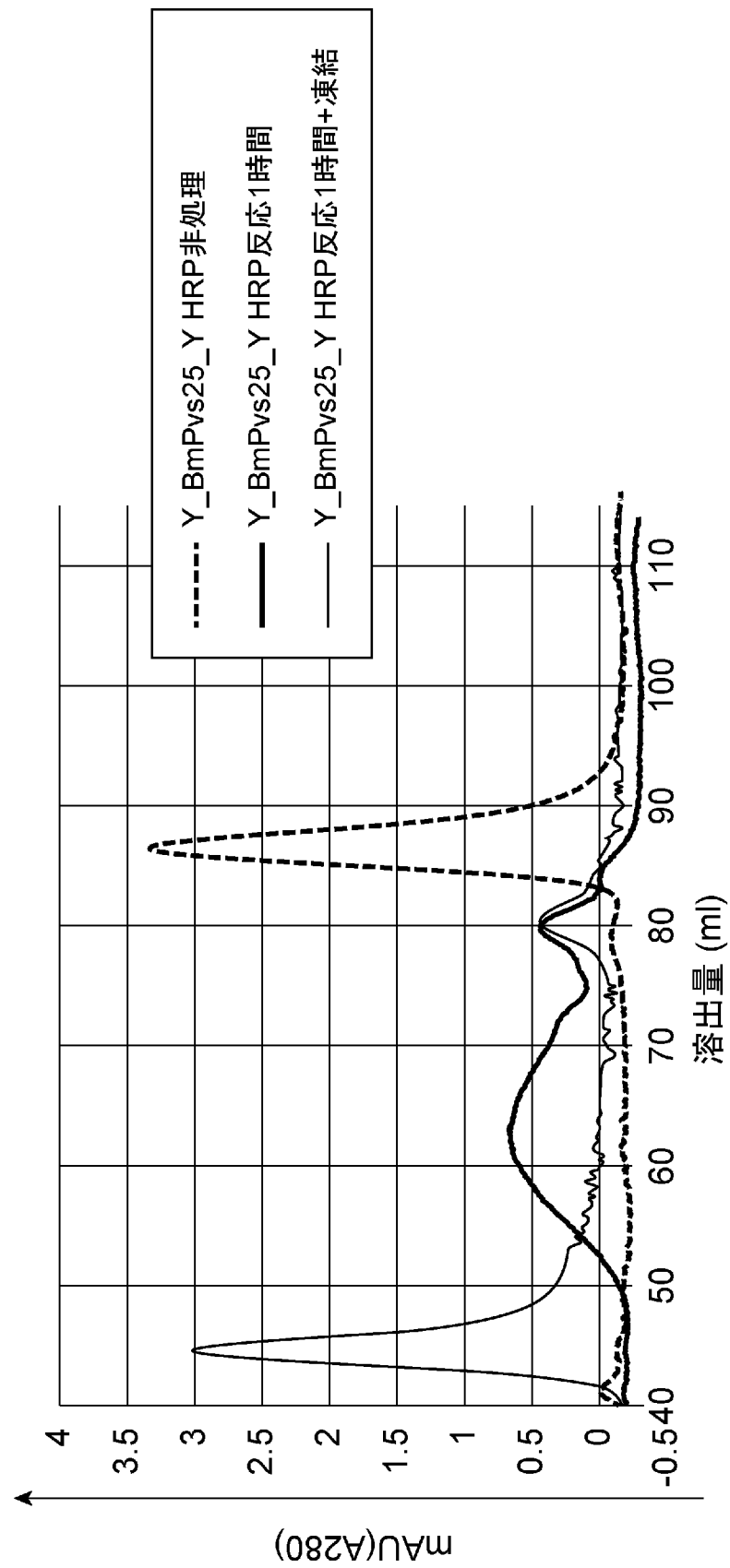
[図3]



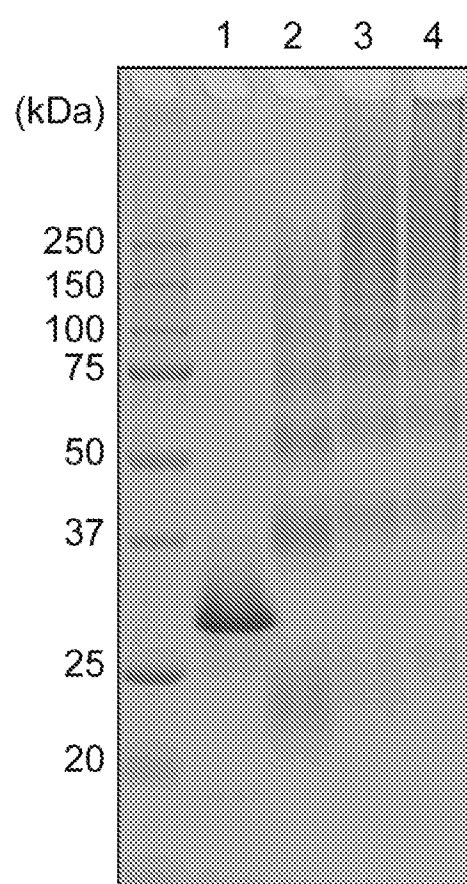
サンプル	1	2	3	4
Y_BmPvs25_Y[μ M]	30	30	30	30
HRP[μ M]	-	1	1	1
H ₂ O ₂ [μ M]	-	60	60	60
反応時間[h]	-	0	1	2

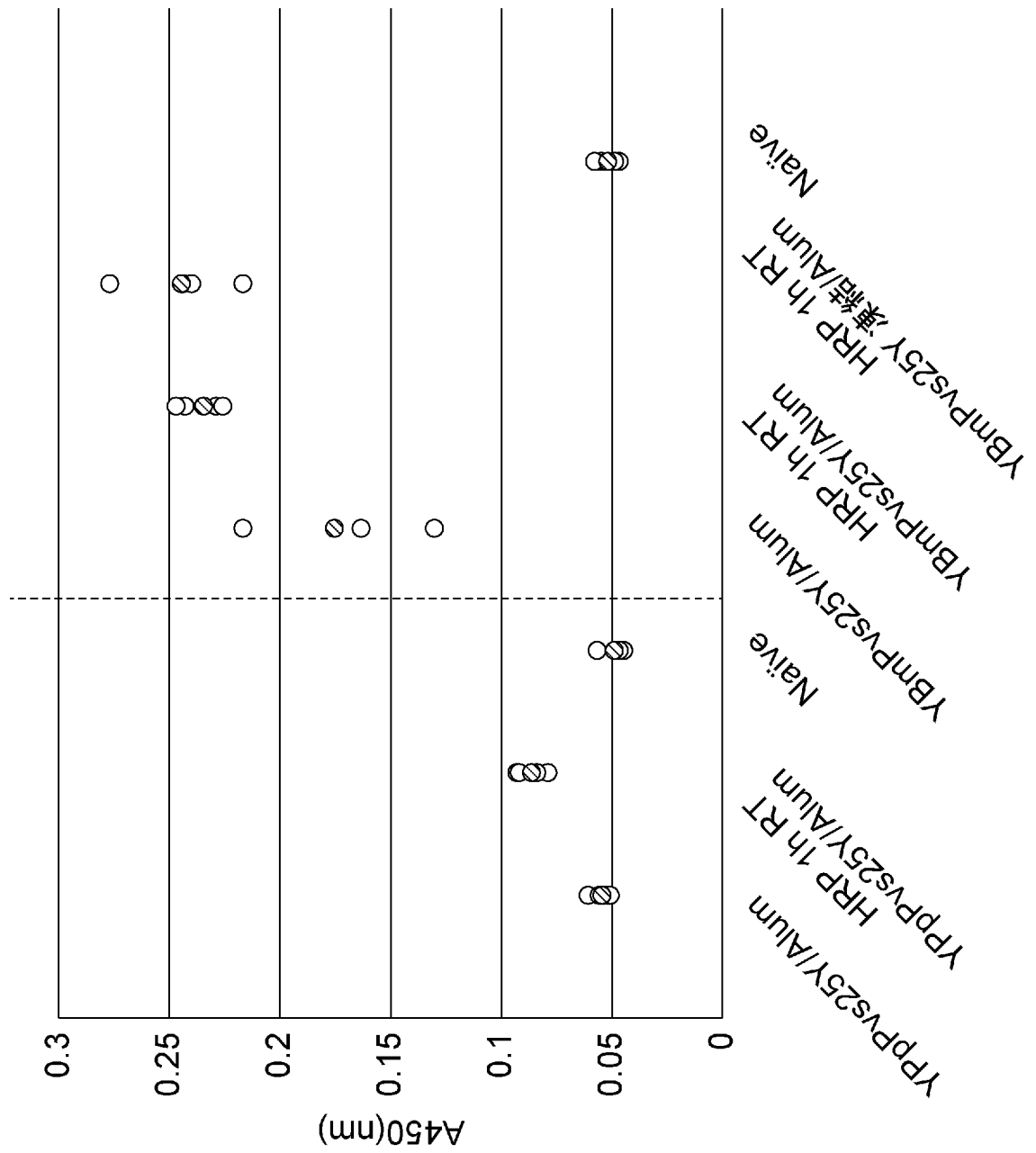
5	6
30	30
1	1
60	60
1	2

[図4]

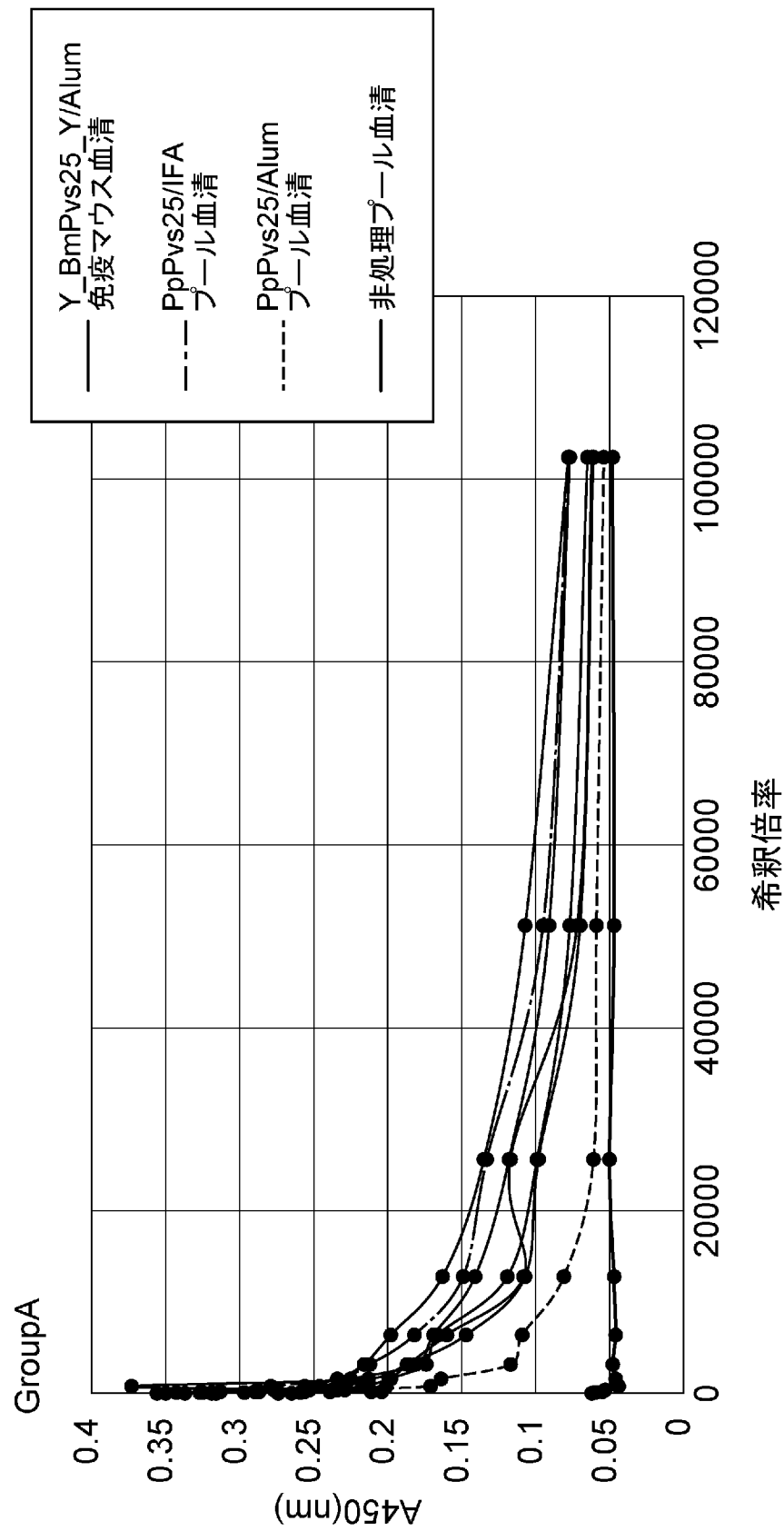


[図5]

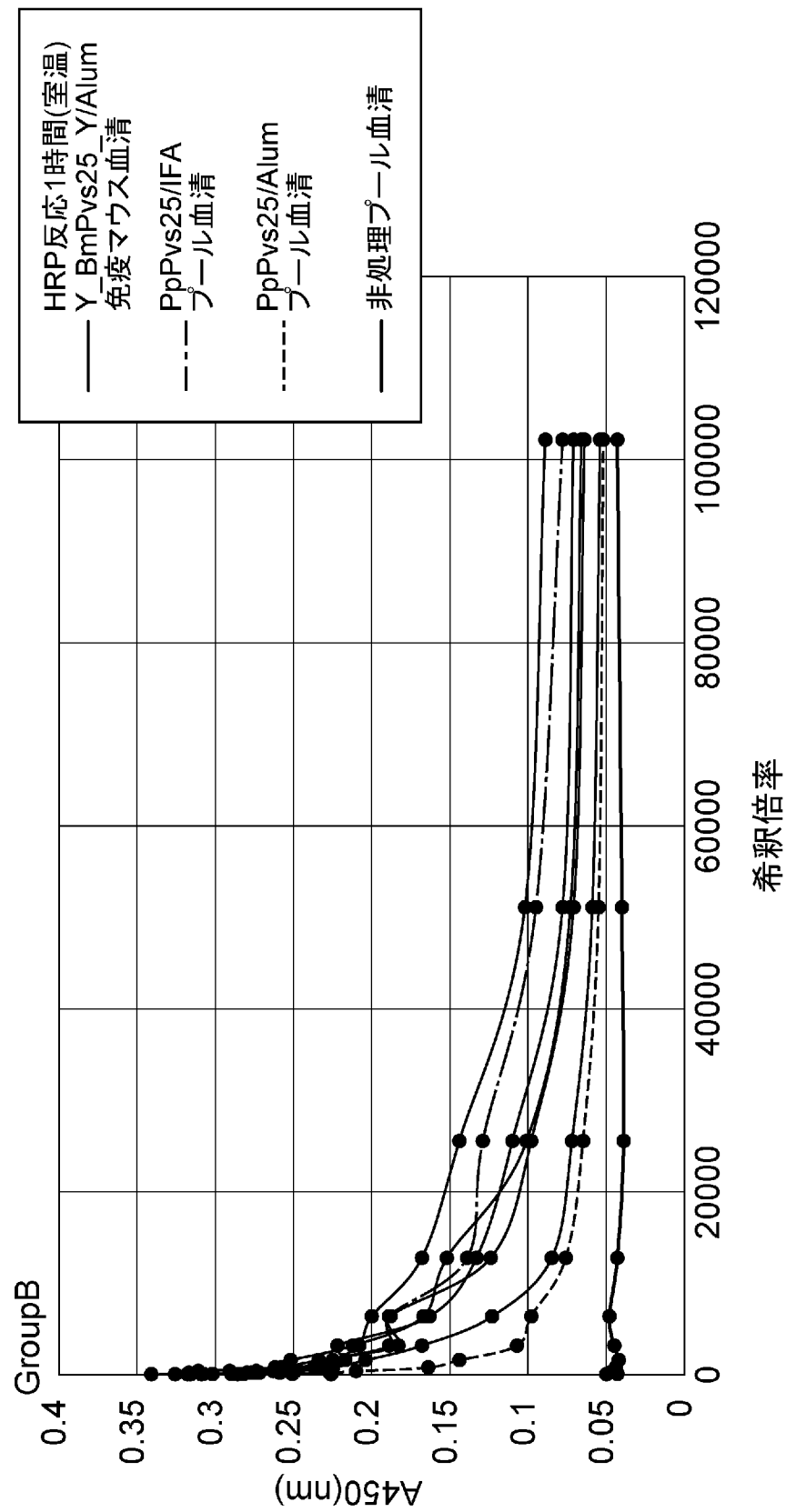




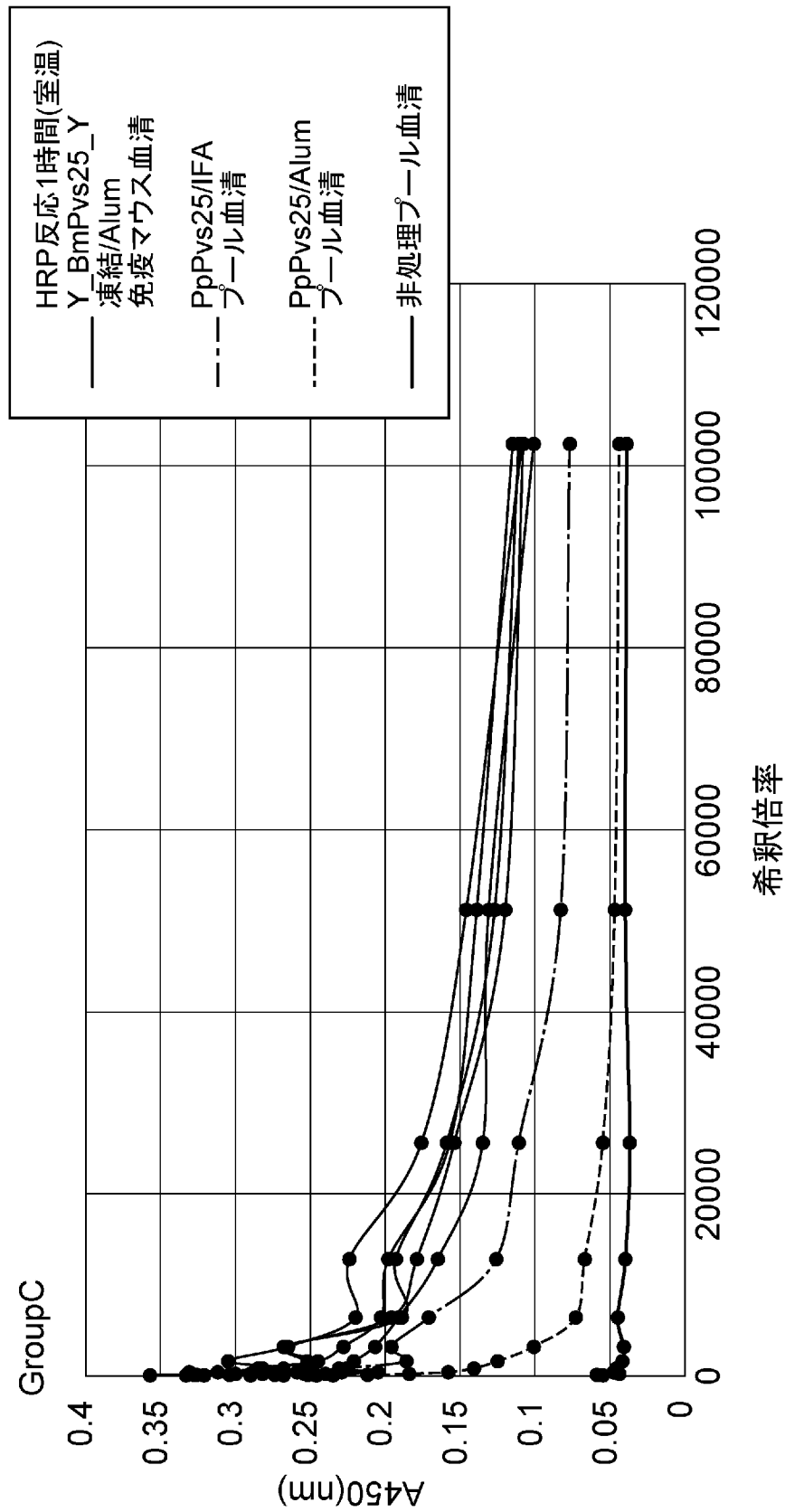
[図7]



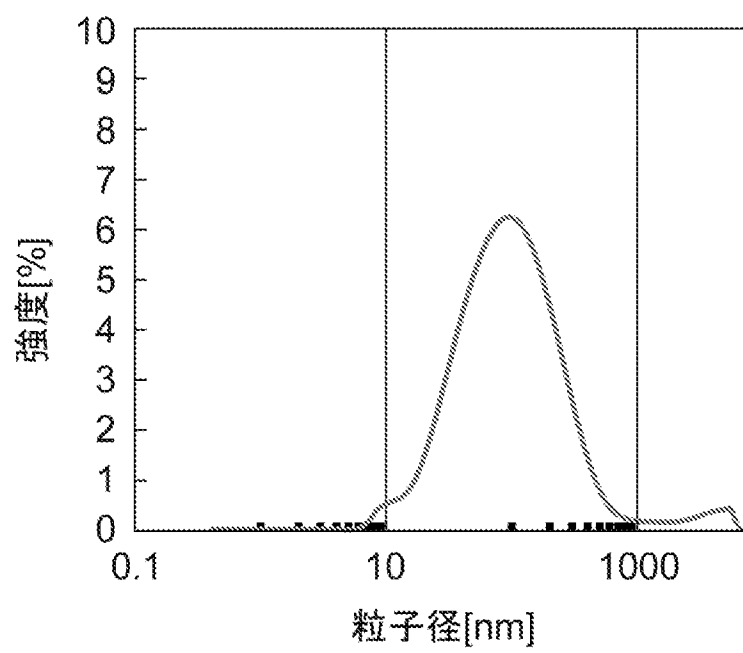
[図8]



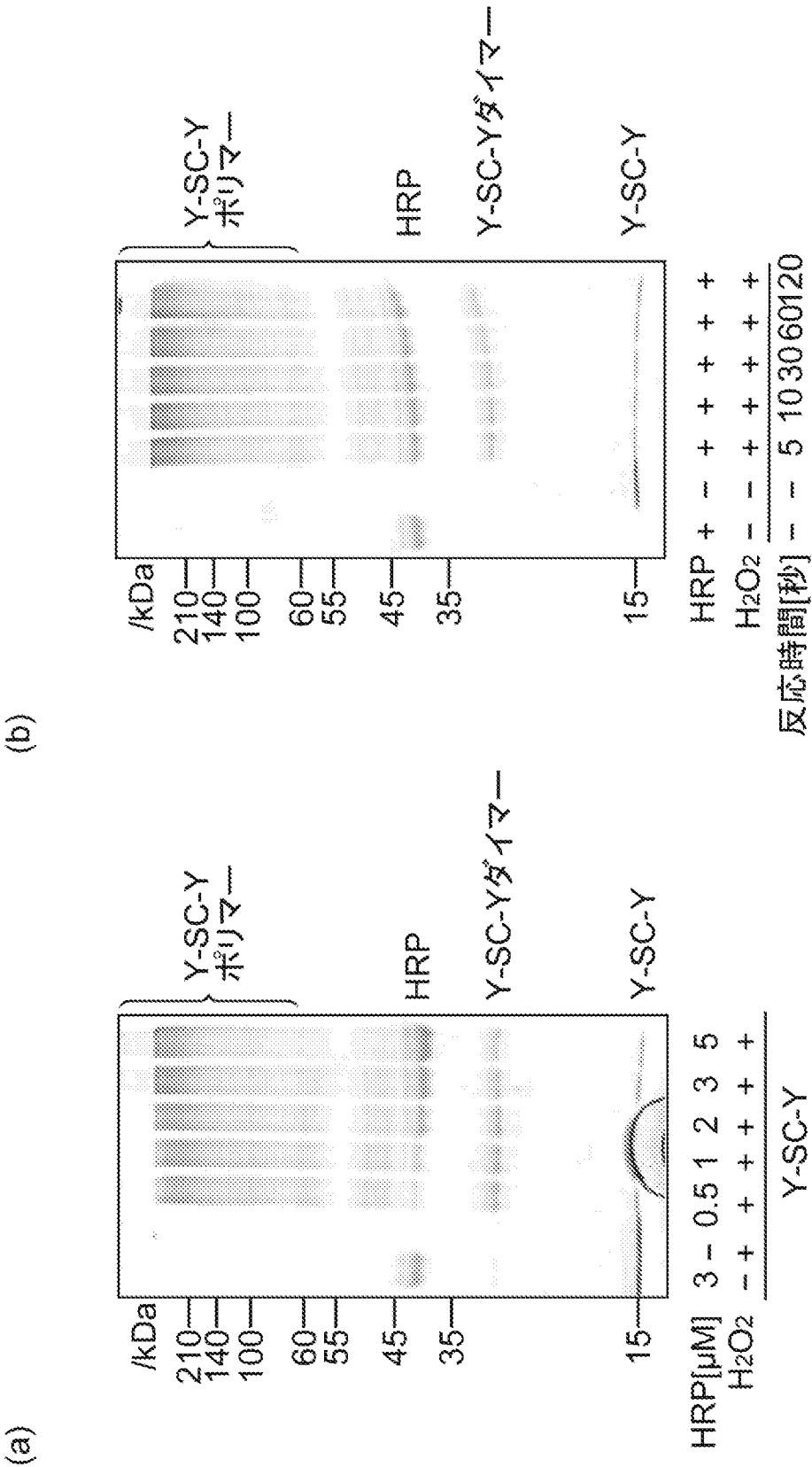
[図9]



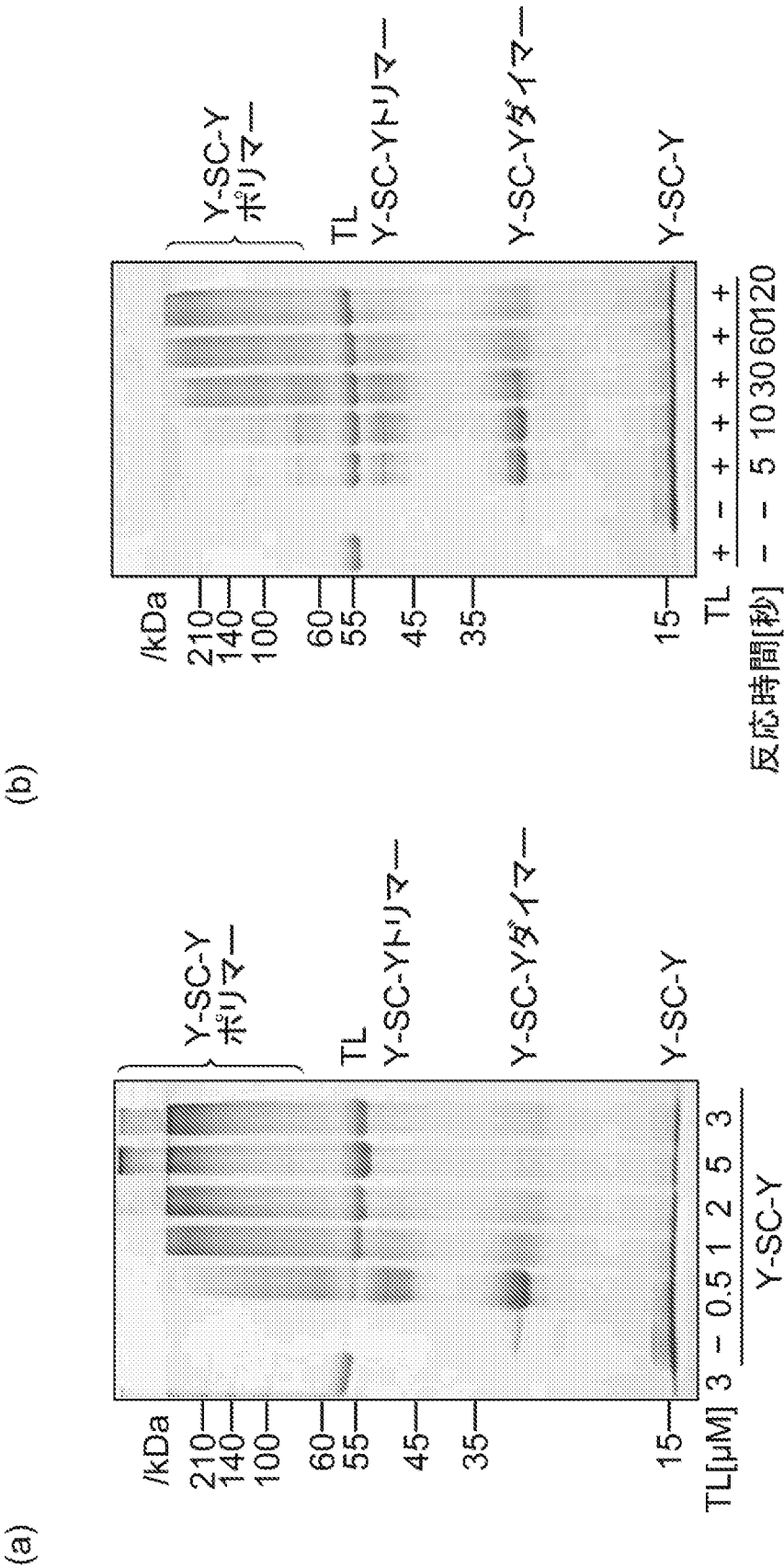
[図10]



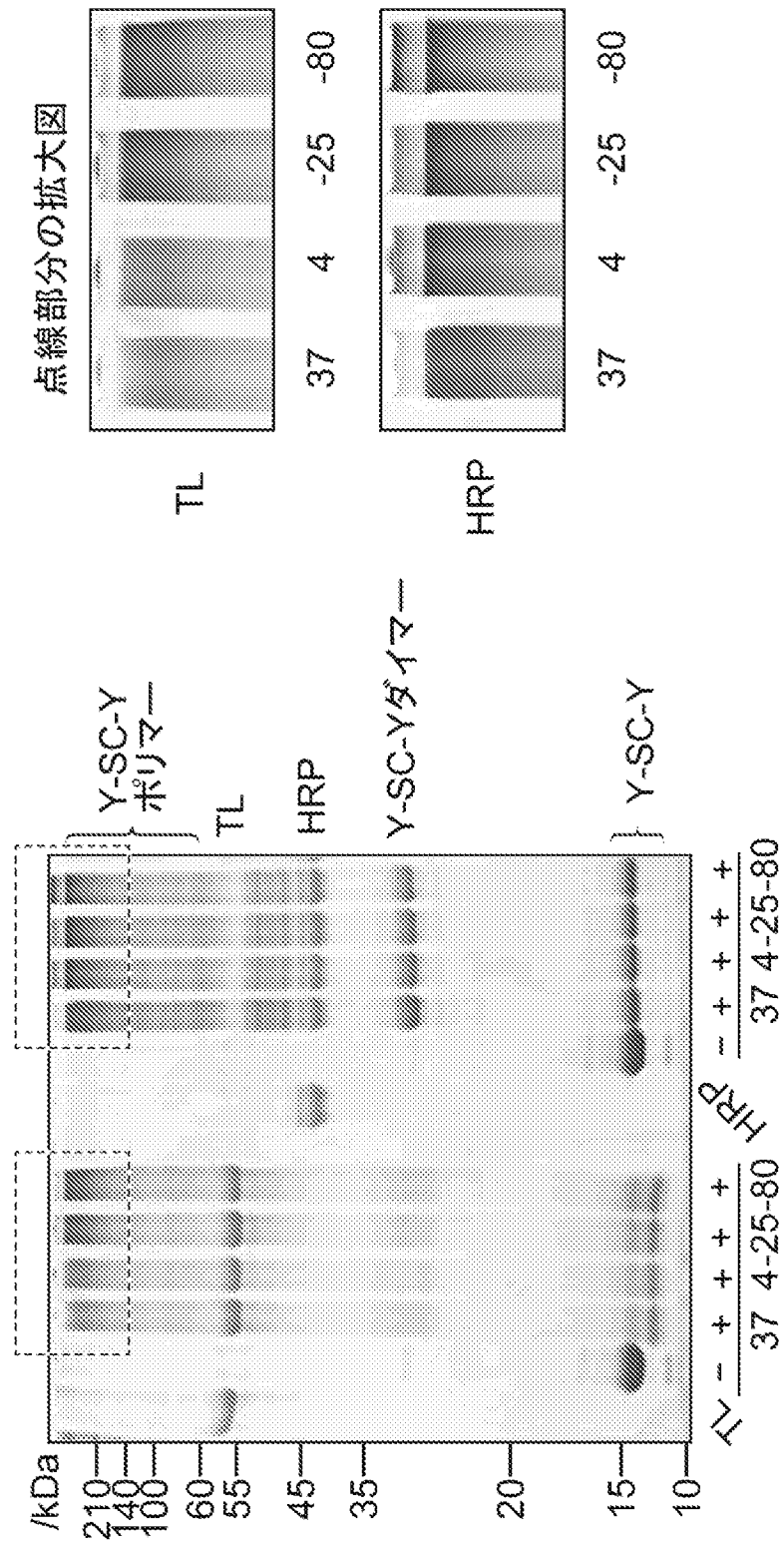
[図11]



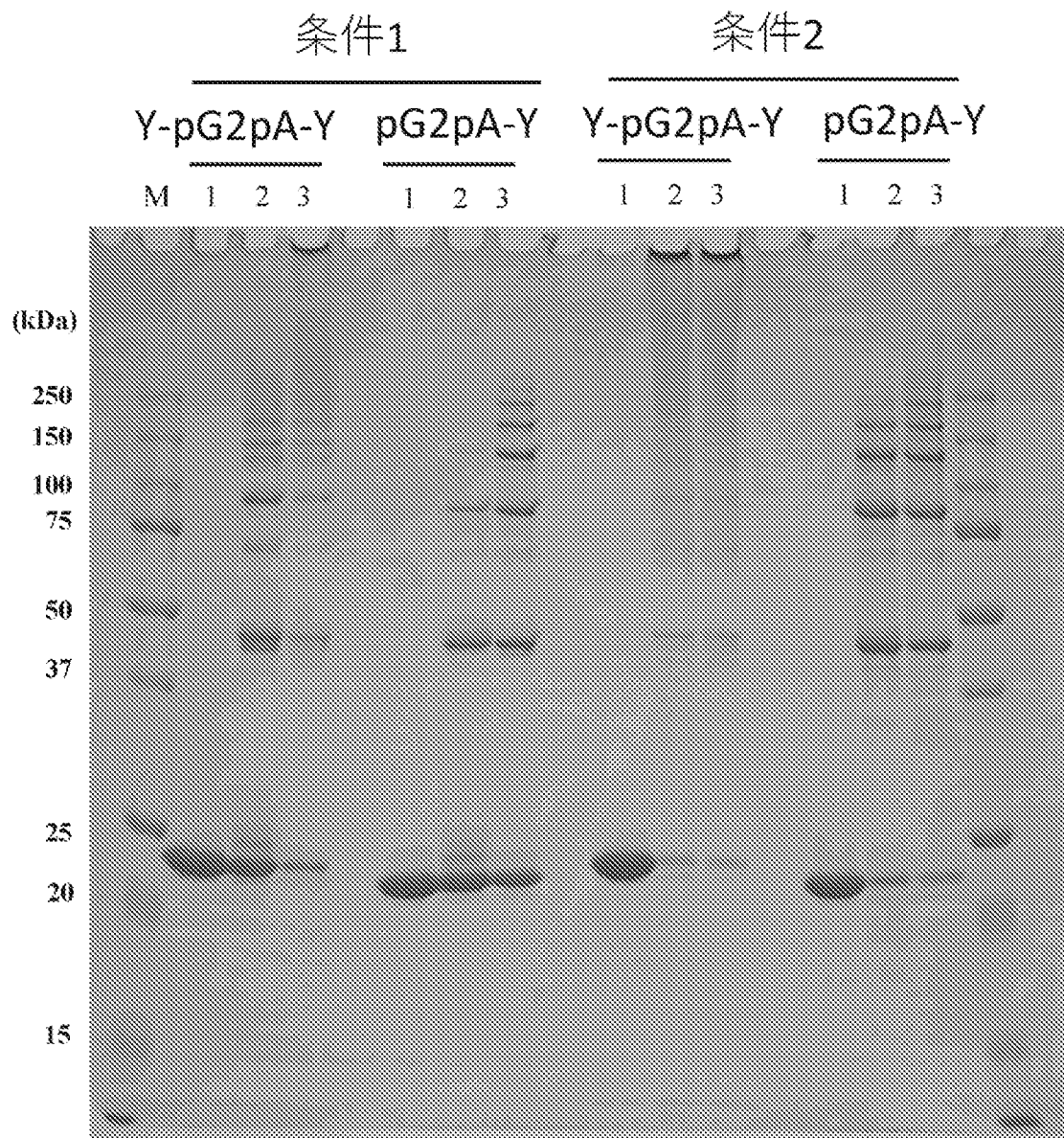
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/016297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/02 (2006.01) i; C07K 1/02 (2006.01) i; C07K 2/00 (2006.01) i; C12N 15/30 (2006.01) n

FI: C12P21/02 B ZNA; C07K1/02; C07K2/00; C12P21/02 C; C12N15/30

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)

C12P21/02; C07K1/02; C07K2/00; C12N15/30

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MINAMIHATA, K. et al., "Tyrosine Coupling Creates a Hyperbranched Multivalent Protein Polymer Using Horseradish Peroxidase via Bipolar Conjugation Points", Bioconjugate Chemistry, 2016, vol. 27, pp. 1348-1359, abstract, introduction, fig. 1, 2, etc.	1-8
Y	PERMANA, D. et al., "Polymerization of Horseradish Peroxidase by a Laccase -Catalyzed Tyrosine Coupling Reaction", Biotechnology Journal, 15 April 2019, vol. 14, 1800531, abstract, sections 1., 2.4, fig. 1, 2, etc.	1-8
Y	JP 2009-534401 A (NOVARTIS AG.) 24.09.2009 (2009-09-24) paragraph [0190]	1-8



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

26 June 2020 (26.06.2020)

Date of mailing of the international search report

07 July 2020 (07.07.2020)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/016297

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	新見伸吾, ヒト IgG 及びヒト化モノクローナル抗体製剤において様々なストレスにより誘導された凝集体の粒子径及び相対光散乱強度の動的光散乱による測定, 国立医薬品食品衛生研究所報告 Bull, Natl. Inst. Health Sci., 2011, vol. 129, pp. 55-60, page 58, left column, lines 6-14, page 58, left column, bottom paragraph to right column, line 3, (NIIMI, Shingo, "Determination of the particle size and relative light scattering intensity of aggregates of human IgG and humanized monoclonal antibody product induced by various stress using dynamic light scattering")	1-8
Y	BRUUN, T. U. J. et al., "Engineering a Rugged Nanoscaffold To Enhance Plug- and-Display Vaccination", ACS NANO, 2018, vol. 12, pp. 8855-8866, abstract, etc.	6
Y	ROSENBERG, A. S., "Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective", The AAPS Journal, 2006, vol. 8, no. 3, article 59, abstract, etc.	6
P, Y	PERMANA, D. et al., "Linear Polymerization of Protein by Sterically Controlled Enzymatic Cross-linking with a Tyrosine-Containing Peptide Loop", ACS Omega, 06 March 2020, vol. 5, pp. 5160-5169, abstract, etc.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/016297

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
---	---------------------	---------------	---------------------

JP 2009-534401 A

24 Sep. 2009

US 2009/0304706 A1

WO 2007/124299 A2

page 76, line 29 to

page 77, line 5

EP 2019841 A1

KR 10-2009-0009204 A

CN 101426817 A

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12P 21/02(2006.01)i; C07K 1/02(2006.01)i; C07K 2/00(2006.01)i; C12N 15/30(2006.01)n FI: C12P21/02 B ZNA; C07K1/02; C07K2/00; C12P21/02 C; C12N15/30		
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）） C12P21/02; C07K1/02; C07K2/00; C12N15/30		
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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
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	MINAMIHATA K. et al., Tyrosine Coupling Creates a Hyperbranched Multivalent Protein Polymer Using Horseradish Peroxidase via Bipolar Conjugation Points, Bioconjugate Chemistry, 2016, Vol.27, p.1348-1359 ABSTRACT, INTRODUCTION, Figure1, 2等	1-8
Y	PERMANA D. et al., Polymerization of Horseradish Peroxidase by a Laccase - Catalyzed Tyrosine Coupling Reaction, Biotechnology Journal, 2019,04.15, Vol.14, 1800531 ABSTRACT, 1.の項、2.4の項、Figure 1, 2等	1-8
Y	JP 2009-534401 A (ノバルティス アーゲー) 24.09.2009 (2009-09-24) 段落0190	1-8
Y	新見 伸吾, ヒトIgG 及びヒト化モノクローナル抗体製剤において様々なストレスにより誘導された凝集体の粒子径及び相対光散乱強度の動的散乱による測定, 国立医薬品食品衛生研究所報告 Bull, Natl. Inst. Health Sci., 2011, Vol.129, p.55-60 第58頁左欄第6-14行、第58頁左欄最下段-右欄第3行	1-8
Y	BRUUN T. U. J. et al., Engineering a Rugged Nanoscaffold To Enhance Plug-and-Display Vaccination, ACS NANO, 2018, Vol.12, p.8855-8866 ABSTRACT等	6
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ 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、一般的な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の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抵触するものではなく、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 26.06.2020		国際調査報告の発送日 07.07.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 北村 悠美子 4B 4501 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	ROSENBERG A. S., Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective, The AAPS Journal, 2006, Vol.8, No.3, Article 59 ABSTRACT等	6
P, Y	PERMANA D. et al., Linear Polymerization of Protein by Sterically Controlled Enzymatic Cross-Linking with a Tyrosine-Containing Peptide Loop, ACS Omega, 2020.03.06, Vol.5, p.5160-5169 ABSTRACT等	1-8

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/016297

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2009-534401	A	24.09.2009	US	2009/0304706	A1	
				WO	2007/124299	A2	
				第76頁第29行-第77頁第5行			
				EP	2019841	A1	
				KR	10-2009-0009204	A	
				CN	101426817	A	