

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02008/018555

発行日 平成22年1月7日 (2010.1.7)

(43) 国際公開日 平成20年2月14日 (2008.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/02 (2006.01)	C07K 14/02 ZNA	4B024
C07K 5/06 (2006.01)	C07K 5/06	4B064
C07K 5/08 (2006.01)	C07K 5/08	4C076
C07K 5/10 (2006.01)	C07K 5/10	4H045
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

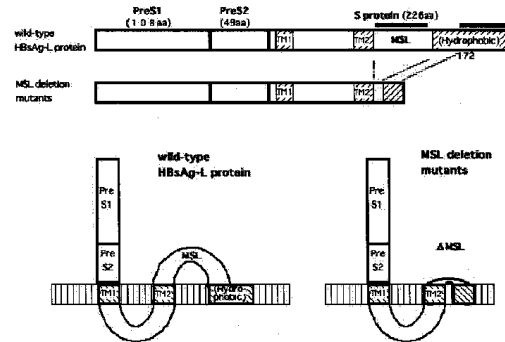
出願番号 特願2008-528881 (P2008-528881)	(71) 出願人 504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2007/065646	
(22) 国際出願日 平成19年8月9日 (2007.8.9)	
(31) 優先権主張番号 特願2006-220346 (P2006-220346)	(74) 代理人 100065215 弁理士 三枝 英二
(32) 優先日 平成18年8月11日 (2006.8.11)	(74) 代理人 100099988 弁理士 斎藤 健治
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100108084 弁理士 中野 睦子
	(74) 代理人 100115484 弁理士 林 雅仁
	(72) 発明者 山田 一朗 岡山県岡山市芳賀5303 株式会社ビー クル内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低抗原性のHBsAg粒子及びその作製法

(57) 【要約】

本発明は、より抗原性/免疫原性の低い中空ナノ粒子及びその構成タンパク質、該タンパク質を構成要素とする粒子並びにその調製法を提供する。具体的には、本発明は、Sポリペプチド部分を含むヒトB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質(HBsAg)において、該Sポリペプチド部分の少なくとも105位~148位のアミノ酸を欠失していることを特徴とする、HBsAgタンパク質改変体に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S ポリペプチド部分を含むヒトB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質 (HBsAg) において、該S ポリペプチド部分の少なくとも105位～148位のアミノ酸を欠失していることを特徴とする、HBsAgタンパク質改変体。

【請求項 2】

前記HBsAgタンパク質改変体がさらに細胞認識部分を含む、請求項1に記載のHBsAgタンパク質改変体。

【請求項 3】

S ポリペプチド部分において、さらに以下の(a)～(c)の少なくとも1種の欠失を有する請求項1に記載のHBsAgタンパク質改変体：

- (a) 101～104位の少なくとも1個のアミノ酸の欠失、
- (b) 149～154位の少なくとも1個のアミノ酸の欠失、
- (c) HBsAgのC末端の54個のポリペプチドにおける少なくとも1個のアミノ酸の欠失。

【請求項 4】

HBsAgタンパク質改変体が、S ポリペプチド部分に加えて、PreS部分の非細胞認識部位又はその一部を含み、さらに、PreS部分に由来する肝細胞認識部分、抗体、成長因子、サイトカイン、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプター、ウイルスおよび微生物に由来する分子並びに糖鎖からなる群から選ばれる少なくとも1種の細胞認識部分を含む、請求項1に記載のHBsAgタンパク質改変体。

【請求項 5】

105位～148位を含む欠失部位に、リンカーペプチドを有する請求項1に記載のHBsAgタンパク質改変体。

【請求項 6】

リンカーペプチドが、2～4個のアミノ酸残基からなる請求項5に記載のHBsAgタンパク質改変体。

【請求項 7】

リンカーペプチドが、ヘリックスを壊すアミノ酸残基 (Gly, Pro, Asn, Tyr)、ターン構造に多いアミノ酸残基 (Asn, Gly, Pro, Asp, Ser, Trp)、膜界面に留まりにくいアミノ酸残基 (Glu, Asp, Lys, His, Arg, Gln, Pro, Asn) からなる群から選ばれるアミノ酸の組み合わせからなる請求項5に記載のHBsAgタンパク質改変体。

【請求項 8】

リンカーペプチドが、PD、QE、PSSSまたはPDNGである請求項5に記載のHBsAgタンパク質改変体。

【請求項 9】

請求項1～8のいずれかに記載のHBsAgタンパク質改変体を構成要素とする、HBsAg中空粒子。

【請求項 10】

請求項1～8のいずれかに記載のHBsAgタンパク質改変体をコードする遺伝子を含む発現ベクターを真核生物細胞に導入して該細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養し、請求項9に記載のHBsAg粒子を回収することを特徴とする、HBsAg粒子の製造方法。

【請求項 11】

請求項9に記載のHBsAg中空粒子の内部に、DNA、RNA、タンパク質、脂質、糖質、標識物質、薬物、細胞内で機能し得る生理活性物質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質を有する物質運搬体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、低抗原性のHBsAg粒子及びその作製法に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

近年医学の分野において、目的細胞あるいは目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し目的箇所のみで作用発現させる事を目的とするドラッグデリバリーシステム（DDS）が注目されている。我々は目的細胞あるいは目的組織に対して特異的に薬剤を送達しうる有効なDDSとして、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識部位が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に物質を特異的かつ安全に運搬する方法を提案してきた(特許文献1～4)。

【 0 0 0 3 】

しかし、この中空ナノ粒子を形成するタンパク質として利用しているウィルス外皮タンパク質は、人体内に投与された時ウィルス同様の抗原性と抗体誘導能を示してしまう。そのため、1) 該ウィルス感染患者や該ウィルスワクチン投与によりすでに抗ウィルス抗体を保有している患者では、投与された中空ナノ粒子が抗ウィルス抗体により中和されるために、2) 中空ナノ粒子を連続投与した場合には、自身に対する抗体が誘導されてその抗体により中和されるために、投与された中空ナノ粒子が目的とする薬剤送達能を発揮できない可能性がある。さらに、副作用としてアナフィラキシーの懸念も排除できない。そのため、この抗原性および免疫原性の克服は、中空ナノ粒子の医薬応用のための課題となっていた。

10

【特許文献1】W003/82344

【特許文献2】特開2003-286198

【特許文献3】特開2004-2313

20

【特許文献4】W003/82330

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

本発明の目的は、より抗原性/免疫原性の低い中空ナノ粒子及びその構成タンパク質、該タンパク質を構成要素とする粒子並びにその調製法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

本発明者は、粒子形成能を有するB型肝炎ウイルス外皮タンパク質（B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質:HBsAg）配列から、中空粒子表面に存在し、抗原エピトープになりやすく、かつ粒子形成能を損なわない配列を欠失させる事により、抗原性および免疫原性の低い中空ナノ粒子を形成し得ることを見出した。

30

【 0 0 0 6 】

本発明は、以下の発明を包含する。

1. Sポリペプチド部分を含むヒトB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質（HBsAg）において、該Sポリペプチド部分の少なくとも105位～148位のアミノ酸を欠失していることを特徴とする、HBsAgタンパク質改変体。

2. 前記HBsAgタンパク質改変体がさらに細胞認識部分を含む、項1に記載のHBsAgタンパク質改変体。

3. Sポリペプチド部分において、さらに以下の(a)～(c)の少なくとも1種の欠失を有する項1または2に記載のHBsAgタンパク質改変体：

(a) 101～104位の少なくとも1個のアミノ酸の欠失、

(b) 149～154位の少なくとも1個のアミノ酸の欠失、

(c) HBsAgのC末端の54個のポリペプチドにおける少なくとも1個のアミノ酸の欠失。

4. HBsAgタンパク質改変体が、Sポリペプチド部分に加えて、PreS部分の非細胞認識部位又はその一部を含み、さらに、PreS部分に由来する肝細胞認識部分、抗体、成長因子、サイトカイン、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプター、ウィルスおよび微生物に由来する分子並びに糖鎖からなる群から選ばれる少なくとも1種の細胞認識部分を含む、項1～3のいずれかに記載のHBsAgタンパク質改変体。

5. 105位～148位を含む欠失部位に、リンカーペプチドを有する項1～4のいずれかに

40

50

記載のHBsAgタンパク質改変体。

6. リンカーペプチドが、2～4個のアミノ酸残基からなる項5に記載のHBsAgタンパク質改変体。

7. リンカーペプチドが、ヘリックスを壊すアミノ酸残基(Gly, Pro, Asn, Tyr)、ターン構造に多いアミノ酸残基(Asn, Gly, Pro, Asp, Ser, Trp)、膜界面に留まりにくいアミノ酸残基(Glu, Asp, Lys, His, Arg, Gln, Pro, Asn)からなる群から選ばれるアミノ酸の組み合わせからなる項5又は6に記載のHBsAgタンパク質改変体。

8. リンカーペプチドが、PD、QE、PSSSまたはPDNGである項5～7のいずれかに記載のHBsAgタンパク質改変体。

9. 項1～8のいずれかに記載のHBsAgタンパク質改変体を構成要素とする、HBsAg中空粒子。 10

10. 項1～8のいずれかに記載のHBsAgタンパク質改変体をコードする遺伝子を含む発現ベクターを真核生物細胞に導入して該細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養し、項9に記載のHBsAg粒子を回収することを特徴とする、HBsAg粒子の製造方法。

11. 項9に記載のHBsAg中空粒子の内部に、DNA、RNA、タンパク質、脂質、糖質、標識物質、薬物、細胞内で機能し得る生理活性物質からなる群から選ばれる少なくとも1種の物質を有する物質運搬体。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、抗原性の低い中空ナノ粒子を高収率で得ることができ、該中空ナノ粒子は、細胞への遺伝子、タンパク質などの物質導入能に優れている。 20

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】野生型エンベロープタンパク質(HBsAg Lタンパク質)とMSL欠損変異体の構造

【図2】各種MSL欠失Lタンパク質発現ベクターの構築

【図3】MSL欠損変異体とヤギ抗HBsAg抗体との反応性M6-d54-3xFLAG(HBsAg陽性対照、PC)、MSL(108-148)/PD-d54、MSL(108-148)/QE-d54各変異体発現ベクターでトランスフェクトしたCos7細胞を抗FLAG-tag抗体を用いたwestern blottingとヤギ抗HBsAg抗体を用いたwestern blottingで解析した。陽性対照M6-d54-3xFLAG変異体と比較して、MSL欠損変異体タンパク質は抗FLAG抗体では同程度検出されるのに対し、抗HBsAg抗体ではほとんど検出されなかった。 30

【図4】WT-d54-3xFLAG、MSL(105-148)/PD-d54、MSL(105-152)/PD-d54、MSL(105-154)/PD-d54粒子を抗HBsAg抗体(下段)と抗FLAG抗体(上段)によるウエスタンブロッティングで検出した。右表は、左図の各バンドの濃さをイメージソフトで数値化し、陽性対照(WT-d54-3xFLAG)を100として表記した。欠失変異体のバンドは、抗FLAG抗体ではWT-d54-3xFLAGと同等の以上に反応したが、抗HBsAg抗体に対する反応性は欠損領域が広くなるにつれ低下した。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

上記の中空ナノ粒子形成のために利用し得る変異タンパク質として、ヒトB型肝炎ウイルス外皮タンパク質(表面抗原タンパク質、HBsAg)が挙げられる。 40

【0010】

B型肝炎ウイルス表面抗原Lタンパク質(HBsAgL)は、粒子形成能力と標的細胞認識能力を有する。HBsAgLタンパク質はN末端側のPreS領域とC末端側のSタンパク質領域からなる。このうちPreS領域は標的細胞(ヒト肝細胞)認識能力を担うが、標的組織を変換した中空ナノ粒子作成の際には、別の標的認識配列と置換される。従って、PreS領域は中空ナノ粒子全てに共通する領域ではない。一方、Sタンパク質部分は粒子構造形成に関与することから、中空ナノ粒子全てに共通する。

HBsAgに包含され、S粒子の構成要素であるSタンパク質(226アミノ酸)は、粒子形成能を有している。Sタンパク質に55アミノ酸からなるPre-S2を付加したのがMタンパク質(M粒子) 50

の構成蛋白)であり、M蛋白に108アミノ酸(サブタイプy)または119アミノ酸(サブタイプd)からなるPre-S1を付加したものがLタンパク質(L粒子の構成蛋白)である。なお、本願明細書では特に断らない限り、Pre-S1領域のアミノ酸位置の番号付けは、108アミノ酸のサブタイプyに基づいて行う。

【0011】

HBsAgは、adr型、adw型、ayw型の3種類のタイプがあり、Pre-S1のadr型は108 a.a.、adw型は115 a.a.、ayw型は119 a.a.である。Pre-S2は、adr型、adw型、ayw型ともに、55 a.a.である。さらに、Sは、adr型、adw型、ayw型ともに、226 a.a.である。

【0012】

adr型のLタンパク質(配列番号45)は、Pre-S1(108 a.a.)、Pre-S2(55 a.a.)、S(226 a.a.)からなる389アミノ酸のタンパク質である。

【0013】

なお、本明細書において、pGLDLIIP39-RcTのLタンパク質(Pre-S1 108 a.a.、Pre-S2 49 a.a.、S 226 a.a.)は、配列番号45のadr型のLタンパク質において152位-157位のSIFSRTの6個のアミノ酸残基(プロテアーゼ感受性配列)が欠失したものである。

【0014】

Lタンパク質、Mタンパク質はSタンパク質と同様に粒子形成能を有している。従って、Pre-S1およびPre-S2の2つの領域は任意に置換、付加、欠失、挿入を行ってもよい。例えばPre-S1領域の3から77アミノ酸残基に含まれる肝細胞認識部位を欠失させた改変タンパク質を用いることで、肝細胞認識能を失った中空粒子を得ることができる。また、Pre-S2領域にはアルブミンを介して肝細胞を認識する部位が含まれているので、このアルブミン認識部位を欠失させることもできる。

【0015】

B型肝炎ウイルスタンパク質またはその改変体としてLタンパク質、Mタンパク質などの肝細胞を認識可能なタンパク質から構成される中空バイオナノ粒子の場合には、細胞認識部位を導入する必要はない。一方、Pre-S1領域の3から77アミノ酸残基に含まれる肝細胞認識部位を欠失させた改変タンパク質、或いはPre-S1とPre-S2の両方の領域を欠失させたタンパク質から構成される中空バイオナノ粒子の場合、そのままでは細胞認識ができないので、細胞認識部位を導入して、肝細胞以外の任意の細胞を認識させ、前記ポリマー/核酸複合体を種々の標的細胞に導入することができる。このような特定の細胞を認識する細胞認識部位としては、例えば成長因子、サイトカイン等のポリペプチドからなる細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するためのポリペプチド分子、ウイルスおよび微生物に由来するポリペプチド分子、抗体、糖鎖などが好ましく用いられる。具体的には、癌細胞に特異的に現れるEGF受容体やIL-2受容体に対する抗体やEGF、またHBVの提示するレセプターも含まれる。或いは、抗体Fcドメインを結合可能なタンパク質(例えば、ZZタグ)、ストレプトアビジンを介してビオチン標識した生体認識分子を提示するためにビオチン様活性を示すストレプトタグなどを使用することもできる。

【0016】

細胞認識部位がポリペプチドである場合には、B型肝炎ウイルスタンパク質またはその改変体をコードするDNAと細胞認識部位をコードするDNAを必要に応じてスパーサーペプチドをコードするDNAを介してインフレーションに連結し、これをベクター等に組み込み、真核細胞で発現させることにより、任意の標的細胞を認識する中空バイオナノ粒子を得ることができる。

【0017】

細胞認識部位が抗体である場合、B型肝炎ウイルスタンパク質またはその改変体をコードするDNAとZZタグをコードするDNAを必要に応じてスパーサーペプチドをコードするDNAを介してインフレーションに連結し、これをベクター等に組み込み、真核細胞で発現させ、得られた中空バイオナノ粒子と標的細胞を認識し得る抗体を混合することにより、目的とする、中空バイオナノ粒子を得ることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

細胞認識部位が糖鎖の場合、糖転移酵素を使用して、細胞認識能を持たない中空バイオナノ粒子にシアリルルイス X などの細胞を認識可能な糖鎖を連結することにより、得ることができる。

【 0 0 1 9 】

HBsAg Lタンパク質の上記Pre-S (Pre-S1、Pre-S2) は、HBVが肝細胞に結合する際に重要な役割を担う。一方、Sタンパク質部分は、粒子構造形成能を持つ。Sタンパク質は、8 - 26 残基部および80 - 98 残基部に膜貫通helix (transmembrane配列、N末端側よりTM1 およびTM2) を持ち、C末端部156 - 226 残基にも非常に高い疎水性を示す膜相互作用領域を持つ。TM2とC末端疎水部に挟まれた領域 (Sタンパク質の99 ~ 154 残基) は、HBsAg粒子の外側に出ており、そのため抗HBsAg抗体に認識されるエピトープがこの領域に多いことから、major surface loop (以下MSLと略す) あるいはmajor antigenic loop と呼ばれる。また、C末端疎水領域(156-226)にも抗体認識エピトープがマッピングされている。HBsAg Lタンパク質、HBsAg Mタンパク質、あるいはHBsAg Sタンパク質を真核細胞で発現させると、同タンパク質は小胞体膜上に膜タンパク質として合成蓄積され、その後分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら出芽形式でルーメン側に粒子として放出され、最終的には培養上清中に分泌される。

10

【 0 0 2 0 】

抗体認識部位除去の方法としては、特定の主要抗原エピトープに対応するアミノ酸残基を置換する事により抗原性および免疫原性を減弱できることも報告されているが、広範囲に渡って複数箇所存在する他の抗原エピトープに対する効果はほとんどないし、弱まったとは言え置換変異導入後の配列が抗原性を示す可能性も排除できない。

20

【 0 0 2 1 】

そこで、これらの抗体認識部位をコードする配列そのものをできる限り大きく欠失させた中空ナノ粒子の作成を検討した結果、主要親水性領域ほぼ全域に相当する44アミノ酸(105-148)と、必要であればさらに(a) 101~104位、(b) 149~154位、(c) HBsAgのC末端の71個(156-226)のポリペプチドの少なくとも1個のアミノ酸の欠失とを組み合わせたHBsAg変異体が粒子を形成し得、かつ、粒子発現量も十分に高いことを見出した。

【 0 0 2 2 】

本発明では、105-148に加えて、101-104と149-154の一部又は全部を欠失し、必要に応じてリンカーアミノ酸/リンカーペプチドを導入することができる。好ましいリンカーの長さとしては、2~4個のアミノ酸が挙げられる。本発明の実施例では、欠失されるMSLの両側に、DNA構築の都合で導入される制限酵素サイト由来の置換配列(N末端側の1アミノ酸(Gly(G))と、C末端側の2アミノ酸Ser-Trp(SW); 合計3残基の置換)が導入される。この場合、リンカー配列を考える際には、MSL(108-148)PD変異体(MSL108-148欠損PDリンカー挿入)は、リンカー配列と置換配列を一体としてMSL(107-150)GPDSW変異体(MSL107-150欠損GPDSWリンカー挿入)と考えることもできる。このような、リンカーの両側に導入され得る制限酵素サイト由来の置換配列は、制限酵素(サイト)の選択、欠失されるアミノ酸配列の両側の塩基配列などにより変わり得る。

30

【 0 0 2 3 】

図1に示されるように、MSLを欠失させると、TM2(膜貫通ヘリックス2)とC末端疎水性領域とが連結される。この2つの構造の間には、まずTM2ヘリックス構造を打止め、そのC末端部を膜外に引っ張り出し、そして引き続きターンして、膜内に戻ってC末端疎水領域に繋げる配列を導入するのが望ましい。

40

【 0 0 2 4 】

リンカーの長さとしては、いわゆる折り返し構造は4残基であるが完全に折り返さない方がよい可能性もある事から、2~4残基が好ましく例示される。リンカーとして導入されるアミノ酸としては、ヘリックスを壊すアミノ酸残基(Gly, Pro, Asn, Tyr)、ターン構造に多いアミノ酸残基(Asn, Gly, Pro, Asp, Ser, Trp)、膜界面に留まりにくい(膜外に出易い)アミノ酸残基(Glu, Asp, Lys, His, Arg, Gln, Pro, Asn)の組み合わせが

50

挙げられ、特に限定されない。具体的には、Pro-Asp(PD)、Gln-Glu(QE)、Pro-Asp-Asn-Gly(PDNG)、Pro-Ser-Ser-Ser(PSSS)、Pro-Lys、Asp-Proなどが挙げられる。

【0025】

本発明において、Sタンパク質部分に含まれるCys残基をSer、Ala等の他のアミノ酸に置換することもできる。具体的には、76位、90位、107位、137位、149位のCysをSer、Ala等の他のアミノ酸に置換することができる。好ましい置換の例示としては、Cys76/Ala、Cys 90/Ala、Cys 107/Ser、Cys 137/Ser、Cys 139/Ser、Cys 149/Ser、Cys 221/Alaが例示される。

【0026】

非特許文献1には、S蛋白の107-146を欠失させることは記載されているが、その欠失タンパク質の製造効率、物質導入剤としての有用性などについては記載されていない。むしろ、遺伝子の導入効率はこの欠失により低下することが記載されている。

【非特許文献1】O'Malley B, Lazinski D. J Virol. 2002 Oct;76(19):10060-3

【0027】

本発明では、主要抗原ループに関して、105-148が欠失可能であり、101-104、149-154のアミノ酸、さらにはC末端疎水性領域のC末端側54アミノ酸残基領域の欠失が可能である。例えば、(101-154)あるいは(105-154)のアミノ酸配列の欠失が特に好ましい。本発明の目的から考えると、欠失領域は多ければ多いほど望ましい。

【0028】

HBsAg変異タンパク質などの粒子を構成するタンパク質には、特定の細胞を認識する分子をSタンパク質に直接或いはリンカーを介して連結し、あるいはPreS領域に導入することによって、標的細胞あるいは標的組織に特異的に物質を導入することもできる。このような特定の細胞を認識する分子としては、例えば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微生物に由来する分子、抗体、糖鎖(例えばシアリルルイスX)などが好ましく用いられる。具体的には、癌細胞に特異的に現れるEGF受容体やIL-2受容体に対する抗体やEGF、またHBVの提示するレセプターも含まれる。或いは、抗体Fcドメインを結合可能なタンパク質(例えば、ZZタグ)、ストレプトアビジンを介してビオチン標識した生体認識分子を提示するためにビオチン様活性を示すストレプトタグなどを使用することもできる。これらは、目的とする細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。細胞認識分子は、公知の方法に従いHBsAg変異タンパク質に導入できる。

【0029】

本発明の低抗原性の粒子は、真核細胞でHBsAg変異タンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。粒子の製造法は、特許文献1~4等に記載され、HBsAgの調製法は、Vaccine. 2001 Apr 30;19(23-24):3154-63. Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L (pre-S1 + pre-S2 + S) protein. Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, Tanaka H, Kawai T, Fukuda H, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S.に記載されている。

【0030】

真核細胞で本発明のHBsAg変異タンパク質を発現させると、該タンパク質は、小胞体膜上に膜蛋白として発現、蓄積され、ナノ粒子として放出されるので好ましい。真核細胞としては、哺乳類等の動物細胞(例えばCHO細胞)、昆虫細胞(バキュロウイルスを用いる発現系など)、酵母等が挙げられる。このような粒子は、HBVゲノムを全く含まないので、人体への安全性が極めて高い。また、必要に応じて細胞認識分子を粒子を構成するタンパク質の少なくとも一部に導入することにより、肝細胞或いは他の細胞に対する本発明のナノ粒子の細胞選択性を高めることができる。

【実施例】

【0031】

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳し

10

20

30

40

50

く説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能で有る事は言うまでもない。

【 0 0 3 2 】

以下の図 1 において、HBsAgとはHBVの外被タンパク質であるB型肝炎ウイルス表面抗原 (Hepatitis B virus surface Antigen) を示す。HBsAgは226個のアミノ酸から構成されるSタンパク質を含んでいる。Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸 (Pre-S2 peptide) が付加したものがMタンパク質、Mタンパク質のN末端側に108もしくは119アミノ酸 (PreS1 peptide) が付加したものがLタンパク質である (108アミノ酸が付加したものを図1に示す)。なお、以下の実施例では、L蛋白質として、N末端に分泌シグナル配列を付加し、PreS2領域内のプロテアーゼ感受性配列 (配列番号45の152 - 157位の6個のアミノ酸) を除去したものを使用した。

10

【 0 0 3 3 】

実施例 1 . Major surface loop (MSL) 欠失Lタンパク質発現ベクターの構築

(1) C末端に検出用FLAGタグ配列を付加したHBsAg Lタンパク質発現プラスミドの構築

MSL欠失変異体作成に先立ち、C末端に検出用エピトープタグ配列を融合したLタンパク質を作成した。すなわち、野生型Lタンパク質のC末端54アミノ酸を欠損させFLAGタグ配列を融合した変異体 (L-d54-FLAG) の動物発現用プラスミドpB0747をXhoIで切断し、FLAG-tag配列を2回含む合成DNA (配列番号1 & 2) を挿入連結することにより、FLAG-tag配列3回が融合したタンパク質 (L-d54-3xFLAG) 発現用プラスミドpB0982を構築した。さらに得られたプラスミドpB0982を鋳型として、L-d54-3xFLAG タンパク質のS領域に存在する13個のCys残基のうち6個をSer残基あるいはAla残基に置換した変異体 (M6-d54-3xFLAG) 発現用プラスミドpB0851を構築した。具体的には、Cys76/Ala、Cys 90/ Ala、Cys 107/Ser、Cys 137/ Ser、Cys 139/ Ser、Cys 147/ Ser、Cys 149/ Serの置換変異を導入した。なお、以後のアミノ酸配列番号は、Sタンパク質の配列番号である。

20

【 0 0 3 4 】

(2) MSL欠失Lタンパク質発現ベクターの構築

上記のM6-d54-3xFLAG発現用プラスミドpB0851を鋳型とし、合成DNA配列番号3 & 4 (表1) を用いた部位特異的変異導入により、Sタンパク質Cys107残基相当位置に制限酵素ApaIサイトを導入し、さらに合成DNA配列番号5 & 6 (表1) を用いた部位特異的変異導入を重ねて行う事によりCys149残基相当位置に制限酵素PvuIIサイトが導入されたプラスミドpB0900を得た。このpB0900を制限酵素ApaIとPvuIIで切断した後、表2に示す配列番号7 & 8、9 & 10、11 & 12、13 & 14の合成DNA4組を各々挿入連結することにより、Sタンパク質の第108-148残基を欠失し、リンカー配列としてPro-Asp(PD)、Gln-Glu(QE)、Pro-Asp-Asn-Gly(PDNG)、あるいはPro-Ser-Ser-Ser(PSSS) が挿入された4種のMSL欠失Lタンパク質変異体 (MSL(108-148)/QE-d54, MSL(108-148)/PD-d54, MSL(108-148)/PDNG-d54, あるいはMSL(108-148)/PSSS-d54) 発現ベクター (pB0940、pB0941、pB0942、pB0943) を構築した。

30

【 0 0 3 5 】

同様に、上記のMSL(108-148)/PD-d54発現用プラスミドpB0941を鋳型とし、表1に示す配列番号15 & 16、17 & 18、あるいは19 & 20の合成DNA3組を用いた部位特異的変異導入により、各々Leu98, Tyr100, Gly102に相当する位置に2つ目の制限酵素ApaIサイトを導入した後、得られたプラスミドDNAをApaIで切断し再結合させることによって、Sタンパク質MSL領域の第99-148残基、第101-148残基、あるいは第103-148残基を各々欠失させ、PDリンカー配列を挿入された3種のMSL欠失Lタンパク質 (MSL(99-148)/PD-d54, MSL(101-148)/PD-d54, MSL(103-148)/PD-d54) 発現ベクター (pB0987、pB0989、pB0991) を各々構築した。

40

【 0 0 3 6 】

また、上記で作成されたプラスミドDNA、pB0987、pB0989、pB0991、およびpB0941に、さらに表1の合成DNA配列番号21 & 22を用いた部位特異的変異導入を加える事により、Ser155残基相当位置へ制限酵素PvuIIサイトを導入した。得られたプラスミドDNAを制限

50

酵素ApaIとPvuIIで切断した後、表2の合成DNA配列番号9 & 10を挿入連結させることにより、MSL領域第99-154残基、第101-154残基、第103-154残基、あるいは第108-154残基を各々欠失しPDリンカー配列が挿入された合計4種のMSL欠失Lタンパク質(MSL(99-154)/PD-d54, MSL(101-154)/PD-d54, MSL(103-154)/PD-d54, MSL(108-154)/PD-d54)発現ベクター(pBO995、pBO997、pBO999、pBO1003)を構築した。

【0037】

さらに、上記のMSL(108-148)/PD-d54 およびMSL(108-154)/PD-d54発現用プラスミド(pBO941、pBO1003)を鋳型とし、表1の合成DNA配列番号21 & 22を用いた部位特異的変異導入により3残基(Pro105, Val106, Gly107残基)を欠失させることにより、Sタンパク質の第105-148残基あるいは第105-154残基を欠失し、PDリンカー配列が挿入された2種のMSL欠失Lタンパク質(MSL(105-148)/PD-d54, MSL(105-154)/PD-d54)発現ベクター(pBO993、pBO1001)を各々構築した。

【0038】

なお、上記と同様の方法により、部位特異的変異導入に使用される合成DNAを代えることにより、本発明に包含される他の変異HBsAgを得ることができる。

【0039】

以上により構築されたMSL欠失Lタンパク質発現ベクターの名称と、コードされるMSL欠失Lタンパク質の名称、および欠失部位周辺のアミノ酸配列を表3に示す。

【0040】

実施例2

(1) MSL欠失Lタンパク質粒子の動物細胞による発現

サル腎由来細胞株COS7は、ウシ胎児血清(FBS)5%を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で、37℃、5%CO₂存在下で培養した。COS7細胞を1×10⁵ cells/mlとなるように10%FBS含有DMEMに浮遊し、3.5cmディッシュへ2mlずつ播種して14~16時間培養した。1.5mlチューブにDMEM 95μlとトランスフェクション試薬FuGene6(Roche Diagnostics社)4μlとを混合した後、実施例1で構築した各MSL欠失Lタンパク質発現プラスミドDNA(1μg/μl溶液)を1μl加えて混合した。室温で15分放置して複合体を形成させた後、その全量を上記COS7細胞に添加した。14~16時間培養した後、培地を1.5mlの無血清培地CHO-S-SFMI1(インビトロジェン社)に交換し、さらに2日間培養後、培養上清と細胞を各々回収した。

【0041】

(2) 抗FLAG抗体を用いた酵素免疫測定法(FLAG-ELISA)によるMSL欠失L粒子の定量

マウス抗FLAG M2抗体(Sigma社)を固相に、ビオチン化抗FLAG M2抗体(Sigma社)と西洋ワサビパーオキシダーゼ(HRP)標識ストレプトアビジン(Prozyme社)とを液相に用いた酵素免疫測定法(FLAG-ELISA)により、培養上清あるいは細胞抽出液中のMSL欠失L粒子濃度を測定した。被検試料、液相抗体および液相標識体の希釈には、1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むTBS(150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.5)を用い、96wellマイクロプレート表面のブロッキングには5%スキムミルクを含むTBSを用いた。HRP基質にはo-フェニレンジアミン溶液(0.4mg/ml o-フェニレンジアミン, 23mM クエン酸, 51.4mM Na₂HPO₄, 0.0012% H₂O₂)を用い、495nmにおける吸光度測定により定量した。野生型L粒子発現COS7細胞培養上清を陰性コントロールとして、L-d54-3xFLAG粒子発現COS7細胞培養上清を陽性コントロールとして、各々用いた。

【0042】

回収した各MSL欠失Lタンパク質発現COS7細胞培養上清を2倍~4倍希釈した後、上記FLAG-ELISAで測定した結果を表4および表5に示す。MSL(108-148)欠失体で挿入リンカー配列の影響を比較した場合(表4)、4アミノ酸残基挿入型(PSSS、PDNG)よりも2アミノ酸残基挿入型(QE、PD)の方が粒子分泌量が多かった。またPD挿入型でMSL欠失領域を比較した場合(表5)、MSL(105-154)欠失L蛋白質が最も高い粒子分泌量(WT-d54-3xFLAGの1.65倍)を示した。一方、MSL(99-148)およびMSL(99-154)欠失Lタンパク質およびMSL(108-148)およびMSL(108-154)欠失Lタンパク質の分泌量は低かった。その他はWT-d54-3xFL

10

20

30

40

50

LAGの59-108%の粒子分泌量を示した。

【0043】

実施例3 MSL欠失L粒子と抗HBsAg抗体との反応性

(1) HBsAg診断用キットによる検出

IMX HBsAg アッセイシステム(ダイナボット社)はマウス抗HBsAgモノクローナル抗体とビオチン化ヤギ抗HBsAgポリクローナル抗体およびアルカリフォスファターゼ(AP)標識抗ビオチン抗体を用いた酵素免疫測定法に基づくHBsAg自動測定システムであり、HBV感染の血液診断に用いられている。このシステムを用いて、培養上清中に分泌された各種MSL欠失L粒子と抗HBsAg抗体との反応性を測定した。回収したMSL欠失Lタンパク質発現COS7細胞培養上清を1%FBSを含むダルベッコリン酸緩衝液(PBS)で2倍希釈後測定した結果、い

10

【0044】

(2) ウェスタンブロッティングによる検出

回収したM6-d54-3xFLAG粒子発現COS7細胞あるいは各MSL欠失Lタンパク質発現COS7細胞をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、PVDF膜に転写した。PVDF膜を5%スキムミルクでブロッキングした後、ビオチン化抗FLAG M2抗体あるいはビオチン化ヤギ抗HBsAgポリクローナル抗体(ダイナボット社IMX HBsAg アッセイシステム液相抗体)とHRP標識ストレプトアビジンを用いて解析した(図3)。M6-d54-3xFLAGは抗FLAG抗体で検出した場合

20

も抗HBsAg抗体で検出した場合も40kDa付近に明瞭なバンドを示した。しかしMSL欠失Lタンパク質変異体(MSL(108-148)/QE-d54およびMSL(108-148)/PD-d54)では抗FLAG抗体では明瞭なバンドが検出されたが、抗HBsAg抗体では明瞭なバンドが検出されなかったことから、ヤギ抗HBsAgポリクローナル抗体に対する反応性の低下が示された。

【0045】

【表1】

	抗FLAG抗体 反応性%	抗HBsAg抗体 反応性%
WT Δ54-3xFLAG	100	100
MSL(105-148)/PD-Δ54	170	100
MSL(105-152)/PD-Δ54	150	78
MSL(105-154)/PD-Δ54	132	53

30

【0046】

(3) ヒト抗HBsAg血清との反応性

ヘブスプリン(ウェルファイド社)は抗HBsAg抗体陽性患者血清より調製された抗HBsAgヒト免疫グロブリン製品である。このヒト抗HBsAgポリクローナル抗体によりMSL欠失L粒子が認識されるかどうかを、ウェスタンブロッティングおよび酵素免疫測定法で測定する。

40

【0047】

まず、L-d54-3xFLAGタンパク質発現COS7細胞あるいはMSL欠失Lタンパク質[MSL(105-154)/PD-d54]発現COS7細胞をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、PVDF膜に転写した。PVDF膜を5%スキムミルクでブロッキングした後、ヘブスプリン溶液と反応させ、さらにHRP標識-抗ヒトIgG(H+L)抗体により検出する。その後、このPVDF膜をビオチン化抗FLAG抗体とHRP-標識ストレプトアビジンでリプロービングする。その結果、ビオチン化抗FLAG抗体は、L-d54-3xFLAGともMSL欠失Lタンパク質とも同程度に反応し40kDa付近に明瞭なバンドを示す。しかし、ヘブスプリン(ヒト抗HBsAgポリクローナル抗体)はL-d54-3xF

50

LAGには反応するが、MSL欠失Lタンパク質にはほとんど反応しない。

【 0 0 4 8 】

L-d54-3xFLAG粒子発現COS7細胞あるいはMSL欠失Lタンパク質[MSL(105-154)/PD-d54]発現COS7細胞の培養上清に抗FLAG抗体-アガロースゲル(Sigma社)を加えて、4℃で一晩反応させた後、アガロースゲルを回収する。得られたゲルをTBST(0.1%Tween20、150mM NaCl、10mMTris-HCl緩衝液pH7.5)で洗浄した後、5%スキムミルクを含むTBSTを加えて4℃で2時間反応させる。これをTBSTで洗浄後、ヘブスブリン溶液を加えて4℃で2時間反応する。TBSTで洗浄後さらにAP標識抗ヒトIgG(H+L)抗体を加えて室温で1時間反応させる。アガロースゲルを回収し洗浄した後、沈殿にAP発色基質液(CDP-star、New England BioLabs社)を200μL加えて良く懸濁し、ルミノメーターにてAP活性を測定する。その結果、MSL欠失L粒子とヘブスブリン(ヒト抗HBsAgポリクローナル抗体)との反応は、L-d54-FLAG粒子との反応に比べて顕著に低下する。

10

【 0 0 4 9 】

(4) ヒト感染防御用抗HBsAg抗体との反応性

WT-d54-3xFLAG粒子発現COS7細胞あるいはMSL欠失Lタンパク質[MSL(105-154)/PD-d54]発現COS7細胞を1%TritonX-100-PBSで可溶化した細胞抽出液を1%FBS-TBS(150mM NaCl、50mMTris-HCl緩衝液pH7.5)で希釈した。これを、抗FLAG抗体を固相に、ヒト抗HBsAg抗体(ヘブスブリン)とHRP標識抗ヒトIgG抗体(Prozyme社)を液相に用いた酵素免疫測定法で測定した。その結果、WT-d54-3xFLAGは粒子9.5ng添加で吸光度0.051の結合反応を示したが、MSL(105-154)/PD-d54は検出限界(陰性対照のCos7細胞抽出液)以下であった。

20

【 0 0 5 0 】

(5) HBsAgサブタイプ診断用抗体による検出

抗HBs抗原決定基dモノクローナル抗体(特殊免疫研究所)あるいは抗HBs抗原決定基rモノクローナル抗体(特殊免疫研究所)を各々固相に、ビオチン化抗FLAG M2抗体とHRP標識ストレプトアビジンとを液相に用いた酵素免疫測定法(各々、サブタイプd-ELISAおよびサブタイプr-ELISA)を用いて、MSL欠失L蛋白質発現Cos7細胞培養上清を測定した。MSL(105-152)/PD-d54粒子およびMSL(105-154)/PD-d54粒子の抗サブタイプdモノクローナル抗体反応性はWT-d54-3xFLAG粒子の1~3%、抗サブタイプrモノクローナル抗体反応性は13~14%に低下した。

30

【 0 0 5 1 】

【表2】

抗HBsAg抗体の種類	相対反応性(% to WT) ^{a)}	
	MSL(105-152)/PD	MSL(105-154)/PD
HBsAg診断キット-EIA ^{b)}	1.0 ± 0.2	1.7 ± 0.3
サブタイプd-ELISA ^{c)}	1.3 ± 0.9	3.2 ± 2.0
サブタイプr-ELISA ^{d)}	12.8 ± 2.6	14.4 ± 2.9

40

【 0 0 5 2 】

a) FLAG-ELISAで粒子濃度を揃えたWT-d54-3xFLAG、MSL(105-152)/PD-d54、MSL(105-154)/PD-d54試料を各々のELISAで測定して、各抗体に対する反応性(粒子量あたりの反応値(吸光度))を算出した。WT-d54-3xFLAGの反応性に対する各変異体の相対反応性で示した。

b) ダイナボット社IMx-HBsAgキット;主に共通抗原決定基aを認識。

c) 抗HBsモノクローナル抗体(抗原決定基d)と抗FLAG抗体により反応性検出。(欠損領域内にエピトープ。)

50

d) 抗HBsモノクローナル抗体（抗原決定基r）と抗FLAG抗体により反応性検出。（エピトープは欠損領域外に隣接。）

【0053】

実施例4 MSL欠失L粒子の大量調製

実施例1で構築したMSL欠失Lタンパク質発現ベクターは全て、そのLタンパク質C末端に発現タンパク質検出用のFLAG-tagが付加されている。そこでまず、MSL欠失Lタンパク質[MSL(105-154)/PD-d54]発現ベクターと合成DNA配列番号25&26とを用いた部位特異的変異導入により、MSL欠失Lタンパク質C末端に付加したFLAGtag配列の前にstopコドンを挿入して、C末端FLAGtag配列の無いMSL欠失Lタンパク質[MSL(105-154)/PD-d54]発現用ベクターpB01077を構築する。得られたMSL欠失Lタンパク質遺伝子をJ. Biol. Chem. Vol. 267(3) p1953-1961 (1992)記載の酵母発現用plasmid pGLDLIP39-RcTのGLDプロモーター下流に挿入することにより、MSL欠失Lタンパク質[MSL(105-154)/PD-d54]発現用ベクターpB01077を構築する。これをSaccharomyces cerevisiae AH22R株に導入し、Leu要求性により形質転換体コロニーを選択した。得られた形質転換体クローン中、MSL欠失L粒子の発現が高いクローンを選ぶ。得られた高発現株を野生型HBsL粒子と同様の方法により大量培養し、得られた発現菌体よりJ. Biol. Chem. Vol. 267(3) p1953-1961 (1992)記載の超遠心法を用いてMSL欠失L粒子を精製する。

10

【0054】

実施例5 MSL欠失L粒子の抗体誘導能

精製MSL欠失粒子あるいは野生型粒子各々100 µgをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(PBS)0.2mlに溶解する。これを6週齢メスBALB/cマウス各4匹の尾静脈へ2週間おきに5回投与する。粒子投与2週間後に各マウスより採血し、血清を得る。得られた血清について、野生型L粒子に対する抗体およびMSL欠失L粒子に対する抗体の誘導をVaccine Vol.19(23-24) p.3154-3163 (2001)に準じ参考例1に示す方法で測定する。

20

【0055】

野生型L粒子投与マウス抗血清では、野生型L粒子に対する抗体が初回投与6週間後から強く誘導される。MSL欠失L粒子投与マウス抗血清では、野生型L粒子およびMSL欠失L粒子に対する抗体はほとんど検出されない。

【0056】

参考例1 野生型L粒子およびMSL欠失L粒子に対する抗体の酵素免疫測定法

抗野生型L粒子抗体用酵素免疫測定法では、まず精製野生型L粒子を20 µg/mlとなるようPBSに溶解した後、96well plateに100 µl/wellずつ分注し、4℃で一晩吸着させた。0.05%Tween80を含むPBS(PBST)で洗浄後、5%ブロッカー（雪印）を含むPBS 150 µLを分注して4℃で一晩保存した。マウス抗血清を希釈用液（10%FBSを含むPBST）で20倍~2万倍希釈して各wellに加え、室温で2時間反応させた。PBSTで洗浄後、希釈用液で5000倍希釈したHRP標識-抗マウスIgG(H+L)抗体を50 µlずつ添加し、室温で2時間反応させる。PBST液で洗浄後、基質液（0.4mg/ml o-フェニレンジアミン、23mM クエン酸、51.4mM Na2HPO4、0.0012% H2O2）を50 µlずつ添加して30分間反応させた後、50 µlの2M H2SO4で反応を停止させ、495nmにおける吸光度を測定する。

30

【0057】

抗MSL欠失粒子抗体用酵素免疫測定法では、まず精製MSL欠失粒子を20 µg/mlとなるようPBSに溶解した後、96well plateに100 µl/wellずつ分注し、4℃で一晩吸着させる。その後、上述の抗野生型HBsAgL粒子抗体用酵素免疫測定法と同様の操作により、MSL欠失L粒子に結合したマウス抗体を検出する。

40

【0058】

表 3. 制限酵素導入用/欠損導入用合成 DNA リスト

配列番号	整理番号	配 列	コメント
3	975	GGTATGTTGCCCGTGGGCCCTCTACTTCC	Apal サイト at107
4	976	GGAAGTAGAGGGCCCCACGGGCAACATACC	
5	977	GGACGGAAACAGCACCAGCTGGCCCATCCCATC	PvuII サイト at149
6	978	GGATGATGGGATGGGCCAGCTGGTCTTTCCGTC	
15	1117	CTTGTGGTTCTGGCCCCCTACCAAGGTATGTTGCC	Apal サイト at98
16	1118	GGGCAACATACCTTGGTAGGGGCCAGAACCAAC	
17	1119	GTTGGTTCTTCTGGAGGGCCCCAGGTATGTTGCC	Apal サイト at101
18	1120	CGGGCAACATACCTGGGCCCTCCAGAAGAACAAC	
19	1121	CTTCTGGACTACCAGGGCCCCGTTGCCCGTGGG	Apal サイト at108
20	1122	CCCACGGGCAACGGGCCCTGGTAGTCCAGAAG	
21	1115	CTGGCCCATCCCATCCAGCTGGGCTTTTCGC	PvuII サイト at155
22	1116	GCGAAAAGCCCCAGCTGGATGGGATGGGCCAG	
23	1123	CTGGACTACCAAGGTATGGGCCAGACTCTGGCCCATCCC	105-107 欠損用
24	1124	GGGATGGGCCAGGAGTCTGGGCCCATACCTTGGTAGTCCAG	
25	1207	GTTTCTCCTGGCTCTAGGGTGGCTCGAG	stop コドン導入用
26	1208	CTCAGCCACCCCTAGAGCCAGGAGAAAC	

【表 4】

表 4. リンカー挿入用合成 DNA

配列番号	整理番号	配列	コメント
1	965	TCGAGTGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGAC	2XFLAG 挿入用リンカー
2	966	TCGAGTCATGATCTTTATAATCACCCTCATGGTCTTTGTAGTCAC	
7	1043	AGGAGTC	QE 挿入用
8	1044	GACTCCTGGCC	
9	1045	CAGACTC	PD 挿入用
10	1046	GAGTCTGGGCC	
11	1047	CAGATAACGGTTC	PDNG 挿入用
12	1048	GAACCGTTATCTGGGCC	
13	1049	CATCCTCCTCCTC	PSSS 挿入用
14	1050	GAGGAGGAGGATGGGCC	

【 0 0 6 0 0 】

【 表 5 】

表 5 MSL 欠失 L 蛋白質発現用プラスミド

Plasmid	Protein	Amino acid Sequence (90th-160th residue of S protein)
Expression vectors for animal cells		
pBO441	L protein (WT)	90 107 149 160 ...LIFLLVLLDY QGMLPVCPLL PGTSTTSTGP CKTCTIPAAG TSMFPSCCCT KPSDGNCTCI PIPSSWAFAR...
pBO982	WTd54-3xFLAG	...LIFLLVLLDY QGMLPVCPLL PGTSTTSTGP CKTCTIPAAG TSMFPSCCCT KPSDGNCTCI PIPSSWAFAR...
pBO851	M6d54-3xFLAG	...LIFLLVLLDY QGMLPVSPLL PGTSTTSTGP SKTSTIPAAG TSMFPSSCST KPSDGNSTSI PIPSSWAFAR...
(MSL deletion mutants with 3xFLAG-tag)		
pBO940	MSL(108-148)/QE-d54	...LIFLLVLLDY QGMLPVGQES WPIPSSWAFAR...
pBO941	MSL(108-148)/PD-d54	...LIFLLVLLDY QGMLPVGPDS WPIPSSWAFAR...
pBO942	MSL(108-148)/PDNG-d54	...LIFLLVLLDY QGMLPVGPDN GSWPIPSSWAFAR...
pBO943	MSL(108-148)/PSSS-d54	...LIFLLVLLDY QGMLPVGPSS SSWPIPSSWAFAR...
pBO993	MSL(105-148)/PD-d54	...LIFLLVLLDY QGMGPDSWPI PPSWAFAR...
pBO991	MSL(103-148)/PD-d54	...LIFLLVLLDY QGPDSPWPIPS SWAFAR...
pBO989	MSL(101-148)/PD-d54	...LIFLLVLLDY PDSWPIPSSWAFAR...
pBO987	MSL(99-148)/PD-d54	...LIFLLVLLDY PDSWPIPSSWAFAR...
pBO1003	MSL(108-154)/PD-d54	...LIFLLVLLDY QGMLPVGPDS WAFAR...
pBO1001	MSL(105-154)/PD-d54	...LIFLLVLLDY QGMGPDSWAFAR...
pBO999	MSL(103-154)/PD-d54	...LIFLLVLLDY QGPDSSWAFAR...
pBO997	MSL(101-154)/PD-d54	...LIFLLVLLDY PDSWAFAR...
pBO995	MSL(99-154)/PD-d54	...LIFLLVLLDY PDSWAFAR...
(MSL deletion mutants without 3xFLAG-tag)		
pBO1056	MSL(101-154)/PD-d54	...LIFLLVLLDY PDSWAFAR... (without 3xFLAG)
Expression vector for yeast (MSL deletion mutant without 3x FLAG-tag)		
pBO1077	MSL(101-154)/PD-d54	...LIFLLVLLDY PDSWAFAR... (without 3xFLAG)

1) MSL deletion mutants : MSL ([欠損領域]) / [リンカ一配列]-d[C 末端欠損残基数]

2) イタリック文字 : 疎水性領域(脂質二重膜結合部位)、下線 : リンカ一配列および制限酵素導入による置換変異残基、標準文字 : major surface loop(MSL)部位

【表 6】

MSL 欠損変異体の粒子分泌と HBs 抗原性 (1)

HBsAg 変異体	粒子分泌濃度 (A405)	HBsAg 濃度(RATE)
M6d54-3xFLAG	0.313	12.6
MSL(108-148)/QE-d54	0.336	7.2
MSL(108-148)/PD-d54	0.297	9.0
MSL(108-148)/PSSS-d54	0.144	5.0
MSL(108-148)/PDNG-d54	0.131	5.0

10

a) COS7 細胞培養上清を 2 倍希釈して、FLAG-ELISA で粒子量を測定した。Blank として希釈液を用いて測定した時の 405nm における吸光度を示した。

b) COS7 細胞培養上清を 2 倍希釈して、IMx-HBsAg キットを用いて HBsAg 量を測定した。各試料の測定値(RATE 値)よりキット付属のネガティブコントロール液の RATE 値を差し引いた値を示した。この時 RATE 6.0 以下は、HBsAg 陰性と判定された。

【 0 0 6 2 】

【表 7】

表 7 A. MSL 欠損変異体の粒子分泌と HBs 抗原性 (1)

HBsAg 変異体	粒子分泌濃度 (ng/ml)	
WT	(26.4)	
WTd54-3xFLAG	20.8	
MSL(99-148)/PD-d54	7.2±1.3	
MSL(101-148)/PD-d54	12.2±3.4	10
MSL(103-148)/PD-d54	13.5±5.1	
MSL(105-148)/PD-d54	22.5±5.1	
MSL(108-148)/PD-d54	8.5±2.2	
MSL(99-154)/PD-d54	8.1±2.2	
MSL(101-154)/PD-d54	13.9±5.0	
MSL(103-154)/PD-d54	13.9±5.7	
MSL(105-154)/PD-d54	34.3±3.9	20
MSL(108-154)/PD-d54	7.4±1.3	

表 7 B. MSL 欠損変異体の粒子分泌と HBs 抗原性 (1)

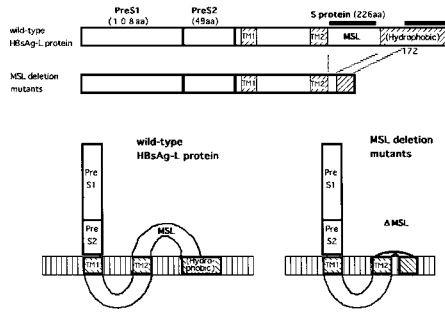
HBsAg 変異体	HBsAg 濃度 (RATE)	HBsAg / 粒子比 (WT=100%)	
WT	229	100	
WTd54-3xFLAG	180	100	
MSL(99-148)/PD-d54	1.7±0.1	3.9	30
MSL(105-148)/PD-d54	1.1±0.7	1.1	
MSL(108-148)/PD-d54	0.7±0.3	1.0	
MSL(99-154)/PD-d54	1.9±0.1	7.6	
MSL(105-154)/PD-d54	2.3±0.5	1.5	

A) タンパク質濃度既知の酵母由来精製 WT 粒子を標準試料として、WTd54-3xFLAG 培養上清の粒子濃度(ng/ml)を IMx-HBsAg キットで求め、WTd54-3xFLAG 培養上清を標準試料として各変異体培養上清の粒子濃度(ng/ml)を FLAG-ELISA で測定した。WT 粒子培養上清の分泌粒子濃度は、IMx-HBsAg キットで測定した。

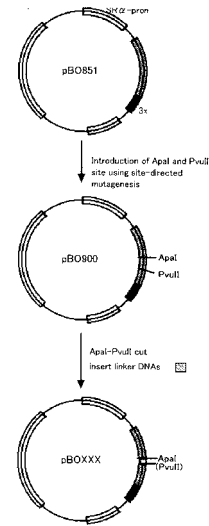
B) 各変異体の培養上清を 2 倍希釈し、IMx-HBsAg キットを用いて HBsAg 量を測定した。各試料の測定値(RATE)から Cos7 培養上清の測定値 (RATE) を差し引いた値を示した。なお、キット付属のネガティブコントロール液の RATE 値の 2 倍 (RATE= 2) 以下の検体は、通常 HBsAg 陰性と判定される。

40

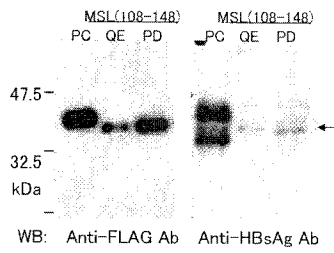
【 図 1 】



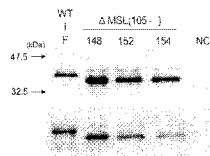
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2008018555000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/065646
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/02(2006.01)i, A61K9/16(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i 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) C07K14/02, A61K9/16, A61K38/00, A61K45/00, A61K47/42, A61K48/00, C12N15/09, C12P21/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2001/064930 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 07 September, 2001 (07.09.01), Full text; particularly, page 7, the last line to page 8, line 3; example J & US 2003/0092069 A1 & EP 1262555 A1 & JP 2001-316298 A	1-11
Y	WO 2003/082330 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 09 October, 2003 (09.10.03), Full text; particularly, page 15, line 22 to page 16, line 5 & US 2006/0088536 A1 & EP 1491210 A1 & JP 2004-002313 A	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 30 October, 2007 (30.10.07)		Date of mailing of the international search report 13 November, 2007 (13.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/065646

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Akihiko KONDO et al., "Chuku Bio Nano Ryushi o Mochiita DDS no Kaihatsu to Sono Sangyoka", Drug Delivery System, 31 July, 2006 (31.07.06), Vol.21, No.4, pages 435 to 443, full text; particularly, page 442, right column, 'Owarini'	1-11
Y	O'MALLEY, B. and LAZINSKI, D., A Hepatitis B Surface Antigen Mutant That Lacks the Antigenic Loop Region Can Self-Assemble and Interact with the Large Hepatitis Delta Antigen, J. Virol., 2002, Vol.76, No.19, p.10060-10063, particularly, page 10060, right column, last paragraph to page 10062, left column	1-11
P,X	Hiroko TADA et al., "Ryushi Keisei ni Hitsuyo na Hito B-gata Kan'en Virus Envelope Tanpakushitsu Hairetsu no Tokutei", Protein Science Society of Japan Nenkai Program Yoshishu, 07 May, 2007 (07.05.07), Vol.7th, page 135, 3P-091	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 5 6 4 6									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/02(2006.01)i, A61K9/16(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/02(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/02, A61K9/16, A61K38/00, A61K45/00, A61K47/42, A61K48/00, C12N15/09, C12P21/02											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2007年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2007年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2007年	日本国実用新案登録公報	1996-2007年	日本国登録実用新案公報	1994-2007年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2007年										
日本国実用新案登録公報	1996-2007年										
日本国登録実用新案公報	1994-2007年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDIplus/JST7580/JSTP1us (JDream2)											
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 請求の範囲の番号									
Y	WO 2001/064930 A1 (科学技術振興事業団) 2001.09.07, 全文、特に第7頁最終行-第8頁第3行、実施例J & US 2003/0092069 A1 & EP 1262555 A1 & JP 2001-316298 A	1-11									
Y	WO 2003/082330 A1 (科学技術振興事業団) 2003.10.09, 全文、特に第15頁第22行-第16頁第5行 & US 2006/0088536 A1 & EP 1491210 A1 & JP 2004-002313 A	1-11									
☑ 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矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 30.10.2007		国際調査報告の発送日 13.11.2007									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 中川 知美 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3335								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 6 5 6 4 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	近藤昭彦, 外4名, 中空バイオナノ粒子を用いたDDSの開発とその産業化, Drug Delivery System, 2006.07.31, Vol.21. No.4, p.435-443, 全文、特に第442頁右欄「おわりに」	1-11
Y	O' MALLEY, B. and LAZINSKI, D., A Hepatitis B Surface Antigen Mutant That Lacks the Antigenic Loop Region Can Self-Assemble and Interact with the Large Hepatitis Delta Antigen, J. Virol., 2002, Vol.76, No.19, p.10060-10063, 特に第10060頁右欄最終段落-第10062頁左欄	1-11
P X	多田宏子, 外14名, 粒子形成に必要なヒトB型肝炎ウイルスエンベロップ 蛋白質配列の特定, 日本蛋白質科学会年会プログラム・要旨集, 2007.05.07, Vol.7th, p.135, 3P-091	1-11

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K	47/42	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 妹尾 昌治

岡山県岡山市津島中3-1-1 岡山大学大学院自然科学研究科内

(72) 発明者 多田 宏子

岡山県岡山市津島中3-1-1 岡山大学大学院自然科学研究科内

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA33 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 DA02 EA04
 FA02 FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA14
 4B064 AG33 CA10 CA19 CC24 DA01
 4C076 AA65 AA95 CC16 EE41H EE41N FF34 FF67 GG01
 4H045 AA10 AA11 AA20 BA10 BA11 BA12 BA13 BA41 CA02 DA86
 EA20 EA29 FA72 FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。