

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5829830号
(P5829830)

(45) 発行日 平成27年12月9日(2015. 12. 9)

(24) 登録日 平成27年10月30日(2015. 10. 30)

(51) Int.Cl.		F I			
C07K	14/08	(2006.01)	C07K	14/08	ZNA
A61K	39/29	(2006.01)	A61K	39/29	
A61K	39/39	(2006.01)	A61K	39/39	
A61P	1/16	(2006.01)	A61P	1/16	
A61P	31/14	(2006.01)	A61P	31/14	

請求項の数 16 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-88810 (P2011-88810)	(73) 特許権者	508198258
(22) 出願日	平成23年4月13日 (2011. 4. 13)		ベイジン ワンタイ バイオロジカル フ
(62) 分割の表示	特願2002-542994 (P2002-542994)		ァーマシー エンタープライズ カンパニ
原出願日	平成13年9月30日 (2001. 9. 30)		ー, リミテッド
(65) 公開番号	特開2011-201881 (P2011-201881A)		中国, ベイジン 102206, チャ
(43) 公開日	平成23年10月13日 (2011. 10. 13)		ンピン ディストリクト, ケシュユアン
審査請求日	平成23年4月13日 (2011. 4. 13)	(73) 特許権者	510183280
審査番号	不服2014-2678 (P2014-2678/J1)		シャアメン ユニバーシティ
審査請求日	平成26年2月12日 (2014. 2. 12)		中華人民共和国 361005 フージェ
			ン プロヴィンス, シャアメン, スーミン
			ディストリクト, スー ミン ナン
		(74) 代理人	110000855
			特許業務法人浅村特許事務所
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E型肝炎ウイルスのポリペプチド断片、それを含むワクチン組成物及び診断キット、並びにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

精製した単量体ポリペプチドの多量体であって、該多量体は2～180の精製した単量体ポリペプチドが自己凝集によって形成し、各々の該精製した単量体ポリペプチドはE型肝炎ウイルスORF2の配列番号1に記載されたアミノ酸配列の断片からなるポリペプチドであって、該断片は：

- 1) 配列番号1のアミノ酸残基414～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド247；
 - 2) 配列番号1のアミノ酸残基429～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド232；
 - 3) 配列番号1のアミノ酸残基439～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド222；及び
 - 4) 配列番号1のアミノ酸残基459～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド201；
- からなる群から選ばれるものである、上記多量体。

【請求項2】

少なくとも1種の請求項1に記載の多量体、及び場合により薬剤として許容される賦形剤及び/もしくはアジュバントを含む、哺乳動物のE型肝炎ウイルス感染を予防及び/又は治療するためのワクチン組成物。

【請求項3】

精製した単量体ポリペプチドの多量体であって、該多量体は2～180の精製した単量体ポリペプチドが自己凝集によって形成し、各々の該精製した単量体ポリペプチドは配列番号1からのアミノ酸残基414～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド247、及び配列番号11に記載のE型肝炎ウイルスORF3からの免疫原性エピートープを含むキメラタンパク質である、上記多量体。

【請求項4】

請求項3に記載の多量体、及び場合によって、薬剤として許容される賦形剤及び/もしくはアジュバントを含む、哺乳動物のE型肝炎ウイルス感染を予防及び/又は治療するためのワクチン組成物。

【請求項5】

請求項1に記載の前記ポリペプチド、又は請求項3に記載の前記キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、組み換え発現ベクター。

【請求項6】

それぞれ請求項1に記載の前記ポリペプチド、又は請求項3に記載の前記キメラタンパク質を発現することができる、請求項5に記載の組み換え発現ベクターで形質転換した、宿主細胞。

【請求項7】

診断に有効な量の少なくとも1種の請求項1に記載の多量体を含む、生物検体のE型肝炎ウイルス感染を診断する診断キット。

【請求項8】

配列番号11に記載のポリペプチドを含み、請求項1に記載の前記ポリペプチドは、配列番号1からのアミノ酸残基414～660のアミノ酸配列、すなわち、ポリペプチド247を有し及び配列番号11に記載の該ポリペプチドが、請求項1に記載のポリペプチドに共有結合している、請求項7に記載の診断キット。

【請求項9】

少なくとも1種の請求項1に記載の多量体を含み、所望であれば、前記多量体が適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出対象の生物検体のIgGに指向性のある検出可能に標識された抗IgG抗体、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；所望であれば、適切な緩衝系をさらに含む、生物検体中のE型肝炎ウイルスに対するIgG抗体を判定するための、請求項7又は請求項8に記載の診断キット。

【請求項10】

検出対象の生物検体のIgMに指向性のある捕捉抗体としての、検出可能に標識した抗IgM抗体を含み、所望であれば、前記捕捉抗体が、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも1種の請求項1に記載の多量体、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；所望であれば、適切な緩衝系をさらに含む、生物検体中のE型肝炎ウイルスに対するIgM抗体を判定するための請求項7又は請求項8に記載の診断キット。

【請求項11】

少なくとも1種の請求項1に記載の多量体を含み、望むなら、前記多量体が、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも1種の請求項1に記載の多量体、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；支持体表面に予め塗布するための前記多量体、及び検出可能な標識多量体と同じでも異なるものでもよい、生物検体中のE型肝炎ウイルスに対する全抗体を判定するための請求項7又は請求項8に記載の診断キット。

【請求項12】

生物検体中のE型肝炎ウイルスに対する全抗体（固定化された請求項1に係る多量体と特異的に結合する全ての型の抗体であって、標識抗原を検出可能である抗体）を検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも1種の請求項1に記載の多量体を固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及び検出可能な標識を有するE型肝炎ウイルス

10

20

30

40

50

抗原及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出するステップを含む方法。

【請求項 1 3】

生物検体においてE型肝炎ウイルスに対するI g G抗体を検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも1種の請求項1に記載の多量体を固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及び検出可能に標識した抗I g G抗体及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出するステップを含む方法。

【請求項 1 4】

生物検体においてE型肝炎ウイルスに対するI g M抗体を検出する方法であって、支持体表面上に抗I g M抗体を固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及び検出可能に標識した少なくとも1種の請求項1に記載の多量体及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗I g M / I g M複合体を検出するステップを含む方法。

10

【請求項 1 5】

生物検体においてE型肝炎ウイルスに対するI g M抗体を検出する方法であって、支持体表面上に抗I g M抗体を固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；次いで抗原と抗体の相互作用に適する条件下、少なくとも1種の請求項1に記載の多量体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及び、次いで検出可能に標識した抗H E V多クローンもしくは単クローン抗体及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出するステップを含む方法。

20

【請求項 1 6】

請求項3に記載の多量体を含む、生物検体におけるE型肝炎ウイルス感染の診断のため、又は生物検体におけるE型肝炎ウイルスに対するI g G抗体、I g M抗体、全抗体の判定のための診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

30

本発明は、N重合体ポリペプチド(Nは1～180の整数である)の形の、配列番号1で示す、E型肝炎ウイルスのORF2のアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片；本発明のポリペプチドとインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片とからなるキメラタンパク質；E型肝炎ウイルスORF3由来のエピトープを含むポリペプチド又はその免疫原性断片に結合した本発明のポリペプチド；上記のポリペプチドをコードするDNA分子を含む組換え発現ベクター、及び本発明のポリペプチドを発現させることのできる、前記組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞に関する。

【0002】

本発明はさらに、上述のポリペプチドを含む、E型肝炎ウイルスに対処するワクチン組成物、又はE型肝炎ウイルス用のI g G、I g M、もしくは全抗体診断キットを含めて、上述のポリペプチドを含むE型肝炎ウイルス感染用診断キット、並びにE型肝炎ウイルス感染の予防、診断、及び／もしくは治療のための、ワクチン組成物及び診断キットの使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

E型肝炎ウイルス(HEV)は、経腸的に伝染した非A非B型肝炎の病原体として1983年に最初に確認された(Balayán等、1983年、Intervirolgy第20巻：23ページ、)。E型肝炎は、主に、アジア、アフリカ、中央アメリカの開発途上国に特有である。先進国でのE型肝炎の症例は、ほとんど外国からの移民又は旅行

50

者に見られた。散発性の症例も大規模な流行も報告されている。1950年代から1990年代の期間に、飲料水の汚染のために、E型肝炎の数件の大発生が連続して起こった (Visvanathan、1957年、Indian J. Med. Res. Suppl. 第45巻: 1~30ページ; Wong等、1980年、Lancet. 第2巻: 882~885ページ; Myint等、1985年、Am J Trop Med Hyg. 第34巻: 1183~1189ページ; Belabbes等、1985年、J Med Virol. 第16巻: 257~263ページ; Hau等、1999年、Am J Trop Med Hyg. 第60巻: 277~280ページ)。大部分のE型肝炎感染は、自己制限的であり、慢性に発展することはほとんどないが、妊婦については予後が重く、死亡率が17%を上回る。(Tsega等、1992年、Clin. Infect. Dis. 第14巻: 961~965ページ; Dilawari等、1994年、Indian J Gastroenterol. 第13巻: 44~48ページ; Hussaini等、1997年、J Viral Hepat. 第4巻: 51~54ページ)。

10

【0004】

1991年に、研究者等は、エンベロープをもたない1本鎖のプラスRNAウイルスであるHEVの最初の完全なゲノム配列を得た (Tam等、1991年、Virology 第185巻: 120~131ページ)。配列分析によって、ゲノムが7.2kbであり、3つのオープンリーディングフレームを有することが示された。5'末端に位置するORF1は、ウイルスの非構造タンパク質をコードし、3'末端に位置するORF2は、ウイルスの主要な構造タンパク質をコードする。ORF3 5'末端には、ORF1 3'末端と重複した1bpが存在する。ORF3 3'末端には、ORF2末端と重複した339bpが存在する。ORF3が未知の機能を備えた別の構造タンパク質をコードすることが認められている (Tam等、1991年、Virology 第185巻: 120~131ページ; Aye等、1992年、Nucleic Acids Res. 第20巻: 3512ページ; Aye等、1993年、Virus Genes. 第7巻: 95~109ページ; Huang等、1992年、Virology 第191巻: 550~558ページ; Reyes等、1993年、Arch Virol Suppl. 第7巻: 15~25ページ)。

20

【0005】

HEV感染の検出は、長い間、主に免疫電子顕微鏡法 (IEM) 又は免疫蛍光技術に頼っていたが、このような技術は非常に複雑で高価であり、多くの研究所では実施しにくいものである。HEVゲノムがクローン化され、配列決定された後、ERISA、ウェスタンブロット、PCRなどのようなより感度のよい技術が開発されて、HEV感染の検出に使用されている。

30

【0006】

血清HEV抗体キットの開発が絶対的に必要であることは十分に認知されているが、感染したヒト又は動物が分泌するHEVウイルスの濃度が非常に低いために、血清を抗原の供給源として使用することは不可能である。現在もなお、HEV細胞培養の効率は非常に低く、これがHEVを検出するために十分な抗原を利用できる可能性を制限した。したがって、HEV抗体の検出は、依然として合成のポリペプチド又は組換え抗原に頼っている。残念なことに、多くの血清学的研究によって、合成ポリペプチド類又は異なるHEVゲノム領域に由来する組換え抗原での整合性が大幅にずれていることが示された。たとえば、Goldsmith等 (1992年、Lancet. 第399巻: 328~331ページ) は、ORF2 3-2 (M) 抗原 (a.a. 613~660、Mexico株) を使用して、院内のE型肝炎ウイルス感染の症例を検出した。IgGの検出率は91%であり、6~12カ月後には27~50%に下がった。彼が3-2 (B) (Burma株由来の同じORF2断片) を検出に使用したとき、検出率はほんの64%であり、6~12カ月後には陽性の結果が見られなかった。それどころか、3-2 (M) は、パキスタン人の対象の回復期血清と反応しないが、3-2 (B) は、4.5年後に同じ症例の血清と反応した。このようなタンパク質では、抗体が陰性に逆転する場合もあれば、依然として力価が

40

50

高いままである場合もあった。大腸菌中に発現したいくつかの線状エピトープを有するモザイクタンパク質を使用した場合の結果は類似していた。良好なH E V抗体キットがないことは、H E Vに感染している間の抗体の動態を深くまで研究する制約になった。一般に、H E Vに感染している間、特定のI g G抗体が初期の段階で検出可能になり、2～4週間後に最高点に達し、急速に降下する。大部分は9カ月後に陰性に逆転するが、何年も後に陽性のままである患者もいる。最近では、急性相と回復期相の両方に由来する血清とも強く反応する、数種の組換え抗原がバキュロウイルス及び大腸菌中に発現されている。原則として、血清疫学調査にはこのような抗原がより適している。血清H E V I g Gの力価が、急性段階の後急速に降下するものの、なお検出可能なレベルに保たれるからである。抗体が、疾患の流行中に感染を防御することに関係しているということは特筆に値する。

10

【0007】

他の手段では、現在のところ利用できる検出法が間接的な方法だけであるために、確立されたH E V I g Mキットは、世界中で未だ開発されていない。間接的方法については、一方では検出結果が様々な要因によって影響されるので再現しにくく、他方では偽陽性の可能性が高く、陰性の値がより高く、又は感度が低いために結果の信頼性が低い。最近の報告によると、臨床サンプルを検出する際、I g Mの結果が陽性であった場合、一般にI g Gも陽性であり、したがって、早期に診断されたその値は、限界があるものの、急性感染の診断特異性の向上において役立つといえる。

【0008】

20

報告されているところでは、いくつかの合成ペプチド及び何らかの組換え抗原に対する抗体は、多くの感染対象において急速に消失するので、急性E型肝炎ウイルス感染の臨床的診断は、一般に臨床的な一致が高いI g G抗体に基づいているが、この方法の最も重大な欠陥は、過去の感染を最近の感染と区別できないことであり、これは、E型肝炎ウイルスが多く発生している区域においても、疫学的研究の際にE型肝炎ウイルス感染の有病率を評価する上でも、誤った診断をもたらすことになる。したがって、回復期血清に対する感度が高いことを特徴とする、信頼性があり、かつ感度のよい抗 μ 鎖I g M診断キット及びI g G診断キットを開発することが早急に求められている。

【0009】

近年では、高感度のI g G診断キットの開発に若干の進歩があった。M a s t等(1998年、H e p a t o l o g y第27巻：857～861ページ)は、世界中の10種の主要なI g G抗体E I Aの包括的評価を提示している。既知の陽性血清の検出では多くのキットが実によく一致していたが、アメリカ人血液供与者の検出では、異なるキットで大きな相違があった。これは、非発生地域でのH E V有病率研究における結果の信頼性が低いことを示唆している。このようなキットの大部分の抗原は、H E Vの線状エピトープを素材としていたが、2種のキットは、立体配座のエピトープを抗原として使用していた。1種目はO R F 2 . 1 (a a 3 9 4 ~ 6 6 0)であり、他方はバキュロウイルス中で発現させたV L P (a a 1 1 2 ~ 6 0 7)である。どちらの抗原も回復期抗体を検出できるが、これら2種の抗原の一致を比較した直接のデータは、今もまだ得られていない。これら2種の抗原が異なる抗体を識別することは可能である。さらに、V L Pキットを使用して、流行のないアメリカで20%近い有病率が報告され、これによってその特異性に疑いが生じたこともあった。しかし、ブタ、ヤギ、ウシ、ニワトリ、ラット、野生のサル、及び飼われているサルでの陽性のH E V感染の報告、並びにメリーランド州の野生ラットとルイジアナ州の野生ラットの抗体有病率が、相違する77%と44%であることから、動物のH E Vは、その病原性による臨床疾患を引き起こし得ないものの、アメリカ人集団の抗体有病率が過小評価されている可能性はある。(K a b r a n e - L a z i z i等、1999年、A m J T r o p i c M e d i c i n e第61巻：331～335ページ)。さらに、O R F 2 . 1キットは、C M V感染及び自己免疫疾患においてより高い陽性率を検出することができる。さらに、報告されているO R F 2 . 1ポリペプチドは、G S Tとのキメラタンパク質又はポリアルギニンとのキメラタンパク質であるが、実際には偽陽

30

40

50

性の結果をもたらすことになる。

【0010】

HEVでは細胞培養も組織培養も成功しておらず、大量のウイルスを得るための実際的な方法が未だ得られないので、遺伝子工学を通じて、旧来の死菌ワクチン又は弱毒ワクチンからサブユニットワクチン又はDNAワクチンへと転換を図ることが唯一の研究手段である。

【0011】

HEV ORF2は、5147に位置する塩基から始まって、1980個のヌクレオチドを有するものであり、主要な構造タンパク質であると推定されているアミノ酸660個のポリペプチドをコードするものであり、ウイルスのキャプシドを構成している。ORF2タンパク質のN末端には、古典的なシグナル配列の後に、正の電荷を大量に帯びた領域であり、かつウイルス構築中にゲノムRNAのキャプシド形成に関与すると考えられているアルギニン高含有領域が存在する。翻訳プロセスの間、ORF2は、シグナルペプチド認識タンパク質(SRP)の機構によって小胞体(ER)に侵入し、さらにグリコシル化され、ER内に蓄積し、次いでおそらくは揃ってキャプシドのキャプソメアを形成する。3箇所(Asn-137、Asn-310、及びAsn-562)が、ORF2に位置している。これらは、異なるウイルス株間でも高度に保存されており、Asn-310は、主要なグリコシル化部位である。ORF2を形質移入した哺乳動物細胞COS、ヒト肝細胞癌Huh-7、HepG2は、それによって、細胞質にも膜にも見出される88kDの糖タンパク質を発現させることができる。これらのグリコシル化部位での突然変異は、PORF2の細胞膜上への配置には影響を及ぼさない。しかし、シグナルペプチド配列がそこから除去された後では、細胞質中でしかPORF2を見出すことができない。これは、タンパク質の細胞膜上への配置にはグリコシル化でないPORF2の変化が必要なことを示唆している。HBVのMSタンパク質のように、PORF2も、ゴルジ体の代わりにERを介して細胞膜に直接分泌される可能性がある。形質移入した細胞の表面では、gpORF2はランダムに分布しておらず、あるゾーンに集中しているが、これはタンパク質サブユニットの合同プロセスが活性であることを示唆しており、ことによると凝集して、さらに指令された何らかの前進した形になる。ウイルスの最終的な構築/成熟には、ゲノムRNAのキャプシド形成が必要であるので、ERの外の細胞質又は細胞膜の壁面内でこれを起こさなければならない。膜内のgpORF2の蓄積は、ウイルス構築を示唆するといえる。同時に、膜上のキャプシドタンパク質の配置は、成熟したウイルスが出芽を経て細胞外へ分泌する可能性を示唆する。さらに記載すべき注目される点は、翻訳及び修飾機能を備えたin-vitro翻訳系を使用する、in-vitroでのPORF2の転写及び翻訳によって、88kDのgpORF2を単量体と二量体の両方の形で産生できることである。gpORF2が相同的な二量体を形成する傾向があり、前記の相同的なgpORF2二量体によってキャプシドのキャプソメアが構成されることが例示されている(Jameel等、1996年、J. Virol. 第70巻: 207~216ページ)。Li等は、Frost Etching election顕微鏡によって、バキュロウイルスによって発現した組換えHEV VLPが、直径22~23nmの60個のp50サブユニットでできた正二重面体の対称ピリオン(T=1)を有することを発見した。この大きさの粒子の内腔は、約1kbのRNAを含むことができ、HEVゲノムは、長さ7.5kbであるので、自然のHEVは、 $T \geq 3$ の結晶格子構造であると推測されるが、キャプソメアの形態上の構造は類似している。T=3サブユニットの総数は、90個のキャプソメアである(Li等、1999年、virology 第265巻: 35~45ページ)。

【0012】

上記のことによると、HEVは、エンベロープをもたないウイルスである。ウイルスのキャプシドは、ORF2によってコードされたタンパク質でできている。このタンパク質には、主要な免疫エピトープおよび一部の中和性エピトープが組み込まれており、サブユニットワクチンを研究する際、最も好都合な断片となる。

10

20

30

40

50

【0013】

米国特許第5,885,768号のReyes等の最初の報告では、4匹のカニクイザルに、HEV Burma株ORF2 C末端2/3 (aa225~660)を含む大腸菌中に発現させた組換えタンパク質trpE-C2にミョウバンアジュバントを配合したものを、0、30日で50 μ g/1回分を投与することによって筋肉内注射した。別の2匹のサルを対照として使用し、アジュバントのみを与えた。4週間後、収集血液の抗体の増加に関する陽性の結果で、ウェスタンブロット法によって見出されたものはなかった。80 μ gのアジュバント未配合不溶性組換えタンパク質を投与することによる、そのうちの2匹のサルでの3回目の免疫化。4週間後、どちらのサルも陽性であった(WB)。次いで、6匹のサルを、各々が3匹のサルを含む第一群と第二群に分けたが、そのうちの2匹が3回又は2回の接種によって免疫化されており、1匹が対照である。第一群にはBurmaHEVを接種し、第二群にはMexicoHEVを接種した。結果は、(1)免疫化した群ではALTが常に正常であったが、対照では免疫化前よりも6~10倍高く上昇した。(2)免疫蛍光法によって肝臓生検試料で検出を行った。3回の投与で免疫化し、Burma株を接種したものを除くすべてのサルで抗原が発見された。(3)3回の投与で免疫化し、Burma株を接種したものを除くすべてのサルで、糞便中へのウイルスの排泄が連続的に見出された。この研究の検体は少ないが、ORF2由来の組換えタンパク質が、ウイルス肝炎の生化学指数を出さないようにし、サルが野生のHEVを接種された場合には、感染から完全に防御したことを示唆している。

10

【0014】

Tsarev等(1994年、Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 第91巻:10198~10202ページ;Tsarev等、1993年、J. Infect. Dis. 第168巻:369~378ページ;Tsarev等、1997年、Vaccine 第15巻:1834~1838ページ)は、昆虫(SF細胞)中のバキュロウイルスを使用して、HEV ORF2を発現させ、細胞溶液中に20nm~30nmの様々な大きさのタンパク質粒子を得た。感染細胞の分裂後期には、より小さい粒子の百分率が実質的に増大する。WB法を使用して、バキュロウイルスによって発現させたORF2を検出すると、25kD、29kD、35kD、40~45kD、55~70kD、72kDに大きさの異なる多数の特定のバンドが検出された。イオン交換法及び分子スクリーニング法を使用して、HEVに特異的なタンパク質を精製した。細胞に組換えウイルスを感染させた後1日目に、72kDの全ORF2ペプチドが最初に出現し、次いで徐々に消失した。2日目には、63kD及び55kDのペプチドが出現した。53kDのペプチドは、初日に大量に細胞溶液中に出現し、3日目に最高点に達した。これは、最初の72kDのタンパク質がランダムに切断されて、55kD(細胞溶解液中)及び/又は53kD(細胞溶液)のHEVタンパク質となることを示唆している。これら2種のタンパク質の配列決定によって、55kDがORF2のaa112~607に位置することが示されたが、53kDがaa112~578に位置し、63kDがaa112~660に位置することも示された。ELISAの結果は、55kDの活性が53kDよりも明らかに強いことを示した。昆虫内のバキュロウイルス中にaa112~660断片が発現した場合、63kDに加え、55kDの組換えHEVタンパク質も見出される。

20

30

40

【0015】

細胞を感染させてから7日目にSF9細胞を収集した。タンパク質を一次精製し、ミョウバンアジュバントと併せた。次いで、1回に50 μ gのタンパク質の筋肉内注射によってカニクイザルを免疫化した。4匹には1回分を与え、他の4匹には2回分を与えた(0d、28d)。最終投与の後、同じHEV系統(SAR-55、パキスタン人患者由来)の1000~10000CID50の投与量ですべてのサルに静脈内接種をした。15週間以内の、肝臓生検材料、血清、及び大便を毎週収集した。1回投与のサルでのウイルス接種前の抗体の力価は、1:100~1:10000であったが、2回投与群では、すべて1:10000であった(精製された55kDでコートされていた)。1回投与群では、ウイルス接種後9週間で1匹のサルが麻酔事故のために死亡した(結果では計算されて

50

いる)。2回投与群では、ウイルス接種後すぐに2匹のサルが原因不明で死亡した(結果では計算せず)。免疫化後の6匹のサルに、ALTの上昇もしくは肝臓生検の病理学的変化は見受けられず、ウイルス血症もなかった。1回投与群の4匹のサルでは、3匹がウイルスを排泄したが、2回投与群の2匹のサルでは、ウイルスの排泄が見られなかった。

【0016】

イオン交換法及び分子篩法によってバキュロウイルス系に発現させた55kDのタンパク質をさらに精製して、精製が99%超に到達するようにした。ミョウバンアジュバントと併せた後、1回分が50 μ g、10 μ g、2 μ g、0.4 μ g、0 μ g(対照)のタンパク質を4匹のアカゲザルにそれぞれ注射し、0及び28日投与した。最終投与後の4週間目に、同じウイルス(SAR-55)をサルに接種した。免疫化群の16匹のサルは、すべて正常であり、2 μ g投与の1匹のサル及び0.4 μ g投与の他のサルだけに、非常に軽度の病理学的変化が現われた。免疫化されたサルは、感染したが、肝炎を予防することができた。50 μ g投与の1匹のサル及び10 μ g投与の他のサルを除き、免疫化したすべてのサルにウイルスの排泄、及びウイルス血症も見られた。ほとんどのサルのウイルス量が制限されたが、期間は短縮されなかった。別の4匹のサルは、2 \times 50 μ gで免疫化し、最終投与後4週間目に100,000MID50の他のHEVを接種した。結果は同様であった。4匹のサルがすべて、ALTの上昇及び病理学的変化を示したわけではなかったが、1匹のサルだけはウイルス排泄及びウイルス血症を示さなかった。ウイルス量は、明らかに減少したが、期間は短縮されなかった。著者の意見によると、これらのサルでの全面的な防御の効果は、前回よりも悪かった。接種に使用したウイルス量が一因である可能性がある。この実験でのウイルス量は、300,000に達したが、前回は1000~10000MID50であった。さらに、0.4 μ g~50 μ g群の抗体の力価は、接種前には差を示さなかった。

【0017】

Genelabs companyのスタッフは、同じ昆虫内バキュロウイルスを使用してORF2aa112~660を発現させ、大量の可溶性組換え62kDタンパク質を得た。精製した後、カニクイザルに免疫化を施すと、投与量1000CID50のウイルス(Mexico株)接種から防御された(20 μ gで免疫化した3匹のサルは、罹患しなかった。2匹のサルではウイルスの排泄が見られず、1匹のサルでウイルス排泄量が減少した)。(Zhang等、1997年、Clin Diagn Lab Immunol、第4巻:423~8ページ。)

【0018】

McAtee等(1996年、Protein Expr Purif第8巻:262~270ページ)は、組換えバキュロウイルス中に発現させたBurmaORF2の62kD二量体を調製した。HPLC-MSによって、この二量体を別々に分離して、56.5kDと58.1kDの2本のペプチドにした。ペプチド集合体のフィンガープリント解析では、この2本のペプチドのN末端が同じaa112であり、C末端がaa637及びaa652で異なっていることが示された。さらに、56.5kDのタンパク質は、非常に良好な免疫原であった。

【0019】

オーストラリアのAnderson group(Anderson等、1999年、J. Virol. Methods、第81巻:131~142ページ;Li等、1994年、J. Clin Microbio.第32巻:2060~2066ページ;Li等、1997年、J. Med. Virol.、第52巻:289~300ページ;Li等、2000年、J. Med. Virol.第60巻:379~386ページ)は、大腸菌中に発現させたORF2のaa394~660(ORF2.1)を使用した。この産物は、GSTとのキメラタンパク質又はポリアルギニンタンパク質であり、高次構造の回復期エピトープを形成し得る。このエピトープは、回復期血清を非常に高率で検出できるが、断片のN末端側に伸長又は切断があった場合に消失する。ラットを組換えORF2.1タンパク質で免疫化した後30週目の血清を使用して、バキュロウイルス中に発現させたVLP

10

20

30

40

50

を被覆抗原として有する回復期の患者からの血清にブロッキングをかけた。阻止率は、81%～86%に達することになる。ORF2.1タンパク質で単クローン抗体を調製すると、ORF2.1の立体配座エピトープを識別できる2種の単クローン抗体2E2及び4B2と、識別可能な5種の単クローン抗体らしいものを得た。抗原としてVLPを有する回復期血清に2E2又は4B2のどちらを使用してブロッキングをかけても、阻止率は、60%に達し得る。これは、これら2種の単クローン抗体が、エピトープを識別でき、回復期血清中で抗体によって識別されるエピトープの主要な構成要素であることを示唆している。別のデータによって、ORIF2.1が、VLPにかなり類似した主要なエピトープ構造を有することが示された。このエピトープへの抗体は、HEV感染血清中に長期間存在し得る。このエピトープは、重要な防御エピトープであるが、ORF2.1について

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0020】

【特許文献1】米国特許第5,885,768号

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】Balayan等、1983年、Intervirology第20巻：23ページ

【非特許文献2】Visvanathan、1957年、Indian J. Med. Res. Suppl. 第45巻：1～30ページ

20

【非特許文献3】Wong等、1980年、Lancet. 第2巻：882～885ページ

【非特許文献4】Myint等、1985年、Am J Trop Med Hyg. 第34巻：1183～1189ページ

【非特許文献5】Belabbes等、1985年、J Med Virol. 第16巻：257～263ページ

【非特許文献6】Hau等、1999年、Am J Trop Med Hyg. 第60巻：277～280ページ

【非特許文献7】Tsega等、1992年、Clin. Infec Dis. 第14巻：961～965ページ

30

【非特許文献8】Dilawari等、1994年、Indian J Gastroenterol. 第13巻：44～48ページ

【非特許文献9】Hussaini等、1997年、J Viral Hepat. 第4巻：51～54ページ

【非特許文献10】Tam等、1991年、Virology第185巻：120～131ページ

【非特許文献11】Aye等、1992年、Nucleic Acids Res. 第20巻：3512ページ

【非特許文献12】Aye等、1993年、Virus Genes. 第7巻：95～109ページ

40

【非特許文献13】Huang等、1992年、Virology第191巻：550～558ページ

【非特許文献14】Reyes等、1993年、Arch Virol Suppl. 第7巻：15～25ページ

【非特許文献15】Goldsmith等、1992年、Lancet. 第399巻：328～331ページ

【非特許文献16】Mast等、1998年、Hepatology第27巻：857～861ページ

【非特許文献17】Kabrane-Lazizi等、1999年、Am J Trop

50

ic Medicine 第61巻：331～335ページ

【非特許文献18】Jameel等、1996年、J. Virol. 第70巻：207～216ページ

【非特許文献19】Li等、1999年、virology 第265巻：35～45ページ

【非特許文献20】Tsarev等(1994年、Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 第91巻：10198～10202ページ

【非特許文献21】Tsarev等、1993年、J. Infect. Dis. 第168巻：369～378ページ

【非特許文献22】Tsarev等、1997年、Vaccine 第15巻：1834～1838ページ 10

【非特許文献23】Zhang等、1997年、Clin Diagn Lab Immunol. 第4巻：423～8ページ

【非特許文献24】McAtee等、1996年、Protein Expr. Purif 第8巻：262～270ページ

【非特許文献25】Anderson等、1999年、J. Virol. Methods. 第81巻：131～142ページ

【非特許文献26】Li等、1994年、J Clin Microbio. 第32巻：2060～2066ページ

【非特許文献27】Li等、1997年、J. Med. Virol.、第52巻：289～300ページ 20

【非特許文献28】Li等、2000年、J. Med. Virol. 第60巻：379～386ページ

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0022】

(発明の概要)

本発明の一態様では、n重合体ポリペプチド(nは1～180の整数である)の形の、E型肝炎ウイルスのオープンリーディングフレーム(ORF)2(配列番号1で示す)のアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片であって、前記の配列番号1で示すE型肝炎ウイルスORF2又はその断片のアミノ酸を含むポリペプチドが、 30

1)アミノ末端がアミノ酸残基113と469の間から出発し、カルボキシル末端がアミノ酸残基596と660の間で終結しているポリペプチド、

2)アミノ末端がアミノ酸残基370と469の間から出発し、カルボニル末端がアミノ酸残基601と628の間で終結しているポリペプチド、

3)アミノ末端がアミノ酸残基390と459の間から出発し、カルボキシル末端がアミノ酸残基601と610の間で終結しているポリペプチド、

4)配列番号1のアミノ酸残基414～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド247、

5)配列番号1のアミノ酸残基429～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド232、 40

6)配列番号1のアミノ酸残基439～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド222、

7)配列番号1のアミノ酸残基459～660のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド201、

8)配列番号1のアミノ酸残基394～628のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド235N、

9)配列番号1のアミノ酸残基394～618のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド225N、

10)配列番号1のアミノ酸残基394～602のアミノ酸配列を有するポリペプチド 50

- 、すなわちポリペプチド 209N、
 11) 配列番号1のアミノ酸残基394~601のアミノ酸配列を有するポリペプチド
 、すなわちポリペプチド 208N、
 12) 配列番号1のアミノ酸残基394~606のアミノ酸配列を有するポリペプチド
 、すなわちポリペプチド NE2I、
 13) 配列番号1のアミノ酸残基390~603のアミノ酸配列を有するポリペプチド
 、すなわちポリペプチド 217D、
 14) 配列番号1のアミノ酸残基374~618のアミノ酸配列を有するポリペプチド
 、すなわちポリペプチド 205、
 15) 配列番号1のアミノ酸残基414~602のアミノ酸配列を有するポリペプチド 10
 、すなわちポリペプチド 189、
 16) 配列番号1のアミノ酸残基414~601のアミノ酸配列を有するポリペプチド
 、すなわちポリペプチド 188、
 17) 配列番号1のアミノ酸残基459~628のアミノ酸配列を有するポリペプチド
 、及び
 18) N末端に Me t が付加され、C末端の3'末端上のアミノ酸残基603の Pro
 において、5'~3'方向にアミノ酸配列 - Pro - Pro - Arg が付加されてC末端
 が修飾されている、配列番号1のアミノ酸残基 X ~ 603のアミノ酸配列を有するポリペ
 プチドであって、
 a) Xがアミノ酸残基394である場合の、配列番号2で示す前記ポリペプチド、す 20
 なわち NE2、
 b) Xがアミノ酸残基414である場合の、配列番号3で示す前記ポリペプチド、す
 なわち 193C、
 c) Xがアミノ酸残基429である場合の、配列番号4で示す前記ポリペプチド、す
 なわち 178C、
 d) Xがアミノ酸残基439である場合の、配列番号7で示す前記ポリペプチド、す
 なわち 168C、
 e) Xがアミノ酸残基449である場合の、配列番号8で示す前記ポリペプチド、す
 なわち 158C、
 f) Xがアミノ酸残基459である場合の、配列番号9で示す前記ポリペプチド、す 30
 なわち 148C、
 g) Xがアミノ酸残基469である場合の、配列番号10で示す前記ポリペプチド、
 すなわち 138Cが含まれるもの
 からなる群から選択されているポリペプチドを提供する
 本発明の別の態様では、上の1)から18)で表される前述のポリペプチドのいずれか
 1つとの相同性が少なくとも80%であり、抗原性や免疫原性など、生物学的特性がほぼ
 同一であるポリペプチドをさらに提供する。
 【0023】
 別の態様では、本発明はさらに、上述の本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチ
 ド配列を含む組換え発現ベクターも提供する。もう1つの態様では、本発明はさらに、本 40
 発明のポリペプチドを発現させることのできる、上記の組換え発現ベクターのいずれか1
 種で形質転換した宿主細胞も提供する。
 【0024】
 本発明の別の態様では、少なくとも1種の本発明のポリペプチドもしくはその任意の組
 合せ、及び場合により薬剤として許容される賦形剤及び/もしくはアジュバントを含む、
 哺乳動物のE型肝炎ウイルス感染を予防及び/又は治療するためのワクチン組成物をさら
 に提供する。
 【0025】
 本発明の別の態様では、本発明のポリペプチド及びインフルエンザウイルス由来の赤血
 球凝集素抗原の保存断片を含むキメラタンパク質をさらに提供する。 50

【 0 0 2 6 】

別の態様では、本発明はさらに、哺乳動物の E 型肝炎ウイルス感染を予防及び / 又は治療するためのワクチン組成物であって、本発明のポリペプチドの 1 種とインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片とからなるキメラタンパク質、並びに任意選択の薬剤として許容される賦形剤及び / 又はアジュバントを含む組成物も提供する。

【 0 0 2 7 】

別の態様では、本発明はさらに、哺乳動物にワクチン接種を施して E 型肝炎ウイルス感染を予防するための、上述のワクチン組成物の使用を提供する。

【 0 0 2 8 】

別の態様では、本発明はさらに、哺乳動物の E 型肝炎ウイルス感染を予防及び / 又は治療するための方法であって、対象に、予防及び / もしくは治療有効量の少なくとも 1 種の上述のポリペプチド、又は上述のポリペプチドの少なくとも 1 種及びインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片からなるキメラタンパク質を投与することを含む方法も提供する。

10

【 0 0 2 9 】

別の態様では、本発明はさらに、診断に有効な量の少なくとも 1 種の本発明のポリペプチド又はその何らかの併用物を含む、生物検体の E 型肝炎ウイルス感染を診断するための診断キットも提供する。

【 0 0 3 0 】

別の態様では、本発明はさらに、生物検体の E 型肝炎ウイルス感染を診断するための診断キットであって、診断に有効な量の少なくとも 1 種の本発明のポリペプチド又はその何らかの併用物を含み、さらに E 型肝炎ウイルス O R F 3 由来免疫原性エピトープを含有するポリペプチド又はその免疫原性断片も含み、前記の E 型肝炎ウイルス O R F 3 由来免疫原性エピトープを含有するポリペプチド又はその免疫原性断片が、任意選択で前記ポリペプチドに共有結合しているキットも提供する。

20

【 0 0 3 1 】

別の態様では、本発明はさらに、生物検体の E 型肝炎ウイルス感染を診断する方法であって、抗原と抗体の相互作用に適する条件下、上述の診断キットと検出対称の検体とを接触させることを含む方法も提供する。

【 0 0 3 2 】

別の態様では、本発明はさらに、生物検体において、E 型肝炎ウイルスに対する全抗体を検出する方法、E 型肝炎ウイルスに対する I g G 抗体を検出する方法、及び E 型肝炎ウイルスに対する I g M 抗体を検出する方法も提供する。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 3 】

【 図 1 】ポリペプチド 2 0 1 を発現するプラスミド p T O - T 7 - O R F 2 - 2 0 1 の作製を示す略図である。

【 図 2 】発現ベクター p T O - T 7 - O R F 2 - 2 0 1 で形質転換した誘導大腸菌の培養物可溶化液（培地を遠心分離にかけるステップ、沈殿した細胞を収集するステップ、次いでペレットを 0 . 1 % の S D S を含む供給液で再懸濁させるステップ、これを沸騰湯中で 1 0 分間さらに処理するステップ、次いで 1 0 分間 1 2 , 0 0 0 r p m で遠心分離するステップ、上清を取り出して測定するステップを経た）に関して、1 2 % ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (S D S - P A G E) (クーマシーブリリアントブルー R 2 5 0 で染色) によって分析した結果を示す図である。レーン 1 および 2 は、それぞれ 2 種の異なる細菌培養物可溶化液を含む。U v i ゲル画像処理システム (U V I t e c , l t d . 、型式 D B T - 0 8) によって解析すると、発現された産物は総タンパク質のほぼ 3 5 % までになる。

40

【 図 3 】4 回分のポリペプチド 2 0 1 からの精製ポリペプチド 2 0 1 の封入体の 2 M および 4 M 尿素溶液に関する、クーマシーブルー R 2 5 0 で染色を行った 1 2 % ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル (S D S - P A G E) の解析結果を示す図であり、前

50

記試料は、発現ベクター p T O - T 7 - O R F 2 - 2 0 1 が組み入れられている組換え大腸菌から得る。この結果は、二量体ポリペプチドの割合が 1 0 % ~ 6 0 % に変動しており、再生を経て二量体ポリペプチドを形成したポリペプチド 2 0 1 が若干あることを示している。再生割合は、1 × P B S (2 0 × P B S (1 L) : N a ₂ H P O ₄ - 1 2 H ₂ O、7 3 . 3 4 4 g ; K H ₂ P O ₄、4 g ; N a C l、1 6 3 . 6 3 2 g ; K C l、4 . 0 2 4 g、p H 7 . 4 5) 中で再生した試料よりも低い。図 4 で示すように、二量体の百分率は 9 9 % である。

【図 4】ポリペプチド 2 0 1 と H E V 感染患者からの血清のウェスタンブロット分析結果を示す図である。レーン 1 ~ 3 は、S D S - P A G E 対照であり、レーン 1 はタンパク質分子量マーカーであり、レーン 2 は、1 × P B S 中の再生ポリペプチド 2 0 1 試料であり、レーン 3 は、沸騰湯浴中で 1 0 分間処理した再生ポリペプチド 2 0 1 であり、レーン 4 および 5 は、それぞれレーン 2 および 3 の試料に対応するウェスタンブロット結果である。

10

【図 5】前述のポリペプチド 2 0 1 の、動的光散乱計による水和状態の動的半径から得た結果を示す図であり、ポリペプチド 2 0 1 は、ゲル濾過 H P L C によって予め精製し、1 0 分間 2 0 0 0 0 g で遠心分離し、0 . 1 μ m の濾過膜で濾過してある。

【図 6】ポリペプチド 2 0 8 N、2 0 9 N、および 2 2 5 N と、マウスの M a b 1 F 6、2 C 9、および 3 F 5 との反応のウェスタンブロット結果を示す図である。レーン 1、2、3 はそれぞれ、ポリペプチド 2 0 8 N の、沸騰湯浴中で 1 0 分間処理した再生試料、再生試料、および沈殿させた再生試料に対応し、レーン 4、5、6 はそれぞれ、ポリペプチド 2 0 9 N の、沸騰湯浴中で 1 0 分間処理した再生試料、再生試料、および沈殿させた再生試料に対応し、レーン 7、8、9 はそれぞれ、ポリペプチド 2 2 5 N の、沸騰湯浴中で 1 0 分間処理した再生試料、再生試料、および沈殿させた再生試料に対応し、レーン 1 0 は、対照としての単量体ポリペプチド 2 0 1 である。

20

【図 7】様々な投与量の（フロイントアジュバントを含有する）ポリペプチド 2 0 1 ワクチンで免疫化した後のマウスの血清中に産生された H E V 抗体のプロフィールを示すグラフである。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、E L I S A によって測定した O D _{450nm/620nm} である。

【図 8】様々な投与量の（アジュバントを含まない）ポリペプチド 2 0 1 ワクチンで免疫化した後のマウスの血清中に産生された H E V 抗体のプロフィールを示すグラフである。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、E L I S A によって測定した O D _{450nm/620nm} である。

30

【図 9】様々な投与量の（アジュバントとして水酸化アルミニウムを含有する）ポリペプチド 2 0 1 ワクチンで免疫化した後のマウスの血清中に産生された H E V 抗体のプロフィールを示すグラフである。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、E L I S A によって測定した O D _{450nm/620nm} である。

【図 10】図 1 0 A、1 0 B、1 0 C、および 1 0 D は、それぞれ N o . 1、N o . 2、N o . 3、および N o . 1 3 にグループ分けしたアカゲザルの血清中に産生された H E V 抗体のプロフィールを示すグラフである。これらの対象動物にはすべて、静脈内注射によって H E V を接種している。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、E L I S A によって測定した O D _{450nm/620nm} である。この結果は、N o . 1、N o . 2、および N o . 3 の群のサル血清中に、抗 N E 2 I - I g G が G E N E L A B S - I g G および W A N T A I 抗 H E V - I g G より 5 ~ 1 0 日早く存在していること、ならびに N o . 1 3 のサルの血清において抗 N E 2 I - I g G は検出可能であるが、G e n e l a b s 抗 H E V - I g G および W A N T A I 抗 H E V - I g G は、N O . 1 3 のサル血清中に検出されないことを例示している。

40

【発明を実施するための形態】

【0034】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

別段の指示がない限り、本明細書で使用する用語又は術語は、当技術分野で通常使用さ

50

れているものと同じである。細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、及び免疫学的手順における通常の製造が、当技術分野で定型化した技術として実施される。本発明では、別段の指示がない限り、本明細書で使用するこれらの用語は、以下のような意味である。

【0035】

「E型肝炎ウイルス」又は「HEV」は、i)水系感染による肝炎を引き起こし、ii)血清学的特性に関して、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、又はD型肝炎ウイルス(HDV)と区別し、iii) pTZKF1(ET1.1)に挿入された1.33kbのcDNAに相同的なゲノム領域を含むウイルス、ウイルスの型、又はウイルスのクラスを指し、前記プラスミドは、American Type Culture Collection(ATCC)に目録番号67717で保管されている大腸菌株の中に含まれている。

10

【0036】

本発明のポリペプチド

一態様では、本発明は、驚くべきことに、抗体との十分な反応性及び/又は免疫原性を有する一連のHEVポリペプチド断片であり、配列番号1で示すHEV ORF2のアミノ酸配列中に含まれる断片を提供する。個々の断片の名称は、実施例6の表1に出ている。

【0037】

本発明における、アミノ酸配列内の配置によるアミノ酸残基の番号付けは、国際純正及び応用化学連合及び国際生化学連合、Joint commission on biochemical Nomenclature、「アミノ酸及びペプチドの命名及び記号表示(Nomenclature and symbolism for Amino Acids and Peptides)」、Pure Appl.Chem.第56巻、595~624ページ(1984年)の発番方式に従う。具体的には、配列番号1のコード出発部位Metを1位と示し、5'から3'の方向に大きくなる。

20

【0038】

本発明の一態様では、n-重合体ポリペプチド(nは1~180の整数である)の形の、配列番号1で示す、E型肝炎ウイルスORF2のアミノ酸配列又はその断片を含むポリペプチドを提供する。nが2であるとき、前記ポリペプチドは二量体ポリペプチドであり、nが3であるとき、前記ポリペプチドは三量体ポリペプチドであり、nが4であるとき、前記ポリペプチドは四量体ポリペプチドであり、以下同様である。

30

【0039】

本発明では、配列番号1で示すアミノ酸配列を含む前記ポリペプチド断片のアミノ末端(5'末端)は、アミノ酸残基113と469の間、好ましくはアミノ酸残基370と469の間、より好ましくはアミノ酸残基390と459の間から出発し、前記ポリペプチドのカルボキシル末端(3'末端)は、アミノ酸残基596と660の間、好ましくはアミノ酸残基601と628の間、より好ましくはアミノ酸残基601と610の間で終結する。具体的には、本発明の好ましいポリペプチドは、ポリペプチド247、ポリペプチド232、ポリペプチド222、ポリペプチド201、ポリペプチド235N、ポリペプチド225N、ポリペプチド209N、ポリペプチド208N、ポリペプチドNE2I、ポリペプチド217D、ポリペプチド205、ポリペプチド189、ポリペプチド188、及び配列番号1のアミノ酸残基459~628のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

40

【0040】

本発明はさらに、N末端にMetが付加され、C末端の3'末端上のアミノ酸残基603のProにおいて、5'~3'方向にアミノ酸配列-Pro-Pro-Argが付加されてC末端が修飾されている、配列番号1のアミノ酸残基X~603のアミノ酸配列を有するポリペプチドに関するものであり、これには、a)NE2、b)193C、c)178C、d)168C、e)158C、f)148C、g)138Cが含まれる。

【0041】

別の態様では、本発明はさらに、前述のポリペプチドのいずれか1種との相同性が少な

50

くとも80%であり、抗原性や免疫原性など、生物学的特性がほぼ同一であるポリペプチド、すなわち、本発明のポリペプチドの派生物に関する。具体的には、このポリペプチドは、前記ポリペプチドのアミノ酸が、前記ポリペプチドのアミノ酸配列と共に、当該ポリペプチドのN末端及び/又はC末端に隣接する、自然配列でないアミノ酸を含むが、それでも抗原性や免疫原性など、生物学的特性が当該ポリペプチドとほとんど類似したままであるという条件の本発明のポリペプチド派生物であると考えられる。したがって、同じ物に相当するDNA断片を本発明の派生DNAと称する。たとえば、発現及び/又は精製の目的のために、そのN末端に開始アミノ酸(メチオニン)又は他のリーディングペプチド及び/もしくはシグナルペプチドを加える、あるいはそのC末端にいくつかのヒスチジンを加えることによってその精製が促進される。

10

【0042】

本発明はさらに、抗原性及び/もしくは免疫原性など、生物学的特性が前述のポリペプチドのいずれか1種と同一であるポリペプチド、又は前述のポリペプチドのいずれか1種との配列同一性が少なくとも80%であるポリペプチドも考えている。用語「同一性百分率」は、最適に並べ合わせて得た2種の比較しようとする配列間で一致するヌクレオチド又はアミノ酸残基の百分率を表すものとし、この百分率は単に統計的なものであり、2配列間の相違は、ランダムに、かつその全長にわたって分布している。2種のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の配列比較は、その各配列を最適に並べ合わせた後にこれらの配列を比較することによって従来どおりに実施し、局所領域の配列類似性を特定及び比較するためには、区分又は「比較のウィンドウ(window of comparison)」によって前記の比較を行う。比較のための最適な配列の並べ合わせは、手作業でなく、Smith及びWaterman(1981年)のAd. App. Math. 第2巻: 482ページの局所相同性アルゴリズム、Neddleman及びWunsch(1970年)のJ. Mol. Biol. 第48巻: 443ページの局所相同性アルゴリズム、Pearson及びLipman(1988年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第85巻: 2444ページの類似性検索法、並びにこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム(米国ウィスコンシン州マディソン575、Science Drive、Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer GroupのGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N、及びTFASTA)によって生じさせる。

20

30

【0043】

2種の核酸配列又はアミノ酸配列の同一性百分率は、最適に並べ合わせたその2種の配列を比較することによって決定するが、その2種の配列の最適な並べ合わせでも、比較対象の核酸配列又はアミノ酸配列が基準配列に対して付加又は欠失を含んでいるかもしれない。同一性百分率は、2種の配列間でヌクレオチド又はアミノ酸残基が一致する同一位置の数を決定し、これを比較する位置数で割り、得られた結果を100倍することによって計算して、この2種の配列間の同一性百分率を得る。

【0044】

たとえば、ウェブサイト<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>から入手できるプログラムBLAST「BLAST2配列」が使用できるが、これでは、パラメータはデフォルト(特に、空のギャップペナルティーは5、伸長のギャップペナルティーは2であり、行列はプログラム「blosom62」などによって得る)であり、並べ合わせる2種の配列間の同一性百分率は、このプログラムによって直接に計算される。

40

【0045】

本発明のポリペプチドの調製

本発明のポリペプチドは、化学的合成方法や組換えDNA技術など、当技術分野で知られている方法によって調製できる。好ましくは、本発明のポリペプチドの調製方法は、組換えDNAを発現させることによって行うことができる。組換えタンパク質を調製する方法は、当技術分野でよく知られており、本明細書で詳細に述べる必要はないが、実施例中

50

の方法を参照することもできる。組換えタンパク質の産生に使用できる細胞に関して言及すべきものとしては、細菌細胞（P. O. Olin's及びS. C. Lee、1993年、Curr. Opin. Biotechnology第4巻：520～525ページ）、酵母細胞（R. G. buckholz、1993年、Curr. Opin. Biotechnology第4巻：538～542ページ）、動物細胞、特に哺乳動物細胞培養物（C. P. Edwards及びA. Aruffo、1993年、Curr. Opin. Biotechnology第4巻：558～563ページ）、及び昆虫細胞がある。昆虫細胞での方法については、たとえば、バキュロウイルス（V. A. Luckow、1993年、Curr. Opin. Biotechnology第4巻：564～572ページ）を参照されたい。これに関して、本発明はさらに、上述のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターも提供する。本発明はさらに、そこに含まれるヌクレオチド配列によってコードされる前記ポリペプチドを発現させることのできる、上述の組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞も提供する。

10

【0046】

本発明の一実施形態では、大腸菌を使用して、次の本発明のポリペプチド、すなわち、ポリペプチド247、ポリペプチド232、ポリペプチド222、ポリペプチド201、ポリペプチド235N、ポリペプチド225N、ポリペプチド209N、ポリペプチド208N、ポリペプチドNE2I、ポリペプチド217D、ポリペプチド205、ポリペプチド189、ポリペプチド188、及びポリペプチドa) NE2、b) 193Cを個々に発現させる。

20

【0047】

前記ポリペプチドの単量体と二量体の比、重合体ポリペプチドの生成量、及びその個々のラジウムを測定する（詳細は実施例6を参照のこと）。結果として、発現した産物は、リフォールディングされる傾向があることが示されている。リフォールディング後に溶液中に安定な重合体が自己生成する能力によって、HEVを予防及び/又は治療するためのワクチンとして使用するのに特に適する本発明のポリペプチドができる。本発明の実施形態の1つでは、ある試験で、二量体、三量体、及び四量体を含む重合体が検出されている。現在の方法では限度があるが、推定上の三量体は、実際には二量体と四量体の適切な比の混合物でできている可能性がある。方法論が向上することによって、本発明のポリペプチドがより大きなポリペプチドを生成し得ることも想定できる。刊行された参考文献（Jameel等、1996年、J. Virology第70巻：207～216ページ；Li等、1999年、Virology第265巻：35～45ページ）から推論すると、自然のHEVは90個の小粒子からなり、各小粒子がORF2ポリペプチドの二量体である可能性が高い。したがって、本発明のポリペプチドは、最高で180重合体のポリペプチドである重合体、又はそれよりも長い重合体を形成し得ると予想するのが妥当であり、ウイルスの構造を知る上での進展となる。

30

【0048】

本発明の別の好ましい実施形態では、封入体の形のポリペプチド201が大腸菌によって高い収率で発現されるが、発明者は、驚くべきことに、前記封入体がpH7.45のPBS緩衝液中で自発的に自己再生でき、これによって、塩酸グアニジンを加え、次いで多段階の透析にかけるステップを含めて、実質的に回収率を低下させる、時間がかかりかつ冗長な従来の変性/再生プロセスが回避されることを発見した。その上、大腸菌によって同時に発現される他の望ましくないタンパク質封入体は、自発的に自己再生できないので、単に遠心分離し、上清を回収することによって、本発明の問題のタンパク質が実質的に精製できる。

40

【0049】

本発明のポリペプチドとインフルエンザウイルス由来赤結集凝集素抗原の保存断片からなるキメラタンパク質

本発明の別の態様では、上述のポリペプチドのいずれか1種とインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片とからなるキメラタンパク質も提供する。赤血球凝集素

50

抗原（以下ではHAと示す）は、2種のインフルエンザウイルス表面抗原の1つであり、対象血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体を特異的に検出する際に使用される最もよく導入される抗原である。動物にHAをワクチン接種して産生させた抗体によって、レシート（*receipt*）がインフルエンザウイルスに再感染するのを有効に予防できることは知られている。したがって、HAに対する抗体が集団の大部分に与えられていると考えるのが妥当である。これまでの報告（McEwen J.等、*Vaccine*、1992年；第10巻（6）：405～11ページ）によると、エピトープ91～108aaは、A型インフルエンザウイルスのH3株すべてのHA遺伝子中にある保存アミノ配列である。本発明の好ましい一実施形態ではまず、遺伝子工学によって、Gly-Gly-Serなど、免疫原性の高い本発明のHEV ORF2遺伝子のポリペプチド断片に、HA遺伝子（91～108aa）を柔軟に連結して、原核生物発現系、特に大腸菌中でのキメラ発現を確立させる。次いで、予めインフルエンザウイルスを感染させることによって産生させたHA抗体で追加免疫を行って、力価の高い防御的な抗HEV抗体を得る。この方法では、本発明のポリペプチドのORF2断片だけを含むワクチンに優るHEVワクチンが得られる。

10

【0050】

本発明での教示を考えて、当分野の技術者は、HA遺伝子中の他の保存断片から、本発明のワクチン組成物に有用なエピトープを選択することもできる。HAの特定のエピトープと本発明のポリペプチドを連結する特定の柔軟なリンカーについては、適切なペプチド断片又はその類似体からなっていてよいが、ただし、本発明のポリペプチドと選択されたHA断片の連結を助長し、哺乳動物のHEV感染の予防/治療に関して本発明のポリペプチドの使用にほとんど影響を及ぼさないものとする。本発明のポリペプチドとHAを連結するリンカーの選択が、主として選択された本発明のポリペプチドの特性に応じて決まることは理解されるはずである。たとえば、HAに連結することにした選択された本発明のポリペプチドに応じて、異なるリンカーを選択すればよい。本発明では、使用するHAの保存断片がアミノ酸残基91～108からの断片であることが好ましい。

20

【0051】

免疫原としての本発明のポリペプチドと選択したHA断片を連結するリンカーは、化学合成技術など、従来の合成技術によって望ましく合成することができる。さらに、当分野の技術者には、自動ペプチド合成装置によるt-BOC法など、標準の化学的方法に従ってペプチドを合成することもできる（たとえば、L.A.Carpino、*J. Am. Chem. Soc.* 第79巻：4427ページ、1957年を参照のこと）。しかし、ペプチドは、タンパク質を化学的に加水分解しても、他の知られている方法によっても産生できる。

30

【0052】

あるいは、本発明のポリペプチドとHAのキメラタンパク質は、HA断片及び本発明のポリペプチドをコードする配列を含むDNA分子の核酸配列で形質転換した宿主細胞によって産生させることができ、前記DNA分子は組換えDNA技術など、従来の遺伝子工学的的方法によって宿主微生物又は宿主細胞中でクローン化することによって得られる。形質転換した細胞での組換え技術によって生成させる場合、得られる組換えキメラタンパク質は、型通りの方法によって培地もしくは宿主細胞、又はその両方から精製及び回収できる。組換え法によって産生された前記キメラタンパク質は、組換えDNA技術による組換え産生の際、得られるペプチドを細胞体又は培地からほとんど分離できる程度に単離される。さらに、得られるペプチドのためのコード配列は、合成によって、あるいは知られている方法に従ってウイルスRNAを使用し、又はそのcDNAを含む入手可能なプラスミドを使用することによって調製できる。

40

【0053】

この方法における使用では、上述のキメラタンパク質は、その産生を増大させ、又はその精製を促進する目的で、一般に知られている作製物向けにも他の作製物向けにも設計できる。適切な系及びベクターは知られており、公的に入手でき、又は大腸菌、バチルス、

50

ストレプトマイセス、サッカロミケス (*Saccharomyces*)、哺乳動物、酵母、昆虫細胞、及び植物細胞など、様々な微生物及び細胞中のクローン化及び発現キメラペプチドが市販されている。

【 0 0 5 4 】

組換え又は合成によって産生されたキメラタンパク質は、型通りの精製方法によって精製できる。当分野の技術者には、問題の用途に合致するポリペプチドの所望の純度が容易に決定できる。

【 0 0 5 5 】

ワクチン組成物

別の態様では、本発明はさらに、少なくとも1種の本発明のポリペプチドもしくはその何らかの併用物と、任意選択の薬剤として許容される賦形剤及び/もしくはアジュバントとを含む、哺乳動物のE型肝炎ウイルス感染を予防及び/又は治療するためのワクチン組成物も提供する。

10

【 0 0 5 6 】

さらに別の態様では、本発明はさらに、本発明のポリペプチド及びインフルエンザウイルスの赤血球凝集素抗原由来保存断片を含有するキメラタンパク質と、任意選択の薬剤として許容される賦形剤及び/もしくはアジュバントとを含む、哺乳動物のE型肝炎ウイルス感染を予防及び/又は治療するためのワクチン組成物も提供する。

【 0 0 5 7 】

本発明のさらに別の態様では、哺乳動物にワクチン接種を施してE型肝炎ウイルス感染を予防する、上記のワクチン組成物の使用も提供する。

20

【 0 0 5 8 】

本発明では、接種又は治療の対象となる哺乳動物には、それだけに限らないが、ヒト、及びヒヒ、類人猿、サルなど、他の霊長類、ウシ、ヤギ、ブタ、ウサギ、マウスなど、実用動物、並びにネコ、イヌなど、ペット類が含まれる。前記ワクチン組成物は、治療及び/又は予防に有効な量の少なくとも1種の本発明のポリペプチドを含有し、前記の有効量は、ある期間投与した後、HEVに感染した対象を有効に治療し、又は対象のHEV感染を予防するのに十分な量である。

【 0 0 5 9 】

本発明のワクチン組成物は、単独で使用することも、医薬用又は予防法向け処方成分として使用することもでき、任意選択で、放出制御剤を含む、薬剤として許容される賦形剤を含有する。前記賦形剤はさらに、HEV感染を治療及び/又は予防するための投与に適する薬剤として許容される媒介物又は希釈剤を含んでもよい。薬剤として許容される適切な媒介物とは、生物学的に不活性かつ/又は非毒性のものを指す。所望の用途に従って、当技術分野で知られている様々な媒介物が選択できる。通常、前記媒介物は、それだけに限らないが、無菌食塩水、ラクトース、スクロース、オルトリン酸カルシウム、ゼラチン、デキストリン、寒天、ミョウバン、酸化アルミニウム、水酸化アルミニウム、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、及び水からなる群から選択できる。さらに、媒介物又は希釈剤は、単独又はパラフィンとの併用で、モノステアリン酸グリセリル/ジステアリン酸グリセリルなど、放出制御性物質をさらに含んでもよい。さらに、可溶性ガラスを含む従来の徐放性重合体製剤も使用できる。

30

40

【 0 0 6 0 】

さらにまた、所望時には、少なくとも1種の本発明のポリペプチド又はその何らかの併用物を含む本発明のワクチン組成物は、他の治療/予防薬をさらに含んでもよい。たとえば、前記組成物は、HEV感染の治療又は予防で有用な様々な薬品の「カクテル混合物」を含んでもよい。このようなカクテル混合物は、インターフェロン、ヌクレオチド類似体、及び/又はN-アセチル-システインなど、他の薬品をさらに含んでもよい。

【 0 0 6 1 】

少なくとも1種の本発明のポリペプチドを含む本発明のワクチン組成物は、任意選択で、アジュバントやサイトカインなど、対象における抗体及びT細胞の応答をさらに誘導す

50

るのに有用な免疫系調節薬をさらに含んでもよい。前記調節薬には、従来のミョウバンを主体としたアジュバント、ムラミルジペプチド、保存剤、化学安定剤、又は他の抗原タンパク質が含まれる。一般に、安定剤、アジュバント、又は保存剤などは、所望の適用例での効果が最高の処方をも最も効果的に決定する。適切な保存剤には、クロリルブチノール(chlorylbutynol)、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、グリセリン、及びフェノールが含まれる。

【0062】

本発明のワクチン組成物を使用して哺乳動物のH E V感染を予防及び/又は治療する方法

別の態様では、本発明は、対象に予防及び/又は治療に有効な量の本発明のポリペプチド、又は少なくとも1種の本発明のポリペプチド及びインフルエンザウイルス赤血球凝集素の保存断片からなるキメラタンパク質を投与することを含む、哺乳動物のE型肝炎ウイルス感染を予防及び/又は治療する方法を提供する。特に、前記方法は、対象に本発明のワクチン組成物を投与するステップを含む。本発明が選択する保存断片は、91~108個のアミノ酸残基からのアミノ酸断片であることが好ましい。

【0063】

これらの組成物の適量は、所望の応答レベルに基づいて決定してよい。一般に、本発明のポリペプチドを含む組成物は、約5ugと約200ugの間の粒子を含有してよい。このような組成物は、1回又は一続きの接種、たとえば、2~6カ月間隔で3回の接種として投与してよい。また適切な投与量は、単剤治療として投与する場合、患者の健康状態、体重、又は年齢、並びに免疫原成分の従来の投与量などの要因を考慮に入れて、治療を行う医師の判断によって決定してよい。患者の状態が改善し、又は所定の病原体への暴露の増加が見込まれれば、本発明のポリペプチドを含む維持量の組成物を必要に応じて投与すればよい。その後、投与量、投与頻度、又はその両方を、所望の効果が保たれるレベルに減らせばよい。その時に、治療を止めるべきである。しかし、所定の好ましくない状態が再発すれば、各個体に長期間の断続的な治療が求められることもある。

【0064】

本発明のポリペプチドを含む組成物は、たとえば非経口投与、特に筋肉内又は皮下、並びに経口投与など、何らかの適切な経路によって投与してよい。経肺、経鼻、点耳、経肛門、経皮、点眼、静脈内、動脈内、腹腔内、経粘膜、舌下、皮下、脳内など、他の経路を使用してもよい。

【0065】

本発明のワクチン組成物の調製をして、液状の溶液又は懸濁液としての注射用組成物又はワクチンを製剤すればよい。注射の前に液体になる溶液又は懸濁液に適する固体剤形を調製してもよい。ある実施形態では、製剤が、放出を制御し、かつ/又は送達を長引かせるために、乳化されていても、リポソーム又は可溶性ガラスに封入されていてもよい。あるいは、製剤は、エアロゾル又はスプレーの形でもよい。製剤は、経皮パッチに含まれていてもよい。活性成分は、薬剤として許容され、活性成分と適合するいくつかの医薬添加物と混合してよい。医薬添加物には、たとえば、フロイント不完全アジュバント、細菌性のリポ多糖体、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、ムラミルジペプチド、レシチン、緩衝物質、セルロースを素材とした物質、及びポリエチレングリコールが含まれる。

【0066】

生物検体においてH E Vに対する抗体I g G、I g M、又は全抗体を検出する診断キット及び方法

本発明のポリペプチドは、生物検体においてH E Vに対する抗体I g G、I g M、又は全抗体の存在を検出するために使用でき、既存の検出キット又は検出法より感度及び特異性が高いことが特徴である。したがって、本発明は、抗体/抗原相互作用に適する条件下、検出すべき検体と検出に有効な量の本発明のポリペプチドを接触させるステップを含む、生物検体におけるH E V感染の存在を判定する方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 7 】

本発明で検出対象となる生物検体を供与するものには、それだけに限らないが、ヒト、及びヒヒ、類人猿、サルなど、他の霊長類、ウシ、ヤギ、ブタ、ウサギ、マウスなど、実用動物、並びにネコ、イヌなど、ペット類が含まれる。

【 0 0 6 8 】

本発明の別の態様では、生物検体においてE型肝炎ウイルスに対する抗体I g Gを判定する診断キットであって、少なくとも1種の本発明のポリペプチドを含み、望むなら、前記ポリペプチドは、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出対象の生物検体のI g Gに指向性のある、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗体抗I g G、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；望むなら、適切な緩衝系をさらに含むキットを提供する。

10

【 0 0 6 9 】

本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、抗体は抗ヒトI g G抗体である。より具体的には、本発明のI g G抗体用検出キットは、HEV ORF3内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。

【 0 0 7 0 】

前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることもできる。

20

【 0 0 7 1 】

本発明の別の態様では、生物検体においてE型肝炎ウイルスに対する抗体I g Mを判定する診断キットであって、検出対象の生物検体に由来するI g Mに指向性のある捕捉抗体としての、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗体抗I g Mを含み、望むなら、前記捕捉抗体は、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも1種の本発明のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；望むなら、適切な緩衝系をさらに含むキットを提供する。

30

【 0 0 7 2 】

本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、抗体は抗ヒトI g M抗体である。より具体的には、本発明のI g M抗体用診断キットは、HEV ORF3内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片は、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。

【 0 0 7 3 】

前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることもできる。

40

【 0 0 7 4 】

本発明の別の態様では、生物検体においてE型肝炎ウイルスに対する抗体I g Mを判定する診断キットであって、検出対象の生物検体に由来するI g Mに指向性のある捕捉抗体としての、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗体抗I g Mを含み、望むなら、前記捕捉抗体は、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも1種の本発明のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；望むなら、適切な緩衝系をさらに含むキットを提供する。

【 0 0 7 5 】

50

本発明の一実施形態では、検出対象の前記生物検体はヒト由来であり、抗体は抗ヒトIgM抗体である。より具体的には、本発明のIgM抗体用診断キットは、HEV ORF3内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片は、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。

【0076】

前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることも

10

【0077】

本発明のさらにまた別の態様では、生物検体においてE型肝炎ウイルスに対する全抗体を判定する診断キットであって、少なくとも1種の本発明のポリペプチドを含み、望むなら、前記ポリペプチドは、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも1種の請求項1に記載のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；請求項1に記載のポリペプチドから選択された、支持体表面に予め塗布するための前記ポリペプチド、及び請求項1に記載のポリペプチドから選択された検出可能な標識ポリペプチドが同じポリペプチドでも異なるものでもよいキットを提供する。

20

【0078】

より具体的には、本発明の全抗体用診断キットは、HEV ORF3内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片は、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。

【0079】

前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のHEV ORF3内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることも

30

【0080】

当技術分野では、前述の診断キットにおいて、様々な市販品を得ることも、様々な動物を利用する方法によって型通りに産生することもできる抗ヒトIgG又は抗ヒトIgMを使用することが知られている。あるいは、検出対象の生物検体を供与する特定の動物に対する抗IgG又は抗IgMを使用するが、これは、関係のある動物を利用することによって生成できる。抗体を調製する目的では、選択される動物には、それだけに限らないが、ヤギ、ヒツジ、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、ブタなどが含まれる。標識化のための前記の検出可能な標識を単独又は他の組成物もしくは化合物との併用で使用すると、検出可能なシグナルが得られて、検体中の問題の物質の存在を視覚化できる。前記の検出可能な標識は、検出の技術分野で知られており、かつ容易に入手できる材料でよく、それには、これだけに限らないが、酵素マーカー、蛍光マーカー、放射性マーカーなどが含まれる。したがって、本発明は、検出標識を特定の選択に限定するものではなく、当技術分野で知られている検出法がすべて含まれるものとする。利便性を考えて、前記検出剤は、キットの形で提供できる。

40

【0081】

前記キットは、任意選択で、本発明のポリペプチドを予め塗布したマイクロタイタープレート、適切に処方された様々な希釈剤及び/もしくは緩衝剤、標識物質、又は酵素基質、補因子、発色団など、特異的に結合した抗原/抗体複合体を検出するためのシグナルを発生する他の薬品をさらに含む。その中の他の構成要素は、当分野の技術者に容易に選択

50

できる。

【0082】

さらに、生物検体においてE型肝炎ウイルスに対する抗体IgGを検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも1種の本発明のポリペプチドを固定化するステップ；次いで、適切な緩衝液で洗浄するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で再度洗浄するステップ；次いで、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗IgG抗体と共に、抗原/抗体が十分に相互作用する一定の時間インキュベートするステップであって、前記抗IgGが、検出対象の生物検体を供与した動物に対するものであるステップ；並びに、その後、前記検出標識に合致する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原/抗体複合体を検出し、検体中の抗体IgGの量を算出するステップを含む方法も提供する。

10

【0083】

本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、使用する前記抗体は抗ヒトIgGである。

【0084】

本発明の別の実施形態では、前もって決められた支持体の表面に抗原としてのポリペプチドNE2Iを予め塗布する。本発明の別の実施形態では、特定の支持体表面を予め塗布する抗原として、HEV ORF3内エピトープと結合したポリペプチド247を使用する。

【0085】

本発明の別の態様では、生物検体においてE型肝炎ウイルスに対する抗体IgMを検出する方法であって、支持体表面上に、市販又は型通りに生成された抗体抗IgMを固定化するステップであって、前記抗IgMが、検出対象の生物検体を供与した動物に対するものであるステップ；適切に洗浄するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体、好ましくは血清を接触させるステップ；適切な緩衝液で再度洗浄するステップ；次いで少なくとも1種の検出可能な標識された本発明のポリペプチドと共に、抗原と抗体が相互作用するのに十分な時間インキュベートするステップ；並びに、その後、前記の検出可能な標識に合致する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原/抗体複合体を検出し、検体中の抗体IgMの量を算出するステップを含む方法を提供する。

20

【0086】

本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、使用する前記抗体は抗ヒトIgMである。

30

【0087】

本発明の別の実施形態では、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたポリペプチド225Nによって、検体中の前記IgM抗体を検出する。本発明のさらにまた別の実施形態では、HEV IRF3のエピトープと結合させたポリペプチド247を、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させて、検体中に含まれるIgMを検出する。

【0088】

さらに、生物検体においてE型肝炎ウイルスに対する全抗体を検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも1種の本発明のポリペプチドを固定化するステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の生物検体を接触させるステップ；任意選択で、適切な緩衝液で再度洗浄するステップ；検出可能な標識された当該ポリペプチドの1つと共に、抗原と抗体が相互作用するのに十分な時間インキュベートするステップ；並びに、検出可能な標識を有するE型肝炎ウイルス抗原及び合致する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原/抗体複合体を検出し、検体中の全抗体の量を算出するステップを含む方法も提供する。

40

【0089】

本発明の一実施形態では、支持体表面上にNE2Iを予め塗布し、西洋ワサビペルオキシダーゼと予め結合させたポリペプチド225によって、検体中の全抗体を検出する。本発明の別の実施形態では、支持体表面上に、HEV ORF3からのエピトープと結合さ

50

せたNE2Iを予め塗布し、HEV ORF3からのエピトープと前もって結合させてある、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたポリペプチド225によって、検体中の全抗体を検出する。

【0090】

以下の図面及び実施例の記載に関して、本発明の詳細をさらに説明するが、これは、いかようにも本発明の保護範囲を限定するものと解釈すべきでない。

【0091】

(実施例)

別段の指示がない限り、本発明の分子生物学の実験方法およびイムノアッセイはすべて、「分子クローニング：実験室必携 (Molecular Cloning: a Laboratory Manual)」第2版、Joseph Sambrook、David W. Russell著、Cold Spring Harbor Laboratory Press、および「分子生物学におけるショートプロトコル (Short Protocols in Molecular Biology)」、第3版、John Wiley & Sons, Inc.、1995年の基本的な記載事項に従う。制限エンドヌクレアーゼの使用は、提供者が提示するプロトコルに従う。

【実施例1】

【0092】

実施例1 本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の調製、およびそれを含む発現ベクターの作製

鋳型としてのHEV ORF2画分の調製

問題の遺伝子を調製するにあたり、中国新疆省のHEV感染患者からクローン化した、鋳型としての全長HEV遺伝子 (Aye, T. T., Uchida等、Nucleic Acids Research第20巻(13)3512ページ(1992年); 遺伝子銀行受入れ番号D11092)、ならびに上方のプライマーとしてのORF2 FP: 5' - atgcgccctcggcca - 3' および下方のプライマーとしてのORF2 RP: 5' - aaataaactataactcccga - 3' の2種のプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) を利用する。PCR反応は、PCRサーマルサイクラー (BIOMETRA t3) において、94 で5分間; 次いで94 で50秒間、57 で50秒間、および72 で2.5分間を25サイクル; 最後に72 で10分間という条件下で実施する。本発明のポリペプチドを調製する鋳型としてのHEV ORF2からのDNA断片約2kbが得られる。先述のPCR産物を市販のベクターpMD18-T (TAKARA社) にさらに連結し、次いでORF2遺伝子が挿入された陽性クローンが識別されるようにBamHI / HindIIIで消化する。M13 (+) / (-) をプライマーとして使用して、得られたものの配列を決定し、それによって本発明のポリペプチドを調製する鋳型として使用する2本のHEV ORF2 DNA断片、すなわち一方が保存配列 (鋳型1、配列番号5)、他方が変異配列 (鋳型2、配列番号6) を識別する。

【0093】

配列を並べ合わせ、ORFを解析することによって、本発明のポリペプチドを調製する鋳型としてのHEV ORF2の変異配列 (配列番号6) は、保存配列 (配列番号5) に対して塩基Aが欠落しており、これがORF2内のアミノ酸残基604~605がHis-Ser-ValからPro-Pro-Argに変異するシフト変異をもたらし、さらにこのために、この変異によって生成した終止コードタグによって前記ポリペプチドへの翻訳が停止することが判明している。

【0094】

以下では本発明のポリペプチド201を使用する実施例によって、ポリペプチド201をコードする核酸およびそれを含む発現ベクターの調製を例示する。

【0095】

本発明のポリペプチド201をコードするポリヌクレオチドおよびそれを含む発現ベク

ターの調製

ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）において、上記で得た配列の配列番号5を鋳型として使用し、ならびにBamHI部位、NdeI部位（CAT ATG）、および大腸菌系の翻訳開始コドンとしてのATGを導入した前方向プライマー201FP：5'-ggatcccatatgggttatttcaggattatgac-3'（表1を参照のこと）と、終止コドンおよびEcoRI部位を導入した逆方向プライマーとしての201RP：5'-ctcgaagaataaactataactcccga-3'（表1を参照のこと）とを使用するものを利用して遺伝子を合成する。PCRは、サーモサイクラーにおいて、94℃で5分間熱変性させ、次いで94℃で50秒間、57℃で40秒間、および72℃で40秒間のサイクルを30回、さらに最後に72℃で10分間増幅させて実施する。得られた～600bpのPCR産物が本発明のポリペプチド201をコードするヌクレオチド配列であることを確認する。

10

【0096】

本発明のポリペプチドを発現する発現ベクターpTO-T7の作製は、参照文献のLiu Wen-Xin等、Chinese Journal of Biotechnology、2000年、第16巻：53～57ページにある方法に従うものである。前記方法は、前述のPCR産物を市販のpMD18-Tベクター（TAKARA社）にクローン化するステップ；BamHI/HindIIIで消化して、ヌクレオチドによってコードされたポリペプチド201が挿入された陽性サブクローンを識別し、これを得るステップ；前記陽性サブクローンをNdeIおよびEcoRIでさらに消化して、ポリペプチド201の遺伝子を含むヌクレオチド配列を得るステップ；次いでNdeI/EcoRIで消化したpTO-T7にクローン化するステップを含む。NdeI/EcoRIで消化することによって、ポリペプチド201のコード化配列が組み入れられている陽性クローンpTO-T7-ORF2-201を識別する。図1に、ORF201ポリペプチドの発現ベクターを作製するための方策を例示する。

20

【0097】

同様に、カルボキシル末端がPro-Pro-Argでない他方の本発明のポリペプチドも、配列番号6の配列を鋳型として使用し、個々の問題のポリペプチド向けに特別に設計された表中の各プライマーを使用することによって、上記の方法に従って得ることができる。

30

【0098】

カルボキシル末端がPro-Pro-Argである本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド、およびそれを含む発現ベクター

カルボキシル末端がPro-Pro-Argである本発明のポリペプチドは、上述のORF2-201の発現ベクターでの方法に従って得た発現ベクターで大腸菌ERR2566を形質転換することによって発現される。具体的には、上述のHEV ORF2変異配列の配列番号6を鋳型とし、本発明の個々のポリペプチド向けに特別に設計された個々の前方向/逆方向プライマー（表1を参照のこと）を使用して、ポリペプチド201の発現ベクターを作製するのと同様の条件下でのPCRによって対応する発現ベクターを得る。この方法では、免疫原性および免疫反応性の良好な一連の本発明のポリペプチドが得られ、得られるポリペプチドは、そのN末端にMetが付加され、カルボキシル末端のアミノ酸603のProである3'末端において、5'から3'の方向にアミノ酸配列-Pro-Pro-Argが付加されている。

40

【0099】

【表 1 - 1】

表1 本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチドを調製するためのPCR増幅用鋳型
および対応する前方向／逆方向プライマー

ポリペプチド	HEV ORF2 位置	鋳型番号	前方向プライマー(FP)および逆方向プライマー(RP)
NE2	394-603ppr*	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
217C	390-603ppr	2	217FP:5'-ggatcccatatgctggctggtggccag-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
193C	414-603ppr	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
178C	429-603ppr	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
168C	439-603ppr	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
158C	449-603ppr	2	E56F:5'-ggatcccatatgcaggaccgaccgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'

10

20

【表 1 - 2】

148C	459-603ppr	2	E66F:5'-ggatcccatatgtcgcgcctttt-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'	
138C	469-603ppr	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgcttggcttctc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'	
NE2D	394-603	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'	
217D	390-603	2	217FP:5'-ggatcccatatgtcggctggtggccag-3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'	10
193D	414-603	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'	
178D	429-603	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'	
NE2I	394-606	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatggggggctaaaacag-3'	
217I	390-606	2	217FP:5'-ggatcccatatgtcggctggtggccag-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatggggggctaaaacag-3'	
193I	414-606	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatggggggctaaaacag-3'	20
178I	429-606	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatggggggctaaaacag-3'	
266N	394-660	1	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'	
235N	394-628	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 235NR:5'-gaattcttagggcagaagtcacgc-3'	
225N	394-618	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 225RP:5'-gaattcttaggcagggtagtcacgc-3'	
209N	394-602	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'	30
208N	394-601	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 208RP:5'-gaattcttataaaacagcaaccgc-3'	
207N	394-600	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 207RP:5'-gaattcttaaacagcaaccgcg-3'	
203N	394-596	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E203R:5'-gaattcttaggaaatagagacgggac-3'	
193N	394-586	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E220R:5'-ctcgagtttaagtggtaagtggaaatag-3'	
176N	394-569	2	HEFP:5'-ggatcccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E237R:5'-ctcgagttacagttggcactagcagt-3'	40
280	380-660	1	227FP:5'-ggatcccatatgctagcggctaccca-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'	

【表 1 - 3】

270	390-660	1	217FP:5'-ggatcccatatgctggctggtggccag-3' HERP:5'-ctcgagaataaactataactcccga-3'	
260	400-660	1	207FP:5'-ggatcccatatgcccgctcgtctcagc-3' HERP:5'-ctcgagaataaactataactcccga-3'	
247	414-660	1	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' HERP:5'-ctcgagaataaactataactcccga-3'	
232	429-660	1	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' HERP:5'-ctcgagaataaactataactcccga-3'	10
222	439-660	1	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaataaactataactcccga-3'	
205	414-618	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 225RP:5'-gaattcttaggcaggtagtccatgg-3'	
201	459-660	1	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaataaactataactcccga-3'	
191	469-660	1	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgcttggctttctc-3' HERP:5'-ctcgagaataaactataactcccga-3'	
189	414-602	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'	20
188	414-601	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 208RP:5'-gaattcttataaaacagcaaccgc-3'	
183	414-596	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E203R:5'-gaattcttaggaaatagagacgggac-3'	
173	414-586	2	<u>E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3'</u> E220R:5'-ctcgagttaagtggtaagtggaaatag-3'	
170	459-628	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 235NR:5'-gaattcttacgggcagaagtcacg-3'	
C160	469-628	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgcttggctttctc-3' 235NR:5'-gaattcttacgggcagaagtcacg-3'	30
N160	459-618	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 225RP:5'-gaattcttaggcaggtagtccatgg-3'	
150	469-618	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgcttggctttctc-3' 225RP:5'-gaattcttaggcaggtagtccatgg-3'	
144	459-602	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'	
142	459-600	2	<u>E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3'</u> 207RP:5'-gaattcttaaacagcaaccgcg-3'	
134	469-602	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgcttggctttctc-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'	40

*: pprは、C末端上の603位のアミノ酸Proである3'末端において、5'から3'の方向にアミノ酸配列-Pro-Pro-Argが付加されているポリペプチドを表す。

【実施例 2】

【0100】

実施例 2 ポリペプチド 201 の発現

形質転換用の(塩化カルシウム法で発生させた)大腸菌 E R R 2 5 6 6 コンピテント細胞 40 u L にプラスミド p T O - T 7 - O R F 2 - 2 0 1 (0 . 1 5 m g / m L) 1 u L

を加えた。次いで、混合物をカナマイシンLBプレートにスクロールし、個々のクローンが得られるまでプレートを37℃で10～12時間インキュベートした。個々のクローンを選び取り、さらに管中LB培地4mLに接種し、培養物のOD_{550nm}値が約1.5になるまで、37℃で10時間、220rpmで振とうした。次いで、1mLの培地を後の使用に備えて4℃で保管し、残りの3mLの培地(最終濃度は0.3mM)に0.5MのIPTG2μLを加えた。IPTG含有培地を220rpmで振とうしながら37℃で4時間インキュベートを続けて、問題のポリペプチドの発現を誘導した。誘導を行った培地1.5mLを30秒間12000gでの遠心分離にかけた。沈殿した細胞を100μLのタンパク質添加液(50mMのトリスCl pH6.8、100mMのDTT、2%のSDS、0.1%のプロモフェノールブルー、10%のグリセロール)に再懸濁させ、さらに10分間煮沸し、次いで10分間12000gでの遠心分離にかけた。10μLの上清を12%SDS-PAGEにかけて、ポリペプチド201の発現を解析した。高い収率で発現したクローンをさらなる発酵に使用した。

10

【0101】

LB培地500mLを含む1L容エルレンマイヤーフラスコにシーク培地200μLを加えた。培養物のOD_{550nm}値が2.0に達するまで、190rpmで振とうしながら37℃で約11時間インキュベートした後、0.5MのIPTG300μLを加えて、最終含有量を0.3mMとした。前述の条件下、この混合物をさらに4時間インキュベートした。誘導を行った1.5mLの培養物を30秒間12000gでの遠心分離にかけた。細胞を100μLのタンパク質添加液に再懸濁させ、10分間煮沸し、次いで10分間12000gでの遠心分離にかけた。10μLの上清を12%SDS-PAGEにかけて、ポリペプチド201の発現を解析した。UVIゲル画像処理器(U-VItech、DBT-08モデル)によって示された(クーマシーブリリアントブルーR250で染色を行う)SDS-PAGEでの解析結果は、ポリペプチド201の発現が、発現した総細胞タンパク質の約35%であることを示した。

20

【実施例3】

【0102】

実施例3 大腸菌中に発現させたポリペプチド201封入体の精製

実施例2で得た組換えポリペプチド201を含有する大腸菌の培地を15分間4000rpmでの遠心分離にかけ、培養物の沈殿各500mLを15mLの溶解緩衝液(dH₂O中50mMのトリスCl、10mMのEDTA、および300mMのNaCl、pH7.2)に再懸濁させた。超音波処理器において細胞を超音波処理した(Uilbra-Cel11VCX500、SONICS & MATERIALS company、パワー70%、40秒間オン、60秒間オフ、合計20分間の超音波処理)。超音波処理した混合物を4℃で10分間12000rpmでの遠心分離にかけ、ペレットを2%のトリトンX100を含む緩衝液I溶液(200mMのトリスCl、pH8.5; 5mMのEDTA; 100mMのNaCl)に再懸濁させ、最終体積は、元の溶解液と同じである。混合物を37℃で30分間、200rpmで振とうし、次いで4℃で10分間10000rpmでの遠心分離にかけた。ペレットを等しい体積の緩衝液Iに再懸濁させ、混合物を超音波処理した(40秒間オン、60秒間オフ、パワー70%、合計で3分間の超音波処理)。その後、混合物を4℃で10分間遠心分離した(10000rpm)。ペレットを2%のトリトンX100を含む緩衝液Iに再懸濁させて、最終体積を前と同じにした。混合物を37℃で30分間振とう(200rpm)した後、4℃で10分間遠心分離した(10000rpm)。ペレットを37℃で30分間振とう(200rpm)して、等しい体積の緩衝液Iに再懸濁させた。次いで、混合物を4℃で10分間、10000rpmで遠心分離した。ペレットを2Mの尿素を含む緩衝液Iに再懸濁させて、最終体積を元の混合物と同じにした。37℃で30分間、200rpmで振とうした後、混合物を4℃で10分間、10000rpmで遠心分離した。この上清に201-2Mと印をつけた。ペレットは、4Mの尿素を含む緩衝液Iに再懸濁させて、最終体積を前と同じにした。37℃で1時間振とう(200rpm)した後、混合物を一晩4℃で保管し、次いでこれを4℃で10

30

40

50

分間、12000rpmで遠心分離した。この上清に201-4Mと印をつけた。上記の試料の純度はすべて、12%SDS-PAGEによって解析した。図3に結果を示す。

【実施例4】

【0103】

実施例4 組換えポリペプチド201の再生

実施例3に従って調製した試料201-4M100mlを2袋の透析バッグ(36DM、保持MW:8000~10000、米国United Carbon Compound)に装入し、1xPBS($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 73.344g、 KH_2PO_4 4g、 NaCl 163.632g、 KCl 4.024gを含有する20xPBS(1L)、pH7.45)900mlを含む1L容ビーカー中で攪拌しながら、25℃で終夜(10時間)透析を行うと、透析バッグ中に白色の沈殿が認められた。透析液を補給し、透析を続け、次いで透析液を3時間毎に4回補給した。原則として、透析が済んだときの試料中の尿素含有量は、4x10⁻⁶Mである。透析した試料を25℃で10分間、12000rpmで遠心分離し、上清を0.22μmの濾過膜で濾過してさらに精製し;4Mの尿素/緩衝液Iに懸濁させたペレットを新しい透析で使用して、その間に沈殿を出現させることもできるが、得られるタンパク質試料の濃度が最初に得たものより低くなる。

10

【実施例5】

【0104】

実施例5 ゲル濾過HPLCによる組換えポリペプチド201の精製

実施例4の方法に従って調製した再生201の試料を以下のようなHPLC、すなわち

20

機器: Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP HPLC、

カラム: TSK GEL SW3000 21.5mm×60cm、

溶離: 1xPBS pH7.45、

流速: 4ml/分、

検出: 280nmのUV、

試料: 4MのNE2(8mg/ml)2ml、

収集: ウィンドウ式自動頂角収集(automatic apex collection of window mode)、

30

収集時間: 1チューブ/20秒、

収集遅延: 6秒によって精製した。

【0105】

クロマトグラムの結果は、分子の濾過が非常に有効であることを示したが、頂角の成分は、単量体および二量体、ならびにこれらの間に均等に分布するタンパク質を含んでいる。試料タンパク質を沸騰湯中で10分間処理した後、最高で95%を越える目的のタンパク質ピークの単量体純度について12%アクリルアミドのSDS-PAGEによって解析した。それによって、ORF2-201単量体が、自己凝集に加えて他の小さいタンパク質とも凝集し、クロマトグラムの際に一緒に溶離した多量体の間で相互作用が生じること

40

【実施例6】

【0106】

実施例6 本発明の組換えポリペプチド産物の特徴づけ

実施例1~5の方法に従って、本発明の組換えポリペプチドを作製し、発現させた。さらに、各々の組換えペプチドを洗浄し、実施例3~4の方法に従って透析にかけた。表2に、各組換えペプチドのE型肝炎ウイルスにおける対応するアミノ酸配置、発現された組換え産物の再生特性、SDS-PAGEでの単量体および二量体の比率、ならびに多量体の生成を示す。

【0107】

【表 2 - 1】

表2 各組換えペプチドのE型肝炎ウイルスにおける対応するアミノ酸配置、
 発現された組換え産物の再生特性、SDS-PAGEでの単量体および
 二重体の比率、ならびに多量体の生成

ポリペプチド名	配列番号	単量体 百分率	二重体 百分率	多量体化	透析による 再生		
NE2	配列番号 2	10%	90%	有	有	10	
193C	配列番号 3	5%	95%	有	有		
178C	配列番号 4	100%	0%	無	有		
168C	配列番号 7	100%	0%	無	有		
158C	配列番号 8	60%	40%	無	有		
148C	配列番号 9	100%	0%	無	有		
138C	配列番号 10	100%	0%	無	有		
NE2I	配列番号 1 aa394~aa606	5%	95%	無	有		20
217I	配列番号 1 aa390~aa606	85%	15%	無	有		
193I	配列番号 1 aa414~aa606	100%	0%	無	有		
178I	配列番号 1 aa429~aa606	60%	40%	無	有		
NE2D	配列番号 1 aa394~aa603	80%	20%	無	有	30	
217D	配列番号 1 aa390~aa603	20%	80%	無	有		
193D	配列番号 1 aa414~aa603	100%	0%	無	有		
178D	配列番号 1 aa429~aa603	100%	0%	無	有		
235N	aa394~aa628	10%	90%	無	有		
225N	配列番号 1 aa394~aa618	4%	96%	無	有		
209N	配列番号 1 aa394~aa602	25%	75%	無	有	40	
208N	配列番号 1 aa394~aa601	100%	0%	無	有		
207N	配列番号 1 aa394~aa600	100%	0%	無	無		

【表 2 - 2】

203N	aa394~aa596 配列番号 1	100%	0%	無	無	
193N	aa394~aa586 配列番号 1	100%	0%	無	無	
176N	aa394~aa569 配列番号 1	100%	0%	無	無	
247	aa414~aa660 配列番号 1	10%	90%	無	有	10
232	aa429~aa660 配列番号 1	10%	90%	無	有	
222	aa439~aa660 配列番号 1	10%	90%	無	有	
205	aa374~aa618 配列番号 1	10%	90%	無	有	
201	aa459~aa660 配列番号 1	1%	99%	無	有	
189	aa414~aa602 配列番号 1	2%	98%	無	有	20
188	aa414~aa601 配列番号 1	4%	94%	無	有	
183	aa414~aa596 配列番号 1	100%	0%	無	無	
173	aa414~aa586	100%	0%	無	無	

【 0 1 0 8 】

表 2 で示したとおり、HEV ORF 2 の配列番号 1 のアミノ酸配列に含まれる本発明のポリペプチドは、そのカルボキシル末端が配列番号 1 の aa601 (Leu) と aa660 の間に位置する場合、よく再生する能力を有し、これによって自然の HEV タンパク質に近い次元構造を示すようになる。具体的には、ペプチド 247、232、222、201、235N、225N、209N、NE2I、217D、205、189、188、NE2 (配列番号 2)、および 193C (配列番号 3) は、単量体分子量および 2 倍の単量体分子量に相当する位置に発現バンドを有するが、二量体の量が明らかに単量体を上回っていることが判明した。NE2 および 193C が、より大きい分子量の位置にはっきりとしたバンドを有することが判明し、前記ペプチドが自発的に多量体化することを示唆した。

【 0 1 0 9 】

表 2 の再生可能な組換えペプチド 193C、201、208N、209N、NE2、222、225N、232、および 247 をゲル濾過 HPLC によってさらに精製し、それぞれを 10 分間 20000g で遠心分離し、0.1 μm の Al₂O₃ 濾過膜で濾過した後、動的光散乱計 (DYNAPRO99-D-50 動的光散乱計、PROTEIN SOLUTIONS 製) によってこれらのペプチドの動的半径を測定し、表 3 ではその構築状態を推測してある。得られた各々の組換えペプチドの分子半径は、その単量体の予想半径よりも明らかに大きい。推定上の分子量に従うと、このようなペプチドの形状が、溶液中に少なくとも二量体を形成し、その大部分が高次の多量体を形成すると結論付けることができるが、これは SDS-PAGE での挙動と同調している。実際、上記の方法で調製した本発明のポリペプチドは、最高で 180 個以上の単量体の多量体を形成し得る。さらに、発明のポリペプチドが予想外の特性、すなわち大腸菌系によって発現された上記の前記組換えペプチドが、変性剤を含まない PBS 溶液中で自発的に多量体化するので、そのワクチ

ンとしての免疫原性を増強するのに有利であることも実証された。

【 0 1 1 0 】

【表 3】

表3 本発明の再生可能な組換えペプチドの凝集状態の動的光散乱計による検出

ポリ ペプチド	理論上の 単量体 分子量 (KD)	測定 半径 (nm)	推定上の 分子量 (KD)	推定上の凝集状態	
193C	21.2	3.44	47	二量体 (21.2 ×2 = 42.4)	
201	22.1	3.08	62.7	三量体 (22.1 ×3 = 66.3)	
208N	22.9	3.57	66.1	三量体 (22.9 ×3 = 68.7)	
209N	23	4.10	91.	四量体 (23 ×4=92)	
NE2	24.4	4.04	90	四量体 (24.4 ×4=97.6)	
222	24.4	3.72	73	三量体 (24.4 ×3=73.2)	
225N	24.8	3.91	82	三量体 (74.4) 四量体 (99.2)	
				共存	
232	25.5	3.97	85	三量体 (25.5 ×3=76.5)	20
247	27.2	4.28	101	二量体 (27.2 ×4=108.8)	
266N	29.3	4.41	108	四量体 (29.3 ×4=117.2)	

【実施例 7】

【 0 1 1 1 】

実施例 7 ポリペプチドの物理化学的特性

封入体からの再生

実施例 1 ~ 3 で記載したとおりに調製した組換えポリペプチドの封入体を 4 M の尿素で変性させ、次いで実施例 4 で記載したとおりに、100 を超える量の PBS での透析にかけた。透析したものを 10 分間 12,000 rpm で遠心分離した。上清は、若干またはすべての組換えポリペプチドを含んでおり、それによって前記組換えポリペプチドに再生能力があることを実証する。

【 0 1 1 2 】

組換えペプチドの重合

従来の SDS - PAGE を利用する上清の解析において、それぞれ単量体、二量体、および多量体に対応するバンドを識別した。従来のウェスタンブロット法によって前記バンドの特異性をさらに確かめ、それによって組換えポリペプチド 201 が再生後に重合体を形成することを実証した (図 4 を参照のこと)。

【 0 1 1 3 】

光走査法によるポリペプチド 201 の分子サイズの決定

実施例 6 に従って、ポリペプチド 201 を HPLC によって精製した後、10 分間 20,000 rpm で遠心分離し、次いで 0.1 μm のアルミナ製ミリポア膜で濾過した。濾液を動的光走査計 (DYNA - POR 99 - D - 50、米国 PROTEIN SOLUTION Com. Ltd.) による 824.0 nm での測定にかけた。算出には制御アルゴリズムを使用し、数多くの標準試料によってその実用性を確かめた。分子の半径は、% ピーク強度に対応する動的半径から算出した。溶媒は、試料緩衝液 PBS とした。図 5 に示す測定結果は、変性剤を含まない溶液中のポリペプチド 201 の平均半径が 3.08 nm であったことを示唆し、(三量体に相当する) MW 62.7 KD が算出された。本発明の技術者には、前記の本発明のポリペプチドが実際に 180 個以上の単量体の重合体を形成したことが知られている。

10

20

30

40

50

【実施例 8】

【0114】

実施例 8 マウス抗 NE 2 単クローン抗体の調製

ハイブリドーマ細胞系の確立

第一次の免疫化では、各々の B a l b / C 雌性マウス（生後 6 ~ 8 週間）に 5 u g の組換え抗原 NE 2 で乳化したフロイント不完全アジュバント（総体積 5 0 u L ）で免疫化を施した。15 日後、マウスにフロイント不完全アジュバント中に乳化された同じ量の NE 2 を筋肉内投与して 2 回目の免疫化を施した。30 日後、アジュバントなしの抗原 5 u g を（尾の静脈を通して）静脈内投与してマウスに追加免疫を施した。追加免疫の後 7 2 ~ 9 6 時間でマウスを屠殺した。次いで血液を採取し、脾臓を切除して、（R P M I 1 6 4 0 培地に懸濁させて）脾細胞懸濁液を調製した。脾細胞を細胞計数器でカウントした。次いで、6 : 1 の比で脾細胞を S P 2 / 0 マウス黒色腫細胞と混合し、遠心分離した。細胞を P E G （ P E G 1 5 0 0 ）で融合し、次いで等しい量の支持細胞と混合し、9 6 穴プレート（2 0 0 u L / ウェル）に移した。5 % の C O ₂ 雰囲気において、9 6 穴プレートを恒温器（E S P E C B N A - 3 1 ）において 3 7 °C でインキュベートした。3 日後、培地の半分を新鮮な H T 培地（R P M I 1 6 4 0 培地（G I B C O I n t . ））を加えて 1 0 0 m L とし、約 4 5 ~ 5 0 °C で溶解させ、濾過して滅菌した 1 . 3 6 1 m g のヒポキサンチンおよび 0 . 3 8 8 m g のチミジン）に入れ替えた。7 日後、9 6 穴プレートに NE 2 を塗布し、以下に述べるようにハイブリドーマ細胞培養物についての E L I S A アッセイを実施した。E L I S A アッセイで陽性であった細胞を限界希釈法によってクローン化した。

10

20

【0115】

E L I S A アッセイ

実施例 5 で述べた H P L C によって 1 0 0 u L の NE 2 を 3 7 °C で精製し、次いで 0 . 0 5 モル / L の C B （ d d H ₂ O を加えて 1 L とした 2 0 . 0 2 g の N a ₂ C O ₃ および 2 . 5 2 g の N a H C O ₃、p H 9 . 5 ）に溶解させて、最終濃度を 0 . 3 u g / m L とした。9 6 穴ポリビニルマイクロタイタープレートを、3 7 °C で 2 時間、次いで 4 °C で一晩かけて、得られた溶液で処理した。マイクロタイタープレートを P B S T （ d d H ₂ O を加えて 1 L とした 8 . 0 g の N a C l、0 . 2 g の K H ₂ P O ₄、2 . 9 g の N a ₂ H P O ₄、1 2 H ₂ O、0 . 2 g の K C l、および 0 . 5 m L の T w e e n - 2 0、p H 7 . 4 ）で洗浄して、吸収されていない抗原を除去した。次いで、ウェル毎に 2 0 0 u L のブロッキング用緩衝液（1 × P B S 中 2 % のグルチン、0 . 2 % のカゼイン、および 2 % のスクロース）を加え、2 時間インキュベートした。次いで溶液を流し、ウェルを乾燥させ、真空中に 4 °C で保管した。

30

【0116】

アッセイのために、1 0 0 u L の細胞培養物を各ウェルに加え、各プレートに 1 陽性対照（1 : 1 0 0 に希釈した多クローン性抗 NE 2 血清 1 0 0 u L を加えたもの）および 1 陰性対照（H T 培地 1 0 0 u L を加えたもの）を設けた。3 7 °C で 3 0 分間インキュベートした後、プレートを P B S T で 5 回洗浄し、次いで乾燥させた。H R P - G A M I g （ D A K O 社）を加え、3 7 °C でさらに 3 0 分間インキュベートした。プレートを再度 P B S - T w e e n - 2 0 で 5 回洗浄し、乾燥させた。プレートに 5 0 u L の基質溶液 A （ d d H ₂ O を加えて 7 0 0 m L とした 1 3 . 4 2 g の N a ₂ H P O ₄、1 2 H ₂ O、4 . 2 g のクエン酸 H ₂ O、および 0 . 3 g の H ₂ O ₂）および 5 0 u L の基質溶液 B （ d d H ₂ O を加えて 7 0 0 m L とした 0 . 2 g の T M D および 2 0 m L のジメチルホルムアミド）を加え、3 7 °C で 1 0 分間インキュベートした。5 0 u L の停止溶液を使用して、反応を停止した。各ウェルの O D ₄₅₀ 値を E L I S A リーダーで読み取った。一般に、O D ₄₅₀ 値が陰性対象より少なくとも 2 0 倍高いと、陽性であるとみなすことができる。

40

【0117】

腹水の調製および単クローン抗体の精製

生後 1 0 週間の B a l b / C マウス各々に 0 . 5 m L のフロイント不完全アジュバント

50

を腹腔内接種した。2～7日後、ハイブリドーマ細胞を収集し、遠心分離した。次いで上清を捨て、細胞群に血清を含まない培地を加えて、最終濃度を $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mLとした。得られた細胞懸濁液0.5 mLを使用して、各マウスに接種した。マウスの腹部が膨張してから7～10日目に腹水を採取し、次いで15分間3,000 rpmで遠心分離した。管中間部の透明の液体をピペットで取り出し、0.45 μmのミリポア膜で濾過して滅菌した。濾液を-20℃で保管した。

【0118】

処理した腹水を等しい体積のPBS（通常の食塩水を加えて100 mLとした0.2モル/Lの Na_2HPO_4 8 mLおよび0.2モル/Lの NaH_2PO_4 19 mL）で希釈した。次いで50%飽和になるまで、穏やかに攪拌しながら $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を滴下し、終夜4℃に保った。溶液を4℃で15分間遠心分離（12,000 rpm）し、上清を捨てた。ペレットを（2の量の腹水を使用した）PBSに溶解させた。33%飽和になるまで、得られた溶液に攪拌しながら再度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を滴下し、終夜4℃に保った。溶液を4℃で15分間遠心分離（12,000 rpm）し、上清を捨てた。ペレットを（2の量の腹水を使用した）PBSに溶解させた。50%飽和になるまで、穏やかに攪拌しながら $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を滴下し、終夜4℃に保った。溶液を4℃で15分間遠心分離（12,000 rpm）し、上清を捨てた。次いでペレットを透析バッグ中の適量のPBSに溶解させ、50～100の量の、120ミリモル/LのトリスHCl緩衝液（20ミリモル/LのNaCl含有、pH7.8）において4℃で約12時間攪拌しながら透析した。緩衝液は3回より頻繁に入れ替えた。透析したものを-20℃で保管した。

【0119】

上記で述べた方法に従い、本発明のポリペプチドNE2でBalb/Cマウスに免疫化を施すことによって単クローン抗体を調製し、8種の抗NE2単クローン抗体（1F6、2C9、3F5、8C11、8H3、13D8、15B2、および16D7）が識別された。前記8種の抗体をエッペンドルフ管にそれぞれ塗布し、捕捉RT-PCR（実施例9を参照のこと）によって、前記抗体が自然のHEVを結合する能力を試験した。その結果、8C11、8H3、および13D8が、顕著なHEV結合活性を示し、その認識部位がウイルス外皮表面上の自然のエピトープであることを示唆した。前記の3種の抗体を実施例10で使用した。

【実施例9】

【0120】

実施例9 抗体捕捉RT-PCRによるmAbのHEV結合能試験

1.5 mL容エッペンドルフ管に30分間紫外線を照射し、次いでCB（ddH₂Oを加えて1 Lとした20.02 gの Na_2CO_3 および2.52 gの NaHCO_3 、pH9.5）中に1:1000で希釈したmAb 500 μLを加えた。37℃で終夜インキュベートした後、緩衝液を流し、1.5 mLのブロッキング用緩衝液（2%アルブミン添加1×PBS、pH7.4）を加えて、37℃で2時間ブロッキングした。次いでブロッキング用緩衝液を流し、滅菌した通常食塩水中10%のHEV陽性排泄物500 μLを加えた。37℃で2時間反応させた後、エッペンドルフ管をPESTで6回洗浄し、次いで各エッペンドルフ管に250 μLのddH₂Oを加えた。次いで実施例14に従ってRT-PCRアッセイを実施した。その結果、8C11、8H3、および13D8の単クローン抗体はHEVを結合できたが、1F6、2C9、3F5、15B2、および16D7はHEVを結合できなかった。

【実施例10】

【0121】

実施例10 本発明のポリペプチドと、陽性アカゲザル由来血清、ヒト由来血清、およびマウス由来単クローン抗体とのELISA、ならびに本発明のポリペプチドとマウス由来単クローン抗体のドットプロット

組換えポリペプチドと、陽性アカゲザル由来血清、ヒト由来血清、およびマウス由来単クローン抗体とのELISA

10

20

30

40

50

実施例 1 ~ 6 で述べた方法に従って、表 2 で示した本発明のポリペプチドを作製し、精製した。得られた濃度 1 mg/ml の精製組換えタンパク質の試料を PBS 緩衝液 (20 mM 、 $\text{pH} 7.4$) で $1:500$ に希釈し、96 穴マイクロタイタープレートに $100 \mu\text{l}$ / ウェルを塗布し、次の条件下、すなわち 37°C で 2 時間インキュベートし、次いで 4 日終夜約 12 時間インキュベートする条件下に置いた。自動洗浄器 (TECAN、M12/4R Columbus plus) において PBS - Tween 20 洗浄溶液 (非イオン性 H_2O を加えて最終濃度 1 L としてある 8.0 g の NaCl 、 0.2 g の KH_2PO_4 、 2.9 g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 0.2 g の KCl 、および 0.5 ml の Tween 20、 $\text{pH} 7.4$) で洗浄し、乾燥させた後、ブロッキング用緩衝液 (PBS 中 2% のグルチン、0.2% のカゼイン、および 2% のスクロース) を $200 \mu\text{l}$ / ウェル加え、 37°C で 30 分間インキュベートした。次いで適宜希釈した抗血清または単クローン抗体を 37°C で 30 分間かけて加えた。自動洗浄器において 20 秒間隔で 5 回、PBS - Tween 20 洗浄溶液で洗浄し、乾燥させた後、適宜希釈した HRP 標識二次抗体 (ヤギ抗ヒト、マウス IgG 抗体) を 37°C で 30 分間かけて加えた。自動洗浄器において 20 秒間隔で 5 回、PBS - Tween 20 洗浄溶液で洗浄し、乾燥させた後、色素産生性薬品 A および B (A: 非イオン水で体積を 700 ml に調整してある 13.42 g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 4.2 g のクエン酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 、および 0.3 g の H_2O_2 ; B: 非イオン水で体積を 700 ml に調整してある 0.2 g の TMB、 20 ml のジメチルホルムアミド) をそれぞれ 1 滴加えて、 37°C で 10 分間かけて発色させた。停止溶液 (2 M の H_2SO_4) を 1 滴加えた。マイクロプレートリーダー (TECAN、Sunrise Remote / Touch Screen) で (620 nm の波長を基準として) $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ を測定した。陰性対象の 3 回の平均値を陽性閾値と定めてあり、結果の OD 値が閾値より高い場合が陽性である。

【0122】

本発明のポリペプチドと様々なマウス由来単クローン抗体のドットプロット

実施例 1 ~ 5 の方法に従って得、HPLC ゲル濾過によって精製した、表 2 に載せたポリペプチド各 $10 \mu\text{l}$ (1 mg/ml) を、ニトロセルロース膜にそれぞれをゆっくりとスポットし、風乾した。5% の脱脂乳によって室温で 1.5 時間ブロッキングした後、実施例 8 で述べたように得た様々なマウス由来単クローン抗体 (5% の脱脂乳で $1:100$ に希釈した、単クローン性 B リンパ球によって分泌された細胞上清) を加えて、室温で 1 時間反応させた。次いで、TNT (10 mM のトリス Cl 、 $\text{pH} 8.0$ 、 150 mM の NaCl 、0.05% の Tween 20) を使用して膜を 5 分間隔で 3 回洗浄した。HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (JINGMEI Biological 社製、5% の脱脂乳で $1:1000$ に希釈したものを) を加え、室温で 1 時間反応させた。5 分間隔で 3 回、TNT で洗浄した後、NBT / BCIP ($\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{N}_{10}\text{O}_6\text{Cl}_2 / \text{C}_8\text{H}_6\text{BrClNO}_4\text{P} \cdot \text{C}_7\text{H}_9\text{N}$) を加えて発色させた。ドットをゲル画像処理システムでスキャンし、黒色度の値に転用し、++++、+++、++、+、+- の 5 陽性段階および - の陰性段階に分類した。古典的なウェスタンブロットに比べ、この方法は、SDS での変性にかけないために変性剤の存在なしで、免疫反応性をより如実に反映できる。

【0123】

【表4 - 1】

表4 マウス由来単クローン抗体、回復相のHEV患者由来血清、および急性相のHEV
感染アカゲザル由来血清に対する本発明のポリペプチドの反応性

ポリ ペプチド	ELISA					ドットプロット			
	サル 血清	ヒト 血清	8C11	8H3	13D8	8C11	8H3	13D8	
NE2	++	++	+++	++	+++	++++	++	+++	10
193C	++	++	+++	+	++	++	++	++	
178C	+	++	+++	+/-	+++	++	++	++	
168C	-	+/-	++	-	+++	+/-	+/-	+/-	
158C	+/-	+	+	-	+++	+	+/-	+/-	
148C	+	++	-	-	-	+/-	+/-	+/-	
138C	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	
NE2I	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++	
217I	+	+	++	-	++	+	+	+	20
193I	++	++	++	-	++	+++	++	+++	
178I	+++	++	++	-	++	++	++	++	
NE2D	++	++	++	-	++	+	+	+	
217D	++	++	++	-	++	+	+	+	
193D	++	++	++	-	++	+	+	+	
178D	++	++	+++	-	+++	+	+	+	
235N	++	+/-	+++	+/-	+++	+++	+	+++	
225N	+++	+++	+++	+/-	+++	++++	+	+++	
209N	++	++	+++	+	+++	++++	+	+++	
208N	+	+++	+++	-	+++	++	+	++	30
207N	-	-	-	-	-	++	+	+	
203N	-	-	-	-	-	++	+	+	
193N	-	-	-	-	-	++	+	+	
176N	-	+	-	-	-	+	+/-	+	
247			+++	+	+++	++++	+++	++++	
232			+++	+	+++	++++	++++	++++	

【表 4 - 2】

222			+++	+-	+++	++++	++	++++
205	++	+	+++	-	+++	+++	++	++
201			+++	+	++	++++	++	++++
189	-	+-	+++	-	+++	++	++	++
188	-	+-	++	-	+++	++	++	++
183	-	+	+-	-	+-	++	++	++
173	-	-	-	-	-	++	+	++
170			+++	-	+++	++++	+++	++++
C160			-	-	-	-	-	-
N160			++	-	++	++	-	++
150			-	-	-	-	-	-
144			++	-	++	++	-	++
142			-	-	-	-	-	-
134			-	-	-	-	-	-

10

【0124】

20

結果

表 4 に載せた精製組換えポリペプチドをそれぞれ、マイクロタイタープレートに塗布し、実施例 8 で述べた 3 種のマウス由来単クローン抗体 8 C 1 1、8 H 3、1 3 D 8、回復相の H E V 患者の血清、および急性相の H E V 感染アカゲザル由来血清に対するその反応性を E L I S A によって調べ、使用した 3 種の単クローン抗体に対するその反応性をドットプロットアッセイによって調べた。その結果は、ポリペプチド N E 2、1 9 3 C、1 7 8 C、N E 2 I、2 3 5 N、2 2 5 N、2 0 9 N、2 4 7、2 3 2、2 2 2、および 2 0 1 が各々の血清 / 単クローン抗体に対してより反応性であることを示した。これは、これらのポリペプチドが自然の H E V エピトープをより多く有しており、H E V の診断キットおよび / またはワクチンに使用できることを示唆している。

30

【0125】

ポリペプチド 1 3 8 C、C 1 6 0、1 5 0、1 4 2、および 1 3 4 は、様々な抗体に対する反応性が弱かった。これによって、主要な自然のエピトープ O R F 2 の形成には、少なくとも a a 4 6 9 ~ a a 6 0 0 の断片が関与することが示された。

【0126】

ポリペプチド 1 7 0、C 1 6 0、N 1 6 0、1 5 0、1 4 4、1 4 2、および 1 3 4 の配列は、O R F 2 の a a 4 5 9 ~ a a 6 2 8、a a 4 6 9 ~ a a 6 2 8、a a 4 5 9 ~ a a 6 1 8、a a 4 6 9 ~ a a 6 1 8、a a 4 5 9 ~ a a 6 0 2、a a 4 5 9 ~ a a 6 0 0 の配列がそれぞれ開始アミノ酸 (M e t) に結合したものである。

【実施例 11】

40

【0127】

実施例 11 本発明のポリペプチドとマウス由来単クローン抗体のウェスタンブロット
 実施例 1 ~ 5 で述べたようにして得た本発明のポリペプチド 2 0 8 N、2 0 9 N、および 2 2 5 N と、実施例 8 で得たマウス由来単クローン抗体 1 F 6、2 C 9、3 F 5 のウェスタンブロットを実施した。前記ポリペプチドを S D S - P A G E によって分離し、次いで従来の方法に従ってニトロセルロース膜に移し、5 % の脱脂乳を加えて 1 . 5 時間ブロッキングし、様々なマウス由来単クローン抗体 (5 % の脱脂乳で 1 : 1 0 0 に希釈した、単クローン性 B リンパ球によって分泌された細胞上清) を加えて、室温で 1 時間反応させ、5 分間隔で 3 回洗浄した後、(5 % の脱脂乳で 1 : 1 0 0 0 に希釈した) H R P 標識抗マウス I g G を室温で 1 時間かけて加え、5 分間隔で 3 回、T N T で洗浄し、N B T / B

50

C I Pを加えて発色させた。図6にウェスタンブロットの結果を示す。その結果は、特にレーン8の、クーマシーブリリアントブルーR250での染色では観察できない重合体バンドが、ウェスタンブロットアッセイの酵素に関連した増幅効果によって観察できることを示している。さらに、本発明の組換えポリペプチド208Nが12% SDS-PAGE中には重合体にならないこと、ならびに209Nおよび225Nに対する単クローン抗体1F6の活性が、単クローン抗体2C9および3F5より強いことも確かである。

【実施例12】

【0128】

実施例12 ポリペプチド201を含むワクチンの調製およびそれによるマウスの免疫化アッセイ

フロイントアジュバントと併せたポリペプチド201含有ワクチンの調製

上述のようにして得、HPLCによって精製した本発明のポリペプチド201(純度>95%およびタンパク質濃度1.02mg/ml)をPBSで希釈し、等価な体積の(BCGを含有する)フロイント完全アジュバントを加えて、ポリペプチド201が所望の最終濃度に達するようにした(たとえば、各マウスを100μl、5μgで免疫化することが望まれれば、ポリペプチド201の濃度を0.05mg/mlに調製することになる)。この溶液を混合し、30分間動かさずにした後分離する液体相が現われなくなるまで30分間かけて乳化した。

【0129】

フロイントアジュバントをワクチンアジュバントとして使用して、0、7、28日の免疫化スケジュールに従い、4グループの各々のマウス(各群に3匹のKunming白色マウス)に100μl中0.5、1、2、5μg/マウスを筋肉内注射した。図7に結果を示す。その結果は、2μgを超える用量のフロイントアジュバントを加えて調製したORF2-201ワクチンが非常に強い免疫原性を有しており、免疫化後2週間目に抗原が産生され始め、4週間目には力価が最高に達したことを示唆した。免疫学についての一般の書籍および文献によると、30~70μg/マウスの用量のタンパク質抗原で免疫化したマウスにおいてのみ力価のより高い抗体が産生できると考えられている。したがって、この結果は、このワクチン、すなわちフロイントアジュバントと併せた本発明のポリペプチド201が、入手可能なワクチンに比べて著しく高い免疫原性効果を有することを示している。

【0130】

アルミニウムアジュバントと併せたポリペプチド201含有ワクチンの調製

Lanzhou Biological Product Institute of Chinaからの所望の量の原物アルミニウムアジュバント(Al₃+13.68%、Na+3.36%、pH5.55)を沈殿が生じるまで1NのNaOHで調整した。完全に混合した後、1×PBSを加えて体積を2倍にした。次いで、1分間10,000で遠心分離し、上清を捨てた。沈殿を1×PBSで再懸濁させて、再度体積を2倍にし、1分間10,000で遠心分離し、上清を捨てた。pHが7~7.4に達するまで、このプロセスを数回繰り返した。最後に、沈殿を等しい体積の1×PBSで再懸濁させ、溶液を滅菌し、4℃で保管し、9倍の保存溶液として使用した。

【0131】

同様に、上述のようにして得、HPLCによって精製したポリペプチド201(純度>95%およびタンパク質濃度1.02mg/ml)をPBSで希釈し、1/9の量のアルミニウムアジュバントを加えて、ポリペプチド201が所望の最終濃度に到達するようにし、4℃で終夜混合した。免疫化用量は、100μl/マウスである。アルミニウムアジュバントをワクチンアジュバントとして使用して、0、7、28日の免疫化スケジュールに従い、各群の3匹のBalb/cマウス各々に2、5、10μg/マウスを筋肉内注射した。図9に結果を示す。その結果は、5、10μg/マウスの用量の免疫原生効果がより高いことを示唆したが、これは、粒子抗原であり、単量体抗原より免疫原性が高いと考えられている最近の入手可能なHBV表面抗原ワクチンに匹敵する。したがって、この

10

20

30

40

50

結果は、本発明の重合体がワクチンに有用であることを示している。

【0132】

アジュバントなしのポリペプチド201の免疫アッセイ

上述のようにして得たポリペプチド201を4Mの尿素に溶かし、上清をPBS(pH 7.45)での透析にかけて再生させ、純度を約95%とした。フロイントアジュバントをワクチンアジュバントとして使用して、0、7、28日の免疫化スケジュールに従い、各群の3匹のKunming白色マウス各々に5、25、50 μ g/マウス(対照群には5 μ g/マウス)を筋肉内注射した。図8に結果を示す。その結果は、アジュバントなしのORF2-201ワクチンで免疫化したマウスにおいて抗体が顕著に産生されたことを示し、その使用した投与量は、フロイントアジュバントを加えてある従来の抗原の投与量と同等であった。本発明の重合体ポリペプチドの免疫原性が従来の抗原よりも高いことをさらに示している。

10

【0133】

上記の結果から、フロイントアジュバントまたはアルミニウムアジュバントの配合にかかわらず、組換えポリペプチド201とNE2(5 μ g/マウス)の両方で免疫化した場合も、Balb/cマウスによる特定の抗体の産生が誘発できると結論付けられる。フロイントアジュバントを配合した他の再生可能なポリペプチドも、マウスによる特定の抗体の産生を誘発し得る。したがって、本発明のポリペプチドは、ワクチンとしての使用に好適な特性を有する。

20

【実施例13】

【0134】

実施例13 本発明の組換えポリペプチドを含むワクチンによるアカゲザルの免疫化

ALTが正常であり、HEV陰性のアカゲザル6匹を選択し、2つの群に分け、一方の群をHF1、HF2、およびHF3と称し、他方の群をHF4、HF5、およびHF6と称した。実施例1~5および12で記載したとおりに調製した、投与量20 μ gのアルミニウムアジュバント含有ポリペプチドNE2Iワクチンおよびポリペプチド201ワクチンを三角筋内注射することによって、対象アカゲザルの2つの群にそれぞれワクチン接種を施した。このワクチン接種をそれぞれ0、10、および30日目に行った。最後のワクチン接種から3週間目に、この動物からの抗NE2I IgG抗体の力価を間接ELISAによって試験すると、結果は次のとおり、すなわちHF1(1:16000)、HF2(1:4000)、HF3(1:8000)、HF4(1:2000)、HF5(1:3000)、およびHF6(1:5000)であった。

30

【0135】

ポリペプチドNE2Iおよび201によって例示された上記の結果は、本発明の組換えポリペプチドが、米国特許第5885768号で免疫原として使用されたHEV ORF2ポリペプチドtrpE-C2(配列番号1のアミノ酸225~660)よりも高い免疫原性を有することを示唆している。Reyes等の米国特許第5885768号では、大腸菌から発現させたHEV ORF2ポリペプチドtrpE-C2と改良アルミニウムアジュバントの併用物50 μ gをそれぞれ0および30日目に静脈内注射することによって、4匹のカニクイザルにワクチン接種を施している。アジュバントのみを注射した2匹のカニクイザルが対照として使用されている。2回目のワクチン接種後4週間目には、ワクチン接種したサル群においてHEVに対する抗体が検出されなかった。ワクチン接種したサルの2匹を選択して、58日目に不溶性のアジュバントを含まないtrpE-C2ポリペプチド80 μ gによる3回目のワクチン接種を施したが、抗HEV抗体が検出されたのは4週間後までであった。

40

【実施例14】

【0136】

実施例14 本発明の組換えポリペプチドを含むワクチンで免疫化したアカゲザルへのHEV接種

E型肝炎ウイルス(HEV)の調製および定量化

50

中国新疆省出身のHEV患者からの糞便を無菌生理食塩水中10%懸濁液に調製した。この懸濁液を4で20分間、12000gで遠心分離し、上清を0.2µmの無菌フィルター(NALGENE(登録商標)カタログ番号190-2520)での濾過によって滅菌した。PCRでの検出が可能な量のHEVを感染投与量として使用した。

【0137】

糞便由来HEV RNAの抽出、逆転写、およびPCR: その操作指示に従ってTrizol試薬(GIBCO)を使用し、10%の糞便懸濁液からHEV RNAを抽出し、さらにAMV逆転写酵素を使用して、20µlの反応体積で、42で40分間、特定のプライマーA3(4566~4586、5'-ggctcaccggagtgtttctttc-3')をRTプライマーとして用いる、その逆転写を行った。次いで、20µlのRT産物を鋳型として使用し、A3プライマーおよびA5プライマー(4341~4362、5'-ctttgatgacaccgtcttctctcg-3')を使用して、次の反応条件下、すなわち94で5分間の予備変性; 94で40秒間の変性および68で40秒間の伸長を35サイクル; 75で5分間の伸長によって、1回目のRT-PCRを実施して、最終体積を20µlにした。1回目の反応産物20µlを鋳型として使用し、プライマーB5(4372~7392、5'-gccgcagcaaaaggcatccatg-3')およびB3(4554~4575、5'-gtgtttcttccaaaaccctcgc-3')を使用して、次の反応条件下、すなわち94で5分間の予備変性; 94で40秒間の変性、56で40秒間のアニーリング、および72で1分20秒間の伸長を35サイクル; 75で5分間の伸長によって、2回目のPCRを実施して、最終体積を20µlとした。

【0138】

この実験で扱うアカゲザルのグループ分け: 免疫化群1は、それぞれ実施例2のHF1、HF2、およびHF3の動物に対応するアカゲザルV10、V11、およびV12を含み; 免疫化群2は、それぞれ実施例2のHF4、HF5、およびHF6に対応するアカゲザルV13、V14、およびV15を含み; 対照群は、V16、V17、およびV18と称した3匹の非免疫化アカゲザルを含む。

【0139】

HEV接種

PCRで検出できる量のHEVを1感染投与量として用いた。実施例13で記載した、本発明の組換えポリペプチドを含むワクチンをアカゲザルHF1~6に最後に接種してから3週間目に、1,000感染投与量のHEVを上記のサルに接種した。HEV接種後、どのサルのALTも上昇しなかった。4週間目にV16およびV17の動物で抗NE2IgGが検出され、5週間目にV18の動物で抗NE2-IgGが検出された。V10~15の動物では1~37日目までHEV排泄物が検出されず; V16の動物では5日目にHEVの排泄が始まり30日目に終わり; V17およびV18の動物ではこれも5日目にHEVの排泄が始まったが、37日目になっても止まらなかった。これらの結果は、ワクチンとしての本発明のポリペプチドが米国特許第5885768号のHEV ORF2のポリペプチドtrpE-C2よりも高い免疫原性を有し、強い防御をもたらすことを示唆している。

【0140】

これらの結果から、少ない投与量の本発明のワクチンを使用してサルにワクチン接種を施した場合、ワクチン接種を受けたサルは、HEVに应答して優れた抗体を産生できるので、HEVを接種後、異常なALTおよび糞便中のウイルス排泄が認められなかったことがわかる。したがって、HEV ORF2からのポリペプチドtrpE-C2を使用して調製したワクチン(米国特許第5885768号)およびTsarev等が調製したポリペプチドを含むワクチンについての報告されているワクチン接種結果に比べて、より優れた免疫防御をもたらされた。さらに、Tsarev and Genelabs co. が利用したバキュロウイルス発現系は、人体に有害である可能性があるため、この系によって発現された組換えタンパク質が、ヒトに使用する市販薬または市販ワクチンとして認

可されたことはこれまで報告されていない。対照的に、本発明による大腸菌発現系によって発現されたいくつかの組換えタンパク質は、ヒトに使用する *in vivo* 市販薬として認可されており、安全性がより確かである。

【実施例 15】

【0141】

実施例 15 HEV ORF3 内エピトープに結合させた本発明のポリペプチド 247 を含むキメラポリペプチドの調製

その 5' 末端に制限エンドヌクレアーゼ部位 BamHI および NdeI を導入する前方向プライマーの 372FP (5' - ggatcccatatgaataacatgtcttttgct - 3') と、その 5' 末端に制限エンドヌクレアーゼ部位 BamHI を導入する逆方向プライマーの 372BRP (5' - ggatccctcggcggcc - 3') を使用して、次の反応条件下、すなわち 94 で 5 分間；94 で 50 秒間、56 で 50 秒間、および 72 で 30 秒間を 30 サイクル；および 70 で 10 分間の反応条件下において、中国新疆省の HEV 患者から単離した E 型肝炎ウイルス (HEV) の全長ゲノム (Aye, T. T., Uchida 等の *Nucleic Acids Research* 第 20 巻 (13) 3512 ページ (1992 年)；遺伝子銀行受入れ番号 GI221701) を鋳型とする PCR 反応を行った。HEV ORF3 内エピトープをコードする、大きさ約 370 bp の特定の DNA 断片を得た。上記の得られた PCR 産物を市販の pMD18-T プラスミド (TAKARA 社) に連結した。BamHI での消化によって、HEV ORF3 内のエピトープ遺伝子が挿入された陽性サブクローンを識別した。DNA の配列決定によって、クローン中に変異がないことが示され、それによって配列番号 11 で示す、HEV ORF3 内エピトープ遺伝子のアミノ酸配列が得られた。

【0142】

BamHI での消化によって HEV - ORF3 の遺伝子断片を得、BamHI で消化した (実施例 1 に記載の方法に従って調製した) pTO-T7-ORF2-247 発現プラスミドベクターに連結した。BamHI で消化して、HEV ORF3 の遺伝子断片が挿入された陽性発現クローン pTO-T7-ORF3-247 を識別した。このクローンを大腸菌 ER2566 株に形質転換し、これを ORF3-247 キメラポリペプチドの発現に使用した。

【実施例 16】

【0143】

実施例 16 NE2D をインフルエンザ由来赤血球凝集素抗原に結合させたキメラポリペプチドの調製

対のプライマー HAFP/E2RD を使用する、実施例 1 で調製した HEV - ORF2 変異配列 (配列番号 6) を鋳型とする PCR で増幅することによって、キメラペプチドのヌクレオチド配列を得た。PCR 反応は、94 で 5 分間の予備加熱；94 で 50 秒間の変性、56 で 50 秒間のアニーリング、72 で 70 秒間の伸長を 30 サイクル；および最後に 72 で 10 分間の伸長という条件下で実施する。得られた PCR 産物は、インフルエンザウイルス由来 HA および本発明のポリペプチド NE2D を含むキメラポリペプチドをコードする、約 800 bp の DNA 断片である。前方向プライマー HAFP は、BamHI および NdeI 制限部位を含む。逆方向プライマー E2RD は、EcoRI 制限部位および翻訳終止コドン TAA を含む。NdeI に対する配列は CAT ATG であり、ATG は翻訳開始コドンである。さらに、2 種のペプチド HA および NE2D の立体配座を厳密に維持するために、HA ペプチドと NE2D ペプチドの間にそれぞれ、CAGCTG TTC によってコードされる柔軟なリンカー Gly - Gly - を導入した。したがって、キメラポリペプチド HA - NE2D は、HEV ワクチンに適切に使用できる。一对のプライマーの配列は、以下のとおりである。

HAFP : 5' - AGA TCT CAT ATG TCT AAA
 BglII NdeI 91 Ser Lys
GCT TTC TCT AAC TGC TAC CCT TAC

A l a P h e S e r A s n C y s T y r P r o T y r
G A C G T T C C G G A C T A C G C T T C T
 A s p V a l P r o A s p T y r A l a S e r
T T A G G T G G A T C C
 L e u 1 0 8 G l y G l y S e r
 C A G C T G T T C T A C T C T C G T C C - 3 '
 E 2 R D : 5 ' - g a a t t c t t a g g g g g c t a a a a c a g c - 3 '

【0144】

得られたキメラポリペプチドをコードする核酸構築物を含む発現ベクターの調製

前述のPCR産物を市販のプラスミドpMD18-T(TAKARA社)中にクローン化した。次いで、BamHI/EcoRIでの消化によってpMD18-T-HA-ORF2-NE2Dプラスミドから問題の配列を得、BamHI/EcoRIでの消化および連結によって発現ベクターに組み込んだ。pTO-T7-HA-ORF2-NE2D発現プラスミドで形質転換した大腸菌ERR2566宿主細胞から、HA-ORF2-NE2Dキメラペプチドを単離した。このアミノ酸配列を配列番号12と称した。

10

【実施例17】

【0145】

実施例17 本発明のポリペプチドNE2Iを主体とした間接Elisaキットによる生物検体中の対HEV IgGの検出

HEVに対するIgGを本発明のポリペプチドNE2Iで検出するキットは、組換えポリペプチドNE2Iを塗布し、ブロッキング用緩衝液(20mMかつpH7.2のPB、0.5%のカゼイン、2%のゼラチン)でブロッキングしたマイクロタイタープレート; 検体希釈剤(20mMかつpH7.2のPB、1%のカゼイン); 作用コンジュゲート(酵素希釈剤(20mMかつpH7.2のPB、0.5%のカゼイン、10%のNBS)で希釈したHRPで標識したヤギ抗ヒトIgG(DAKO)); 20xPBST、色素原A、色素原B、および停止溶液(Beijing wantai)など、生物活性のない材料を含む。

20

【0146】

NE2Iに基く抗HEV IgGキットで一連のサル血清を検出し、Beijing wantaiおよびSingapore Genelabsから得た2種の市販抗HEV IgGキットと比較した。これらのサル血清は、静脈内接種後0~18週(w)までに得た、HEVに自然感染したサルを模倣したサルNo1、No2、No3、およびNo13の血清であった。

30

【0147】

操作手順は以下のとおり、すなわち、各マイクロタイターに検体溶媒100ulを加え; マイクロタイターに検体10ulを加え; マイクロプレートのすべての側面を穏やかに叩くことによって十分に混合し; 37で30分間インキュベートし; マイクロプレートを1回、PBSTで5回洗浄し; マイクロプレートを逆さにし、吸収性の紙にしっかりと軽く叩くことによってプロットドライし; すべてのウェルに作用コンジュゲート100ulを加え、マイクロプレートを37で30分間インキュベートし; マイクロプレートを再度5回洗浄してプロットドライし; 色素原A50ulおよび色素原B50ulを加えて、穏やかに叩いて十分に混合し; 暗所においてそのマイクロプレートを37で10分間インキュベートし; 各ウェルに停止溶液50ulを加え、プレートを軽く叩くことによって穏やかに混合し; 各ウェルの450nm/620nmの吸光度を測定するものである。2種の市販の抗HEV IgGキットでも、各々のアッセイ手順に従って厳密なアッセイを行った。

40

【0148】

結果は以下のとおり、すなわち、NE2Iを主体としたキットは、7~14日目までにWantaiおよびSingapore Genelabsからの2種の市販のキットよりも早く抗体陽転を検出し; 抗NE2I-IgGの持続時間は、Genelabsの抗H

50

EV-IgGおよびWantaiの抗HEV-IgGより長く；抗NE2I-IgGの検出率は、2種の市販の抗HEV-IgGキットより高かった（図10を参照のこと。表5に未処理データを示す）。無作為の34件の健常者血清を検出した場合、抗NE2I-IgGおよびGenelabs抗HEV-IgGの陽性率は、それぞれ35%および11%であり、後者は、完全に前者に含まれていた。肝炎患者の263件の臨床血清では、抗NE2I-IgGおよびWantai抗HEV-IgGの陽性率は、それぞれ27.2%および10.6%であった。非A、非B、非C型肝炎患者の91件の血清では、抗NE2I-IgGおよびGenelabs抗HEV-IgGの陽性率は、それぞれ69.2%および24.2%であった。一言で言えば、本発明のNE2Iを素材とした抗HEV-IgGは、市販の抗HEV-IgGキットよりも感度がよい。

【0149】

【 表 5 】

表5 本発明の抗HEV-IgG抗体検出キット(NF2I-IgG)および2種の市販検出キット(Genelabs、WANTAI)によるHEV感染サルの血清の検出感度の比較

血清番号1	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w	10w	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs																			
抗HEV-IgG	0.01	0.01	0.01	0.01	0.21	2.61	3	3	3	2.61	1.781.36	0.92	0.92	0.92	0.92	0.96	0.96	0.72	
WANTAI 抗HEV-IgG	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	1.82	2.45	2.48	2.42	1.7	1.370.54	0.36	0.25	0.18	0.1	0.05	0.05	0.05	0.03
本発明のNE2I-IgG	0.01	0.02	0.01	1.87	2.56	2.5	2.52	2.49	2.72	2.52	2.522.47	2.53	2.58	2.64	2.65	2.40	2.36	2.35	
血清番号2																			
Genelabs																			
抗HEV-IgG	0.05	0.07	0.05	0.04	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
WANTAI 抗HEV-IgG	0.02	0.02	0.02	0.02	2.05	2.58	2.42	2.46	2.65	2.5	2.332.23	2.3	2.21	2.2	2.26	2.26	2.38	2.46	
本発明のNE2I-IgG	0.06	0.06	0.06	0.77	2.26	2.36	2.5	2.56	2.62	2.65	2.492.47	2.4	2.54	2.51	2.38	2.29	2.34	2.33	
血清番号3																			
Genelabs																			
抗HEV-IgG	0.05	0.02	0.02	0.02	0.78	3	3	2.91	2.83	2.77	2.221.95	1.79	1.54	1.42	1.42	1.42	1.38		
WANTAI 抗HEV-IgG	0	0	0	0.02	0.02	1.87	1.62	1.67	1.82	1.48	1.050.67	0.75	0.76	0.58	0.38	0.46	0.34	0.23	
本発明のNE2I-IgG	0.01	0.05	0.04	0.83	2.2	2.63	2.59	2.62	2.75	3	2.7	2.6	2.55	2.6	2.54	2.51	2.51	2.36	2.51
血清番号13																			
Genelabs																			
抗HEV-IgG	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.15	0.1	0.08	0.06	0.060.07	0.08	0.07	0.1	0.15	0.07	0.04	0.02	
WANTAI 抗HEV-IgG	0.02	0	0.01	0.01	0.01	0	0.01	0.02	0.04	0.03	0.030.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
本発明のNE2I-IgG	0.1	0.11	0.09	0.09	2.3	2.45	2.51	2.5	2.34	2.21	2.132.14	2.05	2.01	1.82	1.87	1.79	1.7	1.6	

【 実施例 18 】

【 0150 】

実施例 18 本発明の組換えタンパク質をHRPで標識する方法

超純粋 (UPW) にそれぞれ 1 mg の HRP (Biozyme R / Z > 3) および Na

10

20

30

40

50

IO₄を溶解させ；攪拌しながらNaIO₄溶液を滴下し；この混合溶液を室温で30分間暗所に静置し；混合しながら1%のエチレングリコール溶液100 μ lを段階的に加え；それを4で30分間暗所に静置する。組換えタンパク質を3時間炭酸緩衝液（10mM、pH9.6）での透析にかけ；適度に透析した組換えタンパク質を酸素添加したHRPに加え、炭酸緩衝液（10mM、pH9.5）中、穏やかに攪拌しながら室温（または4）で6時間透析し；上述の混合物に新しく調製した0.1MのNaBH₄溶液20 μ lを加え；暗所に4で2時間静置し、30分間ずつ1回穏やかにボルテックス（vortex）し；これをPBS（10mM、pH7.2）中、4で終夜透析にかける。

【実施例19】

【0151】

実施例19 生物検体においてHEVに対する抗体IgMを検出する診断キット、および生物検体においてHEVに対する抗体IgMを検出する捕捉アッセイ

実施例18で記載した方法に従って、ポリペプチド225NをHRPで標識した。

【0152】

HRPで標識した本発明のポリペプチドNE2Iを含有する、HEVに対する抗体IgMを検出する診断キットは、マウス抗ヒトIgM μ 鎖多クローン抗体（デンマークDako社）を予め塗布し、ブロッキング用緩衝液でブロッキングしたマイクロタイターストリップ；検体希釈剤（20mM、pH7.2のPB、1%のカゼイン）；作用コンジュゲート（酵素希釈剤（20mM、pH7.2のPB、0.5%のカゼイン、10%のNBS）で適切に希釈したHRP標識ポリペプチド225N）；20 \times PBST、色素原薬品A、色素原薬品B、および停止溶液（WANTAI社、Beijing）など、生物活性のない材料を含む。

【0153】

この診断キットを使用する捕捉アッセイを以下のようにして、すなわち、マウス抗ヒトIgM μ 鎖多クローン抗体を予め塗布した各ウェルに希釈緩衝液100 μ lを加え；希釈緩衝液に検出対象の検体1 μ lを加え；穏やかに叩くことによって十分に混合し；37で30分間インキュベートし；PBSTで5回洗浄し；マイクロプレートを逆さにし、ティッシュペーパー上にしっかりと軽く叩くことによってプロットドライし；各ウェルに作用コンジュゲート（適切に希釈したHRP標識ポリペプチド225N）100 μ lを加え、マイクロプレートを37で30分間インキュベートし；再度5回洗浄し、プロットドライし；次いで色素原A50 μ lおよび色素原B50 μ lを加え、穏やかに叩くことによって十分に混合し；暗所において37で10分間インキュベートし；各ウェルに停止溶液50 μ lを加え、プレートを穏やかに叩くことによって混合し；各ウェルの吸光度をOD_{450nm/620nm}で測定することによって実施する。

【0154】

本発明に従って調製した抗HEV-IgM診断キットを使用して、前述の捕捉アッセイによって、肝炎患者の263件の臨床血清を検出にかけると、陽性率は11%であり；また前記捕捉アッセイによって非A、非B、非C型肝炎患者の91件の血清を検出にかけると、陽性率は48.4%であった。一方、GeneLabsの抗HEV-IgG診断キットによって検出したこの91件の血清検体の陽性率は、24.2%に過ぎなかった。上記の結果が示すように、捕捉アッセイを利用して本発明の抗HEV-IgM診断キットによって検出された陽性検体は、臨床的な診断とよく一致している。さらに、GeneLabs抗HEV-IgGキットによって検出された陽性検体の大部分も、この捕捉アッセイにおいて陽性である。すなわち、本発明の抗HEV-IgMキット、ならびに前記捕捉アッセイは、臨床上のHEV診断において現存する市販のキットよりも感度および特異性が高い。

【実施例20】

【0155】

実施例20 生物検定においてHEVに対する全抗体を検出する診断キット、および生物検体においてHEVに対する全抗体を検出する方法

実施例 18 で記載した方法に従って、ポリペプチド 225N を西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識した。

【0156】

本発明のポリペプチド NE2I および 225N を含有する、HEV に対する全抗体を検出するキットは、組換えポリペプチド NE2I を予め塗布し、ブロッキング用緩衝液 (20 mM かつ pH 7.2 の PB、0.5% のカゼイン、2% のゼラチン) でブロッキングしたマイクロタイターストリップ; 作用コンジュゲート (酵素希釈剤 (20 mM かつ pH 7.2 の PB、0.5% のカゼイン、10% の NBS) で希釈した HRP で標識したポリペプチド 225N); 20 × PBST、色素原薬品 A、色素原薬品 B、および停止溶液 (北京 WANTAI 社) など、生物活性のない材料を含む。

10

【0157】

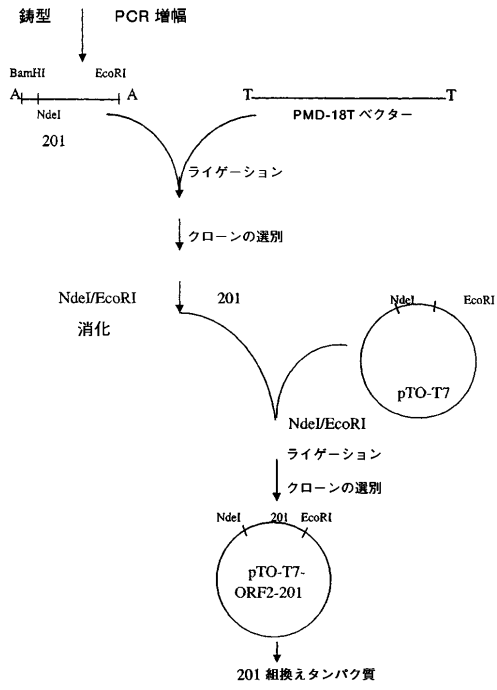
当該キットの検出プロトコルは、以下のとおり、すなわち、予めポリペプチド NE2I を塗布した前記ストリップのマイクロタイターに血清 50 μ l および適切に希釈した組換えポリペプチド 225N を HRP で標識したもの 50 μ l を加え; マイクロプレートのすべての側面を穏やかに叩いて混合し; 37 °C で 60 分間インキュベートし; マイクロプレートを PBST で 5 回洗浄し; マイクロプレート逆さにすることによってプロットドライし; 色素原 A 50 μ l および色素原 B 50 μ l を加え; 次いでマイクロプレートを 37 °C で 15 分間インキュベートし; 最後に各ウェルに停止溶液 50 μ l を加え、プレートを穏やかに叩いて混合し; 各ウェルの OD_{450nm/620nm} の吸光度を測定するものである。

【0158】

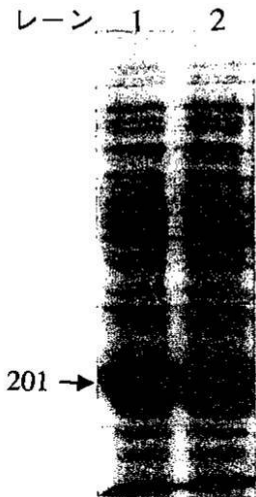
得られた検出結果は、次のとおり、すなわち、本発明のポリペプチド NE2I および 225N を主体とするサンドウィッチ式全抗 HEV 抗体キットでの検出では、肝炎患者からの 263 件の臨床血清が陽性率 52% で検出されたが、WANTAI 抗 HEV-IgG キットでの検出では、10.6% しか判定されなかった。さらに、同じサンドウィッチ式キットを使用して、非 A、非 B、非 C 型肝炎患者の 91 件の血清を検出すると、陽性率は 54.9% であった。しかし、この 91 件の血清において、GeneLabs 抗 HEV-IgG によって検出された陽性率は、24.2% に過ぎなかった。上記のデータが示すように、臨床的な診断において、当該診断キットでの検出は、現存する市販のキットに優っている。

20

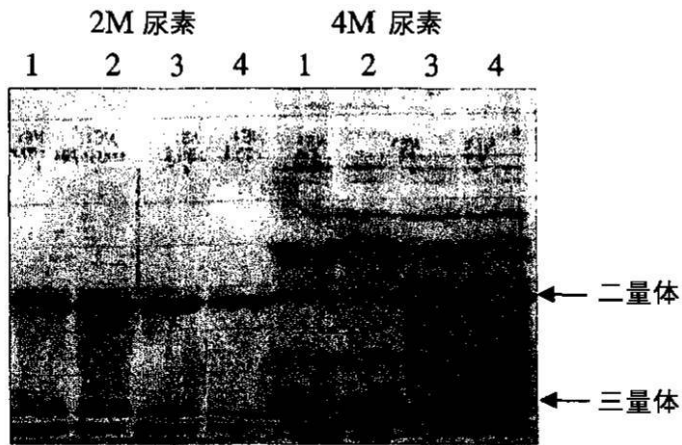
【 図 1 】



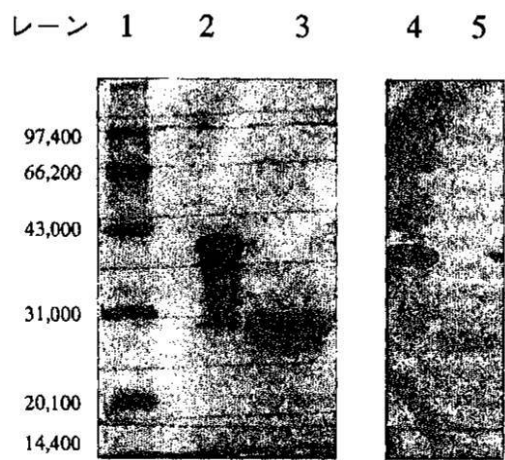
【 図 2 】



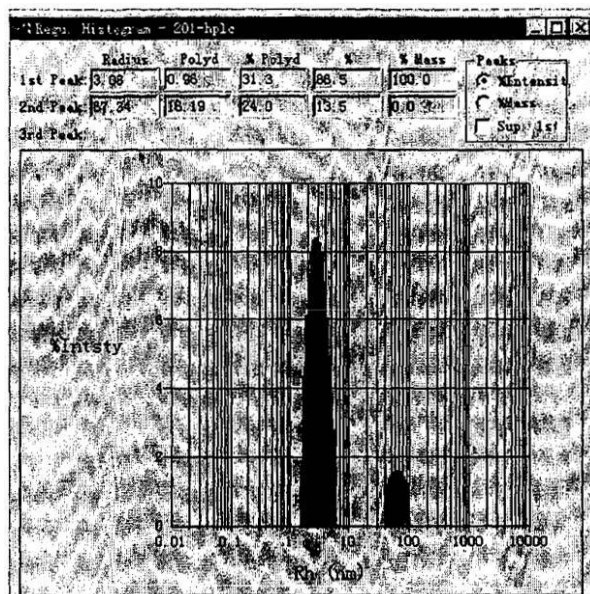
【 図 3 】



【 図 4 】



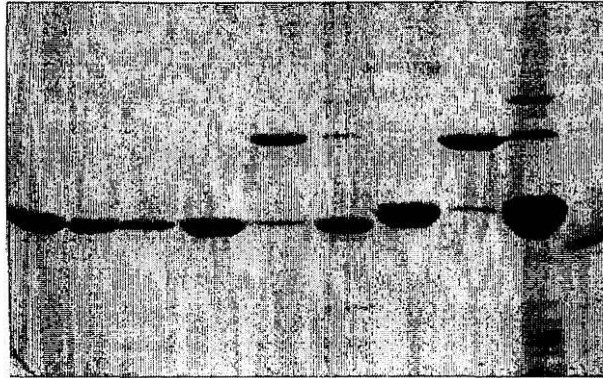
【 図 5 】



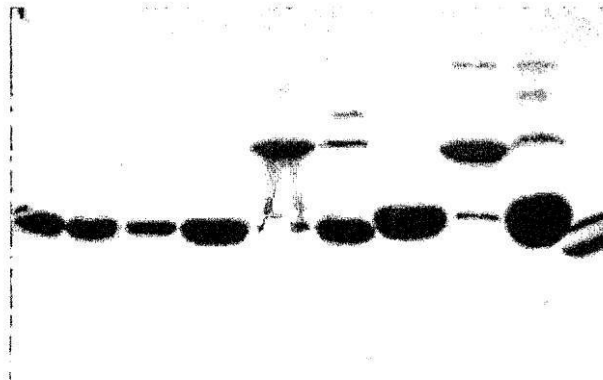
【 図 6 】

レーン 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

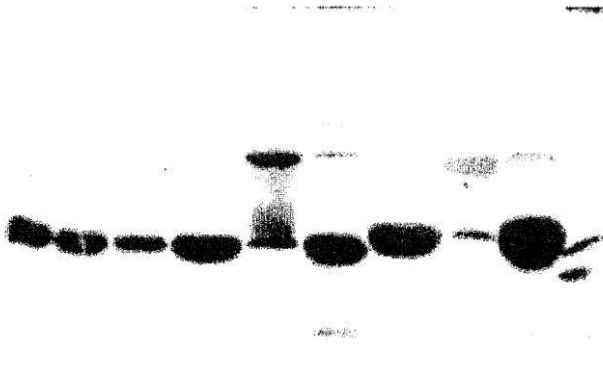
SDS-PAGE



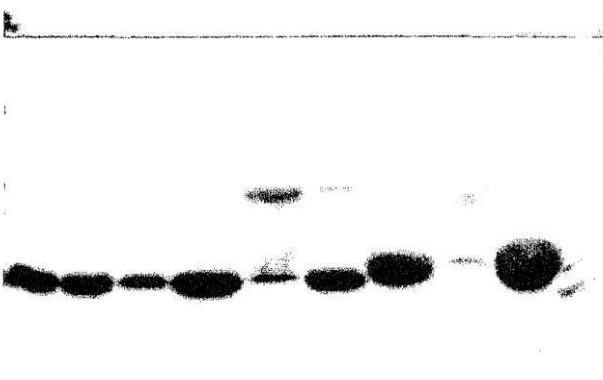
Mab 1F6



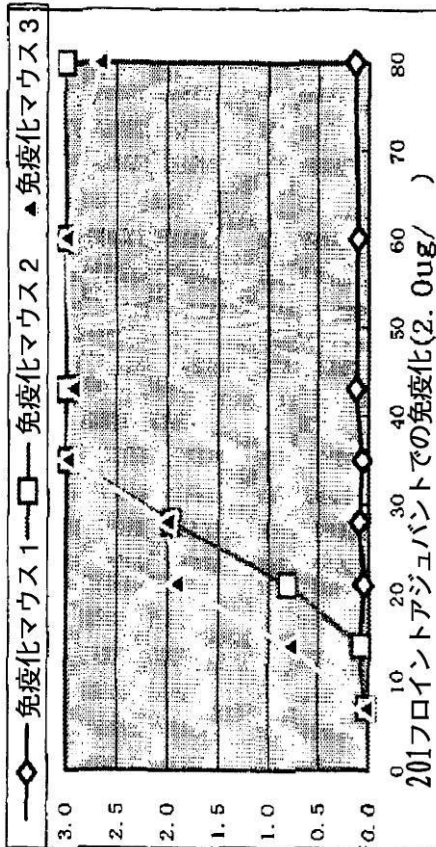
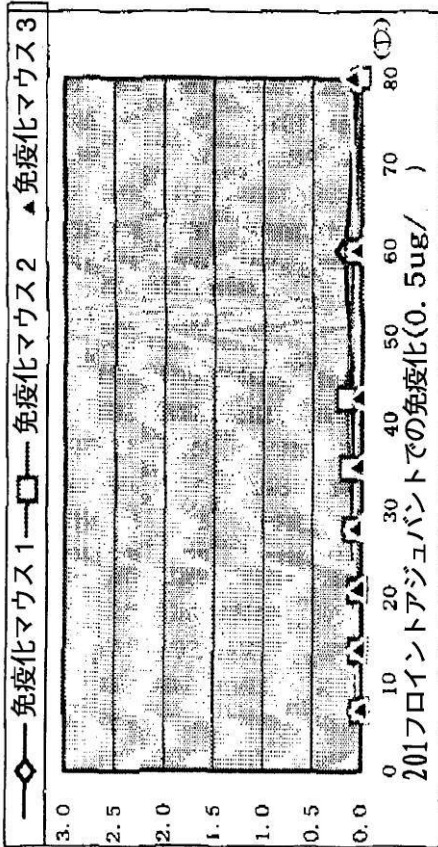
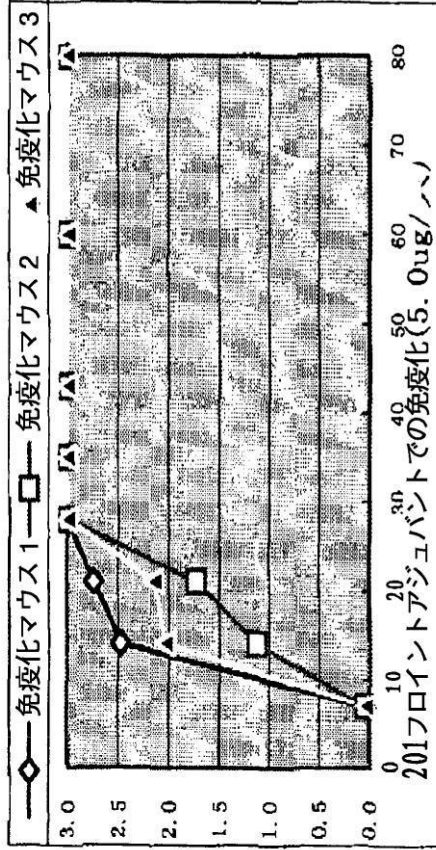
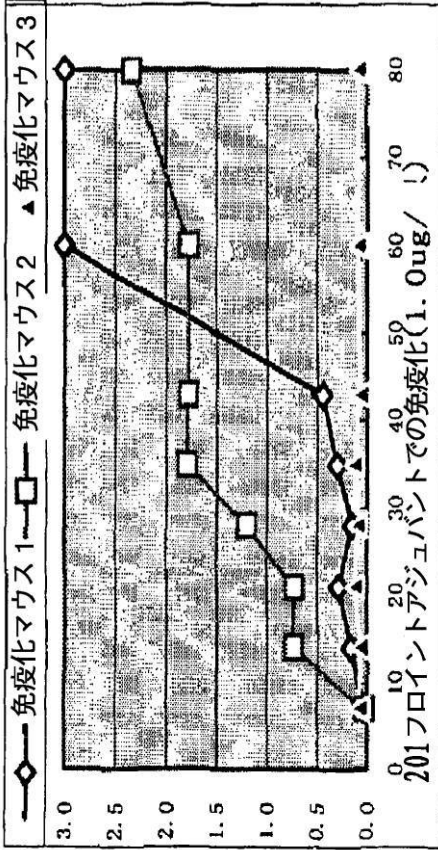
Mab 2C9



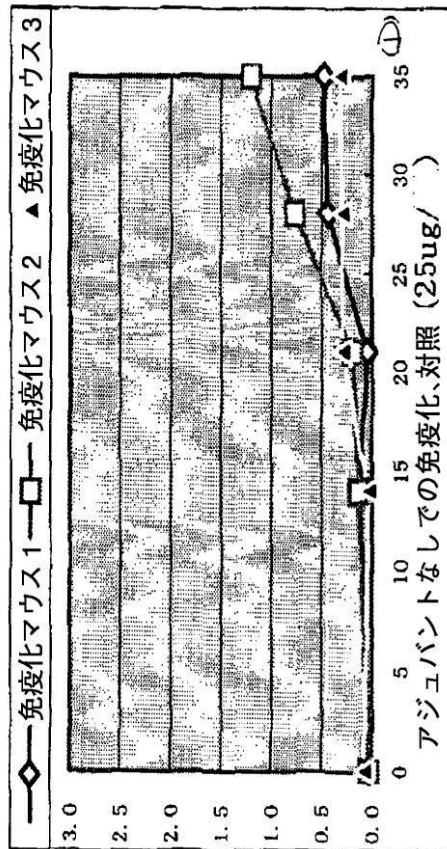
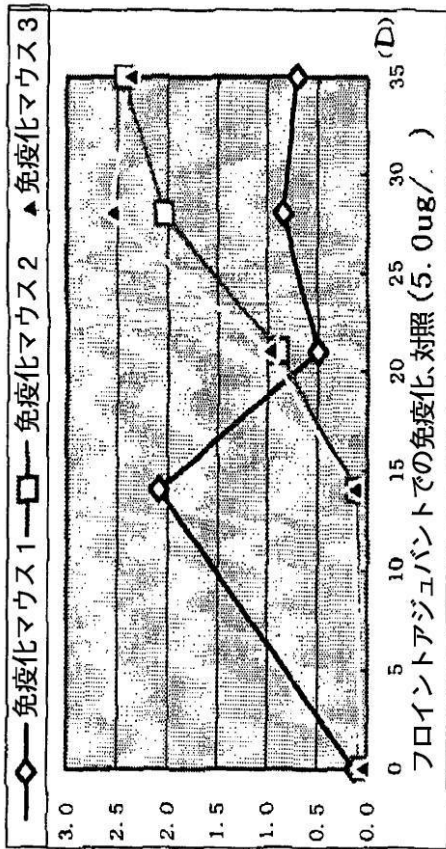
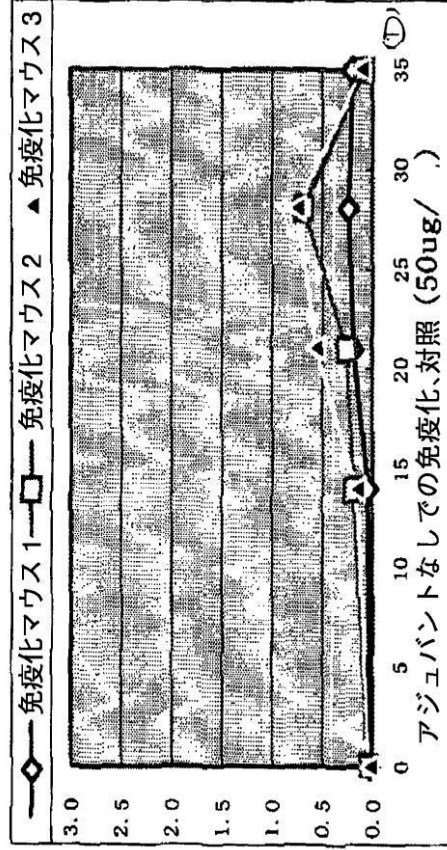
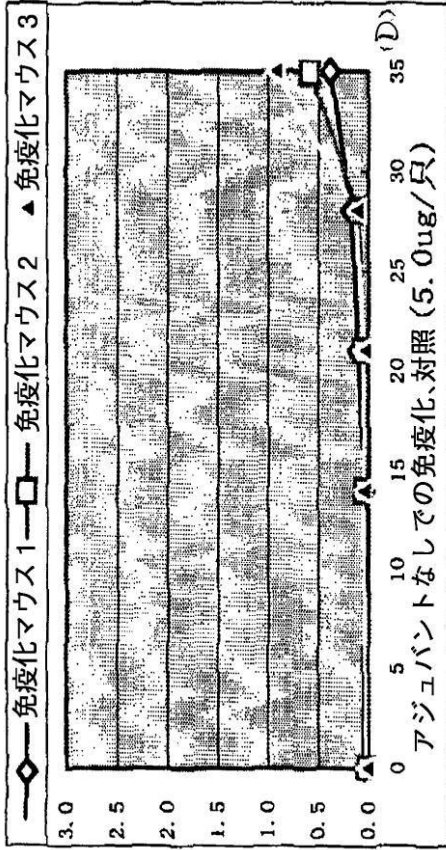
Mab 3F5



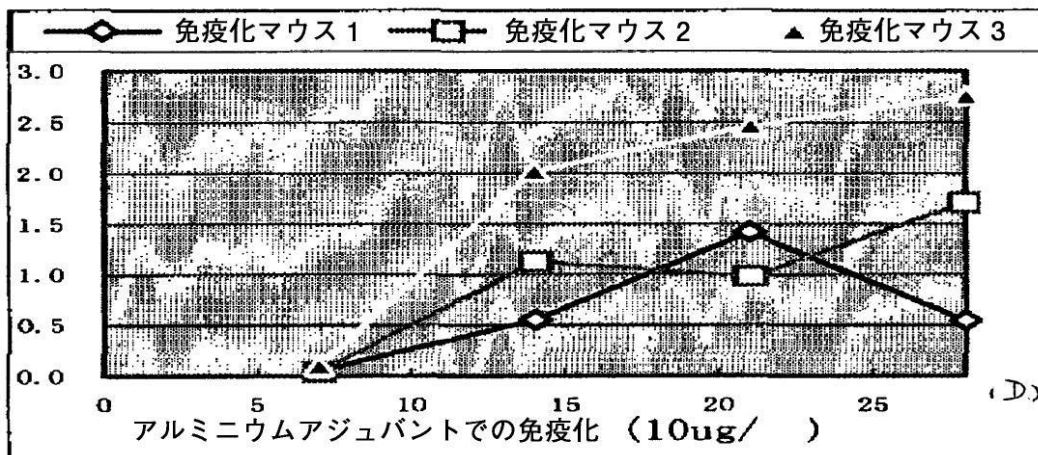
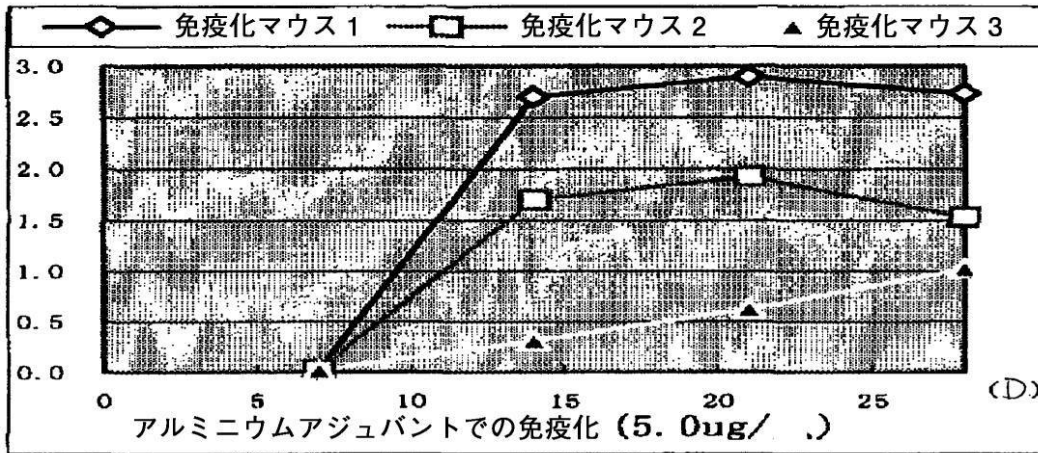
【図7】



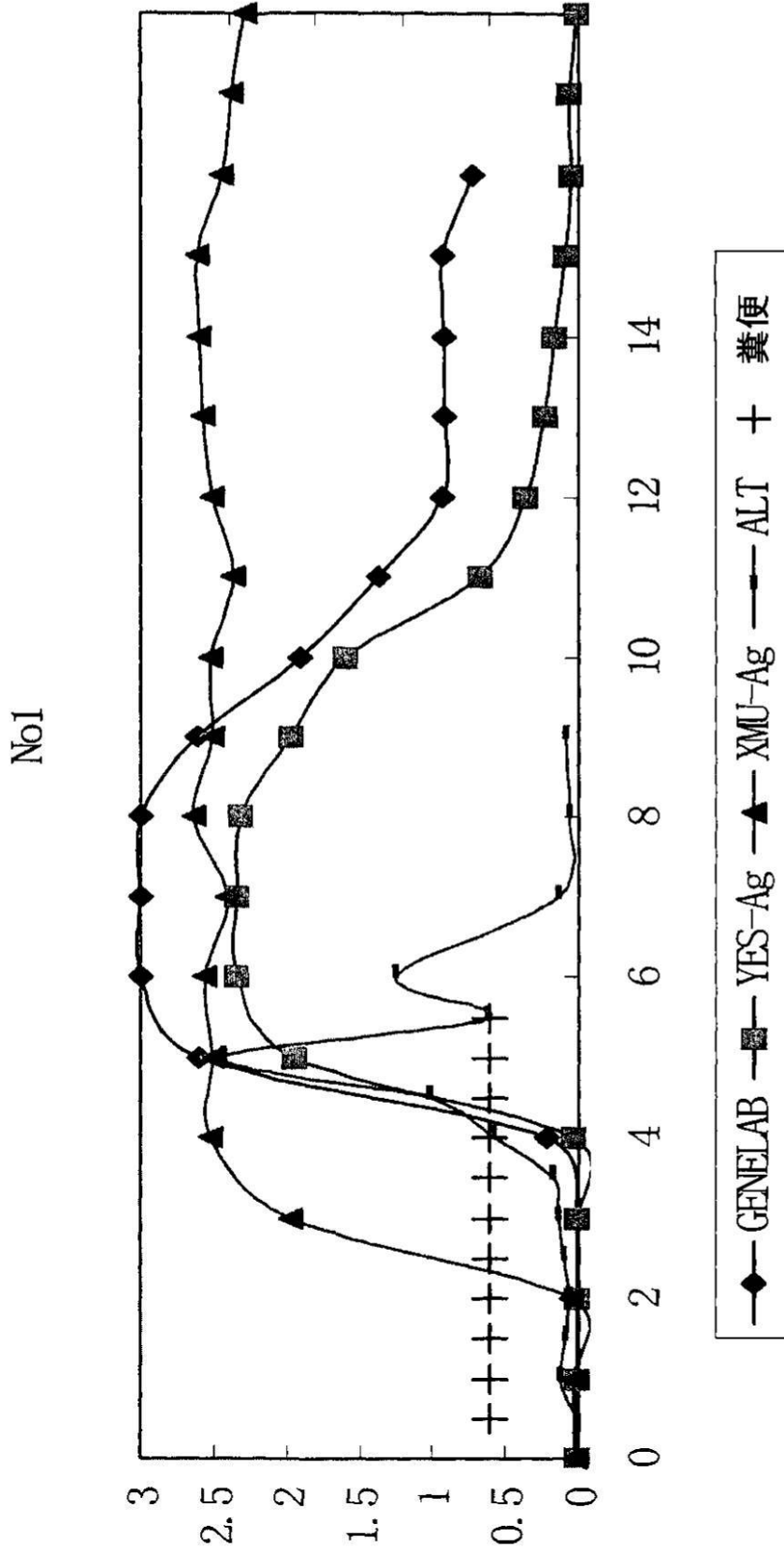
【 図 8 】



【図9】



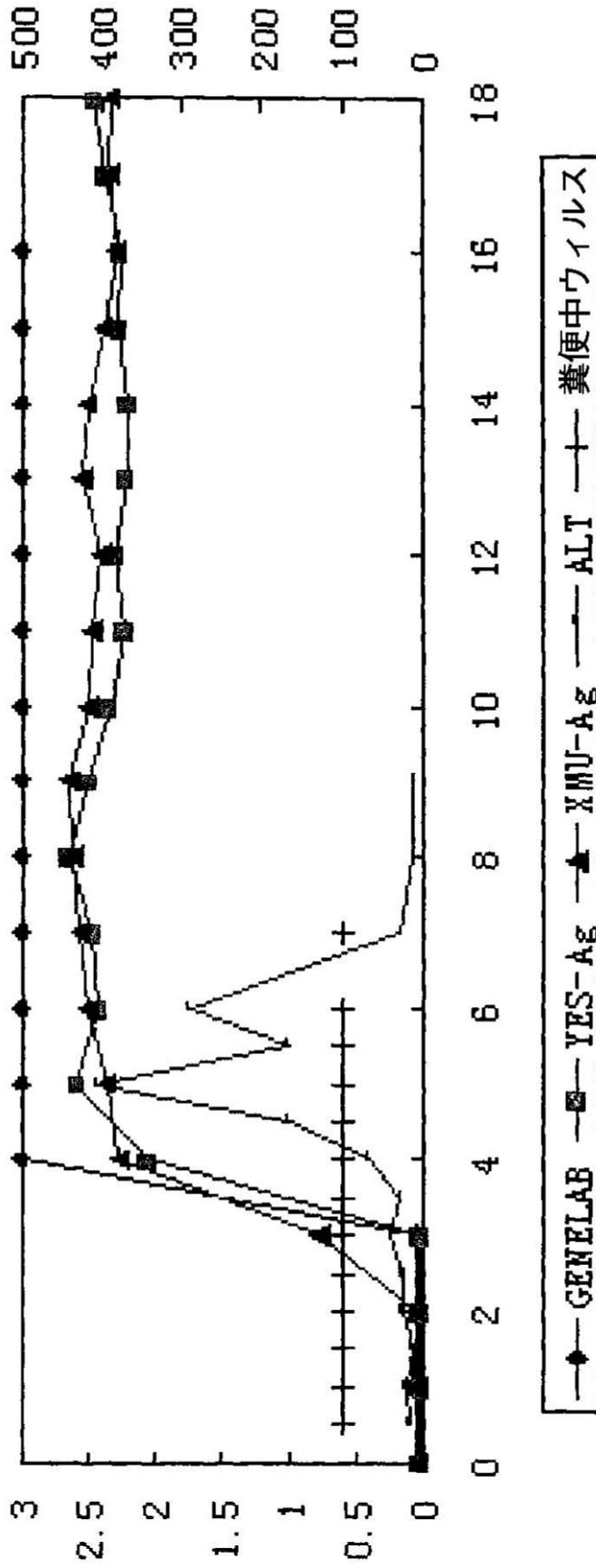
【 10 - 1 】



A

【 10 - 2 】

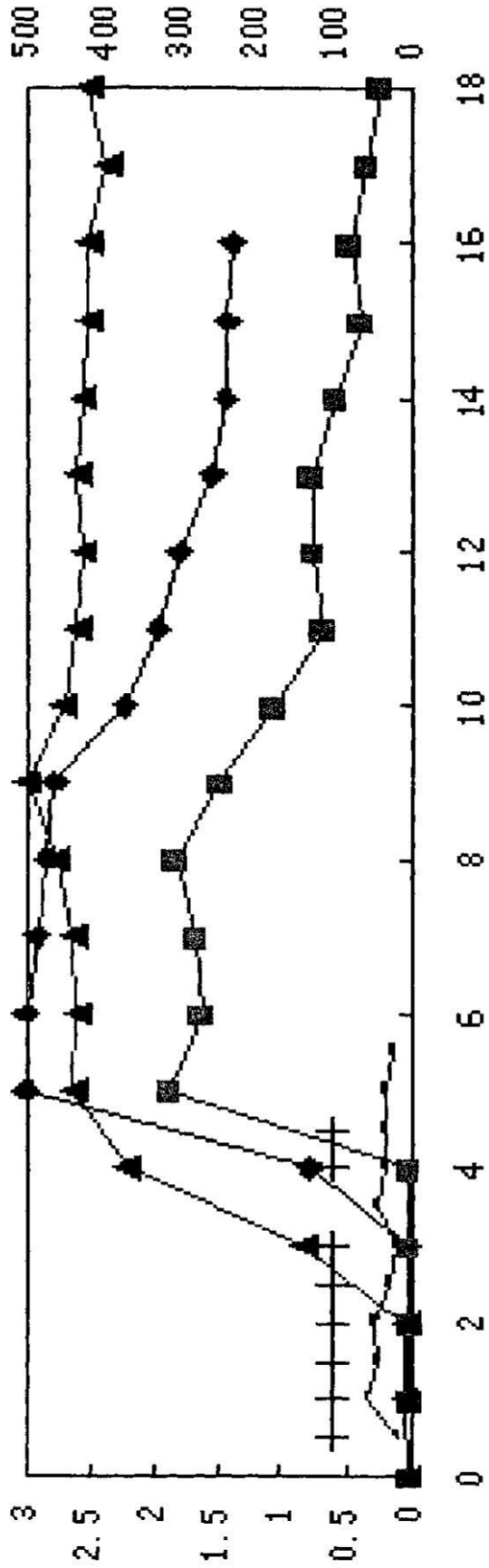
No.2



B

【 図 10 - 3 】

No.3

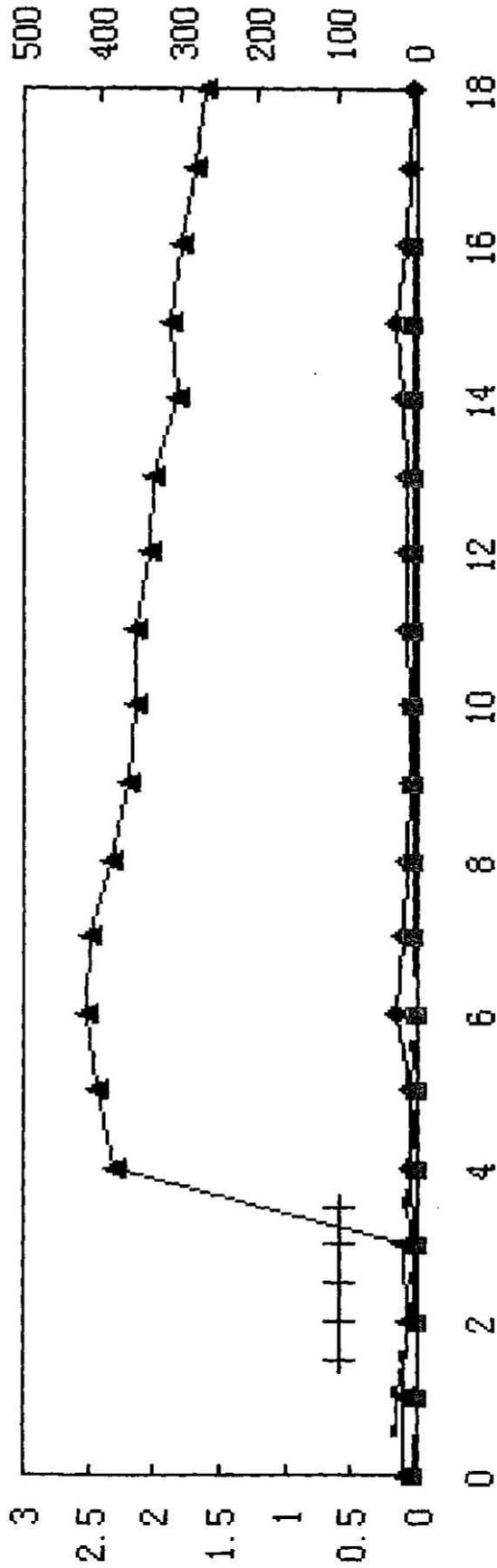


◆ GENELAB ■ YES-AE ▲ XMU-AE ⊕ ALT — 糞便中ウイルス

C

【 図 10 - 4 】

No13



◆ GENELAB ■ YES-Ag ▲ XMU-Ag — ALT + 糞便中ウイルス
 (Note: The graph uses inverted axes for the left y-axis and the right y-axis.)

D

【 配列表 】

0005829830000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/576	(2006.01)	G 0 1 N 33/576	Z

- (72)発明者 シア、ニンシャオ
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード 29、ヤン シェン タン カン
パニー リミテッド内
- (72)発明者 ザン、ジュン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード 29、ヤン シェン タン カン
パニー リミテッド内
- (72)発明者 リ、シャオウェイ
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード 29、ヤン シェン タン カン
パニー リミテッド内
- (72)発明者 ゲ、シェンシャン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード 29、ヤン シェン タン カン
パニー リミテッド内
- (72)発明者 グ、イン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード 29、ヤン シェン タン カン
パニー リミテッド内
- (72)発明者 ヘ、ジキアン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード 29、ヤン シェン タン カン
パニー リミテッド内

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 長井 啓子
審判官 飯室 里美

- (56)参考文献 J . Med . Virol . , vol . 6 0 , p . 3 7 9 - 3 8 6 (2 0 0 0)
J . Med . Virol . , vol . 5 2 , p . 2 8 9 - 3 0 0 (1 9 9 7)
J . Virol . , vol . 7 4 , p . 8 0 1 1 - 8 0 1 7 (2 0 0 0)
J . Med . Virol . , vol . 6 4 , p . 1 2 5 - 1 3 2 (2 0 0 1)
J . Clin . Microbiol . , vol . 3 7 , p . 2 8 6 3 - 2 8 7 1 (1 9 9 9)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 90
C12N 7/00 - 08
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq
PubMed
WPI
BIOSIS / CA / MEDLINE (STN)

JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	戊型肝炎病毒的多肽片段，含有其的疫苗组合物和诊断试剂盒，及其用途		
公开(公告)号	JP5829830B2	公开(公告)日	2015-12-09
申请号	JP2011088810	申请日	2011-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	北京宏泰生物制药企业有限公司 厦门大学		
申请(专利权)人(译)	北京宏泰生物制药企业有限公司 Shaamen大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京宏泰生物制药企业有限公司 Shaamen大学		
[标]发明人	シアニンシャオ ザンジュン リシャオウエイ ゲシエンシャン グイン ヘジキアン		
发明人	シア、ニンシャオ ザン、ジュン リ、シャオウエイ ゲ、シエンシャン グ、イン ヘ、ジキアン		
IPC分类号	C07K14/08 A61K39/29 A61K39/39 A61P1/16 A61P31/14 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/576 A61K38/00 A61K39/295 A61P31/12 C07K14/705 C12N15/51 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/12 A61K39/29 A61K2039/55505 A61K2039/55566 A61K2039/57 A61K2039/6075 A61P1/16 C07K14/005 C07K16/10 C07K2319/00 C12N2760/16022 C12N2770/28122 C12N2770 /28134 C12N2770/28171 G01N33/576		
FI分类号	C07K14/08.ZNA A61K39/29 A61K39/39 A61P1/16 A61P31/14 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1 /21 C12N5/00.101 C12N15/00.A G01N33/53.N G01N33/576.Z C12N15/51 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA33 4B024/CA02 4B024/CA11 4B024/EA02 4B024/HA01 4B024 /HA15 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BA92 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/GG03 4C085 /GG04 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74		
其他公开文献	JP2011201881A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(经修改) 用于诊断HEV感染的疫苗组合物和试剂盒，包括HEV多肽，包括IgG，IgM和完整抗体的诊断试剂盒，以及用于预防，诊断和/或治疗HEV感染的方法提供。n-mer (n是2至180的整数) 多肽或其片段，其包含具有特定氨基酸序列的戊型肝炎病毒ORF-2的氨基酸序列。此外，一种嵌合多肽，其中该片段与流感病毒的血凝素的保守片段融合，并且该片段与戊型肝炎病毒ORF3的表位多肽或其免疫原性活性片段之间的共价键，表达载体，其包含编码多肽的DNA分子，包含表达载体的表达宿主。【选择图】无

(21) 出願番号	特願2011-88810 (P2011-88810)	(73) 特許権者	508198258
(22) 出願日	平成23年4月13日 (2011. 4. 13)		Beijing Wantaï Biotechnological Farmacia Enterprises Company, Limited
(62) 分割の表示	特願2002-542994 (P2002-542994) の分割		中国, Beijing 102206, チャ ンピン ディストリクト, ケシュユアン ロード ナンバー31
原出願日	平成13年9月30日 (2001. 9. 30)		
(63) 公開番号	特願2011-201881 (P2011-201881A)	(73) 特許権者	510183280
(43) 公開日	平成23年10月13日 (2011. 10. 13)		シャアメン ユニバーシティ 中華人民共和国 361005 フージェ ン プロヴィンス, シャアメン, スーミン ディストリクト, スーミン ナン ロード ナンバー422
審査請求日	平成23年4月13日 (2011. 4. 13)	(74) 代理人	110000855
審判番号	不服2014-2678 (P2014-2678/11)		特許業務法人浅村特許事務所
審判請求日	平成26年2月12日 (2014. 2. 12)		最終頁に続く