

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6491228号
(P6491228)

(45) 発行日 平成31年3月27日 (2019.3.27)

(24) 登録日 平成31年3月8日 (2019.3.8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

G O 1 N 33/569 (2006.01)

G O 1 N 33/569 H

G O 1 N 33/543 (2006.01)

G O 1 N 33/543 5 1 5 Z

C O 7 K 14/15 (2006.01)

C O 7 K 14/15 Z N A

請求項の数 9 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-553811 (P2016-553811)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月26日 (2015.2.26)
 (65) 公表番号 特表2017-512200 (P2017-512200A)
 (43) 公表日 平成29年5月18日 (2017.5.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/053966
 (87) 国際公開番号 W02015/128394
 (87) 国際公開日 平成27年9月3日 (2015.9.3)
 審査請求日 平成29年9月12日 (2017.9.12)
 (31) 優先権主張番号 14157165.3
 (32) 優先日 平成26年2月28日 (2014.2.28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチー４０７０バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ１２４
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HTLVキャプシド抗原 p 2 4 の可溶性かつ免疫反応性バリエーション

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO. 3 または SEQ ID NO. 7 に特定された HTLV p 2 4 の C 末端ドメインを含み、SEQ ID NO. 2 および SEQ ID NO. 6 に特定された N 末端ドメインを欠如した、オリゴマー型シャペロンとの融合タンパク質である前記可溶性 HTLV p 2 4 抗原。

【請求項 2】

前記オリゴマー型シャペロンが S k p および F k p A からなる群から選択されるシャペロンである、請求項 1 に記載の可溶性 HTLV p 2 4 抗原。

【請求項 3】

可溶性かつ免疫反応性の HTLV p 2 4 抗原を製造する方法であって、以下の工程を含む前記方法：

- 請求項 1 または 2 に記載の HTLV p 2 4 抗原をコードする組換え DNA 分子が利用可能な状態で連結したものを含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養すること；

- 前記 HTLV p 2 4 抗原を発現させること；および

- 前記 HTLV p 2 4 抗原を精製すること。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の HTLV p 2 4 抗原および SEQ ID NO. 2 5 によるアミノ酸配列を含む HTLV g p 2 1 抗原を含む HTLV 抗原組成物であって、p 2

4 および g p 2 1 抗原が別個のポリペプチドとして発現された、前記組成物。

【請求項 5】

単離した試料において H T L V に対して特異的な抗体を検出するための方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載の H T L V p 2 4 抗原または請求項 4 に記載の H T L V 抗原組成物を H T L V 抗体の捕捉試薬および / または結合パートナーとして使用する、前記方法。

【請求項 6】

単離した試料において H T L V に対して特異的な抗体を検出するための方法であって、以下を含む前記方法：

a) 体液試料を請求項 1 もしくは 2 に記載の H T L V p 2 4 抗原または請求項 4 に記載の H T L V 抗原組成物と混合することにより免疫反応混合物を調製すること； 10

b) 体液試料中に存在する、前記 H T L V 抗原または H T L V 抗原組成物に対する抗体が、前記 H T L V 抗原または H T L V 抗原組成物と免疫反応して免疫反応生成物を形成するのに十分な期間、前記免疫反応混合物を保持すること；および

c) 前記いずれかの免疫反応生成物の存在および / または濃度を検出すること。

【請求項 7】

単離した試料において H T L V に対して特異的な抗体を検出するための請求項 6 に記載の方法であって、ここで前記免疫反応が下記を含む非対称二重抗原サンドイッチフォーマットで実施される、前記方法：

a) 直接または間接的に固相に結合でき、生体親和性結合対の一部であるエフェクター基を保有する第 1 の H T L V p 2 4 抗原、および検出可能な標識を保有する第 2 の H T L V p 2 4 抗原をその試料に添加すること、ここで前記第 1 および第 2 の H T L V p 2 4 抗原は抗 H T L V 抗体に特異的に結合する； 20

b) 第 1 抗原、試料抗体および第 2 抗原を含む免疫反応混合物を調製すること、ここで免疫反応混合物を調製する前、途中または後に、生体親和性結合対の対応するエフェクター基を保有する固相を添加する；

c) 体液試料において前記 H T L V p 2 4 抗原に対する抗 H T L V 抗体が前記 H T L V p 2 4 抗原と免疫反応して免疫反応生成物を形成するのに十分な期間、前記免疫反応混合物を保持すること；

d) 液相を固相から分離すること； 30

e) 固相もしくは液相または両方における前記いずれかの免疫反応生成物の存在を検出すること。

【請求項 8】

H T L V に対して特異的な抗体を検出するための請求項 7 に記載の方法であって、第 1 抗原は F k p A に融合した H T L V p 2 4 抗原であってビオチン部分を保有し、かつ第 2 抗原は S k p に融合した H T L V p 2 4 抗原であって電気化学発光性ルテニウム錯体で標識されているか、または、

第 1 抗原は S k p に融合した H T L V p 2 4 抗原であってビオチン部分を保有し、かつ第 2 抗原は F k p A に融合した H T L V p 2 4 抗原であって電気化学発光性ルテニウム錯体で標識されている、前記方法。 40

【請求項 9】

少なくとも、請求項 1 もしくは 2 に記載の H T L V p 2 4 抗原または請求項 4 に記載の H T L V 抗原組成物を含む、抗 H T L V 抗体の検出のための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、H T L V キャプシド抗原 p 2 4 の可溶性かつ免疫反応性バリエーションに関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトTリンパ球向性ウイルス(human T-cell lymphotropic virus)(HTLV)I型(HTLV-I)は、1980年にヒトにおいて発見された最初のレトロウイルスであった。それはT細胞性の白血病および/またはリンパ腫、ならびにHTLV関連脊髄障害、すなわち最終的に局所痙攣不全対麻痺に至る重篤な脱髄性状態の原因因子である。これらの致命的な不治の疾患を発症する累積生涯リスクは、無症候性HTLV-I保因者の約5%に達する。HTLV-Iは主にCD4陽性T細胞に感染する。それは成人T細胞性リンパ腫ウイルスI型とも呼ばれる。HTLV-IIはHTLV-Iとほぼ70%の遺伝子相同性(タンパク質レベルで80~95%の構造類似性に換算される)をもつ。HTLV-IIの病原能はまだ完全には解明されていないが、それは世界的に主に静脈内薬物使用者に見られるので、輸血のリスクマーカーとみなされている(Vandamme et al., Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II, Gene 261 (2000) 171-180)。両ウイルスとも世界的に拡散しているが、HTLV-Iの有病率は南部日本(九州、四国および沖縄)、サハラ以南アフリカ、カリブ地域(ジャマイカおよびハワイ)および南米のホットスポット領域において最高である。

【0003】

HTLV-I/IIの主な伝播様式は性的接触、輸血、注射針の共有、および授乳による母子間伝播によるものである。HTLV感染後のセロコンバージョン期間は、他の感染性疾患と比較すると長い。ウィンドウ期間、すなわち感染後にそのウイルスに対する抗体を検出できない時間枠は、数週間から数か月に及ぶ可能性がある。

【0004】

HTLVに関する供血者スクリーニングが最初に日本で1986年に、米国およびカナダで1988/1989年に、フランスで1991年に、そして欧州および南米の数か国で1991年以後に導入された。これまでのところHTLV感染についてのゴールドスタンダードは現われていない。組換えおよび/または合成ペプチド抗原に基づく幾つかのイムノアッセイがこの数年間に導入された。

【0005】

抗HTLV抗体を検出するための市販のイムノアッセイは、しばしばウイルスのエンベロープに由来するポリペプチド(gp46表面タンパク質およびgp21膜貫通タンパク質)またはgagコードされたp24キャプシドタンパク質に由来するポリペプチドを用いている。

【0006】

セロコンバージョン時間が長いため、感染後の初期に抗体が出現した時点でごく少量の抗体ですら検出することが重要である。したがって、高感度イムノアッセイに適した抗原の開発が必須である。当然のこととして、不慮のウイルス拡散および伝播を防ぐためには、感染と検出の診断ギャップを詰めることが望ましい。

【0007】

HTLV感染するとセロコンバージョンの初期にgagタンパク質に対する抗体が出現することがかねてから知られていた。特に、gagコードされたキャプシド抗原p24は、体液性免疫応答の好ましい初期ターゲットである(Manns et al., Blood (1991) 77: 896-905)。これまで、p24キャプシドタンパク質のペプチドバリエーションおよび組換えバリエーションがイムノアッセイにおける抗原として用いられてきた。これらの抗原により、Gタイプの抗p24免疫グロブリンが高い正確度および満足できる感度で検出されている。しかし、この種類のp24キャプシド抗原は、Mタイプの免疫グロブリンを結合して検出することはできない。IgM分子は通常はセロコンバージョンに際してIgG分子以前に出現するので、本発明者らは組換えp24キャプシド抗原をIgMにより認識および結合されるように修飾するのは価値があるはずであると判断した。要するに、p24キャプシド抗原をテイリングおよび工学操作することにより抗p24免疫グロブリン検出の感度を改善することが可能かどうかを思案した。特に、IgM分子と相互作用してそれを検出できるp24バリエーションを設計しようとしていた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Vandamme et al., Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II, Gene 261 (2000) 171-180

【非特許文献2】Manns et al., Blood (1991) 77: 896-905

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、本発明の基礎となる課題は、HTLV-IおよびHTLV-IIに対する抗体を検出するための、これまでに得られているイムノアッセイの制限されたセロコンバージョン感度を克服するイムノアッセイを開発することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

この課題は特許請求の範囲に特定される本発明により解決される。

本発明は、シャペロンに融合する可溶性HTLV-p24抗原、および診断適用における、たとえば単離した生体試料においてHTLV-IまたはHTLV-IIに対する抗体を検出するためのイムノアッセイにおける、それらの使用に関する。特に、本発明は、p24配列のN末端またはC末端のどちらかのドメインを含む可溶性HTLV-IまたはHTLV-II-p24抗原フラグメントに関するものであり、その際、HTLV-p24抗原フラグメントはシャペロンに融合していてもよい。さらに、本発明は、これらのHTLV-Iおよび-II融合抗原をコードする組換えDNA分子、ならびに発現ベクターを用いるそれらの組換え製造、ならびにそのような発現ベクターで形質転換した宿主細胞を含む。そのほか、本発明は、これらの数種類のHTLV-p24抗原の組成物、および本発明の抗原を用いてHTLV抗体を検出するためのイムノアッセイ法に注目する。in vitro 診断アッセイにおけるHTLV-p24抗原の使用、および抗HTLV抗体を検出するためのそれらのHTLV抗原を含む試薬キットも包含される。

20

【0011】

開示するアミノ酸配列の説明：

SEP ID NO. 1 : p24/HTLV-I (146-344)// P10274, 199 アミノ酸残基

SwissProtデータベースID P10274から検索したHTLV-I-p24配列(ヒトT細胞白血病ウイルス1, 株 Japan AT-1 サブタイプAに由来する146-344 Gag-Polポリタンパク質)の配列を示す。ナンバリングは未成熟ポリタンパク質前駆体を参照する(アミノ酸1-130の配列はマトリックスタンパク質p19を表わす)。アミノ酸131-145(プロリンリッチ配列)からのN末端15アミノ酸残基は除かれていることを留意されたい。

30

【0012】

【化1】

QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLCSS LVASLHHQQL
 DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAFAALP GSAKDPSWAS
 ILQGLEBEPYH AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRLAYS NANKECQKLL QARGHTNSPL
 GDMLRACQTW TPKDKTKVL

40

【0013】

SEQ ID NO. 2 : p24 NTD (146-260)/HTLV-I, 115 アミノ酸残基

HTLV-I-p24のアミノ酸146-260からのN末端ドメインを示す(アミノ酸位置のナンバリングについてはSEQ ID NO. 1も参照されたい)。1つの位置をX(下線付き)とマークしたことに注目されたい;これは、天然配列のシステイン残基がアラニンまたはセリンで置き換えられていてもよいことを意味する(X=C、AまたはS)。

【0014】

【化2】

QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVASLHHQQL
 DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAAFAALP GSAKD

【0015】

SEQ ID NO. 3 : p24 CTD (261-344)/HTLV-I, 84 アミノ酸残基

HTLV-I p24のアミノ酸残基261-344からのC末端ドメインを示す(アミノ酸位置のナンバリングについてはSEQ ID NO. 1も参照されたい)。2つの位置をX(下線付き)とマークしたことに注目されたい;これは、天然配列のシステイン残基がアラニンまたはセリンで置き換えられていてもよいことを意味する(X=C、AまたはS)。

10

【0016】

【化3】

PSWASILQGL EEPYHAFVER LNIALDNGLP EGTPKDPILR SLAYSNANKE XQKLLQARGH
 TNSPLGDMRL AXQTWTPKDK TKVL

【0017】

SEQ ID NO. 4 : p24(146-344)/HTLV-I, 199 アミノ酸残基

長さおよび位置に関してSEQ ID NO. 1と同様なHTLV-I p24の配列を示す。ただし、3つのアミノ酸位置はX(下線付き)を示す;これは、これらの位置において天然のシステイン(前駆体ポリペプチド配列に従ってナンバリングした位置no. 193、311および332)がアラニンまたはセリンで置き換えられていてもよいことを意味する(X=C、AまたはS)。

20

【0018】

【化4】

QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVASLHHQQL
 DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAAFAALP GSAKDPSWAS
 ILQGLEEYPY AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRSLAYS NANKE XQKLL QARGHTNSPL
 GDMRLAXQTW TPKDKTKVL

【0019】

SEQ ID NO. 5 : p24/HTLV-II (152-350)//P03353, 199 アミノ酸残基

SwissProtデータベースID P03353から検索したHTLV-II p24の配列(ヒトT細胞白血病ウイルス2由来の152-3350 Gag-Proポリタンパク質)を示す。ナンバリングは未成熟ポリタンパク質前駆体を参照する(アミノ酸1-136の配列はマトリックスタンパク質p19を表わす)。アミノ酸137-151(プロリンリッチ配列)からのN末端15アミノ酸残基は除かれていることを留意されたい。

30

【0020】

【化5】

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLCSS LVVSLHHQQL
 NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAAFSTLP GNTRDPSWAA
 ILQGLEEYPY AFVERLNVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAYS NANKECQKIL QARGHTNSPL
 GEMLRTCQAW TPKDKTKVL

40

【0021】

SEQ ID NO. 6 : p24 NTD (152-266)/HTLV-II, 115 アミノ酸残基

HTLV-II p24のアミノ酸152-266からのN末端ドメインを示す(アミノ酸位置のナンバリングについてはSEQ ID NO. 5も参照されたい)。1つの位置をX(下線付き)とマークしたことに注目されたい;これは、天然配列のシステイン残基がアラニンまたはセリンで置き換えられていてもよいことを意味する(X=C、AまたはS)。

50

【 0 0 2 2 】

【 化 6 】

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVVSLHHQQL
 NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAAFSTLP GNTRD

【 0 0 2 3 】

SEQ ID NO. 7 : p24 CTD (267-350)/HTLV-II, 84 アミノ酸残基

HTLV-II p24のアミノ酸267-350からのC末端ドメインを示す(アミノ酸位置のナンバリングについてはSEQ ID NO. 5も参照されたい)。3つの位置をX(下線付き)とマークしたことに注目されたい;これは、天然配列のシステイン残基がアラニンまたはセリンで置き換えられていてもよいことを意味する(X=C、AまたはS)。

10

【 0 0 2 4 】

【 化 7 】

PSWAAILQGL EEPYXAFVER LNVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSNANKE XQKILQARGH
 TNSPLGEMLR TXQAWTPKDK TKVL

【 0 0 2 5 】

SEQ ID NO. 8 : p24(152-350)/HTLV-II, 199 アミノ酸残基

長さおよび位置に関してSEQ ID NO. 5と同様なHTLV-II p24の配列を示す。4つのアミノ酸位置はX(下線付き)を示す;これは、これらの位置において天然のシステイン(前駆体ポリペプチド配列に従ってナンバリングした位置no. 199、281、317および338)がアラニンまたはセリンで置き換えられていてもよいことを意味する(X=C、AまたはS)。

20

【 0 0 2 6 】

【 化 8 】

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVVSLHHQQL
 NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAAFSTLP GNTRDPSWAA
 ILQGLEEPYX AFVERLNVAL DNGLP EGPILRSLAYS NANKE XQKIL QARGHTNSPL
 GEMLR TXQAW TPKDKTKVL

30

【 0 0 2 7 】

下記のアミノ酸配列(SEQ ID NO. 9~16および18~24)は、実施例のセクションで用いるHTLV-IまたはHTLV-II p24(完全または部分)配列の融合配列を示す。タンパク質表記中のEcSl y D、EcF k p AおよびEcS k pについての2文字Ecは、そのタンパク質配列が大腸菌(Escherichia coli)に由来することを示す。各タンパク質はそのC末端にヘキサヒスチジンタグを保有し、それはタンパク質の精製およびリフォールディングを容易にするために用いられる。

【 0 0 2 8 】

【化 9 - 1】

SEQ ID NO. 9: EcSlyD-EcSlyD-p24(146-344)/HTLV-I

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLGHGGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLEET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGGG
SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAFLD YLHGHSLSIS GLETALEGHE
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGSGGGG
GGSGGGSGG GSGGQMKDL QAIKQEVSA APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQQLR REYQQLWLA
FAALPGSAKD PSWASILQGL EEPYHAFVER LNIALDNLGP EGTPKDPILR SLAYSANKE
AQKLLQARGH TNSPLGDMLR AAQTWTPKDK TKVLEHHHH HH

10

SEQ ID NO. 10: EcFkpA-p24(146-344)/HTLV-I

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGKIL DKDQLIAGVQ

【 0 0 2 9 】

【化 9 - 2】

DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSQAAPGSPQ FMQTIRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VASLHHQQLD SLISEAETRG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
 QGLRREYQQL WLAFAALPG SAKDPSWASI LQGLEEPYHA FVERLNIALD NGLPEGTPKD
 PILRSLAYSN ANKEAQKLLQ ARGHTNSPLG DMLRAAQWTW PKDKTKVLEL HHEHHH

SEQ ID NO. 11: EcSlyD-EcSlyD-p24/CTD(258-344)/HTLV-I

10

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFVGDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHGGGSG GSGGGSGGG
 SGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGSGGGGS
 GGGSGGGSGG GSGGGAKDPS WASILQGLEE PYHAFVERLN IALDNLPEG TPKDPILRSL
 AYSNANKEAQ KLLQARGHTN SPLGDMRLAA QTWTPKDKTK VLEHHHHH

SEQ ID NO. 12: EcFkpA-p24/CTD(258-344)/HTLV-I

20

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG KDPWSASILQ GLEPYHAFV ERLNIALDNG
 LPEGTPKDPI LRSAYSNAN KEAQKLLQAR GHTNSPLGDM LRAAQWTWPK DKTKVLEHHH
 HHH

SEQ ID NO. 13: EcSlyD-EcSlyD-p24/CTD(258-344)/HTLV-I

30

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFAQKQ AFEQDRARRS NEERKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGSGGGG GSGGGSGGG GSGGGAKDPS WASILQGLEE
 PYHAFVERLN IALDNLPEG TPKDPILRSL AYSNANKEAQ KLLQARGHTN SPLGDMRLAA
 QTWTPKDKTK VLEHHHHH

SEQ ID NO. 14: EcSlyD-EcSlyD-p24/NTD(146-260)/HTLV-I

40

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFVGDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHGGGSG GSGGGSGGG
 SGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGSGGGGS
 GGGSGGGSGG GSGGQMKDL QAIKQEVSA APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQQGLR REYQQLWLAA
 FAALPGSAKD LEHHHHH

SEQ ID NO. 15: EcFkpA-p24/NTD(146-260)/HTLV-I

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ

【化 9 - 3】

DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKKGSK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGG MKDLQAIKQE VSQAAPGSPQ FMQTIRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VASLHHQQLD SLISEAETRG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
 QGLRREYQQL WLAFAALPG SAKDLEHHHH HH

SEQ ID NO. 16: EcSklp-p24/NTD(146-260)/HTLV-I

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLOSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQK AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDTADVLKQ VKGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSA
 APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVASL HHQQLDLSLIS EAETRGITGY
 NPLAGPLRVQ ANNPQQQGLR REYQQLWLA FAALPGSAKD LEHHHHHH

10

【 0 0 3 1】

SEQ ID NO. 17 : 融合ポリペプチド間のグリシンリッチリンカー (実施例 1 を参照)

【 0 0 3 2】

【化 10 - 1】

GGSGGGSGG GSGGGSGGGG GGG

20

SEQ ID NO. 18: EcSlyD-EcSlyD-p24(152-350)/HTLV-II

MKVAKDLVVS LAYQVTEDEG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRPV KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEELAHG HVHGAHDHHH DHHDGGGSG GSGGGSGGGG
 SGGSGGGGKV AKDLVVSLAY QVTEDEGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRPVKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVVDGNH MLAGQNTKFN VEVVAITREAT REELAHGHVH GAHDHHDHHD HDGGSGGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVVSL HHQQLNTLIT EAETRGMTGY NPMAGPLRMQ ANNPQQGLR REYQNLWLA
 FSTLPGNTRD PSWAAILOGL EEPYAAFVER LNVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSANKE
 AQKILQARGH TNSPLGEMLR TAQAWTPKDK TKVLEHHHH HH

30

SEQ ID NO. 19: EcFkpA-p24(152-350)/HTLV-II

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGKIL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKKGSK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGG MKDLQAIKQE VSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAASFSTLP NTRDPSWAAI LQGLEEPYAA FVERLNVALD NGLPEGTPKE
 PILRSLAYSN ANKEAQKILQ ARGHTNSPLG EMLRTAQAWT PKDKTKVLE HHHHHH

SEQ ID NO. 20: EcSklp-p24(152-350)/HTLV-II

40

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLOSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQK AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDTADVLKQ VKGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS
 ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVVSL HHQQLNTLIT EAETRGMTGY
 NPMAGPLRMQ ANNPQQGLR REYQNLWLA FSTLPGNTRD PSWAAILOGL EEPYAAFVER
 LNVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSANKE AQKILQARGH TNSPLGEMLR TAQAWTPKDK
 TKVLEHHHH HH

【 0 0 3 3】

【化 1 0 - 2】

SEQ ID NO. 21: EcFkpA-p24/CTD(267-350)/HTLV-II

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGP SWAAILQGLE EPYAAFVERL NVALDNGLPE
 GTPKEPILRS LAYSNANKEA QKILQARGHT NSPLGEMLR T AQAWTPKDKT KVLLEHHHHH
 H

10

SEQ ID NO. 22: EcSklp-p24/CTD(267-350)/HTLV-II

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDIADVLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGPSWAA ILQGLEEPPYA
 AFVERLNLVAL DNGLPEGTPK EPILRS LAYS NANKEAQKIL QARGHTNSPL GEMLR TAQAW
 TPKDKTKVLL EHHHHHH

SEQ ID NO. 23: EcFkpA-p24/NTD(152-266)/HTLV-II

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVI PGWTE
 GLKNIKKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAASFSTLPG NTRDLEHHHH HH

20

SEQ ID NO. 24: EcSklp-p24/NTD(152-266)/HTLV-II

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDIADVLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS
 ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVVSL HHQQLNTLIT EAETRGMTGY
 NPMAGPLRMQ ANNPAQQGLR REYQNLWLAA FSTLPGNTRD LEHHHHHH

30

【 0 0 3 4】

SEP ID NP. 25 : gp21/HTLV-I (339-446) // P14075, 1 0 8 アミノ酸残基

SwissProt エントリー ID P14075 によるエンベロープ糖タンパク質 gp21 アミノ酸残基 no. 339 - 446 を示す (エンベロープポリタンパク質前駆体に由来する)。完全ポリタンパク質前駆体は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I (単離株 Caribbean HS-35 サブタイプ A) の表面タンパク質 (= 糖タンパク質 46、gp46) および膜貫通タンパク質 (= 糖タンパク質 21、gp21) を含む。3つの残基を X (下線付き) とマークしたことに注目されたい; これは、天然配列のシステイン残基がアラニンまたはセリンで置き換えられていてもよいことを意味する (X = C、A または S)。

40

【 0 0 3 5】

【化 1 1】

SLASGKSLH EVDKDISQLT QAIKVNHNKLN LKIAQYAAQN RRGDLDFWE QGGLXKALQE
 QXXFLNITNS HVSILQERPP LENRVLTGWG LNWDGLGSQW AREALQTG

【 0 0 3 6】

HTLV gp21 も、たとえば SEQ ID NO. 26 および 27 に示すように溶解性を高めたシャペロン融合ポリペプチドとして有利に適用できる。

【 0 0 3 7】

【化 1 2】

SEQ ID NO. 26: EcSlyD-gp21(339-446)/HTLV-1

MKVAKDLVVS LAYQVRTEG VLVDSPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGSL ASGKSLLEHV DKDISQLTQA IVKNHKNLLK IAQYAAQNRR GLDLLFWEQG
GLAKALQEQA AFLNITNSHV SILQERPPLE NRVLTCWGLN WDLGLSQWAR EALQTGLEHH
HHH

SEQ ID NO. 27: EcSlpA-gp21(339-446)/HTLV-1

10

SESVQNSA VLVHFTLKL DGTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
TTFSLPEPDA FGVSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
ITVDFNHPLA GQTVHFDIEV LEIDPALEGG GSGGGSGGGG GGGSGGGSGG GSLASGKSL
HEVDKDISQL TQAIKVNHN LLKIAQYAAQ NRRGLDLLFW EQGGLAKALQ EQAFLNITN
SHVSILQERP PLENRVLTGW GLNWDGLSLQ WAREALQTGL EHHHHHH

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、S k p - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0)、S E Q I D N O . 2
2の近UV CDスペクトルを示す。

【図2】図2は、S k p - p 2 4 / C T D (S E Q I D N O . 2 2)の融解曲線を示す。熱誘導したアンフォールディングおよびリフォールディングを近UV CD分光法により277nmでモニターしている。

20

【図3】図3は、F k p A - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0)、S E Q I D N O . 21の近UV CDスペクトルを示す。

【図4】図4は、熱誘導アンフォールディング/リフォールディングサイクルの後に天然F k p A - p 2 4 / C T D分子の近UV CD信号が完全に復活することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0039】

HTLV p 2 4は抗HTLV抗体の検出のための重要な抗原である。p 2 4キャプシドタンパク質は当技術分野で以前から知られており、抗HTLV抗体を検出するためのイムノアッセイに用いられてきた(Manns et al., Blood (1991) 77: 896-905)。IgGとIgMの両分子の検出のためのイムノアッセイは、IgG分子だけでなくIgM分子によっても認識および結合される一組の抗原を必要とする。IgM分子は一般に、HTLVに感染した際にセロコンバージョンの初期に出現する。多価IgM分子の結合は高い抗原エпитープ密度に決定的に依存する。よって、IgM分子の特異的検出のために設計された抗原はそのような高エピトープ密度を保有および提示することが必須である。

30

【0040】

高エピトープ密度のIgM検出モジュールを作製するための一般的な方法は、モノマー型抗原を化学架橋により重合させることであろう。きわめて有利に使用でき、当技術分野で周知であるホモ二官能性およびヘテロ二官能性架橋剤は、多数ある。それでもなお、血清学的アッセイにおいて指示子として使用するための抗原の化学誘導による重合には幾つかの重大な欠点がある。たとえば、抗原への架橋剤部分の挿入は、天然様コンホメーションに干渉することにより、または重要なエピトープをマスキングすることにより、抗原性を攪乱する可能性がある。さらに、非天然三次接点の導入はタンパク質フォールディング/アンフォールディングの可逆性に干渉する可能性があり、それはさらに、イムノアッセイ混合物において抗干渉戦略により克服しなければならない干渉問題の根源になる可能性がある。

40

【0041】

IgM検出モジュール作成のより最近の手法は、目的抗原をオリゴマー型シャペロンに融合させ、それによって高エピトープ密度を抗原へ伝達するものである。この技術の利点

50

は、その高い再現性およびオリゴマー型シャペロン融合パートナーの三重の機能にある：第1に、シャペロンは宿主細胞における融合ポリペプチドの発現率を高め、第2に、シャペロンはターゲット抗原のリフォールディングプロセスを促進し、その全体的溶解性を高め、第3に、それは再現性をもってターゲット抗原を規則的なオリゴマー型構造に組み立てる。

【0042】

欧州特許出願公開番号EP1982993 A2には、ヒトサイトメガロウイルスなどの病原体による真の一次感染をオリゴマー型シャペロンに融合する抗原の使用によって早期検出するための方法およびツールが開示されている。しかし、この公報はHTLV感染の検出に関しては言及していない。

10

【0043】

全長バージョンのHTLV p24を用いた本発明者らの最初の試みにより、このタンパク質はシャペロンとしてのEcSllyD - EcSllyDまたはEcFkpAに融合した場合に高い溶解性を示すことが明らかになった。しかし、p24をトリマー型Skpシャペロンと融合させた場合には、その溶解性に限界があった。すべての化合物の溶解性が不均一イムノアッセイ適用に重要な特色であることは自明である。イムノアッセイにおけるタンパク質成分の凝集プロセスは、通常は信号の喪失（エピトープの喪失による）および特異性の喪失（固相への標識抗原凝集物の非特異的結合による）の両方を生じる。本発明者らは、HTLV由来の全長p24が - オリゴマー型シャペロンEcSkpに融合させた場合 - 周囲温度で生理的緩衝液中において凝集する傾向を示すのを観察した。よって、感受性の高いIgMイムノアッセイに全長p24パリアントを単純にそのまま適用するのはともかく除外された。

20

【0044】

全長バージョンのp24に注目する代わりに、本発明者らは今回、トランケート型であるがなお立体的にフォールディングしているp24のフラグメントを設計することを試みた。言い換えると、本発明者らは抗原開発の基礎として全長p24タンパク質の代わりにタンパク質ドメインの使用を試みた。タンパク質ドメインはタンパク質構造内で自発的にフォールディングするものである；すなわち、タンパク質ドメインはそのフォールディングに際して他の部分または領域に依存しない。現在までに、約40アミノ酸残基（WWドメイン）から300アミノ酸残基以上までのサイズに及ぶ多数の天然タンパク質ドメインが解明されている。きわめて小さいけれどもなお安定であるタンパク質ドメインをスクラッチ(scratch)から設計できることも証明された：23～28アミノ酸配列のフラグメント長さをもつ人工ポリペプチド配列が協調してフォールディングし、かつタンパク質ドメインの特徴的な特色をもつことが示された(Struthers, M. D. et al., Design of a monomeric 23-residue polypeptide with defined tertiary structure, Science (1996) 271 (5247) 342-345; Dahiyat, B. I. & Mayo, S.L., De novo protein design: fully automated sequence selection, Science (1997) 278 (5335) 82-87; Dahiyat, B.I. et al., De novo protein design: towards fully automated protein design, J. Mol. Biol. (1997) 273 (4) 789-796)。理論的考察および実験的証拠から、タンパク質ドメインに要求される最小長さは約25アミノ酸残基であると推定される (Porter L. L. & Rose, G. D., A thermodynamic definition of protein domains, PNAS (2012) 109 (24), 9420-9425)。

30

40

【0045】

Journal of Molecular Biology (1999) Aug. 13; 291(2):491-505に、Khorasanizadehらはキャプシドタンパク質p24のNMR構造を提示し、このタンパク質のドメイントポロジーを解明している。この報文によれば、HTLV-I由来のp24はほぼらせん形であり、2つの十分に分離したドメインからなる；すなわち、p24は2つの明確な自発的フォールディングユニットを含む。N末端ドメイン（NTD）にらせん1～7があり、これに対しC末端ドメイン（CTD）はらせん8～12を含む。本発明者らはこれら2つのドメインを個々に大腸菌において発現させることが可能かどうか、また、可溶性かつ抗原

50

性形態のオリゴマー型シャペロンポリペプチド融合体を得ることができるかどうかと思案した。

【 0 0 4 6 】

Khorasanizadehらは、p 2 4 の抗原特性（たとえば、B細胞エピトープ）およびNMR解明されたHTLVキャプシドタンパク質の何らかの診断適用に関しては言及していない。p 2 4 キャプシド抗原の単なる三次元解像構造から、その抗原性が主にN末端ドメイン（NTD）にあるのかまたはC末端ドメイン（CTD）にあるのか、あるいはそのB細胞エピトープがその分子全体に均一に分布しているかどうかは予測不可能であった。

【 0 0 4 7 】

意外にも本発明者らは、シャペロンモジュール、たとえばSlyD、FkpAおよびSkpと融合する単離HTLV p 2 4 ドメインNTDおよびCTDを発現させることができた。実施例のセクションに見ることができるよう、これらの構築体はすべて均一になるまで精製でき、それらは十分に溶解性であり、本発明者らはそれらの抗原性について抗HTLV陽性ヒト血清を用いて自動イムノアッセイ分析計でそれらを査定することができた。これらの結果はきわめて明快であった：抗原性は両ドメインについてかなり高く、CTドメイン（CTD）の方がさらにわずかに高かった。印象深いことに、NTDは、CTDと比較した場合に有意に高いブランクの関係で不確定と同定される可能性があった。CTDは陽性血清について高い信号を発生し、陰性血清についてはきわめて低い信号を発生したという点で、卓越した信号動態を示した。CTDはp 2 4 キャプシドアセンブリーに必要な天然の二量体化モチーフをもつと推定されるので、これは意外である。その自然オリゴマー化挙動により、本発明者らはCTDがNTDの凝集傾向より有意に高い凝集傾向を示すであろうと推論していた。

【 0 0 4 8 】

p 2 4 CTDおよびNTDをウサギ抗HTLVセロコンバージョン血清（ヒトHTLVセロコンバージョンパネルは市販されていないので、本発明者らは人工ウサギモデルに戻らざるを得なかった）で査定した際、シャペロン誘導したオリゴマー型p 2 4 バリエーションをDAGSアッセイの両側に用いるとイムノアッセイの感度が著しく増大することを見出した。セロコンバージョン試料はモノマー型p 2 4 バリエーションを用いるよりオリゴマー型p 2 4 バリエーションを用いてはるかに良好に認識される。

【 0 0 4 9 】

簡単に述べると、HTLV-IおよびHTLV-II由来のp 2 4 のC - ドメインは、高い抗原性および高い溶解性をもつp 2 4 フラグメントと同定された。シャペロン、たとえばSlyD、FkpAまたはSkpに融合させた場合、p 2 4 CTDは可溶性で安定な状態を維持し、HTLVに感染した際に一般にセロコンバージョンの初期に出現するIgM分子の検出に好適である。したがって、特にp 2 4 CTDのオリゴマー型FkpAおよびSkp融合バリエーションはHTLV - イムノアッセイの感度を増大させるために使用できる。

【 0 0 5 0 】

本発明者らは、全長p 2 4 分子より可溶性であり、凝集傾向が有意に少ない、HTLV由来のキャプシドタンパク質p 2 4 のバリエーションを開発した。溶解性および安定性は抗原性を犠牲にして改善される - それにもかかわらず、新たに開発されたp 2 4 バリエーションはHTLVイムノアッセイにおける抗原としての有望性を保持する；それらは大腸菌において多量に過剰発現し、容易に精製され、固定化金属キレートクロマトグラフィー（immobilized metal chelate chromatography）（IMAC）によって容易にリフォールディングし、満足できる安定性を示し、信頼性をもってヒト血清中の抗HTLV抗体を検出するのに使用できるからである（おそらく、gp 2 1 の外部ドメイン（ectodomain）、HTLV由来の他の免疫優性（immunodominant）タンパク質との組合わせで）。たとえば、FkpA - p 2 4 / CTDおよびSkp - p 2 4 / CTD融合タンパク質が、IgM分子を検出するのに十分なエピトープ密度をもつ天然オリゴマーを形成することが最も重要である。本発明者らは総免疫グロブリン検出（すなわち、IgGおよびIgMの検出）のためのイムノ

アッセイの開発を目標としたので、オリゴマー種の F k p A - p 2 4 / C T D および S k p - p 2 4 / C T D を D A G S フォーマットの両側における指示子として有利に使用できる（たとえば、F k p A - p 2 4 / C T D - ビオチンおよび S k p - p 2 4 / C T D - ルテニウム）。予備データは、オリゴマー型 p 2 4 バリエーションの使用は競合体アッセイによって対応できない卓越したセロコンバージョン感度を保証することを示唆する。

【 0 0 5 1 】

したがって本発明は、それぞれ全長 H T L V p 2 4 ポリペプチドの N 末端ドメインを含みかつ C 末端ドメインを欠如するか、または C 末端ドメインを含みかつ N 末端ドメインを欠如する、可溶性 H T L V p 2 4 抗原に関する。本発明によれば、p 2 4 抗原をシャペロンに融合させることができる。診断適用における、たとえば単離した生体試料において H T L V - I または H T L V - I I に対する抗体を検出するためのイムノアッセイにおける、これらの H T L V p 2 4 抗原の使用も包含される。用語 “ H T L V ” は、“ ヒト T リンパ球向性ウイルス ” を意味する。H T L V - I または H T L V - I I と具体的に指示しない限り、用語 H T L V は両方のウイルスタイプを表わす。

10

【 0 0 5 2 】

本発明によれば、抗原は完全 H T L V p 2 4 抗原の特定のドメイン、たとえば N 末端ドメイン (N T D) または C 末端ドメイン (C T D) のみを含む。好ましくは、抗原は H T L V - I p 2 4 の S E Q I D N O . 2 の N 末端ドメインまたは S E Q I D N O . 3 の C 末端ドメインを含む。H T L V - I I 抗原について、融合抗原は好ましくは S E Q I D N O . 6 の N 末端ドメインまたは S E Q I D N O . 7 の C 末端ドメインを含む。さらなる好ましい方式において、N 末端ドメインが抗原の一部であれば C 末端ドメインは欠損しており、逆もまた同様である。

20

【 0 0 5 3 】

特に、本発明は、S E Q I D N O . 2 (p 2 4 N T D H T L V - I) または S E Q I D N O . 6 (p 2 4 N T D H T L V - I I) に特定した H T L V p 2 4 の N 末端ドメイン (N T D) を含む可溶性 H T L V p 2 4 抗原に関するものであり、その際、H T L V p 2 4 抗原は S E Q I D N O . 3 (p 2 4 C T D H T L V - I) および S E Q I D N O . 7 (p 2 4 C T D H T L V - I I) に特定した C 末端ドメイン (C T D) を欠如する。

【 0 0 5 4 】

さらに、本発明は、S E Q I D N O . 3 (p 2 4 C T D H T L V - I) または S E Q I D N O . 7 (p 2 4 C T D H T L V - I I) に特定した H T L V p 2 4 の C 末端ドメインを含む可溶性 H T L V p 2 4 抗原に関するものであり、その際、H T L V p 2 4 抗原は S E Q I D N O . 2 (p 2 4 N T D H T L V - I) および S E Q I D N O . 6 (p 2 4 N T D H T L V - I I) に特定した N 末端ドメインを欠如する。

30

【 0 0 5 5 】

用語 H T L V p 2 4 抗原にはバリエーションも含まれる。H T L V p 2 4 バリエーションは、開示したアミノ酸配列の保存的置換または相同置換（たとえば、アラニンまたはセリンによるシステインの置換）により当業者が容易に作製できる。これに関して用語 “ バリエーション ” は、実質的にそのタンパク質に類似するタンパク質またはタンパク質フラグメント（すなわち、ポリペプチドまたはペプチド）に関するものである。たとえば、C 末端または N 末端の 1 ~ 1 0 個のアミノ酸のトランケーションのような修飾は、特許請求の範囲の H T L V p 2 4 抗原の範囲内である。特に、バリエーションは、最も広く存在するタンパク質イソ型のアミノ酸配列と比較してアミノ酸の交換、欠失または挿入を示すイソ型であってもよい。1 態様において、そのような実質的に類似のタンパク質は、最も広く存在するタンパク質イソ型に対して少なくとも 8 0 %、他の態様において少なくとも 8 5 % または少なくとも 9 0 %、さらに他の態様において少なくとも 9 5 % の配列類似性をもつ。用語 “ バリエーション ” は、翻訳後修飾されたタンパク質、たとえばグリコシル化またはリン酸化されタンパク質に関するものである。本発明によれば、バリエーションは、in vitro 診

40

50

断イムノアッセイにおいて免疫反応性が維持されている限り、すなわち単離した試料中に存在する抗H T L V p 2 4抗体をそのバリエーションがなお結合および検出できる限り、H T L V p 2 4抗原バリエーションと分類される。“バリエーション”は、たとえばタンパク質または抗原への標識またはキャリア部分の共有結合または非共有結合により修飾されたタンパク質または抗原でもある。可能な標識は、放射性、蛍光性、化学発光性、電気化学発光性のもの、酵素、または他のもの、たとえばジゴキシゲニンもしくはビオチンである。これらの標識は当業者に知られている。

【0056】

本発明のH T L V p 2 4抗原は可溶性、安定かつ免疫反応性であり、すなわちそれらは免疫学的アッセイに使用するための抗原として適切である。これは、本発明による抗原が生理的緩衝液条件下で、たとえば界面活性剤を添加していない周囲温度のリン酸緩衝系中で、可溶性であることを意味する。これらの抗原は、単離した試料、たとえばヒト血清中に存在する、H T L V p 2 4に対して特異的な抗体、たとえば抗p 2 4抗体に結合し、あるいはそれらにより認識および結合されることもできる。

【0057】

本発明によるH T L V p 2 4抗原をシャペロンに融合させることができる。本発明において用いる用語“融合タンパク質”、“融合ポリペプチド”または“融合抗原”は、H T L V p 2 4ポリペプチドに対応する少なくとも1つのタンパク質部分、および融合パートナーの役割を果たすシャペロンに由来する少なくとも1つのタンパク質部分を含む、タンパク質を表わす。

【0058】

古典的なフォールディングヘルパーとして知られるシャペロンは、他のタンパク質のフォールディングおよび構造統合性を支援するタンパク質である。フォールディングヘルパーの例はWO 03/000877に詳細に記載されている。本発明によれば、ペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロン、たとえばF K B PファミリーのシャペロンをH T L V p 2 4抗原バリエーションへの融合のために使用できる。融合パートナーとして適したF K B Pシャペロンの例は、F k p A、S l y DおよびS l p Aである。H T L V p 2 4に対する融合パートナーとして適したさらなるシャペロンは、F K B Pファミリーに属さないS k p、すなわち大腸菌のペリプラスムに由来するトリマー型シャペロンである。必ずしもシャペロンの完全配列を用いる必要はない。シャペロンの必要な能力および機能をなお保有する機能性フラグメント（いわゆる結合能をもつ(binding-competent)モジュール)も使用できる(参照：WO 98/13496)。

【0059】

本発明のさらなる態様によれば、F K B Pシャペロン、たとえば大腸菌S l y D、S l p AまたはF k p Aの少なくとも1つまたは少なくとも2つのモジュールを、H T L V p 2 4抗原の発現のための融合部分として用いる。シャペロンS k pも融合パートナーとして使用できる。2つのF K B Pシャペロンドメインの融合により、得られる融合ポリペプチドの溶解性が改善される。融合部分をH T L V p 2 4抗原のN末端もしくはC末端または両末端（サンドイッチ様）に配置することができる。

【0060】

好ましくは、本発明によるH T L V p 2 4抗原をオリゴマー型シャペロンに融合させる。オリゴマー型シャペロンは、天然形態のダイマー、トリマーまたはさらに高次のマルチマーであるシャペロンであり、したがって複数のモノマーサブユニットが特異的な非共有結合性相互作用により組み立てられている。好ましいオリゴマー型シャペロンはF k p AおよびS k pである。

【0061】

特に好ましいものは、S E Q I D N O . 9 ~ 1 6および1 8 ~ 2 4からなる群から選択される、シャペロンに融合した可溶性H T L V p 2 4抗原である。

本発明によるH T L V p 2 4抗原は、組換えDNA技術により作製および産生できる。したがって本発明の他の観点は、前記にさらに定義したH T L V p 2 4抗原およびそ

10

20

30

40

50

のバリエーションをコードする組換えDNA分子である。

【0062】

用語“組換えDNA分子”は、他の状態では分離している2つのDNA配列セグメントの組み合わせにより作製される分子であって、単離したポリヌクレオチドセグメントを遺伝子工学技術または化学合成によって人為的に操作することにより得られるものを表わす。それを行なうために、目的とする機能をもつポリヌクレオチドセグメントを互いに連結して、目的とする組み合わせの機能を生じさせることができる。タンパク質を原核宿主細胞またはより下等もしくは高等な宿主細胞において発現させるための組換えDNA技術は当技術分野で周知である。それらは、たとえばSambrook et al., (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual)により記載されている。

10

【0063】

本発明による組換えDNA分子は、10～100アミノ酸残基のリンカーペプチドをコードする配列を、HTLV p24抗原と融合部分の間に、また数個の融合部分の間にも、含むこともできる。そのようなリンカー配列は、たとえばタンパク質分解開裂部位をもつことができる。

【0064】

本発明のさらなる観点は、利用可能な状態で連結した本発明による組換えDNA分子、すなわちHTLV p24抗原をコードする組換えDNA分子、および場合によりペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロン、たとえばFKBP-シャペロンを含む、発現ベクターであり、その際、FKBP-シャペロンはFkpA、SlyDおよびSlpAから選択される。別態様において、組換えDNA分子はHTLV p24抗原およびSkpを含む融合タンパク質をコードする。本発明による組換えDNAを含む発現ベクターは、無細胞翻訳系においてHTLV p24抗原を発現させるのに使用でき、あるいはHTLV p24抗原の発現のために宿主細胞を当技術分野で周知の方法に従って形質転換するのに使用できる。したがって本発明の他の観点は、本発明による発現ベクターで形質転換した宿主細胞に関する。本発明の1態様において、組換えHTLV p24抗原は大腸菌細胞において産生される。

20

【0065】

さらに他の観点は、本発明による可溶性、安定かつ免疫反応性のHTLV p24抗原を製造するための方法である。そのp24抗原は、HTLV p24抗原およびシャペロンを含む融合タンパク質として製造できる。好ましくは、シャペロン、たとえばSkp、またはペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロン、たとえばFKBPシャペロンを用いる。本発明のさらなる態様において、そのFKBPシャペロンはSlyD、FkpAおよびSlpAからなる群から選択される。

30

【0066】

この方法は下記の工程を含む：

a) HTLV p24抗原をコードする遺伝子を含む前記の発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養する；

b) そのHTLV p24抗原をコードする遺伝子を発現させる；

c) そのHTLV p24抗原を精製する。

40

場合により、追加工程d)として、当技術分野で既知のリフォールディング法によりHTLV p24抗原を可溶性および免疫反応性のコンホメーションにするために、機能性可溶化を実施する必要がある。

【0067】

本発明のさらに他の観点は、単離したヒト試料中の抗HTLV抗体を検出するための方法に関するものであり、その際、本発明によるHTLV p24抗原を抗体に対する結合パートナーとして用いる。よって本発明は、単離した試料においてHTLVに対して特異的な抗体を検出するための方法を含み、その方法は下記を含む：

a) 体液試料を本発明によるHTLV p24抗原と混合することにより免疫反応混合物を調製する；

50

b) 体液試料中に存在する、そのH T L V抗原またはH T L V抗原組成物に対する抗体が、そのH T L V抗原と免疫反応して免疫反応生成物を形成できるのに十分な期間、その免疫反応混合物を保持する；そして

c) そのいずれかの免疫反応生成物の存在および/または濃度を検出する。

【0068】

さらなる観点において、その方法はI g GおよびI g MサブクラスのH T L V抗体を検出するのに適切である。

抗体の検出のためのイムノアッセイは当技術分野で周知であり、したがってそのようなアッセイを実施するための方法ならびに実際の適用および操作も周知である。本発明によるH T L V p 2 4抗原を用いて、使用する標識と無関係に、また検出様式（たとえば、放射性同位体アッセイ、エンザイムイムノアッセイ、電気化学発光アッセイなど）またはアッセイ原理（たとえば、試験片アッセイ、サンドイッチアッセイ、間接試験概念、または均一アッセイなど）と無関係に、抗H T L V抗体を検出するためのアッセイを改善することができる。当業者に知られているすべての生物学的液体を、抗H T L V抗体の検出のための単離した試料として使用できる。通常用いられる試料は、体液、たとえば全血、血清、血漿、尿または唾液である。

【0069】

本発明のさらなる態様は、単離した試料中の抗H T L V抗体を検出するための、いわゆる二重抗原サンドイッチ(double antigen sandwich) (D A G S) 概念に従って実施されるイムノアッセイである。2つの抗原が被験抗体により架橋されるので、時にはこのアッセイ概念は二重抗原架橋概念とも呼ばれる。そのようなアッセイには、抗体がその2 (I g G、I g E)、4 (I g A) または10 (I g M) のパラトープで特定の抗原の少なくとも2つの異なる分子を結合する能力が要求され、利用される。

【0070】

より詳細には、抗H T L V抗体検出を二重抗原架橋フォーマットに従って判定するためのイムノアッセイは、抗H T L V抗体を含有する試料を、2つの異なるH T L V p 2 4抗原、すなわち第1の(“固相”) H T L V p 2 4抗原および第2のH T L V p 2 4(“検出”) 抗原と共にインキュベートすることにより実施され、その際、それらの抗原はそれぞれ抗H T L V抗体に特異的に結合する。第1抗原は直接または間接的に固相に結合することができ、通常は生体親和性(bioaffine)結合対、たとえばビオチンとアビジンの一部であるエフェクター基を保有する。たとえば、第1抗原がビオチンにコンジュゲートしているならば、固相をアビジンまたはストレプトアビジンのどちらかでコートする。第2抗原は標識を保有する。こうして、第1抗原、試料抗体および第2抗原を含む免疫反応混合物が調製される。第1抗原が結合できる固相は、試料を抗原に添加する前または免疫反応混合物を調製した後に添加される。体液試料においてそれらのH T L V p 2 4抗原に対する抗H T L V抗体がそれらのH T L V p 2 4抗原と免疫反応して免疫反応生成物を形成できるのに十分な期間、その免疫反応混合物を保持する。次の工程は液相を固相から分離する分離工程である。最後に、固相もしくは液相または両方におけるそのいずれかの免疫反応生成物の存在を検出する。

【0071】

そのD A G Sイムノアッセイにおいて、“固相抗原”と“検出抗原”の基本構造は本質的に同じである。二重抗原架橋アッセイにおいては、類似するけれども異なるH T L V p 2 4抗原を用いることもでき、それらは免疫交差反応性である。そのようなアッセイを実施するための本質的要件は、関連エピトープまたは関連エピトープ類が両方の抗原に存在することである。本発明によれば、各H T L V p 2 4抗原について異なる融合部分を使用できる(たとえば、固相側のH T L V p 2 4に融合したS l y D、および検出側のH T L V p 2 4に融合したF k p A)；そのようなバリエーションは非特異的結合の問題を著しく軽減し、したがって偽陽性結果のリスクを緩和するからである。

【0072】

好ましくは、そのD A G Sイムノアッセイに非対称フォーマットを適用し、F k p Aに

10

20

30

40

50

融合した H T L V p 2 4 と S k p に融合した H T L V p 2 4 抗原を組み合わせる。より好ましくは、F k p A に融合した H T L V p 2 4 を固相側に用い、かつ S k p に融合した H T L V p 2 4 を検出側に適用するが、逆の配置をもつこともでき、すなわち S k p に融合した H T L V p 2 4 抗原を固相側に、かつ F k p A に融合した H T L V p 2 4 を検出側に用いることもできる。最も好ましくは、H T L V p 2 4 F k p A 融合タンパク質はストレプトアビジンまたはアビジンでコートした固相への付着のためのビオチン部分を保有し、H T L V p 2 4 S k p 融合タンパク質は電気化学発光標識、たとえばルテニウム錯体を保有する。逆の配置の場合、p 2 4 S k p 融合タンパク質がビオチンを保有し、p 2 4 F k p A がその標識を保有する。

【 0 0 7 3 】

10

したがって本発明のさらなる態様は、本発明による第 1 の H T L V p 2 4 抗原および本発明による第 2 の H T L V p 2 4 抗原を用いる二重抗原架橋概念に従ったイムノアッセイである。

【 0 0 7 4 】

本発明はさらに、抗 H T L V 抗体を検出するための診断検査における少なくとも 1 つの H T L V p 2 4 抗原の使用に関する。

本発明のさらに他の対象は、イムノアッセイのための通常の検査添加剤に加えて、決定すべき H T L V 抗体に特異的に結合するのに適した本発明による H T L V p 2 4 抗原の少なくとも 1 つの抗原であっておそらく標識を保有するもの、および必要であれば他の通常の添加剤を含む、H T L V に対する抗体の検出のための試薬キットである。

20

【 0 0 7 5 】

特に、試薬キットは S E Q I D N O . 9 ~ 1 6 および 1 8 ~ 2 4 のいずれかによる H T L V p 2 4 抗原を含む。

さらに、前記に定めた試薬キットは、対照および標準溶液、ならびに平均的な当業者が用いる一般的な添加剤、緩衝剤、塩類、界面活性剤などを含む 1 以上の溶液中の試薬を、使用のための指示と一緒に含む。

【 0 0 7 6 】

他の態様は、本発明による可溶性 H T L V p 2 4 抗原、および H T L V エンベロープ抗原、好ましくは S E Q I D N O . 2 5 を含む g p 2 1 を含有する、H T L V 抗原組成物である。用語“組成物”は、個別に発現したポリペプチドが混合物中に個々の別個の分子として存在するものを表わす。組成物という用語は、p 2 4 および g p 2 1 のフラグメントを単一のポリペプチド鎖上に保有するタンパク質を除外する。

30

【 0 0 7 7 】

H T L V p 2 4 の C 末端ドメインを含む組成物が好ましく、S E Q I D N O . 3 による H T L V - I p 2 4 抗原 (S E Q I D N O . 2 を欠如する) および / または S E Q I D N O . 7 による H T L V - I I p 2 4 抗原 (S E Q I D N O . 6 を欠如する) ならびに H T L V g p 2 1 を含む組成物が特に好ましい。たとえば、その組成物には、S E Q I D N O . 2 5 、 2 6 または 2 7 のいずれかを含む H T L V g p 2 1 配列が存在できる。D A G S フォーマットによるイムノアッセイに適用するために、組成物は 2 形態、すなわち抗原が固相に付着できるようにする形態 (たとえば、ストレプトアビジンでコートした表面に結合できるビオチニル化抗原) および試料中に存在する H T L V 抗体と適用した H T L V 抗原との免疫複合体の検出を可能にする標識化形態の各 H T L V 抗原を含む。

40

【 0 0 7 8 】

本発明はまた、抗 H T L V 抗体の i n v i t r o 診断検査における本発明による H T L V p 2 4 抗原の使用に関する。

【実施例】

【 0 0 7 9 】

本発明を実施例によってさらに説明する。

実施例 1

50

p 2 4 キャプシド融合ポリペプチドのクローニングおよび精製 発現カセットのクローニング

Novagen (米国ワイオミング州マディソン) の p E T 2 4 a 発現プラスミドをベースにして、H T L V - I および H T L V - I I に由来する p 2 4 融合タンパク質をコードする発現カセットを本質的に記載に従って得た (Scholz, C. et al., J. Mol. Biol. (2005) 345, 1229-1241)。H T L V - I および H T L V - I I に由来する p 2 4 抗原の配列を Swiss Prot データベース (それぞれ、Swiss Prot ID P 1 0 2 7 4 および P 0 3 3 5 3) から検索した。N 末端にグリシンリッチリンカー領域がインフレイム融合した H T L V - I (成熟キャプシドタンパク質の N 末端プロリンリッチ 1 5 アミノ酸を欠如する) 由来の p 2 4 キャプシド抗原アミノ酸 1 4 6 - 3 4 4 (ナンバリングは Gag - Pro ポリタンパク質前駆体を参照する) をコードする合成遺伝子を、Medigenomix (ドイツ、マーチンスリード) から購入した。望ましくない副反応、たとえば酸化または分子間ジスルフィド架橋を阻止するために、p 2 4 の位置 1 9 3、3 1 1 および 3 3 2 のシステイン残基をアラニン残基に交換した。BamHI および XhoI 制限部位が、p 2 4 - コーディング領域のそれぞれ 5' および 3' 末端にあった。2 つの E c S l y D ユニット (Swiss Prot 寄託 no. P 0 A 9 K 9 の残基 1 - 1 6 5) がグリシンリッチリンカー領域に連結したものをコードする、C 末端にさらなるリンカー領域の部分を含むさらなる合成遺伝子を、同様に Medigenomix から購入した。NdeI および BamHI 制限部位がこのカセットのそれぞれ 5' および 3' 末端にあった。これらの遺伝子および制限部位は、シャペロン部分 E c S l y D - E c S l y D と p 2 4 抗原部分の簡単なライゲーションによるインフレイム融合が可能になるように設計された。意図しない組換えプロセスを避けるために、かつ大腸菌宿主における発現カセットの遺伝子安定性を高めるために、E c S l y D ユニートをコードするヌクレオチド配列を変性させ、エクステンションしたリンカー領域をコードするヌクレオチド配列を同様に変性させた; すなわち、同一アミノ酸配列をコードする異なるコドン組合わせを用いた。

【 0 0 8 0 】

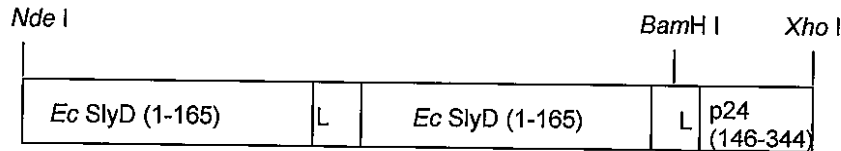
p E T 2 4 a ベクターを NdeI および XhoI で消化し、H T L V - I p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4) にインフレイム融合した縦列 S l y D を含むカセットを挿入した。パスツレラ・ムルトシダ (Pasteurella multocida) S l y D (1 - 1 5 6, Swiss Prot ID Q 9 C K P 2)、大腸菌 S k p (2 1 - 1 6 1, Swiss Prot ID P 0 A E U 7) または大腸菌 F k p A (2 6 - 2 7 0, Swiss Prot ID P 4 5 5 2 3) を含む発現カセットをそれに応じて構築し、H T L V - I I (Swiss Prot ID P 0 3 3 5 3) 由来の p 2 4 および p 2 4 フラグメントを含む発現カセットも構築した。H T L V - I 由来の p 2 4 と同様に、望ましくない副反応、たとえば酸化または分子間ジスルフィド架橋を阻止するために、H T L V - I I 由来の p 2 4 の位置 1 9 9、2 8 1、3 1 7 および 3 3 8 (この場合もナンバリングは前駆体 Gag - Pro ポリタンパク質を参照する) にある真のシステイン残基をアラニン残基に交換した。Ni - NTAA - 支援による精製およびリフォールディングを容易にするために、すべての組換え融合ポリペプチドバリエーションが C 末端ヘキサヒスチジンタグを含んでいた。QuickChange (Stratagene, 米国カリフォルニア州ラホーヤ) および標準 PCR 法を用いて点変異、欠失、挿入およびエクステンションバリエーションまたは制限部位をそれぞれの発現カセットに作製した。

【 0 0 8 1 】

下記の図は、その N 末端にインフレイム融合した 2 つの S l y D シャペロンユニットを保有する N 末端トランケート型 H T L V - I p 2 4 抗原 1 4 6 - 3 4 4 のスキームを示す。大腸菌起源の S l y D 融合パートナーを表わすために、描かれた融合ポリペプチドは E c S l y D - E c S l y D - p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4) と命名された。

【 0 0 8 2 】

【化 1 3】



$L = (GGGS)_5GGG$ —リンカー

【 0 0 8 3】

得られたプラスミドの挿入配列を配列決定し、目的とする融合タンパク質をコードすることが認められた。HTLV-IおよびHTLV-IIに由来するp24融合ポリペプチドの完全アミノ酸配列をSEQ ID NO. 9~16および18~24に示す。リンカーLのアミノ酸配列をSEQ ID NO. 17に示す。

10

【 0 0 8 4】

HTLV-IおよびHTLV-IIに由来するp24およびp24バリエーションを含む融合タンパク質の精製

すべてのp24融合タンパク質バリエーションを実質的に同一のプロトコルを用いて精製した。特定のpET24a発現プラスミドを宿主した大腸菌BL21(DE3)細胞を、37℃でLB培地+カナマイシン(30 μg/ml)中において1.5のOD₆₀₀になるまで増殖させ、1 mMのイソプロピル-β-D-チオガラクトシドを添加することにより細胞質ゾル過剰発現を誘導した。誘導の3時間後、細胞を遠心分離(5000 gで20分間)により収穫し、凍結し、-20℃で保存した。細胞溶解のために、冷却した50 mMリン酸ナトリウム pH 8.0、7.0 M GdmCl、5 mMイミダゾールに凍結ペレットを再懸濁し、懸濁液を氷上で2時間攪拌して細胞溶解を完了させた。遠心分離および濾過(0.45 μm/0.2 μm)の後、粗製の細胞溶解物を5.0 mMのTCEPを含有する細胞溶解緩衝液でNi-NTAカラムに適用した。その後の洗浄工程は各ターゲットタンパク質に合わせて調整され、5 mMから15 mMに及ぶイミダゾール(50 mMリン酸ナトリウム pH 8.0、7.0 M GdmCl、5.0 mM TCEP中)であった。少なくとも10~15体積の洗浄緩衝液を適用した。次いで、GdmCl溶液を50 mMリン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl、10 mMイミダゾール、5.0 mM TCEPにより交換して、マトリックス結合したタンパク質のコンホメーションリフォールディングを誘導した。同時精製されるプロテアーゼの再活性化を避けるために、プロテアーゼインヒビターカクテル(Complete(登録商標) EDTAフリー, Roche)をリフォールディング緩衝液に含有させた。合計15~20カラム体積のリフォールディング緩衝液を一夜の反応で適用した。次いで、TCEPとComplete(登録商標) EDTAフリーインヒビターカクテルの両方を、3~5カラム体積の50 mMリン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl、10 mMイミダゾールで洗浄することにより除去した。その後、非特異的に結合したタンパク質混在物を除去するために、イミダゾール濃度をまだ50 mMリン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl中にあるものを20~80 mM(各ターゲットタンパク質に応じて)に高めた。天然タンパク質を次いで同じ緩衝液中の500 mMイミダゾールで溶離した。タンパク質含有画分を純度についてトリシン(Tricine)-SDS-PAGEにより査定し、プールした。最後に、タンパク質にサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia)を施し、タンパク質含有画分をプールし、Amiconセル(YM10)で10~20 mg/mlに濃縮した。

20

30

40

【 0 0 8 5】

精製とリフォールディングの組合わせプロトコルの後、各ターゲットタンパク質に応じてほぼ10~30 mgの収量のタンパク質を1 gの大腸菌湿潤細胞から得ることができた。

【 0 0 8 6】

実施例 2

50

分光測定

U v i k o n X L ダブルビーム分光光度計でタンパク質濃度測定を実施した。Pace (1995), Protein Sci. 4, 2411-2423が記載した方法を用いてモル吸光係数 (ϵ_{280}) を決定した。個別の融合ポリペプチドに用いたモル吸光係数 (ϵ_{M280}) を表 1 に明示する。

【 0 0 8 7 】

表 1 : この試験で作製および使用した p 2 4 融合ポリペプチドバリエーションのタンパク質パラメーター。すべてのパラメーターが各タンパク質モノマーを表わす

【 0 0 8 8 】

【表 1】

融合タンパク質	ターゲット タンパク質 の長さ (アミノ酸残基)	融合ポリペプチド の分子量 (Da)	pI	ϵ_{M280} $M^{-1}cm^{-1}$	Abs _{0.1%} (= 1 mg/ml)
p24 バリエーション					
HTLV-I					
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -p24	146-344	61762	5.0	35870	0.581
<i>EcFkpA</i> -p24	146-344	50840	6.8	39880	0.784
<i>EcSkp</i> -p24	146-344	40306	9.1	25440	0.631
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -p24/CTD	258-344	49311	4.9	25900	0.525
<i>EcFkpA</i> -p24/CTD	258-344	38389	7.1	29910	0.779
<i>EcSkp</i> -p24/CTD	258-344	27855	9.3	15470	0.555
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -p24/NTD	146-260	52486	4.8	21890	0.417
<i>EcFkpA</i> -p24/NTD	146-260	41565	6.5	25900	0.623
<i>EcSkp</i> -p24/NTD	146-260	31031	9.0	11460	0.369
p24 variants					
HTLV-II					
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -p24	152-350	61868	5.0	35870	0.580
<i>EcFkpA</i> -p24	152-350	50946	7.2	39880	0.783
<i>EcSkp</i> -p24	152-350	40412	9.2	25440	0.630
<i>EcFkpA</i> -p24/CTD	267-350	38120	7.1	29910	0.785
<i>EcSkp</i> -p24/CTD	267-350	27586	9.3	15470	0.561
<i>EcFkpA</i> -p24/NTD	152-266	41739	6.7	25900	0.621
<i>EcSkp</i> -p24/CTD	152-266	31205	9.2	11460	0.367

【 0 0 8 9 】

これらの融合ポリペプチドバリエーションのアミノ酸配列を SEQ ID NO. 9 ~ 16 および 18 ~ 24 に示す。

実施例 3融合タンパク質へのビオチン部分およびルテニウム部分のカップリング

融合ポリペプチドのリジン - アミノ基を、タンパク質濃度 10 ~ 30 mg / ml で N - ヒドロキシ - スクシンイミド活性化ビオチンおよびルテニウム標識分子によりそれぞれ修飾した。標識 / タンパク質比をそれぞれの融合タンパク質に応じて 2 : 1 から 5 : 1 (mol : mol) まで変更した。反応緩衝液は 150 mM リン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl、0.5 mM EDTA であった。反応を室温で 15 分間実施し、緩衝化 L - リジンを 10 mM の最終濃度になるまで添加することにより停止した。標識の

加水分解による不活性化を避けるために、それぞれの原液を乾燥DMSO (secosolv品質, Merck, ドイツ) 中に調製した。反応緩衝液中25%までのDMSO濃度が、試験したすべての融合タンパク質によって良好に耐容された。カップリング反応の後、粗製タンパク質コンジュゲートをゲル濾過カラム (Superdex 200 Hi Load) に通すことにより、未反応の遊離標識を除去した。

【0090】

実施例4

HTLVイムノアッセイにおける種々のp24キャプシド抗原バリエーションの免疫反応性 (すなわち、抗原性)

HTLV p24キャプシド抗原のポリペプチド融合バリエーションの免疫反応性 (抗原性) を、自動Elesys (登録商標) 2010およびcobase 411分析計 (Roche Diagnostics GmbH) で査定した。Elesys (登録商標) はRocheグループの登録商標である。測定は二重抗原サンドイッチフォーマットで実施された。

10

【0091】

Elesys (登録商標) 2010およびcobase 411における信号検出は電気化学発光に基づく。ビオチン-コンジュゲート (すなわち、捕捉抗原) はストレプトアビジンコートした磁性ビーズの表面に固定化され、一方、検出抗原は錯化したルテニウムカチオン (2+と3+の酸化還元状態間でスイッチング) を信号発生部分として保有する。特異的免疫グロブリン被験体の存在下で、色素原ルテニウム錯体は固相に架橋し、白金電極で励起された後に620nmで光を発する。信号出力は相対光単位による。

20

【0092】

組換えp24キャプシド抗原融合ポリペプチドを二重抗原サンドイッチ (DAGS) イムノアッセイフォーマットで査定した。このために、組換えHTLV-Iキャプシド抗原p24をそれぞれビオチンおよびルテニウムのコンジュゲートとして用いて、ヒト血清中の抗p24抗体を検出した。

【0093】

p24はHTLVの免疫優性抗原のひとつであり、p24の可溶性バリエーション - 本出願において開示するもの - はHTLV感染の検出のための貴重なツールである。すべての測定において、シャペロン融合ユニットを介した免疫交差反応を避けるために、化学的に重合させた非標識EcSl yD - EcSl yD、EcFkpAおよびEcSkpを、反応緩衝液中に抗干渉物質として大過剰 (約10 μg / ml) に供給した。

30

【0094】

特に、HTLV-I由来の3つのp24バリエーション、すなわち全長p24 (146 - 344, ナンバリングはGag-Proポリタンパク質前駆体を参照する, SEQ ID NO. 1および5を参照)、p24 N末端ドメイン (p24 / NTD, 146 - 260)、およびp24 C末端ドメイン (p24 / CTD, 261 - 344) をこの試験で調べた。抗p24 IgG分子を検出するために、EcSl yD - EcSl yD - p24 - ビオチンおよびEcSl yD - EcSl yD - p24 - ルテニウムを、それぞれR1 (試薬緩衝液1) およびR2 (試薬緩衝液2) 中において用いた。抗p24 IgMおよびIgGの両分子を検出するために、EcFkpA - p24 - ビオチンおよびEcSkp - p24 - ルテニウムを、それぞれR1 (試薬緩衝液1) およびR2 (試薬緩衝液2) 中において用いた。R1およびR2中の抗原コンジュゲートの濃度は、それぞれ100 ng / mlであった。N末端トランケート型成熟p24 (146 - 344) を、EcSl yD - EcSl yD融合ポリペプチドとしてビオチン側に用い、EcFkpA融合ポリペプチドをルテニウム側に用いた。

40

【0095】

残念ながら、ヒトHTLVセロコンバージョンパネル - 改良された in vitro 診断アッセイの開発に不可欠なツールである - は市販されていない。HTLV感染のごく初期における種々のp24バリエーションの抗原特性を査定するために、本発明者らはセロコンバ

50

ージョンモデルとして用いるウサギ血清に戻らざるを得なかった。この目的で、ニュージーランドシロウサギを、精製および不活性化したH T L V - I および - I I ウイルス溶解物 (Z e p t o m e t r i x から購入, 米国ニューヨーク) および完全フロイントアジュバントで免疫化して、免疫応答を誘導した (2 回の免疫化, 1 週間隔)。ヒトにおける真のH T L V 感染に際しての体液性免疫応答のパターンはウイルス溶解物接種により誘発したウサギの免疫応答とはわずかに異なる可能性があることを本発明者らは承知している。それでもなお、人為的に誘導したウサギのセロコンバージョンは、我々が入手できた最良の模倣である。

【 0 0 9 6 】

第 1 実験において、バックグラウンド信号の見解を得るために、モノマー型 p 2 4 C T D (p 2 4 , 2 6 1 - 3 4 4) を抗 H T L V - 陰性 ヒト血清について前記の D A G S イムノアッセイ設定で査定した。不可避のシステム固有信号は約 5 0 0 カウントである。低いバックグラウンド信号は、各ルテニウムコンジュゲートの高い溶解性および全般的に良好な物理化学的特性の指標となる。表 2 から、モノマー型 p 2 4 C T D の物理化学的特性が卓越していると推測できる (縦列 1)。これはオリゴマー型 p 2 4 C T D についても当てはまる (縦列 2) : F k p A - p 2 4 (2 6 1 - 3 4 4) - ビオチンおよび S k p - p 2 4 (2 6 1 - 3 4 4) - ルテニウムは、D A G S フォーマットにおける抗原対として用いた場合、陰性ヒト血清について約 1 1 0 0 カウントの信号バックグラウンドを生じ、これは明らかに良好な溶解性を指摘する。しかし、モノマー型とオリゴマー型の p 2 4 C T D はそれらが抗 H T L V 抗体 (そして明らかに I g M 分子) を検出する能力において著しく異なることは、表 2 に示すセロコンバージョンパネルにおいて一見して明らかになる。セロコンバージョン K 5 6 4 5 を注意深く観察すると、モノマー型 p 2 4 C T D は 1 8 日目にかろうじて陽性 (1 5 5 8 カウント) として検出され、これに対しオリゴマー型 p 2 4 C T D は 1 4 日目に既に明らかに陽性 (8 2 3 2 カウント) として現われ、1 8 日目には 5 0 1 1 8 カウントの高い信号になる。同じ状況がセロコンバージョンパネル K 5 6 4 6、K 5 6 4 7 および K 5 6 4 8 でみられる：オリゴマー型 p 2 4 C T D バリエーションはより高い信号をより早期に発生し、よってセロコンバージョンにおける抗 p 2 4 抗体の早期検出において卓越した感度を保証する。原則として、その状況は、アミノ酸残基 1 4 6 - 2 6 0 (ナンバリングは G a g - P r o ポリタンパク質前駆体を参照する) を含む p 2 4 の N 末端ドメイン (N T D) について類似する。C T D と同様に、オリゴマー型 p 2 4 N T D の方がセロコンバージョンの早期に出現する抗体 (すなわち、M 型の免疫グロブリン) の検出に好適であり、それは特にセロコンバージョンパネル K 5 6 4 7 および K 5 6 4 8 (表 2 , 縦列 3 および 4) で例示される。しかし、オリゴマー型 N T D p 2 4 のバックグラウンド信号は C T D p 2 4 と比較した場合、有意に高い。さらに、p 2 4 の C 末端ドメインの抗原性は N 末端ドメインの抗原性をはるかに超えると思われる。結論として、p 2 4 のオリゴマー型 C 末端ドメインは卓越した物理化学的特性および優れた抗原性を持ち、それにより H T L V 血清学のための魅力的な候補となる。早期 I g M 検出における感度の点で、それは明らかに全長 p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4 , ポリタンパク質前駆体のナンバリング) より優れている。全長 p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4) の S k p 融合ポリペプチドは著しい凝集傾向があるので利用できなかったため、p 2 4 全長バージョンの S l y D - S l y D および F k p A 融合ポリペプチドに制限された。モノマー型 S l y D - S l y D - p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4) を D A G S フォーマットのビオチン側に用い、オリゴマー型 F k p A - p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4) をルテニウム側に用いた場合、結果はきわめて明快である：全長 p 2 4 はセロコンバージョンパネルの後期には卓越した信号を生じるが、それは早期検出は全くできない (表 2 , 縦列 5)。オリゴマー型の C T D p 2 4 および N T D p 2 4 は両方ともモノマー型全長バリエーションより優れており、高感度の早期検出は主に使用する p 2 4 フラグメントのエピトープ密度に依存するという良い証拠を提示する。卓越したセロコンバージョン感度を得るために完全 p 2 4 配列全体を提供する必要はないと思われる。むしろ、H T L V 感染の初期における高感度で信頼性のある I g M 分子検出を保証するためには p 2 4 の N および C - ドメインにあるエピトープ

10

20

30

40

50

で十分である - ただし、これらのエピトープがオリゴマー型で提示されていれば。H T L V - I 由来の p 2 4 の C 末端ドメインは、その優れた溶解性（低いバックグラウンド信号に反映される）およびその卓越した抗原性のおかげで、H T L V イムノアッセイの貴重な成分としての将来性をもつ。これはほとんど予想外であった：p 2 4 キャプシド抗原の C - ドメインはおそらく p 2 4 オリゴマー化に関与する (Khorasanizadeh et al., J. Mol. Biol. (1999) 291, 491-505) ので、単離した C - ドメインは凝集しやすい可能性があり、少なくとも N - ドメインより取扱いが難しいはずであると本発明者らは推論していた。さらに、本発明者らの予想は、成熟キャプシド粒子内にほとんど隠れている p 2 4 C - ドメインは良好にアクセスできる N - ドメインより少ない免疫優性エピトープを宿しているというものであった。意外なことに、その逆が真実である。実際には、溶解性および抗原性に関して C 末端ドメインより劣ると思われるけれども、p 2 4 の N - ドメインも H T L V - イムノアッセイの抗原として好適である。表 2 は H T L V - I 由来の p 2 4 バリエーションについての結果を示す。H T L V - I I 由来の対応する p 2 4 バリエーションについても実質的に同一の結果が見出された。H T L V - I および H T L V - I I に由来する p 2 4 のアミノ酸配列は 8 4 % の同一性および 9 3 % の相同性をもつので、これは本発明者らの予想と一致する。H T L V - I I 由来の p 2 4 に対応する配列は、1 5 2 - 2 6 6 (N - ドメイン, N T D) , 2 6 7 - 3 5 0 (C - ドメイン, C T D) および 1 5 2 - 3 5 0 (成熟全長 p 2 4) であった；S E Q I D N O . 5 ~ 8 も参照。

【 0 0 9 7 】

表 2 : H T L V 感染初期におけるオリゴマー型 p 2 4 バリエーションの優れた免疫反応性 (ウサギセロコンバージョンパネルにおける高い感度)

【 0 0 9 8 】

10

20

【表 2】

p24 バリエーション (フラグメント長さ)	モノ CTD (261-344)	オリゴ CTD (261-344)	モノ NTD (146-260)	オリゴ NTD (146-260)	全長 p24 (146-344)
融合パートナー R1 (Bi)	SlyD-SlyD	FkpA	SlyD-SlyD	FkpA	SlyD-SlyD
融合パートナー R2 (Ru)	SlyD-SlyD	Skp	SlyD-SlyD	Skp	FkpA
濃度 (ng/ml)	100	100	100	100	300
Elecsys 分析計におけるカウント (cobas e 411)					
抗 HTLV-陰性血清					
0701.1201.01	599	976	667	2846	1677
0701.1202.01	611	1116	724	4331	1981
0701.1203.01	592	1148	717	4860	1933
セロコンバージョンパネル (採血日)					
K5645 (0 日目)	725	1037	790	2330	1608
K5645 (10 日目)	612	1196	758	2549	1613
K5645 (14) 日目	642	8232	729	2690	2910
K5645 (18 日目)	1558	50118	906	3071	15191
K5646 (0 日目)	592	1045	728	2359	1580
K5646 (11 日目)	636	1396	770	2779	1665
K5646 (15 日目)	1425	13090	740	3084	1715
K5646 (19 日目)	14080	106376	4342	6321	8832
K5646 (23 日目)	109285	160403	33361	15881	76212
K5647 (0 日目)	814	917	799	2295	1445
K5647 (12 日目)	2620	95130	1100	19920	3606
K5647 (16 日目)	159796	61639	19774	88453	339050
K5647 (20)	187997	63193	62381	99227	623586
K5648 (0 日目)	572	848	737	2113	1467
K5648 (10 日目)	803	1003	871	2562	1512
K5648 (14 日目)	2575	122993	972	4324	2733
K5648 (18 日目)	10107	181988	4401	21689	10892
K5648 (22 日目)	58656	352195	7844	16692	48125

【 0 0 9 9 】

実施例 5

非対称二重抗原サンドイッチフォーマットにおけるオリゴマー型シャペロンキャリアータンパク質の組み合わせ

イムノアッセイを、本質的に実施例 4 に記載したように実施した。オリゴマー型シャペロン、たとえば F k p A および S k p は、それらの各クライアント抗原の機能的オリゴマー化を達成するための融合パートナーとして有利に使用できる。ターゲットタンパク質（すなわち、それらのクライアント抗原またはゲスト抗原）への F k p A または S k p の融合により、イムノアッセイにおいて I g M 分子を検出するのに適切な明確に規定されたオリゴマー型融合ポリペプチドを得ることができる。ここでは、本発明者らは、D A G S（二重抗原サンドイッチ）フォーマットに用いる場合、S k p - X および F k p A - X 融合ポリペプチドの特定の好ましい組み合わせがあるかどうかという疑問に対処した（注釈：“X” は一般にいずれかのターゲットタンパク質または抗原を表わす）。言い換えると、本発明者らは F k p A - X 融合ポリペプチドを（信号発生）ルテニウム側よりもむしろ（捕捉）ビオチン側に用いるのが得策であるかどうかという疑問に対処した。逆に、本発明者らは S k p - X 融合ポリペプチドを（捕捉）ビオチン側よりもむしろ（信号発生）ルテニ

10

20

30

40

50

ウム側に用いるのが得策であるかどうかという疑問をもっていた。

【 0 1 0 0 】

第1実験では、精製した組換え E c S k p および E c F k p A のビオチンおよびルテニウムコンジュゲートを実施例3に記載したように作製した。すなわち、精製したシャペロン（すなわち、融合したターゲット配列をいずれも含まない裸のシャペロン）を N - ヒドロキシ - スクシンイミド - 活性化ビオチン標識によりビオチニル化した。同様に、ルテニウム化シャペロン（すなわち、融合したターゲット配列をいずれも含まない裸のシャペロン）を N - ヒドロキシ - スクシンイミド - 活性化ルテニウム標識により作製した。

【 0 1 0 1 】

次いで、E c S k p をビオチン側とルテニウム側の両方に種々の濃度で用いて対称 D A G S を実施した。試料として、抗 H T L V 陰性ヒト血清のプールを用い、測定を二重に行なった。表3のデータから、全く同じオリゴマー型シャペロン（ここでは：E c S k p ）を D A G S フォーマットのビオチン側とルテニウム側の両方に用いた場合、きわめて低い濃度ですらバックグラウンド信号がかなり高いことが明らかである。バックグラウンド信号はコンジュゲート濃度に伴って用量依存性様式で著しく増大する。よって、オリゴマー型融合パートナー、たとえば大腸菌由来のトリマー形シャペロン S k p を用いる場合、対称 D A G S フォーマットは実行可能な選択肢とは思われない。類似の結果がダイマー型シャペロン F k p A についても見られた。

【 0 1 0 2 】

表3：D A G S イムノアッセイの両側に全く同じオリゴマー型シャペロンを使用（対称 D A G S フォーマットにおけるオリゴマー型キャリアータンパク質）

【 0 1 0 3 】

【表3】

実験	V1	V2	V3	V4	V5	V6
R1 ベースの緩衝液	R1					
Skp-Bi 濃度 [ng/ml]	10	20	50	100	250	500
R2 ベースの緩衝液	R2					
Skp-Ru 濃度 [ng/ml]	10	20	50	100	250	500
試料	信号 (カウント)	信号 (カウント)	信号 (カウント)	信号 (カウント)	信号 (カウント)	信号 (カウント)
対照 1 (抗 HTLV-陰性ヒト血清のプール)	3969	6301	12582	17521	21471	21498
	3921	6170	13187	17610	21467	22056

【 0 1 0 4 】

しかし、E c S k p および E c F k p A を非対称 D A G S フォーマットに組み合わせた場合、状況は全く異なった（下記の表4を参照）。捕捉側と信号発生側に異なるシャペロンを用いた場合、シャペロンの組み合わせとは関係なくバックグラウンド信号が実質的に低減した。たとえば、対称（すなわち、S k p - B i / S k p - R u ）D A G S フォーマットにおけるバックグラウンド信号は、それぞれ 2 5 0 n g / m l のコンジュゲート濃度で約 2 1 , 0 0 0 カウントであった。全く同じコンジュゲート濃度で、非対称 D A G S フォーマットにおけるバックグラウンド信号は、それぞれ 2 , 7 0 0 カウント（S k p - B i / F k p A - R u ）および 8 6 0 カウント（F k p A - B i / S k p - R u ）に劇的に低減する。D A G S イムノアッセイにおいて実際に F k p A と S k p の好ましい組み合わせがあることは一見して自明である：D A G S イムノアッセイにおいて、F k p A をビオチンコンジュゲートとして、また S k p をルテニウムコンジュゲートとして用いるのが得策であり、F k p A - X および S k p - X 融合ポリペプチドについて同じことが当てはまると結論するのが妥当である。

【 0 1 0 5 】

表 4 : D A G S イムノアッセイの両側に異なるオリゴマー型シャペロンを使用 (非対称 D A G S フォーマットにおけるオリゴマー型キャリアータンパク質)

【 0 1 0 6 】

【表 4】

バリエーション	V1	V2	V3	V4
R1 ベースの緩衝液	R1			
R1	Skp-Bi	Skp-Bi	FkpA-Bi	FkpA-Bi
濃度, [ng/ml]	10	250	10	250
R2 ベースの緩衝液	R2			
R2	FkpA-Ru	FkpA-Ru	Skp-Ru	Skp-Ru
濃度, [ng/ml]	10	250	10	250
試料	信号 (カウント)	信号 (カウント)	信号 (カウント)	信号 (カウント)
対照 1 (抗 HTLV-陰性ヒト血清のプール)	567	2668	447	854
	561	2764	439	864

10

【 0 1 0 7 】

実施例 6

C D 検出した S k p - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0) および F k p A - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0) の熱誘導アンフォールディング

近 UV C D スペクトルをサーモスタット付きセルホルダーを備えた J a s c o - 7 2 0 分光偏光計で記録し、平均残基楕円率 (mean residue ellipticity) に換算した。緩衝液は 1 5 0 m M リン酸カリウム p H 8 . 0、1 0 0 m M K C l、0 . 5 m M E D T A であった。光路長は 0 . 2 c m、タンパク質濃度は 2 1 8 μ (S k p - p 2 4 モノマーについて) または 1 4 7 . 5 μ (F k p A - p 2 4 モノマーについて) であった。測定範囲は 2 5 0 ~ 3 3 0 n m であり、バンド幅は 1 . 0 n m であり、0 . 5 n m の解像度でスキャン速度は 2 0 n m / 分であり、応答は 1 秒であった。信号 - 対 - ノイズ比を改善するために、スペクトルを 9 回測定して平均した。

30

【 0 1 0 8 】

円偏光二色性分光分析 (C D) は、タンパク質の二次構造と三次構造の両方を査定するために好まれる方法である。芳香族領域 (2 5 0 ~ 3 3 0 n m) の楕円率はタンパク質 (すなわち、球形構造の規則的にフォールディングしたタンパク質) 内の三次接点をレポートし、天然様フォールド (コンホメーション) のフィンガープリント領域とみなされる。

【 0 1 0 9 】

精製プロセスの必須工程であるマトリックス - カップリングしたリフォールディング操作後に融合タンパク質が規則的コンホメーションをとるかどうかわかるという疑問に対処するために、S k p - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0) および F k p A - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0)、それぞれ S E Q I D N O . 2 2 および 2 1 の近 UV C D スペクトルをモニターした。答えはきわめて明快である : S k p - p 2 4 / C T D (図 1 を参照) および F k p A - p 2 4 / C T D (図 3 を参照) 両方の近 UV C D 信号は、それぞれの融合ポリペプチドの規則的三次構造を明確にレポートしている。明らかに、S k p - p 2 4 / C T D および F k p A - p 2 4 / C T D の芳香族残基は親油性タンパク質コアに埋め込まれており、よって非対称環境をもち、それはそれぞれの融合構築体内のキャリアーおよびターゲットタンパク質成分の天然様コンホメーションを強く指摘する。S k p - p 2 4 / C T D の近 UV C D スペクトルは、2 8 2 および 2 7 7 n m に最大をもつ陰性信号を示す (図 1)。F k p A - p 2 4 / C T D の近 UV C D スペクトルは、2 8 0 n m に最大をもつ陽性信号を示す (図 3)。

40

50

【 0 1 1 0 】

S k p - p 2 4 / C T D および F k p A - p 2 4 / C T D の熱誘導アンフォールディングが可逆的であるかどうかという疑問に対処するために、それぞれ 2 7 7 および 2 8 0 n m の波長の近 U V 領域で融解曲線をモニターした。温度範囲は 2 0 ~ 7 5 であり、バンド幅は 2 . 0 n m であり、温度勾配は 1 / 分であり、応答は 2 秒であった。

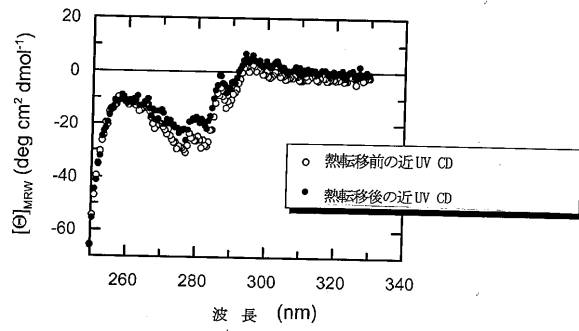
【 0 1 1 1 】

熱誘導アンフォールディングを 2 7 7 および 2 8 0 n m でモニターした；これらは、それぞれ S k p - p 2 4 / C T D および F k p A - p 2 4 / C T D についての最大信号振幅に対応する。加熱すると、融合ポリペプチド分子の天然コンホメーションを安定化する非共有結合接点がルーズになり、最終的に破断する。S k p - p 2 4 / C T D について、この熱誘導アンフォールディング (2 7 7 n m でモニターしたもの) は、図 2 に示すように C D 信号の増強に反映される。S k p - p 2 4 / C T D は、5 5 まで明らかにその天然様フォールドおよびトリマー型構造を保持する。アンフォールディングの開始は 5 5 ~ 6 0 である。図 2 の融解曲線により判定されるように、7 0 で分子は完全にアンフォールディングする。驚くべきことに、タンパク質溶液を 2 0 まで冷却すると C D 信号が復活する (図 1 、 2) 。しかし、リフォールディング曲線のヒステリシスが顕著であり、これはおそらくアンフォールディングとリフォールディングの異なる経路を指摘する。S k p - p 2 4 / C T D のような複雑なトリマー型融合タンパク質の熱誘導アンフォールディングが - 少なくとも部分的には - 可逆のプロセスであることは驚くべきである。7 5 のような高い温度では、S k p - p 2 4 / C T D は熱誘導アンフォールディングおよびモノマーサブユニットへの解離後にきわめて急速かつ定量的に凝集すると予想されであろう。しかし本発明者らは、タンパク質溶液を 2 0 に冷却すると S k p - p 2 4 / C T D が明らかにその天然様コンホメーションを再びとることができるのを見出している。実際に、熱誘導アンフォールディングの前と後にモニターした近 U V C D スペクトルは実質的に重なる (図 1 を参照) 。結論として、S k p - p 2 4 / C T D は強靱なフォールディング特性をもち、それはこの複雑度をもつ分子としては傑出しており、イムノアッセイに用いる抗原にとってきわめて望ましいものである。F k p A - p 2 4 / C T D についてもきわめて類似する結果が見られた：S k p - p 2 4 / C T D と全く同様に、F k p A - p 2 4 / C T D は近 U V 領域に顕著な C D 信号を示し (2 5 0 ~ 3 3 0 n m , 最大信号は 2 8 0 n m に) 、これはマトリックス - カップリングしたリフォールディングプロセス後の十分に規則的なコンホメーションを指摘する (図 3) 。分子がアンフォールディングしてその三次構造を失うと、F k p A - p 2 4 / C T D の C D 信号は著しく低減する (図 4) 。熱転移により、本発明者らは F k p A - p 2 4 / C T D が 5 5 まで実際にその天然様コンホメーションを保持するのを観察した。アンフォールディングの開始 - 2 8 0 n m における近 U V C D 分光分析によりモニターしたもの - は約 6 0 であり、7 0 で F k p A - p 2 4 / C T D は完全にアンフォールディングする。熱的アンフォールディング / リフォールディングサイクル後に天然 F k p A - p 2 4 / C T D 分子の C D 信号が完全に復活するのは驚くべきことである (図 4) 。図 3 に示すように、アンフォールディング / リフォールディングサイクルの前と後の F k p A - p 2 4 / C T D の C D スペクトルはほぼ完全に重なる。

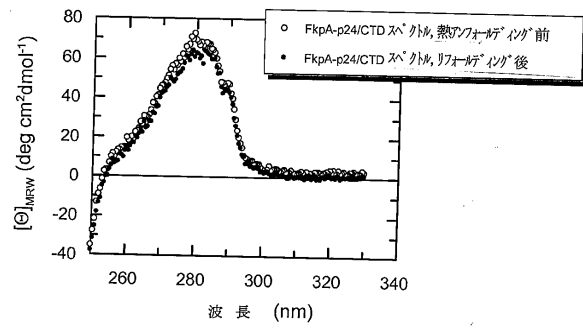
【 0 1 1 2 】

結論として、S k p - p 2 4 / C T D および F k p A - p 2 4 / C T D はきわめて強靱なフォールディング特性をもち、それはこの複雑度をもつ分子としては傑出しており、イムノアッセイにおいて抗原成分、すなわち指示子として用いるためにきわめて望ましいものである。

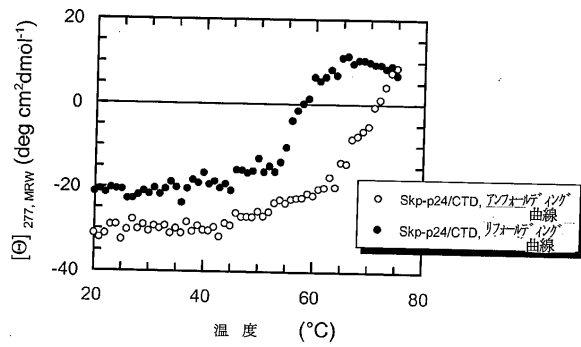
【図 1】



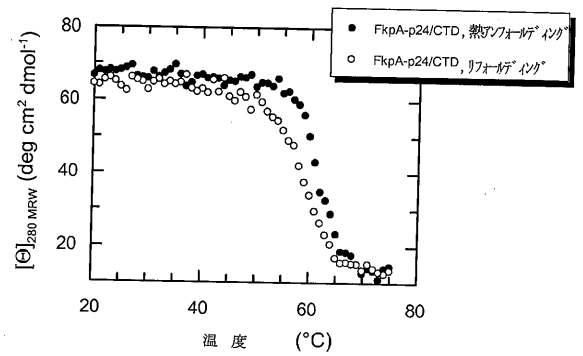
【図 3】



【図 2】



【図 4】



【配列表】

0006491228000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	14/245 (2006.01)	C 0 7 K	14/245
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/48 (2006.01)	C 1 2 N	15/48
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31

(72)発明者 ファーツ, エルケ
 ドイツ国 8 2 3 8 6 フーグルフィンゲ, シュタインクロイツ 1

(72)発明者 ショルツ, クリスティアン
 ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ジンデルスドルファー・シュトラッセ 3 5 アー

(72)発明者 ムエンフ, ペーター
 ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ボーンホルツヴェーク 6

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 国際公開第01/010457(WO, A1)
 国際公開第96/039630(WO, A1)
 特表平05-508838(JP, A)
 特開2000-078973(JP, A)
 特開2008-263983(JP, A)
 KUGA T. et al., Japanese Journal of Cancer Research, Vol.79, No.11(1988), p.1168-1173

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K	1 9 / 0 0
C 1 2 P	2 1 / 0 2
G 0 1 N	3 3 / 5 4 3
G 0 1 N	3 3 / 5 6 9
C 0 7 K	1 4 / 1 5
C 0 7 K	1 4 / 2 4 5
C 1 2 N	1 5 / 3 1
C 1 2 N	1 5 / 4 8
C 1 2 N	1 5 / 6 2

Pub Med
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / R E G I S T R Y
 (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q