

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4290327号
(P4290327)

(45) 発行日 平成21年7月1日 (2009.7.1)

(24) 登録日 平成21年4月10日 (2009.4.10)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 J
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/00
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 M
CO 7 K 14/045 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 3

請求項の数 30 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-513146 (P2000-513146)	(73) 特許権者	391008788
(86) (22) 出願日	平成10年9月22日 (1998.9.22)		アボット・ラボラトリーズ
(65) 公表番号	特表2001-517798 (P2001-517798A)		ABBOTT LABORATORIES
(43) 公表日	平成13年10月9日 (2001.10.9)		アメリカ合衆国、イリノイ州 60064
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/019767		、アボット・パーク、アボット・パーク・
(87) 国際公開番号	W01999/015899		ロード 100、エービー6エー1 0
(87) 国際公開日	平成11年4月1日 (1999.4.1)		377
審査請求日	平成17年9月16日 (2005.9.16)	(74) 代理人	100062007
(31) 優先権主張番号	08/935,009		弁理士 川口 義雄
(32) 優先日	平成9年9月22日 (1997.9.22)	(74) 代理人	100105393
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 伏見 直哉
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘルペスウイルス特異的 I g Mを検出するためのイムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトサイトメガロウイルス感染の検出方法であって、該方法は：

(a) 以下の、

(1) 少なくとも1つの融合タンパク質を含む固相であって、但し該少なくとも1つの融合タンパク質は、ヒトサイトメガロウイルス特異的 I g Mと特異的に結合する少なくとも1つのヒトサイトメガロウイルスエピトープを有する少なくとも1つのペプチドを含んで成るところの A 1 C 2 及び F 3 含有融合タンパク質である前記固相、

(2) 患者試料、及び

(3) ペプチド A 1 C 2 及び F 3

の混合物を用意するステップ；

(b) ヒトサイトメガロウイルスに対する I g M抗体を、前記少なくとも1つの融合タンパク質並びに前記ペプチド A 1 C 2 及び F 3 に特異的に結合させるステップ；

(c) 前記固相上に含まれた前記少なくとも1つの融合タンパク質と特異的に結合した I g M抗体を検出するために I g Mコンジュゲートを加えるステップ；及び

(d) 患者試料中のヒトサイトメガロウイルスに対する I g M抗体のレベルを測定するために前記固相に結合した I g M抗体を検出するステップ；

を含み、

但し、前記ペプチド A 1 C 2 及び F 3 の添加量は、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのヒトサイトメガロウイルス特異

的 I g M 抗体と前記固相上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するのに十分な量であるが、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M 抗体と前記固相上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するには不十分な量であることを特徴とする前記方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つのヒトサイトメガロウイルスエピトープが p p 1 5 0 由来であることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 3】

前記固相がヒトサイトメガロウイルス p p 5 2 由来 H 1 0 / p p 1 5 0 由来 A 1 C 2 (配列番号 5) / p p 1 5 0 由来 F 3 (配列番号 6) の融合タンパクを含むことを特徴とする請求の範囲第 2 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記ペプチド A 1 C 2 及び F 3 がヒトサイトメガロウイルス p p 1 5 0 由来 A 1 C 2 (配列番号 5) 及び p p 1 5 0 由来 F 3 (配列番号 6) から成ることを特徴とする請求の範囲第 2 項に記載の方法。

【請求項 5】

固相がマイクロ粒子からなることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

固相が材料のストリップからなることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ペプチド A 1 C 2 及び F 3 の濃度が、それぞれの少なくとも 1 つペプチドについて $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ である、請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

ヒトサイトメガロウイルス感染の検出に適した試薬であって、該試薬は、ペプチド A 1 C 2 及び F 3 を含有する希釈剤中に懸濁されたマイクロ粒子を含み、但し該マイクロ粒子はヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M と特異的に結合する少なくとも 1 つのヒトサイトメガロウイルスエピトープを有する少なくとも 1 つのペプチドを含んで成るところの A 1 C 2 及び F 3 含有融合タンパク質によりコートされており、且つ、前記希釈剤中のペプチド A 1 C 2 及び F 3 の含有量は、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M 抗体と前記マイクロ粒子上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するのに十分な量であるが、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M 抗体と前記マイクロ粒子上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するには不十分な量であることを特徴とする前記試薬。

【請求項 9】

前記ヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M と特異的に結合する少なくとも 1 つのヒトサイトメガロウイルスエピトープを有する少なくとも 1 つのペプチドにおいて、ヒトサイトメガロウイルス p p 1 5 0 由来エピトープに p p 5 2 由来 H 1 0 が更に融合されていることを特徴とする、請求の範囲第 8 項に記載の試薬。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つのペプチドが A 1 C 2 (配列番号 5) 及び F 3 (配列番号 6) を含むことを特徴とする、請求の範囲第 8 項に記載の試薬。

【請求項 11】

前記希釈剤中のペプチド A 1 C 2 及び F 3 の濃度が、それぞれの少なくとも 1 つペプチドについて $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ である、請求の範囲第 8 項に記載の試薬。

【請求項 12】

ペプチド A 1 C 2 及び F 3 を含む試薬であって、但し該ペプチド A 1 C 2 及び F 3 の含有量が、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示さない患者試料中に存在す

10

20

30

40

50

る低レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M 抗体と固相上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するのに十分な量であるが、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M 抗体と固相上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するには不十分な量であることを特徴とする前記試薬。

【請求項 1 3】

前記ペプチドが A 1 C 2（配列番号 5）及び F 3（配列番号 6）を含むことを特徴とする、請求の範囲第 1 2 項に記載の試薬。

【請求項 1 4】

ヒトサイトメガロウイルス感染の検出に適したキットであって、該キットは、
(a) ヒトサイトメガロウイルスに対する I g M 抗体を特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドを含有する希釈剤中に懸濁されたマイクロ粒子であって、該マイクロ粒子はヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M と特異的に結合する少なくとも 1 つのヒトサイトメガロウイルスエピトープを有する少なくとも 1 つのペプチドを含んで成るところの A 1 C 2 及び F 3 含有融合タンパク質によりコートされており、且つ、該希釈剤は、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M 抗体と前記マイクロ粒子上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するのに十分な量であるが、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的 I g M 抗体と前記マイクロ粒子上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するには不十分な量で前記ヒトサイトメガロウイルスに対する I g M 抗体を特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドを含有することを特徴とする、該希釈剤中に懸濁されたマイクロ粒子、

(b) 希釈液中の I g M コンジュゲート、及び

(c) 遮断剤を含有する緩衝希釈剤を含むことを特徴とする前記キット。

【請求項 1 5】

前記少なくとも 1 つのペプチドが p p 1 5 0 由来であることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

【請求項 1 6】

前記ヒトサイトメガロウイルスが精製組換えヒトサイトメガロウイルス抗原を含むことを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

【請求項 1 7】

前記少なくとも 1 つのペプチドがペプチド A 1 C 2（配列番号 5）及び F 3（配列番号 6）を含むことを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

【請求項 1 8】

前記 (a) の希釈剤が緩衝スクロース／仔ウシ血清希釈剤であることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

【請求項 1 9】

前記 (b) のコンジュゲートが抗ヒト I g M 酵素コンジュゲートであることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記 (b) のコンジュゲートが抗ヒト I g M 蛍光コンジュゲートであることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

【請求項 2 1】

前記 (b) のコンジュゲートが抗ヒト I g M 化学発光コンジュゲートであることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

【請求項 2 2】

前記 (b) の希釈液が緩衝仔ウシ血清であることを特徴とする請求の範囲第 1 4 項に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 23】

前記(c)の遮断剤が仔ウシ血清であることを特徴とする請求の範囲第14項に記載のキット。

【請求項 24】

ヒトサイトメガロウイルス感染の検出に適したキットであって、該キットは、
(a) ヒトサイトメガロウイルス抗原を含む材料のストリップ、
(b) ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチドを含有する試料希釈緩衝剤であって、但し該ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチドの含有量が、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的IgM抗体と前記ストリップ上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するのに十分な量であるが、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的IgM抗体と前記ストリップ上のヒトサイトメガロウイルス抗原とが結合することを防止するには不十分な量である、前記希釈緩衝剤、
(c) 希釈液中のIgMコンジュゲート、
(d) 緩衝洗浄液、及び
(e) 発色試薬
を含むことを特徴とする前記キット。

10

【請求項 25】

前記少なくとも1つのペプチドがペプチドA1C2(配列番号5)及びF3(配列番号6)を含むことを特徴とする請求の範囲第24項に記載のキット。

20

【請求項 26】

前記材料のストリップがニトロセルロースからなることを特徴とする請求の範囲第24項に記載のキット。

【請求項 27】

前記ヒトサイトメガロウイルス抗原が精製したウイルス及び組換えヒトサイトメガロウイルス抗原からなることを特徴とする請求の範囲第24項に記載のキット。

【請求項 28】

前記(c)のコンジュゲートが抗ヒトIgM酵素コンジュゲートであることを特徴とする請求の範囲第24項に記載のキット。

30

【請求項 29】

前記(c)のコンジュゲートが抗ヒトIgM蛍光コンジュゲートであることを特徴とする請求の範囲第24項に記載のキット。

【請求項 30】

前記(c)のコンジュゲートが抗ヒトIgM化学発光コンジュゲートであることを特徴とする請求の範囲第24項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

40

1. 発明の分野

本発明は、ヘルペスウイルス特異的IgM抗体の検出用酵素イムノアッセイの特異性を改善するためのヘルペスウイルスタンパク質由来のペプチドの使用に関する。

【0002】

2. 従来技術の検討

ヘルペスウイルス感染は、通常血清学的方法、すなわち今まで血清反応が陰性であった被検者におけるヘルペスウイルスに対する抗体の出現の証明、により診断されている。ヘルペスウイルスIgM抗体は、免疫コンピテント被検者における一次ヘルペスウイルス感染の鋭敏で特異的なインジケータである。しかしながら、数人の患者においては低レベルのIgM抗体しか生じないので、前記抗体の検出は大きく変化する。

50

【0003】

ヘルペスウイルス特異的 I g M 抗体を検出するためにヘルペスウイルス抗原を使用するアッセイの問題は、低リスクの被検者中に存在する低レベルのヘルペスウイルス特異的 I g M 抗体がしばしば検出されるほど鋭敏なことである。換言すると、前記アッセイでは、余りに多くの偽陽性結果を示す。例えば 0 ～ 8 ヶ月のような最近のヘルペスウイルス感染の診断は疑わしい。なぜならば、以前被ったヘルペスウイルス感染に起因する無症候性再活性化を経験している被験者中に存在する低レベルの I g M 抗体も検出され得るからである。アッセイの特異性を改善するために試薬中のヘルペスウイルス抗原量を低減すると、アッセイの感度も低下する。換言すると、過去 8 ヶ月以内に感染を被っていない無症候性患者において陽性結果が得られることは望ましくない。従って、最近の感染を示す I g M 抗体を検出するが、最近の感染を示さない I g M 抗体は検出しないヘルペスウイルス用アッセイを提供することが望ましい。

10

【0004】

ヒトサイトメガロウイルス (H C M V) は、ヒトに偏在するヘルペスウイルスである。H C M V が健康な成人において病因となることはまれであるが、(H I V 感染したヒトや移植レシピエントのような) 免疫低下した被検者では幾つかの病気に関係している。また、H C M V はヒトにおける先天性感染の最も一般的な病因である。ダウン症候群を除けば、子宮内一次感染が知能遅延の公知の原因の第一位である。二次感染により、余り重篤でない合併症が生ずる。感染は無症状であったり H C M V に特異的でない (発熱や白血球減少のような) 症状を伴うので、臨床検査方法は急性 H C M V 感染を診断する唯一の手段である。H C M V 感染は、病理学的材料中のウイルスまたはウイルス成分を直接検出するか、または血清学的に間接的に検出することにより診断され得る。一次 H C M V 感染は、専ら血清学的方法、すなわち今まで血清反応が陰性であった被検者における H C M V に対する抗体の出現を証明することにより診断されている。H C M V 特異的 I g M は免疫コンピテント被検者における一次 H C M V 感染の鋭敏で特異的なインジケータであり、移植レシピエントでは活性ウイルスの再活性化中に非常にしばしば生ずる。しかしながら、その検出は大きく異なり、異なる市販キットを使用して得られる結果は殆ど一致しないことが判明している。

20

【0005】

欧州特許出願第 2 6 2 5 3 1 号明細書には、ウイルス遺伝子の H i n d I I I - Y / N 断片中に局在する遺伝子によりコードされる、1 5 0 k D の H C M V 構造リンタンパク質の免疫原性部分を開示している。この欧州特許出願によれば、前記した p p 1 5 0 の免疫原性部分は、A D 1 6 9 菌株の H C M V ゲノムから E c o R I - Y 断片の内側に局在する特に約 1 . 5 k b の E c o R I - P s t I 断片によりコードされる。しかしながら、その後のより徹底的な研究により、欧州特許出願第 2 6 2 5 3 1 号明細書の開示内容は以下の点で誤りであることが分かった。タンパク質 p p 1 5 0 は U L 3 2 によりコードされることが判明し、1 . 5 k b よりもかなり長いことが判明し、最後に A D 1 6 9 菌株の E c o R I - Y 断片内に規定されるように E c o R I - P s t I 断片のかなり外側にあることが判明したからである。更に、E c o R I - Y 断片は H i n d I I I - Y / N 断片の完全に外側にある。

30

40

【0006】

1 9 9 6 年 1 2 月 2 7 日に出願された米国特許出願第 0 8 / 7 6 5 , 8 5 6 号明細書によれば、(実質的に未測定のためにポリペプチドを正しく同定していない) 上記欧州特許出願明細書に記載されているタンパク質材料により示される免疫原性と、後に同定される (N o v a k , J . P . ら, “ ヒトサイトメガロウイルスリンタンパク質 p p 1 5 0 の血清学的に関連領域の合成ペプチドを用いるマッピング (Mapping of serologically relevant regions of human cytomegalovirus phosphoprotein pp150 using synthetic peptides) ” , J . G e n . V i r o l . , 7 2 : 1 4 0 9 - 1 4 1 3 (1 9 9 1)) 、 5 ' → 3 ' 方向に U L 3 2 スクレオチド 1 7 8 2 - 1 8 4 2 によりコードされるエピトープ A 1 C 2 、すなわち p p U L 3 2 のアミノ酸 5 9 5 - 6 1 4 に相当する領域のペプチドへの封入と

50

は相関関係がある。

【0007】

米国特許第08／765, 856号明細書は、ヒトサイトメガロウイルスに対して産生した抗体、特にIgM及びIgGとの免疫反応により結合し得、適切な血清学的試験において前記抗体を検出するための抗原として使用され得、ウイルス及び／または感染細胞ライゼートと実質的に同じ力価を有する組換えタンパク質材料、特に融合タンパク質を開示している。米国特許第08／765, 856号明細書は更に、前記タンパク質材料から誘導される診断試薬及びキットも開示している。

【0008】

米国特許第08／765, 856号明細書は、酵素イムノアッセイによりヒト血清中のサイトメガロウイルス特異的IgMを検出するための組換え抗原、特に融合タンパク質を開示している。米国特許第08／765, 856号明細書は更に、前記タンパク質材料から誘導される診断試薬及びキットも開示している。

【0009】

米国特許第08／765, 856号明細書によれば、タンパク質pp52の5'→3'方向に読んでaa22-aa434の範囲の配列の少なくとも一部を有する第1領域、タンパク質pp150の5'→3'方向に読んでaa1006-aa1048の範囲の配列の少なくとも一部を有する第2領域、及びタンパク質pp150の5'→3'方向に読んでaa595-aa614の範囲の配列の少なくとも一部を有する第3領域から構成されることを特徴とするヒトサイトメガロウイルス(HCMV)に対する抗体と結合し得る組換えタンパク質材料が提供される。前記領域は、融合タンパク質内で相互に変更可能に配置され得る。

【0010】

前記領域がpp52及びpp150の配列を完全に含んでいることが好ましく、好ましい実施態様によれば、米国特許第08／765, 856号明細書の融合タンパク質は5'→3'方向に順次、第1領域、その直ぐ下流に位置する第3領域及びこの第3領域から下流にある第2領域を含み、第3と第2領域の間には架橋配列が挿入されている。前記架橋配列は、5'→3'方向にlys leu gln glu pheのアミノ酸配列からなる。配列番号7参照。

【0011】

米国特許第08／765, 856号明細書は更に、上に定義した融合タンパク質を含む、HCMV感染を血清学的方法により診断するための試薬も提供する。特に、前記診断試薬は、そのアミノ酸配列の少なくとも一部がヌクレオチド001-ヌクレオチド900までの配列番号1として配列表に記載したヌクレオチド配列によりコードされる融合タンパク質を含む。

【0012】

米国特許第08／765, 856号明細書はまた、前記融合タンパク質に対する少なくとも1つの単一特異性ポリクローナル血清またはモノクローナル抗体(MaB)を含む、HCMVを血清学的に直接検出するための診断試薬にも関する。

【0013】

米国特許第08／765, 856号明細書の別の態様によれば、ヒト血清中のサイトメガロウイルス特異的IgMを酵素イムノアッセイにより検出するための組換え抗原混合物が提供される。前記混合物は、

(i) ウイルスタンパク質pp52の5'→3'方向に読んでaa202-aa434の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列(H10)を有する第1領域と、ウイルスタンパク質pp150の5'→3'方向に読んでaa1006-aa1048の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列(F3)を有する第2領域と、同じウイルスタンパク質pp150の5'→3'方向に読んでaa595-aa614の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列(A1C2)を有する第3領域とを含む第1融合タンパク質であって、前記領域が第1融合タンパク質内で相互に変更可能に配置さ

10

20

30

40

50

れ得る第1融合タンパク質、

(i i) ウイルス遺伝子UL83によりコードされる主要マトリックスタンパク質pp65の5'→3'方向に読んでaa297-aa510の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列から構成される免疫原領域を含む第2融合タンパク質、及び

(i i i) ウイルス遺伝子UL80aによりコードされるウイルス集合タンパク質pp38の5'→3'方向に読んでaa117-aa373の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列から構成される免疫原領域を含む第3融合タンパク質

を組合せて含むことを特徴とする。

【0014】

特に、前記領域は、タンパク質CKSまたはその少なくとも一部と融合して、pp52、pp150、pp65及びpp38のアミノ酸配列を完全に含む。

【0015】

最後に、米国特許第08/765,856号明細書は、ヒト血清中のサイトメガロウイルス特異的IgMを酵素イムノアッセイにより検出するためのモノー及びポリーエピトープ融合タンパク質の混合物の使用に関する。前記混合物は、

(i) ウイルスタンパク質pp52の5'→3'方向に読んでaa202-aa434の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列(H10)を有する第1領域と、ウイルスタンパク質pp150の5'→3'方向に読んでaa1006-aa1048の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列(F3)を有する第2領域と、同じウイルスタンパク質pp150の5'→3'方向に読んでaa595-aa614の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列(A1C2)を有する第3領域とを含む第1融合タンパク質であって、前記領域が第1融合タンパク質内で相互に変更可能に配置され得る第1融合タンパク質、

(i i) ウイルス遺伝子UL83によりコードされる主要マトリックスタンパク質pp65の5'→3'方向に読んでaa297-aa510の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列から構成される免疫原領域を含む第2融合タンパク質、及び

(i i i) ウイルス遺伝子UL80aによりコードされるウイルス集合タンパク質pp38の5'→3'方向に読んでaa117-aa373の範囲の配列の少なくとも一部に対応するアミノ酸配列から構成される免疫原領域を含む第3融合タンパク質

を組合せて含むことを特徴とする。

【0016】

米国特許第08/765,856号明細書は更に、上記した融合タンパク質混合物の、ヒト血清中のサイトメガロウイルス特異的IgMを酵素イムノアッセイにより検出するための診断キットを製造するための使用にも関する。

【0017】

前記融合タンパク質H10/A1C2/F3のIgG及びIgM反応性は、1つの単一試験キット中に3つの異なるエピトープを有するタンパク質を適切に組合せて得られる場合に比してかなり高いことが判明した。従って、相乗効果が生ずる。これは多分、通常遠く離れている前記エピトープを同じウイルスタンパク質(例えば、ppUL32のA1C2及びF3)または異なるタンパク質(例えば、ppUL44のH10)上に相互に接近して配置することにより、元の完全ウイルスタンパク質中及び/またはビリオン上に存在するように配座エピトープが擬態するためであろう。

【0018】

上記配列を含む新規な融合タンパク質は、感染被検者のIgG及びIgMとの結合において精製ビリオンと同様に活性であり、従って品質及び量の点で実際HCMV感染の血清診断用診断キットを製造する際に精製ビリオン及び/または感染細胞と置換され得る標準化抗原が作成され得ることが実際判明している。明らかに、前記したエピトープは、配列番号2の順でまたはその間に配列番号1のヌクレオチド757-771に対応するような架橋配列を挿入し得る他の配列で米国特許出願第08/765,856号明細書に記載されているような新規な融合タンパク質に含められ得る。

【0019】

米国特許出願第08／765, 856号明細書の発明の別の態様に従い、上記した結果から出発して、発明の第1の態様のポリエピトープタンパク質を更に研究し、前記領域を異なる様式で配置し、タンパク質CKSと一緒に融合発現させた組換え材料を他のHCMVタンパク質の免疫原領域と組合せてIgMに対して非常に有効な融合タンパク質混合物を得た。

【0020】

米国特許出願第08／765, 856号明細書の融合タンパク質は、そのHCMV IgM、特に感染の初期相中に産生されるHCMV IgMを効果的に結合させる能力が実質的に100%であるので、HCMV特異的抗体を血清学的に検出するための診断試薬を直接製造するために単独でまたは混合して使用され得る。前記試薬は、米国特許出願第08／765, 856号の発明の融合タンパク質の混合物を最後には他のHCMV抗原及び／または複数回反復された免疫原配列を含めたより複雑な融合タンパク質と組合せて含み得る。

10

【0021】

米国特許出願第08／765, 856号の発明の融合タンパク質により表されるタンパク質材料は、ヒトサイトメガロウイルス及び／または各種方法により得られる米国特許出願第08／765, 856号の発明のタンパク質に対する特異的ポリクローナル血清またはモノクローナル抗体(MaB)により表される検出用抗原を血清学的に検出するための診断試薬を公知の方法を用いて製造するために更に使用され得る。

20

【0022】

米国特許出願第08／765, 856号の発明のタンパク質を含む上記診断試薬は、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)に対する抗体の産生を血清学的方法により検出するための診断キットを製造するために使用され得、ここで試薬はニトロセルロース紙(ブロットティング)上に吸着されている。最後に、米国特許出願第08／765, 856号の発明のタンパク質は、精製後、手動または完全もしくは部分自動化されている、ELISAアッセイ、ラテックス凝集試験、RIA及びHCMV特異的IgG及びIgMの存在を血清学的にスクリーニングするための公知方法において使用され得る。

【0023】

融合タンパク質H10／A1C2／F3を使用するアッセイの問題は、低リスクの被検者中に存在する低レベルのHCMV特異的IgM抗体もしばしば検出される程鋭敏であることである。換言すると、前記アッセイは、余りに多くの偽陽性結果を示す。以前被ったHCMV感染のために無症候性再活性化を経験している被験者中に存在する低レベルのIgM抗体が検出されるおそれがあるので、0～8ヶ月のような最近のHCMV感染の診断は疑わしい。アッセイの特異性を改善するために試薬中の融合タンパク質H10／A1C2／F3の量を低減すると、アッセイの感度も低下する。換言すると、過去8ヶ月以内に感染を被っていない無症候患者において陽性結果が得られることは望ましくない。従って、最近の感染を示すIgM抗体を検出するが、最近の感染を示さないIgM抗体は検出しないHCMVのアッセイを提供することが望まれている。

30

【0024】

(発明の要旨)

1つの態様で、本発明は、低リスクの被検者中に存在する低レベルのヘルペスウイルス特異的IgM抗体は検出せずに最近の感染を示すヘルペスウイルス特異的IgM抗体を検出する方法を提供する。本発明はまた、低リスクの被検者中に存在する低レベルのヘルペスウイルス特異的IgM抗体は検出せずに最近の感染を示すヘルペスウイルス特異的IgM抗体を検出する際に使用する試薬をも提供する。

40

【0025】

本発明の前記方法は、

(a) ヘルペスウイルス抗原の少なくとも一部を含む固相を用意するステップ、

(b) ステップ(a)の固相に患者試料を導入するステップ、

50

(c) ヘルペスウイルスに対する I g M 抗体をステップ (a) の固相に特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドを導入するステップ、

(d) ヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を、前記したヘルペスウイルス抗原の一部及び前記したヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を固相に特異的に結合させ得るペプチドに特異的に結合させるステップ、

(e) 患者試料中のヘルペスウイルスに対する I g M 抗体のレベルを測定するステップを含む。

【0026】

本発明の 1 実施態様において、前記固相はマイクロ粒子である。この実施態様では、ヘルペスウイルス抗原をコートしたマイクロ粒子を、ヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を特異的に結合させ得るペプチドを含有する希釈剤中に懸濁させる。患者試料を緩衝液で希釈し、次いで希釈剤中に懸濁させたコートマイクロ粒子とインキュベートする。ヘルペスウイルス抗原に対するヘルペスウイルス特異的 I g M 抗体は、マイクロ粒子（固相）及びヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を特異的に結合させ得るペプチド（液相）に結合させる。次いで、固相と液相を分離し、マイクロ粒子に結合した I g M 抗体のみをヒト I g M 特異的コンジュゲートを用いて検出する。

10

【0027】

本発明の別の態様において、固相は材料のストリップである。この実施態様では、ニトロセルロースストリップにヘルペスウイルスから精製したヘルペスウイルス抗原を含浸させる。患者試料を、ヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を特異的に結合させ得るペプチドを含有する緩衝液で希釈する。次いで、ヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を特異的に結合させ得るペプチドを含有する希釈試料をニトロセルロースストリップに適用する。ヘルペスウイルス抗原に対するヘルペスウイルス特異的 I g M 抗体は、ニトロセルロース（固相）及びヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を特異的に結合させ得るペプチド（液相）に結合させる。次いで、固相と液相を分離し、ニトロセルロースに結合した I g M 抗体のみをヒト I g M 特異的コンジュゲートを用いて検出する。

20

【0028】

本発明の 1 実施態様において使用するのに適した試薬は、ヘルペス抗原の少なくとも一部をコートしたマイクロ粒子を含有する溶液を、ヘルペスウイルス抗原に対する I g M 抗体を特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドを含有する希釈剤中に懸濁して含む。本発明の別の実施態様において使用するのに適した試薬は、ヘルペスウイルス抗原に対する I g M 抗体を特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドを含有する試料希釈剤を含む。

30

【0029】

自動化装置において本発明で使用するのに適したキットは、

(a) ヘルペスウイルス抗原、好ましくはヘルペスウイルス抗原に対する I g M 抗体を特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドを含有する希釈剤中に懸濁させたヘルペスウイルス抗原の少なくとも一部をコートしたマイクロ粒子、

(b) 希釈剤中の I g M コンジュゲート、及び

(c) 遮断剤を含有する緩衝希釈剤を含む。

40

【0030】

前記方法、試薬及びキットにおいて、前記したヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を固相に特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドの量は、急性または最近のヘルペスウイルス感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのヘルペスウイルス特異的 I g M 抗体を結合させるのに十分であるが、前記したヘルペスウイルスに対する I g M 抗体を固相に特異的に結合させ得る少なくとも 1 つのペプチドが急性または最近のヘルペスウイルス感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのヘルペスウイルス特異的 I g M 抗体を結合させる程多くない。

【0031】

50

1つの特定の態様において、本発明は、低リスクの被検者中に存在する低レベルのHCMV特異的IgM抗体は検出せずに最近の感染を示すHCMV特異的IgM抗体を検出する方法を提供する。本発明はまた、低リスクの被検者中に存在する低レベルのHCMV特異的IgM抗体は検出せずに最近の感染を示すHCMV特異的IgM抗体を検出する際に使用するための試薬をも提供する。

【0032】

本発明のこの態様の方法は、

(a) ヒトサイトメガロウイルスの少なくとも一部、好ましくはpp150タンパク質（以下、“pp150”）を含む固相を用意するステップ、

(b) ステップ(a)の固相に患者試料を導入するステップ、

(c) ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体をステップ(a)の固相に特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチドを導入するステップ、

(d) ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を、前記したヒトサイトメガロウイルスの一部（好ましくは、pp150）及び前記したヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を固相に特異的に結合させ得るペプチドに特異的に結合させるステップ、

(e) 患者試料中のヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体のレベルを測定するステップ

を含む。

【0033】

本発明のこの態様の好ましい実施態様では、本発明の方法は、

(a) ヒトサイトメガロウイルスのpp150の融合タンパク質H10/A1C2/F3を含む固相を用意するステップ、

(b) ステップ(a)の固相に患者試料を導入するステップ、

(c) ヒトサイトメガロウイルスのpp150のペプチドA1C2及びF3をステップ(a)の固相に導入するステップ、

(d) ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を、融合タンパク質H10/A1C2/F3及びペプチドA1C2及びF3に特異的に結合させるステップ、

(e) 患者試料中のヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体のレベルを測定するステップ

を含む。

【0034】

本発明の1つの好ましい実施態様において、固相はマイクロ粒子である。この好ましい実施態様では、融合タンパク質H10/A1C2/F3をコートしたマイクロ粒子を、ペプチドA1C2及びF3を含有する緩衝スクロース/仔ウシ血清希釈剤中に懸濁させる。生物学的サンプルを緩衝液で希釈し、次いで緩衝スクロース/仔ウシ血清/ペプチド希釈剤中に懸濁させたコートマイクロ粒子とインキュベートする。pp150に対するHCMV特異的IgM抗体はマイクロ粒子（固相）及びペプチド（液相）に結合させる。次いで、固相と液相を分離し、マイクロ粒子に結合したIgM抗体のみをヤギ抗-ヒトIgM特異的コンジュゲートを用いて検出する。

【0035】

本発明の別の好ましい実施態様において、固相は材料のストリップである。この実施態様では、ニトロセルロースストリップにウイルスから精製したpp150及び融合タンパク質A1C2/F3を含浸させる。生物学的サンプルを、ペプチドA1C2及びF3を含有する緩衝液で希釈する。次いで、ペプチドを含有する希釈サンプルをニトロセルロースストリップに適用する。pp150に対するHCMV特異的IgM抗体は、ニトロセルロース（固相）及びペプチド（液相）に結合させる。次いで、固相と液相を分離し、ニトロセルロースに結合したIgM抗体のみをヤギ抗-ヒトIgM特異的コンジュゲートを用いて検出する。上記実施態様は、援用により本明細書に含まれるとするPCT/US 97/13942に記載されている。

【0036】

本発明の1つの実施態様で使用するのに適した試薬は、ヒトサイトメガロウイルスの少なくとも一部、好ましくはpp150、より好ましくは融合タンパク質H10/A1C2/F3をコートしたマイクロ粒子を含有する溶液を、ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチド、好ましくはペプチドA1C2及びF3を含有する希釈剤中に懸濁して含む。本発明の別の実施態様で使用するのに適した試薬は、ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチド、好ましくはペプチドA1C2及びF3を含有するサンプル希釈剤を含む。

【0037】

自動化装置において本発明で使用するのに適したキットは、

(a) ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチド（好ましくは、ペプチドA1C2及びF3）を含有する希釈剤中に懸濁させた、ヒトサイトメガロウイルスの少なくとも一部（好ましくはpp150、より好ましくは精製組換えHCMV抗原）をコートしたマイクロ粒子、

(b) 希釈剤中のIgMコンジュゲート、及び

(c) 遮断剤を含有する緩衝希釈剤

を含む。(a)の希釈剤が緩衝スクロース/仔ウシ希釈剤であることが好ましい。(b)のコンジュゲートがヤギ抗-ヒトIgMアルカリホスファターゼコンジュゲートであり、(b)の希釈剤は緩衝仔ウシ血清であることが好ましい。(c)の遮断剤は仔ウシ血清であることが好ましい。

【0038】

本発明の別の実施態様で使用するのに適したキットは、

(a) HCMV抗原（好ましくは、精製ウイルス及び組換えHCMV抗原）を含む材料のストリップ（好ましくは、ニトロセルロース製ストリップ）、

(b) ヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチド（好ましくは、ペプチドA1C2及びF3）を含有するサンプル希釈緩衝液、

(c) 希釈剤中のIgMコンジュゲート（好ましくは、緩衝仔ウシ血清希釈剤中のヤギ抗-ヒトIgMアルカリホスファターゼコンジュゲート）、

(d) 緩衝洗浄液、及び

(e) 発色試薬

を含む。

【0039】

前記方法、試薬及びキットにおいて、前記したヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を固相に特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチドの量は、急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的IgM抗体を結合させるのに十分でなければならないが、前記したヒトサイトメガロウイルスに対するIgM抗体を固相に特異的に結合させ得る少なくとも1つのペプチドが急性または最近のヒトサイトメガロウイルス感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのヒトサイトメガロウイルス特異的IgM抗体を結合させる程多くてはならない。

【0040】

本発明は、患者試料中のヘルペスウイルス特異的IgM抗体を検出するための診断イムノアッセイの性能を改善する。改善された性能には、高い診断アッセイ特異性と高い診断アッセイ感度、低い偽陽性及び偽陰性結果、急性及び最近の感染を示すヘルペスウイルス特異的IgM抗体の改良された検出、急性及び最近の感染を示さないヘルペスウイルス特異的IgM抗体の改良された非検出、及びウイルス単離、抗原血またはPCRにより測定されるようなウイルス学的診断との良好な相関関係が含まれるが、これらに限定されない。ヒトサイトメガロウイルスの場合、最近の感染は過去8ヶ月間に被った感染である。

【0041】

(詳細な記載)

本明細書中、用語「ヘルペスウイルス」は、1型及び2型単純ヘルペスウイルス、水瘡ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バールウイルス並びにヒト6型、7型及び8型ヘルペスウイルスを含めたヒトヘルペスウイルスを指す。これらの大きな包膜DNAウイルスは広スペクトルに亘る病気に関与し、一次感染後体内に潜伏するようになり、ある不特定の時間経過後に再活性化する可能性があるという独自の特徴を有する。ヘルペスウイルスは、援用により本明細書に含まれるとするJoklik, Willett及びAmos編、Zinsser Microbiology、18版、コネチカット州ノーウォークに所在のAppleton-Century-Crofts (1984) 発行、p. 997-1012に詳細に記載されている。

10

【0042】

本明細書中、用語「低リスク」は、最近HCMV感染を被らなかった被検者を指す。「最近」とは過去0～8ヶ月以内を指す。

【0043】

本明細書中、用語「固相」は、そこにアナライト、アナライト複合体またはアッセイ試薬が結合するようになり、そこから未反応のアッセイ試薬、試験サンプルまたは試験溶液が分離され得る任意の材料を指す。固相は通常「固相試薬」を形成すべくその表面に結合した特定の結合メンバーを有しており、その結合メンバーによりアナライトまたは別のアッセイ試薬が結合し得る。固相に結合させる特定結合メンバーは、直接アナライトに結合するかまたは補助的特異的結合メンバーを用いて間接的にアナライトに結合するように選択され得、固相試薬が試験サンプル及び／または他のアッセイ試薬と接触する前、その間またはその後に固相試薬に結合し得る。

20

【0044】

勿論、固相は複数の成分を含んでいてもよく、固定化特異的結合メンバーは固相の任意の成分またはすべての成分に直接結合し得ると理解されたい。例えば、固相の複数成分には、固相の二次または補助成分内に物理的、化学的または生化学的手段により物理的に捕捉もしくは保持及び固定化される固相試薬が含まれ得る。別の例として、アナライト特異的結合メンバーは不溶性マイクロ粒子に結合し得、その後このマイクロ粒子は多孔質材料により保持される。「保持」とは、一旦多孔質材料上に保持されたマイクロ粒子は多孔質材料内の別の場所に実質的に移動することができないことを意味する。それ自体が固相試薬であり得る第1固相成分は、第1固相成分が試験サンプル及び／または他のアッセイ試薬と接触する前、その間またはその後に固相の補助成分により保持され得る。しかしながら、多くの実施態様では、特異的結合メンバーは単一の固相成分に結合または付着し、その後こうして形成された可動性固相試薬を試験サンプルまたは他のアッセイ試薬と接触させている。

30

【0045】

特異的結合メンバーを、例えば固相に対して特異的結合メンバーを受動的に非共有結合させるような物理的手段により、または共有結合を介するような化学的手段により固相に結合させてもよい。特異的結合メンバーは、その後の反応及び洗浄ステップ中に特異的結合メンバーが実質的に全く脱着しないように固相に結合していなければならない。選択される特異的結合メンバー及びカップリング方法に関係なく、特異的結合メンバーは固相にカップリングさせた後抗体に結合し得るものでなければならない。

40

【0046】

本発明の固相は、マイクロ粒子に化学的または物理的に結合した抗体に対して特異的な結合メンバーを有するマイクロ粒子の混合物であり得る。本発明で使用され得るマイクロ粒子は好ましくはポリマー材料から構成され、より好ましくはスチレン単位を有するポリマーまたはアクリレート単位を有するポリマーから誘導されるマイクロ粒子である。好ましいマイクロ粒子は実質的に球形であり、好ましくは約0.1 μm ～約0.25インチの半径を有する。試料サンプルからマイクロ粒子を分離するための好ましい方法は、多孔質マトリックス（例えば、ガラス繊維）上にマイクロ粒子を取り込むことを含む。

50

【0047】

本発明で使用され得る他の固相には、マイクロ粒子に化学的または物理的に結合した抗体に対して特異的な結合メンバーを有する磁化マイクロ粒子の混合物が含まれる。本発明において有用な磁化マイクロ粒子は酸化鉄または酸化クロムからなるコアとポリマーコーティングを有する。前記コーティングがスチレン単位を有するホモポリマー及びコポリマー、カルボキシル化スチレン単位を有するホモポリマー及びコポリマー、または（メタ）アクリレート単位を有するホモポリマー及びコポリマーからなることが好ましい。

【0048】

当業者に公知の他の固相には、反応トレーのウェルの壁、微量滴定トレーのウェル、チューブ、ポリマービーズ、ニトロセルロースストリップ、膜等が含まれる。天然材料、合成材料及び合成的に改質した天然材料が固相材料として使用され得る。前記材料には、多糖類、例えば紙のようなセルロース材料及び酢酸セルロースやニトロセルロースのようなセルロース誘導体；シリカ；無機材料、例えば失活アルミナ、ケイソウ土、 $MgSO_4$ 、または多孔質ポリマーマトリックス（ここで、マトリックスは1つ以上のポリマー、例えばポリ塩化ビニル、塩化ビニル-プロピレンコポリマーや塩化ビニル-酢酸ビニルコポリマーのような塩化ビニルのホモポリマー及びコポリマーから構成され得る）中に均一に分散させた他の無機微細材料；天然繊維（例えば、綿）及び合成繊維（例えば、ナイロン）；多孔質ゲル、例えばシリカゲル、アガロース、デキストラン及びゼラチン；ポリマーフィルム、例えばポリアクリルアミド；等が含まれる。いずれにせよ、固相は所望の物理的形態を維持するのに十分な強度を有していなければならない、検出可能な信号の発生を妨害してはならない。強度は支持体を用いても付与され得る。

【0049】

本明細書中、用語「ペプチド」は、1つのアミノ酸のカルボキシル基と別のアミノ酸のアミノ基により結合した2つ以上のアミノ酸を含む天然もしくは合成化合物を指す。本発明で使用するのに適したペプチドは、化学的合成により、組換え方法により製造され得る。

【0050】

本明細書中、用語「コンジュゲート」は、2つ以上の分子が共有結合してハイブリッド分子を形成しているもの、例えば標識基に結合した抗体を指す。用語「標識」は、抗体とアナライトまたはアナライトアナログとの間の反応が検出され得るように抗体、アラナイトまたはアラナイトアナログに結合させる基を指す。代表的な標識の例には、酵素、放射性標識、フルオレセイン、及び光を発する化学物質が含まれる。標識は、抗体または抗体誘導体に結合し得且つ肉眼でまたは道具を用いて検出され得る信号を発生し得る任意の物質である。本発明で使用するのに適した標識は多種であり、その中には触媒、酵素、リボソーム、及び信号発生物質（例えば、色素源、触媒、蛍光化合物、化学ルミネセント化合物、酵素等）を含有する他の小胞が含まれる。標識として使用するのに適した多数の酵素が、援用により本明細書に含まれるとする米国特許第4,275,149号明細書に記載されている。前記酵素には、フルオレセインジ（ガラクトピラノシド）、ニトロブルーテトラゾリウム、3,5',5,5'-テトラニトロベンジジン、4-メトキシ-1-ナフトール、4-クロロ-1-ナフトール、4-メチルウンベリフェリルホスフェート、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、国際特許出願公開第88100694号明細書及び欧州特許出願公開第0-254-051号明細書に記載されているジオキセタンのような化学ルミネセント酵素基質、並びにそれらの誘導体及びアナログのような酵素基質と一緒に使用されるグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ホスファターゼ及びペルオキシダーゼ（例えば、アルカリホスファターゼ及び西洋ワサビペルオキシダーゼ）が含まれる。好ましくは、標識は酵素であり、最も好ましい酵素はアルカリホスファターゼである。

【0051】

本明細書中、融合タンパク質中の命名タンパク質またはペプチド、例えばH10、A1C2、F3が斜線“/”で分かれているときには、その命名タンパク質が融合タンパク質中に任意の順序で存在することを意味する。融合タンパク質中の命名タンパク質またはペプ

チド、例えばH10、A1C2、F3がハイホン“－”で分かれているときには、その命名タンパク質が融合タンパク質中に指定の順序で存在していなければならないことを意味する。

【0052】

本発明はヘルペスウイルスのすべての種に関する。本発明の説明を簡潔にするために、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）について詳細に検討する。しかしながら、ヒトサイトメガロウイルスに関連して検討した原理は他のすべての種のヘルペスウイルスにも向けられることに留意されるべきである。

【0053】

pp150としても公知の150Kdを有するリン酸化構造タンパク質はHCMVの構成成分である。タンパク質pp150は、UL82遺伝子によりコードされる1048アミノ酸から構成され、HCMV疾患の患者から得られる試料中に存在するIgM及びIgG抗体に対して反応性であることが判明している数個の免疫原領域を含む。pp150の免疫原領域は、ウイルス感染細胞、感染細胞から得られるウイルスライゼート及び精製ビリオンから入手可能である。pp150の免疫原領域はまた、pp150アミノ酸配列に由来するペプチドを化学的に合成することにより、または発現パートナー（融合タンパク質）に融合しているかまたはしていないUL32遺伝子またはその一部を適当な原核または真核宿主中で発現システムを用いて発現させることにより得られ得る。UL32遺伝子に由来するpp150の免疫原領域は宿主生物から精製され得る。こうして得られ得るpp150の免疫原領域は、HCMV感染被検者中の抗体を検出するために固相と結合させた免疫試薬として使用され得る。

【0054】

ペプチドA1C2及びF3の目的は、急性または最近感染を示さない低レベルのpp150 HCMV特異的IgM抗体に結合し、これにより固相への結合及びその後のHCMV IgMイムノアッセイでの検出を防止することである。

【0055】

本発明で使用するのに適したペプチドには、A1C2及びF3が含まれる。ペプチドA1C2は以下のアミノ酸配列（配列番号5）

（pp150の595－614aa）：

TPTPVNPSTAPAPAPTPTFA

を有する。ペプチドF3は以下のアミノ酸配列（配列番号6）

（pp150の1006－1048aa）：

GSSPQKSGTGPGPGSAGMGGAKTPSDAVQNI LQKIEKIKNTE

を有する。

【0056】

ペプチドA1C2及びF3は、市販されている自動ペプチド合成装置を用いる合成方法により製造され得る。前記製造方法は当業者に公知である。或いは、ペプチドA1C2及びF3は、援用により本明細書に含まれるとする米国特許第08／765,856号明細書に記載されているような組換え方法により製造され得る。簡単に説明すると、A1C2及びF3アミノ酸配列をコードする遺伝子を、宿主生物中で該遺伝子の発現に適した発現ベクターを用いてクローニングする。次いで、タンパク質を宿主生物から当業者に公知の技術に従って精製する。

【0057】

本発明で使用するのに好ましいペプチドの最適量はアッセイ毎に決定されなければならない。通常、ペプチドの量は、急性または最近HCMV感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのpp150 HCMV特異的IgM抗体を結合させるのに十分でなければならない。しかしながら、ペプチドの量は、急性または最近HCMV感染を示す患者試料中に存在する中～高レベルのpp150 HCMV特異的IgM抗体を結合させる程多くてはならない。融合タンパク質に対するペプチドの重量比は、好ましくは約0.3：1～約

3 : 1 の範囲である。A 1 C 2 対 F 3 の重量比は、好ましくは約 1 : 2 ~ 約 2 : 1 である。

【0058】

ペプチドは、通常粉末の形態で供給される。本発明で使用するのに適したペプチドは市販されており、カリフォルニア州サンホセに所在の Ana Spec, Inc. から入手可能である。ペプチドは水に溶解後試薬に形成される。

【0059】

本発明のアッセイを実施するために必要な他の成分には、少なくとも 1 つの遮断剤が含まれる。遮断剤の目的は、イムノグロブリンの固相への非特異的結合を低下させることにある。本発明で好ましい遮断剤は仔ウシ血清である。仔ウシ血清は幾つかのソース、例えば GIBCO から市販されている。

【0060】

自動化アッセイにおいて使用するのに適した典型的な HCMV は比較例 A に後記されている。

【0061】

本発明で使用するのに適した試薬を製造するために、ペプチド A 1 C 2 及び F 3 を水に溶解する。次いで、溶解したペプチドを、HCMV 試薬中の各添加ペプチド 1 ml あたり約 1 µg ~ 約 10 µg、好ましくは約 6 µg の最終濃度を与えるように比較例 A に記載の試薬に添加する。勿論、成分の濃度は、別のアッセイフォーマットのためには組成を最適化するために変更することができる。

【0062】

HCMV の自動分析のために必要な他の試薬には、

(1) コンジュゲート、好ましくは緩衝仔ウシ血清希釈剤中のヤギ抗-ヒト IgM アルカリホスファターゼコンジュゲート (イムノグロブリンに対して酵素を架橋させるための T r a u t のスルホ-SMCC 架橋剤)、

(2) 希釈剤、好ましくは緩衝仔ウシ血清希釈剤
が含まれる。

【0063】

HCMV IgM 低陽性血清 (すなわ、インデックス校正物質) を患者の結果 (インデックス値) を計算するために使用する。HCMV IgM 陽性血清の瓶及び HCMV IgM 陰性血清の瓶をコントロールとして使用する。インデックス校正物質を使用して、サンプル結果、すなわちサンプルのインデックス値を計算する前に計器を校正する。すべてのサンプルを計器を用いて測定し、サンプル中に存在する HCMV IgM 抗体の量に比例するレートカウントとして表す。患者試料のインデックス値は次のようにして計算され得る。

【0064】

インデックス値 = 患者試料のレートカウント / インデックス校正物質のレートカウント。

【0065】

典型的なカットオフ値は次の通りである：

インデックス値 0 ~ 0.399 = HCMV IgM 抗体について陰性、

インデックス値 0.4 ~ 0.499 = HCMV IgM 抗体について疑わしい、

インデックス値 0.5 以上 = HCMV IgM 抗体について陽性。

【0066】

カットオフ値は、アッセイ感度及び特異性を最適化するためにアッセイの特定環境に従って変更され得る。

【0067】

HCMV のようなヘルペスウイルスを検出するのに適した自動化アッセイは、援用により本明細書に含まれるとする米国特許第 5,358,691 号明細書に記載されている。ヘルペスウイルス (例えば、HCMV) IgM 抗体のアッセイは、自動化無作為アクセスのマイクロ粒子イムノアッセイ技術 (automated random access Microparticle Enzyme Immuno

10

20

30

40

50

assay Technology)に基づいている。前記アッセイのために必要な試薬、例えばマイクロ粒子、コンジュゲート及びアッセイ試薬は試薬パック中に収容されている。他のすべてのアッセイ成分、例えば反応容器、マトリックス細胞、直線希釈剤、マイクロ粒子酵素イムノアッセイ (M E I A) 緩衝液及び4-メチルウンベリフェリルホスフェート (M U P) は装置に備えられている。前記アッセイは通常次のように実施される。

【0068】

(1) キット中心のピペッティングプローブを用いて、サンプル及び直線希釈剤 (約0.07 ml) を反応容器のサンプルウェルに入れる。

【0069】

(2) 次いで、プローブを用いて、アッセイのために必要な適当容量のアッセイ希釈剤 (約0.25 ml) 及びコンジュゲート (約0.085 ml) を試薬パックから反応容器の指定ウェルに加える。

10

【0070】

(3) ついで、プローブにより、試薬パックからヘルペスウイルス抗原コートマイクロ粒子 (約0.09 ml) 及び希釈サンプルのアリコート (約0.06 ml) を反応容器の指定ウェルに入れる。

【0071】

(4) 次いで、反応容器を方法カルーセルに移す。ヘルペスウイルス特異的抗体はヘルペスウイルス抗原をコートしたマイクロ粒子に結合して抗原-抗体複合体を形成する。

【0072】

20

(5) アッセイ希釈剤のアリコート (約0.05 ml) を補助カルーセル中のガラス繊維マトリックスに移す。アッセイ希釈剤の別のアリコート (約0.1 ml) を反応混合物に添加する。次いで、反応混合物 (約0.12 ml) をガラス繊維マトリックスに移す。マイクロ粒子はマトリックスに不可逆的に結合させる。

【0073】

(6) マトリックスをM E I A緩衝液で洗浄して、固相のマイクロ粒子上のコートヘルペスウイルス抗原に特異的に結合していない抗体を除去する。次いで、アッセイ希釈剤のアリコート (約0.05 ml) をマトリックスに移す。

【0074】

(7) マトリックスに、ヤギ抗-ヒト I g M (μ鎖特異的) 抗体/アルカリホスファターゼコンジュゲートを添加する。このコンジュゲートは、マイクロ粒子上の組換えヘルペスウイルス抗原に結合した I g M抗体に結合する。

30

【0075】

(8) 次いで、マトリックスをM E I A緩衝液で洗浄して、未結合の酵素-抗体コンジュゲートを除去する。

【0076】

(9) 酵素基質である4-メチルウンベリフェリルホスフェート (M U P) をマトリックスに添加する。ヤギ抗-ヒト I g Mに結合したマトリックス上に存在するアルカリホスファターゼ酵素はM U P由来のホスホリル部分の加水分解を触媒して、計器の光学システムにより測定される高蛍光産物を生成する。信号強度は、患者試料中に存在するヘルペスウイルス特異的 I g M抗体の量に比例する。

40

【0077】

自動化イムノアッセイによるH C M V検出用試薬の製造

H C M V検出用アッセイのために適した試薬の製造についての以下の記載は、援用により本明細書に含まれるとする米国特許出願第08/765,856号明細書に既に記載されている。

【0078】

試薬、酵素及び培地

制限酵素のT4 D N Aリガーゼ、仔ウシ腸アルカリホスファターゼ (C I A P)、ポリヌクレオチドキナーゼ及びD N AポリメラーゼIのクレノウ断片は、マサチューセッツ州

50

Baverlyに所在のNew England Biolabs, Inc. またはインディアナ州インディアナポリスに所在のBoehringer Mannheim Corp. から購入した。DNA及びタンパク質分子量基準、Daiichiプレキャスト勾配ポリアクリルアミドゲル、及び緩衝液を含むSemi-Dry Blotting Systemは、マサチューセッツ州ナティックに所在のIntegrated Separation Systemsから入手した。イソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG)、アクリルアミド、N, N'-メチレンビスアクリルアミド、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)、4-クロロ-1-ナフトール及びドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は、カリフォルニア州リッチモンドに所在のBioRad Laboratoriesから購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗体は、メリーランド州Gaithersburgに所在のKirkegaard & Perry Laboratories Inc. から購入した。"EPICUREAN COLI XL-1 BLUE" (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB lac^q Zdm15 Tn10 (Tet^r)]) スーパーコンピテント大腸菌細胞、DNA単離キット、RNA単離キット及びZAP-cDNA合成キットは、カリフォルニア州ラ・ホーヤに所在のStratagene Cloning Systems Inc. から入手した。GeneAmp試薬及びAmpliTaq DNAポリメラーゼは、コネチカット州ノーウォークに所在のPerkin-Elmer Cetusから購入した。シークエナーゼ及び7-deaza-dGTPを有するDNA配列決定用ヌクレオチドキット及びシークエナーゼversion 2.0 DNAポリメラーゼは、オハイオ州クリーブランドに所在のU. S. Biochemical Corp. から入手した。PolyA+mRNA精製キットは、ニュージャージー州ピスカタウェーに所在のPharmacia LKB Biotechnology Inc. から購入した。アンピシリンを含むルリアブロスプレート (LiSampプレート) は、イリノイ州ロンバードに所在のMicro Diagnostics, Inc. から購入した。"OPTI-MEM" 培地、ウシ胎仔血清、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、コンピテント大腸菌DH5α (F-φ80dlacZdm15 d(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 phoA hsdR17 supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1) 及び"ULTRAPURE" アガロースは、ニューヨーク州グラ
 ンドアイランドに所在のGIBCO BRL, Inc. から購入した。Bactotri
 プトン、Bactoo-酵母抽出物及びBactoo-寒天は、ミシガン州デトロイトに所在
 のDifco Laboratoriesから入手した。"NYZ" ブロスは、メリーラ
 ンド州Cockeysvilleに所在のBecton Dickinson Micro
 biology Systemsから購入した。サケ精子DNA、リゾチーム、アンピシ
 リン、N-ラウロイルサルコシン、チメロサル、緩衝液、カゼイン酸加水分解物、尿素
 、"TWEEN 20" のような界面活性剤、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 及
 び無機塩は、ミズーリ州セントルイスに所在のSigma Chemicalから購入し
 た。"SUPERBROTH II" は、11.25 g/Lのトリプトン、22.5 g/
 Lの酵母抽出物、11.4 g/Lの二塩基性リン酸カリウム、1.7 g/Lの一塩基性リ
 ン酸カリウム、10 ml/Lのグリセロールを含んでおり、水酸化ナトリウムでpH7.
 2に調節されている。トリス緩衝生理食塩水 (TBS) は、20 mM トリス及び150
 mlのNaCl (pH7.5) から構成されていた。トリス緩衝生理食塩水 "TWEEN
 20" は、TBS + 0.05% "TWEEN 20" から構成されていた。膜ブロッ
 キング溶液は、TBS中1% ウシ血清アルブミン、1% カゼイン酸加水分解物、0.
 05% "TWEEN 20" から構成されていた。Rubazyme試料希釈緩衝液 (Ru
 bazyme SDS) は、100 mM Tris (pH7.5)、135 mM NaCl、10 mM EDTA、0.2%
 "TWEEN 20"、0.01% チメロサル及び4% 仔ウシ血清から構成されていた。Ru
 bazymeコンジュゲート希釈剤
 希釈緩衝液は、100 mM Tris (pH7.5)、135 mM NaCl、0.01

10

20

30

40

50

% チメロサル及び10% 仔ウシ血清から構成されていた。“HRP”発色溶液は、TBS中0.06% 4-クロロ-1-ナフトール、0.02% H₂O₂及び0.2% メタノールから構成されていた。SDS-PAGEローディング緩衝液は、62mM Tris (pH6.8)、2% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、10% グリセロール、5% β-メルカプトエタノール及び0.1% ブロモフェノールブルーから構成されていた。TE緩衝液は、10mM Tris、1mM EDTA (pH8.0)から構成されていた。ポリスチレンマイクロ粒子は、ペンシルバニア州ウォーリントンに所在の Polysciences, Inc. から購入した。

【0079】

ウイルス増殖及びcDNAの作成

CMV菌株AD 169及びTowneを、5%ウシ胎仔血清を補充した“OPIMEM”培地中で生長させたヒト繊維芽細胞において増殖させた。感染から6日後、感染細胞を遠心により収集し、PBSで洗浄し、ガラス-PTFE (“TEFLON”)ホモジナイザーを用いて均質化した。全ウイルスDNAを、Mocarski, E. S. ら, Proc. Nat. Acad. Sci., 82:1266 (1985)に記載されているようにして単離した。全RNAはRNA単離キット(カリフォルニア州ラ・ホーヤに所在の Stratagene Cloning Systems)を用いて均質化細胞から単離し、ポリA+ RNAはmRNA単離キット(ニュージャージー州ピスカタウェーに所在の Pharmacia Biotech)を用いて単離した。HCMV cDNAは、“ZAP-cDNA”合成キット(カリフォルニア州ラ・ホーヤに所在の Stratagene Cloning Systems)を用いて精製ウイルスmRNAから合成した。

【0080】

一般的方法

DNAの酵素消化はすべて、供給元の指示に従って実施した。DNA1μgあたり少なくとも5単位の酵素を使用し、DNAを完全に消化させるために十分なインキュベーション時間を設けた。DNA及びRNAの操作に使用した各種キット及びDNAのPCR及び配列決定は、供給元のプロトコルに従った。(1)大腸菌からのプラスミドDNAの小規模及び大規模作成、(2)ファージ入を感染させた大腸菌細胞からのファージライゼートDNAの作成、(3)抗大腸菌抗体の吸収用ファージライゼートの作成、(4)フェノール-クロロホルムを用いる抽出、(5)DNAのエタノールを用いる沈殿、(6)アガロースゲル上でのDNAの制限分析、(7)アガロース及びポリアクリルアミドゲルからのDNA断片の精製、(8)DNAの制限酵素を用いる消化により生じた陥凹3'末端の、DNAポリメラーゼ1のクレノウ断片を用いる充填、(9)DNA断片のT4 DNAリガーゼによる連結、及び(10)援用により本明細書に含まれるとする Sambrook, Fritsch及びManiatis、「分子クローニング：実験手順(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載されているコンピテント大腸菌TB1細胞(Fara d(lac-proAB) rpsL φ80dlacZdM15 hsdR17)の作成については、標準的方法を使用した。PCR増幅により作成したプラスミドにクローニングするためのDNA断片をフェノール-クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させた後、PCR反応混合物を制限酵素で消化した。PCR及びDNA配列決定のためのオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystems Oligonucleotide Synthesizer、モデル390Bまたは394を用いて製造業者のプロトコルに従って合成した。

【0081】

lacZ-H10発現ベクターpROSH10の構築(製造方法A)

Maniatisら(「分子クローニング：実験手順(Molecular cloning: a laboratory manual)」, ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバーに所在の Cold Spring Harbor Laboratory (1982) 発行)に記載されている組換えDNA標準方法に従って、他の著者(Ellingerら参照)から供給されたプラスミ

10

20

30

40

50

ド p R O S から、C M V 陽性血清に対して高い反応性の、 β -ガラクトシダーゼを有する融合タンパク質を産生するファージ λ G t 1 1 を発現する初期遺伝子から得たクローンのゲノムを精製した。次いで、前記ゲノムを制限酵素 E c o R I で消化して、ファージが発現した D N A 断片を抽出した。次いで、前記断片をベクター p U C 1 8 にクローニングし、配列決定した。前記配列は、p p 5 2 (U L 4 4) の C O O H 末端で 2 3 3 アミノ酸を発現する 6 9 9 塩基対の断片を表した。次いで、図 2 に概略的に示すように前記断片を E c o R I 末端に充填後、前記断片を発現ベクター p R O S の S m a l サイトでクローニングした。こうして得られたプラスミドを p R O S H 1 0 と命名した。

【0082】

l a c Z - F 3 発現ベクター p G T 1 の構築（製造方法 B）

製造方法 A に記載の方法に従って、C M V 陽性血清に対して高い反応性の、 β -ガラクトシダーゼと融合タンパク質を産生するファージ λ G t 1 1 を発現する初期遺伝子から得たクローンのゲノムを精製した。次いで、前記ゲノムを制限酵素 E c o R I で消化して、ファージが発現した D N A 断片を抽出した。次いで、前記断片をベクター p U C 1 8 にクローニングし、配列決定した。前記配列は、p 1 5 0 (U L 3 2) の C O O H 末端で 4 4 アミノ酸を発現する 1 3 2 塩基対の断片を表した。次いで、製造方法 A で参照した図 2 に概略的に示すように前記断片の E c o R I 末端に充填後、前記断片を発現ベクター p R O S の S m a l サイトでクローニングした。こうして得られたプラスミドを p G T 1 と命名した。

【0083】

l a c Z - A 1 C 2 F 3 発現ベクター p M B 3 4 の構築（製造方法 C）

プラスミド p M B 3 4 は、E l l i n g e r ら、J . C l i n . M i c r o . , 2 7 : 9 7 1 (1 9 8 9) に記載されている l a c Z 発現ベクター p R O S の誘導体である。このベクターは、l a c Z 遺伝子 (1 - 3 7 5 アミノ酸) の下流に位置するポリリンカークローニングサイトを有する l a c Z 遺伝子の切頭形態を含む。この p M B 3 4 プラスミドは、H C M V の 1 5 0 k D の塩基性リンタンパク質をコードする p p U L 3 2 の 2 つの領域を p R O S 中の l a c Z 遺伝子の 3 ' 末端に結合させることにより 2 段階で構築した。

【0084】

A. p M B 2 8 : l a c Z - A 1 C 2 の構築

プラスミド p M B 2 8 は、図 3 に示すようにプラスミド p R O S の誘導体である。このプラスミドは、p p 1 5 0 (ヌクレオチド 1 7 6 3 - 1 8 4 2) のアミノ酸 5 9 5 - 6 1 4 をコードする p p U L 3 2 の領域由来のヒトサイトメガロウイルス (H C M V) ゲノム D N A を P C R 増幅して得た H C M V - A 1 C 2 含有 D N A 断片を p R O S のポリリンカー領域にクローニングすることにより構築した。大量プラスミド D N A (p R O S) を、一般的方法に記載したように操作して D H 5 α 細胞から単離した。プラスミド p R O S を S a l I 及び H i n d I I I で消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。S a l I サイトを含む p p U L 3 2 のヌクレオチド 1 7 8 3 から始まるセンスプライマー及び H i n d I I I サイトを含む p p U L 3 2 のヌクレオチド 1 8 4 2 から始まるアンチセンスプライマーを合成し、ゲノム H C M V D N A を含有する P C R 反応混合物に添加した。P C R 増幅後、反応混合物を S a l I 及び H i n d I I I で消化し、A 1 C 2 (ヌクレオチド 1 7 3 3 - 1 8 4 2) を含有する 6 0 塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。次いで、この精製断片を精製 p R O S / S a l I / H i n d I I I に 1 6 $^{\circ}$ C で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテント D H 5 α 細胞に形質転換した。少量 D N A を形質転換体から作成し、l a z Z 遺伝子の末端における p R O S 中の 6 0 塩基対断片の存在についてスクリーニングした。A 1 C 2 断片を含むプラスミド p M B 2 8 を単離した。p M B 2 8 中の A 1 C 2 の D N A 配列を確認し、A 1 C 2 コーディング領域は l a c Z コーディング配列とインフレームにあった。

【0085】

B. p M B 3 4 : l a c Z - A 1 C 2 F 3 の構築

プラスミド p M B 3 4 は、図 4 に示すようにプラスミド p M B 2 8 の誘導体である。この

プラスミド pMB34 は、Mocarski, E. S. ら, Proc. Nat. Acad. Sci., 82:1266 (1985) の λ gt11 ライブラリーから誘導した ppUL32 (ヌクレオチド 3016-3144) のアミノ酸 1006-1043 をコードする ppUL32 の λ gt11 サブクローンから得た HCMV-F3 を含有する DNA 断片を A1C2 DNA 配列の直ぐ下流の pMB28 のポリリンカー領域にクローニングすることにより構築した。大量プラスミド DNA (pMB28) を、一般的方法に記載したようにして DH5 α 細胞から単離した。ファージライゼート DNA は、一般的方法に記載したようにして ファージ λ gt11 クローン λ -F3 から作成した。プラスミド pMB28 を StuI で消化し、平滑末端を有するベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。ファージ λ -F3 DNA を EcoRI で消化し、陥凹 3' 末端を DNA ポリメラーゼ 1 のクレノウ断片で充填し、平滑末端が残った。平滑末端を有する 129 塩基対 λ -F3 断片をアガロースゲルを用いて精製し、平滑末端を pMB28/StuI に 16°C で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテント DH5 α 細胞に形質転換した。少量 DNA を形質転換体から作成し、正しい配向での lacZ 遺伝子の末端における pMB28 中の 129 塩基対断片の存在についてスクリーニングした。正しい配向で F3 断片を含有するプラスミド pMB34 を単離した。プラスミド pMB34 中の F3 の DNA 配列を確認し、F3 コーディング領域は lacZ-A1C2 コーディング領域とインフレームにあった。pMB34 中の lacZ-A1C2-F3 構築物のコーディング領域は、アミノ酸に関する国際標準 1 文字体系 (これによると、L は Leu であり、Q は Gln であり、K は Lys であり、E は Glu であり、F は Phe である) を用いて以下に示すように A1C2 と F3 の間に 5 アミノ酸の架橋を含む。(1) lacZ (1-375 aa) - A1C2 (595-614 aa, pp150) - K-L-Q-E-F-F3 (1006-1048 aa, pp150)

【0086】

lacZ-H10A1C2F3 発現ベクター pMB40 の構築 (製造方法 D)

上記したプラスミドを出発材料とし、上記製造方法 A、B 及び C に記載し、図 5 に示す方法に従って、2 対のオリゴヌクレオチドを合成した。その配列は、それぞれプラスミド pROSH10 及び pMB34 中に局在する H10 及び A1C2-F3 配列の PCR による連鎖増幅に使用することができる。前記プライマーを構成するオリゴヌクレオチド配列は次の通りである。すなわち、pROSH10 由来の H10 を増幅し、増幅配列中の 5' に EcoRI サイト及び増幅断片中の 3' に A1C2 と相同の 12 塩基対の配列を導入するための

【0087】

【化 1】

EcoH10: GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC;

H10A1C2: AGG CGT CGG CGT GCC GCA CTT TTG CTT CTT GGT GTT

及びプラスミド pMB34 由来の A1C2-F3 断片を増幅し、増幅産物中の 5' に H10 と相同の配列及び 3' に EcoRI サイトを導入するための

【0088】

【化 2】

H10A1C2: CAA AAG TGC GGC ACG CCG ACG CCT GTC AAT CCT TCC;

F3Eco: GAA TTC CTA TTC CTC CGT GTT CTT AAT CTT

である。次いで、前記した 2 つの独立した増幅物 ($E_{CO}H10_{A1C2}$ 及び $H10_{A1C2-F3_{ECO}}$) から生じた 2 つの断片を外部プライマー $E_{CO}H10$ 及び $F3_{ECO}$ と一緒に混合し、更に増幅した。相補的な配列 3' $E_{CO}H10_{A1C2}$ 及び 5' $H10$

10

20

30

40

50

A1C2-F3_{ECO}のために、増幅産物は3つすべてのエピトープを含み、各末端にEcoRIサイトを有する。次いで、増幅配列をpROSにクローニングし、そこから誘導したプラスミド(pMB40と命名)は対応するサイトSmaIに関連してヌクレオチド002~907に相当するDNA配列(配列番号1)を含む。

【0089】

上記製造方法A、B、C及びDに記載したプラスミドをエレクトロポレーションにより大腸菌に挿入し、クローニングした。次いで、所望の融合タンパク質の合成をIPTGを添加することにより誘発し、得られたタンパク質を細菌細胞の溶解及び細胞ライゼートをSDS及びβ-メルカプトエタノールを用いて変性してコンピテントとした。次いで、タンパク質を9~12%アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEにかけた後、ニトロセルロースに移し、そこで免疫反応を実施した。多数の血清サンプルの予備スクリーニングを、Miniblotter(米国マサチューセッツ州ケンブリッジに所在のImmune-tics)により実施した。精製IgG(オーストリア国ウィーンに所在のImmuno AGの“Endobulin”)及びIgM高陽性血清を1:100の希釈度で使用した。各ヒト血清サンプルをIgG及びIgM検出のために1:80で希釈した。ペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗-gまたは抗-μ鎖を二次抗体として使用した。

10

【0090】

2つのグループのヒト血清サンプルを使用した。第1グループの血清は17個のHCMV陽性サンプルから構成され、そのうち8個はHCMVに対して高いIgG力価を有し、7個は中~低レベルのHCMV特異的IgGを有するとELISAで検出された。HCMV特異的IgGの存在はイムノブロットングにより確認した。第2グループの血清は19個のHCMV陽性サンプルから構成され、そのうちの10個はHCMVに対して高いIgM力価を有し、9個は中~低レベルのHCMV特異的IgMを有するとELISAで検出された。また、この場合も、HCMV特異的IgMの存在はイムノブロットングにより確認した。

20

【0091】

抗HCMV IgGは、M. A. Bioproducts(米国メリーランド州Walkersvilleに所在)のCMVキットを用いて評価した。プレートを“microELISA”自動リーダー(米国バージニア州アレキサンドリアに所在のDynatech Products)で測定した。直線回帰分析を実施し、試験ランを標準化するために、各プレートには3つの血清較正物質を含めた。抗HCMV IgMを、Technogenetics(ドイツ国ハンブルクに所在)のCMV IgM“ELA”キットを用いて評価した。結果は製造業者が指示するようにして解明した。

30

【0092】

偽陽性結果を避けるために、すべてのサンプルをラテックス凝集によりリウマチ因子(英国Dartfordに所在のWellcomeのRheuma-Wellcoテスト)を検出するための試験にかけ、陰性サンプルのみを比較のために使用した。結果を図6の表1(IgG)及び図7の表2(IgM)に示す。

【0093】

提示したデータから明らかなように、H10/A1C2/F3を用いて得た結果は、IgG及びIgMのいずれについても他の融合タンパク質で得た結果に比して顕著な改善を示し、すべてのウイルスからなる抗原で得た結果に完全に重なり得る。

40

【0094】

CKS発現ベクターpJO200の構築

CKS発現ベクターpJO200により、組換えタンパク質をCMR-KDDシンテターゼ(CKS)タンパク質に融合させることができる。CKSをコードする構造遺伝子(kdsB遺伝子)のDNA配列は、Goldmanら, J. Biol. Chem., 261:15831(1986)に公表されている。このDNA配列から誘導されたCKSのアミノ酸配列(全部で248)も同一文献に記載されている。このpJO200ベクターは、Bolling及びMandrecki, Biotechniques 8:468(1

50

990)に記載されているプラスミドpTB201(図8)から3段階方法により構築される。プラスミドpJO200の構築プランは、2つの制限酵素サイトの除去及びCKS遺伝子の3'末端へのマルチクローニングサイトの付加を含む。これは、CKS遺伝子の3'末端でのタンパク質抗原をコードするHCMV(ヒトサイトメガロウイルス)遺伝子のクローニングを容易にするために実施した。完成したベクターは、元のkdsB遺伝子の240アミノ酸とポリリンカーDNA配列からのCKS遺伝子の末端の追加の12アミノ酸(全部で260アミノ酸)に対するコーディング配列を含む。

【0095】

A. pJO210の構築

プラスミドpJO210は、CKS発現ベクターpTB201の誘導体である。このプラスミドは、CKS遺伝子のプロモーターから上流に位置するpTB201中に存在する1つのEcoRIサイトを除去することにより構築した。大量プラスミドDNA(pTB201)を上記「一般的方法」の欄に記載されている方法を用いてTB1細胞から単離した。前記DNAをEcoRIで完全に消化し、ポリアクリルアミドゲルを用いて精製した。次いで、精製pTB201/EcoRI断片を、デオキシヌクレオチドトリホスフェートの存在下でDNAポリメラーゼ1のクレノウ断片を用いて処理した。この酵素は、EcoRIで消化後生じた陥凹3'末端を充填し、平滑末端を残した。クレノウ断片で処理後、DNAをフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿させ、T4 DNAリガーゼ緩衝液中に再懸濁し、T4 DNAリガーゼを用いて室温で4時間連結した。連結混合物をコンピテントTB1細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換体から作成し、EcoRIサイトの消失についてスクリーニングした。EcoRIサイトが消失したプラスミドpJO210を単離した。

【0096】

B. pJO215の構築

プラスミドpJO215は、プラスミドpJO210の誘導体である(図8)。このプラスミドは、CKS遺伝子のプロモーター中に存在する1つのBamHIサイトを架橋突然変異誘発(Mandeccki, W., Proc. Nat. Acad. Sci., 837177(1986))を用いて除去することにより構築した。大量プラスミドDNA(pJO210)を、一般的方法に記載されているようにしてTB1細胞から単離した。前記DNAをBamHIで完全に消化し、アクリルアミドゲルを用いて精製した。次いで、精製pJO210/BamHI断片を、BamHIサイトに広がるプラスミド領域においてpJO210の1つのDNA鎖に相補的な下記する突然変異オリゴヌクレオチドと混合した。

(2) 5' GGATAACAAT TGGGCATCCA GTAAGGAGGT 3'

【0097】

このオリゴヌクレオチドは、プラスミドpJO210に挿入したときBamHIサイトを破壊する(下線をつけた)1つの塩基変化を含む。突然変異オリゴヌクレオチドをpJO210/BamHIと混合後、混合物を3分間煮沸し、室温に5分間冷却し、その後コンピテントTB1細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換体から作成し、BamHIサイトの消失についてスクリーニングした。BamHIサイトが消失したプラスミドpJO215を単離した。

【0098】

C. pMC200の構築

プラスミドpMC200は、Mandeccki及びBolling, Gene, 68:101(1988)に記載されているプラスミドpMW507の誘導体である(図9)。このプラスミドは、Mandeccki及びBolling(1988)に記載されている遺伝子合成のFokI方法を用いてマルチクローニングサイトを含む合成オリゴヌクレオチドをpMW507にクローニングすることにより構築した。大量プラスミドDNA(pMW507)を、一般的方法に記載されているようにしてTB1細胞から単離した。前記DNAをSmaIで完全に消化し、次いで下記するように

(4) 5' F o k I アーム-B g l I I 付着末端-S a l I / A c c I / H i n c I I -
E c o R I - S s t I - K p n I - S m a I / X m a I - B a m H - I / X b a I - P s
t I - S p h I - 停止コドン-B g l I I 付着末端-F o k I アーム 3'
末端に F o k I アームと数個の制限酵素サイトを含む下記するオリゴヌクレオチドと混合
した。

【0099】

【化3】

5' AGGATGCGGA TCCCGATCT CGACCCGTCG ACGAATTCTGA

(3) GCTCGGTACC CGGGGATCCT CTAGACTGCA GGCATGCTAA
GTAAGTAGAT CGGGAATTCA CATCCG 3'

10

オリゴヌクレオチドを P M W 5 0 7 / S m a I と混合後、混合物を3時間煮沸し、室温に
5分間冷却し、次いでコンピテント T B 1 細胞に形質転換した。少量 D N A を形質転換体
から作成し、マルチクローニングサイトの存在についてスクリーニングした。マルチクロ
ーニングサイトを含有するプラスミド p M C 2 0 0 を単離した。マルチクローニングサイトの
D N A 配列を確認した。

【0100】

D. p J O 2 0 0 の構築

20

プラスミド p J O 2 0 0 は、プラスミド p J O 2 1 5 の誘導体である (図 1 0) 。 このプ
ラスミドは、p M C 2 0 0 からマルチクローニングサイトを除去し、前記サイトを p J O
2 1 5 中の C K S 遺伝子の 3' 末端でクローニングすることにより構築した。大量プラス
ミド D N A (p M C 2 0 0 及び p J O 2 1 5) を、一般的方法に記載されているようにし
て T B 1 細胞から単離した。プラスミド p J O 2 1 5 を B g l I I で完全に消化し、その
後連結反応中のプラスミドの再環状化を防止するために仔ウシ腸アルカリホスファターゼ
(C I A P) で処理した。プラスミド p M C 2 0 0 を F o k I で消化し、次いでマルチク
ローニングサイト (1 0 6 塩基対) を含有する p M C 2 0 0 / F o k I D N A 及び p J
O 2 1 5 / B g l I I / C I A P D N A をポリアクリルアミドゲルを用いて精製した。
プラスミド p M C 2 0 0 を F o k I で消化すると、プラスミドからマルチクローニングサ
イト D N A が放出される。この D N A は、B g l I I で消化した p J O 2 1 5 D N A に
容易に連結する B g l I I 付着末端を含有する。この精製 D N A 断片を混合し、T 4
D N A リガーゼを用いて 1 6 ° C で一晚連結させた。翌日、連結混合物をコンピテント T B 1
細胞に形質転換した。少量 D N A を形質転換体から作成し、B g l I I サイトにおける正
しい配向でのマルチクローニングサイトの存在をスクリーニングした。正しい配向でマル
チクローニングサイトを含有するプラスミド p J O 2 0 0 を単離した。B g l I I サイトにお
ける p J O 2 0 0 中のマルチクローニングサイトの D N A 配列を確認した。

30

【0101】

l a c Z - p p 3 8 (1 0 6 - 3 7 3 a a) 発現ベクター p M B 3 8 の構築

プラスミド p M B 3 8 は、l a c Z 発現ベクター p R O S の誘導体である (図 1 1) 。 こ
のプラスミドは、p p 3 8 (ヌクレオチド 3 1 6 - 1 1 1 9) のアミノ酸 (1 0 6 - 3 7
3 a a) をコードする p p U L 8 0 a の領域からゲノム H C M V D N A を P C R 増幅し
て得た H C M V - p p 3 8 (1 0 6 - 3 7 3 a a) を含有する D N A 断片をポリリンカー
領域 p R O S にクローニングすることにより構築した。p p U L 8 0 a 領域は、H C M V
の 3 8 k D のリン酸化をコードする。プラスミド p R O S を S a l I 及び H i n d I I I
で消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。S a l I サイトを
含む p p U L 8 0 a のヌクレオチド 3 1 6 から始まるセンスプライマー及び H i n d I I
I サイトを含む p p U L 8 0 a のヌクレオチド 1 1 1 9 から始まるアンチセンスプライマ
ーを合成し、ゲノム H C M V D N A を含有する P C R 反応混合物に添加した。P C R 増
幅後、反応混合物を S a l I 及び H i n d I I I で消化し、p p 3 8 (1 0 6 - 3 7 3 a

40

50

a) を含有する 804 塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。次いで、この精製断片を精製 p R O S / S a l I / H i n d I I I に 16℃で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテント D H 5 α 細胞に形質転換した。少量 D N A を形質転換体から生成し、l a c Z 遺伝子の末端における p R O S 中の 804 塩基対 p p 38 (106-373 a a) の存在についてスクリーニングした。p p 38 (106-373 a a) 断片を含むプラスミド p M B 38 を単離した。p M B 38 中の p p 38 (106-373 a a) の D N A 配列を確認し、p p 38 (106-373 a a) コーディング領域は l a c Z コーディング領域とインフレームにあった。

【0102】

p J O 200 に基づく C K S - C M V 発現ベクターの構築 (製造方法 E)

10

C K S 発現ベクター p J O 200 は、一連の 5 つの C K S - C M V 遺伝子融合構築物に対するビルディングブロックである。2 種の C K S - C M V 遺伝子融合プラスミドを構築した。1 方の C K S - C M V 遺伝子融合プラスミドは、C M V 遺伝子配列が下記するように p J O 200 のヌクレオチド 638 (C K S のアミノ酸 171) において C K S 遺伝子内に嵌入されるように構築した。

(5) C K S (1-171 a a) - C M V - C K S (171-260 a a)

【0103】

この C K S - C M V 遺伝子融合物構築方法は、エピトープ嵌入と称されている。この構築物から大腸菌において発現させた融合タンパク質は、C K S アミノ酸配列内に完全に嵌入されている抗原のエピトープを含む。プラスミド p C M V - 1 A はこのようにして構築した。

20

【0104】

他方の C K S - C M V 遺伝子融合プラスミドは、C M V 遺伝子 D N A 配列が下記するようにアミノ酸 248 において C K S 遺伝子の 3' 末端に連結するように構築した。

(6) C K S (1-248 a a) - C M V

【0105】

プラスミド p C M V - 3 B、p C M V - 4、p C M V - 9 及び p C M V - 26 はこのようにして構築した。大量プラスミド D N A (p J O 200) を、下記する構築物に対して一般的方法を用いて単離した。

【0106】

30

A. p C M V - 1 A : C K S - A 1 C 2 F 3 - C K S の構築

プラスミド p C M V - 1 A は、p J O 200 の誘導体である (図 12)。このプラスミドは、プラスミド p M B 34 中に含まれる A 1 C 2 F 3 D N A を P C R 増幅して得た H C M V - A 1 C 2 F 3 を含有する D N A 断片を p J O 200 の S t u I サイトにクローニングすることにより構築した。大量プラスミド D N A (p M B 34) を一般的方法により単離した。プラスミド p J O 200 を S t u I 及び B a m H - I で消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。この消化により、連結反応で回復されるであろう C K S 遺伝子の 3' 末端部分が除去される。このベクターバックボーン中に、2 つの P C R 由来 D N A 断片を 3 通りの連結反応でクローニングする。A 1 C 2 F 3 は S t u I / M l u I D N A 断片としてクローニングされ、C K S 遺伝子の残りの 3' 部分は M l u I / B a m H - I D N A 断片としてクローニングされ、完全 C K S 遺伝子が回復する。S t u I サイトを含む p p U L 32 のヌクレオチド 178 から始まるセンスプライマー及び M l u I サイトを含む p p U L 32 のヌクレオチド 3144 から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミド p M B 34 を含有する P C R 反応混合物に添加した。P C R 増幅後、反応混合物を S t u I 及び M l u I で消化し、A 1 C 2 F 3 を含有する 24 塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。M l u I サイトを含有する p J O 200 のヌクレオチド 640 から始まるセンスプライマー及び B a m H - I サイトを含む p J O 200 のヌクレオチド 905 から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミド p J O 200 を含有する P C R 反応混合物に添加した。P C R 反応後、反応混合物を M l u I 及び B a m H - I で消化し、C K S 遺伝子の 3' 部分を含有する 266 塩基対断片をゲ

40

50

ル精製した。次いで、精製したPCR由来DNA断片をpJO200/StuI/BamH-Iに16℃で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテントXL-1 Blue細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換体から作成し、pJO200のStuIサイトに挿入されたA1C2F3の存在についてスクリーニングした。StuIサイトに挿入されたA1C2F3を含有するプラスミドpCMV-1Aを単離した。A1C2F3及びCKS遺伝子の3'末端のDNA配列を確認した。pCMV-1A中のCKS-A1C2F3-CKSのコーディング領域は、A1C2F3とCKS遺伝子の3'末端の間のMluIサイトに由来する2アミノ酸（スレオニン及びアルギニン）架橋を含む。更に、CKSのアミノ酸171は、以下に示すように構築物中で複製されている。

(7) CKS (1-171aa) - A1C2 - K - L - Q - E - F - F3 - T - R - CKS (171-260aa)

10

【0107】

B. pCMV-3B: CKS-H10の構築

プラスミドpCMV-3Bは、プラスミドpJO200の誘導体である（図13A及び13C）。このプラスミドは、製造方法A (Ripalttiら, J. Virological Methods, 46:39 (1994)も参照) に記載されているプラスミドpROSH10由来のHCMV-H10を含有するDNA断片をpJO200にクローニングすることにより構築した。H10 DNA配列は、HCMVの52kDのリントタンパク質をコードするppUL44に誘導される。pROSH10中のppUL44のH10部分は、ヌクレオチド604-1299（アミノ酸202-434）を含有する。H10は、リントタンパク質pp52のC-末端半分をコードする。プラスミドpCMV-3Bは、H10 DNA配列をPCR増幅して得たpROSH10由来のH10 DNAをpJOのSacI/BamH-Iサイトにクローニングすることにより構築した。プラスミドpJO200をSacI及びBamH-Iで消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。SacIサイトを含むppUL44のヌクレオチド604から始まるセンスプライマー及びH10コーディング配列の末端に停止コドンとBamH-Iサイトを含有するppUL44のヌクレオチド1299から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドpROSH10を含有するPCR反応混合物に添加した。PCR増幅後、反応混合物をSacI及びBamH-Iで消化し、H10を含有する696塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製し、その後pJO200/SacI/BamH-Iに16℃で一晩連結した。翌日、連結混合物をコンピテントXL-1 Blue細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換体から作成し、SacI/BamH-IサイトにおけるpJO200中の696塩基対断片の存在についてスクリーニングした。CKS遺伝子とインフレイム融合したH10断片を含有するプラスミドpCMV-3Bを単離した。H10及びCKS遺伝子の3'末端のDNA配列を確認した。このCKS-CMV融合構築物を以下に示す。

20

30

(8) CKS (1-248aa) - H10

【0108】

C. pCMV-4: CKS-A1C2F3-H10の構築

プラスミドpCMV-4は、pJO200の誘導体である（図13A及び13C）。このプラスミドは、それぞれpMB34及びpROSH10に由来するHCMV-A1C2-K-L-Q-E-F-F3（A1C2F3と略記）及びHCMV-H10を含有するPCR増幅DNA断片をpJO200にクローニングすることにより構築した。プラスミドpJO200をSacI及びBamH-Iで消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。このベクターバックボーン中に、2つのPCR由来DNA断片を3通りの連結反応でクローニングする。A1C2-架橋-F3はSacI/PstI DNA断片として、H10はPstI/BamH-I DNA断片としてクローニングされる。SacIサイトを含むppUL32のヌクレオチド1783から始まるセンスプライマー及びPstIサイトを含むppUL32のヌクレオチド3144から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドpMB34を含有するPCR反応混合物に添加した。

40

50

PCR増幅後、反応混合物をSacI及びPstIで消化し、A1C2F3を含有する204塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。PstIサイトを含むppUL44のヌクレオチド604から始まるセンスプライマー及びH10コーディング配列の末端に停止コドンとBamHIサイトを含有するppUL44のヌクレオチド1299から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドpROSH10を含有するPCR反応混合物に添加した。PCR増幅後、反応混合物をPstI及びBamHIで消化し、H10を含有する696塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。次いで、この精製PCR由来DNA断片をpJO200/SacI/BamHIに16℃で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテントXL-1 Blue細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換体から作成し、pJO200のSacI/BamHIサイトに挿入されたA1C2F3及びH10の存在についてスクリーニングした。pJO200中のCKS遺伝子の末端にA1C2F3及びH10を含有するプラスミドpCMV-4を単離した。A1C2-K-L-Q-E-F-F3及びH10のDNA配列を確認した。pCMV-4中のCKS-A1C2F3-H10構築物のコーディング領域は、A1C2F3とH10の間にPstIサイト由来の2アミノ酸の架橋を含む。このCKS-CMV融合構築物を以下に示す。

(9) CKS(1-248aa)-A1C2-K-L-Q-E-F-F3-L-Q-H10

【0109】

D. pCMV-9:CKS-pp65(297-510aa)の構築

プラスミドpCMV-9は、pJO200の誘導体である(図13B及び13C)。このプラスミドは、pp65(ヌクレオチド889-1530)のアミノ酸297-510をコードするppUL83の領域からのHCMV cDNAをPCR増幅して得られるHCMV-pp65(297-510aa)を含有するDNA断片をpJO200にクローニングすることにより構築した。プラスミドpJO200をSacI及びBamHIで消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。HCMV cDNAを鋳型として使用してHCMV-pp65(297-510aa)DNAを作成するために、2段階入れ子PCR反応を使用した。外側入れ子PCR増幅反応のために、ppUL83のヌクレオチド807で始まるセンスプライマー及びppUL83のヌクレオチド1572で始まるアンチセンスプライマーを合成し、HCMV cDNAを含有するPCR反応混合物に添加した。PCR増幅後、外側入れ子PCR反応混合物を内側入れ子PCR増幅反応のための鋳型DNAとして使用した。内側入れ子PCR増幅反応のために、SacIサイトを含むppUL83のヌクレオチド889から始まるセンスプライマー及びpp65(297-510aa)コーディング配列の末端に停止コドンとBamHIサイトを含有するppUL83のヌクレオチド1530から始まるアンチセンスプライマーを合成し、外側入れ子増幅したDNAを含有するPCR反応混合物に添加した。PCR増幅後、反応混合物をSacI及びBamHIで消化し、pp65(297-510aa)を含有する642塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。次いで、この精製DNA断片をpJO200/SacI/BamHIに16℃で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテントXL-1 Blue細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換体から作成し、pJO200のSacI/BamHIサイトに挿入されたpp65(297-510aa)の存在についてスクリーニングした。pJO200中のCKS遺伝子の末端にpp65(297-510aa)を含有するプラスミドpCMV-9を単離した。pp65(297-510aa)のDNA配列を確認した。このCKS-CMV融合構築物を以下に示す。

(10) CKS(1-248aa)-pp65(297-510aa)

【0110】

E. pCMV-26:CKS-pp38(117-373aa)の構築

プラスミドpCMV-26は、pJO200の誘導体である(図13B及び13C)。このプラスミドを、pMB38由来のpp38(ヌクレオチド349-1119)のアミノ

10

20

30

40

50

酸 117-373 をコードする ppUL80a の領域からの pp38 DNA を PCR 増幅して得た HCMV-pp38 (117-373 aa) を含有する DNA 断片を pJO200 にクローニングすることにより構築した。大量プラスミド DNA (pMB34) を一般的方法に記載したようにして単離した。プラスミド pJO200 を SacI 及び BamHI で消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。SacI サイトを含む ppUL80a のヌクレオチド 349 から始まるセンスプライマー及び BamHI サイトを含む ppUL80a のヌクレオチド 1119 から始まるアンチセンスプライマーを合成し、pMB38 DNA を含有する PCR 反応混合物に添加した。PCR 増幅後、反応混合物を SacI 及び BamHI で消化し、pp38 (117-373 aa) を含有する 771 塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。次いで、この精製 DNA 断片を pJO200/SacI/BamHI に 16℃ で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテント XL-1 Blue 細胞に形質転換した。少量 DNA を形質転換体から作成し、pJO200 の SacI/BamHI サイトに挿入された pp38 (117-373 aa) の存在についてスクリーニングした。pJO200 中の CKS 遺伝子の末端に pp38 (117-373 aa) を含有するプラスミド pCMV-26 を単離した。pp38 (117-373 aa) の DNA 配列を確認した。この CKS-CMV 融合構築物を以下に示す。

(11) CKS (1-248 aa) - pp38 (117-373 aa)

【0111】

CKS エピトープ 嵌入 発現 ベクター pEE1 の構築

CKS エピトープ 嵌入 発現 ベクター pEE1 により、エピトープ 含有 組換え タンパク質 を以下に示すように CKS タンパク質 内に 嵌入 させることができる。

(12) CKS (1-171 aa) - 組換え タンパク質 - T-R-CKS (171-260 aa)

【0112】

この pEE1 タンパク質は、CKS 発現ベクター pJO200 を出発材料として 2 段階で構築した。第 1 段階では、突然変異原性オリゴヌクレオチドを、pJO200 中の CKS 遺伝子の 5' 末端の近くに位置する一対の隣接 MluI サイトにクローニングし、MluI サイト及び SalI サイトを除去する。この pJO への修飾により、次段階で CKS 遺伝子中の更に下流に導入するためにユニークな MluI クローニングサイトを使用することができる。第 2 段階では、pCMV-1A 由来の DNA 断片を前記修飾 pJO200 ベクターにクローニングし、よって CKS 遺伝子中に StuI/MluI 断片として遺伝子を嵌入させることができる。

【0113】

A. pJO200-ΔMluI の構築

プラスミド pJO200-ΔMluI は、CKS 発現ベクター pJO200 の誘導体である (図 14A)。このプラスミドは、以下に示す pJO200 DNA 配列中のヌクレオチド 161-174 (11-15 アミノ酸) に位置する一対の隣接する MluI サイト及び SalI サイトを突然変異原性オリゴヌクレオチドを用いて除去することにより構築した。

【0114】

【化 4】

MluI SalI MluI

(13) ¹⁵¹CCC GCG CGC TAC GCG TCG ACG CGT CTG CCC¹⁸⁰

Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu Pro

10

20

30

40

50

5' → 3' 方向にみて天然 p J O 2 0 0 DNA 配列ヌクレオチド。

【0115】

プラスミド p J O 2 0 0 を M l u I で消化し、次いでエタノール沈殿させ、アルカリホスファターゼ緩衝液中に再懸濁させた。次いで、自己連結を防ぐために、プラスミド p J O 2 0 0 / M l u I を仔ウシ腸アルカリホスファターゼ (C I A P) で処理して 5' ホスフェート基を除去した。C I A P で処理後、DNA をフェノールクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿させ、T E 緩衝液中に再懸濁させた後、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。p J O 2 0 0 / M l u I / C A P に連結させるための製造において下記する突然変異腹性オリゴヌクレオチドを合成した。

(14) 5' C G C G A C G T 3'

10

【0116】

このオリゴヌクレオチドはその 3' 末端で自己相補性であり、熱変性ステップ及びその後のアニーリングステップ後下記する 2 本鎖構造が形成されるであろう。

【0117】

【化 5】

(15) 5' CGCGAGCT 3'

3' TCGAGCGC 5'

20

このオリゴヌクレオチドは、M l u I 消化 p J O 2 0 0 DNA に連結され得る M l u I 付着末端を含む。このオリゴヌクレオチドの配列は、天然 p J O 2 0 0 DNA 配列 (13) 中の下線を付けた " T " 及び " A " 残基が下線を付したように突然変異原性オリゴヌクレオチドでは逆になっている点で天然 p J O 2 0 0 DNA とは異なる。従って、p J O 2 0 0 の M l u I サイトにクローニングしたとき、突然変異原性オリゴヌクレオチドは M l u I サイト及び S a l I サイトの両方を壊すであろう。オリゴヌクレオチドを合成後、合成オリゴヌクレオチドをその 5' 末端においてポリヌクレオチドキナーゼを使用してリン酸化した。この酵素で処理後、リン酸化オリゴヌクレオチドを 65℃ に 20 分間加熱してキナーゼを失活させた。室温に冷却後、リン酸化オリゴヌクレオチドを p J O 2 0 0 / M l u I / C I A P と混合し、65℃ で 5 分間加熱後、徐々に室温に冷却してリン酸化オリゴヌクレオチドをそれ自体にアニーリングさせた。次いで、連結緩衝液及び T 4 DNA リガーゼを混合物に添加し、20～4℃ の温度範囲で一晩インキュベートした。翌日、連結混合物をコンピテント X L - 1 B l u e 細胞に形質転換した。少量 DNA を形質転換体から作成し、M u l I 及び S a l I サイトの消失についてスクリーニングした。上記した制限酵素サイトが消失したプラスミド p J O 2 0 0 Δ M l u I を単離した。C K S 遺伝子の 5' 末端の DNA 配列を確認した。M l u I 及び S a l I サイトの除去に加えて、突然変異原性オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド 166-171 によりコードされるアミノ酸を以下に示すように S e r - T h r から T h r - S e r に変化させる。

30

【0118】

【化 6】

40

(13') ¹⁵¹CCC GCG CGC TAC GCG ACG TCG CGT CTG CCC¹⁸⁰

Pro Ala Arg Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Pro

5 → 3' 方向にみて、p J O 2 0 0 Δ M l u I DNA 配列ヌクレオチド 151-180

。

【0119】

B. p E E 1 の構築

プラスミド p E E 1 は、プラスミド p J O 2 0 0 Δ M l u I の誘導体である (図 15) 。

50

このプラスミドは、CKS遺伝子内に嵌入したHCMV-A1C2F3を含有するpCMV-1A由来のStuI/BamHI断片をpJO200ΔMluIのStuI/BamHIサイトにクローニングすることにより構築した。pJO200ΔMluI中に存在するCKSコーディング領域内のStuI/BamHI DNAをpCMV-1A由来のStuI/BamHI断片で置換することにより、生じたプラスミドpEE1はCKS遺伝子内に嵌入したHCMV-A1C2F3を含有する。プラスミドpEE1は、pEE1がCKS遺伝子の5'末端に存在する上流MluIサイトを含んでいない点でプラスミドpCMV-1Aと異なる。従って、pEE1をStuI及びMluIで消化すると、HCMV-A1C2D3 DNA断片が放出され、アガロースゲルを用いて精製後、CKS遺伝子中に平滑/MluI相容性付着末端DNA断片として嵌入させるために他の遺伝子を受容することができるベクターバックボーンが生ずるであろう。大量プラスミドDNA (pJO200ΔMluI及びpCMV-1A)を、一般的方法に記載されているようにして単離した。プラスミドpCMV-1AをStuI及びBamHIで消化し、A1C2F3及びCKS遺伝子の3'末端を含有する461塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。プラスミドpJO200ΔMluIをStuI及びBamHIで消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。次いで、これらの精製DNA断片を一緒に混合し、16℃で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテントXL-1 Blue細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換から作成し、pJO200ΔMluI中の461塩基対A1C2F3 DNA断片の存在についてスクリーニングした。A1C2F3 DNA断片を含み、CKS遺伝子の5'末端にMluIサイトを含まないプラスミドpEE1を単離した。CKS遺伝子の3'末端及びA1C2F3断片のDNA配列を確認した。プラスミドpEE1をStuI及びBamHIで消化後、アガロースゲルを用いてベクターバックボーンを精製すると、他のDNA断片との連結のための製造においてA1C2F3 DNA断片が除去される。この精製ベクターバックボーンは、下記するフォーマットで正しい読み取り枠内でCKS遺伝子を嵌入するためにDNA断片を受容し得る。

(16) 5' X-興味ある遺伝子-Y3'。

ここで、Xは平滑であり、YはMluIは相容性付着末端、例えばMluIまたはBssHIIである。

【0120】

PEE1に基づくCKS-エピトープ嵌入発現ベクターの構築 (製造方法F)

CKS発現ベクターはpEE1は、一連の3種のCKS-CMV-CKS遺伝子融合構築物に対するビルディングブロックである。各構築物のために、プラスミドpEE1をStuI及びMluIで消化し、ベクターバックボーンを精製した。このバックボーンは、5'末端にStuIサイト及び3'末端にMluIサイトを有するPCRにより生成したCMV遺伝子断片を受容することができる。StuI及びMluIで消化後、PCR断片をpEE1/StuI/MluIバックボーンにインフレーションでクローニングする。このベクターから発現したCKS-CMV-CKS融合タンパク質を以下に示すが、ここでT及びRはそれぞれスレオニン及びアルギニン残基であり、ベクターに導入された合成MluIサイトによりコードされる。

(17) CKS (1-171aa) -CMV-T-R-CKS (171-260aa)

【0121】

A. pCMV-27:CKS-A1C2F3-H10-CKSの構築

プラスミドpCMV-27は、pEE1の誘導体である (図16A及び16B)。このプラスミドは、pCMV-4由来のHCMV-A1C2F3-H10を含有する (よって、A1C2とF3の間に架橋KLEFを含有する) PCR増幅DNA断片をpEE1にクローニングすることにより構築した。大量プラスミドDNA (pEE1及びpCMV-4)を一般的方法に記載したようにして単離した。プラスミドpEE1をStuI及びMluIで消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。StuIサイトを含むppUL32のヌクレオチド1783から始まるセンスプライマー及びMluI

サイトを含む p p U L 4 4 のヌクレオチド 1 2 9 9 から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミド p C M V - 4 を含有する P C R 反応混合物に添加した。P C R 増幅後、反応混合物を S t u I 及び M l u I で消化し、A 1 C 2 F 3 - H 1 0 を含有する 9 0 6 塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。この精製 D N A 断片を p E E 1 / S t u I / M l u I に 1 6 ° C で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテント X L - 1

B l u e 細胞に形質転換した。少量 D N A を形質転換体から作成し、p E E 1 の S t u I / M l u I サイトに挿入された A 1 C 2 F 3 - H 1 0 D N A の存在についてスクリーニングした。p E E 1 の S t u I / M l u I サイトに嵌入した A 1 C 2 F 3 - H 1 0 を含有するプラスミド p C M V - 2 7 を単離した。A 1 C 2 F 3 - H 1 0 及び C K S の隣接 D N A 配列を確認した。配列番号 3 及び配列番号 4 を参照されたい。この C K S - C M V - C K S 融合構築物を以下に示すが、ここで L、Q、T 及び R はそれぞれロイシン、グルタミン、スレオニン及びアルギニン残基であり、ベクター中に導入された合成 P s t I 及び M u l I サイトによりコードされる。

(18) C K S (1 - 1 7 1 a a) - A 1 C 2 - K - L - Q - E - F - F 3 - L - Q - H 1 0 - T - R - C K S (1 7 1 - 2 6 0 a a)

【 0 1 2 2 】

B. p C M V - 2 8 : C K S - p p 6 5 (2 9 7 - 5 1 0 a a) - C K S の構築
 プラスミド p C M V - 2 8 は、p E E 1 の誘導体である (図 1 6 A 及び 1 6 B)。このプラスミドは、p C M V - 9 由来の H C M V - p p 6 5 (2 9 7 - 5 1 0 a a) を含有する P C R 増幅 D N A 断片を p E E 1 にクローニングすることにより構築した。大量プラスミド D N A (p E E 1 及び p C M V - 9) を一般的方法により精製した。プラスミド p E E 1 を S t u I 及び M l u I を消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。S t u I サイトを含む p p U L 8 3 のヌクレオチド 8 8 9 から始まるセンスプライマー及び M l u I サイトを含む p p U L 8 3 のヌクレオチド 1 5 3 0 から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミド p C M V - 9 を含有する P C R 反応混合物に添加した。P C R 増幅後、反応混合物を S t u I 及び M l u I で消化し、p p 6 5 (2 9 7 - 5 1 0 a a) を含有する 6 4 2 塩基対断片をアガロースゲルを用いて精製した。この精製 D N A 断片を p E E 1 / S t u I / M l u I に 1 6 ° C で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテント X L - 1 B l u e 細胞に形質転換した。少量 D N A を形質転換体から作成し、p E E 1 の S t u I / M l u I サイトに挿入された p p 6 5 (2 9 7 - 5 1 0 a a) D N A 断片の存在についてスクリーニングした。p E E 1 の S t u I / M l u I サイトに嵌入した p p 6 5 (2 9 7 - 5 1 0 a a) を含有するプラスミド p C M V - 2 8 を単離した。p p 6 5 (2 9 7 - 5 1 0 a a) の D N A 配列及び C K S の隣接 D N A 配列を確認した。この C K S - C M V - C K S 融合構築物を以下に示すが、ここで T 及び R はそれぞれスレオニン及びアルギニン残基であり、ベクター中に導入された合成 M u l I サイトによりコードされる。

(19) C K S (1 - 1 7 1 a a) - p p 6 5 (2 9 7 - 5 1 0 a a) - T - R - C K S (1 7 1 - 2 6 0 a a)

【 0 1 2 3 】

C. p C M V - 2 9 : C K S - p p 3 8 (1 1 7 - 3 7 3 a a) - C K S の構築
 プラスミド p C M V - 2 9 は、p E E 1 の誘導体である (図 1 6 A 及び 1 6 B)。このプラスミドは、p C M V - 2 6 由来の H C M V - p p 3 8 (1 1 7 - 3 7 3 a a) を含有する P C R 増幅 D N A を p E E 1 にクローニングすることにより構築した。大量プラスミド D N A (p E E 1 及び p C M V - 2 6) を一般的方法に記載されているようにして単離した。プラスミド p E E 1 を S t u I 及び M l u I で消化し、ベクターバックボーンをアガロースゲルを用いて精製した。S t u I サイトを含む p p U L 8 0 a のヌクレオチド 3 4 9 から始まるセンスプライマー及び M u l I サイトを含む p p U L 8 0 a のヌクレオチド 1 1 1 9 から始まるアンチセンスプライマーを合成し、プラスミド p C M V - 2 6 を含有する P C R 反応混合物に添加した。P C R 増幅後、反応混合物を S t u I 及び M l u I で消化し、p p 3 8 (1 1 7 - 3 7 3 a a) を含有する 7 7 1 塩基対断片をアガロースゲル

10

20

30

40

50

を用いて精製した。この精製DNA断片をpEE1/StuI/MluIに16℃で一晩かけて連結した。翌日、連結混合物をコンピテントXL-1ブルー細胞に形質転換した。少量DNAを形質転換体から作成し、pEE1のStuI/MluIサイトに挿入されたpp38(117-373aa)DNA断片の存在についてスクリーニングした。pEE1のStuI/MluIサイトに嵌入したpp38(117-373aa)を含有するプラスミドpCMV-29を単離した。pp38(117-373aa)のDNA配列及びCKSの隣接DNA配列を確認した。このCKS-CMV-CKS融合構築物を以下に示すが、ここでT及びRはそれぞれスレオニン及びアルギニン残基であり、ベクター中に導入された合成MluIサイトによりコードされる。

(20) CKS(1-171aa)-pp38(117-373aa)-T-R-CKS(171-260aa)

【0124】

組換えCMV抗原の作成（製造方法G）

A. HCMV遺伝子の発現

製造方法FのHCMV融合タンパク質を発現する細菌クローン、非融合CKSを発現する対照細菌菌株及び製造方法EのHCMV融合タンパク質を発現する細菌クローンを、ログ相に100µg/mlのアンプシリンを含有する“SUPERBROTH II”培地で増殖させ、CKS-HCMV融合タンパク質の合成をRobinson IM, Pilot-Matias TI, Pratt SD, Patel CB, Bevirt TS, Hunt JC, Analysis of the humoral response to the flagellin protein *Borrelia burgdorferi*; cloning of regions capable of differentiating Lyme disease from syphilis, J. Clin. Microbiol, 31:629-635(1993)に記載されているようにIPTGを添加して誘発させた。誘発から4時間後、細胞を収集し、細胞ペレットをタンパク質精製まで-80℃で保存した。すべての発現タンパク質の関連データを表3に示す。

【0125】

B. 非融合CKS及び組換えCKS-HCMV融合タンパク質の精製

複数回の洗剤洗浄により溶解し、その後8M尿素中に可溶化した後、不溶性CKS-HCMV融合タンパク質(rpCMV-1A、rpCMV-3B、rpCMV-4、rpCMV-9、rpCMV-27、rpCMV-28、rpCMV-29)を精製した。8M尿素中に可溶化後、融合タンパク質をQ-セファロースクロマトグラフィー（ニュージャージー州ピスカタウェーに所在のPharmacia Biotech）により精製した。融合タンパク質4(rpCMV-4)及び9(rpCMV-9)をSephacryl S-200クロマトグラフィー（ニュージャージー州ピスカタウェーに所在のPharmacia Biotech）により更に精製した。可溶性CKS-HCMV融合タンパク質26(rpCMV-26)を、細胞溶解後BIO-Rad Prep Cell（カリフォルニア州リッチモンドに所在のBIO-Rad）を用いて分取SDS-PAGEで精製した。不溶性融合タンパク質(rpCMV-27、rpCMV-28、rpCMV-29)も、複数回洗剤洗浄し、その後1% SDS中に可溶化することにより精製し、更にSephacryl S-300 HRクロマトグラフィー（ニュージャージー州ピスカタウェーに所在のPharmacia Biotech）により精製した。可溶性CKSタンパク質は、細胞溶解後硫酸アンモニウム沈殿させ、その後DEAEクロマトグラフィーにより精製した。

【0126】

（実施例）

比較例A

自動化HCMV IgMイムノアッセイ

HCMVゲノムのppUL32、ppUL44、ppUL83及びppUL80a領域内

10

20

30

40

50

にエピトープを含む組換えポリペプチドを使用すると、改善された感度を有し、ウイルス由来のエピトープを用いるHCMV IgMイムノアッセイよりも高特異性であり得るイムノアッセイが提供される。

【0127】

自動化HCMV IgMイムノアッセイでは、HCMVゲノムの4つの異なる領域を表す3種の大腸菌発現組換えタンパク質CKS-A1C2F3-H10-CKS (rpCMV-27)、CKS-pp65-CKS (rpCMV-28) 及びCKS-pp38-CKS (rpCMV-29) を使用した。3種の組換えポリペプチドの各々を製造方法F (A、B及びC) 及び製造方法G (A及びB) に従って製造した。自動化イムノアッセイでは、ポリスチレンマイクロ粒子を別々に上記した3種の組換え抗原の各々で1マイクロ粒子あたり1抗原としてコートした。その後、自動化イムノアッセイは逐次操作モードまたは複合操作モードで実施され得る。自動化イムノアッセイの改変では、3種の内2種の組換え抗原 (rpCMV-27及びrpCMV-29) を一緒に同一のポリスチレンマイクロ粒子上にコートし、次いで第3の組換え抗原 (rpCMV-28) をコートしたマイクロ粒子と混合してもよい。その後、改変した自動化イムノアッセイは複合操作モードで実施し得る。

【0128】

蒸留水中のポリスチレンマイクロ粒子 (大きさ $2.65\mu\text{m}$) を、 50mM Tris、 137mM 塩化ナトリウム及び 0.1% アジ化ナトリウムを含有する $\text{pH}7.5$ の溶液に導入した。次いで、ポリスチレンマイクロ粒子を、rpCMV-27、rpCMV-28及びrpCMV-29と呼ぶ3つの別々の瓶に分配した。 50mM Tris ($\text{pH}8.5$) 中の組換え体rpCMV-27を最終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を与えるようにrpCMV-27を収容している瓶に添加した。 50mM Tris ($\text{pH}8.5$) 中の組換え体rpCMV-28を最終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を与えるようにrpCMV-28を収容している瓶に添加した。 50mM Tris ($\text{pH}8.5$) 中の組換え体rpCMV-29を最終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を与えるようにrpCMV-29を収容している瓶に添加した。各瓶中のポリスチレンマイクロ粒子の最終濃度は $1\sim3\%$ 固体であった。瓶を室温 ($19\sim22^\circ\text{C}$) で2時間回転させた ($30\sim50\text{rpm}$) 後、室温で $10,000\sim15,000\times g$ で10分間遠心した。次いで、ペレット形態のマイクロ粒子を、最終濃度 $0.1\sim0.25\%$ 固体を与えるように 90mM Tris、 135mM 塩化ナトリウム、 100mM EDTA二ナトリウム、 6% スクロース、 0.18% TWEEN-20、 50% ウシ胎仔血清 (CMV抗体なし)、 $35\text{mg}/\text{ml}$ CKSタンパク質を含有する混合物 ($\text{pH}7.5$) に再懸濁させた。次いで、マイクロ粒子をプラスチック製瓶に充填した。

【0129】

rpCMV-27、rpCMV-28及びrpCMV-29をコートしたポリスチレンマイクロ粒子を、ABBOTT "IMx" 計器 (イリノイ州アボットパークに所在のAbbott Laboratories) を用いて実施される自動化イムノアッセイにおいて抗体捕捉フォーマットで使用した。前記したコートマイクロ粒子は、ABBOTT "AxSYM" 計器 (イリノイ州アボットパークに所在のAbbott Laboratories) を用いて実施される自動化イムノアッセイにおいて抗体捕捉フォーマットで使用する

【0130】

前記システムは、血清サンプル及び試薬を自動的に分配するピペッティングデバイスを使用する。前記計器は、サンプルマトリックスからの 448nm における蛍光発光反射率を測定することができる光学リーダーを使用する。逐次操作モードでは、血清サンプルを3種のコートマイクロ粒子の各々と別々にインキュベートする。複合操作モードでは、3種のコートマイクロ粒子の各々を等容量ずつ混合した後、血清サンプルとインキュベートする。いずれのモードでも、適当なストックマイクロ粒子をプラスチック製瓶に分配し、計器にかける。

【0131】

好ましいコンジュゲートは、ヤギ抗ヒト IgM アルカリホスファターゼコンジュゲートである。前記コンジュゲートを 0.2～1.5 μg/ml の作業濃度を測定するために滴定する。コンジュゲート希釈剤は、90mM Tris、135mM 塩化ナトリウム、5% ウシ胎仔血清、0.1% アジ化ナトリウム (pH 7.4) を含む。コンジュゲートを滅菌濾過し、プラスチック製瓶に入れ、計器にかける。コンジュゲートに対する好ましい基質は 4-メチルウンベリフェリルホスフェートである。

【0132】

抗 HCMV 陽性インデックス校正物質を、HCMV に対する抗体が陽性の血漿単位から作成する。プールした単位を再び石灰化し、等分にし、-20℃または 2～8℃で保存する。陽性インデックス校正物質の各ロットについて、ストック溶液を、保存料として 0.1% アジ化ナトリウムを含有する陰性コントロールで希釈する。最終材料を滅菌濾過し、プラスチック製瓶に充填する。

10

【0133】

抗 HCMV 陰性コントロールを HCMV に対する抗体が陰性の再石灰化ヒト血漿から作成する。前記血漿はヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する抗体についても B 型肝炎表面抗原 (HBsAg) についても陰性である。単位をプールし、保存料として 0.1% アジ化ナトリウムを添加する。最終材料を滅菌濾過し、プラスチック製瓶に充填する。

【0134】

試験すべき血清サンプルを計器の反応容器に分配する。自動化 CMV IgM イムノアッセイを実施するための適当なコードを付した後、アッセイを始める。計器により、血清サンプルは直線希釈剤 (0.1M リン酸ナトリウム、0.1% アジ化ナトリウム (pH 7.5) または 0.3M 塩化ナトリウム、0.1M Tris、0.1% アジ化ナトリウム (pH 7.5)) 中に希釈され、次いで希釈した血清サンプルにマイクロ粒子が添加される。5～10 分間インキュベート後、混合物を反応容器マトリックスに移す。前記マトリックスを直線希釈剤で洗浄し、その後反応容器マトリックスにコンジュゲートを添加する。8～10 分間インキュベート後、マトリックスを直線希釈剤で洗浄し、その後前記コンジュゲートに対する基質を添加する。サンプルマトリックスからの 448nm における蛍光発光反射率を直ちに読み、計器により各サンプルのレートカウント値及びインデックス値を記録する。インデックス値は、サンプルのレートカウント値を陽性インデックス校正物質のレートカウント値で割った値である。許容され得るアッセイ特異性を維持するためには、アッセイのカットオフ値は、陰性サンプルのインデックス値の平均より少なくとも 3～4 標準偏差高くなければならない。自動化 HCMV IgM イムノアッセイのカットオフ値を 0.6 のインデックス値で設定した。0.6 以上のインデックス値を有するサンプルは HCMV IgM 抗体について陽性で見做した。0.500～0.599 のインデックス値を有するサンプルは HCMV IgM 抗体について疑わしいと見做し、0.500 未満のインデックス値を有するサンプルは HCMV IgM 抗体について陰性で見做した。本アッセイで使用した融合タンパク質の特徴を表 3 に記載する。

20

30

【0135】

以下の実施例では、HCMV IgM 抗体アッセイのいずれの成分が HCMV 感染の測定において偽陽性結果を与える原因成分であるか、また擬陽性結果の割合をどのように減らすことができるかを示す。

40

【0136】

実施例 1

本発明のイムノアッセイを構築するために、米国特許出願第 08/765,856 号の AxSYM HCMV IgM イムノアッセイのいずれの成分が診断アッセイ特異性の欠乏をもたらすかをまず調べる必要があった。無作為血液ドナー (低リスク集団の 308 人のドナー) からの血清試料を 3 種の市販されている HCMV IgM イムノアッセイ (共通アッセイ) 及び米国特許出願第 08/765,856 号の AxSYM HCMV IgM イムノアッセイを用いて試験して、擬陽性結果を与えた因子を取り出した。共通アッセイで陽性 (3 試料)、疑わしい (2 試料) 及び陰性 (4 試料) と判定された血清試料を以下

50

の研究のために選択した。

【0137】

次いで、3種のコートマイクロ粒子を、以下の組換えHCMV抗原の各種組合せを用いて製造した。

【0138】

H10/A1C2/F3

CKS (1-171aa) - A1C2/F3 - H10 - CKS (171-260aa) ;
A1C2 (595-614aa)、F3 (1006-1048aa) (UL32)、H10 (202-434aa) (UL44)

【0139】

H10

CKS (1-171aa) - H10 - CKS (171-260aa) ;
H10 (202-434aa) (UL44)

【0140】

pp65

CKS (1-171aa) - pp65 - CKS (171-260aa) ;
pp65 (297-510aa) (UL83)

【0141】

pp38

CKS (1-171aa) - pp38 - CKS (171-260aa) ;
pp38 (117-373aa) (UL80a)

【0142】

マイクロ粒子に対して以下のコーティングを製造した。

【0143】

コーティング番号1 (AHのみ)

H10/A1C2/F3抗原のみをコートしたマイクロ粒子。

【0144】

コーティング番号2 (Hのみ)

H10抗原のみをコートしたマイクロ粒子。

【0145】

コーティング番号3 (完全)

H10/A1C2/F3抗原、pp65抗原及びpp38抗原 (rpCMV27、rpCMV28、rpCMV29) をコートしたマイクロ粒子。

【0146】

3つの別々の実験で、表1の試料を自動化“AxSYM”計器にて上記した3種のマイクロ粒子を含む試薬パックを用いて同じアッセイプロトコルに従って試験した。3種のコートマイクロ粒子を用いて試料から得たレートカウントを表1に示す。これらの実験におけるアッセイのカットオフ値は約250レートカウントであった。

【0147】

試料132及び221 (共通アッセイによるとHCMV IgM抗体について陰性、“AxSYM”計器によるとHCMV IgM抗体について陽性) 及び試料177及び215 (共通アッセイによるとHCMV IgM抗体について疑わしい、“AxSYM”機器によるとHCMV IgM抗体について陽性) から分かるように、“AxSYM”計器で生じた陽性信号はH10/A1C2/F3抗原コートマイクロ粒子からのみ誘導された (コーティング番号1 (AHマイクロ粒子) から与えられる信号とコーティング番号3 (完全マイクロ粒子) から与えられる信号を比較されたい)。これら4つの試料のそれぞれにおいて、AHマイクロ粒子は完全マイクロ粒子とほぼ同量の信号を与え、よってH10/A1C2/F3抗原をコートしたマイクロ粒子に対する分析は狭くなった。診断アッセイ特異性を欠如させる成分を更に、A1C2/F3抗原として同定した。なぜならば、上記4つの試料においてH10抗原だけでは陽性信号を与えなかったからである (コーティング番号1 (AH

10

20

30

40

50

マイクロ粒子)で生ずる信号をコーティング番号2(Hマイクロ粒子)で信号を比較されたい)。

【0148】

【表1】

表1
主にA1C2F3に対する血清IgM抗体から与えられる
無作為血液ドナーに対する陽性信号

試料	共通 ¹	AH マイクロ粒子 (コーティングNo1)	H マイクロ粒子 (コーティングNo2)	AH, 65, 38 マイクロ粒子 (コーティングNo3)
846	陽性	1853	1904	1526
UT 32544	陽性	877	731	586
127	陰性	11	76	238
132	陰性	1639	55	1342
155	陽性	953	71	1011
177	疑わしい	596	18	519
215	疑わしい	839	61	1035
220	陰性	84	66	373
221	陰性	585	56	434

(注1)

共通アッセイは、3つの市販IgMイムノアッセイに基づいた。3つのアッセイの内2つのアッセイが一定の結果を示したなら、それらの結果は正しいと推定された。

表1のデータは、過剰量の偽陽性結果は融合タンパク質H10/A1C2/F3のA1C2F3部分に起因したことを示す。

【0149】

実施例2

融合タンパク質のA1C2F3を低いアッセイ特異性の原因として同定した後、米国特許出願第08/765,856号明細書に記載されている“AxSYM”HCMV IgMアッセイにおけるH10/A1C2F3コートマイクロ粒子の量を約2/1～1/3に低減させた。

【0150】

次いで、完全抗原カクテルを含有する2つの試薬パックを作成した。これらの試薬パックは、H10/A1C2/F3抗原をコートしたマイクロ粒子の濃度の点でのみ異なっていた。“AxSYMノーマル”とのラベルを付した試薬パックにはコートマイクロ粒子を通常濃度で含有させ、“AxSYM低減AH”とのラベルを付した試薬パックにはpp65及びpp38をコートしたマイクロ粒子を通常濃度で、H10/A1C2F3抗原をコートしたマイクロ粒子を低濃度(2/1～1/3)で含有させた。

【0151】

次いで、無作為血液ドナー(低リスク集団の308人のドナー)からの血清試料を自動化“AxSYM”計器にて両試薬パックを用いて同一アッセイプロトコルに従って別々の実験で試験した。両試薬パックと同一のアッセイカットオフ値(0.6)及びインデックス校正物質を用いると、“AxSYMノーマル”試薬パックを用いるアッセイでは試料の9.7%がHCMV IgM抗体について陽性であったと判定され、“AxSYM低減RH”試薬パックを用いるアッセイでは試料の2.3%がHCMV IgM抗体について陽性であったと判定された。実施例1に記載の共通アッセイでは、試料の1.6%がHCMV

I g M抗体について陽性であったと判定された。従って、“A x S Y M” H C M V I g MアッセイにおいてH 1 0 / A 1 C 2 / F 3 抗原をコートしたマイクロ粒子の濃度を低下させると、アッセイ特異性が大きく改善され、共通アッセイと良く一致した。

【0152】

次段階では、H 1 0 / A 1 C 2 / F 3 をコートしたマイクロ粒子を低レベル用いる“A x S Y M” H C M V I g Mアッセイの感度が抗原を低減させることにより影響されるかを、共通アッセイで測定して異なる量のH C M V 特異的 I g M抗体を用いて患者試料を試験することにより調べた（感度パネル）。その後、感度パネルからの血清試料を自動化“A x S Y M”計器にて両試薬パック（“A x S Y Mノーマル”及び“A x S Y M低減A H”）を用いて同一のアッセイプロトコルに従って別々の実験で試験した。両試薬パックと同一

10

【0153】

【表2】

表2

感度パネル

試料	共通	“A x S Y M ノーマル”	“A x S Y M 低減A H”
5 1	陽性	1. 1 8 7	0. 3 8 0
8 4	陽性	3. 8 4 2	1. 0 2 4
8 5	陽性	2. 0 7 1	0. 3 5 8
1 1 3	陽性	1. 6 7 9	0. 3 0 3
1 4 9	陽性	1. 2 2 9	0. 0 5 2
1 8 4	陽性	0. 6 2 6	0. 1 5 6
2 0 2	陽性	0. 6 5 1	0. 2 2 9
9 3	疑わしい	0. 8 3 2	0. 2 7 0
1 8 8	疑わしい	0. 2 9 9	0. 2 0 6
6 3	陰性	0. 3 1 5	0. 1 0 8

20

30

共通アッセイでH C M V I g M抗体について陽性と判定された7つの試料を“A x S Y Mノーマル”試薬パックを用いるプロトコルに従って測定したところ、7つの試料すべてがH C M V I g M抗体について陽性であったと判定され、“A x S Y M低減A H”試薬パックによると7つの試料のうち1つのみがH C M V I g M抗体について陽性であったと判定された。従って、H 1 0 / A 1 C 2 / F 3 抗原を低減させると、アッセイ特異性は改善されるが、アッセイ感度は低下する。

【0154】

40

実施例3

実施例2の結果は、H 1 0 / A 1 C 2 / F 3 コートマイクロ粒子の量を低減するとアッセイ感度を犠牲にしてアッセイ特異性が改善されたことを明確に示している。米国特許出願第08/765, 856号明細書に記載されている“A x S Y M” H C M V I g Mアッセイの特異性を改善するために、本アッセイにおいてマイクロ粒子希釈剤に限定量のA 1 C 2 及びF 3 合成ペプチドを添加するときの影響を試験して、急性または最近のH C M V感染を示さない患者試料中に存在する低レベルのI g Mが前記ペプチドの存在により選択的且つ競合的に抑制され得るかを調べた。

【0155】

合成ペプチドA 1 C 2 (20mer) 及びF 3 (43mer) を、0、0. 1、1. 0、

50

10及び25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度で等量のマイクロ粒子希釈剤に添加した。最近のHCMV感染の被検者（Posパネル番号1～14）及び無作為に選択した血液ドナー（RBDパネル番号1～4）から得たコントロールの陽性パネル血清試料を、ペプチドが無作為血液ドナー試料（低リスク集団）に対する信号を選択的に低下させるかを調べるために試験した。マイクロ粒子希釈剤中のペプチドレベルを変化させた試料から得たレートカウントを表3に示す。これらの実験におけるアッセイのカットオフは約250レートカットオフである。

【0156】

【表3】

表3

異なる濃度のA1C2及びF3で得られたレートカウント

試料	0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
PosパネルNo.1	652	657	662	735	782
PosパネルNo.2	729	699	728	780	836
PosパネルNo.3	1696	1601	1616	1853	1994
PosパネルNo.4	1184	1203	1131	1277	1302
RBDパネルNo.1	360	294	256	170	179
RBDパネルNo.2	406	246	212	147	106
RBDパネルNo.3	257	161	139	79	61
RBDパネルNo.4	231	194	194	199	182

陽性パネル試料（Posパネル番号1～4）からの信号は、マイクロ粒子希釈剤中のA1C2及びF3ペプチドの存在により影響されなかった。最高濃度のペプチドでは、数個の陽性パネル試料では信号が適度に増加する。反対に、無作為血液ドナー試料からの信号は、マイクロ粒子希釈剤中に最高10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度までA1C2及びF3ペプチドが存在すると減少する。3つの試料（RBDパネル番号1、2及び3）の場合、これらのペプチドをマイクロ粒子希釈剤に添加するとHCMV IgM抗体について陰性であると判定された。上記パネルメンバー等を用いて更なる実験を実施して、急性または最近のHCMV感染の被検者から得た陽性試料からの信号に対する負の影響を最小限とし、急性または最近のHCMV感染を有さない被検者から得た無作為血液ドナー試料からの信号に対する負の影響を最大限とするマイクロ粒子希釈剤中の各ペプチドの最適量を決定した。各ペプチドについて使用した濃度範囲は1～12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。各ペプチドの最適量は、HCMV組換え抗原コートマイクロ粒子（コーティング番号1、実施例1）を0.2%固体濃度で含有するマイクロ粒子希釈剤において6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であると決定された。

【0157】

マイクロ粒子希釈剤中のペプチド濃度を最適化した後、本発明の改善“AxSYM”HCMV IgMアッセイを上で試験したと同じ無作為血液ドナー試料に対して更に試験し、その性能を、マイクロ粒子希釈剤中にペプチドA1C2及びF3を含有しない米国特許出願第08/765,856号明細書に記載の“AxSYM”HCMV IgMアッセイの性能と比較した。改善“AxSYM”HCMV IgMアッセイでは試料の3.3%がHCMV IgM抗体について陽性であると判定され、米国特許出願第08/765,856号明細書に記載の“AxSYM”HCMV IgMアッセイでは試料の9.7%がHCMV IgM抗体について陽性であると判定された。ペプチドの添加により、HCMV IgM抗体について陽性であると判定された陽性試料の数が3/1に減った。これは、1.6%という共通アッセイの数に非常に近い。本発明の“AxSYM”HCMV IgMアッ

10

20

30

40

50

セイは、米国特許出願第08/765,856号明細書に記載の従来のアッセイに比して有意に改善された診断アッセイ特異性を有する。

【0158】

本発明の“A x S Y M”H C M V I g Mアッセイを、実施例2、表2に記載されている同じ感度パネルメンバーを用いても試験し、その性能を米国特許出願第08/765,856号明細書に記載の“A x S Y M”H C M V I g Mアッセイの性能と比較した。結果を表4に示す。

【0159】

【表4】

表4

試料	予想される結果	“A x S Y M”	本発明の “A x S Y M”
51	陽性	1. 187	1. 102
84	陽性	3. 842	3. 295
85	陽性	2. 071	1. 275
113	陽性	1. 679	1. 408
149	陽性	1. 229	0. 819
184	陽性	0. 626	0. 500
202	陽性	0. 651	0. 517
93	疑わしい	0. 832	0. 536
188	疑わしい	0. 299	0. 232
63	陰性	0. 315	0. 177

共通アッセイ及び米国特許出願第08/765,856号明細書に記載の“A x S Y M”H C M V I g MアッセイでH C M V I g M抗体について陽性である7つの試料のうち、本発明の“A x S Y M”H C M V I g Mアッセイによると5試料がH C M V I g M抗体について陽性であり、2試料がH C M V I g M抗体について疑わしい。これは、7つの陽性試料のうちの1つのみがH C M V I g M抗体について陽性であると判定された低減A H抗原アッセイ（実施例2、表2参照）と対比される。結局、本発明の“A x S Y M”H C M V I g Mアッセイは、米国特許出願第08/765,856号明細書に記載の従来の“A x S Y M”H C M V I g Mアッセイと比較して著しく改善された診断アッセイ特異性及び匹敵する診断アッセイ感度を有する。

【0160】

本発明の範囲及び趣旨を逸脱しない本発明の各種変更及び改変は当業者には自明であり、本発明が本明細書に記載の例示の実施態様に不適當に限定されないことを理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ウイルス菌株A D 1 6 9のE c o R I－Y断片中に含まれる遺伝子U L 3 2における、米国特許出願第08/765,856号の発明の融合タンパク質の1つを特徴付ける2つの部分をコードするD N A断片の位置を概略的に示す。

【図2】 米国特許出願第08/765,856号で使用されているプラスミドの作成方法を概略的に示す。

【図3】 プラスミドp M B 2 8 : l a c Z－A 1 C 2の構築の概略図である。

【図4】 プラスミドp M B 3 4 : l a c Z－A 1 C 2 F 3の構築の概略図である。

【図5】 米国特許出願第08/765,856号で使用されているプラスミドの作成方法を概略的に示す。

【図6】 全ウイルスまたは米国特許出願第08/765,856号の発明の第1態様の組換え融合タンパク質を含めた各種組換え融合タンパク質を用いるELISAアッセイによるHCMV感染被検者からのIgGの検出に関する実験データを比較する表である。

【図7】 米国特許出願第08/765,856号明細書の発明の第1態様の融合タンパク質を含めた全ウイルスまたは各種組換え融合タンパク質を用いるELISAアッセイによるHCMV感染被検者からのIgMの検出に関する実験データを比較する表である。

【図8】 プラスミドpJO210及びpJO215の構築の概略図である。

【図9】 プラスミドpMC200の構築の概略図である。

【図10】 プラスミドpJO200の構築の概略図である。

【図11】 プラスミドpMB38:lacZpp38(106-377aa)の構築の概略図である。 10

【図12】 プラスミドpCMV-1A:CKS-A1C2F3-CKSの構築の概略図である。

【図13A】 A1C2F3及びH10 DNA配列を含むPCR断片の作成を示す。

【図13B】 pp65(297-510aa)及びpp38(117-373aa) DNA配列を含むPCR断片の作成を示す。

【図13C】 プラスミドpCMV-3B:CKS-H10、プラスミドpCMV-4:CKS-A1C2F3-H10、プラスミドpCMV-9:CKS-pp65(297-510aa)及びプラスミドpCMV-26:CKS-pp38(117-373aa)の構築の概略図である。 20

【図14A】 プラスミドpJO200ΔMluIの構築の概略図である。

【図14B】 プラスミド残基151-180(5'→3')での意図する修飾を含むプラスミドpJO200のヌクレオチド配列を示す。

【図14C】 プラスミドpJO200/MluI/CIAPIに連結させるために合成した突然変異原性オリゴヌクレオチド5'CGCGACGT3'の二本鎖構造を示す。

【図14D】 修飾残基151-180(5'→3')を含めたプラスミドpJO200ΔMluIのヌクレオチド配列を示す。

【図15】 プラスミドpEE1の構築の概略図である。

【図16A】 A1C2F3-H10、pp65(297-510aa)及びpp38(117-373aa) DNA配列を含むPCR断片の作成を示す。 30

【図16B】 プラスミドpCMV-27:CKS-A1C2F3-H10-CKS、プラスミドpCMV-28:CKS-pp65(297-510aa)-CKS及びプラスミドpCMV-29:CKS-pp38(117-373aa)-CKSの構築の概略図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION

(i) APPLICANT: Maine, Gregory T.

(ii) TITLE OF THE INVENTION: USE OF PEPTIDES TO IMPROVE
SPECIFICITY OF AN IMMUNOASSAY FOR
THE DETECTION OF HERPESVIRUS SPECIFIC IGM ANTIBODY

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 7

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Abbott Laboratories

(B) STREET: 100 Abbott Park Road

(C) CITY: Abbott Park

(D) STATE: IL

(E) COUNTRY: USA

(F) ZIP: 60064

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Diskette

(B) COMPUTER: IBM Compatible

(C) OPERATING SYSTEM: DOS

(D) SOFTWARE: FastSEQ Version 2.0

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:

(B) FILING DATE:

(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:

(B) FILING DATE:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Weinstein, David L

(B) REGISTRATION NUMBER: 28,128

(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER:

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 847-937-6182

(B) TELEFAX: 847-938-2623

(C) TELEX:

35 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 908 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
5 (iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: HUMAN CYTOMEGALOVIRUS (HCMV)
(vii) IMMEDIATE SOURCE:
(B) CLONE: pROS
10 (ix) FEATURE: 10
(A) NAME/KEY: CDS
(B) LOCATION: 1..900
(x) PUBLICATION INFORMATION:
(A) AUTHORS: RIPALTI, Alessandro
15 ET AL.,
(B) TITLE: CONSTRUCTION OF A POLYPEPTIDE FUSION ANTIGEN
OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS ppUL32; REACTIVITY WITH
HUMAN ANTIBODIES
(C) JOURNAL: J. Clin. Microbiol.
20 (D) VOLUME: 32 20
(F) PAGES: 358-363
(G) DATE: 1994
(K) RELEVANT RESIDUES IN SEQ ID NO: 1: FROM 233 TO 900
(x) PUBLICATION INFORMATION:
25 (A) AUTHORS: RIPALTI, Alessandro
ET AL.,
(B) TITLE: Prokaryotic expression of a large fragment of
the most antigenic cytomegalovirus DNA-binding
protein (ppUL44) and its reactivity with human
30 antibodies. 30
(C) JOURNAL: J. Virol. Methods
(D) VOLUME: 46
(F) PAGES: 39-50
(G) DATE: 1994
35 (K) RELEVANT RESIDUES IN SEQ ID NO: 1: FROM 1 TO 232
(x) PUBLICATION INFORMATION:
(H) DOCUMENT NUMBER: EP 0262531 B1
(I) FILING DATE: 05-JUN-1987

(J) PUBLICATION DATE: 02-DEC-1992

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC CAC GGC GTA AAA AAC ATG
48

5 Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe His Gly Val Lys Asn Met
1 5 10 15

CGT ATC AAC GTG CAG CTG AAG AAC TTC TAC CAG ACG CTG CTC AAT TGC
96

Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr Gln Thr Leu Leu Asn Cys
10 20 25 30 10

GCC GTC ACC AAA CTA CCG TGC ACG CTG CGT ATA GTT ACG GAG CAC GAC
144

Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg Ile Val Thr Glu His Asp
35 40 45

15 ACG CTG TTG TAC GTG GCC AGC CGC AAC GGT CTG TTC GCC GTG GAG AAC
192

Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu Asn
50 55 60

TTT CTC ACC GAG GAA CCT TTC CAG CGT GGC GAT CCC TTC GAC AAA AAT
20 240 20

Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn
65 70 75 80

TAC GTC GGG AAC AGC GGC AAG TCG CGT GGC GGC GGC GGT GGT GGC GGC
288

25 Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

AGC CTC TCT TCG CTG GCC AAT GCC GGC GGT CTG CAC GAC GAC GGC CCG
336

Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly Leu His Asp Asp Gly Pro
30 100 105 110 30

GGT CTG GAT AAC GAT CTC ATG AAC GAG CCC ATG GGT CTC GGC GGT CTG
384

Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro Met Gly Leu Gly Gly Leu
115 120 125

35 GGA GGA GGT GGC GGC GGT GGC GGC AAG AAG CAC GAC CGC GGT GGC GGC
432

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys His Asp Arg Gly Gly Gly
130 135 140

GGT GGT TCC GGT ACG CGG AAA ATG AGC AGC GGT GGC GGC GGC GGT GAT
 480
 Gly Gly Ser Gly Thr Arg Lys Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asp
 145 150 155 160
 5 CAC GAT CAC GGT CTT TCC TCC AAG GAA AAA TAC GAG CAG CAC AAG ATC
 528
 His Asp His Gly Leu Ser Ser Lys Glu Lys Tyr Glu Gln His Lys Ile
 165 170 175
 ACC AGT TAC CTG ACG TCC AAA GGT GGA TCG GGC GGC GGC GGA GGA GGA
 10 576 10
 Thr Ser Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 180 185 190
 GGA GGC GGC GGT TTG GAT CGC AAC TCC GGC AAT TAC TTC AAC GAC GCG
 624
 15 Gly Gly Gly Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Phe Asn Asp Ala
 195 200 205
 AAA GAG GAG AGC GAC AGC GAG GAT TCT GTA ACG TTC GAG TTC GTC CCT
 672
 Lys Glu Glu Ser Asp Ser Glu Asp Ser Val Thr Phe Glu Phe Val Pro
 20 210 215 220 20
 AAC ACC AAG AAG CAA AAG TGC GGC ACG CCG ACG CCT GTC AAT CCT TCC
 720
 Asn Thr Lys Lys Gln Lys Cys Gly Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser
 225 230 235 240
 25 ACG GCC CCC GCT CCG GCC CCG ACA CCT ACC TTC GCG AAG CTT CAG GAA
 768
 Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Lys Leu Gln Glu
 245 250 255
 TTC GGA TCG TCG CCC CAG AAG AGC GGT ACG GGG CCG CAA CCG GGT TCT
 30 816 30
 Phe Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser
 260 265 270
 GCC GGC ATG GGG GGC GCC AAA ACG CCG TCG GAC GCC GTG CAG AAC ATC
 864
 35 Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile
 275 280 285
 CTC CAA AAG ATC GAG AAG ATT AAG AAC ACG GAG GAA TAGAATTC
 908

Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu

290 295 300

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 300 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

10 Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe His Gly Val Lys Asn Met 10
1 5 10 15
Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr Gln Thr Leu Leu Asn Cys
20 25 30
Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg Ile Val Thr Glu His Asp
15 35 40 45
Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu Asn
50 55 60
Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn
65 70 75 80
20 Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly 20
85 90 95
Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly Leu His Asp Asp Gly Pro
100 105 110
Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro Met Gly Leu Gly Gly Leu
25 115 120 125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys His Asp Arg Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Thr Arg Lys Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asp
145 150 155 160
30 His Asp His Gly Leu Ser Ser Lys Glu Lys Tyr Glu Gln His Lys Ile 30
165 170 175
Thr Ser Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
180 185 190
Gly Gly Gly Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Phe Asn Asp Ala
35 195 200 205
Lys Glu Glu Ser Asp Ser Glu Asp Ser Val Thr Phe Glu Phe Val Pro
210 215 220
Asn Thr Lys Lys Gln Lys Cys Gly Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser

225 230 235 240
 Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Lys Leu Gln Glu
 245 250 255
 Phe Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser
 5 260 265 270
 Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile
 275 280 285
 Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu
 290 295 300
 10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3: 10
 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 906 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 15 (D) TOPOLOGY: linear
 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
 (iii) HYPOTHETICAL: NO
 (iv) ANTI-SENSE: NO
 (v) FRAGMENT TYPE: internal
 20 (vi) ORIGINAL SOURCE: 20
 (A) ORGANISM: Human Cytomegalovirus (HCMV)
 (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (B) CLONE: pCMV-27
 (ix) FEATURE:
 25 (A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 1..906
 (x) PUBLICATION INFORMATION:
 (H) DOCUMENT NUMBER: EP 0262531 B1
 (I) FILING DATE: 05-JUN-1987
 30 (J) PUBLICATION DATE: 02-DEC-1992 30
 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:
 ACG CCG ACG CCT GTC AAT CCT TCC ACG GCC CCC GCT CCG GCC CCG ACA
 48
 Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr
 35 305 310 315
 CCT ACC TTC GCG AAG CTT CAG GAA TTC GGA TCG TCG CCC CAG AAG AGC
 96
 Pro Thr Phe Ala Lys Leu Gln Glu Phe Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser

320 325 330
 GGT ACG GGG CCG CAA CCG GGT TCT GCC GGC ATG GGG GGC GCC AAA ACG
 144
 Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr
 5 335 340 345
 CCG TCG GAC GCC GTG CAG AAC ATC CTC CAA AAG ATC GAG AAG ATT AAG
 192
 Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys
 350 355 360
 10 AAC ACG GAG GAA CTT CAG GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC 10
 240
 Asn Thr Glu Glu Leu Gln Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe
 365 370 375 380
 CAC GGC GTA AAA AAC ATG CGT ATC AAC GTG CAG CTG AAG AAC TTC TAC
 15 288
 His Gly Val Lys Asn Met Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr
 385 390 395
 CAG ACG CTG CTC AAT TGC GCC GTC ACC AAA CTA CCG TGC ACG CTG CGT
 336
 20 Gln Thr Leu Leu Asn Cys Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg 20
 400 405 410
 ATA GTT ACG GAG CAC GAC ACG CTG TTG TAC GTG GCC AGC CGC AAC GGT
 384
 Ile Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly
 25 415 420 425
 CTG TTC GCC GTG GAG AAC TTT CTC ACC GAG GAA CCT TTC CAG CGT GGC
 432
 Leu Phe Ala Val Glu Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly
 430 435 440
 30 GAT CCC TTC GAC AAA AAT TAC GTC GGG AAC AGC GGC AAG TCG CGT GGC 30
 480
 Asp Pro Phe Asp Lys Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly
 445 450 455 460
 GGC GGC GGT GGT GGC GGC AGC CTC TCT TCG CTG GCC AAT GCC GGC GGT
 35 528
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly
 465 470 475

CTG CAC GAC GAC GGC CCG GGT CTG GAT AAC GAT CTC ATG AAC GAG CCC
 576
 Leu His Asp Asp Gly Pro Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro
 480 485 490
 5 ATG GGT CTC GGC GGT CTG GGA GGA GGT GGC GGC GGT GGC GGC AAG AAG
 624
 Met Gly Leu Gly Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys
 495 500 505
 CAC GAC CGC GGT GGC GGC GGT GGT TCC GGT ACG CGG AAA ATG AGC AGC
 10 672
 His Asp Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Arg Lys Met Ser Ser
 510 515 520
 GGT GGC GGC GGC GGT GAT CAC GAT CAC GGT CTT TCC TCC AAG GAA AAA
 720
 15 Gly Gly Gly Gly Gly Asp His Asp His Gly Leu Ser Ser Lys Glu Lys
 525 530 535 540
 TAC GAG CAG CAC AAG ATC ACC AGT TAC CTG ACG TCC AAA GGT GGA TCG
 768
 Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Gly Ser
 20 545 550 555
 GGC GGC GGC GGA GGA GGA GGA GGC GGC GGT TTG GAT CGC AAC TCC GGC
 816
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly
 560 565 570
 25 AAT TAC TTC AAC GAC GCG AAA GAG GAG AGC GAC AGC GAG GAT TCT GTA
 864
 Asn Tyr Phe Asn Asp Ala Lys Glu Glu Ser Asp Ser Glu Asp Ser Val
 575 580 585
 ACG TTC GAG TTC GTC CCT AAC ACC AAG AAG CAA AAG TGC GGC
 30 906
 Thr Phe Glu Phe Val Pro Asn Thr Lys Lys Gln Lys Cys Gly
 590 595 600

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 35 (A) LENGTH: 302 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear
 (ii) MOLECULE TYPE: protein

10

20

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

Thr	Pro	Thr	Pro	Val	Asn	Pro	Ser	Thr	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr
1				5					10					15	
Pro	Thr	Phe	Ala	Lys	Leu	Gln	Glu	Phe	Gly	Ser	Ser	Pro	Gln	Lys	Ser
5				20					25					30	
Gly	Thr	Gly	Pro	Gln	Pro	Gly	Ser	Ala	Gly	Met	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr
				35					40					45	
Pro	Ser	Asp	Ala	Val	Gln	Asn	Ile	Leu	Gln	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Lys
				50					55					60	
10	Asn	Thr	Glu	Glu	Leu	Gln	Glu	Phe	Thr	Ala	Asn	Asn	Arg	Val	Ser
	65				70						75				80
His	Gly	Val	Lys	Asn	Met	Arg	Ile	Asn	Val	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Tyr
				85						90				95	
Gln	Thr	Leu	Leu	Asn	Cys	Ala	Val	Thr	Lys	Leu	Pro	Cys	Thr	Leu	Arg
15				100					105					110	
Ile	Val	Thr	Glu	His	Asp	Thr	Leu	Leu	Tyr	Val	Ala	Ser	Arg	Asn	Gly
				115					120					125	
Leu	Phe	Ala	Val	Glu	Asn	Phe	Leu	Thr	Glu	Glu	Pro	Phe	Gln	Arg	Gly
				130					135					140	
20	Asp	Pro	Phe	Asp	Lys	Asn	Tyr	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	Lys	Ser	Arg
	145				150						155				160
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Asn	Ala	Gly
				165							170				175
Leu	His	Asp	Asp	Gly	Pro	Gly	Leu	Asp	Asn	Asp	Leu	Met	Asn	Glu	Pro
25				180					185					190	
Met	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Lys
				195					200					205	
His	Asp	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Lys	Met	Ser	Ser
				210					215					220	
30	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Asp	His	Gly	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu
	225				230						235				240
Tyr	Glu	Gln	His	Lys	Ile	Thr	Ser	Tyr	Leu	Thr	Ser	Lys	Gly	Gly	Ser
				245							250				255
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Asp	Arg	Asn	Ser
35				260					265					270	
Asn	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Glu	Asp	Ser	Val
				275					280					285	
Thr	Phe	Glu	Phe	Val	Pro	Asn	Thr	Lys	Lys	Gln	Lys	Cys	Gly		

290 295 300

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15

Pro Thr Phe Ala

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 43 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala

1 5 10 15

Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu

20 25 30

Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu

35 40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 5 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: None

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Lys Leu Gln Glu Phe

1 5

【図 1】

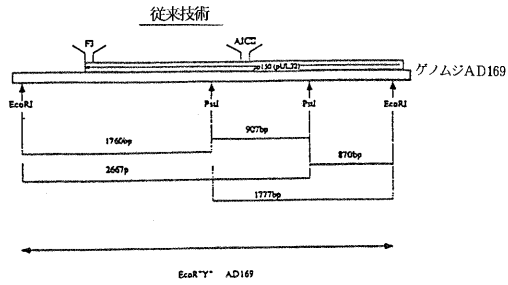


Fig. 1

【図 2】

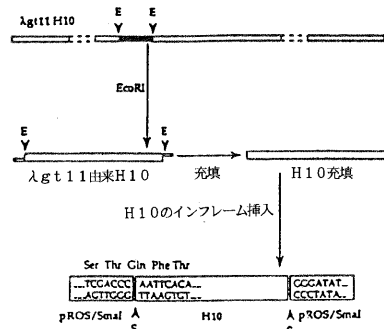


Fig. 2

【図 3】

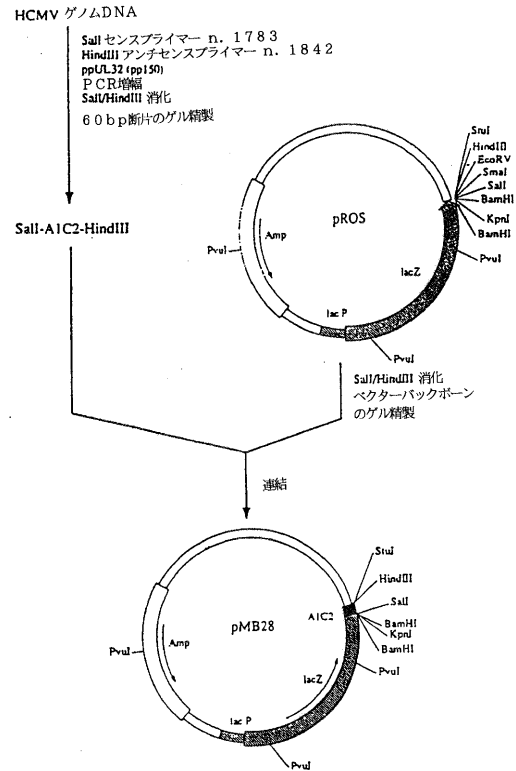


Fig. 3

【図 4】

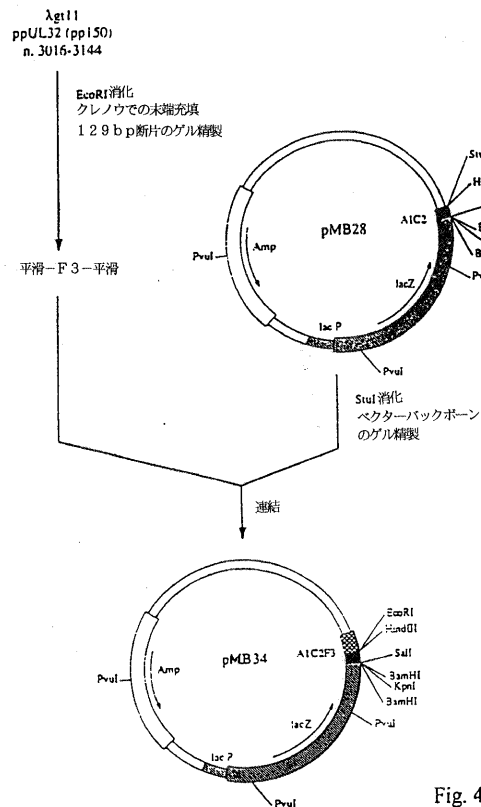


Fig. 4

【図 5】

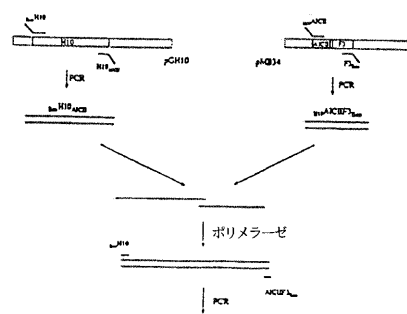


Fig. 5

【図 6】

Fig. 6

表 1

全CMVを用いるELISAによるまたは各融合タンパク質を用いる組換えELISAによるIgG検出の比較

全CMVを用いる ELISA (IgG)		下記融合タンパク質を用いるELISA (IgG)									
数	平均力価 (範囲)	F3		A1C2		A1C2/F3		H10		A1C2/F3/H10	
		陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)
28	291 (243-330)	19	75 (17-180)	10	41 (17-43)	20	172 (40-400)	19	214 (168-501)	27	176 (140-641)
40	576 (434-705)	40	434 (53-2079)	22	110 (12-440)	40	825 (230-2209)	39	611 (206-1038)	40	880 (120-2160)
40	1161 (690-2138)	38	796 (50-2461)	22	114 (25-275)	38	805 (50-2351)	40	758 (300-2120)	40	940 (120-2405)
108	総合	98	54 (90.7%)	54	(50%)	97	(89.8%)	98	(90.7%)	107	(98.1%)
14	0.18 (0.2-5)	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—

【図 7】

Fig. 7

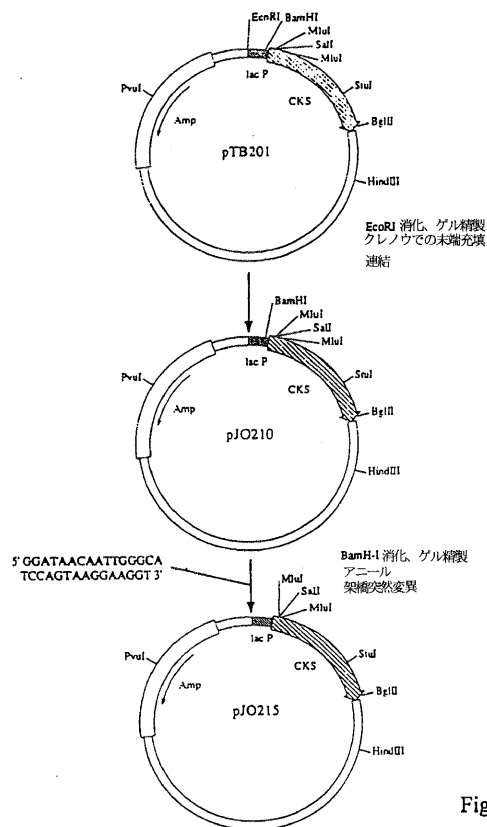
表 2

全CMVを用いるELISAによるまたは各融合タンパク質を用いる組換えELISAによるIgM検出の比較

全CMVを用いる ELISA (IgM)		下記融合タンパク質を用いるELISA (IgM)									
数	平均力価 (範囲)	F3		A1C2		A1C2/F3		H10		A1C2/F3/H10	
		陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)	陽性数	平均力価 (範囲)
20	294 (242-389)	10	521 (232-1171)	10	317 (85-612)	14	797 (210-1417)	19	578 (432-724)	20	517 (386-815)
24	516 (210-2297)	18	1090 (210-2297)	16	467 (143-1141)	22	1278 (370-2561)	23	887 (203-2270)	24	767 (238-1973)
20	1341 (881-2000)	16	1163 (451-2239)	14	1021 (202-2280)	16	1707 (52-2249)	20	1065 (579-2471)	20	1121 (421-2243)
64	総合性	44	(68.75%)	40	(62.5%)	52	(81.25%)	62	(96.87%)	64	(100%)
5	27 (1-56)	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—

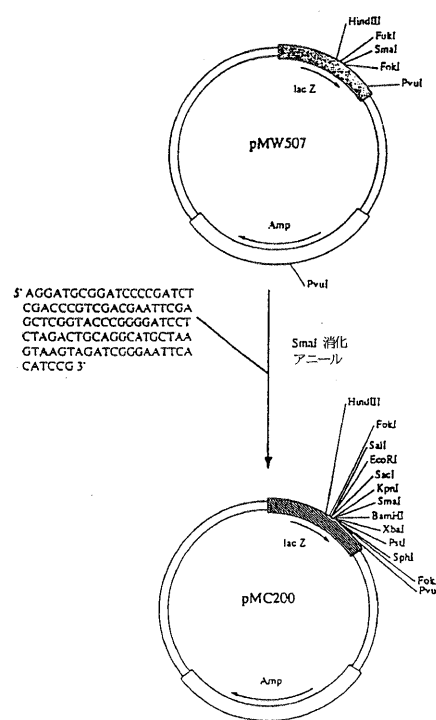
【図 8】

Fig. 8

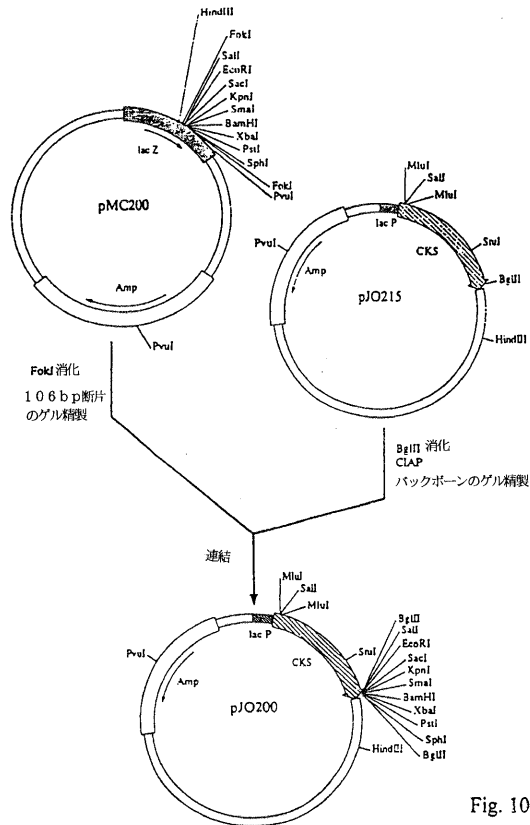


【図 9】

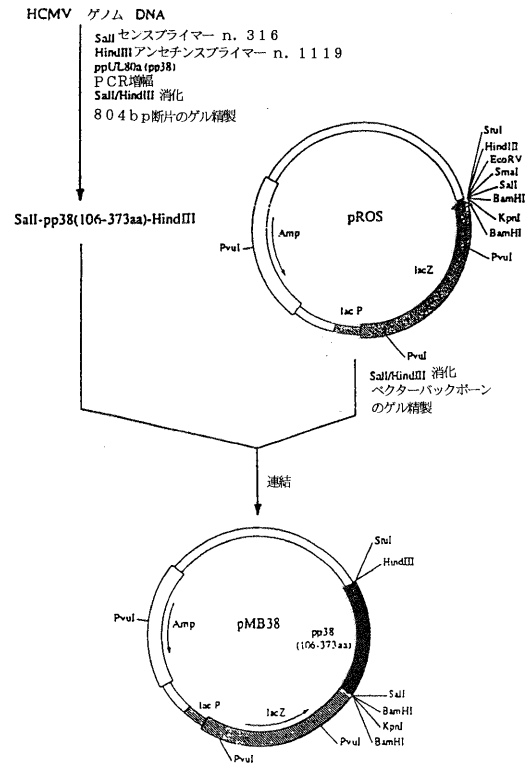
Fig. 9



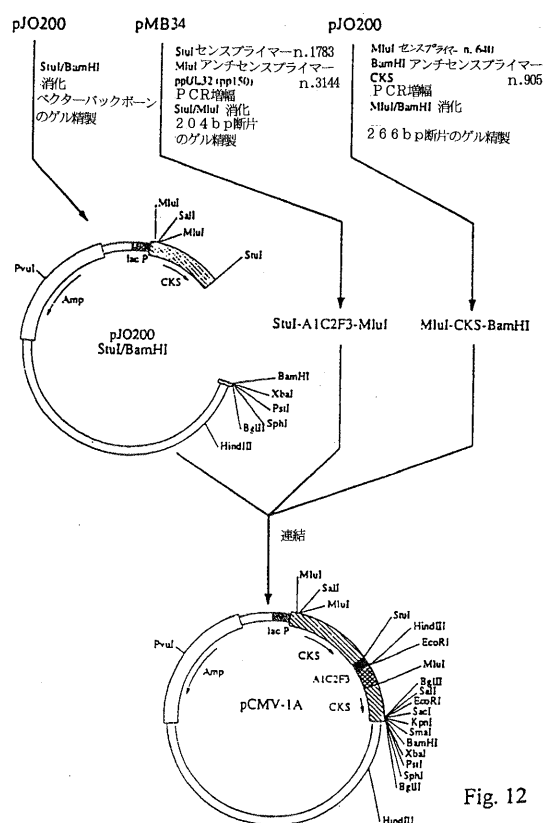
【図 10】



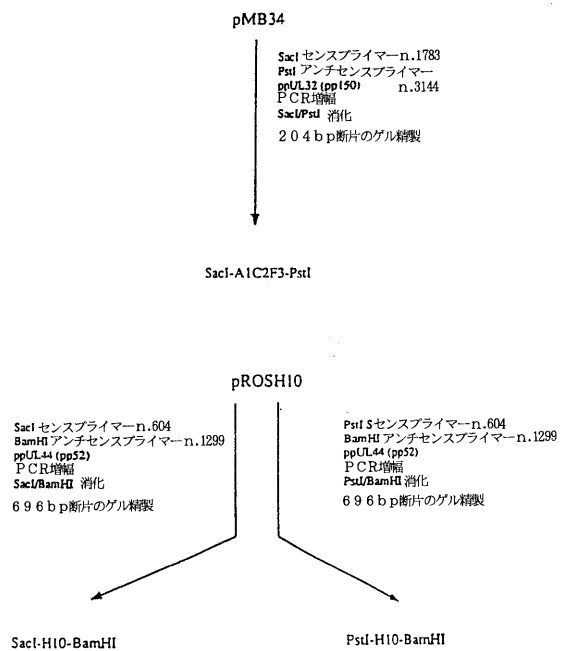
【図 11】



【図 12】



【図 13 A】



【図 13 B】

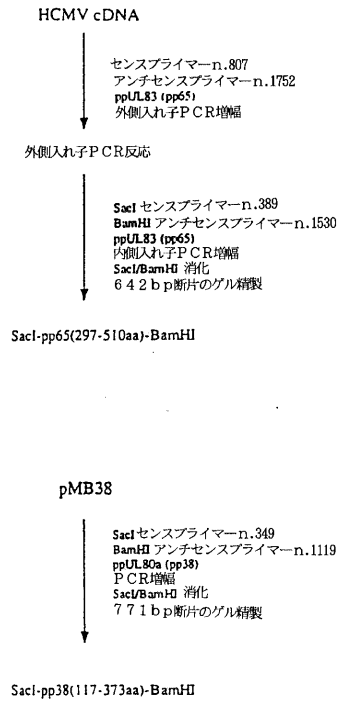


Fig. 13B

【図 13 C】

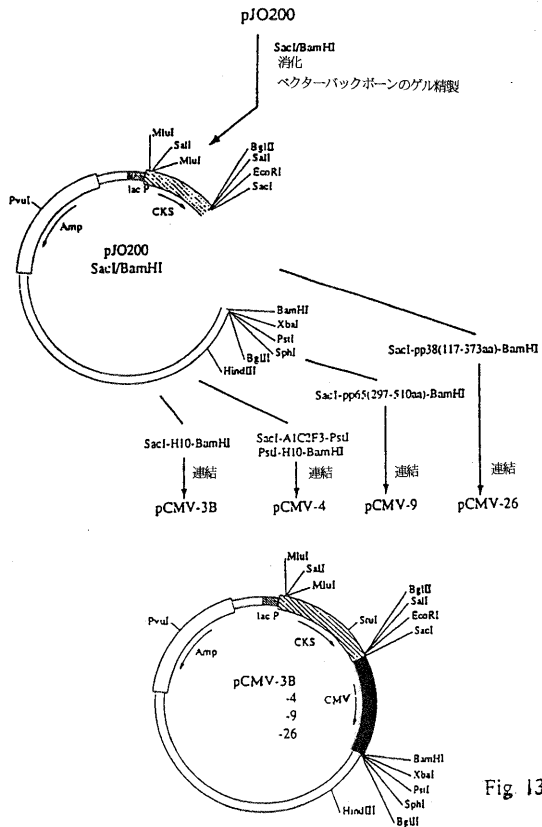


Fig. 13C

【図 14 A】

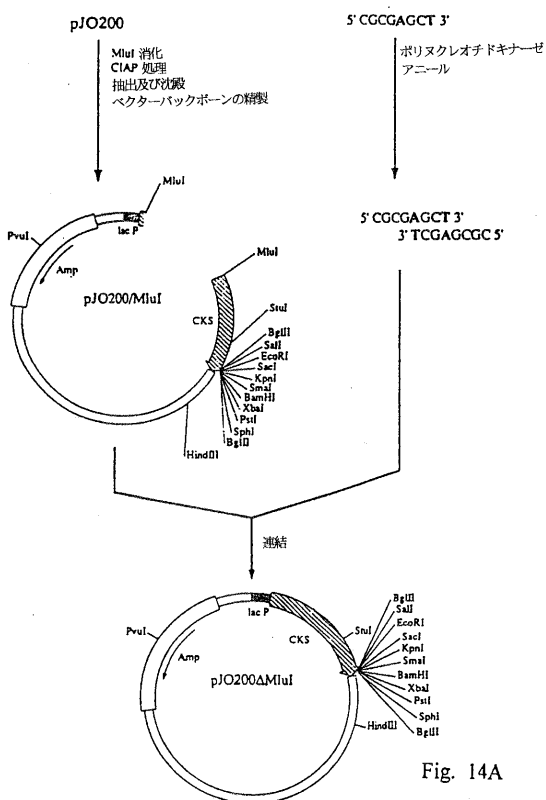


Fig. 14A

【図 14 B】

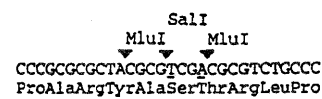


Fig. 14B

【図 14 C】

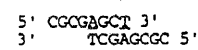


Fig. 14C

【図 14 D】

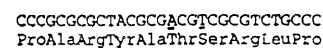
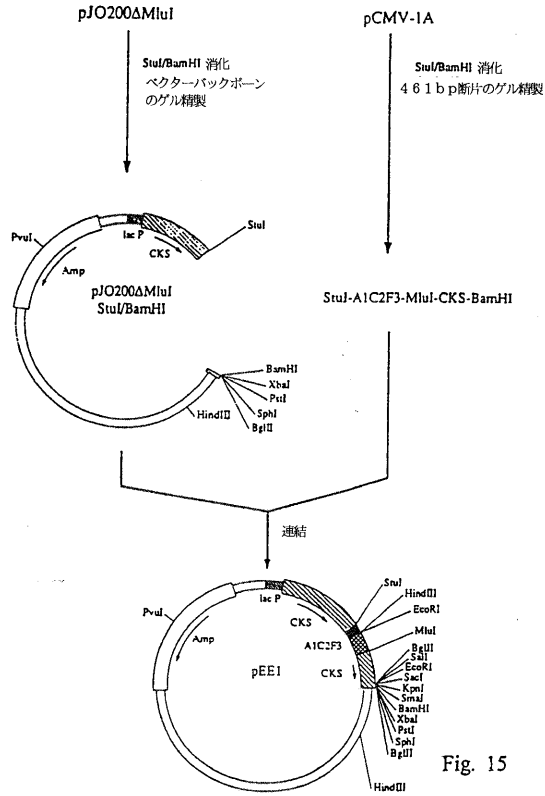


Fig. 14D

【図 15】



【図 16 A】

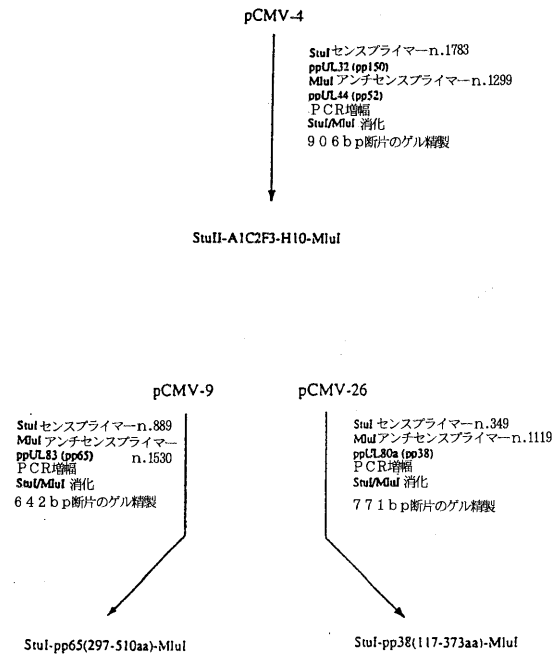
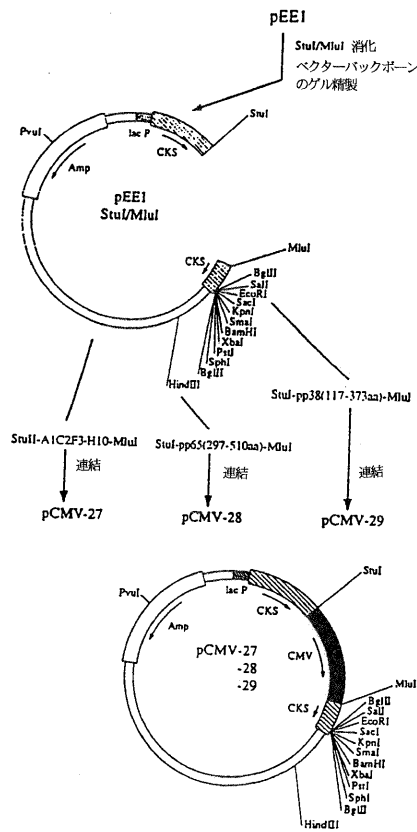


Fig. 16A

【図 16 B】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 14/045
C 1 2 N 15/00 Z N A A

(72)発明者 メイン, グレゴリー・ティー
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 3 1、ガーニー、コンステイテューション・アベニュー・5 7
4 3

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特表平1 0－5 0 2 2 5 3 (J P, A)
特表平0 7－5 0 5 4 7 9 (J P, A)
特開平0 5－0 7 2 2 0 4 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
G 0 1 N 3 3/569
G 0 1 N 3 3/543