

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2001 - 333788

(P2001 - 333788A)

(43)公開日 平成13年12月4日 (2001.12.4)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	ZNA		A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/12			A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 31/20			C 0 7 K 14/025	
C 0 7 K 14/025			C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15			C 1 2 P 21/02	C

審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 20数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 101791(P2001 - 101791)
(62)分割の表示 特願平6 - 507481の分割
(22)出願日 平成5年9月3日(1993.9.3)

(31)優先権主張番号 07/941,371
(32)優先日 平成4年9月3日(1992.9.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 08/032,869
(32)優先日 平成5年3月16日(1993.3.16)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 501129088
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国 20852 メリーランド州,
ロックビル,エグゼクティブ プールバー
ド 6011 ボックス 13 ナショナル イ
ンスティテューツ オブ ヘルス オフィ
ス オブ テクノロジー トランスファー
(72)発明者
ロウィー、ダグラス アール .
アメリカ合衆国 20007 ワシントン、ディ
ーシー、ノース ウェスト、ガーフィール
ド ストリート 3414
(74)代理人 100099793
弁理士 川北 喜十郎

最終頁に続く

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

(57)【要約】

【課題】キャプソメア構造の自己組み立てにより天然の
パピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する
立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細
胞内での発現を指示することを特徴とする、野生型ヒト
パピローマウイルス16型(HPV16)L1立体配座コ
ード配列を含む遺伝子構成物を提供すること。

【解決手段】組換えベクター内のパピローマウイルスL
1キャプシッドタンパク質をコードする野生型ヒトパピ
ローマウイルス16型(HPV16)L1立体配座コード
配列を含む遺伝子構成物であって、前記構成物が、前記
パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質を含む
キャプソメア構造の自己組み立てにより天然のパピロー
マウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座
エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での
発現を指示することを特徴とする、パピローマウイルス
L1キャプシッドタンパク質をコードする野生型ヒトパ
ピローマウイルス16型(HPV16)L1立体配座コ
ード配列を含む遺伝子構成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 組換えベクター内のパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質をコードする野生型ヒトパピローマウイルス16型(HPV16)L1立体配座コード配列を含む遺伝子構成物であって、前記構成物が、前記パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造の自己組み立てにより天然のパピローマウイルスに対する高力価中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の宿主細胞内での発現を指示することを特徴とする、パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質をコードする野生型ヒトパピローマウイルス16型(HPV16)L1立体配座コード配列を含む遺伝子構成物。

【請求項2】 前記の配列が、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列をコードする、請求項1に記載の構成物。

【請求項3】 前記の配列が、SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列をコードする、請求項2に記載の構成物。

【請求項4】 前記の組換えベクターが、昆虫用ベクターであり且つ宿主細胞が昆虫細胞である、請求項1～3の何れかに記載の構成物。

【請求項5】 前記の昆虫用ベクターが、バキュロウイルスベクターである、請求項4に記載の構成物。

【請求項6】 前記のバキュロウイルスベクターが、昆虫宿主細胞の、組換えバキュロウイルスDNAと野生型バキュロウイルスDNAの同時トランスフェクションにより形成される、請求項5に記載の構成物。

【請求項7】 前記の組換えベクターが、酵母細胞用ベクターであり且つ前記の宿主が酵母宿主細胞である、請求項1～3の何れかに記載の構成物。

【請求項8】 前記のキャプソメア構造が、パピローマウイルスL2キャプシッドタンパク質の同時発現を必要としない、請求項1～7の何れかに記載の構成物。

【請求項9】 前記のキャプソメア構造が、更に、パピローマウイルスL2キャプシッドタンパク質を含む、請求項1～7の何れかに記載の構成物。

【請求項10】 前記の配列が、前記のパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質と前記のパピローマウイルスL2キャプシッドタンパク質とを二重にコードする、請求項9に記載の構成物。

【請求項11】 請求項1～10の何れかに記載の遺伝子構成物を含む宿主細胞。

【請求項12】 天然のパピローマウイルスに対する中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造の製造方法であって、該キャプソメア構造の発現を指示する請求項1～10の何れかに記載の遺伝子構成物のための条件を準備することを含む当該製造方法。

【請求項13】 前記のキャプソメア構造を単離するステップを更に含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 請求項1～10の何れかに記載の遺伝子構成物の指示の下に発現された天然のパピローマウイルス

*ルスに対する中和抗体を誘導する立体配座エピトープを有するキャプソメア構造。

【請求項15】 パピローマウイルス感染の予防又は治療における利用のための、請求項14に記載のキャプソメア構造。

【請求項16】 疫化投与スケジュールに従って投与した場合に少なくとも約 10^3 の力価のパピローマウイルス中和抗体を誘導するのに十分な有効な免疫原濃度の請求項14に記載のキャプソメア構造を含む単位投与量のワクチン。

【請求項17】 患者におけるパピローマウイルス感染に対する液性免疫を検出する方法であって、下記を含む当該方法：

(a) 請求項14に記載のキャプソメア構造の有効な抗体検出量を用意し；

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

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

【請求項18】 パピローマウイルス感染の疑いのある患者からの試料において該ウイルスを検出する方法であって、下記を含む当該方法：

(a) 有効なパピローマウイルス検出量の請求項14に記載のキャプソメア構造に対して高めた抗体を用意し；

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

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

【請求項19】 患者におけるパピローマウイルス感染を検出するための、即座に使えるようにパッケージされた診断用キットであって、第1のコンパートメントに有効な抗体検出量の請求項14に記載のキャプソメア構造を含み且つ第2のコンパートメントに該キャプソメア構造と患者から得られた試料中のパピローマウイルス抗体との結合を検出する材料を含む当該キット。

【請求項20】 患者におけるパピローマウイルス感染を検出するための、即座に使えるようにパッケージされた診断用キットであって、第1のコンパートメントに有効なパピローマウイルス検出量の請求項14に記載のキャプソメア構造に対して高めた抗体を含み且つ第2のコンパートメントに該抗体と患者から得られた試料中のパピローマウイルスとの結合を検出する材料を含む当該キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】技術分野

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

使用に適した組換えウイルスタンパク質に関する。

【0002】背景技術

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

【0003】ヒトでは、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる性器疣贅は性的に伝播する疾病である。性器疣贅はごく普通に起こり、無症状すなわち不顕性のHPV感染は臨床感染よりもさらに一般的に見られるものである。ヒトにおける良性病変、特にある特定のパピローマウイルス型から生じる良性病変は、進行して悪性になる。このため、悪性腫瘍関連パピローマウイルス型の1つによる感染は、世界的に見て女性で2番目に多いガンである子宮頸部ガンの発達における最も危険な要因であると考えられている(zur Hausen, H., 1991; Schiffman, M., 1992)。子宮頸部ガンでは何種類かのHPV遺伝子型が発見されたが、HPV16は子宮頸部ガンの50%から単離される最も一般的な型である。

【0004】パピローマ抗原に対する中和抗体の産生についての免疫学的研究から、脊椎動物ではパピローマウイルス感染およびこれらの感染に関連した悪性腫瘍は、免疫処置によって防止可能であるということが分かっている。しかしながら、効果的なパピローマウイルスワクチンの開発はさまざまな困難さが原因で滞っている。

【0005】まず、効果的なワクチンの開発には必須であるパピローマウイルスの構造および免疫遺伝学的特徴を特定するために必要な感染性ウイルスの多量のストックをin vivoで生成するのは不可能であった。培養細胞はパピローマウイルスオンコタンパク質およびその他の非構造的タンパク質を発現するが、これらの細胞はin vitroにおいて熱心に研究されてきた。しかしながら、構造的ウイルス蛋白質L1およびL2(および感染性ウイルスの次のアセンブリ)は、感染した上皮組織の最終的に分化した層においてのみ発生する。従って、ウイルス遺伝子、タンパク質および構造の特徴は、必然的に乳頭腫から採集したウイルスについての研究から集められた

ものであった。特に、パピローマウイルス構造およびこれに関連した免疫性についてはウシパピローマウイルス系において研究されていた。なぜなら、このウシパピローマウイルス(BPV)いぼ状組織からであれば多量の感染性ウイルス粒子を単離することができるからである。

【0006】今日までのパピローマウイルス構造についての研究によって得られた情報から、パピローマウイルスは、全て、保存されたL1主要キャプシドタンパク質およびこれよりは保存されないL2副次的キャプシドタンパク質からなる(Baker, C., 1987)非エンベローブ状態の50~60nmのicosahedral構造であることが分かる(Crawford, L., et al., 1963)。これら2つのタンパク質の配列は互いに全く関連がない。キャプシドにおけるL2の機能および位置は明らかになっていない。しかしながら、免疫学的データからL2のほとんどはL1に対して内在的であるのではないかと思われる。

【0007】近年、BPV1およびHPV1ビリオンについての高解像度低温、電子顕微鏡解析によって、これら2つのウイルスは、72個の五放射キャプソメアを持つ極めてよく似た構造を有し、おそらくそれぞれのキャプソメアがT=7対称性のビリオン外被を形成する5個のL1分子から構成されていることが分かってきた(Baker, T., 1991)。副次的L2キャプシドタンパク質のビリオンにおける位置はまだ特定されておらず、L2やその他のウイルスタンパク質がキャプシドアセンブリに必要なか否かもはっきりしていない。外面的に、パピローマウイルス構造は対称性およびキャプソメア数が同一である、ポリオーマ45nmビリオンの構造に似ている(Liddington, R., et al., 1991)。しかしながら、ポリオーマウイルスとパピローマウイルス種のキャプソメア内部の接触のシステムは異なっており、ポリオーマウイルスの主要および副次的のキャプシドタンパク質は遺伝的にL1およびL2に関連していない。

【0008】ウシパピローマウイルスについての研究は、BPV用に開発された、定量的な病巣形質転換感染アッセイによって促進されているが、HPVには利用できない(Dvoretzky, I., et al., 1980)。従って、パピローマウイルスに対する免疫についての理解は、ウシパピローマウイルス系に基づいて導き出されていた。そのままのウシパピローマウイルスを使用するの限られた研究から、分娩時の上皮BPV感染を防止するワクチンとして感染性あるいはホルマリン不活性化したBPVウイルスを非皮膚接種するのが効果的であることが分かった(Olson, C., et al., 1960; Jarrett, W., et al., 1990)。残念なことに、他の種に感染するパピローマウイルスに対するワクチンの開発にも、他の種

類のウシに対するワクチンの開発にでさえも、BPVピリオンを使用することはできない。なぜなら、これらのウイルスは極めて特異性が高くそのままのウイルス粒子の発癌可能性に関連しているためである。

【0009】これらパピローマウイルス免疫性についての研究の有意な結論は、乳頭種ウイルスを中性化する抗体の能力が、型特異的な立体配座に関してピリオン表面に依存するエピトープに対する反応能力に関連しているようである。例えば、感染性BPV1ピリオンに対して高められたウサギ抗血清は、C127細胞の病巣形質転換(Doretzky, I., et al., 1980)およびウシ胎児皮膚移植片の形質転換を抑制するが、変性ピリオンに対して高められた抗血清は抑制しない(Ghim, S., et al., 1991)。

【0010】これとは対照的に、細菌的に誘導したBPV L1およびL2と(Pilacinski, W., et al., 1984; Jin, X., et al., 1989) in vivoで合成されたワタオウサギパピローマウイルス(CRPV) L1およびL2(Christensen, N., et al., 1991; Lin Y. L. et al., 1992)とに対して中和血清が生成されたが、これらの血清はいずれも天然のピリオンの構造的な特徴は有しておらず、力価は小さく、細胞性免疫反応性を検出するためにE. coliにおいて発現された組み換えHPV L1融合ペプチドを使用して成功する例は極めて限られていた(Hopfl, R., et al., 1991)。BPV系において得られた結果とHPV系において得られた結果とは一貫している。これらの結果において、マウス異種移植アッセイにおいてHPV11感染を中和する単一クローン性の抗体は変性されたHPV11ピリオンではなく天然のHPV11ピリオンであると認識された(Christensen, N., et al., 1990)。

【0011】パピローマウイルスキャプシッドはin vitroで産生するために単離されている。Zhou, J., et al (1991)および(1992)は、HPV L1およびL2遺伝子と、HPV E3/E4遺伝子を組み合わせたHPV L1およびL2遺伝子とをワクシニアウイルスベクターにクローニングし、この組み換えワクシニアウイルスでCV-1哺乳類細胞を感染することによってウイルス様の粒子(virus-like particle)を産生した。これらの研究はZhouによって解釈され、上皮細胞におけるHPV16のL1およびL2タンパク質の発現はピリオン型の粒子の組立てを可能にするために必要で十分なものであるということが確立された。L1およびL2タンパク質を発現する二重組み換えワクシニアウイルスを感染させた細胞では、HPVキャプソメアの不完全に組み立てられたアレイであると思われる核中に小さな(40nm)ウイルスの粒子認められた。L1タンパク質のみあるいはL2タンパク質のみを

発現させても、ウイルス様粒子は産生されなかった。また、L1およびL2遺伝子を含む単一組み換えワクシニアウイルスを二重に感染させた細胞でも粒子を産生させることはできなかった。中和活性は全く報告されなかった。

【0012】Ghim et al. (1992)は、HPV1からL1すなわち主に手足のいぼ状組織に関連した非生殖器型ウイルスが哺乳類細胞において発現すると、L1タンパク質はそのままのピリオンに認められる立体配座エピトープを含有していたと報告した。Ghimは、粒子が産生されるか否かは特定しておらず、L1タンパク質が中和抗体を誘導できるか否かについても評価していなかった。もっと最近になって、Hagans et al. (1993)は、ヒト細胞においてHPV1からL1が発現されると、L1は自己組み立てられてウイルス様の粒子になると報告した。中和抗体についての研究は行われなかった。

【0013】例えばパルボウイルスなどの他のウイルス系における研究から、キャプシッドアセンブリだけでは免疫原性を持たせることはできないだろうということが分かる。パルボウイルスVP2は、昆虫細胞において発現させるとそれ自体で自己組み立てされるが、VP1およびVP2の両方を含有する粒子のみが中和抗体を誘導できた(Kajigaya, S., et al., 1991)。

【0014】細胞培養において選択した種および型の更新可能なパピローマウイルス試薬を産生するための方法を開発することには利点がある。また、サブユニットワクチンとして利用可能な立体配座天然ウイルス粒子の特性を付与する免疫を有するこのようなパピローマウイルス試薬を産生することにも利点がある。

【0015】従って、本発明の目的は、このような組み換え立体配座パピローマウイルスタンパク質と、その産生および使用方法を提供することにある。

【0016】発明の開示

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

化配列は、配列番号：2である。遺伝子構成物は、さらにパピローマウイルスL2コード化配列を有することができる。

【0017】本発明の他の態様によれば、本発明による遺伝子構成物によって形質転換された非哺乳類真核性宿主細胞が得られる。

【0018】本発明の他の態様によれば、キャプソメア構造またはその一部に組み立てられる、組み換えパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を産生するための方法であって、(1)L1立体配座キャプシッドタンパク質を転移ベクターにコード化するパピローマウイルス遺伝子をクローニングするステップであって、前記遺伝子のオープンリーディングフレームは前記ベクターの制御下にある前記ステップと、(2)組み換えベクターを宿主細胞に転移するステップであって、クローン化したパピローマウイルス遺伝子はパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を発現する前記ステップと、(3)宿主細胞からパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を含有するキャプソメア構造を単離するステップと、を含む方法が得られる。好ましい実施態様において、クローン化したパピローマウイルス遺伝子は本質的に立体配座L1コード化配列からなり、発現タンパク質は組み立てられて本質的にL1キャプシッドタンパク質からなるキャプソメア構造になる。他の好ましい実施態様において、上述した方法のクローニングするステップは、L2キャプシッドタンパク質をコード化するパピローマウイルス遺伝子をクローニングすることをさらに含み、それによって前記L1およびL2タンパク質を同時に宿主細胞に発現させる、前記宿主細胞が哺乳類細胞である時に前記転移ベクターはワクシニアウイルスではないという条件で、単離されたキャプソメア構造はL1およびL2キャプシッドタンパク質を有する。立体配座L1コード化配列は、ウシ、サル、ヒトパピローマウイルスからクローニングすることができる。好ましい実施態様によれば、立体配座L1コード化配列は野生型HPV16パピローマウイルスからクローニングされる。特に好ましい実施態様において、立体配座L1コード化配列は配列番号：2である。また、好ましい実施態様において、転移ベクターはパキウイルスに基づく形質転換ベクターであり、パピローマウイルス遺伝子は昆虫細胞において活性であるプロモーターの制御下にある。従って、この実施態様では、組み換えパキウイルスDNAはSf-9昆虫細胞にトランスフェクションされる。

【0019】本発明による方法の別の実施態様において、形質転換ベクターは酵母の転移ベクターであり、組み換えベクターは酵母細胞にトランスフェクションされる。

【0020】本発明のさらに他の態様によれば、本発明の方法によって産生される、本質的にパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質からなるウイルスキャプ

ソメア構造またはその蛋白質が得られる。また、ウイルスキャプソメア構造は本発明の方法により生成される本質的にパピローマウイルスL1およびL2キャプシッドタンパク質からなるものであってもよい。特に好ましい実施態様において、ウイルスキャプソメア構造は、野生型ウイルスからクローニングされたHPV16L1DNAの発現産生物であるパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質を含む。

【0021】本発明によるこのウイルスキャプシッドまたはキャプソメア構造若しくはその一部あるいは断片は、本質的にパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質からなるものであってもよい。一方、これらのキャプシッドまたはキャプソメア構造若しくはその断片は、本質的に野生型HPV16パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質からなるものであってもよい。

【0022】上述した本発明のいずれかの方法によるウイルスキャプシッド構造は、未変性(天然の)パピローマウイルスに対する中和抗体を誘導可能な免疫原立体配座エピトープを有するキャプシッドタンパク質を含む。キャプシッドタンパク質は、ウシ、サル、ヒトのパピローマウイルスL1タンパク質であることができる。好ましい実施態様において、パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質は、野生型HPV16遺伝子の発現産生物である。特に好ましい実施態様において、HPV16遺伝子は配列番号：2の配列を含む。

【0023】本発明のさらに他の態様によれば、免疫治療スケジュールに沿って投与した場合に少なくとも約10³のパピローマウイルス中和抗体力価を誘導できるだけの効果的な免疫原濃度において、パピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質またはL1タンパク質およびL2キャプシッドタンパク質の立体配座エピトープを有するペプチドを含む単回量のワクチンが得られる。好ましい実施態様において、ワクチンはHPV16キャプシッドタンパク質であるL1キャプシッドタンパク質を含む。特に好ましい実施態様において、このワクチンは野生型HPV16タンパク質のL1キャプシッドタンパク質を含む。

【0024】本発明の方法によれば、野生型HPV16パピローマウイルスゲノムからのL1オープンリーディングフレーム(ORF)を使用することで、ワクチンの使用に適したスケールでの調製量のウイルス様粒子の産生を特に促進できる。

【0025】本発明のさらに他の態様によれば、脊椎動物におけるパピローマウイルス感染を防止または治療するための方法であって、本発明によるパピローマウイルスキャプソメア構造またはその断片を、免疫生成管理に基づいて脊椎動物に投与するステップを含む方法が得られる。好ましい実施態様において、パピローマウイルスキャプソメア構造は野生型HPV16L1キャプシッドタンパク質を含む。

【0026】本発明によれば、さらに、脊椎動物においてパピローマウイルス感染を防止または治療するための方法であって、本発明によるパピローマウイルスキャプソメア構造すなわちキャプソメア構造を含むワクチン産生物を、免疫生成管理に基づいて脊椎動物に投与することを含む方法が得られる。好ましい実施態様において、パピローマウイルスワクチンは野生型HPV16 L1キャプシッドタンパク質を有する。

【0027】また、本発明の範囲内で、パピローマウイルス感染に対して脊椎動物を免疫感作するための方法であって、立体配座パピローマウイルスL1コード化配列を有する本発明の組み換え遺伝子構成を脊椎動物に投与し、前記コード化配列が前記脊椎動物の細胞または組織において発現できるようにすることで、パピローマウイルスに対して効果的な中和免疫応答を誘導することを含む方法が得られる。好ましい実施態様において、立体配座パピローマウイルスL1コード化配列は、ヒトパピローマウイルスHPV16から誘導される。特に好ましい実施態様において、ヒトパピローマウイルスHPV16は野生型パピローマウイルスである。

【0028】本発明のさらに他の態様によれば、脊椎動物におけるパピローマウイルス感染に対するヒトの液性免疫を検出するための方法であって、(a)パピローマウイルスキャプソメア構造の少なくとも1つの立体配座エピトープを有するパピローマウイルスキャプシッドタンパク質を抗体検出に有効な量で供給するステップと、(b)ステップ(a)のペプチドを、パピローマウイルス感染についての検査対象となる脊椎動物から得られた体液の標本と接触させ、前記標本に含有されるパピローマウイルス抗体がこれに結合して抗原-抗体複合体を形成させるステップと、(c)ステップ(b)の複合体を、検出可能に標識した免疫グロブリン結合因子と接触させるステップと、(d)前記複合体に結合する標識した免疫グロブリン結合剤によって前記標本中の抗パピローマウイルス抗体を検出するステップと、を含む方法が得られる。本発明のこの態様の好ましい実施態様において、ペプチドは本質的にパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質からなる。他の実施態様において、ペプチドは本質的にヒトパピローマウイルスHPV16の発現産生物からなる。特に好ましい実施態様において、ペプチドは本質的に野生型ヒトパピローマウイルスHPV16遺伝子の発現産生物からなり、例えばこのペプチドは本質的に配列番号：2の発現産生物からなる。

【0029】本発明のさらに他の態様によれば、パピローマウイルスの感染が疑わしい動物由来の標本においてパピローマウイルスを検出するための方法であって、前記パピローマウイルスのキャプシッドの立体配座エピトープの1つまたは複数に対する特異性を有する抗体と標本とを接触させるステップであって、抗体は検出可能なシグナルを発生させる標識を有し、あるいは検出可能に

標識された試薬に結合されるステップと、抗体をパピローマウイルスに結合できるようにするステップと、検出可能なラベルによって標本中に存在するパピローマウイルスの存在を決定するステップと、を含む方法が得られる。

【0030】本発明のさらに他の態様によれば、パピローマウイルスの感染が疑わしい動物におけるパピローマウイルスに対する細胞免疫応答を決定するための方法であって、前記動物の免疫適格細胞と野生型の組み換えパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質すなわち本発明の結合された組み換えL1およびL2キャプシッドタンパク質とを接触させるステップと、キャプシッドタンパク質に対する前記細胞の増殖によってパピローマウイルスに対する細胞性免疫を評価するステップとを有する方法が得られる。本発明のこの態様の好ましい実施態様において、組み換えパピローマウイルスタンパク質を動物の皮膚に導入する。

【0031】本発明のさらに別の態様によれば、本質的にパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質からなるキャプソメア構造またはパピローマウイルスL1タンパク質およびL2キャプシッドタンパク質を含むキャプソメア構造、またはこれらのキャプソメア構造のいずれかに対する抗体を単体または組み合わせで有し、単一包装のパッケージ容器にパピローマウイルスに対する体液または細胞免疫についてのアッセイを実施するための材料と共に備えるパピローマウイルス感染診断キットが得られる。

【0032】発明の詳細な説明

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

【0033】さらに、本発明の自己組み立てされた組換えL1キャプシッドタンパク質は、組換え細菌より抽出したL1タンパク質や変性型ビリオンとは異なり、パピローマウイルス感染症から守ることができる多量の中和抗血清を誘導する能力において、そのままのパピローマウイルス粒子と同じ有効性を有する。本発明におけるキャプシッドタンパク質の高レベルの免疫原性は強い抗体結合性を意味し、それにより、本タンパク質は血清学的スクリーニング検査で立体配座ビリオンエピトープに対する抗体を検出し測定するための感応剤となる。また、この免疫原性により、本発明のキャプシッドタンパク質はパピローマウイルスによる感染症から宿主動物を守る高効果ワクチンまたは中和抗体を誘引する免疫原として使用することもできる。これら見解は最近Kirnbauerらによって報告され(1992)、米国出願番号07/

941, 371の根拠になった。

【0034】今回我々は、良性のパピローマウイルス病変より単離された野生型HPV16ゲノムから発現されるキャプシッドタンパク質L1は、前述のパピローマウイルス系で発現された場合、これまで明らかにされていない効果によって自己組み立てされ、ウシパピローマウイルスL1キャプシッドタンパク質が有する効果とに匹敵することを明らかにした。

【0035】HPV16 L1遺伝子の塩基配列

HPV16 L1 DNA源は、例えばZhouら(1991)が報告した研究で開示された通り、プロトタイプクローン、GenBank AccessionNo. K02718で、子宮頸部癌より単離されている(Seedprfら、1985)。我々は、野生型HPV16ゲノム由来のL1は、単一点での突然変異によりプロトタイプゲノムとは異なるが、BPV1またはBPV L1/L2でみられる効果と同様の効果により、自己組み立てされてウイルス様粒子を形成する。プロトタイプHPVゲノム由来のL1をL2と共に使用した場合に見られる自己組み立てと比較すると、野生型ゲノム由来のL1は少なくとも100倍以上の効率で自己組み立てされる。

【0036】種々のHPV16 L1発現産物の自己組み立て効率を遺伝子レベルで考察するため、良性病変及び異形成もしくは癌関連病変の両者より単離したHPV16 L1遺伝子のオープンリーディングフレームについて塩基配列を調べた。

【0037】分析の結果、プロトタイプ株の報告されているL1の塩基配列の内、下記の通り2箇所にエラーが検出された。

【0038】(1) nt6902とnt6903の間に3つのヌクレオチド(ATG)の挿入がなければならない、これはL1タンパク質中にセリンの挿入をもたらす。

【0039】(2) 報告されているプロトタイプ塩基配列中には、L1タンパク質の配列からアスパラギン酸を欠失させる、nt6952-6954からなる3つのヌクレオチドの欠失がなければならないが、nt5637-7155からなるプロトタイプHPV16 L1ゲノムの正確なヌクレオチド配列は配列番号: 1のヌクレオチド配列で、本文中に掲載されている。

【0040】配列番号1中のヌクレオチド塩基の番号付けは、1番から始めており、報告されているHPV塩基配列のヌクレオチド塩基の番号付けは、nt5638-7156の配列であるが、塩基配列リストの1-1518に対応している。従って元の塩基配列中で対応する部位は当業者により容易に同定される。

【0041】この他3つのHPV16 L1ゲノム、クローン16PAT及びクローン114/16/2及びクローン114/16/11について塩基配列を調べて、これらの塩基配列を修正したプロトタイプの配列と比較した。

【0042】クローン16PATはUniversity of Rochester

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

【0043】クローン114/16/2及び114/16/11はハイデルベルク German Cancer Research CenterのMatthias Durst氏より供与されたものであるが、非悪性病変よりクローニングされ両者とも効率的に自己組み立てされるL1を発現する。

【0044】異形成、悪性進行癌及び良性病変に関連するHPV16 L1遺伝子の特徴の比較

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

【0045】プロトタイプ、悪性関連のHPV16種と良性病変由来のHPV16種との間にあるこのただ一個のアミノ酸の違いにより、自己組み立ての効率に差が生じているのは明かである。きわめて近縁のHPVタイプの間では、この場所にアスパラギン酸があることが効率的な自己組み立てを得るのに必要で、アスパラギン酸をヒスチジンに置き換えるとキャプシッドタンパク質からこの能力が失われる。悪性関連ウイルスにおいてキャプシッド組み立てが失われることは、中和抗体産生に必要な立体配座エピトープの喪失と関連しており、またこれはパピローマウイルスが免疫制御を逃れるための免疫原性の低下と関係していると思われる。

【0046】従って、効率的に自己組み立てされるキャプシッドタンパク質を発現するHPV L1遺伝子は、(1)パピローマウイルス感染症の良性病変から野生型HPV16 L1のオープンリーディングフレームを単離するか、または(2)プロトタイプ塩基配列のnt6242-6244部位でアスパラギン酸をコード化する様に部位特異的突然変異を行うことにより得ることができる。

【0047】組換えキャプシッドタンパク質

本発明の方法により、任意のパピローマウイルスの組換えキャプシッド粒子も調製することができる。L1またはL2キャプシッドタンパク質のいずれか一方のみ、またはL1及びL2キャプシッドタンパク質の両者からなる粒子を調製することができる。L1/L2キャプシッドタンパク質粒子は天然のパピローマウイルスピリオンの組成とより一層密接に関係するが、おそらくL2のほとんどはキャプシッド構造内でL1よりも内部にあるため、L2はL1ほど免疫に関して重要とは思われない。L2が存在しなくてもL1は自身で自己組み立てされることが出来るが、自己組み立てされたL1/L2キャプシッドタンパク質粒子はさらに天然のパピローマウイル

スピリオンの組成と密接に関係している。従って、L1のみを含む粒子の方は単純であり、L1/L2を含む粒子の方が一層真正の構造を有していると思われる。自己組み立てされたL1及びL1/L2粒子は両者とも高力価の中和抗体を誘導し、従ってワクチン産生に適している。野生型HPVゲノムにより発現されるL1キャプシッドタンパク質を含む粒子は、L1のみの場合でもL1/L2のいずれの場合でも、特に望ましい。

【0048】組替え型L1またはL1/L2結合キャプシッド粒子の作成はL1(またはL1及びL2)遺伝子を適当なベクターにクローニングしてベクターを形質転換した真核細胞内で両タンパク質に対応する立体配座をコード化する塩基配列を発現させることにより行う。キャプシッド様構造を形成する能力はキャプシッドタンパク質が高力価の中和抗体を産生する能力と密接に関係しており、自己組み立てされて立体配座エピトープを有するキャプシッド構造を形成させる能力を持つキャプシッドタンパク質を産生するためには、実質的に全てのキャプシッドタンパク質をコード化する塩基配列を発現させなければならないと思われる。従って、実質的に全てのキャプシッドタンパク質をコード化する塩基配列がクローニングされる。遺伝子は、真核細胞系で発現されるのが望ましい。昆虫の細胞は望ましい宿主細胞であるが、適当な酵母発現ベクターが使用される場合は酵母細胞も宿主細胞として適切である。同様に適当な哺乳動物発現ベクターを用いて形質転換した哺乳動物細胞も組み立てされたキャプシッドタンパク質を産生するために用いることができるが、培養した哺乳動物細胞は非哺乳動物細胞よりも哺乳動物に感染する可能性のある未知のウイルスを有していると思われるため、培養した哺乳動物細胞は余り有利ではない。

【0049】好ましいプロトコールに従って、バキュロウイルス系を使用する。クローニングされる遺伝子、実質的にウシパピローマウイルス(BPV1)またはヒトパピローマウイルス(HPV16)L1キャプシッドタンパク質またはヒトパピローマウイルスHPV16L1及びL2をコードするあらゆる塩基配列を、フランキングバキュロウイルス配列を含むバキュロウイルス転移ベクターに挿入して遺伝子構築物を形成し、組換えDNAを野生型バキュロウイルスDNAと共に実施例1記載のSf-9昆虫細胞に同時形質転換させて感染時に挿入遺伝子を大量に発現することの出来る組換えウイルスを作成する。実際のタンパク質産生は新しい昆虫細胞を組換えバキュロウイルスに感染させることによって行う。従って、L1キャプシッドタンパク質及びL1及びL2キャプシッドタンパク質は、実施例2に記載されている通り組換えバキュロウイルスを感染させた昆虫細胞内で発現される。

【0050】実施例1の操作では、BPV1の全L1遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応(PCR; Saikiら、1987)により増

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

【0051】パピローマウイルスL1が異型細胞内に過剰発現された場合、自己組み立てされてウイルス様粒子を形成するという仮説を確かめるために、AcBPV-L1感染細胞の薄片を電子顕微鏡下で観察してパピローマウイルス様構造物の存在を調べた。BPV組換えウイルスを感染させた細胞が選択的に核内に局所化した多くのおよそ50nmの環状構造物を含み、これらの構造物は野生型バキュロウイルス感染細胞からは認められなかった。in vivo パピローマウイルススピリオンの組み立ては核内で起こること、ピリオンの直径は55nmと報告されていることから、これらの結果からL1のウイルス様粒子への組み立てが起こったことが示唆された。

【0052】宿主細胞内で形成したキャプシッドタンパク質の発現後、実施例4記載の通りウイルス粒子を感染細胞の溶解物から精製した。さらにL1タンパク質が自己組み立てされた証拠を得るために、勾配遠心により感染昆虫細胞からウイルス様粒子を単離した。真正のBPVピリオンと比較すると、電子顕微鏡下で精製組換えBPV L1及びHPV16 L1キャプシッドタンパク質の形成が認められた。

【0053】高分子量の構造物を、40%ショ糖中の遠心分離によりL1組換えまたは野生型感染細胞の溶解物から分離し、沈澱物に対してCsCl密度勾配遠心分離を行った。分画を集めて、イムノプロットによりBPV L1特異性モノクローナル抗体に対する反応性を調べた。

【0054】勾配から得たL1陽性分画を炭素膜格子に吸着させ、1%酢酸ウラニルで染色して透過型電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡では、陽性分画が多くの環状構造を含みキャプソメアが規則的に配置されていた。ウイルス様粒子のピークを含むCsCl分画の密度はおよそ1.3mg/mlで、前報の無核BPVピリオン(Larsen.P.ら、1987)の密度と一致した。もっと小さな環状物及び部分的に

組み立てされた構造物も見られたが、多くは直径がおおよそ50nmであった。電子顕微鏡では、大きい方の粒子のサイズ、サブユニット構造が感染性BPVピリオンときわめてよく類似しており、染色と写真撮影を同時に行った。これらの粒子は非感染またはWtAcMNPV感染細胞の調製物中では認められなかった。これらの結果より、BPV L1は、L2または他のパピローマウイルスタンパク質非存在下で組み立てされてウイルス様粒子を形成する能力を本質的に有することが示唆された。さらに、分化している上皮または哺乳動物細胞に制限される特異的因子はパピローマウイルスキャプシッドの組み立てに必要ではなかった。

【0055】昆虫細胞内での自己組み立て能がパピローマウイルスL1の一般的性質であるかどうかを調べるため、HPV16(ヒト性器癌において最も多く検出されるHPVタイプ)のL1も、相同な組換えパキローウイルスにより発現させた。SDS-PAGEにより、予想された58kdのサイズのタンパク質がHPV16 L1組換えウイルスを感染させた昆虫細胞内で大量に発現された。このタンパク質はイムノブロット上でHPV16 L1モノクローナル抗体と強く反応した。このモノクローナル抗体は見かけの分子量がおおよそ28kdからおおよそ48kdの範囲にある別の5つのバンドをも僅かに染色した。この抗体はBPV L1とも若干反応し、従ってこの抗体は同イムノブロット上でBPVの55kdのタンパク質を僅かに染色した。CsCl勾配精製後、免疫反応分画を電子顕微鏡で観察し、電子顕微鏡上で本分画に50nmのパピローマウイルス様粒子が含まれていることが認められた。BPV L1調製物に比べるとヒトの系では、いくらか不完全で小さな組み立て粒子が見られたが、おそらくこれは、発現の量が少ないか、かなりの程度のHPV16 L1の分解(SDS-PAGE上で見られた)のためであり、この結果からHPV16のL1及びおそらく他のタイプのL1タンパク質は組み立てされてピリオンタイプの構造物を形成する能力を本質的に有していることが示唆される。また、実施例に記載の通り、アカゲザルPVの組換えパピローマウイルスキャプシッド粒子の調製も行った。

【0056】免疫原としての組換え配座キャプシッドタンパク質

異型細胞内で合成された自己組み立て主要キャプシッドタンパク質に基づくサブユニットワクチンはヒトB型肝炎を含む多くの病原ウイルスによる感染の予防に有効であることが明らかにされている(Stevens.C.ら、1987)。非感染性またはホルマリン不活性化BPVはワクチンとして有効であるがBPV形質転換細胞は有効ではないことを明らかにする研究により、初期の遺伝子産物よりもウイルスキャプシッドタンパク質は免疫応答を誘引することが示唆されている。他の論文のデータからも、細菌から抽出されたL1タンパク質は中和抗体の力価が低いにもかかわらず一部免疫応答を誘引することが示唆されて

いる。従って、昆虫細胞内で発現してウイルス様粒子に組み立てられるBPV L1について家兎中の中和抗体を誘導する能力を調べた。2種類の調製物について試験を行った。それらは、L1組換えまたは野生型感染Sf-9細胞の全細胞抽出物と種々の遠心分離及び硫酸沈澱により単離した部分的精製粒子である。1次接種後、家兎に隔週毎に2回追加接種を行った。

【0057】家兎血清を、マウスC127細胞へのBPVの感染を阻害する能力について、標準量のBPVウイルスから誘導されるフォーカス数の減少を測定することにより、調べた。代表的なアッセイを行い、組換えBPV L1を接種した動物で誘導される中和抗血清の力価を生体のBPVピリオン及び変性BPVピリオンに対する抗血清と比較した。パキローウイルス由来L1を接種して作成した免疫血清では、少なくとも1:11,000希釈(力価11,000; 表1)でBPVウイルスの感染性を50%減少させることができたが、同じ家兎の免疫前血清では最も低い希釈試験である1:20の希釈率でもフォーカス形成形質転換を阻害できなかった。粗調製物及び部分精製粒子は高力価中和抗体を含み、最高力価が測定値で290,000であり、共に有効であった。この値は感染性BPVピリオンに対して上昇した陽性コントロール抗血清の中和力価と同じ値であって、これと比較して、細菌で誘導したL1を用いた前報の試験での最高力価は36であった(Pilancinski.W.ら、1984)。野生型パキローウイルス感染細胞からの抽出物を接種した家兎から得た血清では、1:20の希釈率で感染性を阻害することができなかったことから、中和活性はL1に特異的であることが示唆された。1%SDS中で煮沸して部分精製L1粒子を破砕したところ、調製物は中和抗体の誘導する能力を失った(表1)。L1は自己組み立てされてピリオン様粒子を形成することができ、誘導する中和抗体の力価が少なくとも以前のin vitro産生抗原よりも3桁高いことから組換えL1キャプシッドタンパク質は自然に伝染したパピローマウイルスに対して効果的な長期間の抑制効果を誘導する能力を潜在的に有することが示唆される。これらの結果から、昆虫細胞内で組み立てされたL1粒子は立体配座依存性の免疫優性エピートープの提示において感染性ウイルスに近い形状になることが明らかである。またこれらの結果から、L2は高力価の中和抗体の産生には必要ないことが明かである。細菌により誘導されたL1の中和免疫原性が弱いことが報告されたが、これはコンフォメーションが適切ではないと思われることまた組み立てされてピリオン様構造物を形成しないことが原因である。また、L1の多数の電気泳動の変異体がピリオン内で検出された(Larsen.P.ら、1987)。これら修飾物のいくつかはおそらく細菌により誘導されたL1内には存在しないと思われるが、これは中和抗体の産生を促進すると思われる。

【0058】ここで開示された高力価の中和抗血清を誘導する組換えL1(またはL2)パピローマウイルスキャ

プシッドタンパク質は伝染性乳頭腫症に対する予防のためのワクチンとしての使用するのに適した能力を有している。危険な状態にある集団で、免疫処置により恩恵を受けることの出来る集団の例は乳頭腫疣贅の恐れのあるウシの群、非生殖器型のHPV感染に対する全てのヒト、及び生殖器型HPVの感染に対する性的活動のあるヒトである。

【0059】治療目的のワクチン処理は、通常L1(及びL2)キャプシッドタンパク質を発現する生産的パピローマウイルス病変に対して有用であり得る。このような病変は疣贅または咽頭乳頭腫症などの良性感染症に最も発症しやすい。新生児の咽頭乳頭腫症は通常、ちつ分泌物内に感染性のパピローマウイルスが存在する産道内を幼児が通過する際に伝染する。パピローマウイルスに対する感染症の妊娠婦人への治療目的のワクチン処理により、胎盤関門を通過し、胎児の循環系に入ってこの種のパピローマウイルス感染症に対する幼児への予防的受動免疫を行う能力を有する中和IgG抗体を誘導することができる。さらにちつ液や乳汁に分泌される母性IgAにより幼児保護機構が供給される。Jarrett(1991)はBPV誘導性疣贅の治療時に働くL2の何等かの有効性を示した。一般に悪性腫瘍はL1またはL2を発現せず、子宮頸部癌などの状態における組換えL1またはL2でのワクチン処理の有効性については明らかにされていない。

【0060】良性及び悪性パピローマウイルス疾患に対する保護免疫は組換えL1キャプシッドタンパク質の有効量をパピローマウイルス感染症の恐れのある個体に投与することによって誘導される。

【0061】キャプシッドタンパク質を含むワクチンは、従来の免疫処置プロトコルに従って、非経口的あるいは局所的に直接投与される。もう一つの具体例では、立体配座をコードするL1の塩基配列を転移ベクター、例えば(軽度の一過性感染を引き起こす)セムリキ森林ウイルスベクター、受容者である細胞または組織内に誘導され、そこで免疫化キャプシッドタンパク質が発現される組換えウイルスにクローニングすることができる。ワクシニアウイルスもまた遺伝子ベヒクルとして使用できる。

【0062】血清学的スクリーニング剤としての組換え形成キャプシッドタンパク質

パピローマウイルスビリオンタンパク質に対するヒト免疫応答に関する公知の血清検査では、原則として細菌で誘導したL1およびL2キャプシッドタンパク質を利用しており、その結果は他のHPV感染症の測定(Jenison, S. et al., 1990)とはあまりよい相関関係にはない。上記のBPVパピローマウイルス免疫検査により、細菌より抽出されたパピローマウイルスビリオンタンパク質は、タイプ特異性で多くの中和抗体により認識される立体配座により影響を受けるエピト

ープを示さないことが示唆されている。主に線状エピトープを認識するこのようなアッセイと比較すると、自己組み立てされるL1粒子を用いた血清検査は、ヒトの集団において抗HPVビリオン免疫性の程度をさらに正確に測定すると思われる。従ってここに開示された組換えL1キャプシッドタンパク質は立体配座エピトープを示しており、いくつかのタイプの結合アッセイにおいてパピローマウイルスに対する中和抗体を与える免疫性を検出するための特異性の高い診断薬として使用できる。その操作方は、一般に抗原抗体対中のキャプシッドタンパク質と特異的に結合する体液中の抗体を検出する手段を提供する固相あるいは液相アッセイとして行われる。循環抗体を評価するための当業者間で公知の手順の例として、二重抗体ラジオイムノアッセイおよび酵素イムノアッセイなどの液相アッセイや、ストリップラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロットングおよびGalloy et al. に付与された米国特許第4,520,113号酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、Skold et al. に付与された米国特許第5,039,607号に開示されているimmunochromatographicアッセイなどが挙げられる。抗体の検出用として好ましいELISA法は、Harlow E. およびLane, D. 著、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1988, pp. 563~578に開示されているようなものである。

【0063】ここに開示の組換えL1またはL1/L2キャプシッドタンパク質を使用し、例えばBradley, L., 1980に開示の抗原誘導T細胞増殖応答や、特にStarlingに付与された米国特許第5,081,029ウイルス抗原に対する細胞応答などのin vivo あるいはin vitroのアッセイによってパピローマウイルスに対する細胞性免疫を測定することもできる。パピローマウイルスに対する細胞性免疫は、Stites, D., 1980に開示されているような従来のin vivo遅延型過敏性反応皮膚試験や、組換えHPV L1融合タンパク質の皮内注射によるHopfl, R., et al., 1991に開示されている好ましい方法によっても特定することができる。

【0064】また、本発明のキャプシッドタンパク質を免疫遺伝子として使用し、周知の方法によって多クローン性あるいは単クローン性抗体を得ることもできる。これらのパピローマウイルス特異抗体は、特に抗体の網や種に特異的な第2の標識抗体と組み合わせ、免疫組織化学などの様々な周知のアッセイ手順に基づいて、体の組織や体液の標本中におけるキャプシッドタンパク質の存在の検出に診断的に利用することもできる。

【0065】後述の遺伝子操作は、本発明による遺伝子調節ユニットの要素の調製に対する一般的な用途につい

抗血清の製造

家兎に対し、凍結/溶解を1サイクル行い20xダウンスホモジェナイズ処理をすることにより調製した全細胞Sf-9溶解物(3x10⁷細胞)(家兎#1,2および8)、または分画遠心分離および35%硫酸沈澱により部分精製したL1タンパク質200μg(#3,4,6および7)を、完全フロイントアジュバント中に添加したものを皮下より注入して免疫し、次に不完全フロイントアジュバント中に同様の調製物を添加したものをを用いて2週間間隔で2回追加免疫を行った。

【0071】実施例4

粒子の精製及び透過型電子顕微鏡による解析

Sf-9細胞(2x10⁶/ml)500mlにAcBPV-L1またはAcHPV16-L1またはAcHPV16-L1/L2(16-L1/L2)組換え体バキュロウイルスを感染させた。72時間後、回収した細胞をPBS中で60秒間超音波処理した。低速清澄化後、溶解物を40%(wt/vol)ショ糖/PBS中、110,000gで2.5時間遠心分離を行った(SW-28)。再懸濁したペレットを141,000g、室温で20時間、10~40%(wt/wt)CsCl/PBS中で密度勾配沈降平行遠心分離を行った。分画を底から回収してSDS-PAGEによる分析を行った。免疫反応性分画をPBSを外液として透析、セントリコン30(Millipore)限外濾過により濃縮し、(HPV16-L1の場合)真空ポンプ付きA-100ローター(Beckman)内で10分間30psiで遠心分離してペレットを形成させた。BPV1ビリオン(図2B)を記述通り(Cowsert,L.ら、1987)ウシ疣贅(A.B.Jenson氏より供与)より精製した。精製した粒子を30カーボンコートTEMグリッドに吸着させ、1%酢酸ウラニルで染色してフィリップ電子顕微鏡EM400Tにより倍率36,000倍で観察した。電子顕微鏡から結果が得られ、考察は上記で行っている。

【0072】実施例5

BPV1中和アッセイ

第2追加免疫3週間後に得られた血清の系列希釈物を約500フォーカス形成単位のBPV1ウイルスと共に3*

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

20

フォーカス数が50%減少する希釈と等価

†A.B.Jenson(Nakai,Y.,etal.,1986)より

*0分間インキュベートし、ウイルスをC127細胞に1時間吸着させて、これらの細胞を3週間培養した(Dvoretzky,I.ら、1980)。フォーカスを0.5%メチレンブルー/0.25%カルボルフクシン/メタノール液で染色した。結果は、フォーカスの数を評価して得た。考察は以下に行う。抗-AcBPV-L1は家兎#1より得られ、抗-wtAcMNPVは家兎#8より得られた(表1)。1:400に希釈した前免疫血清を標準として使用した。抗-AcBPV-L1は希釈率1:400または1:600で実質的にフォーカスを消失したが、抗wtAcMNPVは希釈率1:400または1:600でフォーカスの数が上昇したように思われた。1:00希釈時に「nrs」と表記することとした正常家兎血清のネガティブコントロールを抗BPV-1ビリオンの標準として使用したところ、抗BPV-1ビリオンは希釈率1:400または1:600で実質的にフォーカスを消失したと思われた。抗BPV-1ビリオンは以前の研究(Nakai,Y.ら、1986)で、野生のBPVビリオンに対して励起された。最後に、ダコは変性BPVビリオンに対して励起された市販の家兎抗血清(Dako Corp.,Santa Barbara, California)である。この血清は、見かけ上抗体を含まないコントロールよりも大量のフォーカスを発生させた。ネガティブコントロールとして、ウイルスを含まない検査では、実質的にフォーカスを発生しなかった。

【0073】実施例6

BPV1に対する血清中和力価

実施例5と同様にしてアッセイを行った。家兎#1,2および8に粗全細胞Sf-9溶解物を接種し、家兎#3,4,6および7には部分精製したL1タンパク質(表1)を接種した。家兎#6および7を、1%SDS中で煮沸変性させたL1タンパク質調製物で免疫した。各家兎とも、2回目の追加免疫後3~6週間後に少なくとも2回採血して検査を行ったところ、同一の抗体力価であることが認められた。各家兎の免疫前血清の力価は、20より小さく、最も低い希釈率で検査した。

【0074】

【表1】

【 0 0 7 5 】参考文献

- U.S. Patent No. 5,081,029 to Starling et al. U.S. Patent No. 5,039,607 to Skold et al. U.S. Patent No. 4,520,113 to Gallo et al.
- Baker, C. in *The Papovaviridae: Vol.2. The Papillomaviruses* (N. Saizman et al., eds.) Plenum Press, New York, 1987. p.321.
- Baker, T., et al. *Biophys. J.* 60:1445 (1991).
- Bradley, L. et al. in *Selected Methods in Cellular Immunology*. B. Mishell and S. Shiigi, eds. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1980. pp. 164-166.
- Christensen, N., et al. *Virology* 64:5678 (1990).
- Christensen, N., et al. *Virology* 181:572 (1991).
- Crawford, L., et al. *Virology* 21:258 (1963).
- Dvoretzky, I., et al. *Virology* 103:369 (1980).
- Ghim, S., et al. Comparison of neutralization of B PV-1 infection of C127 cells and bovine fetal skin xenografts. *Int. J. Cancer* 49: 285 (1991).
- Ghim, S., et al. HPV1-L1 protein expressed in cos cells displays conformational epitopes found on intact virions. *Virology* 190:548-552 (1992).
- Hagensee, M., et al. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. of Virology* 67(1):315-322.
- Hopfl, R., et al. Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet* 337:373 (1991).
- Jarrett, W., et al. *Veterinary Record* 126:449 (1990).
- Jarrett, W., et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology* 184:33 (1991).
- Jenison, S., et al. *J. Infectious Dis.* 162:60 (1990).
- Jenson, A., et al. Identification of linear epitopes BPV-1 L1 protein recognized by sera of infected or immunized animals. *Pathobiology* 59:396 (1991)
- Jin, X., et al. *J. Gen. Virology* 70:1133 (1989).
- Kajigaya, S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4646 (1991).
- Kirnbauer, R., et al. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12180-12184 (1992).
- Larsen, P., et al. *J. Virology* 61:3596 (1987).
- Liddington, R., et al. *Nature* 354:278 (1991).
- Lin, Y-L., et al. Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. *Virology* 187:612 (1992).
- McLean, C., et al. Production and characterization of a monoclonal antibody to human Papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J. Clin. Pathol* 43:488 (1990).
- Nakai, Y. *Intervirology*. 25:30 (1986).
- Olson, C., et al. *Amer. J. Vet. Res.* 21:233 (1960).
- Pilacinski, W., et al. *Biotechnology* 2:356 (1984).
- Saiki, R. K., et al. *Science* 239:487 (1987).
- Seedorf, et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145:181-185 (1985)
- Shiffman, M. J. *National Cancer Inst.* 84:394 (1992).
- Stevens, C., et al. *JAMA* 257:2612 (1987).
- Stites, D. Chapter 27 in *Basic and Clinical Immunology 3d Ed.* H. Fudenberg et al., eds. Los Altos: Lange Medical Publications, 1980.
- Summers, M., et al. Texas Agricultural Experiment Station, College Station, Texas. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures* (1987). Bulletin No. 1555.
- Zhou, J., et al. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *J. Virology* 185:251 (1991).
- zur Hausen, H. *Science* 254:1167 (1991).

【 0 0 7 6 】配列表

(1) 概要 :

(i) 出願人 : 米国政府 , 代表者 Health and Human Services 長官

(i i) 発明の名称 : 自己組立て組換えパピローマウイルスキャプシッドタンパク質

(i i i) 配列数 : 6

(i v) 代理人住所 :

(A) 代理人 : KNOBBE, MARTENS, OLSON & BEAR

(B) 通り : 620 Newport Center Drive Sixteenth Floor

(C) 都市 : Newport Beach

(D) 州 : カリフォルニア州

(E) 国 : U S A

(F) 郵便番号 : 9 2 6 6 0

(v) コンピュータ読取可能な形式 :

(A) 媒体の種類 : フロッピー (登録商標) ディスク

(B) コンピュータ : I B M P C 互換機

(C) O S : P C - D O S / M S - D O S

(D) ソフトウェア : Patent IN Release 1.0, Version 1.25

(v i i) 先行出願データ :

(A) 出願番号：US 07/941,371

(B) 出願日：1992年9月3日

(A) 出願番号：US 08/032,869

(B) 出願日：1993年3月16日

(ix) 通信情報：

(A) 電話：714-760-0404

(B) ファクシミリ：714-760-9502

【0077】

(2) 配列ID番号：1についての情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：1517塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖状：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖

(ii) 分子型：DNA(ゲノム)

(iii) 仮説：なし

(iv) アンチセンス：なし

(vi) 原ソース：

(A) 微生物：ヒトパピローマウイルス

(B) 菌株：HPV16

(ix) 特徴：

(A) 名称/キー：CDS

(B) 位置：1..1518

(xi) 配列の説明：配列ID番号：1：

ATG TCT CTT TGG CTG CCT AGT GAG GCC ACT

GTC TAC TTG CCT CCT GTC 48

Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr

Val Tyr Leu Pro Pro Val

1 5 10 15

CCA GTA TCT AAG GTT GTA AGC ACG GAT GAA

TAT GTT GCA CGC ACA AAC 96

Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu

Tyr Val Ala Arg Thr Asn

20 25 30

ATA TAT TAT CAT GCA GGA ACA TCC AGA CTA

CTT GCA GTT GGA CAT CCC 144

Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu

Leu Ala Val Gly His Pro

35 40 45

TAT TTT CCT ATT AAA AAA CCT AAC AAT AAC

AAA ATA TTA GTT CCT AAA 192

Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn

Lys Ile Leu Val Pro Lys

50 55 60

GTA TCA GGA TTA CAA TAC AGG GTA TTT AGA

ATA CAT TTA CCT GAC CCC 240

Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg

Ile His Leu Pro Asp Pro

65 70 75 80

AAT AAG TTT GGT TTT CCT GAC ACC TCA TTT

TAT AAT CCA GAT ACA CAG 288

Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe

Tyr Asn Pro Asp Thr Gln

85 90 95

CGG CTG GTT TGG GCC TGT GTA GGT GTT GAG

GTA GGT CGT GGT CAG CCA 336

TGC AAA CCA CCT ATA GGG GAA CAC TGG GGC
 AAA GGA TCC CCA TGT ACC 528
 Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly
 Lys Gly Ser Pro Cys Thr
 165 170 175
 AAT GTT GCA GTA AAT CCA GGT GAT TGT CCA
 CCA TTA GAG TTA ATA AAC 576
 Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro
 Pro Leu Glu Leu Ile Asn
 180 185 190
 ACA GTT ATT CAG GAT GGT GAT ATG GTT CAT
 ACT GGC TTT GGT GCT ATG 624
 Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val His
 Thr Gly Phe Gly Ala Met
 195 200 205
 GAC TTT ACT ACA TTA CAG GCT AAC AAA AGT
 GAA GTT CCA CTG GAT ATT 672
 Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser
 Glu Val Pro Leu Asp Ile
 210 215 220
 TGT ACA TCT ATT TGC AAA TAT CCA GAT TAT
 ATT AAA ATG GTG TCA GAA 720
 Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr
 Ile Lys Met Val Ser Glu
 225 230 235 2
 40
 CCA TAT GGC GAC AGC TTA TTT TTT TAT TTA
 CGA AGG GAA CAA ATG TTT 768
 Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu
 Arg Arg Glu Gln Met Phe
 245 250 255
 GTT AGA CAT TTA TTT AAT AGG GCT GGT ACT
 GTT GGT GAA AAT GTA CCA 816
 Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr
 Val Gly Glu Asn Val Pro
 260 265 270
 GAC GAT TTA TAC ATT AAA GGC TCT GGG TCT
 ACT GCA AAT TTA GCC AGT 864
 Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser
 Thr Ala Asn Leu Ala Ser
 275 280 285
 TCA AAT TAT TTT CCT ACA CCT AGT GGT TCT
 ATG GTT ACC TCT GAT GCC 912
 Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser
 Met Val Thr Ser Asp Ala
 290 295 300
 CAA ATA TTC AAT AAA CCT TAT TGG TTA CAA
 CGA GCA CAG GGC CAC AAT 960
 Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln
 Arg Ala Gln Gly His Asn
 305 310 315 3
 20
 AAT GGC ATT TGT TGG GGT AAC CAA CTA TTT

420 425 430
 CCT CCA GCA CCT AAA GAA GAT CCC CTT AAA
 AAA TAC ACT TTT TGG GAA 1344
 Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys
 Lys Tyr Thr Phe Trp Glu

435 440 445
 GTA AAT TTA AAG GAA AAG TTT TCT GCA GAC
 CTA GAT CAG TTT CCT TTA 1392
 Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp
 Leu Asp Gln Phe Pro Leu

450 455 460
 GGA CGC AAA TTT TTA CTA CAA GCA GGA TTG
 AAG GCC AAA CCA AAA TTT 1440
 Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu
 Lys Ala Lys Pro Lys Phe

465 27 470 475 4
 80
 ACA TTT 配列 I D 番号: ACA GCT ACA の情報 ACC
 ACC (TCA) 配列の特徴: ACA 1488
 Thr Leu Glu Lys Arg Lys 塩基対 Pro Thr
 Thr Ser Ser 型核酸 Thr
 (C) 鎖状: 48本鎖 490 495
 ACT GCD AAA の口 AA-AA直鎖T AAG CTG TA
 (i i) 分子型: DNA (1818)
 Thr (Ala Lys) 板読Lys Lys Arg Lys Leu
 (i v) ア50チセンス: なし 505
 (i x) 特徴:
 (A) 名称 / キー: C D S
 (B) 位置: 1 . . 1 5 1 8
 (x i) 配列の説明: 配列 I D 番号: 2 :
 ATG TCT CTT TGG CTG CCT AGT GAG GCC ACT
 GTC TAC TTG CCT CCT GTC 48
 Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr
 Val Tyr Leu Pro Pro Val
 1 5 10 15
 CCA GTA TCT AAG GTT GTA AGC ACG GAT GAA
 TAT GTT GCA CGC ACA AAC 96
 Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu
 Tyr Val Ala Arg Thr Asn
 20 25 30
 ATA TAT TAT CAT GCA GGA ACA TCC AGA CTA
 CTT GCA GTT GGA CAT CCC 144
 Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu
 Leu Ala Val Gly His Pro
 35 40 45
 TAT TTT CCT ATT AAA AAA CCT AAC AAT AAC
 AAA ATA TTA GTT CCT AAA 192
 Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn
 Lys Ile Leu Val Pro Lys
 50 55 60
 GTA TCA GGA TTA CAA TAC AGG GTA TTT AGA
 ATA CAT TTA CCT GAC CCC 240
 Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg

【 0 0 7 8 】

	100	105	110	
TTA GGT GTG GGC ATT AGT GGC CAT CCT TTA				
TTA AAT AAA TTG GAT GAC	384			
Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu				
Leu Asn Lys Leu Asp Asp				
	115	120	125	
ACA GAA AAT GCT AGT GCT TAT GCA GCA AAT				
GCA GGT GTG GAT AAT AGA	432			
Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn				
Ala Gly Val Asp Asn Arg				
	130	135	140	
GAA TGT ATA TCT ATG GAT TAC AAA CAA ACA				
CAA TTG TGT TTA ATT GGT	480			
Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr				
Gln Leu Cys Leu Ile Gly				
145	150	155	1	
60				
TGC AAA CCA CCT ATA GGG GAA CAC TGG GGC				
AAA GGA TCC CCA TGT ACC	528			
Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly				
Lys Gly Ser Pro Cys Thr				
	165	170	175	
AAT GTT GCA GTA AAT CCA GGT GAT TGT CCA				
CCA TTA GAG TTA ATA AAC	576			
Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro				
Pro Leu Glu Leu Ile Asn				
	180	185	190	
ACA GTT ATT CAG GAT GGT GAT ATG GTT GAT				
ACT GGC TTT GGT GCT ATG	624			
Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp				
Thr Gly Phe Gly Ala Met				
	195	200	205	
GAC TTT ACT ACA TTA CAG GCT AAC AAA AGT				
GAA GTT CCA CTG GAT ATT	672			
Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser				
Glu Val Pro Leu Asp Ile				
	210	215	220	
TGT ACA TCT ATT TGC AAA TAT CCA GAT TAT				
ATT AAA ATG GTG TCA GAA	720			
Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr				
Ile Lys Met Val Ser Glu				
225	230	235	2	
40				
CCA TAT GGC GAC AGC TTA TTT TTT TAT TTA				
CGA AGG GAA CAA ATG TTT	768			
Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu				
Arg Arg Glu Gln Met Phe				
	245	250	255	
GTT AGA CAT TTA TTT AAT AGG GCT GGT ACT				
GTT GGT GAA AAT GTA CCA	816			
Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Thr				
Val Gly Glu Asn Val Pro				

GAA TAT GAT TTA CAG TTT ATT TTT CAA CTG
TGC AAA ATA ACC TTA ACT 1152
Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu
Cys Lys Ile Thr Leu Thr
370 375 380

GCA GAC GTT ATG ACA TAC ATA CAT TCT ATG
AAT TCC ACT ATT TTG GAG 1200
Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met
Asn Ser Thr Ile Leu Glu
385 390 395 4

00
GAC TGG AAT TTT GGT CTA CAA CCT CCC CCA
GGA GGC ACA CTA GAA GAT 1248
Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro
Gly Gly Thr Leu Glu Asp
405 410 415

ACT TAT AGG TTT GTA ACC CAG GCA ATT GCT
TGT CAA AAA CAT ACA CCT 1296
Thr Tyr Arg Phe Val Thr Gln Ala Ile Ala
Cys Gln Lys His Thr Pro
420 425 430

CCA GCA CCT AAA GAA GAT GAT CCC CTT AAA
AAA TAC ACT TTT TGG GAA 1344
Pro Ala Pro Lys Glu Asp Asp Pro Leu Lys
Lys Tyr Thr Phe Trp Glu
435 440 445

GTA AAT TGA AAG GAA AAG TTT TCT GCA GAC
CTA GAT CAG TTT CCT TTA 1392
Val Asn Ile Lys Phe Lys Phe Ile Asp
Leu (Asp) 配列の特徴: Leu
450 (A) 長さ: 47塩基対 460

GGA GGC AAA TTT TGG GAA 1440
AAG GCC AAC CTA GAA GAT GAT CCC CTT AAA
Gly Arg Lys Phe Leu Thr Ala Gly Leu
Lys (Ala) 配列の特徴: Leu (ゲノム)
465 (i i i) 仮説: なし 470 475 4

80 (i v) アンチセンス: なし
ACA TTA GGC AAA CCA AAA GCT ACA CCC ACC
ACC TCA TCC 微生物TCUパピロウイルス
Thr (Leu Gly) 即時型: Lys Ala Thr Pro Thr
Thr Ser Ser Thr Ser: BIP V 1 N
(x i) 配列の説明: 配列 I D 番号: 480 495

【0079】

【0080】

CCAGAA GCTGTAT 47 1517
(Th A) 配列 I D 番号: Lys Phe Ile の情報:
(i) 配列の特徴: 505
(A) 長さ: 47塩基対
(B) 型: 核酸
(C) 鎖状: 1本鎖
(D) トポロジー: 直鎖

(i i) 分子型 : DNA (ゲノム)
 (i i i) 仮説 : なし
 (i v) アンチセンス : あり
 (v i i) 即時ソース :
 (B) クローン : B P V 1 Y
 (x i) 配列の説明 : 配列 I D 番号 : 4 :
 GCGGTGGT ~~AG~~ CGTGCA GTTG ACTTACCTTC TGTT
 TTACAT TTACAGA 47

【 0 0 8 1 】

(2) 配列 I D 番号 : 5 についての情報 :
 (i) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 4 1 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖状 : 1 本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖
 (i i) 分子型 : DNA (ゲノム)
 (i i i) 仮説 : なし
 (i v) アンチセンス : なし
 (v i i) 即時ソース :
 (B) クローン : H P V 1 N
 (x i) 配列の説明 : 配列 I D 番号 : 5 :
 CCGCTAGATC TAATATGTCT CTTTGGCTGC CTAG
 TGAGGC C 41

【 0 0 8 2 】

(2) 配列 I D 番号 : 6 についての情報 :
 (i) 配列の特徴 :
 (A) 長さ : 4 4 塩基対
 (B) 型 : 核酸
 (C) 鎖状 : 1 本鎖
 (D) トポロジー : 直鎖
 (i i) 分子型 : DNA (ゲノム)
 (i i i) 仮説 : なし
 (i v) アンチセンス : あり
 (v i i) 即時ソース :
 (B) クローン : H P V 1 6 Y
 (x i) 配列の説明 : 配列 I D 番号 : 6 :
 GCGGTAGATC TACACTAATT CAACATACAT ACAA
 TACTTA CAGC 44

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
C 1 2 N 5/10		C 1 2 Q 1/70	
C 1 2 P 21/02		G 0 1 N 33/569	L
C 1 2 Q 1/70		C 1 2 R 1:91)	
G 0 1 N 33/569		(C 1 2 P 21/02	C
/(C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(C 1 2 P 21/02		5/00	B
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	

(72)発明者 ロウイー、ダグラス アール、
アメリカ合衆国 20007 ワシントン、デ
ィーシー、ノース ウェスト、ガーフィー
ルド ストリート 3414

(72)発明者 シラー、ジョン ティー、
アメリカ合衆国 20902 メリーランド州、
シルバー スプリング、メイプル ビュー
ドライブ 11306

(72)発明者 キルンバウアー、ラインハルト
アメリカ合衆国 20814 メリーランド州、
ベテスダ、ノース ブルック レーン
8315、 905

专利名称(译)	自组装重组乳头瘤病毒衣壳蛋白		
公开(公告)号	JP2001333788A	公开(公告)日	2001-12-04
申请号	JP2001101791	申请日	2001-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	ロウィーダグラスアール シラージョンティー キルンパウアーラインハルト		
发明人	ロウィー、ダグラス アール. シラー、ジョン ティー. キルンパウアー、ラインハルト		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/23 A61P17/12 A61P31/12 A61P31/20 A61P35/00 C07K14/025 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/04 C12N15/09 C12N15/37 C12P21/02 C12Q1/70 C12R1/91 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A01K2227/10 A61K39/00 A61K2039/525 A61K2039/5258 A61P17/12 C07K14/005 C07K2319/00 C12N7/00 C12N2710/20022 C12N2710/20023 C12N2710/20034 C12N2800/30 Y10S435/975 Y10S977/795 Y10S977/804 Y10S977/918 Y10S977/927		
FI分类号	A61K39/12 A61P31/20 C07K14/025 C12N1/15 C12P21/02.C C12Q1/70 G01N33/569.L C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA01 4B024/FA17 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ10 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG31 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA14 4B064/DA15 4B065/AA90X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA76 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	川北 喜十郎		
优先权	07/941371 1992-09-03 US 08/032869 1993-03-16 US		
其他公开文献	JP4046949B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种野生型人乳头状瘤，其特征在于指导具有构象表位的壳粒结构的表达，所述构象表位通过壳聚糖结构在宿主细胞中的自组装诱导针对天然乳头瘤病毒的高滴度中和抗体。提供包含病毒16型(HPV16)L1构象编码序列的遗传构建体。1.一种基因构建体，其包含编码重组载体中的乳头瘤病毒L1衣壳蛋白的野生型人乳头瘤病毒16型(HPV16)L1构象编码序列，其中所述构建体包含乳头瘤病毒。通过在宿主细胞中自组装含有L1衣壳蛋白的壳粒结构，指导具有构象表位的壳粒结构的表达，所述构象表位诱导针对天然乳头瘤病毒的高滴度中和抗体，提供了包含编码乳头瘤病毒L1衣壳蛋白的野生型人乳头瘤病毒16型(HPV16)L1构象编码序列的基因构建体。

