

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-143560

(P2007-143560A)

(43) 公開日 平成19年6月14日(2007.6.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2007-47248 (P2007-47248)	(71) 出願人	501134749
(22) 出願日	平成19年2月27日 (2007.2.27)		
(62) 分割の表示	特願2001-104294 (P2001-104294) の分割		
原出願日	平成7年10月6日 (1995.10.6)		
(31) 優先権主張番号	08/319,467		
(32) 優先日	平成6年10月6日 (1994.10.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パピローマウイルス様キメラ粒子

(57) 【要約】

【課題】免疫関連反応を誘導または検出する能力を保持しているパピローマウイルス様キメラ粒子を提供する。

【解決手段】ヒト又はウシパピローマウイルス含み、パピローマウイルス粒子の融合パートナーがパピローマウイルス E 6 又は E 7 ペプチドである、パピローマウイルス粒子の形状エピトープを有するパピローマウイルス様粒子。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パピローマウイルス L 1 融合生成物を含み、パピローマウイルス粒子の形状エピトープを有するパピローマウイルス様粒子。

【請求項 2】

前記パピローマウイルス L 1 融合生成物が、ヒトパピローマウイルス L 1 融合生成物またはウシパピローマウイルス L 1 融合生成物である請求項 1 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 3】

前記ヒトパピローマウイルス L 1 融合生成物が、HPV 16 L 1 融合生成物であり、前記ウシパピローマウイルス L 1 融合生成物が、BPV 1 L 1 融合生成物である請求項 2 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 4】

前記ヒトパピローマウイルス L 1 融合生成物が、ペプチド若しくは全長蛋白である単一の融合パートナー、または、ペプチド、全長蛋白、若しくは縦並びに連結されたこれらの組み合わせである複数の融合パートナーを含む請求項 1 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 5】

前記融合パートナーがパピローマウイルス E 6 または E 7 生成物である請求項 4 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 6】

前記パピローマウイルス L 1 融合生成物が、その N 末端または C 末端で融合パートナーに融合する請求項 1 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 7】

前記パピローマウイルス L 1 融合生成物が、L 1 アミノ酸の間に挿入された融合パートナーを有する請求項 1 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 8】

更にパピローマウイルス L 2 生成物を含む請求項 1 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 9】

前記パピローマウイルス L 2 生成物が、HPV 16 L 2 生成物または BPV 1 L 2 生成物である請求項 8 に記載のパピローマウイルス様粒子。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のパピローマウイルス様粒子を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、パピローマウイルス様キメラ粒子および関連する合成 DNA 分子、宿主細胞、方法並びにワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

パピローマウイルスはヒトおよび広範囲の動物の上皮に感染し、当該上皮の感染部位に一般に良性の増殖を誘導する。しかしながら、幾つかの事例ではある種のパピローマウイルスによって誘導された病巣は悪性に経過する。ヒトの性器病巣の悪性進行とヒトパピローマウイルス (HPV) のある種の型 (例えば HPV 16) との間には密接な関係が存在する。これらのウイルス型による感染は、子宮頸癌 (世界的に最も一般的な女性の癌の 1 つ) の進行における最も重要な危険因子であると考えられる (非特許文献 1; 非特許文献 2)。子宮頸癌の大半は HPV 初期遺伝子 (例えば E 6 および E 7) を含み、該遺伝子を発現している。さらに、これらの遺伝子は培養細胞において強力な形質転換活性および永代化 (immortalizing) 活性を有することが示された (非特許文献 3)。

10

20

30

40

50

【0003】

パピローマウイルスは、直径が約55nmのエンベロープを持たない二本鎖DNAウイルスで、ヌクレオヒストンのコアの中に約8kbのゲノムを含む(非特許文献4)。キャプシドは、ウイルスによってコードされる2つの蛋白L1およびL2で構成され、これらはSDS-PAGEにおいて、それぞれ約55kDaおよび75kDaに移動する(非特許文献5)。L1(これは主要キャプシド蛋白である)は、T-7の二十面体対称と結合する72ペンタメーターとして配列されている。L2の機能およびビリオン内の位置は不明である(非特許文献4)。

【0004】

L1蛋白は自己集合組立能をもち、それによって、大量のウイルス様粒子(virus-like particles, VLPs)が、多数のパピローマウイルス種に由来するL1蛋白の種々の組換え体(リコンビナント)発現系での発現により生成できる(非特許文献6; 非特許文献7; 非特許文献8; 非特許文献9)。集合組立には必要ではないが、L2は、細胞内でL1とともに同時に発現される場合(L1/L2VLPs)VLPsに取り込まれる。

【0005】

天然のビリオンまたはL1VLPsでウサギを免疫することによって高力価の中和血清抗体が誘導されるが、大腸菌で発現させた集合組立されていないL1による免疫では誘導されなかった(非特許文献10; 非特許文献7; 非特許文献11; 非特許文献12)。天然の粒子に対して作製した多クローン性および単クローン性抗体は形状依存性エピトープを認識する(非特許文献13; 非特許文献14; 非特許文献15)。

【0006】

VLPsに対して作製した中和抗体もまた形状依存性エピトープを認識する。感染性BPV1(これはウシの病巣から容易に得られ、インビトロBPV1感染性アッセーで定量できる(非特許文献16))を用いて、ウシパピローマウイルスから得られたVLPsは高レベルの中和抗体を誘導することが示された(非特許文献7)。この中和抗体は形状依存性エピトープに対して誘導され、免疫の前に粒子を変性させると中和活性を誘導するこの調製物の能力は失われた(上掲書)。

【0007】

昆虫細胞でリコンビナントバキュロウイルスによってL1主要キャプシド蛋白を発現させるために非進行性病巣から得られたHPV16分離株のL1遺伝子を用いた場合、L1は、プロトタイプのHPV16(癌病巣から最初に分離された)に由来するL1を用いて得られた収量より3乗高い収量で自己集合組立を行ない、天然のビリオンと形態学的に同様なVLPsを形成した(非特許文献8)。DNA配列の比較によって、プロトタイプL1の効率の悪い自己集合組立をもたすただ1つの非保存的アミノ酸変化が明らかにされた(上掲書)。集合組立能をもつクローンのL1はしたがって野性型遺伝子と考えられ、集合組立不全クローンのプロトタイプL1は変異体と考えられる。

【0008】

野性型L1蛋白をもつHPV16VLPsを抗原として用いて、HPV16に感染した患者における血清抗体を検出するELISAを開発した(非特許文献17)。対照的に、変性HPV16粒子もプロトタイプL1蛋白調製物もこれらの抗体を検出できなかった(上掲書)。これらの結果は、プロトタイプL1蛋白は形状エピトープをもたないことを明らかにした。

【0009】

自己集合組み立てさせた野性型HPV16L1/L2に対して作製したウサギ血清は、HPV16VLPが細胞表面分子に結合するのを妨げることが分かった(Rodenら、J. Virol. (印刷中、1994年、10月))。対照的に、HPV16L1/L2のプロトタイプ株に対して作製された血清はそのような結合を阻止しなかった(上掲書)。このデータは、プロトタイプHPV株は形状エピトープを欠いていることを示している。

【0010】

完全なワタオウサギパピローマウイルス(CRPV)のL1またはL1/L2から構成

されたウイルス様粒子で免疫したウサギは、その後の感染性CRPVによる実験的感染から防御された(Breitburdら、第12回国際パピローマウイルスワークショップ(於:アムステルダム)、印刷中(1994年、10月))。対照的に、変性粒子で免疫した動物は防御されなかった(上掲書)。これらの発見は、形状エピトープをもつVLPは防御免疫を誘導できるという結論と一致する。

【0011】

キャプシド蛋白で構成されたVLPは、パピローマウイルス感染を防止する予防ワクチンとして魅力的な候補物である。しかしながら、これらVLPワクチンがすでに成立したパピローマウイルス感染に対して治療的効果を有することはおそくないであろう。E6およびE7と異なり、このキャプシド蛋白は進行性病巣または基底上皮感染細胞(これらはパピローマの免疫退行の推定標的である)での発現は検出されない。

10

【0012】

L1およびL2以外のパピローマウイルス蛋白に対する免疫はパピローマウイルス感染の制御を助けるかもしれないということが実験モデルによって証明される。E6およびE7は腫瘍発生過程で選択的に維持されるので、これらの腫瘍蛋白に由来するペプチドは、HPV含有腫瘍細胞に対する細胞性免疫反応のための標的として役立つ可能性がある。動物モデル実験によってHPV16のE7蛋白は腫瘍拒絶抗原として作用することが示唆された(非特許文献18; 非特許文献19)。のみならず、HPV感染頻度、HPV感染の持続、並びに子宮頸癌および他のHPV関連癌のリスクは細胞性免疫の抑制をもつ患者で高まる(非特許文献20; 非特許文献21)。これらの観察によって、細胞性免疫は、HPV感染およびそれに付随する腫瘍の発達を防御するために重要であることが示唆される。そのような免疫の誘導は予防的であるとともに治療的であるかもしれない。

20

【0013】

外来ペプチドがウイルスキャプシド様構造物に取り込まれ得ること、さらにこれらキメラ粒子を用いて外来抗原を免疫系に呈示することが可能なことが明らかになった。報告された実施例には、ヒトライノウイルス2型エピトープ(非特許文献22)、HIVのgp41(非特許文献23)のB型肝炎コア抗原粒子の表示、並びに単純ヘルペスウイルス1型およびネズミ肝炎ウイルス由来ペプチドのB19パルボウイルス粒子の表示(非特許文献24)が含まれる。パルボウイルスキメラは、対応するウイルスによる実験的感染攻撃からマウスを防御した。上記の系の全てで、外来配列はキャプシド構造に必須の蛋白内に挿入され、20アミノ酸未満に限定されていた。しかしながら、最近の実験(非特許文献25)は、パルボウイルスL1マイナーキャプシド蛋白に融合させた場合、完全な147アミノ酸のニワトリ卵白リゾチーム蛋白がB19パルボウイルス粒子に取り込まれ得ることを明らかにした。このリゾチームは生物的活性を保持し、ウサギに注射したとき免疫反応を誘導した。別の関連性が低い実験でも、HIV-1エンベロープ糖蛋白の84アミノ酸を含むB型肝炎ウイルス表面抗原粒子(これは脂質膜構造である)(非特許文献26)およびHIV-1V3ループの一部を含む酵母Tyウイルス様粒子(非特許文献27)もまた、動物に接種したとき挿入したペプチドに対して免疫反応を起こさせることが示された。パピローマウイルスに関しては、HPV16E7ペプチド(全て20アミノ酸未満)を含むB型肝炎ウイルスコア抗原粒子は、マウスでペプチド特異的抗体およびTヘルパー応答を誘導することが報告された(非特許文献28)。

30

40

【0014】

【非特許文献1】H. zur Hausen, Science 254:1167(1991)

【非特許文献2】M.H. Schiffman, J. Natl. Cancer Inst. 84:394(1992)

【非特許文献3】B.A. Wemess, K. Munger & P.M. Howley(1991)、「腫瘍学の進歩」(Advances in Oncology)、V.T. DeVita, S. Hellman & S.A. Rosenberg編、(Lipponcott、フィラデルフィア) pp.3-18

【非特許文献4】Bakerら、Biophys. J. 60:1445(1991)

【非特許文献5】Mose Larsonら、J. Virol.61:3596(1987)

【非特許文献6】Hagenseeら、J. Virol. 67:315(1993)

50

- 【非特許文献 7】 Kirnbauerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:12180(1992)
- 【非特許文献 8】 Kirnbauerら、J. Virol. 67:6929(1993)
- 【非特許文献 9】 Roseら、J. Virol. 67:1936(1993)
- 【非特許文献 10】 N.D. Christensen & J.W. Kreider, J. Virol. 64:3151(1990)
- 【非特許文献 11】 Pilacinskiら、Bio/Technology 2:356(1984)
- 【非特許文献 12】 Segreら、Am. J. Vet. Res. 16:517(1955)
- 【非特許文献 13】 N.D. Christensen & J.W. Kreider, Virus Res. 28:195(1993)
- 【非特許文献 14】 Christensenら、J. Virol. 64:5678(1990)
- 【非特許文献 15】 Christensenら、Virology 181:572(1991)
- 【非特許文献 16】 Dvoretzkyら、Virology 103:369(1980) 10
- 【非特許文献 17】 Kirnbauerら、L. Natl. Cancer Inst. 86:494(1994)
- 【非特許文献 18】 Chenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:110(1981)
- 【非特許文献 19】 Feltkempら、Eur. J. Immunol. 23:2242(1993)
- 【非特許文献 20】 Alloutら、Br. Med. J. 298:153(1989)
- 【非特許文献 21】 Lagaら、Int. J. Cancer 50:45(1992)
- 【非特許文献 22】 Francisら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2545(1990)
- 【非特許文献 23】 Borisovaら、FEBS Lett. 259:121(1989)
- 【非特許文献 24】 Brownら、Virology 198:477(1994)
- 【非特許文献 25】 Miyamuraら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:8507(1994)
- 【非特許文献 26】 Michelら、J. Virol. 64:2452(1990) 20
- 【非特許文献 27】 Griffithsら、J. Virol. 65:450(1991)
- 【非特許文献 28】 Tindleら、Virology 200:547(1994)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

自己集合組立パピローマウイルス L1 を基材にしたキメラ粒子はこれまで報告がなく、またキメラ VLP を作製する目的でウイルス性融合パートナーとして使用したという報告もない。上記に記載したキメラ粒子実験は、パピローマウイルスと無関係のウイルスを含み、したがってパピローマウイルスを含むキメラ粒子実験の結果を予測することはできない。実際、カーンパウエルらによるパピローマウイルスの研究(Kirnbauerら、J. Virol. 67:6929(1993) 上掲書)では、L1 のただ 1 つの非保存的アミノ酸変化が、VLPs への効果的な自己集合組立および形状エピトープの表示(これらは臨床的に関連する免疫反応の誘導および検出に必須であるらしい)をもたらすことが明らかにされた。したがって、パピローマウイルスに無関係のウイルスを用いた研究は、L1 のただ 1 つのアミノ酸置換によって効果的な自己集合組立が失われると仮定した場合、外来ペプチドまたは蛋白を含むパピローマウイルス L2 がパピローマウイルス L1 との同時集合組立によって粒子を形成することができるか否かを予測することは不可能である。さらにまた、これらの実験は、L1 のただ 1 つのアミノ酸置換が形状エピトープの表示を妨げることができると仮定した場合、生じたキメラ粒子のいずれかが中和抗体もしくは他の免疫関連反応を誘導または検出する能力を保持しているか否かを予測することも不可能である。 30 40

【課題を解決するための手段】

【0016】

前記課題を解決するため、パピローマウイルス様キメラ粒子を提供することが本発明の目的である。これらのキメラ粒子は多価抗原を表示するための土台として機能することができる。またこれらのキメラ粒子は、蛋白を細胞内に運び、ペプチドに加工し続いて MHC 分子の中にこれらのペプチドを表示させて細胞性免疫反応を誘導させるために役立てることができる。このキメラ粒子は、有効スペクトルの広い効果的なパピローマウイルスワクチンを作製する費用効率の良い方法を提供する。また別に、このパピローマウイルス用キメラ粒子は VLP および/または融合パートナーの精製にも利用できる。またこのキメラ粒子は、活性を有する無傷の蛋白(例えば酵素、毒素または薬剤)を細胞内に運ぶため 50

に機能することができる。

【0017】

前記目的を達成するため、本発明は、パピローマウイルスL1融合生成物を含み、パピローマウイルス粒子の形状エピトープを有することを特徴とするパピローマウイルス様粒子を提供する。

【0018】

当該パピローマウイルス様粒子において、前記パピローマウイルスL1融合生成物は、ヒトパピローマウイルスL1融合生成物またはウシパピローマウイルスL1融合生成物であることを特徴としていてもよい。

【0019】

前記ヒトパピローマウイルスL1融合生成物は、HPV16L1融合生成物であり、前記ウシパピローマウイルスL1融合生成物が、BPV1L1融合生成物であることを特徴としていてもよい。

【0020】

前記ヒトパピローマウイルスL1融合生成物が、ペプチド若しくは全長蛋白である単一の融合パートナー、または、ペプチド、全長蛋白、若しくは縦並びに連結されたこれらの組み合わせである複数の融合パートナーを含むことを特徴としていてもよい。

【0021】

前記融合パートナーがパピローマウイルスE6またはE7生成物であることを特徴としていてもよい。

【0022】

前記パピローマウイルスL1融合生成物が、そのN末端またはC末端で融合パートナーに融合することを特徴としていてもよい。

【0023】

前記パピローマウイルスL1融合生成物が、L1アミノ酸の間に挿入された融合パートナーを有することを特徴としていてもよい。

【0024】

更にパピローマウイルスL2生成物を含むことを特徴としていてもよい。

【0025】

前記パピローマウイルスL2生成物が、HPV16L2生成物またはBPV1L2生成物であることを特徴としていてもよい。

【0026】

本発明の別の態様として、上記パピローマウイルス様粒子を含む組成物も含まれる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

本発明は、パピローマウイルスL2融合生成物が、パピローマウイルスL1生成物を基材とする、形状エピトープを表示するパピローマウイルス様粒子に取り込まれるという結果から得られた。これらの結果は予期せぬものであった。

【0028】

パピローマウイルスの研究(Kirnbauerら、J. Virol. 67:6929(1993) 上掲書)において、L1のただ1つの非保存的アミノ酸変化がVLPsへのL1の効果的な自己集合組立および形状エピトープの表示をもたらすことが示された。この形状エピトープの表示は、臨床的に関連のある免疫反応の誘導および検出に必要なように思える。したがって、L1内のただ1つのアミノ酸置換が効果的な自己集合組立を失わせると仮定した場合、外来ペプチドまたは蛋白を含むパピローマウイルスL2がパピローマウイルスL1とともに集合組み立てされて粒子を形成するか否かは予測不可能であった。L1内のただ1つのアミノ酸置換が形状エピトープの表示を妨げることができると仮定した場合、生成されるどのようなキメラ粒子が中和抗体もしくは他の免疫関連反応の誘導または検出能を保持しているかを予測することもまた不可能であった。

【0029】

10

20

30

40

50

パピローマウイルス L2 融合生成物は一連のアミノ酸の鎖を意味し、この場合該鎖の一部は L2 の蛋白配列に由来し、さらに該鎖の一部は別の 1 つ蛋白配列（または複数の蛋白配列）に由来する。

【0030】

L2 融合生成物は、1 つの蛋白（または多数の蛋白）のための読み取り枠を L2 のための読み取り枠の隣にまたはその中に（枠内で）スプライシングすることによって製造される。

【0031】

蛋白工学を用いて L2 融合生成物の構造を決定する。蛋白工学分野の従事者にとって日常的な作業で天然蛋白 L2 の変種が作製される。作製されるこのような変形は L2 の構造を詳細に知った上での経験に基づいて予測されるものでもよく、また完全に任意のものであってもよい。構造情報とランダム変異および選別との組合せによってもまた劇的な結果を得ることができる。

【0032】

例えば、融合ペプチドまたは蛋白がその間に挿入される L2 アミノ酸の選別はこの基準によって実施することができる。アミノ酸の配列と長さがパピローマウイルス間で変化する領域が存在することは、この領域が L2 の組み込みおよび/または粒子への取り込みに必須ではない構造を表していることを示唆する。融合ペプチドまたは蛋白を L2 内へ挿入するこの観察された能力は、そのような領域が存在することを暗示させる。

【0033】

L2 融合生成物のための構造の決定は、形状エピトープを表示するパピローマウイルス L1 生成物を基材にしたパピローマウイルス様粒子への取り込みが生じる L2 融合生成物の能力をもとに実施される。

【0034】

構造決定の好ましい手段は、パピローマウイルス L1 生成物を基材とするパピローマウイルス様粒子への L2 融合生成物の取り込み効率および/または純正度を測定するアッセーを含む。

【0035】

L1 / L2 VLPs 形成の効率および/または純正度は形状エピトープの表示と関連がある（上掲書）。

【0036】

キメラ L2 は、したがって野性型 L2 の取り込みのそれと同じような効率および/または純正度で L1 基材 VLPs へ取り込まれるようになるであろう。

【0037】

L2 融合生成物のための構造を決定する他の好ましい手段は、中和抗体の誘発および/または検出を測定するアッセーを含む。

【0038】

中和抗体は形状依存性エピトープに対して誘導される（上掲書）ので、中和抗体の誘導および/または検出は形状エピトープの表示と関連がある。

【0039】

したがって、キメラ L2 の取り込みは、L1 または L1 / L2 VLPs と比較したときパピローマウイルス様キメラ粒子による中和抗体の誘導および/または検出を抑制しない。

【0040】

本発明の目的のために、キメラ L2 融合生成物は、形状エピトープ（上記の手段または当技術分野で既知の他のいずれかの手段で特定されたか否かにかかわらず）を表示するパピローマウイルス L1 生成物基材パピローマウイルス様粒子へ取り込まれることができる能力をもつ。

【0041】

L2 およびその融合パートナー（および L1）の構造は、完全な長さの L2 蛋白（およ

10

20

30

40

50

びL1蛋白)並びに完全な長さの融合パートナー蛋白およびそのフラグメント(5'フラグメントであれ、3'フラグメントであれまたは内部フラグメントであれ)を含むことが意図される。前記フラグメントは、少なくとも約20アミノ酸残基、有利には少なくとも約10アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも約5アミノ酸残基である。L2(およびL1)のタイプ、サブグループおよび株間変動並びに、融合パートナー蛋白のヒト対立遺伝子および種間変動も明らかに本発明の範囲内に含まれると解される。本発明はまた、完全な長さのL2蛋白(およびL1蛋白)並びに完全な長さの融合パートナー蛋白およびそのペプチドフラグメントの保存的変種を含むが、この場合、保存的アミノ酸が野性型L2(およびL1)および融合パートナー蛋白のアミノ酸残基に代わって置換される。遺伝暗号の縮退のために、本発明はまた、L2(およびL1)および融合パートナー遺伝子のDNAがコードするのと同じアミノ酸残基をコードするDNAを含む。 10

【0042】

このパピローマウイルス様キメラ粒子自体は、どのようなパピローマウイルスに由来するどのようなL2融合生成物もいずれのL1生成物と一緒に(該ゲノムが密接に関係しようと、関係が薄かろうと粒子への取り込みが生じるかぎり)取り込むと予想される。したがって、例えばBPV-1、BPV-2、BPV-4、CRPV、DPV、EEPV、HPV-1、HPV-5、HPV-6、HPV8、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-31またはHPV-33の何れかと関係があるL2融合生成物は、例えば上記のウイルスの何れか、またはパピローマウイルスのいずれかのタイプ、サブグループもしくは株間変種に由来する何れのL1生成物とも粒子内に取り込まれ得る。 20

【0043】

VLPsは高力価の中和血清抗体の誘導に必要な形状依存性エピトープを表示するので、L2融合生成物を含むVLPキメラは、液性免疫の刺激のために最適化されたサブユニットワクチンとして機能し、パピローマウイルス感染を予防し、したがってパピローマウイルス関連癌およびパピローマウイルスに付随する他の病的状態の発生を排除する。

【0044】

先に考察したように、VLPsが既に存在する増殖性病巣の退縮を誘導する治療用ワクチンとして有効であるということはあるまいので、キメラVLPsは、治療用ワクチンを開発しようとして長い間熱望され、これまで果たされなかった要請を達成するために機能することができる。 30

【0045】

おそらくキメラVLPsは、特異的な細胞表面レセプターに結合して内在化されて細胞質中に遊離され、したがって細胞性免疫を惹起させる細胞毒性T細胞に向けて呈示されるMHCクラスI分子と組み合わされたペプチドの表示を促進するであろう。これは、特異的に細胞に進入したり、細胞毒性T細胞反応を誘導するためにMHCクラスI分子と一体となってペプチドの表示を促進することが期待されない非複合体化蛋白と対照的な点である(この場合は、MHCクラスII分子と結合してヘルパーT細胞に呈示され、ペプチドの表示が促進される可能性の方が高い)。

【0046】

L2融合生成物として1つまたは2つ以上のパートナーを包含することは、(臨床的病巣の治療および予防の改善を含む)広い利用スペクトルをもつ効果的なパピローマウイルスワクチンを作製するために明らかに経費効率が良い方法である。 40

【0047】

融合パートナーは、VLP基材ワクチンの潜在的標的を広げる方法を提供するような融合パートナー(例えばE6もしくはE7ペプチドまたは完全な長さのE6もしくはE7、他のパピローマウイルスペプチドもしくは蛋白、または他のSTDもしくは感染性病原体(例えば単純ヘルペス、HIV、トラコーマクラミジア、淋菌、梅毒トレポネーマ)のペプチドもしくは蛋白)から成る群から選択できる。

【0048】

L2融合生成物はL2分子につきただ1つの融合パートナーとは限らず、また別の融合 50

パートナー、例えば縦並びに連結したまた別のペプチドまたは完全な長さの蛋白、または同じかもしくは異なる蛋白に由来するそれらの組合せを含むことができる。さらにまた、1つ以上のL2融合生成物をただ1つのVLP中に同時に集合組み立てさせることができる。例えば、補助刺激蛋白の結合ドメインまたは免疫反応に必要な補助レセプターもしくはリガンドを含むように操作して、ウイルス標的エピトープを含むL2融合生成物またはキメラVLPをまた作製できる。これらは、例えばB7（これはT細胞上でCD28と相互作用する）、細胞内粘着分子（ICAM）、リンパ球機能抗原（LFA）、血管細胞粘着分子（VCAM-1）および熱耐性抗原（HSA）（補助刺激物質またはリガンドをVLP表面に誘導するため、実施例14参照）である。

【0049】

疾患の予防および/または治療においてワクチンとして実際に好ましいパピローマウイルス様キメラ粒子の量は、製剤化された具体的な組成物、適用態様、処置される具体的な部位および器官によって変動することは理解されよう。ある宿主の投与量は通常の方法によって、例えば適切な慣用的免疫付与プロトコルによって決定できる。

【0050】

また別にキメラVLPはVLP精製方法でも用いることができる。VLPsはそれ自体予防用ワクチンとして、さらに免疫診断として有用である（上掲書）。簡単に記せば、融合パートナーに対する抗体は標準的な免疫学的技術によって作製され、アフィニティークロマトグラフィーカラムはこの抗体を用いて構築される。続いてVLPsはアフィニティークロマトグラフィー工程で精製される。また、キメラVLPsは融合パートナーの精製方法で用いることができる。例えば、L2-E7融合生成物を含むVLPsは、正しく折り畳まれたE7を得る手段として有用である。子宮頸癌患者の血清は、細菌から分離されたような変性E7に対するよりも高い割合で形状的に正確なE7に対して陽性であることが報告された(Viscidiら、Int. J. Cancer 55:780(1993))。この報告でE7を生成させるために用いられたインビトロ転写-翻訳系は困難かつ高価で、しかも放射能標識E7を用いる。キメラE7VLPsを精製し、この材料をE7ELISAで用いることが有利であろう。ヒトL1またはL2との血清反応性の複雑さを避けるために、BVP基材粒子を用いることができるであろう。E7の血清反応性（これは前癌病変とは対照的に癌と相関する）をモニターすることは、子宮頸癌患者で疾患の進行を追跡するために、さらに再発をスクリーニングするために有用であると提唱された（上掲書）。

【0051】

場合によっては、キメラVLPsは活性を有する完全な蛋白を細胞に輸送させる方法で用いることができる。この蛋白は、例えば酵素または毒素または薬剤であろう。このキメラVLPsは細胞にインビトロ、インビボ、そのままの場所でまたは生体外のいずれかで投与され、この蛋白はその後細胞に輸送され、該細胞でその意図された目的（例えば酵素または毒素または薬剤として）のために機能する。

【0052】

本発明者らは、L2に融合させたE7蛋白またはペプチドを取り込んだパピローマウイルス様キメラ粒子の作製に成功した。

【0053】

パピローマウイルスE7遺伝子は、L2遺伝子の3'末端に枠内で融合させた場合、またはL2読み取り枠部分内で融合させた場合、ウイルス様粒子に取り込んだL2-E7融合蛋白をL1蛋白の存在下で発現させた。VLPsへのL2-E7の取り込み効率と純正度は野性型L2蛋白のそれと同様であった。BPVL1/L2-E7ウイルス様粒子は、BPVL1/L2粒子と同じ効率で中和抗体を誘導させることが分かった。キメラ粒子は、L2-E7キメラ粒子で免疫したウサギで融合パートナーエピトープに特異的な液性免疫を誘導し、E7に対する抗体を生じることが観察された。

【0054】

パピローマウイルス様キメラ粒子を作製することが可能になったことによって、実際上どのような蛋白またはペプチドもL2生成物に融合させ、パピローマウイルス様キメラ粒

10

20

30

40

50

子に取り込ませることが可能になる。

【0055】

本発明者らは、L2-E7融合蛋白を作製し、これらの蛋白を昆虫細胞でリコンビナントバキュロウイルスを介してL1とともに発現させることによってキメラVLPsを製造することに成功した。我々は3つのキメラVLPsを作製した：HPV16L1+HPV16L2-HPV16E7（完全な長さ）、BPVL1+BPVL2-HPV16E7（完全な長さ）およびBPVL1+BPVL2-HPV16E7（アミノ酸1~30）。BPVL2はHPV16E7にその3'末端で融合させた。HPV16L2はHPV16E7にその3'末端で融合させた。さらにHPV16E7の最初の30コドンはBPVL2のコドン274と275との間に挿入させた。

10

【0056】

L1およびL2-E7の蔗糖濃度勾配による同時沈降並びに免疫沈澱によって、キメラ蛋白がVLPsに取り込まれていることが示された。

【0057】

透過型電子顕微鏡によって、L2-E7融合蛋白を含む粒子はL1またはL1/L2VLPsと同じ効率で集合組立が行なわれ、形態学的に区別できないことが明らかになった。

【0058】

インビトロBPV1中和アッセーによって、BPVL1含有キメラVLPsは中和抗血清を誘導できることが示された。力価はBPVL1/L2を用いて得られるものに匹敵した。30000に匹敵する中和力価がBPVL1/L2VLPsおよびBPVL1/L2-HPV16E7（完全な長さ）キメラVLPsの両方に対して得られた。

20

【0059】

L2-E7キメラ粒子で免疫したウサギはE7に対する抗体を生じたが、このことは、キメラVLPsによる融合パートナーエピトープに対して特異的な液性免疫が誘導されることを示し、さらにE7の存在部位がVLPsの外部であることを確認させた。

【0060】

実施例1で説明するように、キメラリコンビナントバキュロウイルスを作製することができる。キメラの遺伝子は、ゲノム源またはcDNAから直接的合成またはそのいずれかの組合せによって得ることができる。L2およびその融合パートナー遺伝子はリコンビナントPCR技術によって増幅できる。このPCR技術は、例えば融合を促進し、さらに発現、移転および/またはクローニングのためのベクター（例えばプラスミド）へのクローニングを促進する制限酵素部位を含むオリゴヌクレオチドを用いる。

30

【0061】

融合遺伝子はバキュロウイルス発現ベクターでクローニングできる。L1を含む別のバキュロウイルス発現ベクターを作製できる。または、融合遺伝子は、既にL1を含むバキュロウイルス二重発現ベクターでクローニングできる。

【0062】

実施例2では、リコンビナントバキュロウイルス選別の典型的な方法が説明される。CsCl精製（またはそれに匹敵する）リコンビナントプラスミドをバキュロウイルスDNAとSf9昆虫細胞にリポフェクチン（またはそれと同等なもの）を用いて同時トランスフェクションさせることができる。続いて、通常のパキュロウイルスベクターおよび昆虫細胞培養方法を用いて、リコンビナントバキュロウイルスを（例えば）プラーク精製することができる。

40

【0063】

二重発現バキュロウイルスベクターの代わりに2種の単一発現バキュロウイルスを用いる方が有利であるかもしれない。この場合には、キメラVLPsはSf9細胞を2つのリコンビナントバキュロウイルス（1つはL1生成物を他方はL2融合生成物をコードする）で感染させることによって生成できる。該遺伝子を異なるベクターに配置することによって、産生されるL1生成物およびL2融合生成物量を操作することができる。このアプ

50

ローチは、VLPにおけるL2融合生成物のL1生成物に対する比を変化させることを可能にする。天然のピリオンではL2はL1に比べて少ない成分であるが、2種の単一発現ベクターを用いてVLPへのL2融合生成物のより大量の取り込みを達成することができる。

【0064】

実施例3で説明するように、キメラ粒子は塩化セシウム（または同等物）中でのバンド形成によって精製することができる。Sf9昆虫細胞にバキュロウイルスを例えば感染価10で感染させることができる。72時間後（またはその辺りで）、細胞を採取し燐酸緩衝食塩水中で60秒（またはその辺りで）音波破碎できる。低速（または同等な処理）で清澄にした後、溶解物を40%（重量/容積）の蔗糖/PBSクッション中で例えば110000×g、25時間遠心する（SW-28ローター）。再懸濁させた沈殿物を、例えば10-40%（重量/重量）のCsCl/PBS勾配中で室温で20時間141000×gで平衡に達するまで遠心する。目に見えるバンドを採取し、同一条件を用いて再び平衡となるまで遠心し、PBSに対して十分に透析して（例えば）4で保存する。

10

【0065】

実施例4に説明するように、キメラ複合体の同時沈降を、例えば分析用濃度勾配遠心で実施できる。例えば、12から45%蔗糖の段階勾配は4で一晩で直線化して透析したサンプルを最上部に重層し、この濃度勾配を41000rpm（288000×g）で2時間SW-41ローターで遠心する。分画を採集し、同時沈降について例えばウェスタンブロット分析または同時免疫沈澱によって分析する。

20

【0066】

実施例5で説明するように、同時沈降は例えば免疫沈澱によって達成される。

【0067】

実施例6で説明するように抗血清を作製できる。これは、文献に記載されたように(Dvo retskyら、Virology 103:369(1980))、BPV1中和アッセー（または同等なもの）を実施するために行なわれる。抗血清は例えば以下のように作製される。PBS中のCsCl勾配精製粒子330μl（濃度1mg/ml）を皮下注射してウサギを免疫する。続いて、最初の注射から2週間後および4週間後に同じ量の粒子でウサギを追加免疫する。

【0068】

実施例7で説明するようにBPV1中和アッセー（または同等なもの）を実施し、BPVキメラ粒子が形状エピトープを表示しているか否かを調べる。例えば2回目の追加免疫注射後3週間して得られた血清の段階希釈を=500フォーカス形成単位のBPV1ウイルスと30分保温し、このウイルスをC127細胞に1時間吸着させ、この細胞を3週間培養する。続いてフォーカスをメタノール中の0.5%メチレンブルー/0.25%石炭酸フクシンで染色する。キメラVLPsおよびコントロールBPV1-L2VLPsについて中和力価を得る。匹敵する中和力価は、キメラ粒子が適切に折り畳まれて有効に形状エピトープが表示されていることを示す。

30

【0069】

実施例8に説明するように、キメラ粒子は例えば透過型電子顕微鏡で調べることができる。例えば、精製粒子を炭素被覆グリッドに吸着させ、1%酢酸ウラニルで染色し、フィリップス電子顕微鏡モデルEM400Tで36000倍で調べる。キメラ粒子およびL1またはL1/L2VLPsの取り込み効率並びに形態を比較する。取り込みおよび形態が区別不可能であるということは、キメラ粒子の適切な自己集合組立を示唆する。

40

【0070】

実施例9で説明するように、キメラ粒子は、例えば融合パートナーエピトープに対して特異的な液性免疫誘導について調べられる。例えば、ウサギにキメラVLPsを接種する。例えば融合パートナー抗原サンプルをSDS-PAGEに、続いてウェスタンブロットティング分析に付してこの血清を抗体について調べる。免疫血清および免疫前血清（コントロール）を適切に希釈して用いることができる。免疫ウサギから得た血清によってウェスタンブロットで融合パートナーのバンドが検出されれば、融合パートナーエピトープに対

50

して特異的な抗体が誘導されたことが示唆される。

【0071】

実施例10で説明するように、例えばキメラVLPsをマウスに注射し抗原特異的T細胞増殖を測定することによって、融合ペプチドについて特異的な細胞性免疫の誘導についてキメラ粒子を調べる。

【0072】

実施例11で説明するように、L2融合は予防免疫を失わせないことを明らかにするために、例えばウサギをキメラCRPVLPsおよび非キメラCRPVLPs(コントロール)で免疫し、続いて感染性CRPVで試験感染させることによって、または、STD病原体を含むキメラVLPsで実験動物を免疫し、続いてSTDで試験感染させてから致死感染に対する生存の向上もしくは致死量以下の試験感染後の感染の減少を測定することによって、キメラ粒子を試験感染に対する予防免疫の誘導について調べることができる。

10

【0073】

実施例12で説明するように、例えばキメラCRPVLPsおよび非キメラCRPVLPs(コントロール)を用いて(既にパピローマをもつ)ウサギを免疫し、存在するパピローマの退縮を測定することによって、既に存在するパピローマに対する治療的免疫誘導についてキメラ粒子を調べることができる。

【0074】

実施例13で説明するように、例えば腫瘍の免疫療法および免疫的予防についてキメラ粒子を調べることができる。

20

【0075】

本発明の具体的な特徴は、特定の実施形態に本発明の範囲を限定することなく本発明の例示を目的とする以下の実施例を参考にいっそう容易に理解されよう。

【実施例】

【0076】

以下に、本発明の実施例を説明するが、本発明は以下の実施例になんら限定されるものではない。

(実施例1)

[キメラリコンビナントパキユロウイルスの作製]

30

3種のキメラを作製した: HPV16L2-HPV16E7、BPVL2-HPV16E7およびBPVL2-HPV16E7(アミノ酸1~30)。HPV16L2-HPV16E7は、HPV16L2のC-末端(アミノ酸473)に融合させた完全な長さのHPV16E7を含んでいた。BPVL2-HPV16E7は、BPVL2のC-末端(アミノ酸469)に融合した完全な長さのHPV16E7を含んでいた。BPVL2-HPV16E7(アミノ酸1~30)は、アミノ酸274と275の間でBPVL2の中央に融合させたHPV16E7の最初の30アミノ酸を含んでいた。

【0077】

L2-E7キメラ遺伝子はリコンビナントPCR技術(R. Higuchi(1990)、「PCRプロトコル:方法と応用の手引」(PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications)より、M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White編、(Academic, NY), pp. 177-180))によって作製した。完全な長さのHPV16E7を含むキメラについては、制限酵素部位を含む5'オリゴおよび、E7の5'オリゴと相補的な3'オリゴを用いてL2を増幅させた。それぞれ別個の反応で、L2の3'オリゴと相補的な5'オリゴ、および制限酵素部位を含む3'オリゴを用いてE7を増幅させた。続いて、外側(L2の5'およびE7の3')オリゴのみを用いて、L2およびE7遺伝子を第二のプライマー伸長反応で融合させた。HPV16E7のアミノ酸1~30のみを含むキメラについては、"内部"プライマーはHPV16E7の最初の30アミノ酸をコードした。

40

【0078】

続いて、融合遺伝子をパキユロウイルス二重発現ベクターpSynwtV1-(これは

50

ポリヘドロンプロモーター下でクローニングされた L 1 を既に含む (Kirnbauerら、Virol. 67:6929(1993)) で p S y n プロモーターの直ぐ下流でクローニングした。

【 0 0 7 9 】

B P V L 2 - H P V 1 6 E 7 キメラは 5 ' B g I I I から 3 ' B g I I I フラグメントとしてクローニングした。H P V 1 6 L 2 - H P V 1 6 E 7 キメラは 5 ' S s t I I から 3 ' S s t I I フラグメントとしてクローニングした。B P V L 2 - H P V 1 6 E 7 (完全な長さ) のために用いたプライマーは以下の通りであった: B P V L 2 のセンス (鎖) は、5'GCGGTAGATCTACCTATAAATATGAGTGCACGAAAAAGAGTAAAACGT3' (配列番号: 1)、アンチセンス (鎖) は、5'GCAATGTAGGTGTATCTCCATGCATGGCATGTTTCCGTTTTTTTCGTTTCTCAACAAGGAGGG3' (配列番号: 2) H P V 1 6 E 7、センスは、5'CCCTCCTTGTGAGGAAACGAAAAAACGGAAACATGCCATGCATGGAGATACACCTACATTGC3' (配列番号: 3) およびアンチセンスは 5'CCGCTAGATCTGGTACCTGCAGGATCAGCCATGG3' (配列番号: 4) B P V L 2 - H P V 1 6 E 7 (アミノ酸 1 ~ 3 0) のために用いたプライマーは以下の通りであった: B P V L 2、センスは上記と同じで、内部プライマーのアンチセンスは 5'CAGTTGTCTCTGGTTGCAAATCTAACATATATTCATGCAATGTAGGTGTATCTCCATGCATGGATGAAAACACTTCAGGATCTTCCGTGGGC3' (配列番号: 5)、内部プライマーのセンスは 5'GCATGAATATATGTTAGATTTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACTGTTATGAGCAATTAATGACCAAACATTTGCAAACCCACTGTATGAAGCAGAACC3' (配列番号: 6)、B P V L 2、アンチセンスは 5'CCGCTAGATCTAGGGAGATACAGCTTCTGGCCTTGTGGCCACAACGC3' (配列番号: 7) 。H P V 1 6 L 2 - H P V 1 6 E 7 キメラのために用いたプライマーは以下の通りであった: H P V 1 6 L 2、センスは 5'GCGGTCCGCGGAATATGCGACACAAACGTTCTGCAAACGCACAAAACGT3' (配列番号: 8)、およびアンチセンスは 5'ATCTCCATGCATGGCAGCCAAAGAGAC3' (配列番号: 9)、H P V 1 6 E 7、センスは 5'GTCTCTTTGGCTGCCATGCATGGAGAT3' (配列番号: 1 0)、およびアンチセンスは 5'GCTCCGCGGGTACCTGCAGGATCAGCC3' (配列番号: 1 1) 。

【 0 0 8 0 】

(実施例 2)

[リコンビナントバキュロウイルスの選別]

リポフェクチン (GIBCO/BRL 製、ガイザースバーグ、メリーランド) を用いて、C s C 1 精製リコンビナントプラスミドを S f 9 昆虫細胞 (A T C C , C R L 1 7 1 1) にバキュロウイルス D N A (Baculo-Gold; PharMingen 製、サンディエゴ、カリフォルニア) と同時トランスフェクションさせた (P.C. Harting, Biotechniques 11:310(1991))。リコンビナントバキュロウイルスは、記載 (M.D. Summers & G.E. Smith (1987)、*「バキュロウイルスベクターと昆虫細胞培養手順の手引」* (A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures)、Texas Agricultural Experiment Station Bulletin (Tex. Agric. Exp. Stn., College Station, TX)、1555 巻) にしたがってプラーク精製した。

【 0 0 8 1 】

(実施例 3)

[キメラ粒子の精製]

S f 9 昆虫細胞は、感染価 1 0 でリコンビナントバキュロウイルスで感染させられた。7 2 時間後、採取細胞を燐酸緩衝食塩水 (P B S) 中で 6 0 秒間音波で破碎した。低速で清澄にした後、溶解物を 4 0 % (重量 / 容積) の蔗糖 / P B S クッション中で 1 1 0 0 0 0 × g、2 5 時間遠心した (S W - 2 8 ローター)。再懸濁させた沈殿物を、1 0 ~ 4 0 % (重量 / 重量) の C s C 1 / P B S 勾配中で室温で 2 0 時間 1 4 1 0 0 0 × g で平衡に達するまで遠心した。目に見えるバンドを採取し、同一条件を用いて再び平衡となるまで遠心し、P B S に対して十分に透析して 4 で保存した。

【 0 0 8 2 】

(実施例 4)

[L 1 / L 2 - E 7 複合体の同時沈降]

L 2 - E 7 融合蛋白が粒子内に取り込まれているか否かを決定するために、分析用濃度勾配遠心を、L 1 および L 2 の同時集合組立について調べるために先に報告されたように

実施した(Kirnbauerら、Virology 67:6929(1993))。

【0083】

簡単に記せば、12から45%の蔗糖段階濃度勾配を4で一晚直線化させて透析サンプルを最上部に重層し、この濃度勾配をSW-41ローターで41000rpm(288000×g)で2時間遠心した。分画を採取し、これら分画をクーマシー染色SDS-PAGE(L1)またはウェスタンブロット分析(抗BPV L2ポリクローナル抗体または抗HPV 16 E7ポリクローナル抗体および¹²⁵I標識抗ウサギIgGを用いる)で調べた。

【0084】

キメラL2-E7とウイルス様粒子との結合は同時沈降分析によって確認された。

10

【0085】

(実施例5)

[L1/L2-E7複合体の同時免疫沈澱]

L2-E7融合蛋白はL1と安定な複合体を形成するという証拠を得るために、同時免疫沈澱実験を実施した。

【0086】

簡単に記せば、BPV L1/L2-HPV 16 E7(完全な長さ)およびBPV L1/L2-HPV 16 E7(アミノ酸1~30)VLP調製物を、PBS、1%トリトンRX-100中で抗L1モノクローナル抗体5B6(Rodenら、J. Virology 印刷中(1994年11月))、抗L1ポリクローナル抗体、免疫前血清または無関係抗体(抗E1Aモノクローナル抗体)および蛋白Aセファロースを用いて免疫沈澱させ、さらにSDS-PAGEに付した。蛋白を免疫ブロッティングに付し、抗BPV L2もしくは抗HPV 16 E7血清または抗HPV 16 E7モノクローナル抗体(Triton Diagnostics製、アラメダ、カリフォルニア)をプローブとして調べた。

20

【0087】

キメラL2-E7とウイルス様粒子との結合は同時免疫沈澱によって確認された。

【0088】

(実施例6)

[抗血清の作製]

PBS中で1mg/mlの濃度の330μlのCsCl濃度勾配精製粒子を皮下注射してウサギを免疫した。最初の注射から2週間および4週間後で同じ量の粒子でウサギを追加免疫した。

30

【0089】

(実施例7)

[BPV 1中和アッセー]

報告(Kirnbauerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:12180(1992))にしたがってフォーカス形成アッセーを実施した。

【0090】

簡単に記せば、2回目の追加免疫注射の3週間後に得たウサギの血清の段階希釈を、=500フォーカス形成単位のBPV 1ウイルスと30分保温し、このウイルスをC127細胞に1時間吸着させ、さらにこの細胞を3週間培養した(Dvoretzkyら、Virology 103:369(1990))。フォーカスをメタノール中の0.5%メチレンブルー/0.25%石炭酸フクシンで染色した。

40

【0091】

30000に匹敵する中和力価がBPV L1/L2VLPsおよびBPV L1/L2-HPV 16 E7(完全な長さ)キメラVLPsについて得られた。

【0092】

(実施例8)

[電子顕微鏡]

透過型電子顕微鏡観察を報告(Kirnbauerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:12180(1

50

992)) にしたがって実施した。

【0093】

簡単に記せば、精製粒子を炭素被覆グリッドに吸着させ、1%酢酸ウラニルで染色し、フィリップス電子顕微鏡モデルEM400Tで36000倍で調べた。

【0094】

L2-E7融合蛋白を含む粒子は、形態および取り込み効率に関してL1VLPsまたはL1/L2VLPsと区別できないことが分かった。

【0095】

(実施例9)

[抗体の誘導]

BPV L1/L2-HPV16E7パピローマウイルス様粒子を接種したウサギはE7を認識する抗血清を産生した。

【0096】

E7特異性について血清を調べるために、2.5μgのHPV16E7および2.5μgのBSA(コントロール)をSDS-PAGEに付し、続いてウェスタンブロッティングで調べた。免疫血清および免疫前血清(コントロール)を1:10の希釈で用いた。

【0097】

免疫ウサギから得た血清はウェスタンブロットでHPV16E7蛋白バンドを特異的に検出し、E7エピトープに特異的な抗体の誘導を示唆した。

【0098】

(実施例10)

[細胞性免疫の誘導]

E7ペプチドに特異的な細胞性免疫の誘導について、例えばキメラVLPsをマウスに注射し、抗原特異的T細胞増殖を測定することによって、キメラ粒子を調べた。

【0099】

(実施例11)

[予防的免疫]

キメラ粒子を、試験感染に対する予防的免疫の誘導について調べる。例えばE7キメラCRPVVLPsおよび非キメラCRPVVLPs(コントロール)でウサギを免疫し、続いて感染性CRPVで試験感染させて、L2-E7融合が予防的免疫を失わせないことを示すか、またはSTD病原体を含むキメラVLPsで実験動物を免疫し、続いてSTD病原体で試験感染させ、致死感染に対する生存度の向上または致死量以下の試験感染後の感染の減少を測定する。

【0100】

(実施例12)

[治療的免疫]

例えば、ウサギ(既にパピローマをもつ)をE7キメラCRPVVLPsおよび非キメラCRPVVLPs(コントロール)で免疫し、既に存在するパピローマの退縮を測定することによって、既に存在するパピローマに対する治療的免疫の誘導についてキメラ粒子を調べる。

【0101】

(実施例13)

[腫瘍の免疫療法および免疫予防]

例えば、実験動物(例えばマウス)で既に存在する腫瘍を治療する能力、または腫瘍の発達を予防する能力について、例えばE7を発現している腫瘍細胞を用いてキメラ粒子を調べる。動物を、例えばL2-E7キメラVLPsで免疫し、例えばE7を発現している接種腫瘍原性細胞の増殖について調べる。このアプローチは、非複合E7および補助刺激蛋白で免疫した動物で機能することが示された(Chenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:110(1991))。

【0102】

10

20

30

40

50

(実施例14)

[キメラVLPsの表面への誘導]

細胞表面に結合する例えば補助刺激物質またはリガンドのようなある種の分子は、キメラVLPsの表面に存在することが望ましいかもしれない。ローデンら(Rodenら、J. Virol. 印刷中(1994年、11月))は、L2の領域はVLPsの表面存在することを見出した。BPVL2アミノ酸44~173を含むペプチドは、ウサギに接種されたとき、1:1000の血清希釈で活性を有する中和抗体を誘導した。これらの結果は、L2の領域は中和エピトープを明示し、さらにこれらの領域は天然のビリオン表面に接近できることを示唆している。したがって、非L2ポリペプチドをこれらの領域の1つに融合させることによって、おそらくこのペプチドをキメラVLP表面に誘導することができるであろう。

10

【配列表】

2007143560000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年2月27日(2007.2.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

パピローマウイルスの形状エピトープを有し、パピローマウイルスL1融合生成物を含むパピローマウイルス様粒子を生成させる方法であって、宿主細胞が合成DNA分子を発現させる条件を提供し、前記パピローマウイルス様粒子を生成させる工程を含み、

前記宿主細胞は合成DNA分子により形質転換された宿主細胞であって、

前記合成DNA分子は、パピローマウイルスL1融合生成物をコードし、前記形質転換された宿主細胞において、発現を誘導可能な遺伝子発現系をさらに含み、

前記パピローマウイルスL1融合生成物は、L1蛋白質配列由来のアミノ酸鎖、およびL1蛋白質以外の蛋白質由来のアミノ酸鎖からなる融合パートナーを含む、

パピローマウイルス様粒子を生成させる方法。

【請求項2】

前記パピローマウイルス様粒子を、前記宿主細胞から回収する方法をさらに含む、請求項1に記載のパピローマウイルス様粒子を生成させる方法。

【請求項3】

前記DNA分子が昆虫形質転換宿主細胞において発現を誘導可能な遺伝子発現系をさらに含み、前記DNA分子がさらに昆虫細胞ベクターを含む、又は、前記DNA分子が哺乳類形質転換宿主細胞において発現を誘導可能な遺伝子発現系をさらに含み、前記DNA分子がさらに哺乳類細胞ベクターを含む、又は、前記DNA分子が酵母形質転換宿主細胞において発現を誘導可能な遺伝子発現系をさらに含み、前記DNA分子がさらに酵母細胞ベクターを含む、請求項1に記載のパピローマウイルス様粒子を生成させる方法。

フロントページの続き

(74)代理人 100090516

弁理士 松倉 秀実

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(72)発明者 ローウィ、 ダグラス アール、

アメリカ合衆国 20814 メリーランド州 ベセスダ サウス チェルシー レーン 4709

(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 グリーンストーン、 ヘザー、

アメリカ合衆国 20910 メリーランド州 シルバー スプリング ストラットン ロード 1901

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 DA02 EA02

EA04 GA11 GA18 HA04 HA08 HA14

4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA44 CA46

4C085 AA03 AA16 BA76 CC08 DD62 EE01

专利名称(译)	乳头状瘤病毒样嵌合颗粒		
公开(公告)号	JP2007143560A	公开(公告)日	2007-06-14
申请号	JP2007047248	申请日	2007-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	科尔多瓦轨迹仪器美利坚合众国为卫生复制禅特德遮阳秘书部和人力爵士可见我的		
申请(专利权)人(译)	美利坚合众国的Gavamento, AS复制禅泰德局局长, 卫生和人类Savisuizu系		
[标]发明人	ローウィダグラスアール シラージョンティー グリーンストーンヘザー		
发明人	ローウィ、ダグラスアール. シラー、ジョンティー. グリーンストーン、ヘザー.		
IPC分类号	C12N7/00 C12N15/09 A61K39/12 A61P31/20 A61P35/00 A61K39/00 A61K39/23 A61P17/12 A61P31/12 C07K14/025 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/04 C12N15/37 C12P21/02 C12Q1/70 C12R1/91 C12R1/93 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A01K2227/10 A61K39/00 A61K2039/525 A61K2039/5258 A61P17/12 C07K14/005 C07K2319/00 C12N7/00 C12N2710/14143 C12N2710/20022 C12N2710/20023 C12N2710/20034 C12N2800/30 Y10S977/803 Y10S977/918		
FI分类号	C12N7/00.ZNA C12N15/00.A A61K39/12 A61P31/20 A61P35/00 C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA04 4B024/HA08 4B024/HA14 4B065/AA90X 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA16 4C085/BA76 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	08/319467 1994-10-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供嵌合乳头状瘤病毒样颗粒保持引入或检测免疫反应的能力。ŽSOLUTION：乳头瘤病毒样颗粒具有乳头瘤病毒样颗粒的构象表位，包含人或牛乳头瘤病毒，其中融合配偶体是乳头瘤病毒E6或E7肽。Ž