

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6692796号

(P6692796)

(45) 発行日 令和2年5月13日(2020.5.13)

(24) 登録日 令和2年4月17日(2020.4.17)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z N A Z

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

請求項の数 9 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2017-507091 (P2017-507091)
 (86) (22) 出願日 平成27年4月21日(2015.4.21)
 (65) 公表番号 特表2017-513527 (P2017-513527A)
 (43) 公表日 平成29年6月1日(2017.6.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/052915
 (87) 国際公開番号 W02015/162560
 (87) 国際公開日 平成27年10月29日(2015.10.29)
 審査請求日 平成30年4月19日(2018.4.19)
 (31) 優先権主張番号 P.407950
 (32) 優先日 平成26年4月21日(2014.4.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 ポーランド (PL)

(73) 特許権者 516317263
 バイオベンチャーズ・インスティテュート
 ・スプウカ・ゾオ
 ポーランド・ボズナン・P L - 6 O - 1 4
 1・プロミエニスタ・8 3
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72) 発明者 ピョートル・スコフロン
 ポーランド・グダニスク・P L - 8 O - 3
 O 3・ウリツァ・グリグレフスキエゴ・1
 O / 2 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリエピトープタンパク質を得る方法とこの方法を具体化するためのDNAベクター

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SapIによって認識される二つの収束性DNA配列、及び、それらの間に見出され、SmaIによって認識されるインサートのクローニングイン(cloning-in)部位を含むDNA配列を含む増幅モジュールを包含し、前記増幅モジュールは、配列：GCTCTTCACCCGGGCCAGAGAGCを含む、DNAベクター。

【請求項 2】

タンパク質発現ベクターであって、更に複製開始点、抗生物質抵抗性遺伝子、転写プロモーター、リプレッサー遺伝子、翻訳開始シグナル、及び場合により6ヒスチジン残基をコードする配列及び翻訳停止シグナルをコードする配列を含む、請求項1に記載のDNAベクター。

【請求項 3】

2

atgcgctctt caccggggcc cagaagagct aagtaagtaa g (配列1)、

atggctcttc accggggccc agaagagcta agtaagtaag (配列2)、

atgccgctct tcaccggggc ccagaagagc taagtaagta ag (配列3)、

atgcaccacc accaccacca cagctcttca cccggggcca gaagagctaa gtaagtaag (配列4)、

atgcaccacc accaccacca cgctcttcac ccggggcccag aagagctaag taagtaag (配列5)、及び、

atgcaccacc accaccacca cccgctcttc accggggccc agaagagcta agtaagtaag (配列6)、

から成る群から選択される配列を有する、請求項1に記載のDNAベクター。

【請求項 4】

catgcaccac caccaccacc acagctcttc acccggggccc agaag
 agcta agtaagtaag agctcgaccc ggctgaattt gctttcgaat
 ttctgccatt catccgctta ttatcactta ttcaggcgta gcac
 caggcg ttaaggga ccaataactg ccttaaaaaa attacgccc
 c gccctgccac tcatcgagct actgtttaa ttcattaagc att
 ctgccga catggaagcc atcacagacg gcatgatgaa cctgaatc
 gc cagcggcac agcacctgt cgccttgcgt ataataattg cc
 catggtga aaacgggggc gaagaagtgt tccatattgg ccacgtt
 taa atcaaaactg gtgaaactca cccagggtt ggctgagacg a
 aaaacatat tctcaataaa ccttttaggg aaataggcca ggtttt
 cacc gtaacacgcc acatcttgcg aatatagtgt tagaaactgc
 cggaatcgt cgtgtattc actccagacg gatgaaaacg ttca
 gtttg ctcatggaac acggtgtaac aagggtgaac actatccat
 atcaccagct caccgtcttt cattgccata cggaattccg gatg
 agcatt catcaggcgg gcaagaatgt gaataaaggc cgataaaa
 c ttgtgcttat tttctttac ggtctttaaa aaggccgtaa tat
 ccagctg aacggtcttg ttataggtac attgagcaac tgactgaa
 at gcccaaaat gttctttacg atgccattgg gatataatcaa cg
 gtggtata tccagtgtat tttttctcca ttttagcttc cttagct
 cct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacgccc ggtagtgtac t
 tatttcatt atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg atcaac
 gtct cattttcgcc aaaagtggc ccagggtctc ccggtatcaa
 caggacacc aggtattatt tattctcgca agtgatctc cgta
 caggt atttattcgg cgaaagtgc gtcgggtgat gtcgcaact
 tactgattta gtgtatgatg gtgttttga ggtgctccag tggc
 ttctgt ttctatcagc tgcctctct gttcagctac tgacgggt
 g gtgcgtaacg gcaaaagcac cgccggacat cagcgctagc gga
 gtgtata ctggcttact atgttggcac tgatgagggt gtcagtga
 ag tgcttcatgt ggcaggagaa aaaaggctgc accggtgcgt ca
 gcagaata tgtgatacag gatataattcc gttcctctgc tactga
 ctg gctacgctcg gtcgttcgac tgcggcgagc ggaatggct
 tacgaacggg gcggagattt cctggaagat gccaggaaga tactt
 aacag ggaagtgaga gggccgaggc aaagccgttt ttccataggc
 tccgcccc tgacaagcat cagcaaatct gacgtcaaa tcag
 tgggtg cgaaacccga caggactata aagataccag cgttttccc
 c ctggcgctc cctcgtgcg tctcctgttc ctgctttcg gtt
 taccggt gtcattccgc ttttatggcc gcgtttgtct cattccac
 gc ctgacactca gttccgggta ggcagttcgc tccaagctgg ac
 tgtatgca cgaaccccc gttcagtcg accgctgcgc ctatcc
 ggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggaaga catgcaaaag c
 accactggc agcagccact ggtaattgat ttagaggagt tagtct
 tgaa gtcatgcgcc ggtaaggct aaactgaaag gacaagtttt
 ggtgactgcg ctctccaag ccagttacct cggttcaaa agttg
 gtgac tcagagaacc ttgaaaaac cgccctgcaa ggcggttttt
 tctgtttcag agcaagagat tacgcgaga ccaaacgat ctca
 agaaga tcatcttatt aatcagataa aatatttcta gatttcagt
 g caatttatct cttaaatgt agcacctgaa gtcagcccca tac
 gatataa gttgtaattc tcatgtttga cagcatgcca tcgatcgc
 ga tcttgctcaa ttgttatcag ctatgcgccc accagaacac ct
 tgccgatc agccaaacgt ctcttcaggc cactgactag cgataac

ttt cccacaacg gaacaactct cattgcatgg gatcattggg t
 actgtgggt ttagtggttg taaaacacc tgaccgctat ccctga
 tcag ttcttgaag gtaaactcat ccccccaag tctggctatg
 cagaaatcac ctggctcaac agcctgtca gggtaacga gaatt
 aacat tccgtcagga aagcttggct tggagcctgt tggtcgggc
 atggaattac cttcaacctc aagccagaat gcagaatcac tggc
 tttttt ggttgtgctt acccatctct ccgcatcacc ttggtaaa
 g gttctaagct caggtagaa catccctgcc tgaacatgag aaa
 aaacagg gtactcatc tacttctaa gtgacggctg catactaa
 cc gcttcataca tctcgtatg ttctctggcg attgaaggc ta
 aattcttc aacgctaact ttgagaattt ttgcaagcaa tgcggcg
 tta taagcattta atgcatgat gccattaaat aaagcaccaa c
 gcctgactg ccccatcccc atcttgtctg cgacagattc ctggga
 taag ccaagttcat ttttctttt ttcataaatt gctttaaggc
 gacgtgcgc ctcaagctgc tctgtgtta atgtttctt ttttg
 tgctc atacgttaaa tctatcaccg caagggataa atactaaca
 ccgtgcgtgt tgactattt accctcggcg gtgataatgg ttgc
 atgtac taaggagggt gtt (配列7)を有する、請求項1に記
 載のDNAベクター。

20 【請求項 5】

- a) エピトープをコードする平滑末端のDNA配列をクロー
ン化して、請求項1～4に記載のDNAベクター内に、Sm
alにより認識される部位で挿入する、
- b)得られたベクターを細菌宿主中で増幅させ、単離して
SapIで消化し、その後、エピトープをコードするDNA配
列を含む単離した断片を、コンカテマーへのインサート
の一方向性のライゲーションを促進する、一本鎖突出末
端を備えるように修飾する、
- c)単離した断片をオートライゲーションさせる、
- 30 d)オートライゲーション産物を、SapIにより認識される
部位で、請求項1～4に記載のDNAベクター中にクロー
ン化する、及び
- e)得られたベクターを細菌宿主の形質転換に使用し、そ
の後ポリエピトープタンパク質を発現させ、単離する、
方法であって、ポリエピトープタンパク質の大きさを増
大させるため、段階e)を実行する前に段階b)からd)を繰
り返すことを特徴とする、ポリエピトープタンパク質を
得る方法。

【請求項 6】

- 40 エピトープがHBVエピトープである、請求項5に記載の
方法。

【請求項 7】

増幅されたモノマー断片は、異なるタンパク質又は同
じタンパク質の異なる領域に由来する様々なエピトープ
を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

- ポリエピトープタンパク質が、その精製を促進する配
列を更に含み、段階e)において実施される単離が、金属
アフィニティクロマトグラフィーの使用を包含する、請
50 求項5に記載の方法。

【請求項 9】

段階e)において、ポリエピトープタンパク質が巨大分子担体に固定化されている、請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の主題は、ポリエピトープタンパク質を得る方法とこの方法を具体化するためのDNAベクターに関する。本発明に従って得られるタンパク質は、特に改善されたワクチンの生産のために、多くの用途が見いだされてよい。

【背景技術】

【0002】

Shen S-Hは、多量体(最大7コピー)のプロインスリンを得る方法を開示している(P.N.A.Sci USA 81:4627-4631(1984))。当該多量体は、IISエンドヌクレアーゼ(SfaNI、アルカリフォスファターゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ及びDNAリガーゼ)で切断された合成DNA断片を用いたDNA長の連続した連結を使用して得られた。しかしながら、この方法では、毎回1つの追加モノマーコピーしか付加できないため、単一の反応中で多数重複した繰り返しのDNA配列を産生することはできない。

【0003】

Lennickらは、ペプチドホルモン、すなわち心房性ナトリウム利尿ペプチドの8コピーをコードする多量体遺伝子を開示している(Gene 61:103-112(1987))。開示された方法は、ペプチドをコードする配列の多量体コピーを生じさせることができるベクターを使用しておらず、得られた多量体遺伝子はin vitroで産生されたものであり、最終的に一般に使用される発現ベクター中へとクローン化された。この方法もまた、毎回1つの追加モノマーしか付加することができないため、単一の反応中で容易にDNA配列を増幅させることはできない。

【0004】

Kim, S. C.及びSzybalski, Wは、IIS型制限エンドヌクレアーゼBspMI、pSK3 DNAベクター及びDNAリガーゼを使用して、クローン化DNA断片を一方向性に増幅させる方法を開示している(Gene 71:1-8、(1998))。コンカテマー中に30モノマーのコピーが得られた。しかしながら、基質DNAを完全に分解しないため、BspMIの使用は実際には困難である。事実、ORFを持続的に維持することはできず、増幅は、増幅されたコンカテマーに追加のDNA配列を導入する。記載された方法では、所望の数の繰り返しDNA断片を得る可能性を著しく制限する増幅サイクルを繰り返すことはできない。記載されたベクターは、発現ベクターではなかった。

【0005】

Lee, J.H.らは、IIS型制限エンドヌクレアーゼ-BspMI及びBbsI、pBBS1 DNAベクター及びDNAリガーゼを使用して、クローン化DNA断片を一方向性に増幅させる方法

を開示している(Genetic Analysis; Biomolecular Engineering 13: 139-145(1996))。当該方法は、4ヌクレオチド(nt)の突出DNA末端のオートライゲーションに基づいており、増幅DNA断片の所望のコピー数を達成するための、増幅サイクルの繰り返しが可能であるため、ORF持続性の維持が可能となる。使用されたベクターは発現ベクターではなかった。この方法は、短い抗菌ペプチド遺伝子-mogainin(108コピー)を増幅するために使用された。

【0006】

Lee, J.H.らは、前述のベクターpBBS1に基づく方法の別の変形を開示している(Protein Expression and purification 12:53-60(1998))。使用されたベクターは発現ベクターではなかった。著者らは、BbsI酵素を使用して4ヌクレオチド(nt)の突出DNA末端、深刻なORF持続性の阻害を生じさせた。この文献は、増幅配列中で6コピー未満のDNAモノマーDNAを産生することを開示している。この方法は、mogainin抗菌ペプチド遺伝子とBufferin IIの増幅に使用された。

【0007】

Wang, Y-Q及びCai, J.Y. は、二つのDNAアダプターの存在下、非対称の突出末端を含む合成DNA断片のオートライゲーションを用いて、抗菌ペプチドをコードする遺伝子を多量体化した、他のバリエーションを開示している(Appl Biochem Biotechnol. 141:203-13(2007))。前記アダプターは、制限エンドヌクレアーゼSalI及びEcoRIにより認識される配列を含んでいた。この手法はベクターを使用せず、増幅を制御することは困難であり、合成DNAのモノマーの連続部分を反応中に添加する必要がある。開示された重合体遺伝子の構築方法は、抗菌ペプチドの産生のために設計され、結果として重合体タンパク質中に8モノマーのコピーを生じた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Shen S-H(P.N.A.Sci USA 81:4627-4631(1984))

【非特許文献2】Lennickら(Gene 61:103-112(1987))

【発明の概要】

【0009】

本発明の到達点は、任意の長さのポリエピトープタンパク質を容易に得る方法、前記方法及びより高次のポリエピトープ構造を得る態様において有用なベクターを供給することである。得られたポリエピトープタンパク質及び高次のポリエピトープ構造は、幅広い用途に有用であり、特に効果を増強した改良ワクチンの産生に用いることができる。

【0010】

本発明の主題は、SapIエンドヌクレアーゼによって認識される二つの収束性のDNA配列を含む増幅モジュール

の配列を包含するDNAベクター、及び、SmaIエンドヌクレアーゼによって認識されるインサートのクローニングイン(cloning-in)部位を含む、介在DNA配列であり、好ましくは、増幅モジュールは配列GCTCTTCACCCGGGCCAG AAGAGC(配列番号11)を有する。

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

好ましくは、本発明のDNAベクターは、更に複製開始点(好ましくはp15A)、抗生物質抵抗性遺伝子(好ましくはクロラムフェニコール)、転写プロモーター(好ましくはλバクテリオファージのP_{PR})、リプレッサー遺伝子(好ましくはcI857ts)、翻訳開始シグナル、及び場合により6ヒスチジン残基をコードする配列及び翻訳停止シグナルをコードする配列をさらに含むタンパク質発現ベクターである。

【0012】

好ましくは、本発明のDNAベクターは図2に示す配列1~6の中から選択される配列を含む。

【0013】

好ましくは、本発明のDNAベクターは配列7(pAMP1-HiSA)を有する。

【0014】

本発明の次の主題は、以下に特徴づけられるポリエピトープタンパク質を得る方法である：

a) エピトープをコードする平滑末端のDNA配列をクローニングして、上記で定義されたベクター内に、エンドヌクレアーゼSmaIにより認識される部位で挿入するか、又は、エピトープをコードする突出末端のDNA配列をクローニングして、上記で定義されたベクター内に、SapIエンドヌクレアーゼにより認識される部位で挿入する。場合により、コンカテマー形成効率を向上させるために、SapIで消化されたベクターへの添加に先立ち、一方向性の消化を確実にするよう、突出末端を有するDNA配列の予備ライゲーションを行うことができる。

b) 得られたベクターを細菌宿主中で増幅させ、単離し、IISサブタイプ制限SapIエンドヌクレアーゼで消化し、その後、エピトープをコードするDNA配列を含む単離された断片を、コンカテマーへのインサートの一方向性のライゲーションを確実にするよう、一本鎖突出末端を備えるように修飾する。

c) 単離した断片をオートライゲーションさせる。

d) オートライゲーション産物を、サブタイプIIS制限SapIエンドヌクレアーゼにより認識される部位で、請求項1~4に定義したDNAベクター中にクローニングする、及び

e) 得られたベクターを細菌宿主の形質転換に使用し、その後ポリエピトープタンパク質を発現させ、単離する、上記方法において、ポリエピトープタンパク質の大きさを増大させるため、段階e)を実行する前に段階b)からd)を繰り返す。

【0015】

場合により、別のエピトープの増幅段階において、上記で定義された、得られたポリエピトープタンパク質を高分子担体(微生物、細胞、細菌、バクテリオファージ、ウイルス、不完全ウイルス、自己凝集タンパク質又はナノ粒子等)上に固定化することにより、使用する。

【課題を解決するための手段】

【0016】

以下の実施例は、本発明にかかる方法の可能な態様の变形の一つについての詳細な記載を含む。インサートのクローニングにおける他の方法は、デオキシリボヌクレオチド3リン酸の存在下でDNAポリメラーゼを使用して突出末端が埋められたSapI消化ベクターを使用することである。本発明に従い、当業者は次の態様のバリエーションを提案することができる。

【0017】

好ましくは、エピトープは、特に合成配列9によりコードされるHBVエピトープである(図3)。

【0018】

好ましくは、増幅されたモノマー部分は、異なるタンパク質又は同じタンパク質の異なる領域に由来し、好ましくは合成配列によってコードされる種々のエピトープを含んでもよい(図1)。

【0019】

発明者らはまた、遺伝子工学的方法及び化学合成を使用し、天然には発生しない人工遺伝子を設計し使用する方法を開示しており、当該人工遺伝子は、一つまたは複数のペプチドの複数のモノマー単位を含む、繰り返し部分をコードする複数のDNAコピーを含む。特定の生物学的又は化学的機能を有するペプチド(エピトープ)をコードする遺伝子の増幅は、得られた(ポリ)ペプチドと特異的なリガンドとの所望の相互作用を増大させることにつながる。特に、このようなポリエピトープタンパク質は(i)人工抗原-免疫系の刺激能力を増強させたワクチンの新規創出；(ii)その工業生産性又は環境修復性のためのレアメタルキレート化モジュールを含むポリタンパク質；(iii)悪影響を停止させるために創傷中で作用するプロテアーゼ等の、酵素コファクター(陽イオン、陰イオン、有機分子等)に対する結合モジュール；(iv)分子病、ウイルス疾患、及び細菌性疾患の治療のための、生物学的機能の活性化剤又は阻害剤と共にペプチドを含む、マルチエピトープ保護タンパク質、多重モジュール；(v)ペプチドホルモンのマルチマー又はシグナルタンパク質の生物学的に活性な断片及び組織再生を刺激するペプチドホルモンのマルチマー又はシグナルタンパク質の生物学的に活性な断片を含む、マルチエピトープタンパク質；(vi)巨大分子担体(微生物、細胞、細菌、バクテリオファージ、ウイルス、不完全なウイルス粒子、自己凝集タンパク質、又はナノ粒子など)上に固定化されたポリエピトープタンパク質、として有用である。固定化は、遺伝学的又は化学的手段を使用して実施されてよい。

固定化ポリエピトープタンパク質は、(i)～(iv)で想定される使用の効果を増強しうる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】HBV抗原表面の増幅の例を使用して記載した本発明の方法の概要。

【図 2】pAMPベクターの第一のシリーズを、p15A複製開始点を有するベクター骨格に基づいて設計したものである。設計されたベクターのうち、pAMP-A(6ヒスチジン残基の融合タグを含まない)と、pAMP-HisA(6ヒスチジン残基の融合タグを含む)とを構築した。さらには、pAMPベクターシリーズは、 λ ファージ P_R の制御下でタンパク質を高発現する選択肢と、効率的な金属アフィニティクロマトグラフィーのプロトコルを使用することにより、ポリエピトープタンパク質の単離を可能にするHis6タグによる融合の選択肢を付して構築された。

【図 3】増幅反応に供されるHBV表面抗原の7アミノ酸エピトープのモデル。

【図 4】pAMP1-HisAベクター、SapIエンドヌクレアーゼ及びDNAリガーゼを使用した、HBV表面抗原モデルに由来する7アミノ酸エピトープのin vitro増幅反応の結果を示している。

【図 5】第一の増幅ラウンドで得られた、HBVタンパク質のポリエピトープをコードする遺伝子のハイブリッドクローン分析の結果。

【図 6】HBVエピトープの五量体の増幅の第二ラウンドの結果。

【図 7】AMP1-HisAベクターにおける第一の増幅ラウンド(13-mer)の間に得られたタンパク質ポリエピトープHBVタンパク質をコードするハイブリッド遺伝子の発現解析例

【図 8】pAMP1-HisAベクターの制限地図

【図 9】HBVの7アミノ酸エピトープの増幅の結果生じた13コピーのコンカテマー遺伝子のバリエーションの発現プラスミド

【図 10】13コピーのコンカテマー遺伝子の発現のウエスタンブロット検出

【図 11】多遺伝子性の五量体エピトープのポリエピトープタンパク質と、HBVエピトープ多遺伝子の増幅に働き、バクテリオファージベクターとの遺伝子工学的に融合するために使用される、EcoRI及びHindIIIの制限部位を導入する望ましいプライマーとの配列

【図 12】実施例3で使用された精製25mer及び、実施例4で使用された五量体HBVエピトープを数百コピー提示する組み換えT7バクテリオファージのウエスタンブロット【発明を実施するための形態】

【実施例】

【 0 0 2 1 】

実施例1：本発明の方法の態様の概要図

【 0 0 2 2 】

図1は、HBV抗原表面の増幅の例を使用して記載した本発明の方法の概要である。この図は、エピトープの増幅ベクターと増幅反応の概要を表している（図中：合成HBVエピトープ）。

【 0 0 2 3 】

増幅ベクターは、優先的に長いDNA配列を認識し、DNAを切断して3ヌクレオチド(又は3ヌクレオチドの重複)の突出末端を生じるサブタイプIIS制限エンドヌクレアーゼによって認識される二つの収束性のDNA配列を含む。発明者らは、SapIエンドヌクレアーゼを使用した。SapIエンドヌクレアーゼの注目すべき特徴は、(ベクター及び増幅したDNA部分に固有の)7塩基対の比較的長い配列を認識して、上の鎖では1ヌクレオチドの距離、下の鎖からは4ヌクレオチドの距離で切断し、3ヌクレオチドの突出末端又は単一コドンの等価物を生じる。SapI部位はベクター中で、挿入されたDNAのクローニングのために設計されている従来のII型エンドヌクレアーゼの配列に隣接している。発明者らは、認識配列中でDNAを切断し、いわゆる平滑末端を生じるSmaIエンドヌクレアーゼを使用した。SmaIによるベクターの切断は、合成又は天然の任意のDNA部分をクローン化し、増幅することができる。好ましい実施形態では、増幅されたDNA部分は、数個の同一または異なる抗原を包含する抗原又はアミノ酸配列をコードする。唯一の制限は増幅された断片の長さであり、所定の種類のDNAベクターによって許容されるインサートDNAの長さによって決定される。

【 0 0 2 4 】

実施例2：設計された6つのpAMP1ベクター

図2に示した実施形態において、発明者らは、pAMPベクターの第一のシリーズを、p15A複製開始点を有するベクター骨格に基づいて設計した。設計されたベクターのうち、発明者らは、pAMP1-A(6ヒスチジン残基の融合タグを含まない)と、pAMP1-HisA(6ヒスチジン残基の融合タグを含む)とを構築した。さらには、pAMPベクターシリーズは、 λ ファージ P_R の制御下でタンパク質を高発現する選択肢と、効率的な金属アフィニティクロマトグラフィーのプロトコルを使用することにより、ポリエピトープタンパク質の単離を可能にするHis6タグによる融合の選択肢を付して構築された。

【 0 0 2 5 】

ベクターは、p15A複製開始点、クロラムフェニコールに対する抗生物質抵抗性遺伝子、 λ バクテリオファージに由来する強力な転写プロモーター P_R 、リプレッサー遺伝子cIt857ts、翻訳開始シグナル、ニッケルイオンとの親和性を有する6ヒスチジン残基の配列、翻訳開始コドンATG及びORFを維持するDNA断片の一方方向性の増幅のためのモジュールと融合した、IISサブタイプエンドヌクレアーゼ、好ましくはSapIの収束性の制限部位であって挿入されたDNAのクローニングのための補助的な制限部位、好ましくはSmaIを含む短いDNA部分によって分離さ

れている制限部位系を含む。バリエーションは、(天然の非合成DNA配列を増幅する際に重要でありうる)3つのリーディングフレームを制御する能力という点、及び、(電荷、可溶性及びその他の生化学的パラメータにかかわらず、発現したポリエピトープタンパク質のその後の単離を容易にする点で優れている)His6タグの存在又は非存在という点で異なる。バリエーション4を、HBVの表面抗原に由来するエピトープを増幅する以下の実施例において使用した。増幅モジュールは、様々なクラスのベクター、例えば、他の複製起点、抗生物質抵抗性遺伝子、転写プロモーター、及び翻訳シグナルを含むベクターをクローニングすることによって導入されてよい。例えば、発明者らは、増幅したモジュールを、アンピシリン抵抗性及びcolE1複製起点並びにaraBAD又はT7転写プロモーターをそれぞれ有するベクターpBAD/Myc-HisA及びpET21d21d(+)に導入した。NcoI及びSacI酵素の突出末端を有する合成モジュールは、His6残基アフィニティタグを含む及び含まないバージョンで、これらの酵素で切断されたベクター中にクローン化され、araBAD又はT7プロモーターを(それぞれ)使用するポリエピトープタンパク質の発現が可能になった。発明者らは、標準的なMCS(マルチクローニングサイト)において挿入された増幅モジュールを有するベクターpBADMP1-A、pBADAMP1-HisA、pETAMP-A、pETAMP1-HisAを得た。

【 0 0 2 6 】

実施例3において使用されるpAMP1-HisAベクターの全配列は、配列7として示される。さらに、図8においては、pAMP1-HisAベクターの制限地図を示しており、図9においては、13merの抗原性ペプチドをクローン化したpAMP1-HisAベクターの制限地図を示している。

【 0 0 2 7 】

実施例2において使用される、pBAD及びpETベクターに導入された増幅モジュールをコードする合成オリゴヌクレオチドの配列は、配列12、13、14及び15に示される。

【 0 0 2 8 】

実施例3：HBV表面抗原の7アミノ酸エピトープのモデルを含むポリエピトープタンパク質の産生

【 0 0 2 9 】

増幅反応に供されるHBV表面抗原の7アミノ酸エピトープのモデルを図3に示す。

【 0 0 3 0 】

HBV表面抗原のエピトープをコードする合成DNA断片は、pAMP1-HisAベクターにおける試験的な増幅実験に供される。発明者らは、in vitroで、DNAコンカテマー中に60コピー超のエピトープ及びin vivoでクローン化された13コピーのIN THE HYBRIDポリエピトープタンパク質を得た。

【 0 0 3 1 】

図4は、pAMP1-HisAベクター、SapIエンドヌクレアー

ゼ及びDNAリガーゼを使用した、HBV表面タンパク質モデルに由来する7アミノ酸エピトープのin vitro増幅反応の結果を示している。

【 0 0 3 2 】

発明者らは、PAGEを使用して増幅反応を分析した。発明者らは、HBV表面抗原の7アミノ酸エピトープをコードする、21bpの合成DNA断片を増幅ベクターpAMP1-HisA中でクローン化した。HBVエピトープモノマーを含むプラスミドをSapIエンドヌクレアーゼで消化し、プラスミド構造から修飾エピトープを除去した。この修飾は、一本鎖5'突出末端の3ヌクレオチドの付加から成る。増幅反応とは別に、最終的なポリマーハイブリッドタンパク質において、これらの末端はプロリン残基の付加、いわゆる“ヘリックスブレーカー”を担い、エピトープモノマーを分離し、3次元構造中で、エピトープの独立したフォールディングを促進し、従ってその天然の空間構造の維持を助ける。付加される“ヘリックスブレーカー”の数は、それらをコードするアミノ酸の合成エピトープ末端への導入によって、(コードするDNAレベルで)任意に制御されうる。切除された、エピトープをコードする修飾DNAは、in vitroで自動ライゲーションに供される。5~160分のレーンは、自己ライゲーションの動態を示している。反応産物は、長さが増大する一連のDNA部分を生じる電気泳動で分析される。これは、DNAリガーゼ(K)のない対照反応に関連するエピトープ遺伝子の一方向性のコンカテマー(ポリマー)である。生じたin vitroコンカテマーは再度、pAMP-HisA中へクローン化された。これらは別の増幅サイクル又は、コードされた多量体タンパク質の発現に供されてよい。

【 0 0 3 3 】

図5は、第一の増幅ラウンドで得られた、HBVタンパク質のポリエピトープをコードする遺伝子のハイブリッドクローン分析の結果を示す。

【 0 0 3 4 】

以下の系：pAMP-HisA増幅ベクター/SapIエンドヌクレアーゼ/DNAリガーゼを使用してin vitroでポリマー化された、合成HBVエピトープ遺伝子の混合物(図4、レーン：MIX)は、poly-HBVエピトープ遺伝子のバリエーションを修復し、コードされたポリエピトープタンパク質を発現し、増幅サイクルを繰り返すよう、pAMP-HisA増幅ベクター中で再度クローン化された。増幅反応の第一ラウンドにおいて、発明者らは、2~13コピーのエピトープを含む、一連のクローンを得た(レーン1~13、PCR分析、DNA断片はその長さ(結合したエピトープの数の直接的な指標)が長くなるほどゆっくりと移動する)。DNA配列の分析は、得られたコンストラクトにおけるORFの持続性を示し、従ってこのような各合成多遺伝子は、これらの合成タンパク質が標的とする役割に関して非常に重要な、異なるポリエピトープHBVタンパク質をコードする。

これは、それらの異なるバリエーションが、免疫応答の強度

及び可溶性の変化を誘導するという事実に起因する。SapIによる再度の除去後、各コンカテマー遺伝子バリエーションは、全く別の増幅反応に供されてもよく、(プロリンにより分断された)数百コピーのHBVエピトープ遺伝子から成る次の多遺伝子をもたらし、ハイブリッドコンストラクト内で、大腸菌高発現系におけるORF持続性を維持する。従って、連続的な各増幅ラウンドは、幾何学的な比率でコンカテマーにおけるモノマーコピー数を増幅させ、短時間で、所定のコピー数の標的プラスミドコンストラクトのバリエーションが得られる。

【0035】

図6は、HBVエピトープの五量体コンカテマーの増幅の第二ラウンドの結果を示す。

【0036】

DNA断片はSapIエンドヌクレアーゼを使用して、増幅の第1ラウンドの間に得られ、再度増幅に供された5エピトープのコピーのコンカテマーを含むpAMP1-HisAコンストラクトから除去された。最も大きなコンカテマーは、12コピーの5量体を含み、60倍の一方方向性の多量体HBVエピトープを構成しており、アガロースゲル分離の端において可視化される。大きなコンカテマーが明白に可視化されるほど、一方で区別できるバンドへと分離されなくなる。得られた第二ラウンドの産物は、pAMP-HisA中へと再度クローン化され、持続性ORFを有する単一組み換えポリペプチド(タンパク質)で表される、数百又は数千のHBVエピトープのコピーの産生をもたらす増幅の第三ラウンドに供されてもよい。これらのクローンはまた、ポリエピトープタンパク質内でのエピトープ増幅のバリエーションを得るための分析的な発現にも供された。

【0037】

図7は、pAMP1-HisAベクターにおける第一の、モデルの、増幅ラウンド(13-mer)の間に得られたポリエピトープHBVタンパク質をコードするハイブリッド遺伝子の発現解析例を示している(配列番号7、図8)。発明者らは、発現された13merのポリHBVエピトープの電気泳動解析を、変性条件下のポリアクリルアミドゲル及びクマシーブルー染色で行った。レーンMはタンパク質量マーカー(GE LMW Calibration Kit)であり；レーンK0~3: 13merのHBVコンストラクトを含む、誘導前の組み換え大腸菌培養、0、1、2、3時間のサンプル、レーン1時間~16時間: 13merのHBVコンストラクトを含む、熱誘導後の組み換え大腸菌培養、1、2、3、4及び16時間のサンプル。赤矢印は、赤紫色に染色した、13merのHBVバンドが増えていることを示す。菌における発現誘導の持続を超えて濃度が増大した(連続したレーン)、13merのバンドの赤紫色の異常な染色は、アミノ酸部分の配列の繰り返し染色の規則正しい配列から生じており、従って、検出及び単離の間にポリエピトープタンパク質の存在の更なる試験として機能を果たす。発明者らは、各エピトープがプロリン残基によって分断された、HBVの7アミノ酸エピト

ープの増幅の結果生じた13コピーのコンカテマー遺伝子のバリエーションを含むクローンの発現解析(in vivo)におけるタンパク質合成)を使用した(発現プラスミドは、配列番号8、図9を参照)。この技術は、ORFの持続性を維持する。発現は、大腸菌、人工ポリエピトープHBVタンパク質の高発現をもたらすP_{RL}バクテリオファージプロモーターの系において実施された。

【0038】

図10: ABCは、ポリエピトープタンパク質のバリエーションの例: 13コピーのコンカテマー遺伝子の発現を分離する手法とウエスタンブロット検出を表している。(増幅ベクターを有し、13merのHBVエピトープを発現する)組み換え菌の予備培養(10L)から誘導及び発現後まで、発明者らは、細菌のバイオマスを遠心分離して以下の手法に供した: (i)細胞のデブリの超音波分解及び遠心分離、(ii)分解物を65℃で加熱して宿主のタンパク質を変性させ、沈殿したタンパク質を遠心分離する、(iii)核酸及び酸性の宿主タンパク質を除去するために生成物を緩衝化ポリエチレンイミンで処理し、沈殿物を遠心分離する、(iv)硫酸アンモニウムで塩析することによって分画し、次の単離段階で使用するために、13-merのHPVエピトープを含有する沈殿物及びバッファー中の分解物を遠心分離する、(v)ゲル中でニッケルイオンをキレートするためのAKTA高性能アフィニティークロマトグラフィー-HiTrap IMAC HP、13merのN末端において6ヒスチジン残基のタグに結合する、(vi)Superdex 200pgにおけるAKTA高性能分子ふるいクロマトグラフィー。電気泳動的に均一な13merのポリエピトープタンパク質の生成された調製物を、抗6ヒスチジン残基タグモノクローナル抗体を使用して、発色反応がコンジュゲートしたHRP及び3,3',4,4'-テトラアミノビフェニルヘトラヒドロクロリドを使用して実施されるウエスタンブロットングに供した。図10は: パネルA~B: 13merのHBVエピトープを単離する連続した段階のサンプルのPAGEの変性。レーン: M-分子量マーカー(GE LMW Calibration kit); レーン1-13merのHBVエピトープを発現する組み換え細菌細胞; レーン2-超音波処理の結果生じた細胞抽出物; レーン3-加熱後沈殿した変性タンパク質; レーン4-ポリエチレンイミンでの処理後の13merを含む上清; レーン5及び6-硫酸アンモニウムでの分画後の13merを含む上清; レーン7-金属アフィニティークロマトグラフィーを使用した精製後のHBV 13mer; レーン8-分子ふるいクロマトグラフィー後のHBV 13mer; パネルC: ウエスタンブロット検出。レーン1-分子量マーカー(GE LMW Calibration kit); レーン2-精製HBV 13mer調製物; レーン3-抗6ヒスチジン残基タグ(Merk)抗体によるウエスタンブロット検出。

【0039】

組み換え宿主はいずれも6ヒスチジン配列を含むタンパク質を有していないため、陽性反応は、単離されたタ

ンパク質が13merのHBVポリエピトープタンパク質であることを明確に裏付けるものである。更なる裏づけは、分子量マーカーと比較した、単離されたタンパク質の予測サイズ及びHiTrap IMAC HPゲルに対する特異的な結合である。この手法は共通のものであり、6ヒスチジン残基と融合した他のポリエピトープタンパク質のバリエーションの単離においても成功裏に裏付けられており、多量化したHBVエピトープの量の変化を含む。

【0040】

実施例4：T7バクテリオファージのカプシド表面のHBV表面抗原の7アミノ酸エピトープのモデルを含む、ポリエピトープタンパク質の数百の固定化コピーを含む多量体構造のより高次での産生

【0041】

ポリエピトープタンパク質の構築は、単一のタンパク質分子中のエピトープ濃度の多重増加を促進し、次の増幅段階は、より高次の構造の多くのポリエピトープタンパク質分子の組合せに基づく。このことは、(i)生物学的に、ポリエピトープタンパク質と、染色体、核様体、微生物のプラスミド、細菌、バクテリオファージ、もしくはウイルスなどの高次の構造担体の遺伝材料と、ポリエピトープタンパク質をコードする遺伝子との融合を介して、又は(ii)化学的手段により、巨大分子と結合する因子の使用を介して、達成されう。

【0042】

図11は、五量体エピトープを有する多遺伝子性のポリエピトープタンパク質と、HBVエピトープ多遺伝子の増幅に働き、バクテリオファージベクターとの遺伝子工学的に融合するために使用される、EcoRI及びHindIIIの制限部位を導入する望ましいプライマーとの配列を表している。この配列は、大腸菌に感染するT7バクテリオファージカプシド表面のポリエピトープHBV五量体エピトープの生物学的固定手法の例を設計するために使用された。発明者らは、市販されているNovagen T7Select(登録商標) Phage Display SystemのファージベクターT7Slect415-1bを使用するバージョンを使用した。当該システムは、415ポリペプチドコピーを長さ50アミノ酸残基以下で正確に固定化し、従って、(好ましくは、発明者らは五量体構造を使用する)完全な高分子構造は、2075コピーのHBVエピトープを含む。バクテリオファージカプシド表面のポリエピトープタンパク質の固定化手法は、以下の段階から成る：(i)T7カプシドを形成するためのタンパク質への翻訳のためのORF持続性を維持し、DNA断片をクローニングするためのベクターT7Slect415-1b用の、エンドヌクレアーゼHindIII及びEcoRIに対する制限部位を導入した、五量体HBVエピトープをコードする断片のPCR増幅；(ii)PCR増幅した断片の、制限エンドヌクレアーゼHindIII及びEcoRIによる消化；(iii)消化したPCR断片と、予めHindIII及びEcoRIで消化したT7バクテリオファージの左右腕との一方向性のライゲーション；(i

v)組み換えT7バクテリオファージのin vitroでのパッキング及び宿主大腸菌への感染；(v)組み換えT7バクテリオファージの個々のクローンの単離、クローンの増幅及び設計された配列で産生されたDNA配列の検証。

【0043】

実施例4で使用される(五量体HBVエピトープのバリエーションをコードする)Phage Display Systemのインサートを産生するための基質であるPCR産物の配列は、配列16として示され、5HBVエピトープのバリエーションの増幅に使用されるPCRプライマーの配列は配列17及び18として示される。

【0044】

実施例5：ポリエピトープHBVタンパク質の免疫学的活性

【0045】

実施例2の25merのポリエピトープHBVタンパク質を実施例4において示した手法を使用して組み換え菌から単離した。代表群のマウス(それぞれ6個体)に、不完全フロイントアジュバントと混合した、精製25merのPBS緩衝溶液を20 µg/個体で接種した。並行して、対照群もPBS及び不完全フロイントアジュバントを接種した。ワクチン化サイクルは3週間間隔で3回の注射を含んだ。

【0046】

図12は、実施例3で使用された精製25mer及び、実施例4で使用された五量体HBVエピトープを数百コピー提示する組み換えT7バクテリオファージのウエスタンブロットを示す。変性PAGEを使用して分離されたサンプルを、不完全フロイントアジュバントと混合した、25merのポリエピトープHBVタンパク質を接種されたマウスに由来する上清及びPBS及び不完全フロイントアジュバントを接種された対照マウスに由来する上清を使用してウエスタンブロットした。レーンM、泳動定量マーカー；レーン1、五量体HBVエピトープを含む精製組み換えバクテリオファージ。パネルAの左手の矢印は、バクテリオファージT7カプシドと、五量体HBVエピトープとの融合タンパク質の位置を示す。パネルAの右手矢印は、精製25merタンパク質の多量体形態を示す；レーン2：図10に従って、均一に精製された25merのポリエピトープHBVタンパク質。この結果は、ポリエピトープタンパク質及び組み換えバクテリオファージT7のカプシド上に提示されたポリエピトープタンパク質の両方に存在する、7アミノ酸HBVエピトープ多量体に対する、最初の3サイクルの免疫化後の特異的な体液性免疫応答を示す。同時に、陽性のウエスタンブロットの結果及び組み換えバクテリオファージT7のDNA配列は、実施例4のクローニング法の正確性、並びに、五量体HBVエピトープを提示し、次世代ワクチンのバリエーションにおいて述べられている技術を使用する可能性を示す組み換えバクテリオファージのバリエーションを評価している。得られたポリエピトープHBVタンパク質及び組み換えT7バクテリオファージは、ポリエピトープ

17

HBVタンパク質の多量体コピーを有しており、抗HBVワク

【図 1】

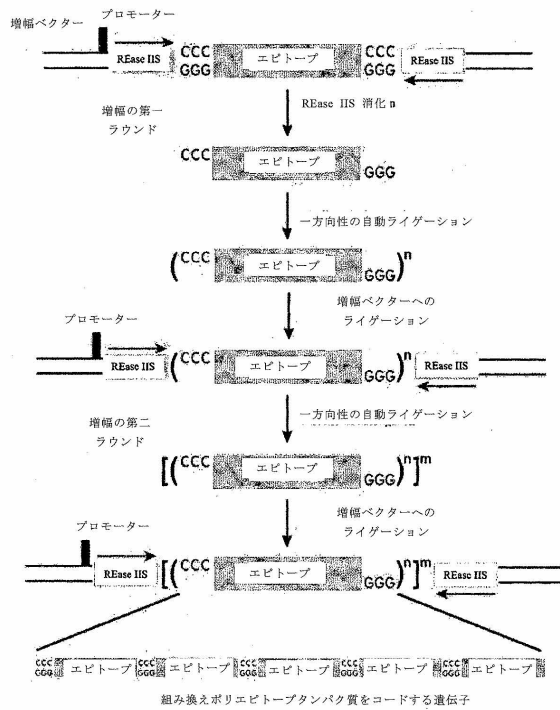


図 1

【図 3】

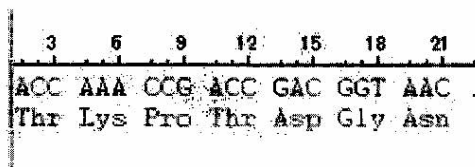


Fig. 3

【図 5】

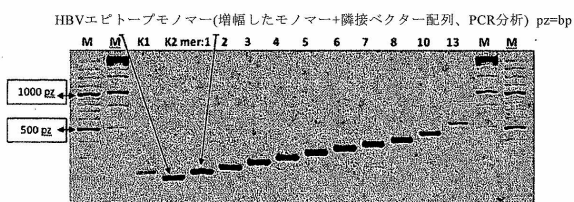


図 5

18

チンのプロトタイプを構成する。

【図 2】

Vector 1: pAMP1-A: ORF (during reading of SmaI digestion site)
SmaI SmaI SmaI STOP (3 ORF)
ATG C GCTCTT ACCC GGG CCC AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG
Met Ala Ser Ser Pro

Vector 2: pAMP1-B: ORF B (phase -1 bp)
SmaI SmaI SmaI STOP (3 ORF)
ATG GCTCTT ACCC GGG CCC AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG
Met Ala Ser Ser Pro

Vector 3: pAMP1-C: ORF C (phase +1 bp)
SmaI SmaI SmaI STOP (3 ORF)
ATG CC GCTCTT ACCC GGG CCC AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG
Met Pro Leu Thr Thr

Vector 4: pAMP1-HisA: ORF/N-His tag (during reading of SmaI digestion site)
His SmaI SmaI STOP (3 x ORF)
ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GCTCTT ACCC GGG CCC AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG
Met His His His His His Ser Ser Ser Pro

Vector 5: pAMP1-HisB: ORF B (phase -1 bp)/N-His tag
His SmaI SmaI STOP (3 x ORF)
ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC GCTCTT ACCC GGG CCC AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG
Met His His His His His Ser Ser Ser Pro

Vector 6: pAMP1-HisC: ORF C (phase +1 bp)/N-His tag
His SmaI SmaI STOP (3 x ORF)
ATG CAC CAC CAC CAC CAC CAC CC GCTCTT ACCC GGG CCC AGAAGAGC TAAGTAAGTAAG
Met His His His His His Pro Leu Thr Thr

Fig. 2

【図 4】

HBVエピトープモノマー(21bp+3-n突出末端DNA) pz=bp

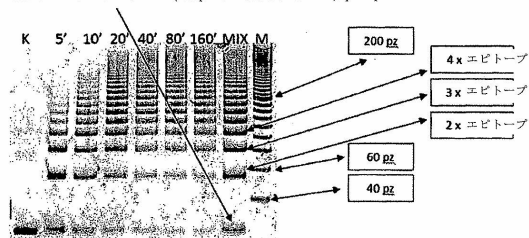


図 4

【図 7】

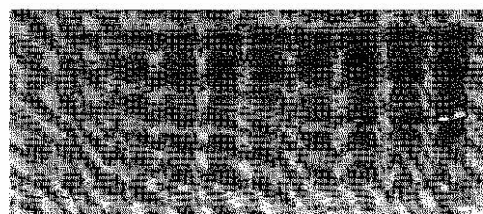


Fig. 7

【図 6】

12merの、HBVエポトープ増幅の第一ラウンドの5merコンカデマー(+3-nt突出末端)

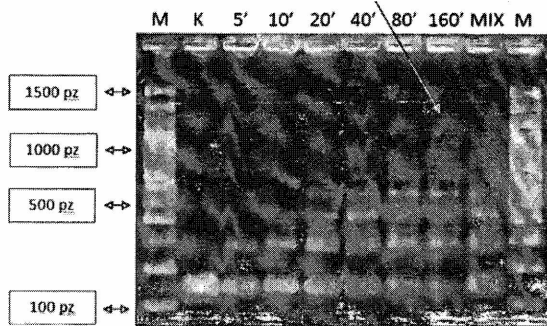


図6

【図 8】

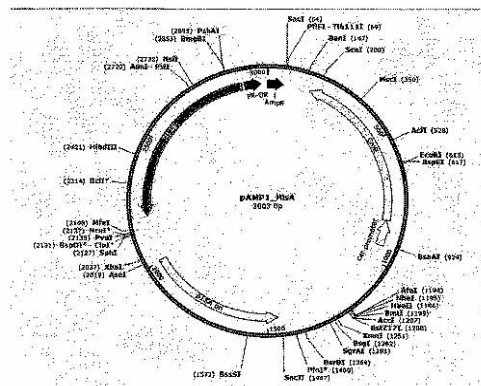


Fig. 8

【図 9】

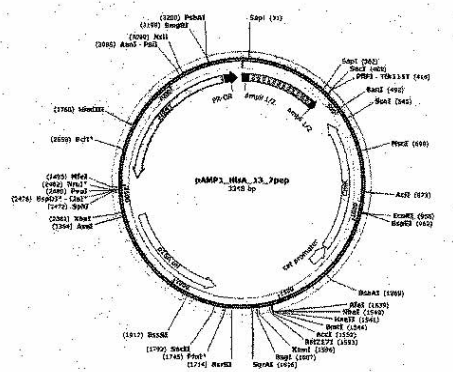
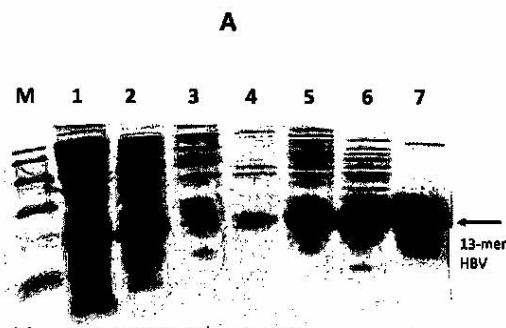
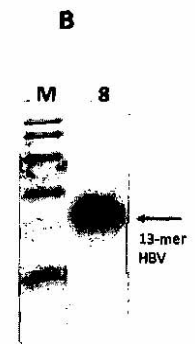


Fig. 9

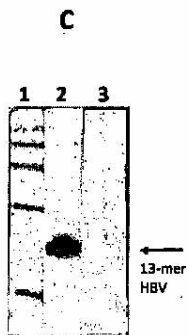
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10 C】



【図 11】

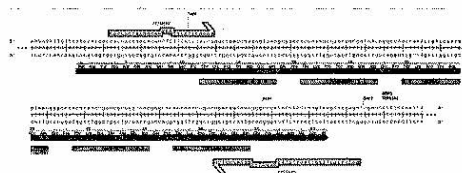
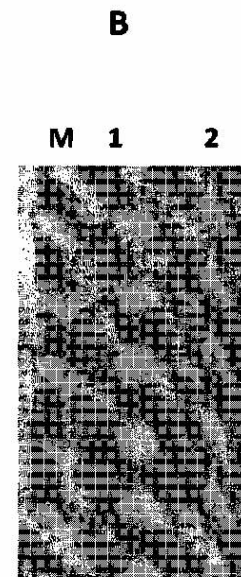
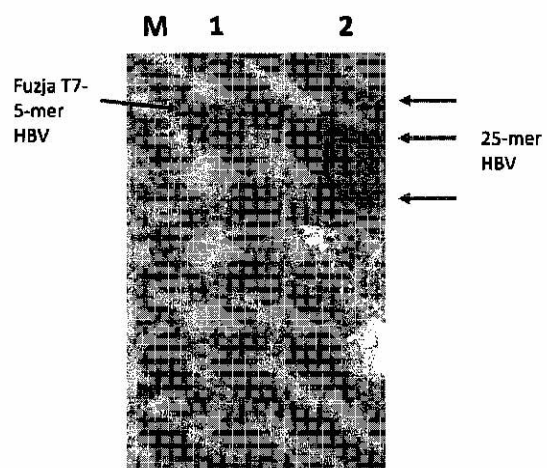


Fig. 11

【図 12 B】



【図12A】

A

フロントページの続き

- (72)発明者 アグニエシュカ・ジリツチュ - スタフーラ
ポーランド・グダニスク・PL - 8 0 - 3 0 6 ・ウリツァ・ボランキ・6 8
- (72)発明者 オルガ・ゾルニエルキエヴィチ
ポーランド・グダニスク・PL - 8 0 - 3 0 6 ・ウリツァ・スタルトバ・1 5 ア / 2 0
- (72)発明者 マウゴジャータ・スコフロフ
ポーランド・グディニャ・PL - 8 1 - 6 0 1 ・ウリツァ・カンスキエゴ・1 ア / 1
- (72)発明者 ルカシュ・ヤヌス
ポーランド・ボズナン・PL - 6 0 - 6 9 4 ・ウリツァ・オシェドレ・ブワディスワヴァ・ヤギエ
ウウィ・1 5 ・エム・6
- (72)発明者 ヨアンナ・イエゼウスカ - フラッコヴィアク
ポーランド・グダニスク・PL - 8 0 - 3 3 1 ・ウリツァ・タトシャンスカ・1 1 ア / 4 8
- (72)発明者 ダリア・クレフト
ポーランド・レダ・PL - 8 4 - 2 4 0 ・ウリツァ・オブボドバ・2 6 / ベ 2 0
- (72)発明者 ダヴィド・ニゾウルスキ
ポーランド・グダニスク・PL - 8 0 - 8 0 7 ・ウリツァ・マルチナ・ドラガナ・2 0 / 6
- (72)発明者 カスヤン・シェミアコ
ポーランド・グダニスク・PL - 8 0 - 2 8 7 ・ウリツァ・オランスカ・2 ベ / 1 2
- (72)発明者 ナタリア・マチエジュフスカ
ポーランド・ブウォシニツァ・PL - 1 3 - 2 0 6 ・ザレシエ・8 0
- (72)発明者 マルタ・ノヴァック
ポーランド・レダ・PL - 8 4 - 2 4 0 ・ウリツァ・フツァソバ・3 2
- (72)発明者 アネタ・シマンスカ
ポーランド・グダニスク・PL - 8 0 - 2 8 3 ・ウリツァ・クルレフスキエ・ブズグジェ・2 3 /
3 1

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 特開平 1 1 - 2 2 1 0 8 9 (J P , A)
特表 2 0 1 3 - 5 3 1 4 8 0 (J P , A)
Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 1996, Vol.13, p.139-145
Macromolecules, 2002, Vol.35, p.8281-8287
- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 9
C 1 2 P 2 1 / 0 2
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q