

(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 1
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00
C 12 P 21/02 (2006.01)	C 12 P 21/02
G 01 N 33/569 (2006.01)	G 01 N 33/569
G 01 N 33/543 (2006.01)	G 01 N 33/543
C 07 K 14/15 (2006.01)	C 07 K 14/15

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)	(73) 特許権者	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCHE E AKTIENGESELLSCHAFT T スイス・シーエイチ-4070バーゼル・ グレンツアーヘルストラツセ124
(86) (22) 出願日	平成27年2月26日(2015.2.26)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(65) 公表番号	特表2017-512200 (P2017-512200A)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(43) 公表日	平成29年5月18日(2017.5.18)	(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/053966	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(87) 國際公開番号	W02015/128394		最終頁に続く
(87) 國際公開日	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	歐州特許庁(EP)		

(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アント

(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できるのに十分な期間、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できるのに十分な期間、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】

【0 0 0 1】

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アントに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

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症性不全対麻痺に至る重篤な脱髓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-I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/I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。ウインドウ期間、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アントおよび組換えバリアント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に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ィラ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バリアントを設計しようとしていた。

【先行技術文献】

10

20

30

40

50

【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-Pro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 QFMQTIIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLCSS LVASLHHQQL
DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAAFAALP GSAKDPWSAS
ILQGLEEPYH AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRSLAYS 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よく注目されたい；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

H T L V - I p 2 4 のアミノ酸残基 2 6 1 - 3 4 4 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
TNSPLGDMLR 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 H T L V - I p 2 4 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 n o . 1 9 3 、 3 1 1 および 3 3 2) 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
ILQGLEE PYH AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRSLAYS NANKEXQKLL QARGHTNSPL
GDMRLRAXQTW TPKDKTKVL

【0019】

30

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

S w i s s P r o t データベース ID P 0 3 3 5 3 から検索した H T L V - I I p 2 4 の配列 (ヒト T 細胞白血病ウイルス 2 由来の 1 5 2 - 3 3 5 0 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 - 1 3 6 の配列はマトリックスタンパク質 p 1 9 を表わす)。アミノ酸 1 3 7 - 1 5 1 (プロリンリッチ配列) からの N 末端 1 5 アミノ酸残基は除かれていることを留意されたい。

【0020】

【化5】

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLCSS LVVSLHHQQL
NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAAFSTLP GNTRDPSWAA
ILQGLEE PYC 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

H T L V - I I p 2 4 のアミノ酸 1 5 2 - 2 6 6 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 LWLAADFSTLP GNTRD

【 0 0 2 3 】

SEQ ID NO. 7 : p24 CTD (267-350)/HTLV-11, 84 アミノ酸残基

H T L V - I I p 2 4 のアミノ酸 2 6 7 - 3 5 0 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 S E Q I D N O . 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 LVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSNANKE XQKILQARGH
 TNSPLGEMLR TXQAWTPKDK TKVL .

【 0 0 2 5 】

SEQ ID NO. 8 : p24(152-350)/HTLV-11, 199 アミノ酸残基

長さおよび位置に関して S E Q I D N O . 5 と同様な H T L V - I p 2 4 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 n o . 1 9 9、2 8 1、3 1 7 および 3 3 8) がアラニンまたはセリンで置き換えられ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 LWLAADFSTLP GNTRDPSWAA
 ILQGLEEPYX AFVERLVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAGS NANKEXQKIL QARGHTNSPL
 GEMLRTXQAW TPKDKTKVL

30

【 0 0 2 7 】

下記のアミノ酸配列 (S E Q I D N O . 9 ~ 1 6 および 1 8 ~ 2 4) は、実施例のセクションで用いる H T L V - I または H T L V - I I p 2 4 (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 E c S l y D、E c F k p A および E c S k p についての 2 文字 E c 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 PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVD
GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GGSGGGSGGG
SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAAPLD YLHGHSGLIS GLETALEGHE
VGDKFDFAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKD V FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEEELAHGHVH GAHDHHHDHD HDGGGSGGGS
GGGSGGGSGGG GSQQQMKDL QAIKQEVSQA APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
YLAASSLVASL HHQQQLDSLIS EAETRGITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQQGLR REYQQLWLAA
FAALPGSAKD PSWASILQGL EEPYHAFVER LNIALDNGLP EGTPKDPILR SLAYSNANKE
AQKLLQARGH TNSPLGDMLR AAQTWTPKDK TKVLLEHHHH HH

10

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

MAEAAKPATT ADSKAASFKN DQKSAYALGA SLGRYMEMSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ

【0029】

【化9-2】

DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGGGGGGG GSQAAAPGSPQ FMQTIRLAVQ
 QFDPTAKDILQ DLLQYIASSL VASLHHQQLD SLISEAETRG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
 QGLRREYQQL WLAAFAALPG SAKDPSWASI LQGLEEPYHA FVERLNIALD NGLPEGTPKD
 PILRSIAYSN ANKEAQKLLQ ARGHTNSPLG DMLRAAQTWT PKDKTKVLE HHHHHH

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

10

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALLE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KPNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSQGGGGGG
 SGGGGGGGVK AKDLVVSAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EELAHGHVH GAHDHHHDHD HDGGGGGGGS
 GGGGGGGGG GSQGGAKDPS WASILQGLEE PYHAFVERLN IALDNGLPEG TPKDPIRLSL
 AYSNANKEAQ KLLQARGHTN SPLGDMRAA QTWTPDKTK VLEHHHHHH

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

20

MAEAAKPATT ADSKAQFKND DQKSAYALGA SLGRYMEISL KEQEKGKIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGGGGGGG GSQGGGGGG GSQGGAKDPS WASILQGLEE ERLNIALDNG
 LPEGTPKDPI LRSIAYSNAN KEAQKLLQAR GHTNSPLGDM LRAAQTWT PKDKTKVLEHHH

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

30

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNTLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMQ QRQTEFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVVA
 NAVAYNSSDV KDTADVLKQ VKGGGGGGGS GGGGGGGGG GSQGGAKDPS WASILQGLEE
 PYHAFVERLN IALDNGLPEG TPKDPIRLSL AYSNANKEAQ KLLQARGHTN SPLGDMRAA
 QTWTPDKTK VLEHHHHHH

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

40

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALLE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KPNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSQGGGGGG
 SGGGGGGGVK AKDLVVSAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EELAHGHVH GAHDHHHDHD HDGGGGGGGS
 GGGGGGGGG GSQGGQMKDL QAIKQEVSQA APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQQGLR REYQQLWLAA
 FAALPGSAKD LEHHHHHH

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

MAEAAKPATT ADSKAQFKND DQKSAYALGA SLGRYMEISL KEQEKGKIKL DKDQLIAGVQ

【0030】

【化9-3】

DAFADSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKGGGS GGGSGGGSGG GSAGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSQAAPGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYIASSL VASLHHQQLD SLISEAETRG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
 QGLRREYQQL WLAFAALPG SAKDLEHHHH HH

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

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IOTAVKSVAN SQDIDLVVD
 NAVAYNSSDV KDIRADVLQ VKGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSAGGGQMKDL QAIKQEVSQA
 APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY
 NPLAGPLRVQ ANNPQQQLR REYQQLWLAA FAALPGSAKD LEHHHHHH

10

【0031】

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）

【0032】

【化10-1】

GGGSGGGSGG GSAGGGSGGG GGG

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

20

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVLQRPV KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSAGGGSGGG
 SGGGSGGGKV AKDLVVLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDYQGYDE NILVQRVPKD FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVVTGNNH MLAGQNLKFN VEVVATREAT EELAHGHV GAHDHHHDHD HDGGGSGGG
 GGGSGGGSGG GSAGGGQMKDL QAIKQEVSAA ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVVSL HHQQLNLTIT EAETRGMTGY NPMAGPLRMQ ANNPAAQQLR REYQNLWLAA
 FSTLPGNTRD PSWAAILQGL EEPYAAFVER LNVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSNANKE
 AQKILQARGH TNSPLGEMLR TAQAWTPKDK TKVLLEHHHH HH

30

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

MAEAAKPATT ADSKAASKND DQKSAYALGA SLGRYMEMSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKGGGS GGGSGGGSGG GSAGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYIASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAFASTLPG NTRDPSWAAI LQGLEEYAA FVERLNUALD NGLPEGTPKE
 PILRSLAYSN ANKEAQKILQ ARGHTNSPLG EMLRTAQAWT PKDKTKVLE HHHHHH

40

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

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IOTAVKSVAN SQDIDLVVD
 NAVAYNSSDV KDIRADVLQ VKGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSAGGGQMKDL QAIKQEVSAA
 ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVVSL HHQQLNLTIT EAETRGMTGY
 NPMAGPLRMQ ANNPAAQQLR REYQNLWLAA FSTLPGNTRD PSWAAILQGL EEPYAAFVER
 LNVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSNANKE AQKILQARGH TNSPLGEMLR TAQAWTPKDK
 TKVLLEHHHH HH

【0033】

【化10-2】

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

MAEAAKPATT ADSKAASKND DQKSAYALGA SLGRYMEMSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGP SWAAILQGLE EPYAAFVERL NVALDNLPE
 GTPKEPILRS LAYSNANKEA QKILQARGHT NSPLGEMLRT AQAWTPKDKT KVLEHHHHH
 H

10

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

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNTELENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMQ QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVVD
 NAVAYNSSDV KDIRADVLKQ VKGGGGSGGG GGGSGGGSGG GSGGGPSWAA ILQGLEEPYA
 AFVERLNVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAYS NANKEAQKIL QARGHTNSPL GEMLRTAQAW
 TPKDKTKVLL EHHHHHH

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

MAEAAKPATT ADSKAASKND DQKSAYALGA SLGRYMEMSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAASFSTLPG NTRDLEHHHH HH

20

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

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNTELENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMQ QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVVD
 NAVAYNSSDV KDIRADVLKQ VKGGGGSGGG GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVS
 ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLTVVSL HHQQLNTLIT EAETRGMTGY
 NPMAGPLRMQ ANNPAQQGLR REYQNLWLAA FSTLPGNTRD LEHHHHHH

30

【0034】

SEP ID NP. 25 : gp21/HTLV-I (339-446) // P14075, 108 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g
 p21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
 Caribbe an 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よく注目されたい;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よいことを意味する(X=C、AまたはS)。

40

【0035】

【化11】

SLASGKSLHH EVDKDISQLT QAIVKNHKNL LKIAQYAAQN RRGLDLLFWE QGGLXKALQE
QXXFLNITNS HVSILQERPP LENRVLTGWG LNWDLGLSQW AREALQTG

【0036】

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。

【0037】

【化12】

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

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMRFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GGSGGGSGGG
 SGGGSGGGSL ASGKSLLHEV DKDISQLTQA JVKNHKNLLK IAQYAAQNRR GLDLLFWEQG
 GLAKALQEQA AFLNITNSHV SILQERPLE NRVLTGWGLN WDLGLSQWAR EALQTGLEHH
 HHHH

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

10

SESVQNSA VLVHFTLKD DGTIAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
 TTFSLEPDAA FGVPSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIJAIALM FTAMDGSEMP GVIREINGDS
 ITVDFNHPPLA GQTVHF DIEV LEIDPALEGG GS GGGSGGGGS GGGSGGGSGGG GSLASGKSLL
 HEVDKDISQL TQAIVKHNKN LLKIAQYAAQ NRRGLDLLFW EQGGLAKALQ EQAAFLNITN
 SHVSILQERP PLENRVLTGW GLNWDLGLSQ 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)、SEQ ID NO. 2 2 の近UV CDスペクトルを示す。

20

【図2】図2は、S k p - p 2 4 / C T D (SEQ ID NO. 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277 nmでモニターしている。

【図3】図3は、F k p A - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0) , SEQ ID NO. 2 1 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ピト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、天然様コンホー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】

10 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。

【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EcS1yD-EcS1yD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Sckp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EcSckp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バリエントを単純にそのまま適用するのと同様に除外された。

【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立体制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）。

【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構造を解明している。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できか、また、可溶性かつ抗原

10

20

30

40

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N M R 解明されたH T L V 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（N T D）にあるのかまたはC 末端ドメイン（C T D）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S 1 y D、F k p A およびS k p と融合する単離H T L V p 2 4 ドメインN T D およびC T D を発現させることができた。実施例のセクションに見るように、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H T L V 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、C ドメイン（C T D）の方がさらにわずかに高かった。印象深いことに、N T D は、C T D 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。C T D 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。C T D 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C T D がN T D 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 C T D およびN T D をウサギ抗H T L V セロコンバージョン血清（ヒトH T L V 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 バリアントをD A G S 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 バリアントを用いるよりオリゴマー型p 2 4 バリアント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、H T L V - I およびH T L V - I I 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S 1 y D、F k p A またはS k p に融合させた場合、p 2 4 C T D は可溶性で安定な状態を維持し、H T L V 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I g M 分子の検出に好適である。したがって、特にp 2 4 C T D のオリゴマー型F k p A およびS k p 融合バリアントはH T L V - 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、H T L V 由来のキャプシドタンパク質p 2 4 のバリアントを開発した。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 バリアントはH T L V 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）（I M A C）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H T L V 抗体を検出するのに使用できるからである（おそらく、g p 2 1 の外部ドメイン（ectodomain）、H T L V 由来の他の免疫優性（immunodominant）タンパク質との組合せ）。たとえば、F k p A - p 2 4 / C T D およびS k p - p 2 4 / C T D 融合タンパク質が、I g M 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、I g G およびI g M の検出）のためのイムノ

10

20

20

30

40

50

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 バリアント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。

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

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。

30

【0054】

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 D T 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。

【0055】

用語 H T L V p 2 4 抗原にはバリアントも含まれる。H T L V p 2 4 バリアントは、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。これに関する用語“バリアント”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、バリアントは、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“バリアント”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、バリアントは、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HTLV p24抗体をそのバリアントがなお結合および検出できる限り、HTLV p24抗原バリアントと分類される。“バリアント”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ヤー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HTLV p24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、HTLV p24に対して特異的な抗体、たとえば抗p24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。

10

【0057】

本発明によるHTLV p24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、HTLV p24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。

20

【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FKBPファミリーのシャペロンをHTLV p24抗原バリアント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FKBPシャペロンの例は、FkpA、SlyDおよびS1pAである。HTLV p24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、FKBPファミリーに属さないSkp、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）。

30

【0059】

本発明のさらなる態様によれば、FKBPシャペロン、たとえば大腸菌SlyD、S1pAまたはFkpA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、HTLV p24抗原の発現のための融合部分として用いる。シャペロンSkpも融合パートナーとして使用できる。2つのFKBP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HTLV p24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。

40

【0060】

好ましくは、本発明によるHTLV p24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FkpAおよびSkpである。

【0061】

特に好ましいものは、SEQ ID NO. 9～16および18～24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HTLV p24抗原である。

本発明によるHTLV p24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HTLV p24抗原およびそ

50

のバリエント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合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、目的とする組合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、S1yDおよびS1pA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S1p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產生される。

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S1p、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S1yD、FKpAおよびS1pA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HTLV抗原またはHTLV抗原組成物に対する抗体が、そのHTLV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IgGおよびIgMサブクラスのHTLV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HTLV p24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HTLV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HTLV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HTLV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) (DAGS) 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(IgG、IgE)、4(IgA)または10(IgM)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HTLV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HTLV抗体を含有する試料を、2つの異なるHTLV p24抗原、すなわち第1の（“固相”）HTLV p24抗原および第2のHTLV p24（“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HTLV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HTLV p24抗原に対する抗HTLV抗体がそれらのHTLV p24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DAGS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HTLV p24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HTLV p24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HTLV p24に融合したS1yD、および検出側のHTLV p24に融合したFkpa）；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DAGSイムノアッセイに非対称フォーマットを適用し、Fkpaに

10

20

30

40

50

融合したHTLV-p24とSKpに融合したHTLV-p24抗原を組み合わせる。より好ましくは、FkpAに融合したHTLV-p24を固相側に用い、かつSKpに融合したHTLV-p24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SKpに融合したHTLV-p24抗原を固相側に、かつFkpAに融合したHTLV-p24を検出側に用いることもできる。最も好ましくは、HTLV-p24-FkpA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、HTLV-p24-Skp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、p24-Skp融合タンパク質がビオチンを保有し、p24-FkpAがその標識を保有する。

【0073】

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HTLV-p24抗原および本発明による第2のHTLV-p24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。

【0074】

本発明はさらに、抗HTLV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HTLV-p24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HTLV抗体に特異的に結合するのに適した本発明によるHTLV-p24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、HTLVに対する抗体の検出のための試薬キットである。

20

【0075】

特に、試薬キットはSEQ-ID NO.9～16および18～24のいずれかによるHTLV-p24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。

【0076】

他の態様は、本発明による可溶性HTLV-p24抗原、およびHTLVエンベロープ抗原、好ましくはSEQ-ID NO.25を含むgp21を含有する、HTLV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、p24およびgp21のフラグメントを单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

【0077】

HTLV-p24のC末端ドメインを含む組成物が好ましく、SEQ-ID NO.3によるHTLV-I-p24抗原(SEQ-ID NO.2を欠如する)および/またはSEQ-ID NO.7によるHTLV-II-p24抗原(SEQ-ID NO.6を欠如する)ならびにHTLV-gp21を含む組成物が特に好ましい。たとえば、その組成物には、SEQ-ID NO.25、26または27のいずれかを含むHTLV-gp21配列が存在できる。DAGS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HTLV抗体と適用したHTLV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HTLV抗原を含む。

40

【0078】

本発明はまた、抗HTLV抗体のin vitro診断検査における本発明によるHTLV-p24抗原の使用に関する。

【実施例】

【0079】

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
発現力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 pET24a 発現プラスミドをベースにして、HTLV-I および HTLV-II に由来する p24 融合タンパク質をコードする発現力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)。HTLV-I および HTLV-II に由来する p24 抗原の配列を SwissProt データベース (それぞれ、SwissProt ID P10274 および P03353) 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ーム融合した HTLV-I (成熟キャプシドタンパク質の N 末端プロリンリッチ 15 アミノ酸を欠如する) 由来の p24 キャプシド抗原アミノ酸 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) 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、p24 の位置 193、311 および 332 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、p24 - 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 Ecs1yD ユニット (SwissProt 寄託 no. P0A9K9 の残基 1-165) 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 Ecs1yD - Ecs1yD と p24 抗原部分の簡単なライゲーションによるインフレー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力セットの遺伝子安定性を高めるために、Ecs1yD ユニッ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せを用いた。

【0080】

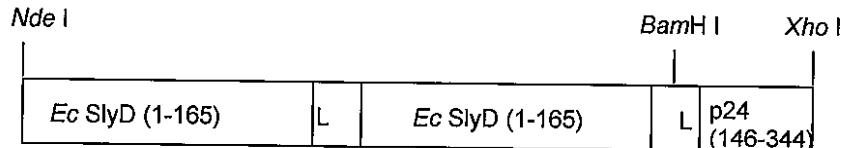
pET24a ベクターを NdeI および XhoI で消化し、HTLV-I p24 (146-344) にインフレーム融合した縦列 S1yD を含むカセットを挿入した。パストレラ・ムルトシダ (Pasteurella multocida) S1yD (1-156, SwissProt ID Q9CKP2)、大腸菌 Skp (21-161, SwissProt ID P0AEU7) または大腸菌 FkpA (26-270, SwissProt ID P45523) を含む発現カセットをそれに応じて構築し、HTLV-II (SwissProt ID P03353) 由来の p24 および p24 フラグメントを含む発現カセットも構築した。HTLV-I 由来の p24 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、HTLV-I 由来の p24 の位置 199、281、317 および 338 (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。Nt-Nta - 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アントが 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アントまたは制限部位をそれぞれの発現カセットに作製した。

【0081】

下記の図は、その N 末端にインフレーム融合した 2 つの S1yD シャペロンユニットを保有する N 末端トランケート型 HTLV-I p24 抗原 146-344 のスキームを示す。大腸菌起源の S1yD 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 Ecs1yD - Ecs1yD - p24 (146-344) と命名された。

【0082】

【化13】



L = (GGGS)₅GGG-リンクー

【0083】

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。リンカーリン酸配列をSEQ ID NO. 17に示す。

10

【0084】

HTLV-IおよびHTLV-IIに由来するp24およびp24バリエント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ント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した大腸菌BL21(DE3)細胞を、37度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、1mMのイソプロピル-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(5000g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50mMリン酸ナトリウムpH8.0、7.0M GdmC1、5mM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5.0mM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、5mMから15mMに及ぶイミダゾール(50mMリン酸ナトリウムpH8.0、7.0M GdmC1、5.0mM 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、GdmC1溶液を5.0mMリン酸カリウムpH8.0、100mM KC1、10mMイミダゾール、5.0mM 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50mMリン酸カリウムpH8.0、100mM KC1、10mM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-まだ50mMリン酸カリウムpH8.0、100mM KC1中にある-を20～80mM(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500mM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10～20mg/mlに濃縮した。

20

【0085】

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

30

【0086】

実施例2

40

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_{280}) を表1に明示する。

【0087】

表1: この試験で作製および使用したp24融合ポリペプチドバリアント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

【0088】

【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 バリアント					
HTLV-I					
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24</i>	146-344	61762	5.0	35870	0.581
<i>EcFkpA-p24</i>	146-344	50840	6.8	39880	0.784
<i>EcSkp-p24</i>	146-344	40306	9.1	25440	0.631
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24/CTD</i>	258-344	49311	4.9	25900	0.525
<i>EcFkpA-p24/CTD</i>	258-344	38389	7.1	29910	0.779
<i>EcSkp-p24/CTD</i>	258-344	27855	9.3	15470	0.555
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24/NTD</i>	146-260	52486	4.8	21890	0.417
<i>EcFkpA-p24/NTD</i>	146-260	41565	6.5	25900	0.623
<i>EcSkp-p24/NTD</i>	146-260	31031	9.0	11460	0.369
p24 variants					
HTLV-II					
<i>EcSlyD-EcSlyD-p24</i>	152-350	61868	5.0	35870	0.580
<i>EcFkpA-p24</i>	152-350	50946	7.2	39880	0.783
<i>EcSkp-p24</i>	152-350	40412	9.2	25440	0.630
<i>EcFkpA-p24/CTD</i>	267-350	38120	7.1	29910	0.785
<i>EcSkp-p24/CTD</i>	267-350	27586	9.3	15470	0.561
<i>EcFkpA-p24/NTD</i>	152-266	41739	6.7	25900	0.621
<i>EcSkp-p24/CTD</i>	152-266	31205	9.2	11460	0.367

【0089】

これらの融合ポリペプチドバリアントのアミノ酸配列を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-N-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

10

20

30

40

50

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D M S O (s e c c o s o 1 v 品質, M e r c k , ドイツ)中に調製した。反応緩衝液中25%までのD M S O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filtrationカラム(S u p e r d e x 2 0 0 H i L o a d)に通すことにより、未反応の遊離標識を除去した。

【 0 0 9 0 】

実施例4

H T L V イムノアッセイにおける種々のp 2 4 キャプシド抗原バリアントの免疫反応性(すなわち、抗原性)

H T L V p 2 4 キャプシド抗原のポリペプチド融合バリアントの免疫反応性(抗原性)を、自動E l e c s y s (登録商標) 2 0 1 0 およびc o b a s e 4 1 1 分析計(R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H)で査定した。E l e c s y s (登録商標)はR o c h e 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。

【 0 0 9 1 】

E l e c s y s (登録商標) 2 0 1 0 およびc o b a s e 4 1 1 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)はストレプトアビシ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칭)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620 nmで光を発する。信号出力は相対光単位による。

【 0 0 9 2 】

組換えp 2 4 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(D A G S)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H T L V - I キャプシド抗原p 2 4 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p 2 4 抗体を検出した。

【 0 0 9 3 】

p 2 4 はH T L V の免疫優性抗原のひとつであり、p 2 4 の可溶性バリアント - 本出願において開示するもの - はH T L V 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E c S 1 y D - E c S 1 y D 、 E c F k p A およびE c S k p を、反応緩衝液中に抗干渉物質として大過剰(約10 μ g / m l)に供給した。

【 0 0 9 4 】

特に、H T L V - I 由来の3つのp 2 4 バリアント、すなわち全長p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4 , ナンパリングはG a g - P r o ポリタンパク質前駆体を参照する, S E Q I D N O . 1 より5を参照)、p 2 4 N 末端ドメイン(p 2 4 / N T D , 1 4 6 - 2 6 0)、およびp 2 4 C 末端ドメイン(p 2 4 / C T D , 2 6 1 - 3 4 4)をこの試験で調べた。抗p 2 4 I g G 分子を検出するために、E c S 1 y D - E c S 1 y D - p 2 4 - ビオチンおよびE c S 1 y D - E c S 1 y D - p 2 4 - ルテニウムを、それぞれR 1 (試薬緩衝液1)およびR 2 (試薬緩衝液2)中において用いた。抗p 2 4 I g M およびI g G の両分子を検出するために、E c F k p A - p 2 4 - ビオチンおよびE c S k p - p 2 4 - ルテニウムを、それぞれR 1 (試薬緩衝液1)およびR 2 (試薬緩衝液2)中において用いた。R 1 およびR 2 中の抗原コンジュゲートの濃度は、それぞれ100 ng / m l であった。N 末端トランケート型成熟p 2 4 (1 4 6 - 3 4 4)を、E c S 1 y D - E c S 1 y D 融合ポリペプチドとしてビオチン側に用い、E c F k p A 融合ポリペプチドをルテニウム側に用いた。

【 0 0 9 5 】

残念ながら、ヒトH T L V 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。H T L V 感染のごく初期における種々のp 2 4 バリアントの抗原特性を査定するために、本発明者らはセロコンバ

10

20

20

30

40

50

ーシ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HTLV-Iおよび-IIウイルス溶解物(Zeptomatrix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)。ヒトにおける真的HTLV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。

【0096】

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p24CTD(p24, 261-344)を抗HTLV-陰性ヒト血清について前記のDAGS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500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p24CTD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p24CTDについても当てはまる(縦列2): Fk pA-p24(261-344)-ビオチンおよびSkp-p24(261-344)-ルテニウムは、DAGS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1100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p24CTDはそれらが抗HTLV抗体(そして明らかにIgM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K5645を注意深く観察すると、モノマー型p24CTDは18日目にからうじて陽性(1558カウント)として検出され、これに対しオリゴマー型p24CTDは14日目に既に明らかに陽性(8232カウント)として現われ、18日目には50118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K5646、K5647およびK5648でみられる: オリゴマー型p24CTDバリエント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p24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146-260(ナンバリングはGag-Proポリタンパク質前駆体を参照する)を含むp24のN末端ドメイン(NTD)について類似する。CTDと同様に、オリゴマー型p24NTD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K5647およびK5648(表2、縦列3および4)で例示される。しかし、オリゴマー型NTD p24のバックグラウンド信号はCTD p24と比較した場合、有意に高い。さらに、p24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、p24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もち、それによりHTLV血清学のための魅力的な候補となる。早期IgM検出における感度の点で、それは明らかに全長p24(146-344、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p24(146-344)のSkp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つたため、p24全長バージョンのS1yD-S1yDおよびFk pA融合ポリペプチドに制限された。モノマー型S1yD-S1yD-p24(146-344)をDAGSフォーマットのビオチン側に用い、オリゴマー型Fk pA-p24(146-344)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p24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CTD

p24およびNTD p24は両方ともモノマー型全長バリエントより優れており、高感度の早期検出は主に使用するp24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p24配列全体を提供する必要はないと思われる。むしろ、HTLV感染の初期における高感度で信頼性のあるIgM分子検出を保証するためにはp24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、HTLV-I由来のp24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、HTLV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：p24キャプシド抗原のC-ドメインはおそらくp24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p24C-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、p24のN-ドメインもHTLV-I由来のp24バリエントについての結果を示す。HTLV-II由来の対応するp24バリエントについての結果を示す。HTLV-IおよびHTLV-IIに由来するp24のアミノ酸配列は84%の同一性および93%の相同意をもつので、これは本発明者の予想と一致する。HTLV-II由来のp24に対応する配列は、152-266(N-ドメイン, NTD), 267-350(C-ドメイン, CTD)および152-350(成熟全長p24)であった；SEQ ID NO. 5~8も参照。
10

【0097】

表2：HTLV感染初期におけるオリゴマー型p24バリエント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）
20

【0098】

【表2】

p24 バリアント (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
融合パートナー R2 (Ru)	SlyD-SlyD		Skp	SlyD-SlyD	Skp
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

【0099】

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ヤータンパク質の組合わせ

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FkpAおよびSkp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FkpAまたはSkpの融合により、イムノアッセイにおいてIgM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、DAGS（二重抗原サンドイッチ）フォーマットに用いる場合、Skp-XおよびFkpA-X融合ポリペプチドの特定の好ましい組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FkpA-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Skp-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。

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。

【0100】

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。

【0101】

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HTLV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な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。

【0102】

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ヤタンパク質）

【0103】

【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)	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

【0104】

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、シャペロンの組合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250ng/mlのコンジュゲート濃度で約21,000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2,700カウント（S k p - B i / F k p A - R u）および860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の好ましい組合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結論するのが妥当である。

10

20

30

40

50

【0105】

表4：DAGS 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DAGSフォーマットにおけるオリゴマー型キャリヤータンパク質）

【0106】

【表4】

バリエント	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)	567 561	2668 2764	447 439	854 864

【0107】

10

実施例6

C D 検出した Skp - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0) および F kp 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 CD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 Jasco - 720 分光偏光計で記録し、平均残基橋円率 (mean residue ellipticity) に換算した。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。光路長は 0.2 cm、タンパク質濃度は 218 μ (Skp - p 2 4 モノマーについて) または 147.5 μ (F kp A - p 2 4 モノマーについて) であった。測定範囲は 250 ~ 330 nm であり、バンド幅は 1.0 nm であり、0.5 nm の解像度でスキャン速度は 20 nm / 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。

20

【0108】

円偏光二色性分光分析 (CD) 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 (250 ~ 330 nm) の橋円率はタンパク質 (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。

【0109】

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という疑問に対処するために、Skp - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0) および F kp A - p 2 4 / C T D (2 6 7 - 3 5 0) 、それぞれ SEQ ID NO. 2 2 および 2 1 の近UV CDスペクトルをモニターした。答えはきわめて明快である： Skp - p 2 4 / C T D (図 1 を参照) および F kp A - p 2 4 / C T D (図 3 を参照) 両方の近UV CD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、 Skp - p 2 4 / C T D および F kp 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ヤ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。 Skp - p 2 4 / C T D の近UV CDスペクトルは、282 および 277 nm に最大をもつ陰性信号を示す (図 1) 。 F kp A - p 2 4 / C T D の近UV CDスペクトルは、280 nm に最大をもつ陽性信号を示す (図 3) 。

30

40

50

【0110】

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 277 および 280 nm の波長の近UV領域で融解曲線をモニターした。温度範囲は 20 ~ 75 であり、バンド幅は 2.0 nm であり、温度勾配は 1 / 分であり、応答は 2 秒であった。

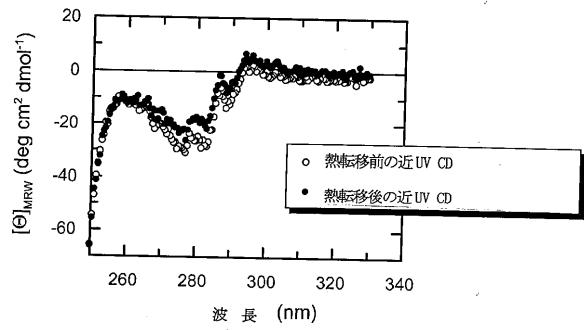
【0111】

熱誘導アンフォールディングを 277 および 280 nm 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 (277 nm でモニターしたもの) は、図 2 に示すように CD 信号の増強に反映される。S k p - p 2 4 / C T D は、55 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 55 ~ 60 である。図 2 の融解曲線により判定されるように、70 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 20 まで冷却すると CD 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 - 可逆的プロセスであることは驚くべきである。75 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たであろう。しかし本発明者らは、タンパク質溶液を 20 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である。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UV CD 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 は強靭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UV 領域に顕著な CD 信号を示し (250 ~ 330 nm, 最大信号は 280 nm 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 CD 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 55 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 - 280 nm における近UV CD 分光分析によりモニターしたもの - は約 60 であり、70 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 CD 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 CD スペクトルはほぼ完全に重なる。

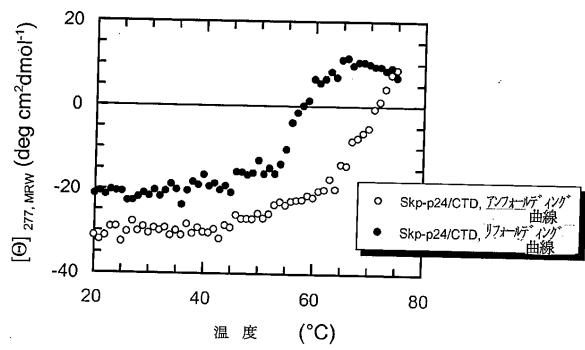
【0112】

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 はきわめて強靭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。

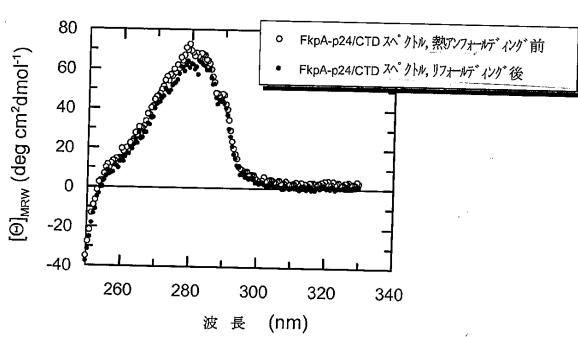
【図1】



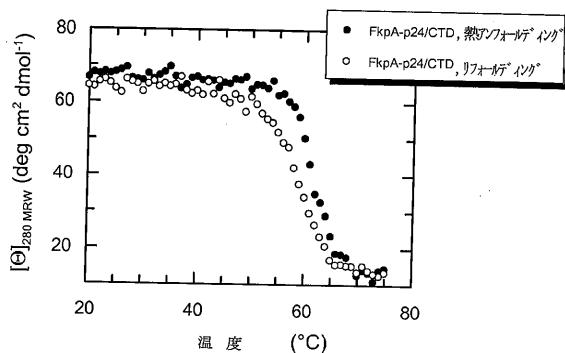
【図2】



【図3】



【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 フーグルフィング,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・シュトラーセ 35 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,ポ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 19 / 0 0

C 1 2 P 21 / 0 2

G 0 1 N 33 / 5 4 3

G 0 1 N 33 / 5 6 9

C 0 7 K 14 / 1 5

C 0 7 K 14 / 2 4 5

C 1 2 N 15 / 3 1

C 1 2 N 15 / 4 8

C 1 2 N 15 / 6 2

P u b M e d

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