

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-512200

(P2017-512200A)

(43) 公表日 平成29年5月18日 (2017.5.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 14/15 (2006.01)	C O 7 K 14/15 Z N A	4 B O 6 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
C O 7 K 14/245 (2006.01)	C O 7 K 14/245	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 N	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く		

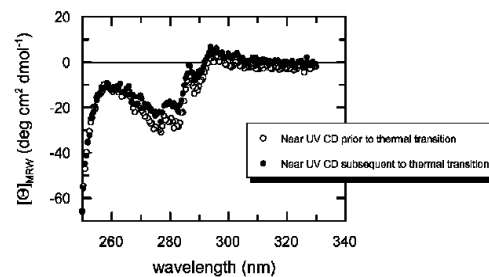
(21) 出願番号	特願2016-553811 (P2016-553811)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成27年2月26日 (2015.2.26)		エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成28年10月5日 (2016.10.5)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/053966		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02015/128394		スイス・シーエイチ・４０７０バーゼル・
(87) 国際公開日	平成27年9月3日 (2015.9.3)		グレンツァーヘルストラッセ 1 2 4
(31) 優先権主張番号	14157165.3	(74) 代理人	100140109
(32) 優先日	平成26年2月28日 (2014.2.28)		弁理士 小野 新次郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(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】 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

(57) 【要約】

本発明は、シャペロンに融合できる可溶性かつ抗原性の H T L V p 2 4 バリエーション、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 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、それらの使用に関する。特に、本発明は、p 2 4 の N 末端または C 末端のどちらかのドメインを含み、他方のドメインを欠如する、可溶性 H T L V - I または H T L V - I I p 2 4 抗原に関する。さらに、本発明は、これらの H T L V - I および - I I 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 H T L V p 2 4 抗原と H T L V g p 2 1 抗原の組成物、および本発明の抗原を用いて H T L V 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 H T L V p 2 4 抗原の使用、および抗 H T L V 抗体を検出するためのそれらの H T L V 抗原を含む試薬キットも包含される。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO. 2 または SEQ ID NO. 6 に特定された HTLV p 2 4 の N 末端ドメイン (NTD) を含み、SEQ ID NO. 3 および SEQ ID NO. 7 に特定された C 末端ドメイン (CTD) を欠如する、可溶性 HTLV p 2 4 抗原。

【請求項 2】

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する、可溶性 HTLV p 2 4 抗原。

【請求項 3】

可溶性 HTLV p 2 4 抗原がシャペロンに融合する、請求項 1 または 2 に記載の可溶性 HTLV p 2 4 抗原。

【請求項 4】

シャペロンがオリゴマー型シャペロンである、請求項 3 に記載の可溶性 HTLV p 2 4 抗原。

【請求項 5】

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

【請求項 6】

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 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の 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され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 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の HTLV p 2 4 抗原および SEQ ID NO. 25 によるアミノ酸配列を含む HTLV gp 2 1 抗原を含む HTLV 抗原組成物であって、p 2 4 および gp 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 8】

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であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の HTLV p 2 4 抗原または請求項 7 に記載の HTLV 抗原組成物を HTLV 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 9】

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であって、以下を含む前記方法：

- a) 体液試料を請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の HTLV p 2 4 抗原または請求項 7 に記載の HTLV 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；
- b) 体液試料中に存在する、前記 HTLV 抗原または HTLV 抗原組成物に対する抗体が、前記 HTLV 抗原または HTLV 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 10】

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請求項 9 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：

10

20

30

40

50

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HTLV p24抗原、および検出可能な標識を保有する第2のHTLV p24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HTLV p24抗原は抗HTLV抗体に特異的に結合すること；

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こと；

c) 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するのに十分な期間、その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；

e) 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こと。

【請求項11】

HTLVに対して特異的な抗体を検出するための請求項10に記載の方法であって、第1抗原はFkpAに融合したHTLV p24抗原であってビオチン部分を保有し、かつ第2抗原はSkpに融合したHTLV p24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Skpに融合したHTLV p24抗原であってビオチン部分を保有し、かつ第2抗原はFkpAに融合したHTLV p24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。

【請求項12】

抗HTLV抗体の検出のためのin vitro診断検査における、請求項1～5のいずれか1項に記載のHTLV p24抗原または請求項7に記載のHTLV抗原組成物の使用。

【請求項13】

少なくとも、請求項1～5のいずれか1項に記載のHTLV p24抗原または請求項7に記載のHTLV抗原組成物を含む、抗HTLV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、HTLVキャプシド抗原p24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性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】

10

20

30

40

50

H T L V - I / 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。H T L V 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。

【 0 0 0 4 】

H T L V に関する供血者スクリーニングが最初に日本で 1 9 8 6 年に、米国およびカナダで 1 9 8 8 / 1 9 8 9 年に、フランスで 1 9 9 1 年に、そして欧州および南米の数か国で 1 9 9 1 年以後に導入された。これまでのところ H T L V 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。

10

【 0 0 0 5 】

抗 H T L V 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 (g p 4 6 表面タンパク質および g p 2 1 膜貫通タンパク質) または g a g コードされた p 2 4 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。

【 0 0 0 6 】

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。

20

【 0 0 0 7 】

H T L V 感染するとセロコンバージョンの初期に g a g 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、g a g コードされたキャプシド抗原 p 2 4 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、p 2 4 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 p 2 4 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 p 2 4 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。I g M 分子は通常はセロコンバージョンに際して I g G 分子以前に出現するので、本発明者らは組換え p 2 4 キャプシド抗原を I g M 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、p 2 4 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 p 2 4 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、I g M 分子と相互作用してそれを検出できる p 2 4 バリエーションを設計しようとしていた。

30

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 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

40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

したがって、本発明の基礎となる課題は、H T L V - I および H T L V - I I 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。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

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 H T L V p 2 4 抗原、および診断適用におけ

50

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。

10

【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。

20

【0012】

【化1】

QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLCS LVASLHHQQL
 DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAFAALP GSAKDPSWAS
 ILQGLBEPYH AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRSLAYS NANKECQKLL QARGHTNSPL
 GDMLRACQTW TPKDKTKVL

【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)。

30

【0014】

【化2】

QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVASLHHQQL
 DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAFAALP 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)。

40

【0016】

【化3】

PSWASILQGL EEPYHAFVER LNIALDNGLP EGTPKDPILR SLAYSNANKE XQKLLQARGH
 TNSPLGDMLR AXQTWTPKDK TKVL

50

【 0 0 1 7 】

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)。

【 0 0 1 8 】

【 化 4 】

QMKDLQAIKQ EVSQAAPGSP QFMQTIRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVASLHHQQL
 DSLISEAETR GITGYNPLAG PLRVQANNPQ QQGLRREYQQ LWLAFAALP GSAKDPSWAS
 ILQGLEEPYH AFVERLNIAL DNGLPEGTPK DPILRSLAYS NANKEQKLL QARGHTNSPL
 GDMRLRAXQTW TPKDKTKVL

10

【 0 0 1 9 】

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。

20

【 0 0 2 0 】

【 化 5 】

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLCSS LVVSLHHQQL
 NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAFASTLP GNTRDPSWAA
 ILQGLEEPC AFVERLNVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAYS NANKEQKIL QARGHTNSPL
 GEMLRTCQAW TPKDKTKVL

【 0 0 2 1 】

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)。

30

【 0 0 2 2 】

【 化 6 】

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVVSLHHQQL
 NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAFASTLP 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)。

40

【 0 0 2 4 】

【化 7】

PSWAAILQGL EEPYXAFVER LNVALDNGLP EGTPKEPILR SLAYSNANKE XQKILQARGH
TNSPLGEMLR TXQAWTPKDK TKVL

【0025】

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 - 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 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)。

【0026】

【化 8】

QMKDLQAIKQ EVSSSALGSP QFMQTLRLAV QQFDPTAKDL QDLLQYLXSS LVVSLHHQQL
NTLITEAETR GMTGYNPMAG PLRMQANNPA QQGLRREYQN LWLAAFSTLP GNTRDPSWAA
ILQGLBEPYX AFVERLNVAL DNGLPEGTPK EPILRSLAYS NANKEQKIL QARGHTNSPL
GEMLR TXQAW TPKDKTKVL

【0027】

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 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 EcSlyD、EcFkpA および EcSkp 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。

【0028】

【化 9 - 1】

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

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVD
GNHMLAQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHGGGSG GSGGGSGGG
SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGSGGGG
GGGGGGSG GSGGGMKDL QAIKQEVSA APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQQLR REYQQLWLAA
FAALPGSAKD PSWASILQGL EEPYHAFVER LNIALDNGLP EGTPKDPILR SLAYSNANKE
AQKLLQARGH TNSPLGDMRL AAQTWTPKDK TKVLLHHHH HH

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

MAEAAKPATT ADSKAFFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGKIL DKDQLIAGVQ

【0029】

【化 9 - 2】

DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKKG3K IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGG MKDLQAIKQE VSQAAPGSPQ FMQTIRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VASLHHQQLD SLISEAETRG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
 QGLRREYQQL WLAAPALPG SAKDPSWASI LQGLEEYHA FVERLNIALD NGLPEGTPKD
 PILRSLAYSN ANKEAQKLLQ ARGHTNSPLG DMLRAAQWTW PKDKTKVLE HHHHHH

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 DHDHGGGGSG GSGGGSGGGG
 SGGSGGGGKV AKDLVVSLEY 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 VLEHHHHHH

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
 GLKNIKKG3K IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGA KDPWSASILQ GLEPYHAFV ERLNIALDNG
 LPEGTPKDPI LRSAYSNAN KEAQKLQAR GHTNSPLGDM LRAAQWTWPK DTKVLEHHH
 HHH

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

30

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQK AFEQDRARRS NEERKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KQITADVLKQ VK3GGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGAKDPS WASILQGLEE
 PYHAFVERLN IALDNLPEG TPKDPILRSL AYSNANKEAQ KLLQARGHTN SPLGDMRLAA
 QTWTPKDKTK VLEHHHHHH

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 DHDHGGGGSG GSGGGSGGGG
 SGGSGGGGKV AKDLVVSLEY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGSGGGGS
 GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSA APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY NPLAGPLRVQ ANNPQQQLR REYQQLWLAA
 FAALPGSAKD LEHHHHHH

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 DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKKGSK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSQAAPGSPQ FMQTIRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VASLHHQQLD SLISEAETRG ITGYNPLAGP LRVQANNPQQ
 QGLRREYQQL WLAFAALPG SAKDLEHHHH HH

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

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLOSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDTADVLKQ VKGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSA
 APGSPQFMQT IRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVASL HHQQLDSLIS EAETRGITGY
 NPLAGPLRVQ ANNPQQGLR REYQQLWLAA 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 1 0 - 1】

GGSGGGSGSG GSGGGSGGGG GGG

20

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

MKVAKDLVVS LAYQVREDTG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFVGVDDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHGGGGSG GSGGGSGGGG
 SGGSGGGGKV AKDLVVSLAY QVREDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYQYDE NLVQVRPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVVDGNH MLAGQNTKFN VEVVAITREAT FEELAHGHVH GAHDHHHDHD HDGGSGGGGS
 GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ
 YLASSLVVSL HHQQLNTLIT EAETRGMTGY NPMAGPLRMQ ANNPAQQGLR REYQNLWLAA
 FSTLPGNTRD PSWAAILQGL EEPYAAFVER LNVALDNGLP EGTPEKPIR SLAYSNANKE
 AQKILQARGH TNSPLGEMLR TAQAWTPKDK TKVLEHHHH HH

30

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

MAEAAKPATT ADSKAAFKND DQKSAYALGA SLGRYMENSL KEQEKLGIKL DKDQLIAGVQ
 DAFADKSKLS DQEIEQTLQA FEARVKSSAQ AKMEKDAADN EAKGKEYREK FAKEKGVKTS
 STGLVYQVVE AGKGEAPKDS DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKKGSK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGQ MKDLQAIKQE VSSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAFFSTLPG NTRDPSWAAI LQGLEEPYAA FVERLNVALD NGLPEGTPKE
 PILRSLAYSN ANKEAQKILQ ARGHTNSPLG EMLRTAQAWT PKDKTKVLE HHHHHH

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

40

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLOSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFQAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDTADVLKQ VKGGSGGGG GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS
 ALGSPQFMQT LRLAVQQFDP TAKDLQDLLQ YLASSLVVSL HHQQLNTLIT EAETRGMTGY
 NPMAGPLRMQ ANNPAQQGLR REYQNLWLAA FSTLPGNTRD PSWAAILQGL EEPYAAFVER
 LNVALDNGLP EGTPEKPIR SLAYSNANKE 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 DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 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: EcSbp-p24/CTD(267-350)/HTLV-II

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ 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 DTVVVNYKGT LIDGKEFDNS YTRGEPLSFR LDGVIPGWTE
 GLKNIKKGGK IKLVIPPELA YGKAGVPGIP PNSTLVFDVE LLDVKPAPKA DAKPEADAKA
 ADSAKKGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGG MKDLQAIKQE VSSSALGSPQ FMQTLRLAVQ
 QFDPTAKDLQ DLLQYLASSL VVSLHHQQLN TLITEAETRG MTGYNPMAGP LRMQANNPAQ
 QGLRREYQNL WLAASFSTLPG NTRDLEHHHH HH

20

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

MADKIAIVNM GSLFQQVAQK TGVSNLENE FRGRASELQR METDLQAKMK KLQSMKAGSD
 RTKLEKDVMA QRQTFAQKAQ AFEQDRARRS NEERGKLVTR IQTAVKSVAN SQDIDLVDVA
 NAVAYNSSDV KDITADVLKQ VKGGSGGGGS GGGSGGGSGG GSGGGQMKDL QAIKQEVSSS
 ALGSPQPMQT 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 QAIVKNHKNL LKIAQYAAQN RRGDLDFWE QGGLXKALQE
 QXXFLNITNS HVSILQERPP LENRVLTGWG LNWDLGLSQW 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 DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHGH DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
 SGGSGGGSL ASGKSLLEHV DKDISQLTQA IVKNHKNLLK IAQYAAQNRRL GLDLLFWEQG
 GLAKALQEQA AFLNITNSHV SILQERPPLE NRVLTGWGLN WDLGLSQWAR EALQTGLEHH
 HHHH

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

10

SESVQNSA VLHFHTLKD DGTAESTRN NGKPALFRLG DASLSEGLEQ HLLGLKVGDK
 TTFSLEPDAA FGVPSPDLIQ YFSRREFMDA GEPEIGAIML FTAMDGSEMP GVIREINGDS
 ITVDFNHPLA GQTVHFDEIV LEIDPALEGG GSGGGSGGGG GGGSGGGSGG GSLASGKSL
 HEVDKDISQL TQAIKVNHN LLKIAQYAAQ NRRGLDLLFW EQGLAKALQ EQAFLNITN
 SHVSILQERP PLENRVLTGW GLNWDGLSQ WAREALQTGL EHHHHH

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、Skp-p24/CTD(267-350)、SEQ ID NO. 22の近UV CDスペクトルを示す。

【図2】図2は、Skp-p24/CTD(SEQ ID NO. 22)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、FkpA-p24/CTD(267-350)、SEQ ID NO. 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FkpA-p24/CTD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 p24は抗HTLV抗体の検出のための重要な抗原である。p24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EcSl yD - EcSl yDまたはEcFk pA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Sk p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EcSk p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バリエーション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）にはらせん1～7があり、これに対しC末端ドメイン（CTD）にはらせん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。

【0046】

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。

【0047】

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 l 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ことができるように、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。

【0048】

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 バリエーションを 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。

【0049】

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 l 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 融合バリエーションは 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。

【0050】

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 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わせで）。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

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ゼ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）に関するものでもある。たとえば、C 末端または N 末端の 1 ~ 10 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 80 %、他の態様において少なくとも 85 % または少なくとも 90 %、さらに他の態様において少なくとも 95 % 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もある。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。

10

【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。

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）。

30

【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。

40

【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

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。

【0073】

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。

【0074】

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。

【0075】

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。

【0076】

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。

【0077】

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。

【0078】

本発明はまた、抗 H T L V 抗体の in vitro 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】

【0079】

本発明を実施例によってさらに説明する。

実施例 1

10

20

30

40

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 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)。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ション融合した 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 EclYD 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 EclYD - EclYD 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ション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、EclYD 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。

【0080】

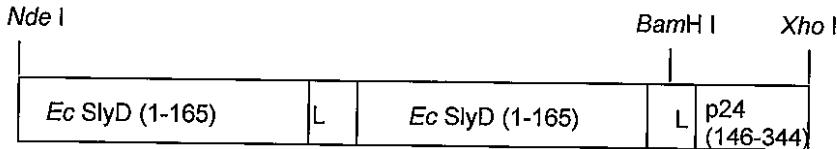
pET24a ベクターを NdeI および XhoI で消化し、HTLV-I p24 (146 - 344) にインフレーション融合した縦列 SLYD を含むカセットを挿入した。パスツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*) SLYD (1 - 156, SwissProt ID Q9CKP2)、大腸菌 Skp (21 - 161, SwissProt ID P0AEU7) または大腸菌 FkpA (26 - 270, SwissProt ID P45523) を含む発現カセットをそれに応じて構築し、HTLV-II (SwissProt ID P03353) 由来の 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-II 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。Ni-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。

【0081】

下記の図は、その N 末端にインフレーション融合した 2 つの SLYD 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 SLYD 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 EclYD - EclYD - p24 (146 - 344) と命名された。

【0082】

【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。

【 0 0 8 4 】

HTLV - IおよびHTLV - IIに由来するp 2 4およびp 2 4バリエントを含む融合タンパク質の精製

すべてのp 2 4 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p E T 2 4 a 発現プラスミドを宿した大腸菌B L 2 1 (D E 3) 細胞を、3 7 でL B 培地 + カナマイシン (3 0 μ g / m l) 中において1 . 5 のO D _{6 0 0} になるまで増殖させ、1 m M 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 (5 0 0 0 g で2 0 分間) により収穫し、凍結し、- 2 0 で保存した。細胞溶解のために、冷却した5 0 m M リン酸ナトリウム p H 8 . 0、7 . 0 M G d m C l、5 m M 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 . 4 5 μ m / 0 . 2 μ m) の後、粗製の細胞溶解物を5 . 0 m M のT C E P を含有する細胞溶解緩衝液でN i - N T A 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 m M から1 5 m M に及ぶイミダゾール (5 0 m M リン酸ナトリウム p H 8 . 0、7 . 0 M G d m C l、5 . 0 m M T C E P 中) であった。少なくとも1 0 ~ 1 5 体積の洗浄緩衝液を適用した。次いで、G d m C l 溶液を5 0 m M リン酸カリウム p H 8 . 0、1 0 0 m M K C l、1 0 m M イミダゾール、5 . 0 m M T C E P 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 (C o m p l e t e (登録商標) E D T A フリー, R o c h e) をリフォールディング緩衝液に含有させた。合計1 5 ~ 2 0 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、T C E P と C o m p l e t e (登録商標) E D T A 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5 0 m M リン酸カリウム p H 8 . 0、1 0 0 m M K C l、1 0 m M 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5 0 m M リン酸カリウム p H 8 . 0、1 0 0 m M K C l 中にある - を2 0 ~ 8 0 m M (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5 0 0 m M 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) - S D S - P A G E 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 (S u p e r d e x H i L o a d , A m e r s h a m P h a r m a c i a) を施し、タンパク質含有画分をプールし、A m i c o n セル (Y M 1 0) で1 0 ~ 2 0 m g / m l に濃縮した。

【 0 0 8 5 】

精製とリフォールディングの組み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 】

实施例 2

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。

【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

【0088】

【表1】

10

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

20

30

【0089】

40

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 ϵ -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

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 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 Eleysys (登録商標) 2010 および cobase 411 分析計 (Roche Diagnostics GmbH) で査定した。Eleysys (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。

【0091】

Eleysys (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 620 nm で光を発する。信号出力は相対光単位による。

【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 EcSlyD - EcSlyD、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。

【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 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、EcSlyD - EcSlyD - p24 - ビオチンおよび EcSlyD - EcSlyD - 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、EcSlyD - EcSlyD 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。

【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

10

20

30

40

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

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。

10

【 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)

20

【 0 0 9 8 】

【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

10

20

30

40

50

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

20

【 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 M (S k p - p 2 4 モノマーについて) または 1 4 7 . 5 μ M (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

40

50

最大をもつ陽性信号を示す（図3）。

【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。

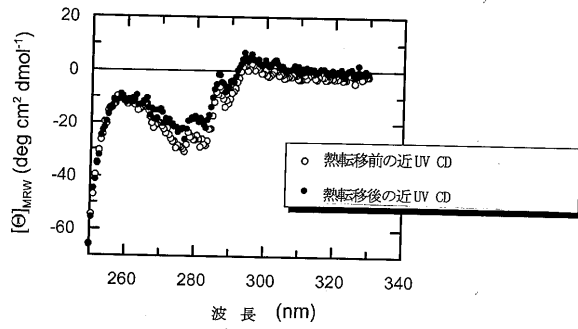
【0111】

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C D 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。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UV 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UV領域に顕著なC D 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 C D 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。

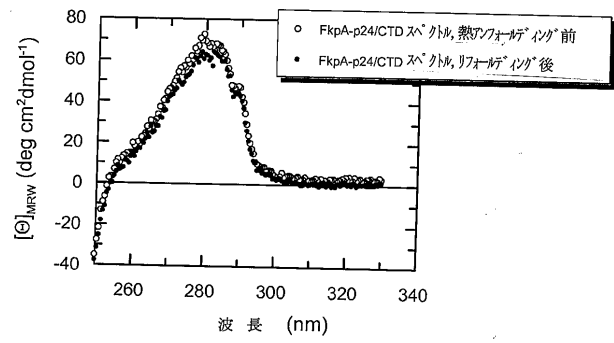
【0112】

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。

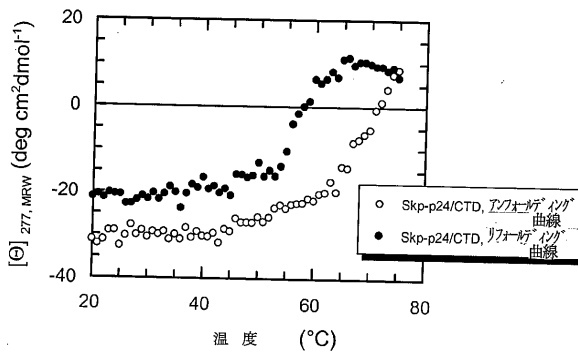
【図 1】



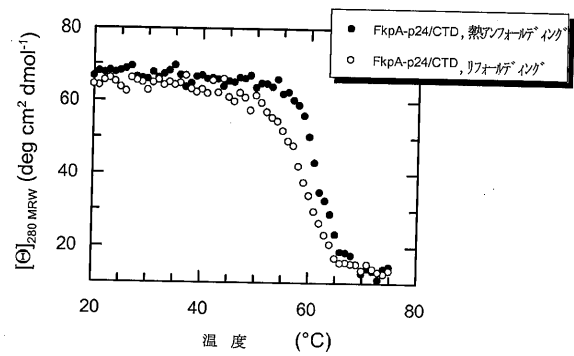
【図 3】



【図 2】



【図 4】



【配列表】

2017512200000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2015/053966

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/053966**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/053966

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/005 G01N33/569
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUGA T ET AL: "A GAG-ENV HYBRID PROTEIN OF HUMAN T-CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE 1 AND ITS APPLICATION TO SERUM DIAGNOSIS", JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, JAPANESE CANCER ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 79, no. 11, 1 November 1988 (1988-11-01), pages 1168-1173, XP009080953, ISSN: 0910-5050	1,6,8-10,12,13
Y	page 1170; figure 2 page 1169, paragraph 4 page 1172, paragraph 1 page 1170	3-5,7,11
A	----- EP 0 214 555 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 18 March 1987 (1987-03-18) page 16 - page 17; table 2 ----- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 September 2015

Date of mailing of the international search report

15/09/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, David

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/053966

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 2 127 678 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 2 December 2009 (2009-12-02) paragraph [0001] paragraph [0009] paragraph [0017] paragraph [0059] paragraph [0105] -----	3-5,11
Y	DATABASE WPI Week 200025 Thomson Scientific, London, GB; AN 2000-285928 XP002730923, & JP 2000 078973 A (TONEN CORP) 21 March 2000 (2000-03-21) abstract -----	7
X	WO 01/10457 A2 (TRIPEP AB [SE]; VAHLNE ANDERS [SE]) 15 February 2001 (2001-02-15)	2,6, 8-10,12, 13
Y	page 5, line 7 - line 10 figure 5 -----	3-5,7,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/053966

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0214555	A1	18-03-1987	CA 1306209 C 11-08-1992
			DE 214555 T1 24-09-1987
			DE 3671244 D1 21-06-1990
			EP 0214555 A1 18-03-1987
			JP 2564268 B2 18-12-1996
			JP S6248699 A 03-03-1987
			US 4939094 A 03-07-1990
			US 5082776 A 21-01-1992

EP 2127678	A1	02-12-2009	CA 2667177 A1 26-11-2009
			CN 101591665 A 02-12-2009
			EP 2127678 A1 02-12-2009
			EP 2127679 A1 02-12-2009
			JP 5611540 B2 22-10-2014
			JP 2009284902 A 10-12-2009
			US 2009291892 A1 26-11-2009
			US 2012308994 A1 06-12-2012

JP 2000078973	A	21-03-2000	NONE

WO 0110457	A2	15-02-2001	AU 5701300 A 05-03-2001
			CA 2378480 A1 15-02-2001
			CN 1377276 A 30-10-2002
			CZ 20020421 A3 11-09-2002
			EP 1207897 A2 29-05-2002
			HU 0202512 A2 28-11-2002
			IS 6263 A 08-02-2002
			JP 2003506411 A 18-02-2003
			MX PA02001349 A 22-07-2002
			NO 20020635 A 15-03-2002
			PL 354122 A1 29-12-2003
			US 2003050242 A1 13-03-2003
			WO 0110457 A2 15-02-2001

International Application No. PCT/ EP2015/ 053966

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1(completely); 3-13(partially)

An HTLV-I p24 antigen N terminal fragment having a sequence as set out in SEQ ID NO:2 or 6, and not having a sequence as set out in SEQ ID NO: 3 or 7; related methods, compositions, uses and entities.

2. claims: 2(completely); 3-13(partially)

An HTLV-I p24 antigen C terminal fragment having a sequence as set out in SEQ ID NO:3 or 7, and not having a sequence as set out in SEQ ID NO: 2 or 6; related methods, compositions, uses and entities.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		U
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 0 1 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		G 0 1 N 33/574		C
		C 1 2 N 15/00		A

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

(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, ポーンホルツヴェーク 6

F ターム(参考) 4B064 AG31 CA19 CE12 DA15

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA04 CA11 DA86 EA53 FA72

FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017512200A5	公开(公告)日	2017-10-26
申请号	JP2016553811	申请日	2015-02-26
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ファーツエルケ ショルツクリスティアン ムエンフペーター		
发明人	ファーツ,エルケ ショルツ,クリスティアン ムエンフ,ペーター		
IPC分类号	C07K14/15 C07K19/00 C07K14/245 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/574 C12N15/09		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/35 C12N2740/14022 C12N2740/14031 G01N33/56983 G01N2333/15 G01N2469/20 C12N2740/14051 G01N33/56988		
FI分类号	C07K14/15.ZNA C07K19/00 C07K14/245 C12P21/02.C G01N33/53.N G01N33/53.U G01N33/543.501. A G01N33/574.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA15 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/CA04 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	2014157165 2014-02-28 EP		
其他公开文献	JP2017512200A JP6491228B2		

摘要(译)

本发明涉及与分子伴侣融合的可溶性和抗原性HTLV p24变体及其在诊断应用中的用途，例如用于检测分离的生物样品中抗HTLV-I或HTLV-II的抗体的免疫测定。具体而言，本发明涉及包含SEQ ID NO.1的至少25个氨基酸的片段的可溶性HTLV-I或HTLV-II p24抗原。1或4 (HTLV-1) 或SEQ ID NOs. 5或8 (HTLV-II) ，其中HTLV p24抗原与分子伴侣融合。此外，本发明涵盖了编码这些HTLV-I和-II融合抗原的重组DNA分子以及使用表达载体和用这种表达载体转化的宿主细胞的重组生产。此外，本发明集中于这些HTLV p24抗原与HTLV gp21抗原的组合物以及使用本发明的抗原检测HTLV抗体的免疫测定方法。还包括在体外诊断测定中使用HTLV p24抗原以及用于检测包含所述HTLV抗原的抗HTLV抗体的试剂盒。