

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6351571号  
(P6351571)

(45) 発行日 平成30年7月4日(2018.7.4)

(24) 登録日 平成30年6月15日(2018.6.15)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	D
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	L
CO 7 K 19/00 (2006.01)	GO 1 N 33/536	E
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	CO 7 K 19/00	Z N A
請求項の数 38 (全 117 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-509458 (P2015-509458)	(73) 特許権者	508029653
(86) (22) 出願日	平成25年5月3日(2013.5.3)		アンステイテュ・パストゥール
(65) 公表番号	特表2015-517649 (P2015-517649A)		フランス・F-75724・パリ・セデック
(43) 公表日	平成27年6月22日(2015.6.22)		クス・15・リュ・デュ・ドクトゥール・
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/059312		ルー・25-28
(87) 国際公開番号	W02013/164476	(74) 代理人	100108453
(87) 国際公開日	平成25年11月7日(2013.11.7)		弁理士 村山 靖彦
審査請求日	平成27年12月21日(2015.12.21)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	61/642, 924		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成24年5月4日(2012.5.4)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡邊 隆
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2012/074986	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成24年12月10日(2012.12.10)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 マルチプレックス免疫スクリーニングアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象由来の生体試料に存在する少なくとも2種の異なる標的抗体を検出するための *in vitro* アッセイ方法であって、

(a) 少なくとも2種の固体支持体の混合物を生体試料と接触させる工程であって、

固体支持体の少なくとも1種が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第1のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

固体支持体の少なくとも1種が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第2のAGT-抗原融合タンパク質を含む工程と、

(b) 第1のAGT-抗原への抗体の結合の存在または非存在を検出する工程と、

(c) 第2のAGT-抗原への抗体の結合の存在または非存在を検出する工程と

を含む方法。

【請求項2】

少なくとも5種の固体支持体の混合物を対象由来の生体試料と接触させる工程を含む、請求項1に記載のアッセイ方法。

【請求項3】

少なくとも10種の固体支持体の混合物を対象由来の生体試料と接触させる工程を含む、請求項1に記載のアッセイ方法。

【請求項4】

少なくとも15種の固体支持体の混合物を対象由来の生体試料と接触させる工程を含む、

請求項1に記載のアッセイ方法。

【請求項5】

両方のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号2のSNAP変異体を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項6】

前記固体支持体が、その特異的な位置、サイズ、直径、重量、粒度分布または標識により特異的に同定され得る、請求項1～5のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項7】

前記固体支持体が、蛍光色素、発色団、放射性同位元素および/または質量タグで標識されている、請求項1～6のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

10

【請求項8】

前記固体支持体が、微小粒子である、請求項1～7のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項9】

前記固体支持体が、磁性である、請求項1～8のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項10】

前記固体支持体が、蛍光染料で内部標識された微小粒子である、請求項1～9のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項11】

固体支持体のそれぞれが、励起後に異なる識別可能な波長を放射する、請求項1～10のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

20

【請求項12】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号3のデング熱ウイルス1のEDIIIタンパク質、配列番号4のデング熱ウイルス2のEDIIIタンパク質、配列番号5のデング熱ウイルス3のEDIIIタンパク質、配列番号6のデング熱ウイルス4のEDIIIタンパク質、配列番号7のウエストナイルウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号8の黄熱ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号9の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号10のジカウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号11のベッセルブロンウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号12のロシオウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号13のマレー脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号14のセントルイス脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号54によりコードされた遺伝子型1の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号55によりコードされた遺伝子型2の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号56によりコードされた遺伝子型4の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号57によりコードされた遺伝子型5の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号58によりコードされたラーベンスブルクウイルスのEDIIIタンパク質の少なくとも30個の連続的なアミノ酸を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

30

【請求項13】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、HIV1、HIV2、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ウエストナイルウイルスおよび、HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66および68の発癌性HPV株のウイルス性タンパク質の少なくとも20個の連続的なアミノ酸を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

40

【請求項14】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号21、配列番号42、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68、配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号109、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番

50

号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149および配列番号151からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項15】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号155、157、159、161、163、165、167、171、173、175、177および179の少なくとも30個の連続的なアミノ酸を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項16】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号155、157、159、161、163、165、167、171、173、175、177および179のアミノ酸配列を含む、請求項1～15のいずれか

10

【請求項17】

前記生体試料が、血清または血漿である、請求項1～16のいずれか一項に記載のアッセイ方法。

【請求項18】

(a)AGT基質に共有結合によりカップリングされた第1のAGT-抗原融合タンパク質を含む第1の固体支持体と、

(b)AGT基質に共有結合によりカップリングされた第2のAGT-抗原融合タンパク質を含む第2の固体支持体と

を含む、対象由来の生体試料に存在する少なくとも異なる2種の標的抗体を検出するためのキット。

20

【請求項19】

AGT基質に共有結合によりカップリングされた異なるAGT-抗原融合タンパク質にそれぞれカップリングされた少なくとも5種の固体支持体を含む、請求項18に記載のキット。

【請求項20】

AGT基質に共有結合によりカップリングされた異なるAGT-抗原融合タンパク質にそれぞれカップリングされた少なくとも10種の固体支持体を含む、請求項19に記載のキット。

【請求項21】

AGT基質に共有結合によりカップリングされた異なるAGT-抗原融合タンパク質にそれぞれカップリングされた少なくとも15種の固体支持体を含む、請求項20に記載のキット。

30

【請求項22】

前記固体支持体が、微小粒子である、請求項18～21のいずれか一項に記載のキット。

【請求項23】

前記固体支持体が、少なくとも1個の単一区画において一緒に混合されている、請求項18～22のいずれか一項に記載のキット。

【請求項24】

前記固体支持体が、マイクロタイタープレートの少なくとも1個のウェルまたは少なくとも1本のチューブにおいて一緒に混合された微小粒子である、請求項18～23のいずれか一項に記載のキット。

【請求項25】

固体支持体と結合している少なくとも2種の標的抗体を検出するための標識された二次抗体をさらに含む、請求項18～24のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項26】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号3のデング熱ウイルス1のEDIIIタンパク質、配列番号4のデング熱ウイルス2のEDIIIタンパク質、配列番号5のデング熱ウイルス3のEDIIIタンパク質、配列番号6のデング熱ウイルス4のEDIIIタンパク質、配列番号7のウエストナイルウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号8の黄熱ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号9の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号10のジカウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号11のベッセルブロンウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号12のロシオウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号13のマレー脳炎ウイルスのEDIIIタンバ

50

ク質、配列番号14のセントルイス脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号54によりコードされた遺伝子型1の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号55によりコードされた遺伝子型2の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号56によりコードされた遺伝子型4の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号57によりコードされた遺伝子型5の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号58によりコードされたラーベンスブルクウイルスのEDIIIタンパク質の少なくとも30個の連続的なアミノ酸を含む、請求項18~25のいずれか一項に記載のキット。

【請求項27】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、HIV1、HIV2、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ウエストナイルウイルスおよび、HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66および68の発癌性HPV株のウイルス性タンパク質の少なくとも20個の連続的なアミノ酸を含む、請求項18~26のいずれか一項に記載のキット。

【請求項28】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号21、配列番号42、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68、配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号109、配列番号111、配列番号113、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149および配列番号151からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項18~27のいずれか一項に記載のキット。

【請求項29】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号155、157、159、161、163、165、167、171、173、175、177および179の少なくとも30個の連続的なアミノ酸を含む、請求項18~28のいずれか一項に記載のキット。

【請求項30】

前記第1または第2のAGT-抗原融合タンパク質が、配列番号155、157、159、161、163、165、167、171、173、175、177および179のアミノ酸配列を含む、請求項18~29のいずれか一項に記載のキット。

【請求項31】

対象由来の生体試料における少なくとも2種の標的抗体を検出するための、請求項18~30のいずれか一項に定義されているキットの使用。

【請求項32】

対象における少なくとも2種の標的疾患を診断するための、請求項18~31のいずれか一項に定義されているキットの使用であって、前記標的疾患が、パピローマウイルス、または Dengue 熱、黄熱、ウエストナイル、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、C型肝炎、チクングニア、ロスリバー、マヤロ、西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎、クリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、シュマレンベルク、E型肝炎ウイルス、ラッサ熱、エボラ、マールブルグウイルスが原因のウイルス感染症、レプトスピラ・インテロガンス(*Lep tospirosa Interrogans*)が原因の細菌感染症、あるいは熱帯熱マラリア原虫が原因の感染症である使用。

【請求項33】

対象における少なくとも1種の標的疾患を診断するための *in vitro* 方法であって、前記標的疾患が、前記対象における少なくとも1種の標的抗体の合成を誘導することが知られており、請求項1~17のいずれか一項に定義されているアッセイ方法を行う工程を含み、前記少なくとも1種の標的抗体の量が対照値よりも高い場合、前記対象が、前記少なくとも1種の標的疾患を患っていると診断される方法。

【請求項34】

10

20

30

40

50

キットを製造するための方法であって、

(a)第1の標的抗体により認識される第1のAGT-抗原融合タンパク質を用意する工程と、  
(b)前記第1のAGT-抗原融合タンパク質を、前記AGT-抗原融合タンパク質の基質と共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体と接触させる工程と、

(c)第1のAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体を得る工程と、

(d)第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のAGT-抗原融合タンパク質を用意する工程と、

(e)前記第2のAGT-抗原融合タンパク質を、前記AGT-抗原融合タンパク質の基質と共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体と接触させる工程と、

(f)第2のAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体を得る工程と

を含み、

前記第1および第2の固体支持体が、互いに特異的に同定され得る方法。

【請求項35】

AGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた固体支持体を一緒に混合する工程をさらに含む、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

少なくとも5種の異なるAGT-抗原融合タンパク質を用いて工程a)~c)に従って、5種の異なるAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた少なくとも5種の固体支持体を作製する工程をさらに含む、請求項34または35に記載の方法。

【請求項37】

少なくとも10種の異なるAGT-抗原融合タンパク質を用いて工程a)~c)に従って、10種の異なるAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた少なくとも10種の固体支持体を作製する工程をさらに含む、請求項34または35に記載の方法。

【請求項38】

少なくとも15種の異なるAGT-抗原融合タンパク質を用いて工程a)~c)に従って、15種の異なるAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた少なくとも15種の固体支持体を作製する工程をさらに含む、請求項34または35に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

細菌、ウイルス(例えば、ウイルス性出血熱(VHF))および寄生生物等、病原因子によってもたらされる感染性疾患は、この疾患の重症度、高い致死性、特定の作用因子のヒトからヒトへの伝染性およびこれらの多くに対し有効な治療を欠くことから、重大な公衆衛生上の問題を引き起こす。

【背景技術】

【0002】

伝染病の制御は、時宜を得た適切な行為を定義し実行するための、作用因子の迅速な検出および正確な同定に決定的に依存する。この文脈において、大発生 of 早期検出、病原因子の的確な同定および疾患サーベイランスの改善のためのツールを作製および検証することが必要不可欠である。

【0003】

この点において、体液における抗体の検出は、ウイルスにより誘導される疾患、感染性の生物によって引き起こされる他の疾患、自己免疫性疾患の診断および癌の検出の大部分を構成する。実際のところ、特定の抗体は、その存在が病原体の大発生と相関することが知られているため、診断におけるマーカーとして役立つことができ、予後および治療をなし得る。これは特に、ウイルス抗原を排他的に標的化する抗体に関して当てはまる。

【0004】

抗体の存在を検出するための現在の方法は、免疫蛍光顕微鏡法、ケミルミネッセンスア

10

20

30

40

50

ッセイ、ウエスタンブロッティング、放射性免疫沈降アッセイ(RIP)およびELISA等、多様な技法を包含する。数種類の抗体の同時的な平行検出は、キャリアプレートおよび抗体が同一条件下で解析されるため、ELISAにおける等、個々のアッセイ間に存在するマトリックス効果を最小化することにより特に有用となり得る。したがって、これは、同一試料内に存在する複数の抗体の測定のために比較できる結果を生じるであろう。係るアッセイの一つは、ビーズに結合した抗原を利用するルミネックス(Luminex)マルチプレックスアッセイである。Pickeringら、*Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9:872~876(2002)。

【 0 0 0 5 】

しかし、病原性関連抗体の直接的な同定を複雑化させることに、正常血清は、複雑な染色パターンで自身を顕在化させる大量の自然抗体を含有する(Avrames S. *Immunol. Today* 1991)。これら自然抗体の存在は、「自己免疫性ノイズ」、即ち、天然起源の自己抗体の複雑なバックグラウンドからの疾患関連抗体の区別を複雑化させ得る。Andersonら、*Methods Mol. Biol.* 723:227~238(2011)に記述されている通り、クロストークおよび干渉は、依然としてマルチプレックスアッセイに関する懸念となっている。

10

【 0 0 0 6 】

マルチプレックスアッセイにおけるビーズへのヒト抗体の直接的な結合は、問題として報告されてきた。Tainskyら、*Biomarker Insights* 2:261~267(2007);Waterboerら、*J. Immunol Methods* 309:200~204(2006)。

【 0 0 0 7 】

さらに、陽性および対照試料の間の僅かな差は、マルチプレックスアッセイの有用性を限定し得る。Burbeloら、*Exp. Rev Vaccines*、9:567~578(2010)。

20

【 0 0 0 8 】

別の問題は、ELISAおよびマルチプレックスアッセイが、必ずしも(necessary)同じ結果を生じるとは限らないことである。例えば、Pickeringら、2002は、種々のウイルスおよび細菌抗原に対する防御抗体を測定した際の、2種のアッセイ間の多数の矛盾について記述した。この結果は、抗原が基板に付着する仕方に関する抗原性の変更を反映し得る。Ambrosinoら、*Malaria Journal* 9:317(2010)。同様に、Chamら、*Malaria Journal* 7:108(2008)は、いくつかの試料が、ELISAおよびビーズに基づくアッセイ読み取り値の間に顕著な差を示し、そのうち一部が、より高いELISA読み取り値を有していたことを報告した。この結果は、タンパク質が表面または球体に結合されている場合、抗体が組換えタンパク質の異なる部分に到達可能であるという事実によるものである可能性がある。Id。

30

【 0 0 0 9 】

商業適用(即ち、キット)のための十分な量の抗原の調製も必要とされる。Burbeloら、*Exp. Rev Vaccines*、9:567~578(2010)。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 国際公開第2004/031404号パンフレット

【 特許文献 2 】 国際公開第2005/085470号パンフレット

【 特許文献 3 】 国際公開第2004/031405号パンフレット

【 特許文献 4 】 国際公開第2006/114409号パンフレット

【 特許文献 5 】 国際公開第2010/107433号パンフレット

【 特許文献 6 】 米国特許第5,736,330号明細書

【 特許文献 7 】 米国特許第5,981,180号明細書

【 特許文献 8 】 米国特許第6,057,107号明細書

【 特許文献 9 】 米国特許第6,268,222号明細書

【 特許文献 1 0 】 米国特許第6,449,562号明細書

【 特許文献 1 1 】 米国特許第6,514,295号明細書

【 特許文献 1 2 】 米国特許第6,524,793号明細書

40

50

- 【特許文献 1 3】米国特許第6,528,165号明細書
- 【特許文献 1 4】欧州特許第1204869号明細書
- 【特許文献 1 5】米国特許第4,358,388号明細書
- 【特許文献 1 6】米国特許第4,654,267号明細書
- 【特許文献 1 7】米国特許第4,774,265号明細書
- 【特許文献 1 8】米国特許第5,320,944号明細書
- 【特許文献 1 9】米国特許第5,356,713号明細書
- 【特許文献 2 0】国際公開第99/055892号パンフレット
- 【特許文献 2 1】米国特許第6,682,507号明細書
- 【特許文献 2 2】国際公開第01/27300号パンフレット 10
- 【特許文献 2 3】米国特許第5,879,926号明細書
- 【特許文献 2 4】国際公開第84/01153号パンフレット
- 【特許文献 2 5】DK3614/83
- 【特許文献 2 6】国際公開第95/02059号パンフレット
- 【特許文献 2 7】国際公開第87/02670号パンフレット
- 【特許文献 2 8】国際公開第98/10088号パンフレット
- 【特許文献 2 9】国際公開第95/18863号パンフレット
- 【特許文献 3 0】国際公開第96/17823号パンフレット
- 【特許文献 3 1】米国特許第5,459,127号明細書
- 【特許文献 3 2】国際公開第95/21931号パンフレット 20
- 【特許文献 3 3】国際公開第96/25508号パンフレット
- 【非特許文献】
- 【0 0 1 1】
- 【非特許文献 1】Pickeringら、Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9:872 ~ 876(2002)
- 【非特許文献 2】Avrameas S. Immunol. Today 1991
- 【非特許文献 3】Andersonら、Methods Mol. Biol. 723:227 ~ 238(2011)
- 【非特許文献 4】Tainiskyら、Biomarker Insights 2:261 ~ 267(2007)
- 【非特許文献 5】Waterboerら、J. Immunol Methods 309:200 ~ 204(2006)
- 【非特許文献 6】Burbeloら、Exp. Rev Vaccines、9:567 ~ 578(2010) 30
- 【非特許文献 7】Ambrosinoら、Malaria Journal 9:317(2010)
- 【非特許文献 8】Chamら、Malaria Journal 7:108(2008)
- 【非特許文献 9】Damoiseauxら、ChemBiochem、2001
- 【非特許文献 1 0】Kufer SK、Eur. Biophys.J. 2005
- 【非特許文献 1 1】Xu-Welliverら、Biochemical Pharmacology 1999
- 【非特許文献 1 2】Miller and Rosman、BioTechniques、7:980 ~ 990、1992
- 【非特許文献 1 3】Brinsterら、Nature、296:39 ~ 42、1982
- 【非特許文献 1 4】Lastowski-Perryら、J.Biol. Chem. 260:1527(1985)
- 【非特許文献 1 5】B.J.Bondら、Mol. Cell. Biol. 6:2080(1986)
- 【非特許文献 1 6】Hellwig Sら、Nat. Biotechnol.2004; 22(11):1415 ~ 22 40
- 【非特許文献 1 7】Sambrook、Fitsch & Maniatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.
- 【非特許文献 1 8】DNA Cloning: A Practical Approach、IおよびII巻(D. N. Glover ed . 1985)
- 【非特許文献 1 9】Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編、1984)
- 【非特許文献 2 0】Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames & S. J. Higgins編、1984 )
- 【非特許文献 2 1】Animal Cell Culture(R. I. Freshney編、1986)
- 【非特許文献 2 2】Immobilized Cell and Enzymes(IRL Press、1986)
- 【非特許文献 2 3】B. E. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) 50

【非特許文献24】F. M. Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons, Inc.(1994)

【非特許文献25】Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、84:7413~7417、1987)

【非特許文献26】Mackeyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、85:8027~8031、1988

【非特許文献27】Wuら、J. Biol. Chem.、267:963~967、1992

【非特許文献28】Wu and Wu、J. Biol. Chem.、263:14621~14624、1988

【非特許文献29】Williamsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、88:2726~2730、1991

【非特許文献30】Harloweら、1988、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press

【非特許文献31】Kolpe A.B.ら、Virus Research 2012

【非特許文献32】Pan W.ら、The Journal of Immunology、2004

【非特許文献33】Sivakolundu S.ら、Journal of Medical Microbiology、2012

【非特許文献34】Wongら、Journal of Clinical Microbiology 42(1):65~72、2004

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

上述に鑑み、抗体生成疾患の分子診断のために、ハイスループット、対費用効果および精度においてさらなる改善をもたらすことのできるアドレス可能な(addressable)システムおよび方法の必要がある。本発明は、上述および他の必要を満たす。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、抗原の志向性抗原カップリング手順を用いて、より高い感度および特異性による、生体試料における複数の抗原の同時スクリーニングを可能にする。本発明者らは、生体液における広範な疾患、特に、アルボウイルス性疾患およびVHFにより生成される数種の抗体の迅速な同時検出を可能にするイムノアッセイを開発および検証した。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】基質コーティングされたマイクロスフェアへのキメラAGT抗原タンパク質の志向性カップリングを表す図である。カップリングの第1の工程は、アミンカップリングにより、活性化されたマイクロスフェアにAGT基質BG-PEG-NH2をカップリングする工程からなる。第2の工程は、基質コーティングされたマイクロスフェアを、AGT(例えば、SNAP変異体)を含有する融合タンパク質と接触させる工程からなり、前記酵素は、そのBG-PEG-NH2基質、即ち、マイクロスフェアに共有結合させることが企図されている。

【図2】抗SNAP抗体により追跡される、キメラSNAP-ウイルス抗原タンパク質(SNAP-DV1.EDI111、SNAP-DV2.EDI111、SNAP.DV3.EDI111、SNAP.DV4.EDI111、SNAP-WNV.EDI111、SNAP-YF.EDI111、SNAP-JE.EDI111、SNAP-ジカ.EDI111)のカップリング効率を示す図である。

【図3】hAGTタンパク質の基質を介してマイクロスフェアにコンジュゲートされた(本発明のカップリング)、または標準的なアミンカップリング手順、例えば、Bio-Plexアミンカップリングキット、BIORADによりカップリングされたキメラSNAP-DV2.EDI111タンパク質における精製モノクローナル抗DV2抗体の検出のためのイムノアッセイ実験の感度を比較する図である。

【図4】シングルプレックス(singleplex)、またはマイクロスフェアにカップリングされた他のキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV2.EDI111、SNAP.DV3.EDI111、SNAP.DV4.EDI111、SNAP-WNV.EDI111、SNAP-YF.EDI111、SNAP-JE.EDI111、SNAP-TBE.EDI111)によるマルチプレックスフォーマット(format)のいずれかにおける、マイクロスフェアにコンジュゲートされたキメラSNAP-DV1.EDI111タンパク質における精製モノクローナル抗DV1抗体の検出のためのイムノアッセイ実験の感度を比較する図である。

【図5】マイクロスフェアにカップリングされたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV1.EDI111、SNAP-DV2.EDI111、SNAP.DV3.EDI111、SNAP.DV4.EDI111、SNAP-WNV.EDI111、SNAP-YF.EDI111、SNAP-JE.EDI111、SNAP-TBE.EDI111)における、精製モノクローナル抗WNV抗体の

10

20

30

40

50

希釈液の検出のためのマルチプレックスイムノアッセイ実験の反応性および特異性を示す図である。

【図6】マイクロスフェアにカップリングされたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV1.ED111、SNAP-DV2.ED111、SNAP.DV3.ED111、SNAP.DV4.ED111、SNAP-WNV.ED111、SNAP-YF.ED111、SNAP-JE.ED111、SNAP-WSL.ED111、SNAP-ロシオ.ED111、SNAP-MVE.ED111、SNAP-SLE.ED111、SNAP-ジカ.ED111)におけるマルチプレックスイムノアッセイにおける、DV3に対するマウスポリクローナル血清における抗DV3 IgG検出(A)およびYFに対するマウスポリクローナル血清における抗YF IgG検出(B)の反応性および特異性を示す図である。

【図7A】マイクロスフェアにカップリングされたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV1.ED111、SNAP-DV2.ED111、SNAP.DV3.ED111、SNAP.DV4.ED111、SNAP-WNV.ED111、SNAP-YF.ED111、SNAP-JE.ED111、SNAP-WSL.ED111、SNAP-ロシオ.ED111、SNAP-MVE.ED111、SNAP-SLE.ED111、SNAP-ジカ.ED111、SNAP-TBE.ED111)におけるマルチプレックスイムノアッセイにおける、ヒト患者のDV1感染血清における抗DV1 IgM検出の反応性および特異性を示す図である。

【図7B】マイクロスフェアにカップリングされたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV1.ED111、SNAP-DV2.ED111、SNAP.DV3.ED111、SNAP.DV4.ED111、SNAP-WNV.ED111、SNAP-YF.ED111、SNAP-JE.ED111、SNAP-WSL.ED111、SNAP-ロシオ.ED111、SNAP-MVE.ED111、SNAP-SLE.ED111、SNAP-ジカ.ED111、SNAP-TBE.ED111)におけるマルチプレックスイムノアッセイにおける、ヒト患者のDV1感染血清における抗DV1 IgG検出の反応性および特異性を示す図である。

【図8】pDeSNAPunivカセットの構造を開示する図である。

【図9】pDeSNAPuniv/SBV.Nカセットの構造を開示する図である。

【図10A】 $Cd^{2+}$ により10日間誘導された(+ )または誘導なしの(-)S2/SNAP-SBV.N細胞の上清において行われた免疫ブロットアッセイを示す図である。規定量の高度に精製されたキメラタンパク質SNAP-TOS.N(理論上のMW49kDa)と比較して、分泌されたキメラタンパク質SNAP-SBV.N(理論上の(theoretical)MW50kDa)を、抗His<sub>tag</sub>抗体を用いて検出した。

【図10B】10日間誘導されたS2/SNAP+SBV.N細胞由来の分泌されたSNAP+SBV.Nタンパク質の最終精製工程に相当する、分子ふるいクロマトグラフィーカラムの各画分におけるタンパク質の直接的な可視化(PAGE-SDSのクーマシーブルー染色)を示す図である。

【図11】本発明の抗原コーティングされたマイクロスフェアを含有するデバイスの例を示す図である。

【図12A】SARSウイルスN遺伝子を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号154)およびアミノ酸配列(配列番号155)を示す図である。

【図12B】SARSウイルスN遺伝子を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号154)およびアミノ酸配列(配列番号155)を示す図である。

【図12C】SARSウイルスN遺伝子を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号154)およびアミノ酸配列(配列番号155)を示す図である。

【図12D】SARSウイルスN遺伝子を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号154)およびアミノ酸配列(配列番号155)を示す図である。

【図12E】SARSウイルスN遺伝子を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号154)およびアミノ酸配列(配列番号155)を示す図である。

【図12F】SARSウイルスN遺伝子を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号154)およびアミノ酸配列(配列番号155)を示す図である。

【図13A】SARSウイルスS遺伝子受容体結合ドメインを含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号156)およびアミノ酸配列(配列番号157)を示す図である。

【図13B】SARSウイルスS遺伝子受容体結合ドメインを含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号156)およびアミノ酸配列(配列番号157)を示す図である。

【図13C】SARSウイルスS遺伝子受容体結合ドメインを含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号156)およびアミノ酸配列(配列番号157)を示す図である。

【図13D】SARSウイルスS遺伝子受容体結合ドメインを含有するSNAPコンストラクトの

10

20

30

40

50





179)を示す図である。

【図24B】シュマレンベルクウイルス由来のNSsタンパク質をコードする配列を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号178)およびアミノ酸配列(配列番号179)を示す図である。

【図24C】シュマレンベルクウイルス由来のNSsタンパク質をコードする配列を含有するSNAPコンストラクトのコードヌクレオチド(配列番号178)およびアミノ酸配列(配列番号179)を示す図である。

【図25A】本発明のキットに包含されるべき、抗原カップリングされたマイクロスフェアの有利な組み合わせを示す図である。

【図25B】本発明のキットに包含されるべき、抗原カップリングされたマイクロスフェアの有利な組み合わせを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、抗原の志向性抗原カップリング手順を用いて、より高い感度および特異性による、生体試料における複数の抗原の同時スクリーニングを可能にする。本発明者らは、生体液における広範な疾患、特に、アルボウイルス性疾患およびVHFにより生成される数種の抗体の迅速な同時検出を可能にするイムノアッセイを開発および検証した。

【0016】

最小の抗原を用いた少量の抗体の検出のための最適な感度および特異性を達成するために、志向性抗原カップリング手順を開発した。この志向性のある抗原カップリング手順は、AGT酵素とその基質、06-ベンジルグアニン誘導体との間の共有結合相互作用に基づいており、この06-ベンジルグアニン誘導体は、そのベンジル基を酵素の活性部位システインへと転移させることによりAGT酵素と不可逆的に反応する。従って、多数の標的抗原をAGT酵素部分と融合させて、生体試料に存在する抗体の捕捉試薬として用いることのできる異なるキメラ融合タンパク質(以下、[AGT-抗原]融合タンパク質と称される)を生じることができる。本発明者らは、特異的AGT-基質相互作用の結果、融合タンパク質が固体支持体へと結合している場合、この抗体捕捉が思いがけないことに増強されることを示した。よって、AGT-基質による前記固体支持体のコーティングは、本発明のイムノアッセイの必要不可欠な工程である。

【0017】

実施例に示す通り、本発明者らは、志向性抗原カップリング手順を用いて、多数の異なる抗原コーティングされた蛍光マイクロスフェアを作製した。デング熱血清型1~4、ウエストナイル、黄熱、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、セントルイス脳炎、マレー渓谷脳炎、ヴェッセルスbron(Wesselsbron)、ジカ、ロシオ、ウスツ、リフトバレー熱およびチクングニアウイルスの異なるタンパク質に特異的な16種の血清抗体の力価測定において、16種の精製キメラ[AGT-抗原]融合タンパク質とカップリングされた16種の別個のセットのマイクロスフェアを用いた。思いがけないことに、これら16種の別個のセットのマイクロスフェアは、検出の感度および特異性に影響を及ぼすことなく単一試料において混合されている(図5を参照)。1000回の個々のアッセイを行うのに十分な、1セットの抗原カップリングされたマイクロスフェア(約 $1.25 \times 10^6$ 個のマイクロスフェア)の作製のためにごく少量の組換え抗原(<50  $\mu$ g)が必要とされるため、本システムの作製は、極めて時間および対費用効果が高い。

【0018】

結果的に、本発明は、キメラ融合タンパク質、即ち、AGT-抗原にカップリングされたAGT基質への固体支持体、好ましくは、標識された微小粒子の志向性抗原カップリングに基づくマルチプレックスアッセイを行うための方法およびキットを網羅する。この志向性抗原カップリングは、生体試料における抗体と抗原との相互作用の増加を可能にする。このようなイムノアッセイにおいて、AGT基質でコーティングされた固体支持体は、AGT酵素の酵素活性によりAGT-抗原とカップリングすることができる。

【0019】

10

20

30

40

50

6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT、これはATaseまたはMG MTとしても知られており、以下、「AGT」と称される)は、IUBMB酵素命名法においてEC2.1.1.63と番号付けされている。これは、207アミノ酸残基の6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼDNA修復酵素であり、細胞におけるその機能は、アルキル化DNAを修復することである。よりの確には、AGTは、 $S_N2$ 反応においてメチル基を反応性システイン残基 (Cys145)へと不可逆的に転移させることにより、DNAにおける $O^6$ -メチル化グアニンに作用する。近年、多数の $O^6$ -ベンジルグアニン誘導体が、そのベンジル基をAGT酵素の活性部位システインへと転移させることにより、前記酵素と不可逆的に反応することが示された (Damoiseauxら、ChemBiochem.、2001、国際公開第2004/031404号パンフレットおよび国際公開第2005/085470号パンフレットを参照)。よって、AGT-抗原は、酵素反応によりAGT基質にカップリングすることができる。

10

## 【0020】

AGT-抗原にカップリングされた固体支持体は、免疫グロブリンを含有する生体試料と共にインキュベートすることができる。免疫グロブリンが、固体支持体に結合した後、免疫グロブリンに有効に結合している固体支持体の検出を遂行 (accomplished) することができる。免疫グロブリンコーティングされた固体支持体 (複数可) の同定は、いかなる病原体が患者に感染しているか診断することを可能にする (各固体支持体が、定義された病原性抗原と適合するため)。この検出工程は、いずれかの通常手段、例えば、標識された検出抗体を用いて、固体支持体の性質を同定することにより行われる。

## 【0021】

有利には、本発明の方法は、罹患した患者における抗体の存在の検出のみに関与するが、これら抗体の正体に関する知識は必要とされない。

20

## 【0022】

複数の標的抗体を検出するための方法

本発明は、生体試料における少なくとも2種の標的抗体を検出するための方法に関する。本発明は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の異なる標的抗体の存在または非存在の検出を網羅する。よって、本発明は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の固体支持体を含む方法と、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の異なるエピトープを含む方法を含む。方法は、生体試料の添加前に一緒に混合された少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の固体支持体を含むことができる。エピトープは、標的抗体によって認識され得る。

30

## 【0023】

一実施形態において、方法は、

(a) 少なくとも2種の固体支持体の混合物を生体試料と接触させる工程であって、固体支持体の少なくとも1種が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第1のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

固体支持体の少なくとも1種が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第2のAGT-抗原融合タンパク質を含む工程と、

40

(b) 第1のAGT-抗原への抗体の結合の存在または非存在を検出する工程と、

(c) 第2のAGT-抗原への抗体の結合の存在または非存在を検出する工程と

を含む。

## 【0024】

一実施形態において、方法は、

(a) 少なくとも10種の固体支持体の混合物を生体試料と接触させる工程であって、第1の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第1のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

第2の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第2のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

50

第3の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第3のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

第4の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第4のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

第5の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第5のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

第6の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第6のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

第7の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第7のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

10

第8の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第8のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

第9の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第9のAGT-抗原融合タンパク質を含み、

第10の固体支持体が、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第10のAGT-抗原融合タンパク質を含む工程と、

(b)AGT-抗原のそれぞれへの抗体の結合の存在または非存在を検出する工程とを含む。

#### 【0025】

－実施形態において、方法は、

20

(a)06-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと、第1の標的抗体により認識される第1のエピトープとを含む第1の融合タンパク質に共有結合によりカップリングされたAGT基質を含む第1の固体支持体を、生体試料と接触させる工程と、

(b)06-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと、第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のエピトープとを含む第2の融合タンパク質に共有結合によりカップリングされたAGT基質を含む第2の固体支持体を、生体試料と接触させる工程と、

(c)2種の標的抗体の有無を検出する工程とを含む。

30

#### 【0026】

好ましくは、第1および第2等の固体支持体は、マイクロスフェアである。最も好ましくは、マイクロスフェアは、標識されている。好ましくは、第1および第2の固体支持体は、異なる標識で標識されている。

#### 【0027】

本発明は、対象由来の生体試料に存在する少なくとも2種の異なる標的抗体を検出するためのin vitroアッセイ方法であって、

(a) - 第1の標的抗体により認識される第1のエピトープを含むポリペプチドと、  
- 06-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと

40

を含む第1の融合タンパク質を用意する工程と、

(b)前記第1の融合タンパク質を、前記AGTポリペプチドの基質と共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体と接触させる工程と、

(c)第1の標的抗体により認識される第1のエピトープと共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体を得る工程と、

(d) - 第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のエピトープを含むポリペプチドと、

- 06-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと

を含む第2の融合タンパク質を用意する工程と、

50

(e)前記第2の融合タンパク質を、前記AGTポリペプチドの基質と共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体と接触させる工程と、

(f)第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のエピトープと共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体を得る工程であって、前記第1および第2の固体支持体が、互いに特異的に同定され得る工程と、

(g)前記生体試料を、工程(c)および(f)において得られた第1および第2の固体支持体と接触させる工程と、

(h)前記少なくとも2種の標的抗体の存在を検出する工程とを含む方法を網羅する。

#### 【0028】

本明細書において、用語「抗体」、「融合タンパク質」、「エピトープ」、「抗原」、「AGTポリペプチド」、「固体支持体」その他は、本技術分野における、即ち、幅広い様式において、一般的な意義のものとして明確に理解されたい。特に、これらの用語は、特定の単一分子のみならず、多数の前記分子も網羅する。例えば、用語「固体支持体」は、多数の同一固体支持体のサブセットを網羅し、用語「微小粒子」は、多数の同一微小粒子のサブセットを網羅し、用語「融合タンパク質」は、多数の同一単一タンパク質分子を網羅する。本発明の文脈において、固体支持体が、AGTポリペプチドは別として同一抗原、したがって同一エピトープを含有する多数の同一融合タンパク質を保有し、これによって、固体支持体において検出される抗体を明白に同定することができることは注目に値する。

#### 【0029】

本明細書において、用語「融合タンパク質」は、2個以上のポリペプチドの人為的な連接によって作製されたタンパク質またはポリペプチドを含有するポリペプチド(<http://en.wikipedia.org/wiki/peptide>を参照)を意味する。本発明のイムノアッセイにおいて、前記融合タンパク質は、AGTポリペプチドと、少なくとも1種のエピトープを含有する抗原とを含有する。融合タンパク質は、融合遺伝子の遺伝子操作([http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic\\_engineering](http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_engineering)を参照)によって得ることができる。これは通常、第1のタンパク質をコードするcDNA配列(<http://en.wikipedia.org/wiki/CDNA>を参照)から終止コドン(<http://en.wikipedia.org/wiki/Codon>を参照)を除去し、続いてライゲーション(<http://en.wikipedia.org/wiki/Ligase>を参照)または重複伸長(overlap extension)PCR(<http://en.wikipedia.org/wiki/PCR>を参照)により第2のタンパク質のcDNA配列をインフレーム([http://en.wikipedia.org/wiki/Reading\\_frame](http://en.wikipedia.org/wiki/Reading_frame)を参照)で付加する工程に参与する。続いて、該DNA配列が、単一のタンパク質として細胞([http://en.wikipedia.org/wiki/Cell\\_\(biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_(biology))を参照)により発現([http://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_expression](http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_expression)を参照)される。タンパク質は、両者の本来のタンパク質の完全配列を、またはどちらかの一部のみを包含するよう操作することができる。2種の実体がタンパク質である場合、タンパク質の独立的なフォールドおよび予想通りの挙動を可能にするリンカー(または「スペーサー」)ペプチドを加えてよい。特に、本発明の融合タンパク質は、AGT DNA配列のN末端またはC末端側いずれかに付着したエピトープまたは抗原コード配列と共に、AGTコード配列をインフ

#### 【0030】

本明細書における用語「抗体」は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびキメラ抗体を包含することが企図される。好ましくは、本発明のイムノアッセイにより検出される抗体は、罹患した患者の生体試料に存在するポリクローナル抗体であり、したがって、異なるB細胞源から生じたものである。このようなものとして、ポリクローナル抗体は、病原性抗原により提示される異なるエピトープを認識する(他方では、モノクローナル抗体は、単一細胞株に由来し、同一エピトープを認識する)。

10

20

30

40

50

## 【0031】

抗体(または「免疫グロブリン」)は、ジスルフィド結合により内部連結された少なくとも2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む糖タンパク質からなる。各重鎖は、重鎖可変領域(またはドメイン)(本明細書において、HCVRまたはVHと省略)および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3個のドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書において、LCVRまたはVLと省略)および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1個のドメイン、CLを含む。VHおよびVL領域は、「相補性決定領域」(CDR)または「超可変領域」と呼ばれる超可変性の領域へとさらに細分することができ、この領域は主として、抗原のエピトープの結合の原因であり、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域と共に散在する。各VHおよびVLは、3個のCDRおよび4個のFRで構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へと、次の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置される。重および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1の構成成分(C1q)を包含する宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

10

## 【0032】

抗体は、異なるアイソタイプ(即ち、IgA、IgD、IgE、IgGまたはIgM)のものとなり得る。IgGおよびIgM型の抗体は両者共に、本方法により検出することができる。注目すべきことに、これらのアイソタイプは、ジスルフィド結合により接続された2本の同一重鎖および2本の同一軽鎖で構成される。重要なことに、IgM抗体はポリマーを形成し、このポリマーにおいて、複数の免疫グロブリンが、主に五量体として、時に六量体としてジスルフィド結合による共有結合で一緒に連結されて、およそ900kDaの分子量を有する(五量体型では)。各単量体は、2個の抗原結合部位を有するため、五量体IgMは、10個の結合部位を有する。しかし通常、大部分の抗原のサイズの大きさが近傍部位への結合を妨げるため、IgM抗体は、10個の抗原と同時に結合することができない。そのポリマーの性質のため、IgMは、高い結合性を所有する。抗体の異なるアイソタイプ(例えば、IgGまたはIgM)は、同じ抗原により検出することができ、抗体応答が抗原/感染に対し初期またはより後期の応答であるか等、抗体応答の時間的識別を可能にする。この識別は、感染または抗原への曝露のタイミングに関する情報を提供することができる。

20

## 【0033】

抗体断片は、本方法の結果検出することもできる。この用語は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ(minibody)、ディアボディ(diabody)およびこれらの多量体ならびに二特異性抗体断片を包含することが企図される。

30

## 【0034】

モノクローナル抗体は、例えば、固体支持体に結合している免疫グロブリンを検出するために、本イムノアッセイにおいて用いることができる。本明細書において、「モノクローナル抗体」は、同種抗体集団から生じる抗体を定義する。より具体的には、集団の個々の抗体は、最小の比率で存在し得るいくつかの可能性のある自然発生の突然変異を除いて同一である。言い換えると、モノクローナル抗体は、単一細胞クローン(例えば、ハイブリドーマ、同種抗体をコードするDNA分子をトランスフェクトされた真核生物宿主細胞、同種抗体をコードするDNA分子をトランスフェクトされた原核生物宿主細胞等)の増殖から生じる同種抗体からなり、一般に、唯一のクラスおよびサブクラスの重鎖ならびに単一の種類の軽鎖により特徴付けられる。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一抗原に対するものである。加えて、通常、種々の決定基またはエピトープに対する種々の抗体を包含するポリクローナル抗体の調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一エピトープに対するものである。

40

## 【0035】

本明細書における用語「抗原」は、免疫系に当該物質に対する抗体を産生させるいずれかの物質を意味する。「免疫原性」抗原は、注射されると適応免疫応答を刺激することのできる特定の種類の抗原である。よって、分子レベルにおいて、抗原は、抗体の抗原結合

50

部位に「結合される」その能力により特徴付けられる。

【0036】

本発明の文脈において、抗体が、前記抗原(またはエピトープ)に対し $10^5\text{M}^{-1}$ よりも高い、好ましくは、 $10^6\text{M}^{-1}$ よりも高い、より好ましくは、 $10^7\text{M}^{-1}$ よりも高い親和性定数 $K_d$ (解離定数の逆数、即ち、 $1/K_d$ )を有する場合、前記抗体は、規定の(define)抗原(またはエピトープ)と「結合」する、もしくは前記抗原(またはエピトープ)を「認識」と言われる。この親和性は、例えば、平衡透析または蛍光消光により測定することができ、どちらの技術も本技術分野において日常的に用いられている。

【0037】

本発明の方法は、例えば、アレルゲンの検出において、タンパク質、核酸、抗体、免疫応答、多糖等の検出のための他の技法とカップリングすることができる。

10

【0038】

マルチプレックスイムノアッセイにおける使用のための抗原

本発明の文脈において、抗原またはエピトープは、タンパク質、リポタンパク質、多糖類および糖タンパク質を包含する。前記タンパク質は、アルブミン、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、百日咳トキソイド、細菌外膜タンパク質(髄膜炎菌性外膜タンパク質を包含)、RSV-Fタンパク質、マラリア由来ペプチド、B-ラクトグロブリンB、アプロチニン、オボアルブミン、リゾチーム、直鎖ペプチド、オリゴペプチド等、ウイルス、細菌、寄生虫、動物および真菌タンパク質を包含する。抗原およびエピトープは、癌、サイトカインおよびアレルゲンの抗原およびエピトープを包含する。抗原は、自己免疫性疾患

20

【0039】

抗原は、アルファフェトプロテイン(AFP、<http://en.wikipedia.org/wiki/Alphafetoprotein>)、がん胎児抗原(CEA)、CA 15-3、CA27-29、CA 125、CA 19-9、カルレチニン(Calretinin)、前立腺特異的抗原(PSA)、MUC-1(<http://en.wikipedia.org/wiki/MUC1>)、上皮膜タンパク質(EMA)、上皮腫瘍抗原(ETA)、チロシナーゼ(<http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosinase>)、メラノーマ関連抗原(MAGE)、TAA複合体、SSX2またはNERCMSL、ras([http://en.wikipedia.org/wiki/Ras\\_subfamily](http://en.wikipedia.org/wiki/Ras_subfamily))、P53、CD34、CD99、CD117、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、第VIII因子([http://en.wikipedia.org/wiki/Factor\\_VIII](http://en.wikipedia.org/wiki/Factor_VIII))、CD31(<http://en.wikipedia.org/wiki/CD31>)、FL1(<http://en.wikipedia.org/wiki/FL1>)、GFAP

30

、GCDFP-15、HMB-45、hCG、インヒピン、ケラチン、PTPRC(CD45)、MART-1、MyoD1、MSA、NSE、PLAP、S100タンパク質、SMA、シナプトフィジン、サイログロブリン、甲状腺転写因子-1、腫瘍M2-PKおよびビメンチン等、腫瘍関連抗原となり得る。

【0040】

抗原は、アンジオポエチン-2、sCD40L、EGF、エンドグリン、sFASL、HB-EGF、IGFBP-1、IL-6、IL-8、IL-18、PAI-1、PLGF、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、uPA、VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、sEGFR、FGF-塩基性、フォリスタチン、G-CSF、HGF、sHER-2/neu、sIL-6R $\alpha$ 、レプチン、オステオポンチン、PECAM-1、PDGF-AB/BB、プロラクチン、SCF、sTIE-2、sVEGFR-1およびsVEGFR-2等、癌バイオマーカーとなり得る。

【0041】

抗原は、カルピンディン、クラスタリン、GST- $\pi$ 、IL-18、KIM-1、MCP-1、アルブミン、B2M、シスタチンC、NGAL、オステオポンチンおよびTFF3等、腎臓毒性マーカーとなり得る。

40

【0042】

抗原は、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  2、TGF- $\beta$  3、IL-1 $\alpha$ 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、塩基性FGF、エオタキシン、G-CSF、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IP-10、MCP-1(MCAF) MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、PDGF-BB、RANTES、TNF- $\alpha$ 、VEGF、IL-1 $\alpha$ 、IL-2R $\alpha$ 、IL-3、IL-12(p40)、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- $\alpha$ 、HGF、IFN- $\gamma$  2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 $\delta$ -NGF、SCF、SCGF- $\beta$ 、SDF-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ およびTRAIL等、サイトカイン、ケモカインおよび増殖因子となり得る。

50

## 【 0 0 4 3 】

抗原は、ハプテン、ならびに糖類、オリゴ糖、多糖類、ペプチド、ムチン、毒素およびアレルギー(花粉、卵白)等、低分子量分子を含む他の部分であってもよい。

## 【 0 0 4 4 】

抗原は、食物、イネ科草本(grass)、樹木、草、昆虫、カビ、表皮(epidermal)またはイエダニ(dust mite)アレルギー等、アレルギーとなり得る。抗原は、動物、貝類、ミルク(<http://en.wikipedia.org/wiki/Milk>を参照)、ダイズ(<http://en.wikipedia.org/wiki/Soy>を参照)、卵([http://en.wikipedia.org/wiki/Egg\\_\(food\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Egg_(food))を参照)、コムギ(<http://en.wikipedia.org/wiki/Wheat>を参照)、ピーナッツ(<http://en.wikipedia.org/wiki/Peanuts>を参照)、木の実([http://en.wikipedia.org/wiki/Tree\\_nuts](http://en.wikipedia.org/wiki/Tree_nuts)を参照)、魚(<http://en.wikipedia.org/wiki/Fish>を参照)または種子アレルギーとなり得る。

10

## 【 0 0 4 5 】

抗原は、自己免疫性疾患に関与することができ、好ましくは、ヒト抗原である。好ましい抗原は、サイログロブリン、甲状腺ペルオキシダーゼ、リウマトイド因子(IgA、IgG、IgM)、シトルリン化ペプチド、ヒスチジル(histidyl)-tRNAシンターゼ(Jo-1)、PM-Scl、補体、補体構成要素C4cおよびC3c;総補体(CH50)、Sm/RNP、SS-Aおよび-B(シェーグレン(Sjogren)aおよびb)、Scl-70、トポイソメラーゼ、リボソームPタンパク質、アクチン、組織トランスグルタミナーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、プロテイナーゼ-3、M型ホスホリパーゼA、肝腎ミクロソーム抗原1型(抗LKM1)、抗肝臓サイトゾル1型(抗LC1)、SMA、ビルビン酸脱水素酵素複合体E2サブユニット、核膜孔gp210、核内構造体sp100、高移動度群box1、コラーゲン、コラーゲンII型、コラーゲンIV型、コラーゲンVII型、hLAMP-2、電位開口型カリウムチャネル(VGKC)、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体(NMDAR)、Hu、Yo、Ri、Ma 1/2、CRMP-5、アンフィフィシン(Ampiphysin)、熱ショックタンパク質(HSP)、HSP 60、凝固因子VIII、増殖細胞核抗原(PCNA)、DNAポリメラーゼ、リカバリン、-エノラーゼ、トランスデューシン-、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、第VIII因子(FVIII)、第IX因子(FIX)、アミロイド ペプチド(A)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG;[www.discoverymedicine.com/category/species-and-cell-types/human/brain/oligodendrocyte/](http://www.discoverymedicine.com/category/species-and-cell-types/human/brain/oligodendrocyte/)を参照)、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン(IFN)-、インターロイキン-(IL)-6、IL-17A、IL-17F、IL-22、ヒストンH1、シトクロムP450、ミエリン、アクアポリン-4(AQP-4)、Ro、La、筋肉特異的キナーゼ(MuSK)、アクチニン-4、-エノラーゼ、伸長因子2、グルタミン酸受容体(NR2)、ラミニン、ミオシン、smD1、PM-Scl、フィブリラリン、RNAポリメラーゼI、NOR)、Scl-70、サイクリンIおよびII、肝臓特異的タンパク質、ホルムイミノトランスフェラーゼ・シクロデアミナーゼ(LC-1)、可溶性肝臓抗原/肝臓-膵臓抗原(SLA/LP)、デスマグレイン1または3、エンボブラキン、BP180タンパク質、BP230タンパク質、ミエリン関連糖タンパク質、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)、チロシンホスファターゼ(IA2)、インスリン、H+/K+-ATPase、エラスターゼ、カテプシン(kathepsin)G、ラクトフェリン(lactoferrin)、BPI、rPAg1(CUZD1)およびrPAg2(GP2)、ホスホリパーゼA2受容体、グリアジン-アナログ融合ペプチド、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD65)ならびにサイトロロピン受容体抗原である。

20

30

40

## 【 0 0 4 6 】

抗原は、毒素、例えば、ボツリヌス神経毒、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)イブシロン毒素、リシン、サキシトキシン、志賀毒素、テトロドトキシン、ブドウ球菌エンテロトキシン等となり得る。ムチンも本技術分野において周知である。MUC5AC、MUC5BおよびMUC2は、その例である。特に、これらは、B群連鎖球菌(streptococcal)および肺炎球菌莢膜多糖類(III型を包含)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)ムコエクソ(mucoexo)多糖類および莢膜多糖類(フィッシャー(fisher)I型を包含)ならびにインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)多糖類等、天然起源の多糖類となり得る。

## 【 0 0 4 7 】

好ましい一実施形態において、前記抗原またはエピトープは、ウイルスによって発現さ

50

れ、ウイルスは、インフルエンザウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、HIVウイルス、黄熱ウイルス、デング熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、ウツモしくはウエストナイルウイルス、リフトバレー熱もしくはトスカールウイルス、チクングニアウイルス、オムスク出血熱ウイルス、Alkhurma出血熱ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、ロスリバーウイルス、マヤロウイルス、呼吸器多核体(respiratory synticial)ウイルス、ロシオウイルス、モルビリウイルス、マレー溪谷脳炎ウイルス、ヴェッセルスブロン(Wesselbron)ウイルス、ジカウイルス、リンパ性脈絡髄膜炎(lymphocytic choreomeningitis)ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ラッサ熱ウイルス、フニンウイルス、マチュポウイルス([http://en.wikipedia.org/wiki/Machupo\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Machupo_virus))、サビアウイルス、グアナリトウイルス、ムンプスウイルス、狂犬病ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス1および2型、より一般には、アルファウイルス、アデノウイルス、ハンタウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、フラビウイルス、ライノウイルス、オルソブニヤウイルス、ポリオウイルス、ポックスウイルス(例えば、天然痘(<http://en.wikipedia.org/wiki/Smallpox>)、サル痘、ブラックポックス(blackpox)またはカナリアポックス)、オルソミクソウイルス(例えば、インフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスB、インフルエンザウイルスC、[http://en.wikipedia.org/wiki/Influenza\\_A\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Influenza_A_virus); [http://en.wikipedia.org/wiki/Influenzavirus\\_B](http://en.wikipedia.org/wiki/Influenzavirus_B); [http://en.wikipedia.org/wiki/Influenzavirus\\_C](http://en.wikipedia.org/wiki/Influenzavirus_C))、ピコルナウイルス(例えば、口蹄疫ウイルス、FMDV、<http://en.wikipedia.org/wiki/Picornavirus>)、ヒトパルボウイルス、エンテロウイルス、コロナウイルス(例えば、SARSまたはヒトベータコロナウイルス)、ヒトパピローマウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、1、2および3型由来のパラインフルエンザウイルス等のパラミクソウイルス(<http://en.wikipedia.org/wiki/Paramyxovirus>)、またはいずれかの同定されたウイルスからなる群から選択される。

#### 【 0 0 4 8 】

好ましい一実施形態において、前記抗原またはエピトープは、フラビウイルス科(デング熱、黄熱、ウエストナイル、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、C型肝炎ウイルス)、トガウイルス科(チクングニア、ロスリバー、マヤロ、西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎ウイルス)、ブニヤウイルス科(クリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、シュマレンベルクウイルス)、カリシウイルス科(E型肝炎ウイルス)、アレナウイルス科(ラッサ熱)およびフィロウイルス科(エボラ、マールブルグ)からなる群から選択される科に属するウイルスにより発現される。

#### 【 0 0 4 9 】

別の好ましい一実施形態において、前記抗原またはエピトープは、寄生性原生動物(リーシュマニア属またはトキソプラズマ原虫(*Toxoplasma Gondii*)、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)(例えば、MSP1(19)+AMA-1(III)抗原を別々にまたは同時発現して)、ニューモシスチス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、クリプトスポリジウム属(*Cryptosporidium*)、フォーラーネグレリア(*Naegleria fowleri*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Naegleria\\_fowleri](http://en.wikipedia.org/wiki/Naegleria_fowleri))もしくはランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)由来等)、虫(クルーズトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)、線虫、糸虫または吸虫等)または節足動物(甲殻類、昆虫、クモ類等)により発現される。

#### 【 0 0 5 0 】

別の好ましい一実施形態において、前記抗原またはエピトープは、感染性細菌、例えば、サルモネラ属(*Salmonella*)、シゲラ属(*Shigella*)、連鎖球菌属(*Streptococcus*)、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)、マイコプラズマ属(*Mycoplasma*)、ジフテリア(*Diphtheriae*)、レプトスピラ属(*Leptospira*)、リケッチア属(*Rickettsia*)または大腸菌属(*Escherichia*)の属により発現される。さらに好ましい一実施形態において、前記細菌は、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Treponema\\_pallidum](http://en.wikipedia.org/wiki/Treponema_pallidum))、へ

10

20

30

40

50

リコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)、ライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、ペスト菌(*Yersinia pestis*)、エンテロコリチカ菌(*Yersinia enterocolitica*)、ブルセラ・アボルトス(*Brucella abortus*)、鼻疽菌(*Burkholderia mallei*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Burkholderia\\_mallei](http://en.wikipedia.org/wiki/Burkholderia_mallei))、類鼻疽菌(*Burkholderia pseudomallei*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Burkholderia\\_pseudomallei](http://en.wikipedia.org/wiki/Burkholderia_pseudomallei))、クラミジア・ニューモニエ(*Chlamydia pneumoniae*)、野兔病菌(*Francisella tularensis*)、マイコプラズマ・ニューモニエ(*Mycoplasma pneumoniae*)、インフルエンザ菌(*H. influenzae*)、肺炎球菌(*S. pneumoniae*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium\\_botulinum](http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_botulinum))、ウェルシュ菌([http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium\\_perfringens](http://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_perfringens))、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Neisseria\\_meningitidis](http://en.wikipedia.org/wiki/Neisseria_meningitidis))、表皮ブドウ球菌(*S. epidermidis*)、髄膜炎菌(*N. meningitidis*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、トラコーマクラミジア(*Chlamydia trachomatis*)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、Q熱コクシエラ(*Coxiella burnetii*)、発疹チフスリケッチア(*Rickettsia prowazekii*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Rickettsia\\_prowazekii](http://en.wikipedia.org/wiki/Rickettsia_prowazekii))、オウム病クラミジア(*Chlamydia psittaci*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydia\\_psittaci](http://en.wikipedia.org/wiki/Chlamydia_psittaci))、レプトスピラ・インテロガンズ(*Leptospira interrogans*)および大腸菌(*E. coli*) (例えば、大腸菌0157:H7([http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli\\_0157:H7](http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli_0157:H7)))から選択される生物種のうち1種に属する。

#### 【 0 0 5 1 】

別の好ましい一実施形態において、前記抗原またはエピトープは、真菌または酵母(例えば、カンジダ属(*Candida*)、アスペルギルス属(*Aspergillus*)、クリプトコッカス属(*Cryptococcus*)、ヒストプラズマ属(*Histoplasma*)、ニューモシスチス属(*Pneumocystis*)またはスタキボトリス属(*Stachybotrys*)の種由来)により発現される。

#### 【 0 0 5 2 】

抗原またはエピトープは、プリオンタンパク質(PrPc)に由来し得る。

#### 【 0 0 5 3 】

エピトープは、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEまたはIgG全体等、特異的免疫グロブリンに由来し得る。

#### 【 0 0 5 4 】

抗原は通常、特異的抗体の相互作用点として作用し得る数種の表面特色を提示する。いずれかの係る別個の分子特色は、エピトープを構成する。したがって本明細書において、用語「エピトープ」は、少なくとも1個の抗体により結合され得る、抗原、例えば抗原断片の特定の分子表面特色を指す。したがって分子レベルにおいて、エピトープは、特異的抗体により認識および結合される、抗原(例えば、抗原断片)の特定の分子表面特色に相当する。本発明の文脈において、「融合タンパク質」は、標的抗体によって認識される少なくとも1個のエピトープを含有する。好ましくは、前記融合タンパク質は、数個のエピトープ(<http://en.wikipedia.org/wiki/Epitope>)を含む抗原全体を含有する。これらエピトープは、直鎖または立体構造エピトープとなり得る。本明細書において、直鎖(または配列)エピトープは、そのアミノ酸の([http://en.wikipedia.org/wiki/Amino\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid))直鎖配列または一次構造([http://en.wikipedia.org/wiki/Primary\\_structure](http://en.wikipedia.org/wiki/Primary_structure))により、抗体(<http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody>)により認識されるエピトープである。対照的に、立体構造エピトープ([http://en.wikipedia.org/wiki/Conformational\\_epitope](http://en.wikipedia.org/wiki/Conformational_epitope))は、その特異的三次元形状によって認識される。好ましくは、本発明の融合タンパク質は、立体構造エピトープを含有するが、その理由として、大部分のポリクローナル抗体がこれを認識するからである。

#### 【 0 0 5 5 】

しかし、このような抗原は、交差反応性エピトープ、即ち、そこに結合する非特異的抗体により認識されるエピトープを提示しないことが重要である。このような場合、本発明の方法の特異性は減少するであろう。

【0056】

好ましい一実施形態において、前記エピトープは、デング熱ウイルス1、デング熱ウイルス2、デング熱ウイルス3、デング熱ウイルス4、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ジカウイルス、ヴェッセルスブロン(Wesselbron)ウイルス、ロシオウイルス、マレー脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、遺伝子型1の日本脳炎ウイルス、遺伝子型2の日本脳炎ウイルス、遺伝子型4の日本脳炎ウイルス、遺伝子型5の日本脳炎ウイルスおよびラーベンスブルク(Rabensburg)ウイルスのタンパク質からなる群から選択されるウイルスタンパク質、好ましくは、EDIIIタンパク質上に存在する。

10

【0057】

より好ましい一実施形態において、前記エピトープは、配列番号3によりコードされるデング熱ウイルス1のEDIIIタンパク質、配列番号4によりコードされるデング熱ウイルス2のEDIIIタンパク質、配列番号5によりコードされるデング熱ウイルス3のEDIIIタンパク質、配列番号6によりコードされるデング熱ウイルス4のEDIIIタンパク質、配列番号7によりコードされるウエストナイルウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号8によりコードされる黄熱ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号9によりコードされる日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号10によりコードされるジカウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号11によりコードされるベッセルブロンウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号12によりコードされるロシオウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号13によりコードされるマレー脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号14によりコードされるセントルイス脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号54によりコードされた遺伝子型1の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号55によりコードされた遺伝子型2の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号56によりコードされた遺伝子型4の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号57によりコードされた遺伝子型5の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、および配列番号58によりコードされたラーベンスブルクウイルスのEDIIIタンパク質ならびにHIV1、HIV2、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ウエストナイルウイルスおよび、HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66および68等の発癌性HPV株のウイルス性タンパク質からなる群から選択されるウイルス性タンパク質上に存在する。

20

30

【0058】

好ましい一実施形態において、本発明の方法において用いられる融合タンパク質においてhAGT酵素と融合した第1および第2のエピトープ(または抗原)は、同一の分類学的レベルに属する、即ち、同一の科(例えば、フラビウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科またはフィロウイルス科)または属または種に属するが、これらは異なる血清型を有する。言い換えると、前記第1および第2のエピトープは、近縁関係のウイルスにより発現され得る、例えば、同一の科、属または種に属するが、デング熱ウイルス1、2、3または4等、異なる血清型を有する。

【0059】

あるいは、別の好ましい一実施形態において、前記第1および第2のエピトープ(または抗原)は、無関係の生物学的な科または属または種に属する。

40

【0060】

エピトープは、ウイルスエピトープとなり得る。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、ウイルスエピトープから選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、デング熱ウイルス(血清型1、2、3または4)、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレー渓谷脳炎ウイルス、ヴェッセルスブロンウイルス、ジカウイルス、ロシオウイルス、ウスツウイルス、リフトバレー熱ウイルスおよびチクン

50

グニアウイルスエピトープから選択される。より好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、デング熱ウイルス(血清型1、2、3または4)、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレー溪谷脳炎ウイルス、ヴェッセルスbronウイルス、ジカウイルス、ロシオウイルス、ウスツウイルス、リフトバレー熱ウイルス、チクングニアウイルス、SARSコロナウイルス、ヒトコロナウイルス、C型肝炎(Hepatitis)ウイルス(HCV)、E型肝炎ウイルス(HEV)またはシュマレンベルクウイルスエピトープから選択される。

【0061】

好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、デング熱ウイルス(血清型1、2、3または4)、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレー溪谷脳炎ウイルス、ヴェッセルスbronウイルス、ジカウイルス、ロシオウイルス、ウスツウイルス、リフトバレー熱ウイルス、チクングニアウイルス、SARSコロナウイルス、ヒトコロナウイルス、C型肝炎(Hepatitis)ウイルス(HCV)、E型肝炎ウイルス(HEV)、シュマレンベルクウイルス、HIV1、HIV2、B型肝炎ウイルスおよびHPVエピトープから選択される。エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、交互に、上述のウイルスのうち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種のいずれかの群から選ばれ得る。

【0062】

好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、フラビウイルス科(Flaviviridae)エピトープから選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、トガウイルス科(Togaviridae)エピトープ(eitope)から選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、ブニヤウイルス科(Bunyaviridae)エピトープから選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、カリシウイルス科(Caliciviridae)エピトープから選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、アレナウイルス科(Arenaviridae)エピトープから選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、フィロウイルス科(Filoviridae)エピトープから選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、ポックスウイルス科(Poxviridae)エピトープから選択される。

【0063】

エピトープは、細菌エピトープとなり得る。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、細菌エピトープから選択される。好ましくは、エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)([http://en.wikipedia.org/wiki/Treponema\\_pallidum](http://en.wikipedia.org/wiki/Treponema_pallidum))、ヘリコバクター・ピロリ、カンピロバクター・ジェジュニ、ライム病ボレリア、レジオネラ・ニューモフィラ、ペスト菌([http://en.wikipedia.org/wiki/Yersinia\\_pestis](http://en.wikipedia.org/wiki/Yersinia_pestis))、エンテロコリチカ菌、ブルセラ・アボルトス、鼻疽菌、類鼻疽菌、クラミジア・ニューモニエ、野兔病菌、マイコプラズマ・ニューモニエ、インフルエンザ菌、肺炎球菌、肺炎桿菌、黄色ブドウ球菌、炭疽菌、ボツリヌス菌、ウェルシュ菌、リステリア菌、百日咳菌、破傷風菌、髄膜炎菌、表皮ブドウ球菌、髄膜炎菌(*N. meningitidis*)、緑膿菌、トラコーマクラミジア、結核菌、Q熱コクシエラ、発疹チフスリケッチア、オウム病クラミジア、レプトスピラ・インテロガンズ(*Leptospira interrogans*)および大腸菌(例えば、大腸菌O157:H7)エピトープから選択される。エピトープのうち少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種は、交互に、上述の細菌のうち1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15また

10

20

30

40

50

は16種のいずれかの群から選ばれ得る。

【0064】

好ましくは、少なくとも1、2、3または4種のエピトープが、レプトスピラ属(*Leptospira*)エピトープ、最も好ましくは、LruA、LruB、HbpAまたはLipL32エピトープから選択される。

【0065】

一部の実施形態において、第1または第2の融合タンパク質は、配列番号3~14および54~58のいずれかによってコードされる少なくとも1種のアミノ酸配列、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸を含む。

10

【0066】

一部の実施形態において、第1または第2の融合タンパク質は、配列番号155、157、159、161、163、165、167、171、173、175、177および179から選択される少なくとも1種のアミノ酸配列、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸を含む。

【0067】

一部の実施形態において、第1または第2の融合タンパク質は、配列番号3~14および54~58のいずれかによってコードされる少なくとも1種のアミノ酸配列を含む、および/または配列番号155、157、159、161、163、165、167、171、173、175、177および179から選択される少なくとも1種のアミノ酸配列またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50

20

【0068】

一部の実施形態において、第1または第2の融合タンパク質は、SARSコロナウイルス由来の変異Nタンパク質、SARSコロナウイルス由来のSタンパク質のRBD、ヒトベータコロナウイルス由来のNタンパク質、ヒトベータコロナウイルス由来のS1タンパク質、ヒトベータコロナウイルス由来のSタンパク質のRBD、C型肝炎(HCV)ウイルス由来の変異Cタンパク質、HEVコア抗原、HCVコア抗原、HCVコア抗原の短縮型、シュマレンベルクウイルス由来のNsタンパク質から選択される少なくとも1種のアミノ酸配列を含む。

【0069】

一部の実施形態において、第1または第2の融合タンパク質は、図12~図16および図21~図24に示すウイルスアミノ酸配列の少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200または300個の連続的なアミノ酸を含む。

30

【0070】

一部の実施形態において、第1または第2の融合タンパク質は、LruA、LruBまたはLipL32タンパク質から選択される少なくとも1種のアミノ酸配列を含む。好ましくは、第1または第2の融合タンパク質は、図17、図18または図19に示すLruA、LruBまたはLipL32アミノ酸配列の少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200または300個の連続的なアミノ酸を含む。

【0071】

一部の実施形態において、エピトープは、図17、図18または図19に示す配列の少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200または300個の連続的なLruA、LruBまたはLipL32アミノ酸を含む。

40

【0072】

本発明のイムノアッセイは、公知または未知の多数の抗体を同時に検出することができる。本明細書において、「多数」とは、少なくとも5、より好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも50、さらにより好ましくは少なくとも100種の抗体であると理解される。したがって、好ましい一実施形態において、本発明のアッセイ方法は、対象由来の生体試料における少なくとも5、より好ましくは少なくとも15、好ましくは少なくとも50、さらにより好ましくは少なくとも100種の標的抗体の検出に用いられる。本手順は、前記抗体の存在の検出のみに依存し、その性質に依存しないため、特定の抗体が適切に特徴

50

付けられているか否かは、本発明の方法にとって全く関係ない。

【0073】

本発明の好ましい一実施形態において、前記第1および第2の固体支持体とカップリングされる前記第1および第2の融合タンパク質は、

- 配列番号21 (融合タンパク質[SNAP-DEN1.EDIII]に相当)
- 配列番号42 (融合タンパク質[SNAP-SBV.N]に相当)
- 配列番号49 (融合タンパク質[SNAP-EV71.VP1]に相当)
- 配列番号51 (融合タンパク質[JE.sE-SNAP]に相当)
- 配列番号53 (融合タンパク質[SNAP-JE-1.EDIII]に相当)
- 配列番号60 (融合タンパク質[SNAP-JE-2.EDIII]に相当) 10
- 配列番号62 (融合タンパク質[SNAP-JE-4.EDIII]に相当)
- 配列番号64 (融合タンパク質[SNAP-JE-5.EDIII]に相当)
- 配列番号66 (融合タンパク質[SNAP-RabV.EDIII]に相当)
- 配列番号68 (融合タンパク質[SNAP-フラビウイルス.EDIII]に相当)
- 配列番号70 (融合タンパク質[RR.sE2-SNAP]に相当)
- 配列番号72 (融合タンパク質[MAY.sE2-SNAP]に相当)
- 配列番号74 (融合タンパク質[WEE.sE2-SNAP]に相当)
- 配列番号76 (融合タンパク質[EEE.sE2-SNAP]に相当)
- 配列番号78 (融合タンパク質[VEE.sE2-SNAP]に相当)
- 配列番号80 (融合タンパク質[SNAP-AKA.N]に相当) 20
- 配列番号82 (融合タンパク質[SNAP-AIN.N]に相当)
- 配列番号84 (融合タンパク質[SNAP-SHA.N]に相当)
- 配列番号86 (融合タンパク質[SNAP-huCOV.N]に相当)
- 配列番号88 (融合タンパク質[SNAP-huCOV.S]に相当)
- 配列番号90 (融合タンパク質[SNAP-HCV.C]に相当)
- 配列番号92 (融合タンパク質[SNAP-MSP+AMA]に相当)
- 配列番号94 (融合タンパク質[SNAP-HbpA1]に相当)
- 配列番号96 (融合タンパク質[SNAP-MUB40]に相当)
- 配列番号98 (融合タンパク質[SNAP-moCLEC5A]に相当)
- 配列番号100 (融合タンパク質[SNAP-huCLEC5A]に相当) 30
- 配列番号102 (融合タンパク質[SNAP-cxVAGO]に相当)
- 配列番号104 (融合タンパク質[SNAP-aaVAGO]に相当)
- 配列番号109 (融合タンパク質[SNAP-CCHF.N]に相当)
- 配列番号111 (融合タンパク質[SNAP-EBO.N]に相当)
- 配列番号113 (融合タンパク質[SNAP-MAR.N]に相当)
- 配列番号115 (融合タンパク質[SNAP-LAS.N]に相当)
- 配列番号117 (融合タンパク質[SNAP-JUN.N]に相当)
- 配列番号119 (融合タンパク質[SNAP-MAC.N]に相当)
- 配列番号121 (融合タンパク質[SNAP-GUA.N]に相当)
- 配列番号123 (融合タンパク質[SNAP-SAB.N]に相当) 40
- 配列番号125 (融合タンパク質[SNAP-OMSK.EDIII]に相当)
- 配列番号127 (融合タンパク質[SNAP-KYA.EDIII]に相当)
- 配列番号129 (融合タンパク質[SNAP-ALK.EDIII]に相当)
- 配列番号131 (融合タンパク質[LAS.ectoGP1-SNAP]に相当)
- 配列番号133 (融合タンパク質[JUN.ectoGP1-SNAP]に相当)
- 配列番号135 (融合タンパク質[MAC.ectoGP1-SNAP]に相当)
- 配列番号137 (融合タンパク質[GUA.ectoGP1-SNAP]に相当)
- 配列番号139 (融合タンパク質[SAB.ectoGP1-SNAP]に相当)
- 配列番号141 (融合タンパク質[LAS.ectoGP2-SNAP]に相当)
- 配列番号143 (融合タンパク質[JUN.ectoGP2-SNAP]に相当) 50

- 配列番号145 (融合タンパク質[MAC.ectoGP2-SNAP]に相当)
  - 配列番号147 (融合タンパク質[GUA.ectoGP2-SNAP]に相当)
  - 配列番号149 (融合タンパク質[SAB.ectoGP2-SNAP]に相当)、および
  - 配列番号151 (融合タンパク質[SNAP-HEV.C]に相当)
- からなる群から選択される。

## 【0074】

結果的に、本発明の *in vitro* 方法は、ウイルス、細菌、酵母または真菌媒介性感染症である標的疾患(複数可)の検出を可能にする。好ましくは、前記ウイルス感染症は、パピローマウイルス、またはフラビウイルス科(デング熱、黄熱、ウエストナイル、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、C型肝炎ウイルス)、トガウイルス科(チクングニア、ロスリバー、マヤロ、西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎ウイルス)、ブニヤウイルス科(クリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、シュマレンベルクウイルス)、カリシウイルス科(E型肝炎ウイルス)、アレナウイルス科(ラッサ熱[http://en.wikipedia.org/wiki/Lassa\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Lassa_virus))およびフィロウイルス科(エボラ[http://en.wikipedia.org/wiki/Ebola\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Ebola_virus)、マールブルグ[http://en.wikipedia.org/wiki/Marburg\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Marburg_virus))由来のRNAウイルスが原因である。好ましくは、前記細菌感染症は、レプトスピラ・インテロガンズが原因である。好ましくは、前記感染症は、熱帯熱マラリア原虫が原因である。

10

## 【0075】

本明細書において、用語「生体試料」は、患者から得られた、抗体を含有し得るいずれかの試料を指す。好ましくは、前記生体試料は、尿、脳脊髄液、胸水、滑液、腹水、羊水、胃液、血液、血清、血漿、リンパ液、間質液、唾液、生理的分泌物、涙、粘液、汗、乳汁、精液、精漿、腺分泌物、潰瘍ならびに他の表面皮疹、水疱および膿瘍から出た液等、生体液、例えば、未濾過生体液である。これは、抗体を含有し得る正常、悪性および疑わしい組織またはその他の身体構成物の生検を包含する組織の抽出物も指す。前記生体試料は、使用前に、血液から血漿の調製、粘稠液の希釈その他等、前処理することができる。処理方法は、濾過、蒸留、濃縮、干渉化合物の不活性化および試薬の添加に關与することができる。好ましい一実施形態において、前記生体試料は、全血、血清、血漿、尿、精漿、脳脊髄液および唾液から選ばれる。

20

## 【0076】

AGTポリペプチド

$O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するいずれかのポリペプチドを、本発明の方法において用いることができる。本発明の目的のため、これらのポリペプチドは、「AGTポリペプチド」と称されることになる。

30

## 【0077】

AGTは、その基質、 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAから自身のシステイン残基の1個へと、アルキル基を不可逆的に転移させる。AGTと迅速に反応する基質アナログは、 $O^6$ -ベンジルグアニンであり、二次(second order)速度定数は、およそ $10^3 \text{sec}^{-1} \text{M}^{-1}$ である。

## 【0078】

本発明の文脈において、ポリペプチドは、 $O^6$ -アルキルグアニン含有分子からそれ自身のシステイン残基の1個へとアルキル基を不可逆的に転移させることができる場合、「 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性」(または「AGT活性」)を有すると言われる。前記ポリペプチドの「 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性」は、例えば、公知の標識 $O^6$ -ベンジルグアニン誘導体を接触させ、被験ポリペプチドにおける前記標識の転移をモニターすることにより実証することができる。アッセイが、*in cellulo*または細胞抽出物において行われる場合、宿主細胞の内在性AGTの反応は、内在性AGTが前記ポリペプチドに干渉しないよう制御される必要がある。したがって、公知のAGT欠損細胞株が好ましくは用いられる。現在、AGT活性を同定するためのアッセイは、十分に記載されている。数種の $O^6$ -ベンジルグアニン誘導体が市販されている( $O^6$ -ベンジルグアニンは、例えば、Santa Cruz biotechnologyにより流通されており、蛍光標識 $O^6$ -ベンジルグアニン誘導体は、New England Biolabs NEBから入手することができる)

40

50

。これらアッセイの一部は、国際公開第2005/085470号パンフレットおよび国際公開第2004/031405号パンフレットにおいて開示されている。

【0079】

本発明の文脈において、AGTポリペプチドの「触媒ドメイン」は、前記酵素の活性部位、または言い換えると、基質、 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAから反応性システイン残基へのアルキル基の転移が生じる酵素部分に相当する。その活性部位において $O^6$ -ベンジルグアニンと結合したhAGTの構造において、4個のアミノ酸が、ベンジル環と近接している(Pro140、Ser159、Gly160)、またはヌクレオベースのN9と接触させ得る(Asn157)。位置Pro140およびGly160における突然変異は、 $O^6$ -ベンジルグアニンとhAGTの反応に影響を及ぼすことが以前に示され(Xu-Welliverら、Biochemical Pharmacology 1999)、位置140におけるプロリンは、それとベンジル環との相互作用に必要不可欠であると考えられ、突然変異Gly160Trpは、 $O^6$ -ベンジルグアニンへのhAGTの反応性を増加させることを示した。

10

【0080】

好ましい一実施形態において、 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドは、配列番号1の配列のヒトAGTポリペプチド(NP\_002403.2として参照)、NP\_032624.1として同定されるマウスAGT(配列番号18)、NP\_036993.1として同定されるラットMGMT(配列番号19)またはこれらの相同配列であり、前記相同配列は、 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有する。

【0081】

本明細書において、用語「相同」は、配列類似性を有する配列を指す。用語「配列類似性」は、そのあらゆる文法上の形式において、核酸またはアミノ酸配列間の同一性または一致の程度を指す。本発明の文脈において、アミノ酸の少なくとも約80%、あるいは少なくとも約81%、あるいは少なくとも約82%、あるいは少なくとも約83%、あるいは少なくとも約84%、あるいは少なくとも約85%、あるいは少なくとも約86%、あるいは少なくとも約87%、あるいは少なくとも約88%、あるいは少なくとも約89%、あるいは少なくとも約90%、あるいは少なくとも約91%、あるいは少なくとも約92%、あるいは少なくとも約93%、あるいは少なくとも約94%、あるいは少なくとも約95%、あるいは少なくとも約96%、あるいは少なくとも約97%、あるいは少なくとも約98%、あるいは少なくとも約99%が類似である場合、2種のアミノ酸配列は、「相同」である。好ましくは、類似または相同ポリペプチド配列は、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズムを用いることにより同定される。

20

30

【0082】

好ましくは、AGT酵素に対する相同配列は、配列番号1と少なくとも64%アミノ酸配列同一性、好ましくは少なくとも約65%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約66%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約67%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約68%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約69%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約70%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約71%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約72%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約73%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約74%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約75%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約76%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約77%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約78%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約79%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約80%アミノ酸同一性、あるいは少なくとも約81%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%アミノ酸配列同一性、あるいは少なく

40

50

とも約98%アミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約99%アミノ酸配列同一性を共有する。好ましい一実施形態において、配列番号1の相同配列は、配列番号1に対し少なくとも64%、好ましくは70%、より好ましくは80%同一である。

【0083】

好ましい一実施形態において、前記相同ポリペプチドは、配列番号1のhAGTポリペプチドの断片または変異体であり、前記断片または変異体は、O<sup>6</sup>-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有する。

【0084】

前記断片は、少なくとも50、好ましくは100、より好ましくは150アミノ酸のサイズを有し、AGT酵素のO<sup>6</sup>-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性の原因である、上に定義されているAGTポリペプチドの少なくとも「触媒ドメイン」を含有することができる。これら断片は、当業者に公知の通常技法を用いて得ることができる。

10

【0085】

現在までに、天然AGTに由来する様々な変異体酵素が記載されている(Lim A.ら、1996;Daniels D.S.ら、2000;Juillerat A.ら、2003、国際公開第2005/085470号パンフレット、国際公開第2004/031405号パンフレット)。特に、アミノ酸182において切断された、突然変異Cys62Ala、Lys125Ala、Ala127Thr、Arg128Ala、Gly131Lys、Gly132Thr、Met134Leu、Arg135Ser、Cys150Ser、Asn157Gly、Ser159Gluを含有する20kDaの変異体タンパク質が得られた(国際公開第2005/085470号パンフレットにおける所謂「AGT26」変異体であり、国際公開第2006/114409号パンフレットにおいては「SNAP26」とも呼ばれる)。この特定の変異体「SNAP26」は、増強された標識活性を有することが示された。

20

【0086】

本発明の文脈において、より好ましいAGTポリペプチドの配列は、国際公開第2005/085470号パンフレットに記載されている突然変異を含有し、この位置は、配列番号1に照らして容易に転位することができ、SNAP26の開始メチオニン残基は、配列番号1の32位におけるメチオニン残基に相当する(したがって、配列番号1における相当する配列を得るためには、国際公開第2005/085470号パンフレットに開示されている位置に31アミノ酸を付加する必要がある)。

【0087】

好ましい一実施形態において、本発明において有用なAGT相同配列は、1~30の間、好ましくは、6~25の間、特に、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23アミノ酸が他のアミノ酸により置換された、および/またはC末端における1~40、好ましくは、1~20、特に、10~20アミノ酸、より好ましくは15アミノ酸が欠失された配列番号1の天然AGT配列に相当する。

30

【0088】

より好ましい一実施形態において、AGT相同配列は、配列番号1と比較して次の突然変異を含有する。

(A)Argにより置き換えられたLys31、またはSerにより置き換えられたMet32、またはAlaにより置き換えられたCys93、またはAlaにより置き換えられたLys156、またはThrにより置き換えられたAla158、またはAlaにより置き換えられたArg159、またはLysにより置き換えられたGly162、またはThrにより置き換えられたGly163、またはLeuにより置き換えられたMet165、またはSerにより置き換えられたArg166、またはSerにより置き換えられたCys181、またはGlyにより置き換えられたAsn188、またはGluにより置き換えられたSer190、またはProにより置き換えられたGly214、またはAlaにより置き換えられたSer215、またはGlyにより置き換えられたSer216、またはIleにより置き換えられたGly217、またはGlyにより置き換えられたLeu218、またはProにより置き換えられたGly220、またはGlyにより置き換えられたAla221、またはSerにより置き換えられたTrp222、もしくは

40

(B)Arg-Serにより置き換えられたLys31-Met32、またはThr-Alaにより置き換えられたAla158-Arg159、またはLys-Thrにより置き換えられたGly162-Gly163、またはLeu-Serにより置き換えられたMet165-Arg166、またはLys-Thr/Leu-Serにより置き換えられたGly162-Gly

50

163/Met165-Arg166、またはGly/Gluにより置き換えられたAsn188/Ser190、またはPro-Ala-Gly-Ile-Glyにより置き換えられたGly214-Ser215-Ser216-Gly217-Leu218、またはPro-Gly-Serにより置き換えられたGly220-Ala221-Trp222、好ましくは、(A)において引用されているその他のアミノ酸置き換えとの組み合わせ、もしくは

(C)Leu223後の切断(アミノ酸224~238が欠失)、好ましくは、(A)または(B)において引用されているその他のアミノ酸置き換えとの組み合わせ。

【0089】

好ましいAGT相同配列は、Leu223後を切断された配列である。

【0090】

好ましいAGT相同配列は、改変(B)のうち2種が存在し、任意選択でLeu223後が切断された配列である。

10

【0091】

好ましいAGT相同配列は、改変(B)のうち3種が存在し、任意選択でLeu223後が切断された配列である。

【0092】

好ましいAGT相同配列は、改変(B)のうち4種が存在し、任意選択でLeu223後が切断された配列である。

【0093】

好ましいAGT相同配列は、改変(B)のうち5種が存在し、任意選択でLeu223後が切断された配列である。

20

【0094】

好ましいAGT相同配列は、改変(B)のうち6種が存在し、任意選択でLeu223後が切断された配列である。

【0095】

他の好ましいAGT相同配列は、(A)において開示されている改変の中から選ばれる2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種の突然変異の組み合わせと、任意選択でLeu223後の切断とを含有する配列である。

【0096】

より一層好ましい一実施形態において、本発明のAGTポリペプチドは、hAGT酵素に対し相同であり、配列番号1と比較して、突然変異Lys31Arg、Met32Ser、Cys93Ala、Lys156Ala、Ala158Thr、Arg159Ala、Gly162Lys、Gly163Thr、Met165Leu、Arg166Ser、Cys181Ser、Asn188Gly、Ser190Glu、Gly214Pro、Ser215Ala、Ser216Gly、Gly217Ile、Leu218Gly、Gly220Pro、Ala221Gly、Trp222SerおよびLeu223後の切断を含有する、配列番号2のSNAP変異体である。配列番号2のSNAP変異体は、ヒト6-メチルグアニン-DNA-メチルトランスフェラーゼ(NP\_002403.2、配列番号1)のアミノ酸配列と77%相同性を共有し、マウス6-メチルグアニン-DNA-メチルトランスフェラーゼ(NP\_032624.1、配列番号18)のアミノ酸配列と70%相同性を共有する。

30

【0097】

さらになおより好ましい一実施形態において、AGT酵素は、配列番号2のSNAP変異体タンパク質またはO<sup>6</sup>-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するそのホモログである。好ましくは、SNAP変異体タンパク質に対する前記相同配列は、配列番号2の配列のSNAP変異体タンパク質に対し80%、好ましくは81%、より好ましくは82%、より好ましくは83%、より好ましくは84%、より好ましくは85%、好ましくは86%、より好ましくは87%、より好ましくは88%、より好ましくは89%、より好ましくは90%、より好ましくは91%、より好ましくは92%、より好ましくは93%、より好ましくは94%、より好ましくは95%、より好ましくは96%、さらにより好ましくは97%を超えて少なくとも同一であり、上に定義されているO<sup>6</sup>-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有する。

40

【0098】

O<sup>6</sup>-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有する前記相同ポリペプチドを、当業者に公知のタンパク質操作技法を用いておよび/または分子進化を用いて産

50

生して、新たな $O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼを作製および選択することができる。係る技法は、例えば、標的化突然変異誘発、ファージディスプレイ方法、飽和突然変異誘発、配列中のどこかに変異を導入するためのエラープロードPCR、飽和突然変異誘発および/またはエラープロードPCR後に用いるDNAシャッフリング、または複数の種由来の遺伝子を用いたファミリーシャッフリングである。

【0099】

最も好ましい一実施形態において、本発明の方法において用いられるAGTポリペプチドは、配列番号2のSNAP変異体である。

【0100】

AGT基質

AGT酵素は、その基質、 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAから自身のシステイン残基の1個へと、アルキル基を不可逆的に転移させる。しかし、ベンジル環のC4における $O^6$ -ベンジルグアニンの置換は、 $O^6$ -ベンジルグアニン誘導体に対するAGTの反応性に有意に影響を及ぼさない。この性質は、ベンジル環のC4に付着した標識のAGTへの転移に用いられてきた(国際公開第2004/031404号パンフレットおよび国際公開第2005/085470号パンフレットを参照)。

【0101】

多数の $O^6$ -ベンジルグアニン誘導体は、そのベンジル基をAGT酵素の活性部位システインへと転移させることにより、AGT酵素と反応することを示した(Damoiseauxら、ChemBiochem、2001、国際公開第2004/031404号パンフレットおよび国際公開第2005/085470号パンフレットを参照)。

【0102】

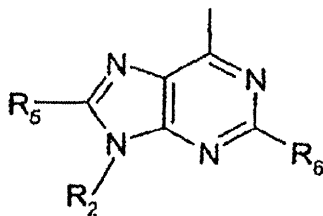
好ましい一実施形態において、本発明の方法において用いられるAGT基質は、式I:  
R1-X-CH<sub>2</sub>-R3-R4-Y

(式中、

- R1は、1~5個の窒素原子を含有する複素環式芳香族基、好ましくは、次式:

【0103】

【化1】



【0104】

(式中、R5は、水素、ハロゲン、例えば、クロロもしくはブロモ、トリフルオロメチルまたはヒドロキシであり、R6は、水素、ヒドロキシまたは非置換もしくは置換アミノであり、R2は、水素、1~10個の炭素原子のアルキルまたは糖部分である)

で表されるプリン基等、前記AGTポリペプチドにより基質として認識される基であり、

- Xは、酸素または硫黄原子、好ましくは、酸素原子であり、
- R3は、芳香族もしくは複素環式芳香族基、または任意選択で置換された不飽和アルキル、シクロアルキルまたはCH<sub>2</sub>に連結された二重結合を有するヘテロシクリル基、好ましくは、フェニル、例えば、パラまたはメタ位においてR4により置換されたフェニルであり、
- R4は、リンカー部分であり、
- Yは、反応基、好ましくは、アミノ基である)

を有する $O^6$ ベンジルグアニン誘導体である。

【0105】

好ましい一実施形態において、前記リンカー部分R<sub>4</sub>は、可撓性リンカーである。リンカ

10

20

30

40

50

一単位は、想定される用途の文脈において、即ち、AGTを含む融合タンパク質への基質の転移において選ばれる。リンカーは、AGTとの反応にも、標的抗体との反応にも干渉しない。

【0106】

例えば、これは、

(a)1個または複数の炭素原子が、酸素により置き換えられ、特に、第3の炭素原子が全て、酸素により置き換えられた、例えば、1~5個のエチレンオキシ単位を有するポリエチレンオキシ(polyethyleneoxy)基である、

(b)1個または複数の炭素原子が、水素原子を保有する窒素により置き換えられ、隣接する炭素原子が、オキシにより置換された、アミド官能基-NH-CO-を表す、

(c)1個または複数の炭素原子が、酸素により置き換えられ、隣接する炭素原子が、オキシにより置換された、エステル官能基-O-CO-を表す、

(d)隣接する2個の炭素原子間の結合が、二重または三重結合である、官能基-CH=CH-または-C≡C-を表す、

(e)1個または複数の炭素原子が、フェニレン、飽和もしくは不飽和シクロアルキレン、飽和もしくは不飽和ピシクロアルキレン、架橋ヘテロ芳香族または架橋飽和もしくは不飽和ヘテロシクリル基により置き換えられた、

(f)隣接する2個の炭素原子が、ジスルフィド結合-S-S-により置き換えられた、

1~20個の炭素原子、好ましくは、5~15個の炭素原子を有する直鎖または分枝鎖アルキレン基、

もしくは任意選択で置換基を含有する、上文の(a)~(f)に定義されている2種以上、特に、2もしくは3種のアルキレンおよび/または改変されたアルキレン基の組み合わせとなり得る。

【0107】

考慮される置換基は、例えば、低級アルキル、例えば、メチル、低級アルコキシ、例えば、メトキシ、低級アシルオキシ、例えば、アセトキシまたはハロゲンニル(halogenyl)、例えば、クロロである。

【0108】

好ましい一実施形態において、R4は、1~8個のエチレンオキシ単位を有するポリエチレンオキシ基であり、水素原子を保有する1~4個の窒素原子をさらに含み、その隣接する炭素原子がオキシにより置換されて、アミド官能基-NH-CO-を表す。

【0109】

より好ましい一実施形態において、R4は、-CH<sub>2</sub>-NH-CO-NH-[C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-O]<sub>n</sub>- (式中、nは、1~8、好ましくは、2~6の間に含まれ、最も好ましくは、3である)である。

【0110】

好ましい一実施形態において、前記反応基は、固体支持体における基質の付着および結合を容易にする官能基である。係る官能基は、本技術分野において周知のものである。これは、アミン、活性化エステル、アクリルアミド、アシルアジド、アシルハライド、アシルニトリル、アルデヒド、ケトン、アルキルハライド、無水物、アリールハライド、アジリジン、ボロン酸塩(boronate)、活性化カルボン酸(carboxylic acid)、カルボジイミド、ジアゾアルカン、エポキシド、ハロアセトアミド、ハロ白金酸塩(haloplatinate)、ハロトリアジン、イミドエステル、イソシアン酸塩、イソチオシアン酸塩、マレイミド、ホスホラミダイト、ソリル(silyl)ハライド、スルホン酸エステルおよびスルホニルハライドを包含する。これは、好ましくは、アミン基-NH<sub>2</sub>である。

【0111】

その反対側では、固体支持体は、係る反応基に対応する相補的な基によって官能化される必要がある。これら反応基それぞれに対応する相補的な基は、本技術分野において周知のものである。これらは、例えば、国際公開第2010/107433号パンフレットの表Iに提示されている。

【0112】

10

20

30

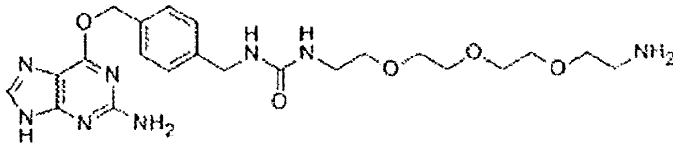
40

50

好ましい一実施形態において、本発明の方法において用いられるAGT基質を次に示す。

【0113】

【化2】



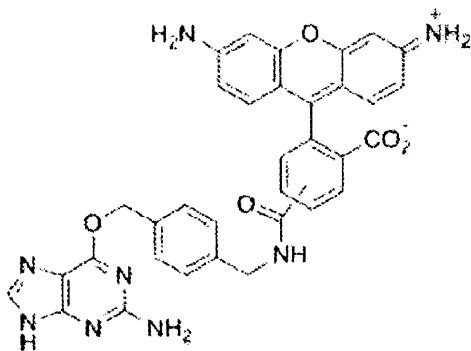
【0114】

10

別の好ましい一実施形態において、本発明の方法において用いられるAGT基質は、次式で表される「SNAP-cell(登録商標)505」と命名された蛍光リンカーである。

【0115】

【化3】



20

【0116】

このベンジルグアニン誘導体は、SNAPドメインとの特異的相互作用のための1個のベンジルプリン基(グアニン)と共に、マイクロスフェア表面との共有結合カップリングのための1個の遊離アミン基を所有する。これは、New England BioLabsによって商品化されており、本発明の微小粒子の表面とのカップリングに成功した。

30

【0117】

本発明の基質は一般に、本技術分野において公知の標準的な方法により調製される。特定の方法は、例えば、特許出願の国際公開第2005/085470号パンフレットにおいて説明されている。

【0118】

固体支持体へのAGT基質のカップリング

本発明は、固体支持体に共有結合によりカップリングされているAGT基質を網羅する。本発明の文脈において、AGT基質が、前記固体支持体に永続的に付着しており、経時的に脱着または浸出しない場合、これは固体支持体に「共有結合によりカップリング」されている。本発明において、AGT基質は、長期間の貯蔵、例えば、通常少なくとも6ヶ月の貯蔵の間付着を維持する場合、前記固体支持体に永続的に付着している。多数のカップリングのやり方が、現在までに記載されている。AGT基質が、固体支持体に永続的に付着するのであれば、本発明のイムノアッセイにおいてこれらのカップリングのやり方のいずれを用いてもよい。

40

【0119】

固体支持体へのAGT-抗原融合タンパク質のカップリング

本発明は、次の2工程:i)固体表面をAGT基質(例えば、BG-PEG-アミノ)でコーティングする工程と、ii)アンカーとしてAGT基質を用いてキメラ[AGT-抗原]融合タンパク質を共有結合固定化する工程とを含む、固体支持体に抗原をカップリングするための方法をさらに網羅する(図1を参照)。固体表面は、有利には、前記AGT基質でコーティングされる前に、好

50

ましくは、最適化された二段階カルボジイミド過程(Kufer SK, Eur. Biophys. J. 2005)を用いることにより官能化されて、AGT基質が固体表面へと共有結合されるようにする。これらの工程が行われると、固体表面は、キメラ[AGT-抗原]融合タンパク質に不可逆的に連結されたAGT基質を保有するようになる。この反応の高い特異性により、融合タンパク質は、AGT酵素のシステイン含有ドメインを介して排他的にカップリングされ、よって、それと抗体との相互作用のために抗原を到達可能なまま維持する。

#### 【0120】

このカップリング手順は、固体支持体における志向性のある様式での抗原の結合を可能にするため、非常に有利である。また、この抗原カップリング手順は、有利には、固体表面において多量体抗原構成を得ることを可能にし、免疫グロブリンGおよび、潜在的に免疫グロブリンMの捕捉効率を増強させることができる。結果的に、本願の実験部分において開発された、抗原カップリングされたマイクロスフェアは、標準的な志向性のないアミンカップリング手順により作製された抗原カップリングされたマイクロスフェアと比較して、特異的抗体の捕捉増強を示した(後述する実験部分および図3を参照)。最後に、この抗原カップリング手順は、高いカップリング効率および抗原コンジュゲートされたマイクロスフェアの長期安定性(4 で>6ヵ月)を得ることを可能にする。

#### 【0121】

本発明のイムノアッセイにおいて、共有結合カップリングは、好ましくは、その開示が参照により本明細書に組み込まれている国際公開第2010/107433号パンフレットの表Iにおいて開示されている基等、相補的な基で以前に官能化された固体支持体と、AGT基質(上述の反応基Yを含有する)を接触させることにより行われる。

#### 【0122】

よって、好ましい一実施形態において、本発明の方法は、AGT基質と接触する前に、AGT基質の反応基に相補的な基で官能化された固体支持体を用いる。

#### 【0123】

AGT基質を固体支持体の表面に共有結合によりカップリングするための好ましい従来の手順は、カルボジイミド反応に基づき、水溶性カルボジイミドを用いる。この手順に従って、固体支持体は、反応性アミンまたはスルフヒドリル含有AGT基質の付着に利用できる表面カルボキシル基を有する。よって、この好ましい実施形態において、本発明の方法は、AGT基質との接触に先立ち表面カルボキシル基で官能化された固体支持体を用いる。

#### 【0124】

この場合、本発明の方法の第1の工程は、固体支持体をコーティングするカルボキシル基を活性化させることである。この活性化は通常、所謂「活性化バッファー」、例えば、50mg/mLのEDAC溶液または50mg/mLのS-NHS溶液を添加することにより行われる。これらの溶液は、市販されている。固体支持体の活性化は通常、製造業者の説明書に従って、前記支持体を活性化バッファーと共に室温で数分間(例えば、5分間~30分間)インキュベートすることにより行われる。

#### 【0125】

重要なことに、固体支持体へのAGT基質の共有結合カップリングは、AGT基質溶解性およびビーズ(内部蛍光色素)の統合性を保存することができる特定の条件下で行われる必要がある。本発明者らは、AGT基質が、0~20%の間のジメチルスルホキシド(DMSO)を含有する「共有結合カップリング」バッファーに懸濁される必要があることを観察した。特に、本発明者らは、20%を上回るDMSOの濃度が、本発明の方法の検出工程に影響を及ぼし得ることを観察した。好ましくは、前記バッファーは、0~20%の間のDMSO、より好ましくは10%~20%の間のDMSOを含有するPBSバッファーである。

#### 【0126】

有利には、AGT基質と共有結合していない固体支持体上の非特異的部位は、いずれかの従来の手段により、例えば、1%のウシ血清アルブミン(BSA)またはいずれかの飽和用タンパク質(例えば、カゼイン)を含有するブロッキングバッファーを用いることによりさらにブロッキングすることができる。

## 【0127】

本発明の固体支持体が、AGT基質と共有結合によりカップリングすると(好ましくは、カルボジイミド共有結合により)、次に、固体支持体は、本発明の融合タンパク質に接触させて、標的抗体により特異的に認識されるエピトープを前記支持体とカップリングさせる。

## 【0128】

この場合も同様に、このカップリング工程は、特定の条件下で行われる必要がある。実際のところ、AGT酵素の触媒部位および融合タンパク質に保有される抗原/エピトープの立体構造は、カップリングのやり方の際に保存される必要がある。本発明者らは、カップリングが効率的となるために、融合タンパク質が、ジチオスレイトール(DTT)含有バッファ

10

ー、好ましくは、PBS/DTTバッファーに懸濁されるべきであることを確認した。有利には、前記カップリングバッファーは、tween 20を含有する。本発明者らにより実際に、カップリング培地へのtween 20の添加が、ビーズ凝集の回避に有用であることが観察された。好ましくは、カップリングバッファーは、0.02%のtween 20を含有する。より好ましくは、本発明の共有結合カップリングバッファーは、0.02 %のtween 20および1mMのDTTを含有するpH7.4のPBSバッファーである。

## 【0129】

他のカップリング条件は、通常条件である。好ましくは、固体支持体へのAGT基質の共有結合カップリングおよび融合タンパク質のカップリングは、室温で行われる。固体支持体が蛍光標識されている場合、前記のやり方は、より好ましくは、暗所で行われる。

20

## 【0130】

本発明は、 $O^6$ -アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドを、官能化された固体支持体に共有結合によりカップリングするための方法であって、

a)前記官能化された固体支持体を活性化する工程と、

b)基質が前記支持体に共有結合するように、適切な条件下で、0~20%の間のDMSOを含有するバッファーに懸濁された前記AGTポリペプチドの基質を添加する工程と、

c)PBS/DTTバッファー中で、前記AGTポリペプチドを、工程b)の基質コーティングされた支持体と接触させる工程と

を含み、

30

非結合分子が、工程b)およびc)後に洗い流される方法を網羅する。

## 【0131】

洗浄は、いずれかの種類の適切な洗浄バッファーを用いることにより行うことができる。係るバッファーは、当業者により日常的に用いられ、ここでさらに詳述する必要はない。好ましくは、PBSバッファーが用いられる。

## 【0132】

本明細書において、「適切な条件」は、通常条件である。好ましくは、AGT基質の共有結合カップリングは、室温で行われ、固体支持体が蛍光標識されている場合は、暗所で行われる。

## 【0133】

固体支持体の官能化は、いずれかの従来手段(上に記す)により行うことができる。それに応じて、前記官能化された固体支持体の活性化が行われる。好ましい一実施形態において、前記固体支持体は、表面カルボキシル基で官能化され、古典的活性化バッファー、例えば、50mg/mLのEDAC溶液または50mg/mLのS-NHS溶液によりさらに活性化される。

40

## 【0134】

好ましい一実施形態において、DTTは、PBS/DTTバッファーにおける1mMの濃度である。

## 【0135】

本発明は、前記方法により得られた固体支持体と、本発明のイムノアッセイにおける前記固体支持体の使用についても描写する。

## 【0136】

次に、前記固体支持体は、従来の貯蔵バッファー、例えば、0.5g/Lのアジ化ナトリウム、0.1%のBSA、0.02%のtween 20および/または1mMのDTTを含有するバッファー中で貯蔵することができる。

【0137】

これらカップリング工程は全て、好ましくは、内在性AGT酵素との反応を考慮に入れる必要がないよう、生細胞を欠くバッファー中でin vitroで行われ、したがって(外因性)AGT融合タンパク質の反応は、高度に特異的である。

【0138】

固体支持体

本発明の方法において用いることができる固体支持体は、互いに特異的に同定され得るのであれば、いかなる種類のものであってもよく、例えば、試験管、マイクロタイターウェル、シート、ビーズ、チップおよび/または微小粒子が挙げられる。例えば、支持体が、空間的に別々に位置する場合(例えば、マイクロタイタープレートにおけるウェルまたはチップ上の異なる位置に)、または異なって標識されている場合、係る同定が可能となる。したがって、「固体支持体」は、幅広い意義において、即ち、固体支持体全体の個別の小部分(プレートまたはパイオチップの場合)または共通の検出可能な特徴を共有する多数の同一微小粒子(以下、微小粒子「サブセット」と称される)のいずれかを指すことにより理解される。

【0139】

好ましい実施形態において、本発明のイムノアッセイにおいて用いられる固体支持体は、どの抗原がどの固体支持体により保有されているかの確に決定することが可能になるよう、本質的に同定可能となる必要がある。次に、抗原カップリングされた同定可能な固体支持体は、特異的ヒト免疫グロブリンの捕捉試薬として用いられ、したがって、患者の生体試料と接触する。

【0140】

好ましい一実施形態において、本発明において用いられる固体支持体は、その特異的な位置、サイズ、直径、重量、粒度分布および/または標識により特異的に同定することができる。係る標識は、例えば、蛍光色素、フルオロフォア、発色団、放射性同位元素、質量タグまたは本技術分野において公知のいずれかの種類の検出可能なタグである。

【0141】

本発明において用いられる固体支持体は、いかなる材料で作製してもよく、例えば、ポリスチレン、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、セラミック、樹脂、ゴム、プラスチック、シリカ、シリコン、金属および/またはポリマーでできている。ポリマー材料として、ブROM化ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリアクリロニトリル、ポリアミド、ポリアクリルアミド、ポリアクロレイン、ポリブタジエン、ポリカプロラクトン、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリジメチルシロキサン、ポリイソプレン、ポリウレタン、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルピリジン、ポリビニル塩化ベンジル、ポリビニルトルエン、ポリ塩化ビニリデン、ポリジビニルベンゼン、ポリメタクリル酸メチル、ポリラクチド、ポリグリコリド、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)、ポリ酸無水物、ポリオルトエステル(polyorthoester)、ポリホスファゼン、ポリホソファーゼ(polyphosphazene)、ポリスルホンまたは同様に許容されるこれらの組み合わせが挙げられる。これら支持体の多くは、市販されている。例えば、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸塩またはラテックス等、合成ポリマー由来のビーズは、Bio-Rad Laboratories(カリフォルニア州リッチモンド)およびLKB Produkter(スウェーデン、ストックホルム)等、多数の供給源から市販されている。アガロース、架橋アガロース、グロブリン、デオキシリボース核酸およびリボソーム等、天然巨大分子および粒子から形成されたビーズは、Bio-Rad Laboratories、Pharmacia(ニュージャージー州ピスカタウェイ)およびIBF(フランス)等、供給源から市販されている。ポリアクリルアミドおよびアガロースのコポリマーから形成されたビーズは、IBFおよびPharmacia等、供給源から市販されている。

10

20

30

40

50

## 【0142】

ポリマー支持体が用いられた場合、カルボキシル基を含有する単量体をポリマー(例えば、アクリル酸、メタクリル酸、イタコン酸その他)に取り込ませることにより、固体支持体の表面にカルボキシル基を付加することができる。あるいは、これは、既に記載されている通り、カルボキシル基へと変換され得る(例えば、無水マレイン酸等、無水物の加水分解により、または表面メチロールまたはアルデヒド末端基の酸化により)他の前駆体反応基を有するポリマーのさらなる化学反応により支持体に付加することができる。

## 【0143】

好ましい一実施形態において、本発明において用いられる固体支持体は、微小粒子である。前記微小粒子は、好ましくは、1ミリメートル未満の直径、好ましくは、約0.1~約1,000マイクロメートル( $\mu\text{m}$ )に及ぶ直径を有する。微小粒子は、いかなるサイズであってもよいが、好ましいサイズは、1~100 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは、2~50 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは、3~25 $\mu\text{m}$ 、さらにより好ましくは、約6~12 $\mu\text{m}$ である。微小粒子は、いずれかの規則的に成形された材料で作製されている。好ましい形状は、球状である。しかし、このパラメータは、本発明の性質に重要ではないため、その他の形状の粒子を用いてもよい。粒子の形状は、フローサイトメトリーにより、例えば、高分解能スリットスキャンニング(split-scanning)方法により識別される、追加的な区別パラメータとして機能し得る。

## 【0144】

本明細書において、用語「微小粒子」、「マイクロスフェア」または「マイクロビーズ」は、基本的にマイクロメートル範囲に収まる全体的な直径を有する小粒子を指すため、互換的に用いられており、同等の意義を有する。用語「ナノスフェア」、「ナノ粒子」または「ナノビーズ」は、基本的にナノメートル範囲に収まる全体的なサイズを有するより小さい粒子を指す。本明細書において、一般用語粒子、スフェアまたは「ビーズ」は、本発明の方法において固体支持体として有効に機能する微小粒子およびナノ粒子の両方を指す。

## 【0145】

本発明の文脈において、微小粒子の「サブセット」は、同一の特徴を有し、同一のエピトープでコーティングされた多数の同一微小粒子に相当する。重要なことに、微小粒子の各サブセットは、少なくとも1種の特徴(例えば、位置、サイズ、直径、重量、粒度分布および/または標識)により、集団の他のサブセットから識別可能となるべきである。

## 【0146】

好ましい一実施形態において、微小粒子の異なるサブセットは、異なって標識されているため(例えば、蛍光色素、フルオロフォア、発色団、放射性同位元素、質量タグまたは本技術分野において公知のいずれかの種類の検出可能なタグにより)区別することができる。

## 【0147】

より好ましい一実施形態において、米国特許第5,736,330号明細書、米国特許第5,981,180号明細書、米国特許第6,057,107号明細書、米国特許第6,268,222号明細書、米国特許第6,449,562号明細書、米国特許第6,514,295号明細書、米国特許第6,524,793号明細書および米国特許第6,528,165号明細書において提案されている通り、微小粒子の異なるサブセットは、異なって蛍光標識されているため区別することができる。よりの確には、これらの異なるサブセットは、異なる蛍光染料および/または異なる濃度の1種または複数の蛍光染料で染めることができる。このようなものとして、異なるサブセットは、測定し、測定システムにより個々の微小粒子が属するサブセットの決定(即ち、サブセットに応じた微小粒子の分類)に用いることのできる異なる蛍光サイン(例えば、異なる蛍光波長、異なる蛍光強度等)を有し得る。

## 【0148】

好ましい一実施形態において、これによりここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する欧州特許第1204869号明細書に記載されている通り、本発明において用いられる微小粒子は、蛍光染料で内部標識されている。

## 【0149】

このような微小粒子は、磁石または超常磁性、常磁性および強磁性金属酸化物からなる群から選択される磁性応答性金属酸化物を取り込むこともできる。磁性ビーズは、例えば、Dynal Inc.(ニューヨーク州グレートネック)等、供給源から市販されている、または例えば、米国特許第4,358,388号明細書、米国特許第4,654,267号明細書、米国特許第4,774,265号明細書、米国特許第5,320,944号明細書および米国特許第5,356,713号明細書に開示されている本技術分野において公知の方法を用いて調製することができる。したがって好ましい一実施形態において、本発明において用いられる固体支持体は、磁性である。

## 【0150】

より好ましい一実施形態において、本発明において用いられる固体支持体は、リガンドの共有結合カップリングのための表面カルボキシル基を含有する機能性ポリマー外側コーティングにおいてカプセル封入されたマグネタイトを有する、蛍光染料で内部標識された微小粒子であり、Luminex Corpにより商品名MagPlexで販売されている微小粒子等が挙げられる。

## 【0151】

スペクトル上の別個の領域に色分けされたカルボキシル化ポリスチレン微小粒子である、MicroPlexマイクロスフェア(Luminexにより販売)を用いることも可能である。これらの領域は、単一試料容量から最大100種の異なる分析物の同時照合を可能にするxMAP Instrumentにより素早く区別することができる。

## 【0152】

血清学アッセイにおける非特異的結合を低下させるよう最適化されたMicroPlexマイクロスフェアの特別な製剤である、SeroMAPマイクロスフェア(Luminexにより販売)を用いることも可能である。

## 【0153】

結合した抗体の検出

本発明は、エピトープに、したがって、検出可能な固体支持体に結合している抗体の存在の検出を網羅する。微小粒子のいずれのサブセットに抗体が結合しているか解析することにより、生体試料においていずれの抗体が存在するか、したがって、いずれの病原体に被験対象が感染しているか容易に推量することができる。

## 【0154】

いずれかの公知技術を用いて、固体支持体に結合している抗体の存在を検出することができる。後述する実験部分に示す通り、例えば、対象免疫グロブリンの定常部分を特異的に認識する標識された二次抗体を用いることができる。抗体にカップリングした固体支持体とカップリングしていない固体支持体との間を区別するために、検出抗体の標識が、固体支持体の標識とは異なるべきであることに留意することが重要である。

## 【0155】

あるいは、感染動物またはヒト由来の血清中に存在する免疫グロブリンは、一段階抗体標識プロトコールを用いて、R-フィコエリトリン(R-PE)へと直接的にコンジュゲートすることができる(Lightning-Link(商標)R-フィコエリトリンコンジュゲーションキット - Innova Biosciences)。全手順の実際の操作時間(hands-on time)は、通常20~30秒間であり、100%回収による少量の免疫グロブリンの標識を可能にする。この手順は、マルチプレックス免疫アッセイ実験におけるコンジュゲートされた抗生物種抗体およびストレプトアビジン-R-フィコエリトリン等、二次試薬の必要をなくす。

## 【0156】

蛍光染料で内部標識された微小粒子が用いられる場合、蛍光検出装置は、マイクロスフェアの種類を検出するための第1のレーザーと、特異的検出抗体にコンジュゲートされたフルオロフォアを励起することにより捕捉されたIgMまたはIgGの定量化を確実にするための第2のレーザーとを備えるべきである。

## 【0157】

その広範なマルチプレックス化能力およびより低い検出限界により、このアプローチは

10

20

30

40

50

、伝統的ELISA測定を超える相当な費用および試料の節約を可能にする。さらに、マイクロスフェアの選択されたセットは、MagPix(Luminex Corporation)等、入手可能でコンパクトで頑強な蛍光検出システムに適応することができる。

【0158】

本実施形態において、本発明の方法は、フロー解析ツールを用いることにより、1ウェル当たり最大100種類のカップリングされたマイクロスフェアの同時解析を可能にし、現在用いられているシステムおよび方法よりもおよそ数桁大きいと予想される大幅に増強された感度を与える。

【0159】

興味深いことに、本発明の方法は、ヒトであれ動物であれ個体における複数の感染症を診断するためのハイスループット血清学的スクリーニングの実行を可能にする。

10

【0160】

マルチプレックスイムノアッセイキット

本発明は、複数の抗原に対する抗体の検出における使用に適したキットを網羅する。本明細書に開示されている抗原またはエピトープのいずれかがキットに取り込まれてもよい。

【0161】

本発明は、ウイルス、細菌、寄生生物、動物、プリオン、酵母および真菌タンパク質に対する抗体の検出のためのキットを網羅する。

【0162】

キットは、少なくとも2種の固体支持体を含む。本発明は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の固体支持体を含むキットと、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の異なるエピトープを含むキットを網羅する。キットは、一緒に混合された少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の固体支持体を含むことができる。エピトープは、標的抗体によって認識され得る。

20

【0163】

一実施形態において、キットは、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第1のAGT-抗原融合タンパク質を含む第1の固体支持体と、AGT基質に共有結合によりカップリングされた第2のAGT-抗原融合タンパク質を含む第2の固体支持体とを含む。

30

【0164】

一実施形態において、キットは、  
AGT基質に共有結合によりカップリングされた第1のAGT-抗原融合タンパク質を含む第1の固体支持体、

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第2のAGT-抗原融合タンパク質を含む第2の固体支持体、

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第3のAGT-抗原融合タンパク質を含む第3の固体支持体、

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第4のAGT-抗原融合タンパク質を含む第4の固体支持体、

40

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第5のAGT-抗原融合タンパク質を含む第5の固体支持体、

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第6のAGT-抗原融合タンパク質を含む第6の固体支持体、

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第7のAGT-抗原融合タンパク質を含む第7の固体支持体、

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第8のAGT-抗原融合タンパク質を含む第8の固体支持体、

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第9のAGT-抗原融合タンパク質を含む第9の固体支持体、

50

AGT基質に共有結合によりカップリングされた第10のAGT-抗原融合タンパク質を含む第10の固体支持体を含む。

【0165】

他の実施形態において、キットは、AGT基質に共有結合によりカップリングされた2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50または100種のAGT-抗原融合タンパク質を含む、2、3、4、5、6、7、8、9、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50または100種の固体支持体を含むことができる。

【0166】

一実施形態において、キットは、第1の標的抗体により認識される第1のエピトープと共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体と、第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のエピトープと共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体とを含み、少なくとも2種の固体支持体は、互いに特異的に同定され得て、2種の異なる標的抗体の検出を可能にする。

10

【0167】

好ましい一実施形態において、本発明は、

(a)O6-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと、第1の標的抗体により認識される第1のエピトープとを含む第1の融合タンパク質に共有結合によりカップリングされたAGT基質を含む第1の固体支持体と、

b)O6-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと、第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のエピトープとを含む第2の融合タンパク質に共有結合によりカップリングされたAGT基質を含む第2の固体支持体と

20

を含む、生体試料における少なくとも2種の標的抗体の検出のためのキットを網羅する。

【0168】

好ましい実施形態において、キットは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の異なるウイルスエピトープを含む。

【0169】

好ましい実施形態において、キットは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50、100種等の異なる細菌エピトープを含む。

30

【0170】

キットは、ウイルス、細菌および/または寄生生物に特異的となり得る。

【0171】

キットは、ウイルスまたは細菌の科に特異的となり得る、あるいは同様の関連する臨床症状(即ち、小児疾患、呼吸器または出血性症候群等)に基づき得る。

【0172】

キットは、免疫グロブリンに特異的となり得、キットは、IgD、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEおよびIgG全体から選択される少なくとも2、3、4または5種の免疫グロブリンに対する抗体を検出する。

40

【0173】

キットは、バイオテロ病原体に特異的となり得、キットは、野兔病菌、炭疽菌、ボツリヌス菌、ペスト菌、天然痘、マールブルグウイルス、エボラウイルス、ラッサ熱ウイルスおよびマチュポウイルスタンパク質から選択される少なくとも2、3、4または5種のタンパク質に対する抗体を検出する。

【0174】

キットは、流感(flu)ウイルスに特異的となり得、キットは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種の異なるインフルエンザまたはSARSタンパク質に対する抗体を検出する。

50

## 【 0 1 7 5 】

キットは、ボックスウイルスに特異的となり得、これは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16種の異なるボックスウイルスに対する抗体を検出する。ボックスウイルスは、オルソボックス(天然痘ウイルス/痘瘡、ワクシニアウイルス(<http://en.wikipedia.org/wiki/Vaccinia>))、牛痘ウイルス(<http://en.wikipedia.org/wiki/Cowpox>)またはサル痘ウイルス(<http://en.wikipedia.org/wiki/Monkeypox>))、パラボックス(オーフウイルス、偽牛痘、ウシ丘疹口内炎ウイルス)、ヤタボックス(タナボックス([tanapox](http://en.wikipedia.org/wiki/Tanapox)))ウイルス(<http://en.wikipedia.org/wiki/Tanapox>))、ヤバサル腫瘍ウイルス([http://en.wikipedia.org/wiki/Yaba\\_monkey\\_tumor\\_virus](http://en.wikipedia.org/wiki/Yaba_monkey_tumor_virus)))またはモルシボックス([http://en.wikipedia.org/wiki/Molluscum\\_contagiosum](http://en.wikipedia.org/wiki/Molluscum_contagiosum)))となり得る。

10

## 【 0 1 7 6 】

本発明は、癌および腫瘍抗原、腎臓毒性マーカー、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、自己免疫性疾患に關与する抗原ならびに免疫グロブリンを包含するヒトタンパク質に対する抗体の検出のためのキットを網羅する。

## 【 0 1 7 7 】

本発明は、アレルゲンに対する抗体の検出のためのキットを網羅する。

## 【 0 1 7 8 】

好ましい一実施形態において、少なくとも1種のエピトープは、ウイルスエピトープである。好ましい一実施形態において、前記第1および/または第2のエピトープは、配列番号3のデング熱ウイルス1のEDIIIタンパク質、配列番号4のデング熱ウイルス2のEDIIIタンパク質、配列番号5のデング熱ウイルス3のEDIIIタンパク質、配列番号6のデング熱ウイルス4のEDIIIタンパク質、配列番号7のウエストナイルウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号8の黄熱ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号9の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号10のジカウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号11のベッセルブロンウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号12のロシオウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号13のマレー脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号14のセントルイス脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号54によりコードされた遺伝子型1の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号55によりコードされた遺伝子型2の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号56によりコードされた遺伝子型4の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号57によりコードされた遺伝子型5の日本脳炎ウイルスのEDIIIタンパク質、配列番号58によりコードされたラーベンスブルクウイルスのEDIIIタンパク質、ならびにHIV1、HIV2、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ウエストナイルウイルスおよび、HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66および68等の発癌性HPV株のウイルス性タンパク質からなる群において選ばれるウイルス性タンパク質上に存在する。

20

30

## 【 0 1 7 9 】

好ましくは、このキットは、固体支持体に結合している少なくとも2種の標的抗体を検出するための手段も含有する。前記手段は、より好ましくは、標的抗体の定常部分を認識する二次抗体である。前記二次抗体は、標識が固体支持体上に存在するものと同一でなければ標識されていてよい。しかし、感染性病原体(複数可)に関する情報は、抗体に結合している固体支持体の同定によってのみ与えられるため、固体支持体(複数可)に結合している抗体の検出に用いられる全二次抗体に対し同一標識を用いることが可能である。

40

## 【 0 1 8 0 】

本発明のキットは、洗浄バッファー、必要なプラスチック製器具(plasticware)その他等、標準試薬として許容される他の成分を含有することができる。

## 【 0 1 8 1 】

好ましい一実施形態において、本発明のキットは、少なくとも10、好ましくは少なくとも50、より好ましくは少なくとも100種の異なってカップリングされた固体支持体を含み、前記固体支持体は、例えば、上に定義されている微小粒子のサブセットである。

## 【 0 1 8 2 】

より好ましい一実施形態において、前記固体支持体は、マイクロスフェア、例えば、表

50

面カルボキシル基を含有する機能性ポリマー外側コーティングにカプセル封入されたマグネタイトを有する、蛍光染料で内部標識されたマイクロスフェアである。

【0183】

別の好ましい一実施形態において、本発明のキットにおいて、前記固体支持体は、少なくとも1個の単一区画において一緒に混合される。

【0184】

有利には、本発明のキットは、従来の支持体(複数可)、例えば、上に定義されている異なる抗原でコーティングされた微小粒子サブセットを含有するマイクロタイタープレートを含有する。好ましい一実施形態において、前記微小粒子サブセットは、少なくとも1個の単一区画(例えば、ウェルまたはチューブ)において一緒に混合される。このようなデバイスは、図11に開示されている。

10

【0185】

本発明のキットは、抗原コーティングされた微小粒子の前記サブセットを収容した受容器(recipient)(例えば、チューブ)を含有することもできる。

【0186】

本発明は、対象由来の生体試料における少なくとも2、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも50、さらにより好ましくは少なくとも100種の標的抗体を検出するための本発明のキットの使用も標的とする。

【0187】

好ましい一実施形態において、本発明のキットは、同一の地理的領域の風土病の(endemic)ウイルスまたは寄生虫による感染後に生成される少なくとも2、好ましくは少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50または100種の標的抗体を検出するために用いられる。例えば、本発明のキットは、デング熱ウイルス1型、2型、3型、4型、黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス、ウスツウイルス、ジカウイルス、ヴェッセルスブロンウイルス、シャモンダウイルス、リフトバレー熱ウイルス、チクングニアウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、エボラウイルス、マールブルグウイルス、ラッサ熱ウイルス、C型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、エンテロウイルス71、熱帯熱マラリア原虫またはレプトスピラ・インテロガンズ(leptospira interrogans)等、アフリカ領域に特異的なウイルスまたは寄生虫の抗原でコーティングされた微小粒子を含有することができる。

20

30

【0188】

図25は、これが企図される地理的領域(アジア、ヨーロッパ(Europa)、アメリカ、オセアニアまたはアフリカ)に応じた、本発明のキットに包含され得る抗原カップリングされたマイクロスフェアの組み合わせの例を開示する。

【0189】

あるいは、本発明のキットは、各患者/動物に適応することができるように、ウイルスまたは寄生虫誘導性の特異的症状(インフルエンザ様、脳炎または出血熱)または感染特異的動物の診断を可能にする抗原カップリングされたマイクロスフェアを含有してもよい。

【0190】

図25は、患者または動物の症状に応じた、本発明のキットに包含され得る抗原カップリングされたマイクロスフェアの組み合わせの例を開示する。

40

【0191】

国の衛生監督省庁(national sanitary agencies)に提案される抗原の組み合わせを含有するキットもまた、本発明に明らかに網羅されている。

【0192】

特に、本発明のキットは、配列番号21、配列番号42、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68、配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号109、配列番号111、配列番号1

50

13、配列番号115、配列番号117、配列番号119、配列番号121、配列番号123、配列番号125、配列番号127、配列番号129、配列番号131、配列番号133、配列番号135、配列番号137、配列番号139、配列番号141、配列番号143、配列番号145、配列番号147、配列番号149および配列番号151からなる群から選択される少なくとも2種の融合タンパク質でコーティングされた少なくとも2種の固体支持体を含む。

【0193】

好ましい一実施形態において、本発明のキットは、前記融合タンパク質でコーティングされた、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50または100種の固体支持体の組み合わせを含有する。

【0194】

より好ましい一実施形態において、本発明のキットは、食品医薬品局(Food and Drug Administration)に推奨される抗原、即ち、HBV、HCV、HIV1、HIV2およびウエストナイルウイルス由来の抗原を含有する少なくとも5種の異なる融合タンパク質でコーティングされた、少なくとも5種の固体支持体(例えば、マイクロスフェアサブセット)の組み合わせを含有する。

【0195】

本発明は、本発明のキットを製造するための方法を網羅する。

【0196】

一実施形態において、本発明は、キットを製造するための方法であって、

(a)第1の標的抗体により認識される第1のAGT-抗原融合タンパク質を用意する工程と、  
(b)前記第1のAGT-抗原融合タンパク質を、前記AGT-抗原融合タンパク質の基質と共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体と接触させる工程と、  
(c)第1のAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体を得る工程と、

(d)第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のAGT-抗原融合タンパク質を用意する工程と、

(e)前記第2のAGT-抗原融合タンパク質を、前記AGT-抗原融合タンパク質の基質と共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体と接触させる工程と、

(f)第2のAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体を得る工程と

を含み、前記第1および第2の固体支持体が、互いに特異的に同定され得る方法を網羅する。

【0197】

一実施形態において、AGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた固体支持体は、一緒に混合される。

【0198】

少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50または100種の異なるAGT-抗原融合タンパク質を用いて上述の工程a)~c)を反復して、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50または100種の異なるAGT-抗原融合タンパク質と共有結合によりカップリングされた少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、20、25、30、40、50または100種の固体支持体を作製することができる。

【0199】

別の一態様において、本発明は、上に定義されている本発明のキットを製造するための方法であって、

(a) - 第1の標的抗体により認識される第1のエピトープを含むポリペプチドと、  
- O6-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと

を含む少なくとも第1の融合タンパク質を用意する工程と、

(b)前記第1の融合タンパク質を、前記AGTポリペプチドの基質と共有結合によりカップリ

10

20

30

40

50

ングされた第1の固体支持体と接触させる工程と、

(c)第1の標的抗体により認識される第1のエピトープと共有結合によりカップリングされた第1の固体支持体を得る工程と、

(d) - 第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のエピトープを含むポリペプチドと、

- 06-アルキルグアニン-DNAアルキルトランスフェラーゼ活性を有するAGTポリペプチドと

を含む少なくとも第2の融合タンパク質を用意する工程と、

(e)前記第2の融合タンパク質を、前記AGTポリペプチドの基質と共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体と接触させる工程と、

(f)第2の標的抗体により認識されるが、前記第1の標的抗体により認識されない第2のエピトープと共有結合によりカップリングされた第2の固体支持体を得る工程と

を含み、前記少なくとも第1および少なくとも第2の固体支持体が、互いに特異的に同定することができる、

本発明のキットが、少なくとも前記第1および第2の支持体を含む方法に関する。

#### 【0200】

別の態様において、本発明は、上に定義されている少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90または96種の固体支持体を含むマルチプレックス免疫スクリーニングアッセイに関し、前記固体支持体のそれぞれは、励起後に異なる識別可能な波長を放射する。

#### 【0201】

別の態様において、本発明は、

a)1種または数種の生体試料を、上に定義されている少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90または96種の固体支持体と接触させる工程であって、固体支持体のそれぞれが、励起後に異なる識別可能な波長を放射する工程と、

b)標的抗体の有無を検出する工程と

を含む、マルチプレックス免疫スクリーニングアッセイ方法に関する。

#### 【0202】

好ましい一実施形態において、前記標的抗体は、例えば、HBV、HCV、HIV1、HIV2およびWNVから選択されるウイルス等、WHOまたはFDAガイドラインに従って血液バンクにおいて検出されるべきウイルス由来の抗原に特異的である。

#### 【0203】

別の好ましい一実施形態において、前記標的抗体は、HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66および68等、発癌性HPV株に特異的である。

#### 【0204】

別の好ましい一実施形態において、前記標的抗体のそれぞれは、検出可能な標識で標識されている。

#### 【0205】

別の態様において、本発明は、固体支持体から放射される光源および標的抗体または標的抗体に結合している標識抗体から放射される光源を検出するための技術デバイスと、いずれの固体支持体が標的抗体と結合しているか同定し、これにより解析されている試料における抗原、細菌、ウイルスまたは寄生虫の有無を示すための計算またはコンピュータデバイスとを含む、上に定義されている本発明のキットを製造するための方法を行うための機器に関する。

#### 【0206】

別の態様において、本発明は、対象における少なくとも1種の標的疾患を診断するためのin vitro方法に関し、前記標的疾患は、前記対象における少なくとも1種の標的抗体の合成を誘導することが知られており、前記方法は、本発明のイムノアッセイを行う工程

10

20

30

40

50

を含み、前記少なくとも1種の標的抗体の量が対照値よりも高い場合、前記対象は、前記少なくとも1種の標的疾患を患っていると診断される。

【0207】

この診断方法は、好ましくは、それを必要とする対象における2、好ましくは3、より好ましくは4種の標的疾患の診断を可能にする。しかし、この数は限定的なものではない。実際には、本発明の検出方法により100種までの異なる抗体を検出することが可能であれば、100種の標的疾患を診断することが可能である。

【0208】

好ましい一実施形態において、前記少なくとも1種の標的疾患は、ウイルス、細菌、酵母または真菌媒介性感染症、好ましくは、パピローマウイルスまたはフラビウイルス科(10  
デング熱、黄熱、ウエストナイル、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、C型肝炎ウイルス)、トガウイルス科(チクングニア、ロスリバー、マヤロ、西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎ウイルス)、ブニヤウイルス科(クリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、シュマレンベルクウイルス)、カリシウイルス科(E型肝炎ウイルス)、アレナウイルス科(ラッサ熱)もしくはフィロウイルス科(エボラ、マールブルグ)由来のRNAウイルスが原因のウイルス感染症、レプトスピラ・インテロガンズが原因の細菌感染症、もしくは熱帯熱マラリア原虫が原因の感染症である。

【0209】

好ましい一実施形態において、前記in vitro方法は、前記対象における少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13または15、より好ましくは少なくとも15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40または45、より好ましくは少なくとも50、60、70、80または90、さらにより好ましくは少なくとも100種のウイルスおよび/または細菌および/または寄生虫感染症を診断するために用いられる。20

【0210】

好ましい一実施形態において、前記方法において用いられる対照値は、前記標的疾患を患っていない対象、好ましくは健常対象由来の試料における前記標的抗体の量を表す。

【0211】

本発明の方法は、動物における感染症の診断に用いることができる。

【0212】

特に、本方法は、動物疾患の診断と共に、自然に感染した動物をワクチン接種した動物から識別するためのDIVA(感染動物をワクチン接種動物から識別する(Differentiating Infected from Vaccinated Animals))アプローチに用いることができる。新規ワクチンを補完するDIVA戦略の使用は、従来の戦略(試験し、屠殺してから食肉検査(test, slaughter and meat inspection))に並んで、標的化制御戦略としてのワクチン接種の実施を可能にするであろう。さらに、試験の特異性の増加は、不必要に屠殺され得る偽陽性動物の数を低下させることにより、大きい経済的利益を有するであろう。最後に、特に、新規診断アッセイが用いられる場合の感度の改善は、ワクチン接種の非存在下であっても疾患管理の経済的負荷の低下においてさらなる利益を有するであろう。30

【0213】

好ましい一実施形態において、本発明の方法は、ヒト個体に適用される。40

【0214】

本発明は、対象における少なくとも2種の標的疾患を診断するための本発明のキットの使用に関し、前記標的疾患は、パピローマウイルスまたはフラビウイルス科(デング熱、黄熱、ウエストナイル、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、C型肝炎ウイルス)、トガウイルス科(チクングニア、ロスリバー、マヤロ、西部ウマ脳炎、東部ウマ脳炎、ベネズエラウマ脳炎ウイルス)、ブニヤウイルス科(クリミア・コンゴ出血熱、リフトバレー熱、シュマレンベルクウイルス)、カリシウイルス科(E型肝炎ウイルス)、アレナウイルス科(ラッサ熱)もしくはフィロウイルス科(エボラ、マールブルグ)由来のRNAウイルスが原因のウイルス感染症、レプトスピラ・インテロガンズが原因の細菌感染症、もしくは熱帯熱マラリア原虫が原因の感染症である。50

## 【0215】

新たな新興アルボウイルスが近年配列決定され、ドイツ、ベネルクス(Benelux)およびフランスにおけるウシに影響を及ぼしている。このウイルスは、シュマレンベルクウイルス(SBV)と呼ばれており、ブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属のシンプ血清群に属するアカバネウイルスと近縁である。シュマレンベルクウイルスのウイルスゲノムは、S、LおよびMとして公知の3種の一本鎖RNAセグメントを含む。Sセグメントは、NヌクレオプロテインおよびNS非構造タンパク質をコードする。Nヌクレオプロテインは、異なるブニヤウイルスと抗原決定基を共有する。シュマレンベルクウイルスのBH80/11-4株の3種のRNAウイルス配列は、HE649913.1、HE649914.1およびHE649912.1の番号で利用できる。

## 【0216】

AGT融合タンパク質の産生を増強するためのAGTの使用

本発明者らは、SBV Nタンパク質と6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)とのキメラタンパク質としての融合が、特に、S2細胞等、無脊椎動物細胞における組換えNタンパク質の産生を大幅に改善することを観察した。

## 【0217】

そこで本発明者らは、宿主細胞、特に、非脊椎動物細胞におけるSBV由来のNヌクレオプロテインの産生を増強させるために、AGT酵素(EC2.1.1.63)、その変異体、その触媒ドメインまたはその細断片を用いることを初めて提案する。宿主細胞が、少なくともi)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、ii)AGT酵素、その変異体、触媒ドメインまたは細断片と、iii)SBVのNヌクレオプロテインとを含む融合ポリペプチドを発現する場合、増強効果が観察される。増強効果を生じるためには、AGT酵素は、対象とするタンパク質へと直接的または間接的に(スペーサーおよび他のアミノ酸が導入され得る)物理的に連結される必要がある。理論に制約されることなく、例えば、宿主細胞からの分泌を容易にし、宿主細胞の上清における合成された融合ポリペプチドを安定化することにより、もしくは合成および宿主細胞からの分泌後にこれが代謝されるのを防ぐために、AGT酵素が、シャペロンタンパク質として作用することが考慮される。加えて、AGTが、AGTの足場の役割と適合する、ヘリックスを含む3D球状構造を有する(Wibley J.E.A.ら、2000)ことが観察された。

## 【0218】

本発明の文脈において、「宿主」細胞は、「非脊椎動物」(または無脊椎動物)細胞、脊椎動物細胞、植物細胞、酵母細胞または原核生物細胞等、組換えタンパク質の産生に用いることができるいずれかの細胞である。これは、好ましくは、非脊椎動物および脊椎動物細胞である。

## 【0219】

非脊椎動物(無脊椎動物としても公知)は、異なる門を含み、最も有名なものは、昆虫、クモ綱(Arachnida)、甲殻綱(Crustacea)、軟体動物門(Mollusca)、環形動物門(Annelida)、蔓脚亜綱(Cirripedia)、放射相称動物(Radiata)、腔腸動物門(Coelenterata)および滴虫類(Infusoria)である。これらは現在、海綿および扁形動物等の単純な生物から、節足動物および軟体動物等の複雑な動物に及ぶ30を超える門に分類されている。本発明の文脈において、非脊椎動物細胞は、好ましくは、ショウジョウバエ(*Drosophila*)または蚊細胞、より好ましくはショウジョウバエS2細胞等、昆虫細胞である。

## 【0220】

宿主細胞株として有用な脊椎動物生物に由来する細胞の例として、非ヒト胚性幹細胞またはその派生体、例えば、トリEBX細胞;SV40配列により形質転換されたサル腎臓CVI系統(COS-7、ATCC CRL 1651);ヒト胚性腎臓系統(293);ペビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO);マウスセルトリ細胞[TM4];サル腎臓細胞(CVI、ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸がん細胞(HeLa、ATCC CCL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34);バッファローラット(buffalo rat)肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065);マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562、ATCC CCL51);ラット肝臓細胞腫

10

20

30

40

50

細胞[HTC、MI.5];YB2/O(ATCC n° CRL1662);NIH3T3;HEKおよびTRI細胞が挙げられる。本発明の文脈において、脊椎動物細胞は、好ましくは、EBX、CHO、YB2/O、COS、HEK、NIH3T3細胞またはその派生体である。

【0221】

本発明の文脈において用いることのできる植物細胞は、タバコ栽培品種Bright Yellow 2(BY2)およびNicotiana tabaccum 1(NT-1)である。

【0222】

本発明の文脈において用いることのできる酵母細胞は、出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)、分裂酵母(Schizosaccharomyces pombe)およびハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)と共に、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)およびピキア・メタノリカ(Pichia methanolica)等のメチロトローフ酵母である。

10

【0223】

本発明の文脈において用いることのできる原核生物細胞は通常、大腸菌細菌または枯草菌(Bacillus subtilis)細菌である。

【0224】

よって、別の一態様において、本発明は、宿主細胞においてSBV由来のNヌクレオプロテイン(SBV.N)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)配列番号16のSBVのNヌクレオプロテインとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

20

【0225】

SBV由来のNヌクレオプロテインは、以下、「異種タンパク質」、「対象とするタンパク質」、「キメラタンパク質」または「組換えタンパク質」と称する。

【0226】

本明細書において、用語「ベクター」は、外来遺伝子のDNAまたはRNA配列を宿主細胞へと導入し、これを形質転換し、導入配列の発現を促進することのできる媒体を意味する。本明細書において理解される通り、ベクターは、例えば、プラスミド、ファージおよびウイルス等、核酸分子である。これに関しては、下により詳細に記述する。いずれかの種類のプラスミド、コスミド、YACまたはウイルスベクターを用いて、対象とするタンパク質の発現が望ましい宿主細胞へと導入することのできる、組換え核酸コンストラクトを調製することができる。特定の種類の宿主細胞における対象とするタンパク質の発現が望ましい場合、所望の細胞型または組織型に選択的に感染するウイルスベクターを用いることができる。また、本発明の文脈において重要なベクターは、遺伝子治療において用いるためのベクターである(即ち、核酸分子を宿主生物へと送達することができるベクター)。

30

【0227】

例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスおよび望ましい細胞指向性を有する他の組換えウイルス等、ウイルスベクターが挙げられる。ウイルスベクターを構築および使用するための方法は、本技術分野において公知のものである(Miller and Rosman、BioTechniques、7:980~990、1992を参照)。

40

【0228】

本発明において実際に好ましいウイルスベクターは、脊椎動物および非脊椎動物細胞における使用に十分に適したベクターである。

【0229】

非脊椎動物細胞のため、好ましいベクターは、アルボウイルスであり、節足動物ベクターであるウエストナイルウイルスが特に好ましい。非脊椎動物細胞において効率的に発現されることが知られている他のベクターは、バキュロウイルスである。

【0230】

脊椎動物細胞のため、レンチウイルス、AAV、バキュロウイルスおよびアデノウイルスベクターが好ましい。哺乳類宿主細胞における発現に適したベクターは、非ウイルス性(

50

例えば、プラスミドDNA)起源であってもよい。適したプラスミドベクターとして、pREP4、pCEP4(Invitrogen)、pCI(Promega)、pCDM8およびpMT2PC、pVAXおよびpgWizが限定することなく挙げられる。

【0231】

原核生物細胞のため、プラスミド、バクテリオファージおよびコスミドベクターが好ましい。原核生物系における使用に適したベクターとして、pBR322(Gibco BRL)、pUC(Gibco BRL)、pBluescript(Stratagene)、p Poly、pTrc;pET 11d;pIN;およびpGEXベクターが限定することなく挙げられる。

【0232】

植物細胞のため、Tiプラスミド等、プラスミド発現ベクターならびにカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)およびタバコモザイクウイルスTMV等、ウイルス発現ベクターが好ましい。

【0233】

酵母細胞における組換えタンパク質の発現は、3種類のベクター:組込みベクター(YIp)、エピソームプラスミド(YEp)およびセントロメアプラスミド(YCp)を用いて行うことができる。酵母(例えば、出芽酵母(*S. cerevisiae*))における発現に適したベクターとして、pYepSec1、pMFa、pJRY88、pYES2(Invitrogen Corporation、カリフォルニア州サンディエゴ)およびpTEF-MF(Dualsystems Biotech製品コード:P03303)が挙げられるがこれらに限定されない。

【0234】

遺伝子治療に用いることのできるベクターは、本技術分野において周知のものである。これは、例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、泡沫状ウイルスまたはアデノ随伴ウイルス(AAV)である。ウイルスベクターは、複製能を有し得る、もしくは複製欠損または複製障害となるよう遺伝的に無能化され得る。好ましい遺伝子治療ベクターは、国際公開第99/055892号パンフレット、米国特許第6,682,507号明細書および国際公開第01/27300号パンフレットに記載されているDNA Flapベクターである。

【0235】

RNA、ポリペプチド、タンパク質または酵素等、発現産物を「コードする」配列は、発現されると、該RNA、ポリペプチド、タンパク質または酵素の産生をもたらすヌクレオチド配列である、即ち、ヌクレオチド配列は、該RNAを「コードする」、もしくは該ポリペプチド、タンパク質または酵素のアミノ酸配列をコードする。

【0236】

本発明のベクターは、6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインをコードするヌクレオチド配列を含有する。これらのポリペプチドは、上に定義されている。好ましくは、前記AGT変異体は、配列番号2のSNAP酵素であり、例えば、配列番号15または配列番号31によりコードされ、後者は、51%のG/C含量を有する。

【0237】

好ましくは、本発明のヌクレオチド発現ベクターは、対象とするタンパク質をコードする異種DNA配列のインフレーム挿入を可能にするクローニング部位をさらに含む。

【0238】

本発明において意味する通り、用語「分泌シグナルペプチド」は、Nヌクレオプロテインの輸送を宿主細胞の外部に方向付ける短い(3~60アミノ酸長)ペプチド鎖を指す。

【0239】

本発明に適切な分泌シグナルの例として、接合因子(MF)アルファ(米国特許第5,879,926号明細書);インペルターゼ(国際公開第84/01153号パンフレット);PH05(DK3614/83);YAP3(酵母アスパラギン酸プロテアーゼ3;国際公開第95/02059号パンフレット);およびBAR1(国際公開第87/02670号パンフレット)のシグナルペプチド配列が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

## 【0240】

本発明の文脈において、この分泌シグナルペプチドは、好ましくは、非脊椎動物細胞もしくは脊椎動物細胞のいずれかにおいてまたはその両方において機能的である。

## 【0241】

昆虫細胞において機能的な分泌シグナルペプチドの例は、昆虫ssBiP(配列番号37、例えば、配列番号22のDNA配列によりコードされる)、配列番号24のBiP様ペプチドシグナル(例えば、配列番号23のDNA配列によりコードされる)、配列番号153のBiP様ペプチドシグナル(例えば、配列番号152のDNA配列によりコードされる)およびアルボウイルスに存在するいずれかのペプチドシグナル、例えば、ウエストナイルウイルスのエンベロープEタンパク質(配列番号38)である。

10

## 【0242】

興味深いことに、配列番号24の上述のBiP様ペプチドシグナルは、非脊椎動物および脊椎動物細胞の両方において機能的である。このBiP様シグナルは、最後のグリシンアミノ酸が、デング熱ウイルスのEタンパク質の切断部位に相当するアミノ酸配列Pro Thr Ala Leu Ala(配列番号39)により置き換えられた配列番号37のBiPペプチドシグナルに相当する。従って、BiP様シグナルは、タンパク質が翻訳され宿主細胞の上清に分泌されると、有利に切断される。

## 【0243】

種々の分泌シグナルは、酵母宿主細胞、例えば、出芽酵母における発現にも利用できる。これらは、プレプロアルファ因子、HSp150、PHO1、SUC2、KILM1(キラー毒素1型)およびGGP1を包含する。

20

## 【0244】

クローニング部位は、対象とするタンパク質をコードする遺伝子の、発現系へのクローニングを容易にする配列である。これは、制限部位または制限認識部位、即ち、制限酵素により認識されるヌクレオチドの特異的配列を含有するDNA分子上の位置を含有する(例えば、図面を参照)。これは一般に、パリンδροーム配列(制限酵素は通常、ホモ二量体として結合するため)であり、特定の制限酵素は、その認識部位内の2個のヌクレオチドの間または近傍のいずれかで配列を切ることができる。クローニング部位は、当業者に周知のものである。

## 【0245】

本発明の好ましい一実施形態において、前記AGT酵素をコードするDNA配列は、前記対象とする異種タンパク質をコードするDNA配列の5'または3'に、好ましくは5'に位置する。したがって、AGT酵素は、対象とする異種タンパク質/ポリペプチドに直接的にまたは間接的に連結され、好ましくは、対象とする異種タンパク質/ポリペプチドのN末端側に位置する。前記ペプチドシグナルと、前記AGT酵素、変異体または触媒ドメインと、前記対象とする組換えタンパク質とを含む融合ポリペプチドをコードするDNA配列は、ペプチドシグナルが機能する細胞と同一の宿主細胞において機能的な誘導性プロモーターと作動可能に関連することができる。

30

## 【0246】

より好ましくは、本発明のベクターにおいて、前記オープンリーディングフレームは、ペプチドシグナルが機能する細胞と同一の宿主細胞において機能的な誘導性プロモーターと作動可能に関連する。

40

## 【0247】

RNAポリメラーゼがコード配列をRNAへと転写し、続いてこれがトランス-RNAスプライスされ(イントロンを含有する場合)、配列がタンパク質をコードするのであればタンパク質へと翻訳される場合、該コード配列は、細胞において発現制御配列(即ち、転写および翻訳制御配列)「と作動可能に関連」する。

## 【0248】

「プロモーター」は、作動可能に(operably)連結されたその下流DNAの転写を開始させることのできる(即ち、二本鎖DNAのセンス鎖における3'方向で)ヌクレオチドの配列であ

50

る。プロモーター配列内において、転写開始部位(例えば、ヌクレアーゼS1によるマッピングにより簡便に見出される)と共に、RNAポリメラーゼの結合に關与するタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)が見出される。

【0249】

本発明の文脈において、遺伝子発現の制御に用いることのできるプロモーターは、例えば、非脊椎動物細胞または脊椎動物細胞において機能的なプロモーターである。例えば、非脊椎動物細胞のために、メタロチオネイン遺伝子の調節配列を用いることができる(Brinsterら、Nature、296:39~42、1982)。

【0250】

好ましくは、本発明のベクターに存在する誘導性プロモーターは、昆虫細胞、より好ましくは、ショウジョウバエ細胞においてプロモーター活性を有する。これは例えば、金属、例えばCuSO<sub>4</sub>の存在下で遺伝子の高レベル転写を導くショウジョウバエメタロチオネインプロモーターpMT(Lastowski-Perryら、J.Biol. Chem. 260:1527(1985))である。あるいは、構成的プロモーターであり、金属の添加を必要としないショウジョウバエアクチン5C遺伝子プロモーターを用いることができる(B.J.Bondら、Mol. Cell. Biol. 6:2080(1986))。他の公知のショウジョウバエプロモーターの例として、例えば、誘導性熱ショック(Hsp70)およびCOPIA LTRプロモーターが挙げられる。SV40初期プロモーターは、ショウジョウバエメタロチオネインプロモーターよりも低レベルの発現を生じる。

【0251】

好ましくは、本発明のベクターに存在する誘導性プロモーターは、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)細胞、好ましくは、ショウジョウバエS2細胞においてプロモーター活性を有する。これは例えば、Lastowski-Perryら、J.Biol. Chem. 260: 1527(1985)において完全に記載されているメタロチオネインプロモーターである。

【0252】

哺乳類細胞における構成的発現に適したプロモーターとして、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、アデノウイルス主要後期(major late)プロモーター、ホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターおよび単純ヘルペスウイルス(HSV)-1のチミジンキナーゼ(TK)プロモーターが挙げられる。外因的に供給される化合物により調節される誘導性真核生物プロモーターとして、亜鉛誘導性メタロチオネイン(MT)プロモーター、デキサメタゾン(Dex)誘導性マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーターシステム(国際公開第98/10088号パンフレット)、エクジソン昆虫プロモーター、テトラサイクリン抑制性プロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター、RU486誘導性プロモーターおよびラパマイシン誘導性プロモーターが限定することなく挙げられる。

【0253】

好ましくは、本発明のベクターに存在するプロモーターは、哺乳類細胞、好ましくは、HeLa細胞においてプロモーター活性を有する。これは例えば、SV40プロモーターである。

【0254】

酵母宿主細胞におけるタンパク質発現のために、様々な酵母プロモーターが利用できる。ADH2、SUC2等、その一部の発現は誘導性であり、GAPDH等、他の一部は構成的である。酵母における発現に適した他のプロモーターとして、TEF、PGK、MFアルファ、CYC-1、GAL-1、GAL4、GAL10、PHO5、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPまたはGAPDH)およびアルコール脱水素酵素(ADH)プロモーターが挙げられる。

【0255】

植物細胞における使用のために、最も一般的に用いられているプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーターまたはその強化バージョンであるが、トウモロコシおよびシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来のハイブリッド(ocs)3masプロモーターまたはユビキチンプロモーター等、多数の代替プロモーターを用いることもできる。これら構成的プロモーターとは対照的に、イネ -アミラーゼRAmy3Dプロモーターは、糖欠乏により誘導される(Hellwig Sら、Nat. Biotechnol.2004; 22(11):1415~22)。

## 【0256】

大腸菌宿主細胞における発現に適したプロモーターとして、バクテリオファージラムダ(lambda)pLプロモーター、lac、TRPおよびIPTG誘導性pTACプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0257】

分泌シグナルペプチドおよび誘導性プロモーターが、同一宿主細胞において機能的であることが好ましい。

## 【0258】

より好ましくは、分泌シグナルペプチドおよび誘導性プロモーターは、ショウジョウバエS2細胞および脊椎動物細胞の両方において機能的である。

10

## 【0259】

プロモーターに適用される用語「誘導性」は、当業者に十分に理解されている。本質的には、誘導性プロモーターの制御下における発現は、加えられた刺激に応答して「スイッチオン」または増加する。刺激の性質は、プロモーター間で変動する。一部の誘導性プロモーターは、適切な刺激の非存在下において殆ど発現しないまたは検出不能レベルの発現をもたらす(または全く発現しない)。他の誘導性プロモーターは、刺激の非存在下において検出可能な構成的発現をもたらす。刺激の非存在下における発現のレベルがどうであれ、いかなる誘導性プロモーターからの発現も、正しい刺激の存在下で増加する。

## 【0260】

適切なベクターが構築され、選択された宿主細胞、好ましくは、ショウジョウバエ細胞株にトランスフェクトされると、誘導性プロモーターに適切な誘導剤の添加により異種タンパク質の発現が誘導される。例えば、カドミウムまたは銅は、Hsp70プロモーターの誘導剤である。アクチン5Cプロモーター等、構成的プロモーターに関して、発現のための誘導剤は必要ない。

20

## 【0261】

本発明の別の一実施形態において、ヌクレオチド発現ベクターは、好ましくは、AGT酵素またはその触媒ドメインと対象とする組換えタンパク質との間に位置する、少なくとも1個のペプチド切断部位をコードする。

## 【0262】

ペプチド切断部位(「ペプチド切断部位」とも呼ばれる)は、少なくとも1種のプロテアーゼ酵素(例えば、とりわけセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ)により認識されるアミノ酸配列である。ペプチド切断部位の例は、配列番号40(AspAspAspAspLys/Asp)のエントロキナーゼ切断部位である。エントロキナーゼは、配列のC末端側における切断により不活性トリプシノーゼンを活性トリプシンに変換することが知られているセリンプロテアーゼ酵素(EC3.4.21.9)である:Val--(Asp)<sub>4</sub>--Lys--Ile-Val~(トリプシノーゼン)Val--(Asp)<sub>4</sub>--Lys(ヘキサペプチド)+Ile-Val~(トリプシン)。Lysの前に4個のAspがありその後プロリン残基が続かない場合、エントロキナーゼは、リジンの後を切断する。

30

## 【0263】

別の有用なペプチド切断部位は、配列番号32(pro-TEV1)または配列番号33(pro-TEV2)(それぞれGlu Asn Leu Tyr Phe Gln SerまたはGly)のアミノ酸配列を有する、所謂「TEVプロテアーゼ」の切断部位である。係る切断部位は、例えば、配列番号29および30によりコードされ得る。TEVプロテアーゼは、タバコエッチ病ウイルスによりコードされる核封入タンパク質の27kDa触媒ドメインの一般名である。これは市販されている(Invitrogen)。

40

## 【0264】

Deng熱ウイルス血清型1の膜前駆体prM由来の切断部位(配列番号39)を本発明のベクターにおいて用いることもできる。

## 【0265】

別の実施形態において、本発明のヌクレオチド発現ベクターは、好ましくは、本発明の融合ポリペプチド(ペプチドシグナルと、AGTタンパク質またはそのホモログと、組換えタンパク質とを含む)における組換えタンパク質のC末端側に位置する標識をさらにコード

50

する。本発明の文脈において、「標識」は、宿主細胞の粗ライセートからポリペプチドの回収を容易にするために用いられ、好ましくは、蛍光タンパク質、ポリ-ヒスチジン(ポリ-his)もしくはポリ-ヒスチジン-グリシン(ポリ-his-gly)タグ;flu HAタグ;c-mycタグ単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ、Flag-ペプチド、アルファ-チューブリンエピトープまたはT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグを含む群から選択される。しかし、その他の標識を用いてもよい。本発明の好ましい実施形態において、ベクターは、配列番号27を有するヘキサ-ヒスチジンタグをコードする配列番号28のDNAを含む。

【0266】

別の一実施形態において、本発明のヌクレオチド発現ベクターは、好ましくは、AGT酵素(またはその触媒ドメイン)と対象とする組換えタンパク質との間および/または対象とする組換えタンパク質と標識との間に位置するスペーサー配列をさらにコードする。本発明の文脈において、スペーサー配列は、2個の連結されたポリペプチドを空間的に離間させるために用いられる少なくとも3個のアミノ酸を含むアミノ酸配列である(その結果、これらのポリペプチドは間接的に連結されるようになる)。係るスペーサーは、例えば、アミノ酸配列グリシン-グリシン-グリシン-セリン(GGGS、配列番号25)となることができ、これをコードするDNAスペーサー配列は、配列番号26となることができる。本発明の文脈において、このDNA配列は以下、「DNAスペーサー配列」と命名され、AGTまたはその触媒ドメインをコードするDNAと組換えDNA配列との間に、好ましくは、ペプチド切断部位をコードするDNA配列の上流に位置する。

【0267】

SNAPカセットおよび抗原発現

本明細書において、用語「pDeSNAPUniv」は、単一のオープンリーディングフレームにおいて、5'から3'にかけて、

- a) 分泌シグナルペプチドと、
- b) 配列番号1のAGTタンパク質、その変異体、断片または触媒ドメイン、特に、配列番号2のSNAP変異体と、
- c) 少なくとも1個のペプチド切断部位と、
- d) 少なくとも1個の標識と、
- e) 少なくとも1個のスペーサー配列と

をコードするDNAカセットを命名する。

【0268】

このpDeSNAPUniv DNAカセットは、有利には配列番号24のBiP様ペプチドシグナルもしくは配列番号37のssBiPペプチドシグナルである分泌シグナルペプチド、配列番号2のSNAP変異体、有利には配列番号27のHis-tagである標識、有利には配列番号32のpro-TEVもしくは配列番号33のpro-TEVのいずれかであるペプチド切断部位、および/または有利には配列番号25のアミノ酸配列を有するスペーサー配列をコードする。

【0269】

より好ましくは、pDeSNAPUniv DNAカセットは、5'から3'にかけて、BiP様分泌シグナルをコードする配列番号23の配列と、SNAP変異体をコードする配列番号15または31と、配列番号26のスペーサー配列と、配列番号29のペプチド切断部位pro-TEVと、配列番号30のペプチド切断部位pro-TEVと、配列番号26のスペーサー配列と、His-tag標識をコードする配列番号28の配列を含む(pDeSNAPUnivカセットの構造を示す図8を参照)。係るpDeSNAPUniv DNAカセットは、例えば、配列番号34である。

【0270】

この「pDeSNAPUniv」カセットは、異種タンパク質を産生するために宿主細胞のトランスフェクトに用いられるいかなる種類のベクター、即ち、脊椎動物ベクター(pcDNA3またはpCI-neoベクター等)や非脊椎動物ベクター(Invitrogen製のDESシステムにおいて有用なpMT/BiP/V5-HisA等)にも挿入され得るため、「ユニバーサル」として保持される。前記ユニバーサル配列を含むプラスミドの例は、配列番号43(pDeSNAP Univカセットを含むInvitrogen製のpMT/BiP/V5-HisA)、配列番号44(pDeSNAP Univカセットを含むInvitrogen製のpU

10

20

30

40

50

C57)または配列番号45(pDeSNAP Univカセットを含むInvitrogen製のpcDNA3)である。

【0271】

前記ユニバーサル配列を含むプラスミドの別の例は、5'から3'にかけて、オルギア・シユードツガ(*Orgyia pseudotsugata*)マルチカプシドヌクレオプロテインウイルス最初期2プロモーター(OpIE2SP)の構成的プロモーターと、配列番号152のBiP様シグナルペプチドと、配列番号31のSNAP様配列と、配列番号26のスペーサー配列と、配列番号29のpro-TEV1配列と、配列番号106のC末端ペプチドタグとを含む、pUC57プラスミドである配列番号105である。

【0272】

SBV.N等、対象とするタンパク質の異種配列がそこにクローニングされると、係るベクターは、脊椎動物または非脊椎動物宿主細胞のいずれかに有利にトランスフェクトされて、対象とするタンパク質を多量に産生することができる。

【0273】

好ましい一実施形態において、本発明のベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/SBV.Nカセット」即ち、SBVのNヌクレオプロテインの配列が挿入されたpDeSNAPUniv DNAカセットを含み、前記pDeSNAP Univ/SBV.Nカセットは、単一オープンリーディングフレームにおいて、5'から3'にかけて、

a) 分泌シグナルペプチドと、

b) 配列番号1のAGTタンパク質、その変異体、断片または触媒ドメイン、特に、配列番号2のSNAP変異体と、

c) 少なくとも1個のペプチド切断部位と、

d) 配列番号16のSBVのNヌクレオプロテインと、

e) 少なくとも1個の標識と、

f) 少なくとも1個のスペーサー配列と

をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0274】

このpDeSNAP Univ/SBV.N DNAカセットは、有利には配列番号24のBiP様ペプチドシグナルもしくは配列番号37のssBiPペプチドシグナルである分泌シグナルペプチド、配列番号2のSNAP変異体、配列番号16のSBVのNヌクレオプロテイン、有利には配列番号27のHis-tagである標識、有利には配列番号32のpro-TEVもしくは配列番号33のpro-TEVのいずれかであるペプチド切断部位、および/または有利には配列番号25のアミノ酸配列を有するスペーサー配列をコードする。

【0275】

より好ましくは、pDeSNAP Univ/SBV.N DNAカセットは、5'から3'にかけて、BiP様分泌シグナルをコードする配列番号23の配列またはssBiP分泌シグナルをコードする配列番号22と、SNAP変異体をコードする配列番号15または31と、配列番号26のスペーサー配列と、配列番号29のペプチド切断部位pro-TEV1と、SBVのNヌクレオプロテインをコードする配列番号17の配列と、配列番号30のペプチド切断部位pro-TEV2と、配列番号26のスペーサー配列と、His-tag標識をコードする配列番号28の配列とを含む。

【0276】

さらにより好ましくは、pDeSNAP Univ/SBV.N DNAカセットは、5'から3'にかけて、ssBiP分泌シグナルをコードする配列番号22の配列と、SNAP変異体をコードする配列番号31と、配列番号26のスペーサー配列と、配列番号29のペプチド切断部位pro-TEV1と、SBVのNヌクレオプロテインをコードする配列番号17の配列と、配列番号30のペプチド切断部位pro-TEV2と、配列番号26のスペーサー配列と、His-tag標識をコードする配列番号28の配列とを含む。係るpDeSNAP Univ/SBV.Nカセットは、例えば、配列番号35である。

【0277】

あるいは、pDeSNAP Univ/SBV.N DNAカセットは、5'から3'にかけて、BiP様分泌シグナルをコードする配列番号23の配列と、SNAP変異体をコードする配列番号31と、配列番号26のスペーサー配列と、配列番号29のペプチド切断部位pro-TEV1と、SBVのNヌクレオプロテ

10

20

30

40

50

インをコードする配列番号17の配列と、配列番号30のペプチド切断部位pro-TEV2、配列番号26のスペーサー配列と、His-tag標識をコードする配列番号28の配列とを含むことができる。係るpDeSNAP Univ/SBV.Nカセットは、例えば、配列番号36である(その構造を図9に示す)。

【0278】

よって、好ましい一実施形態において、本発明のベクターは、配列番号35のヌクレオチド配列または配列番号36のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/SBV.Nカセットを含む。

【0279】

よりの確には、配列番号35のpDeSNAP Univ/SBV.Nカセットヌクレオチド配列は、  
 - 配列番号22の昆虫BiP配列、  
 - 配列番号31のSNAP様配列、  
 - スペーサー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、  
 - 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、  
 - 配列番号17のSBV.N DNA配列(内部EcoRV部位が欠失され、2個のEcoRVおよびXmaI部位が端(extremities)に付加された、天然SBV.N配列に相当)、  
 - 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、  
 - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列  
 を含む。

10

【0280】

また、配列番号36のpDeSNAP Univ/SBV.Nカセットヌクレオチド配列は、  
 - 配列番号23の昆虫BiP様配列、  
 - 配列番号31のSNAP様配列、  
 - スペーサー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、  
 - 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、  
 - 配列番号17のSBV.N DNA配列(内部EcoRV部位が欠失され、2個のEcoRVおよびXmaI部位が端に付加された、天然SBV.N配列に相当)、  
 - 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、  
 - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列  
 を含む(図9も参照)。

20

30

【0281】

興味深いことに、配列番号36のpDeSNAP Univ/SBV.Nカセットヌクレオチド配列は、加えて、ATGの上流にNheI部位、BiP様配列とSNAP様配列との間にBglII部位、両者共に終止コドンの下流に位置するAgeI部位およびHindIII部位も含む。

【0282】

本発明のベクターは、例えば、配列番号17のSBV.N DNA配列が挿入された配列番号43(pDeSNAP Univカセットを含むInvitrogen製のpMT/BiP/V5-HisAプラスミド)、配列番号17のSBV.N DNA配列が挿入された配列番号44(pDeSNAP Univカセットを含むInvitrogen製のpUC57プラスミド)または配列番号17のSBV.N DNA配列が挿入された配列番号45(pDeSNAP Univカセットを含むInvitrogen製のpcDNA3プラスミド)である。

40

【0283】

本発明のベクターは、2012年4月24日に番号CNCM I-4616で国立微生物培養物寄託機関(Centre National de Culture et de Microorganismes)(CNCM)、パスツール研究所(Institut Pasteur)(25 rue du Docteur Roux、75724 Paris cedex 15、フランス)に寄託された、S2細胞においても提供されている。

【0284】

別の一態様において、本発明は、本発明のベクター、好ましくは、配列番号35または配列番号36のヌクレオチド配列を含むベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞を標的とする。

【0285】

50

好ましくは、本発明の本態様において、前記組換え細胞は、非脊椎動物細胞、好ましくは昆虫細胞、より好ましくはS2細胞である。

【0286】

非脊椎動物細胞は、昆虫、クモ綱、甲殻綱、軟体動物門、環形動物門、蔓脚亜綱、放射相称動物、腔腸動物門および滴虫類由来のいずれかの細胞となり得る。本発明の文脈において、非脊椎動物細胞は、好ましくは、ショウジョウバエまたは蚊の細胞等、昆虫細胞である。これは、より好ましくは、ショウジョウバエS2細胞である。この場合、本発明の発現ベクターは、例えば、配列番号35を含む。

【0287】

ショウジョウバエS2細胞は、広く記載されている。この細胞は、懸濁培養において室温(24±1)で維持することができるため、高収量のタンパク質産生に特に適する。培養培地は、5~10%(v/v)の間の熱失活ウシ胎仔血清(FBS)を補充したM<sub>3</sub>である。本発明の好ましい実施形態において、培養培地は、5%FBSを含有する。誘導後に細胞は、無血清培地において培養される。この培地において、S2細胞は、懸濁培養において、例えば、250mL~2000mLスピナ(spinner)フラスコにおいて50~60rpmで撹拌しつつ増殖させることができる。細胞密度は通常、1mL当たり10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>個の間の細胞で維持される。

【0288】

好ましい一実施形態において、本発明の組換え細胞は、2012年4月24日に番号CNCM I-4616で国立微生物培養物寄託機関(Centre National de Culture et de Microorganismes)(CNCM)、パスツール研究所(Institut Pasteur)(25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, フランス)に寄託されたS2細胞である。

【0289】

別の好ましい一実施形態において、前記組換え細胞は、脊椎動物細胞である。

【0290】

好ましくは、前記脊椎動物組換え細胞は、哺乳類細胞、好ましくは、CHO、YB2/O、COS、HEK、NIH3T3、HeLa細胞またはその派生体である。より好ましくは、この場合、本発明の発現ベクターは、配列番号36を含む。

【0291】

本発明の別の態様において、前記組換え細胞は、本発明の発現ベクター、好ましくは、配列番号35または36を含むベクターの増幅および精製に用いられる。

【0292】

この目標において、本発明のヌクレオチド発現ベクターは、選択マーカーをコードする遺伝子および/またはターミネーター配列を含むこともできる。コンストラクトに包含され得る選択マーカー遺伝子は通常、抗生物質(例えば、ブラストサイジン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、クロラムフェニコール)に対する抵抗性等、選択可能な表現型を与える遺伝子である。

【0293】

発現ベクターを作製するための方法は、本技術分野において周知のものである。

【0294】

別の態様において、本発明の組換え細胞は、シュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインを多量に産生するために用いられる。

【0295】

よって、特定の一実施形態において、本発明は、シュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインを産生するための方法であって、

(a)例えば、配列番号35または配列番号36のDNA配列を含む本発明のベクターを得る工程と、

(b)工程(a)において得られたポリヌクレオチドで宿主細胞(好ましくは、昆虫細胞または哺乳類細胞)をトランスフェクトする工程と、

(c)工程(b)において得られた前記ポリヌクレオチドを発現させて、シュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインを産生する工程と、

10

20

30

40

50

(d)任意選択で、AGTポリペプチドを切断する工程と、  
(e)シュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインを回収する工程と、  
(f)任意選択で、シュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインを精製する工程とを含む方法についても描写する。

【0296】

本発明の方法の異なる工程を行うために、従来の分子生物学、微生物学および組換えDNA技法を、当業者の技能範囲内で利用することができる。係る技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook、Fitsch & Maniatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(本明細書において「Sambrookら、1989」と称する); DNA Cloning: A Practical Approach、IおよびII巻(D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編、1984); Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames & S. J. Higgins編、1984); Animal Cell Culture(R. I. Freshney編、1986); Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press、1986); B. E. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、Inc.(1994)を参照されたい。

【0297】

用語「トランスフェクション」は、宿主細胞が、導入された遺伝子または配列を発現して、シュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテイン産生することができるような、真核生物宿主細胞への外来核酸の導入を意味する。導入されたDNAまたはRNAを受け入れ、これを発現する宿主細胞は、「トランスフェクト」されており、「トランスフェクタント」または「クローン」である。宿主細胞に導入されたDNAまたはRNAは、宿主細胞と同一の属もしくは種の細胞または異なる属もしくは種の細胞を包含するいずれかの供給源に由来し得る。

【0298】

本発明の文脈において、ポリヌクレオチドによる宿主細胞のトランスフェクションは、本技術分野における古典的方法により、例えば、トランスフェクション、感染またはエレクトロポレーションにより行うことができる。別の一実施形態において、本発明のベクターは、リポフェクション(ネイキッドDNAとして)または他のトランスフェクション促進剤(ペプチド、ポリマー等)により、in vivoで導入することができる。マーカーをコードする遺伝子のin vivoトランスフェクションのためのリボソームを調製するために、合成陽イオン性脂質を用いることができる(Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、84:7413~7417、1987)。核酸移入のための有用な脂質化合物および組成物は、国際公開第95/18863号パンフレットおよび国際公開第96/17823号パンフレットおよび米国特許第5,459,127号明細書に記載されている。脂質は、標的化の目的のために他の分子に化学カップリングすることができる(Mackeyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、85:8027~8031、1988を参照)。ホルモンもしくは神経伝達物質等の標的化されるペプチドおよび抗体等のタンパク質または非ペプチド分子は、化学的にリボソームにカップリングすることができる。陽イオン性オリゴペプチド(国際公開第95/21931号パンフレットを参照)、DNA結合タンパク質に由来するペプチド(国際公開第96/25508号パンフレットを参照)または陽イオン性ポリマー(国際公開第95/21931号パンフレットを参照)等、他の分子も、in vivoにおける核酸のトランスフェクションを容易にするために有用である。ベクターをネイキッドDNAプラスミドとしてin vivoで導入することも可能である。遺伝子治療のためのネイキッドDNAベクターは、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿法、遺伝子銃の使用またはDNAベクター輸送体の使用等、本技術分野において公知の方法により所望の宿主細胞に導入することができる(Wuら、J. Biol. Chem.、267:963~967、1992; Wu and Wu、J. Biol. Chem.、263:14621~14624、1988; Williamsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、88:2726~2730、1991を参照)。

【0299】

本明細書における用語、ポリヌクレオチドを「発現させる」は、ベクターに存在する調

10

20

30

40

50

節配列の刺激(例えば、誘導性プロモーターを活性化する刺激)と、あらゆる必要な構成成分が、ポリヌクレオチドの翻訳が起こるのに十分な量で存在することを意味する。

【0300】

必要であれば、定義されている切断部位を有するプロテアーゼを組換え細胞の上清にまたは組換え細胞内に添加することにより、産生された融合タンパク質からAGT/SNAPポリペプチドを切り離すことができる。例えば、配列番号35または36のpDeSNAP Univカセットを含むベクターが用いられる場合、pro-TEV切断部位ENLKVFQ/G(S)の切断は、組換え細胞の上清にTEVプロテアーゼを添加することにより得られる。あるいは、AGT/SNAPポリペプチドは、SBV由来のNヌクレオプロテインの寿命を増強させるために維持することができる。

【0301】

さらに、当業者であれば、発現または分泌されたタンパク質またはポリペプチドが、本宿主細胞の維持または増殖に用いられる培養培地において検出され得ることを認められよう。培養培地は、遠心分離または濾過等、公知の手順により宿主細胞から分離することができる。続いて、タンパク質またはポリペプチドは、該タンパク質またはポリペプチドに特徴的な公知の性質を利用することにより、無細胞培養培地において検出することができる。係る性質は、タンパク質またはポリペプチドの別個の免疫学的、酵素的または物理的性質を包含し得る。例えば、タンパク質またはポリペプチドが、独自の酵素活性を有する場合、宿主細胞に使用された培養培地において該活性のアッセイを行うことができる。さらに、所定のタンパク質またはポリペプチドに対し反応性の抗体が利用できる場合、係る抗体を用いて、いずれかの公知の免疫学的アッセイ(例えば、Harloweら、1988、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press)においてタンパク質またはポリペプチドを検出することができる。

【0302】

SBV由来のヌクレオプロテインNの回収は、本技術分野において周知の手段により媒介され、この手段の例として、調製用ディスクゲル電気泳動、等電点電気泳動、HPLC、逆相HPLC、ゲル濾過、イオン交換および分配クロマトグラフィー、沈殿および塩析クロマトグラフィー、抽出ならびに向流分配その他等が挙げられるがこれらに限定されない。標識と連結された本発明の組換え系における対象とするタンパク質の産生に好ましいように、前記標識は、適切な固相マトリックスにおけるクロマトグラフィーによる、宿主細胞の粗ライセートからのポリペプチドの回収を容易にするであろう。あるいは、タンパク質またはそれに由来するペプチドに対し作製された抗体は、回収試薬として用いることができる。

【0303】

本発明者らは、本発明の方法により作製された融合タンパク質は一般に、さらに精製される必要がないことを発見した。しかし、必要であれば、さらなる精製工程(g)を行ってもよい。

【0304】

精製された材料は、これが本来関連している筈の細胞構成成分の約50%未満、好ましくは約75%未満、最も好ましくは約90%未満を含有し得る。用語「実質的に純粋」は、本技術分野において公知の従来の精製技法を用いて達成することができる、最も高い程度の純度を指す。

【0305】

本発明の一実施形態において、本発明の方法は、回収された細胞培養物上清において、少なくとも40mg/L、好ましくは少なくとも50mg/L、より好ましくは少なくとも60mg/Lの実質的に純粋なシュマレンベルクウイルス(SBV)のNヌクレオプロテインの獲得を可能にする。

【0306】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC 2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)配列番号16のシュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。

10

20

30

40

50

## 【0307】

この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。

## 【0308】

この融合ポリペプチドは、好ましくは、上に定義されている標識をさらに含む。この標識は、好ましくは、ポリ-ヒスチジン標識であり、好ましくは、シュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインのC末端側に位置する。

## 【0309】

本発明の融合ポリペプチドは、例えば、配列番号41(BiP様/SNAP/SBV.N/Histag融合タンパク質に相当)または配列番号46(ssBiP/SNAP/SBV.N/Histag融合タンパク質に相当)または配列番号42(SNAP/SBV.N融合タンパク質に相当)のアミノ酸配列である。

10

## 【0310】

本発明は、配列番号178のヌクレオチド配列および/または配列番号179のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPUniv-シュマレンベルクNSsタンパク質カセットを含むベクターを網羅する。ベクターは、図24に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはシュマレンベルクウイルス由来のNSsタンパク質、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

## 【0311】

最後に、キメラタンパク質SNAP-SBV.Nは、血液、血清、唾液その他等、生体液におけるシュマレンベルクウイルスによるウイルス感染症の検出または前記ウイルスに特異的な抗体の検出の診断剤として有用となり得る。

20

## 【0312】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば本発明のイムノアッセイの結果、生体試料における前記病原性または非病原性微生物の存在を同定するための、本発明のいずれかの方法により得られる融合タンパク質[SNAP-SBV.N]の使用についても描写する。

## 【0313】

他の態様において、本発明はまた、特に関心のある融合タンパク質を発現するベクターに関し、前記融合タンパク質は、対象とするウイルスまたは細菌抗原、微生物ペプチドおよび/またはポリペプチド等、関心のある抗原とインフレイムで融合した、6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインを含む。このようなベクターを下に詳述する。

30

## 【0314】

## エコーウイルス抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞においてエコーウイルス抗原、例えば、エンテロウイルス71(ピコルナウイルス科(Picornaviridae))のVP1タンパク質を発現させるためのベクターに関する。特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)エンテロウイルス71のVP1タンパク質(EV71、例えば、Kolpe A.B.ら、Virus Research 2012を参照)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

40

## 【0315】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/EV71.VP1カセット」即ち、EV71ウイルス株JL-AFP-EV71-07-03由来のVP1タンパク質をコードする配列番号47の配列(Genebank#JQ715713)が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

## 【0316】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、

50

- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
  - 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
  - EV71ウイルス株JL-AFP-EV71-07-03由来のVP1タンパク質(Genebank#JQ715713)をコードする配列番号47のDNA配列、
  - 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
  - スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
  - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列
- を含む、配列番号48のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/EV71.VP1カセットを含む。

## 【0317】

10

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【0318】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)EV71ウイルス由来のVP1タンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号49のアミノ酸配列である(SNAP様/proTEV1/EV71.VP1/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)。S2/の誘導後に、高レベル(30mg/l)の該タンパク質が産生された。

20

## 【0319】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイにおいて、生体試料におけるエンテロウイルス71の存在を同定するための、この融合タンパク質[SNA P-EV71.VP1]の使用についても描写する。

## 【0320】

フラビウイルス属抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において特定のフラビウイルス属抗原を発現させるためのベクターに関する。

## 【0321】

好ましい一実施形態において、前記フラビウイルス属抗原は、日本脳炎ウイルス由来の可溶性Eタンパク質(sE)である(JEV.sE)。より具体的には、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)日本脳炎ウイルス由来のsEタンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

30

## 【0322】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JEV.sEカセット」、即ち、日本脳炎ウイルス(JEV)由来の可溶性Eタンパク質(sE)をコードする遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

## 【0323】

好ましい一実施形態において、このベクターは、5'から3'にかけて、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- JEV株SA-14由来のprM/M配列をコードするDNA配列(Genbank#M55506)、
- JEV株SA-14由来のE[1-395]配列をコードするDNA配列(Genbank#M55506)、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26のDNA配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号50のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JEV.sEカセットを含む。

40

## 【0324】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

50

## 【0325】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)日本脳炎ウイルス由来の可溶性Eタンパク質(sE)(JEV.sE)とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号51のアミノ酸配列(JEV.sE/SNAP様/Histag融合タンパク質に相当)である。

## 【0326】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料における日本脳炎ウイルス(JEV)の存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-JEV.sE]の使用についても描写する。

10

## 【0327】

好ましい一実施形態において、前記フラビウイルス属抗原は、遺伝子型1(JE-1.EDI11)、遺伝子型2(JE-3.EDI11)、遺伝子型4(JE-4.EDI11)または遺伝子型5(JE-5.EDI11)の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープEタンパク質のドメイン111(EDI11タンパク質)である。

## 【0328】

したがって、別の一態様において、本発明は、宿主細胞において遺伝子型1(JE-1.EDI11)、遺伝子型2(JE-2.EDI11)、遺伝子型4(JE-4.EDI11)または遺伝子型5(JE-5.EDI11)の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープEタンパク質のドメイン111(EDI11タンパク質)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)遺伝子型1(JE-1.EDI11)、遺伝子型2(JE-2.EDI11)、遺伝子型4(JE-4.EDI11)または遺伝子型5(JE-5.EDI11)の日本脳炎ウイルス由来のEDI11タンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

20

## 【0329】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JE-1.EDI11カセット」、即ち、遺伝子型1の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープEタンパク質のドメイン111(EDI11タンパク質)をコードする遺伝子の配列(JE-1.EDI11)が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

30

## 【0330】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号23の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- 遺伝子型1の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープEタンパク質のドメイン111(EDI11タンパク質)をコードする配列番号54のDNA配列(Genebank#AY377577)、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号52のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JE-1.EDI11カセットを含む。

## 【0331】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JE-2.EDI11カセット」、即ち、遺伝子型2の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープEタンパク質のドメイン111(EDI11タンパク質)の配列(JE-2.EDI11)が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

40

## 【0332】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号23の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- 遺伝子型2の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープEタンパク質のドメイン111(EDI11タンパク質)をコードする配列番号55のDNA配列(Genebank#L-43566)、

50

- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列を含む、配列番号59のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JE-2.EDIIIIカセットを含む。

【0333】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JE-4.EDIIIIカセット」、即ち、遺伝子型4の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープタンパク質のドメインIII(EDIIIIタンパク質)の配列(JE-4.EDIIII)が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0334】

好ましい一実施形態において、このベクターは、  
 - 配列番号23の昆虫BiP様配列、  
 - 配列番号31のSNAP様配列、  
 - 遺伝子型4の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープタンパク質のドメインIII(EDIIIIタンパク質)をコードする配列番号56のDNA配列(Genebank#U70408)、  
 - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列を含む、配列番号61のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JE-4.EDIIIIカセットを含む。

10

【0335】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JE-5.EDIIIIカセット」、即ち、遺伝子型5の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープタンパク質のドメインIII(EDIIIIタンパク質)をコードする遺伝子の配列(JE-5.EDIIII)が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

20

【0336】

好ましい一実施形態において、このベクターは、  
 - 配列番号23の昆虫BiP様配列、  
 - 配列番号31のSNAP様配列、  
 - 遺伝子型5の日本脳炎ウイルス由来のエンベロープタンパク質のドメインIII(EDIIIIタンパク質)をコードする配列番号57のDNA配列(Genebank#JN587258)、  
 - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列を含む、配列番号63のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JE-5.EDIIIIカセットを含む。

30

【0337】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0338】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)JE-1、JE-2、JE-4またはJE-5ウイルス由来のEDIIIIタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号53(SNAP様/JE-1.EDIIII/Histag融合タンパク質に相当)、配列番号60(SNAP様/JE-2.EDIIII/Histag融合タンパク質に相当)、配列番号62(SNAP様/JE-4.EDIIII/Histag融合タンパク質に相当)または配列番号64(SNAP様/JE-5.EDIIII/Histag融合タンパク質に相当)のアミノ酸配列である。

40

【0339】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるそれぞれ遺伝子型1、2、4または5の日本脳炎ウイルスの存在を同定するための、これら融合タンパク質[SNAP-JE-1.EDIIII]、[SNAP-JE-2.EDIIII]、[SNAP-JE-4.EDIIII]または[SNAP-JE-5.EDIIII]のいずれかの使用についても描写する。

【0340】

50

別の一態様において、本発明は、宿主細胞においてラーベンスブルクウイルス(RabV)由来のエンベロープEタンパク質のドメインIII(EDIIIタンパク質)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ラーベンスブルクウイルス(RabV)由来のエンベロープEタンパク質のドメインII(EDIIIタンパク質)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0341】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/RabV.EDIIIカセット」、即ち、ラーベンスブルクウイルス由来のEDIIIタンパク質の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

10

【0342】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号23の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- ラーベンスブルクウイルス由来のエンベロープEタンパク質のドメインIII(EDIIIタンパク質)をコードする配列番号58のDNA配列(Genebank#AY65264)、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号65のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/ RabV.EDIIIカセットを含む。

20

【0343】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0344】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ラーベンスブルクウイルス由来のEDIIIタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号66のアミノ酸配列(SNAP様/RabV.EDIII/Histag融合タンパク質に相当)である。

30

【0345】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるラーベンスブルクウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-RabV.EDIII]の使用についても描写する。

【0346】

アルファウイルス抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において特定のアルファウイルス抗原、例えば、ロスリバーウイルス(RR.sE2)由来またはマヤロウイルス(MAY.sE2)由来の可溶性E2タンパク質を発現させるためのベクターに関する。

【0347】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ロスリバーウイルス由来のsE2タンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

40

【0348】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/RR.sE2カセット」、即ち、ロスリバーウイルス由来のsE2遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0349】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

50

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
  - ロスリバーウイルス株QML1のsE2タンパク質をコードするDNA配列(Genebank#GQ433354)、
  - 配列番号31のSNAP様配列、
  - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列
- を含む、配列番号69のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/RR.sE2カセットを含む。

【0350】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0351】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ロスリバーウイルス由来のsE2タンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号70のアミノ酸配列(RR.sE2/SNAP様/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0352】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるロスリバーウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-RR.sE2]の使用についても描写する。

【0353】

本発明は、宿主細胞においてマヤロウイルス由来の可溶性E2タンパク質(MAY.sE2)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)マヤロウイルス由来のsE2タンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについても描写する。

【0354】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/MAY.sE2カセット」、即ち、ロスリバーウイルス由来のsE2遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0355】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- マヤロウイルス株IQD2668の補正されたsE2タンパク質(E2-S203C)をコードするDNA配列(Genbank#DQ487429.1)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号71のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MAY.sE2カセットを含む。

【0356】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0357】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)マヤロウイルス由来のsE2タンパク質(MAY.sE2)とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号72のアミノ酸配列(MAY.sE2/SNAP様/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0358】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生

10

20

30

40

50

体試料におけるマヤロウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-MAY.sE2]の使用についても描写する。

【0359】

ウマ脳炎ウイルス抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において、特定のウマ脳炎ウイルス抗原、例えば、西部ウマ脳炎ウイルス(WEE.sE2)、東部ウマ脳炎ウイルス(EEE.sE2)またはベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEE.sE2)由来の可溶性E2タンパク質を発現させるためのベクターに関する。

【0360】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)西部ウマ脳炎ウイルス由来の可溶性E2タンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

10

【0361】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/WEE.sE2カセット」、即ち、西部ウマ脳炎ウイルス由来のsE2遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0362】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 西部ウマ脳炎ウイルスのsE2タンパク質をコードするDNA配列(Genbank#NC00390808)

20

- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号73のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/WEE.sE2カセットを含む。

【0363】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0364】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)WEEウイルス由来のsE2タンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号74のアミノ酸配列(WEE.sE2/SNAP様/Histag融合タンパク質に相当)である。

30

【0365】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料における西部ウマ脳炎ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-WEE.sE2]の使用についても描写する。

【0366】

別の一実施形態において、本発明は、宿主細胞において東部ウマ脳炎ウイルス由来の可溶性E2タンパク質(EEE.sE2)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)東部ウマ脳炎ウイルス由来の可溶性E2タンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについても描写する。

40

【0367】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/EEE.sE2カセット」、即ち、東部ウマ脳炎ウイルス由来のsE2遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

50

## 【0368】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 東部ウマ脳炎ウイルス由来のsE2タンパク質をコードするDNA配列(Genbank#EF151502)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号75のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/EEE.sE2カセットを含む。

## 【0369】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。 10

## 【0370】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)EEEウイルス由来のsE2タンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号76のアミノ酸配列(EEE.sE2/SNAP様/Histag融合タンパク質に相当)である。

## 【0371】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料における東部ウマ脳炎ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNA P-EEE.sE2]の使用についても描写する。 20

## 【0372】

別の一実施形態において、本発明は、宿主細胞においてベネズエラウマ脳炎ウイルス由来の可溶性E2タンパク質(VEE.sE2)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ベネズエラウマ脳炎ウイルス由来の可溶性E2タンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについても描写する。

## 【0373】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/VEE.sE2カセット」、即ち、ベネズエラウマ脳炎ウイルス由来のsE2遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。 30

## 【0374】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- ベネズエラウマ脳炎ウイルス由来のsE2タンパク質をコードするDNA配列(Genbank#AY973944)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号77のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/VEE.sE2カセットを含む。 40

## 【0375】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【0376】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)VEEウイルス由来のsE2タンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号78の 50

アミノ酸配列(VEE.sE2/SNAP様/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0377】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるベネズエラウマ脳炎ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-VEE.sE2]の使用についても描写する。

【0378】

オルソプニヤウイルス抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において特定のオルソプニヤウイルス抗原、例えば、アカバネ(Akabane)ウイルス(AKA.N)、アイノウイルス(AIN.N)またはシャモンダ(Shamonda)ウイルス(SHA.N)由来のヌクレオプロテインNを発現させるためのベクターに関する。

10

【0379】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)アカバネウイルス由来のヌクレオプロテインNとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0380】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/AKA.Nカセット」、即ち、アカバネウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

20

【0381】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- アカバネウイルスの天然NヌクレオプロテインをコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

30

を含む、配列番号79のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/AKA.Nカセットを含む。

【0382】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0383】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)アカバネウイルス由来のNヌクレオプロテインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号80のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/AKA.N/pro-TEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

40

【0384】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるアカバネウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-AKA.N]の使用についても描写する。

【0385】

別の一実施形態において、本発明は、宿主細胞においてアイノ(Aino)ウイルス由来のヌクレオプロテインN(AIN.N)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェ

50

ラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)アイノウイルス由来のヌクレオプロテインNとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0386】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/AIN.Nカセット」、即ち、アイノウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0387】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペースー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- アイノウイルスの天然NヌクレオプロテインをコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペースー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号81のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/AIN.Nカセットを含む。

【0388】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0389】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)アイノウイルス由来のNヌクレオプロテインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号82のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/AIN.N/pro-TEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0390】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるアイノウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-AIN.N]の使用についても描写する。

【0391】

別の一実施形態において、本発明は、宿主細胞においてシャモンダウイルス由来のヌクレオプロテインN(SHA.N)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)シャモンダウイルス由来のヌクレオプロテインNとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0392】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/SHA.Nカセット」、即ち、シャモンダウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0393】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペースー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- シャモンダウイルスの天然NヌクレオプロテインをコードするDNA配列、

- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号83のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/SHA.Nカセットを含む。

【0394】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0395】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)シャモンダウイルス由来のNヌクレオプロテインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号84のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/SHA.N/pro-TEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0396】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるシャモンダウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-SHA.N]の使用についても描写する。

【0397】

ベータコロナウイルス(Betacoronavirus)抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において特定のベータコロナウイルス抗原、例えば、ヒトベータコロナウイルス由来のヌクレオプロテインN(huCOV.N)またはヒトベータコロナウイルスのプロテインS(huCOV.S)を発現させるためのベクターに関する。

【0398】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ヒトベータコロナウイルス由来のヌクレオプロテインNとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0399】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/huCOV.Nカセット」、即ち、ヒトベータコロナウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0400】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- ヒトベータコロナウイルス2cEMC/2012由来の遺伝子NをコードするDNA配列(Genbank#

JX869059)、

- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号85のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/huCOV.Nカセットを含む。

【0401】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0402】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ヒトベータコロナウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融

10

20

30

40

50

合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号86のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/huCOV.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0403】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるヒトベータコロナウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-huCOV.N]の使用についても描写する。

【0404】

別の一実施形態において、本発明は、宿主細胞においてヒトベータコロナウイルス由来の可溶性型スパイクSタンパク質(huCOV.S)を発現させるためのベクターであって、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ヒトベータコロナウイルス由来の可溶性型スパイクSタンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0405】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/huCOV.Sカセット」、即ち、ヒトベータコロナウイルス由来の遺伝子Sの配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0406】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- ヒトベータコロナウイルス2cEMC/2012由来の遺伝子SをコードするDNA配列(Genbank# JX869059)、
- スパーサー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26のDNA配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号87のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/huCOV.Sカセットを含む。

【0407】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号154のヌクレオチド配列および/または配列番号155のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPUniv-SARSウイルスNタンパク質カセットを含む。ベクターは、図12に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはSARSコロナウイルス由来の変異タンパク質、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

【0408】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号156のヌクレオチド配列および/または配列番号157のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAP+SARS S-RDBカセットを含む。ベクターは、図13に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはSARSウイルスのSタンパク質由来の受容体結合ドメイン、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

【0409】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号158のヌクレオチド配列および/または配列番号159のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPUniv-huCOV.N(ヒトコロナウイルス)カセットを含む。ベクターは、図14に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはヒトベータコロナウイルス由来の遺伝子N、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

【0410】

10

20

30

40

50

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号160のヌクレオチド配列および/または配列番号161のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有する-huCOV.S1+DeSNAP(ヒトコロナウイルス)カセットを含む。ベクターは、図15に描写されているキメラタンパク質のシグナルペプチド、SNAP配列もしくはヒトベータコロナウイルス由来の遺伝子S1、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

【0411】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号162のヌクレオチド配列および/または配列番号163のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-huCoV.S-RDBカセットを含む。ベクターは、図16に描写されているキメラタンパク質のシグナルペ  
10  
プチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはヒトベータコロナウイルスのSタンパク質由来のRBD、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

【0412】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0413】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ヒトベータコロナウ  
20  
イルス由来の可溶性型スパイクSタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号88のアミノ酸配列(huCoV.S/SNAP様/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0414】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるヒトベータコロナウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-huCoV.S]の使用についても描写する。

【0415】

ヘパシウイルス抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において特定のヘパシウイルス抗原、例えば、C型肝炎ウイルス由来(HCV.C)またはE型肝炎ウイルス(HEV.C)由来のプロテインCを発現させるためのベクターに関する。

【0416】

一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)C型肝炎ウイルス由来のプロテインCとをコードするヌクレ  
40  
オチド配列を含むベクターに関する。

【0417】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/HCV.Cカセット」、即ち、C型肝炎ウイルス由来のプロテインCの遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0418】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペーサー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- C型肝炎ウイルス遺伝子型1b(株TCHM-R2/03)由来のCタンパク質をコードするDNA配列

10

20

30

40

50

- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号89のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/HCV.Cカセットを含む。

【0419】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号170のヌクレオチド配列および/または配列番号171のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-HEV.Cカセットを含む。ベクターは、図20に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはE型肝炎ウイルス由来の変異Cタンパク質、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

10

【0420】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号172のヌクレオチド配列および/または配列番号173のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-HEV.Cタンパク質中心ドメインカセットを含む。ベクターは、図21に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはHEVコア抗原、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

【0421】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号174のヌクレオチド配列および/または配列番号175のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-HCVコア抗原カセットを含む。ベクターは、図22に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはHCVコア抗原、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

20

【0422】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号176のヌクレオチド配列および/または配列番号177のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-短HCVコア(C)カセットを含む。ベクターは、図23に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはHCVコアタンパク質の短縮型、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

30

【0423】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0424】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)C型肝炎ウイルス由来のタンパク質C(HCV.C)とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号90のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/HCV.C/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

40

【0425】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるC型肝炎ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-HCV.C]の使用についても描写する。

【0426】

別の実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体

50

、断片または触媒ドメインと、c)E型肝炎ウイルス由来のプロテインC(HEV.C)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0427】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/HEV.Cカセット」、即ち、E型肝炎ウイルス由来のプロテインCの遺伝子の配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0428】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号23の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- E型肝炎ウイルス(Genbank#AB29196)由来のCタンパク質をコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号150のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/HEV.Cカセットを含む。

【0429】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0430】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)E型肝炎ウイルス由来のプロテインC(HEV.C)とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号151のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/HEV.C/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0431】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるE型肝炎ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-HEV.C]の使用についても描写する。

【0432】

マラリア抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において特定のマラリア抗原、例えば、熱帯熱マラリア原虫由来のMSP-1およびAMA-1タンパク質(MSP-1+AMA-1)(Pan W.ら、The Journal of Immunology、2004を参照)を発現させるためのベクターについて描写する。

【0433】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)寄生虫熱帯熱マラリア原虫由来のMSP-1およびAMA-1タンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0434】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/MSP-1+AMA-1カセット」、即ち、寄生虫熱帯熱マラリア原虫由来のMSP-1およびAMA-1タンパク質をコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0435】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、

- 熱帯熱マラリア原虫由来のMSP-1(19)配列(50%G+C)をコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- 熱帯熱マラリア原虫由来のAMA-1(III)配列(50%G+C)をコードするDNA配列、
- スペーサー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号91のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MSP-1+AMA-1カセットを含む。

【0436】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

10

【0437】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)熱帯熱マラリア原虫由来のMSP-1+AMA-1タンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号92のアミノ酸配列(SNAP様/MSP-1/proTEV2/AMA-1/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0438】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料における寄生虫熱帯熱マラリア原虫の存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-MSP-1+AMA-1]の使用についても描写する。

20

【0439】

レプトスピラ症抗原

別の一態様において、本発明は、宿主細胞においてレプトスピラ属(*Leptospira*)細菌のHbpA、LruA、LruBまたはLipI32タンパク質(Sivakolundu S.ら、*Journal of Medical Microbiology*、2012を参照)等、特定のレプトスピラ症抗原を発現させるためのベクターについて描写する。好ましいベクターは、SNAP-Lru AおよびSNAP-Lru Bである。これらのベクターを含有するS2細胞株が特に好ましい。S2/SNAP-Lru AおよびS2/SNAP-Lru B細胞株は、2013年5月2日に国立微生物培養物コレクション(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)(CNCM)(25、Rue du Docteur Roux、75724 Paris Cedex 15、フランス)に、それぞれCNCM I-4745およびCNCM I-4746の番号で寄託した。

30

【0440】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)レプトスピラ・インテロガンズ細菌由来のHbpAタンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0441】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/HbpAカセット」、即ち、レプトスピラ属細菌由来のHbpAタンパク質をコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

40

【0442】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペーサー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- レプトスピラ・インテロガンズ血清型Lai str.56601由来のHbpAの改変された短縮型(TonB依存性外膜受容体またはLB191)をコードするDNA配列(Genbank#AA51750.1)、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、

50

- スペーサー配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号93のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/HbpAカセットを含む。

【0443】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号164のヌクレオチド配列および/または配列番号165のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-shortLruA(レプトスピラ症)カセットを含む。ベクターは、図17に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはLruAの修飾された短縮型、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

10

【0444】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号166のヌクレオチド配列および/または配列番号167のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-短LruB(レプトスピラ症)カセットを含む。ベクターは、図18に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはLruBの修飾された短縮型、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

【0445】

別の一実施形態において、ベクターは、配列番号168のヌクレオチド配列および/または配列番号169のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を有するDeSNAPuniv-LipL32(レプトスピラ症)カセットを含む。ベクターは、図19に描写されているSNAPのシグナルペプチド、SNAP配列、pro-TEV部位もしくはLipL32の修飾された短縮型、またはその少なくとも10、15、20、25、30、40、50、60、100、200もしくは300個の連続的なアミノ酸をコードするDNA配列を、単独でまたは組み合わせて含むことができる。

20

【0446】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0447】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)レプトスピラ・インテロガンズ細菌由来のHbpAタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号94のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/HbpA/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

30

【0448】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるレプトスピラ属細菌の存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-HbpA]の使用についても描写する。

【0449】

微生物ペプチド

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において微生物ペプチド、例えば、微生物ペプチドMUB-40を発現させるためのベクターについて描写する。

40

【0450】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)MUB-40ペプチドとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0451】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/MUB40カセット」

50

、即ち、MUB40ペプチドをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0452】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- MUB-40ペプチドをコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

10

を含む、配列番号95のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MUB40カセットを含む。

【0453】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0454】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)MUB40ペプチドとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号96のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/MUB40/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

20

【0455】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるリガンドの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-MUB40]の使用についても描写する。

【0456】

フラビウイルス属(Flavivirus)病原性に関するレクチン

別の一態様において、本発明は、宿主細胞においてフラビウイルス属病原性に関する特定のレクチン、例えば、マウスまたはヒト可溶性型C型様レクチン(CLEC5A)を発現させるためのベクターについて描写する。

30

【0457】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)マウスCLEC5A(mo-CLEC5A)またはヒトCLEC5A(hu-CLEC5A)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0458】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/mo-CLEC5Aカセット」、即ち、マウス可溶性型C型様レクチンをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

40

【0459】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- マウス可溶性型C型様レクチン(CLEC5A)をコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

50

を含む、配列番号97のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/mo-CLEC5Aカセットを含む。

【0460】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0461】

別の好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/hu-CLEC5Aカセット」、即ち、ヒト可溶性型C型様レクチンをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0462】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- ヒト可溶性型C型様レクチン(CLEC5A)をコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号99のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/hu-CLEC5Aカセットを含む。

【0463】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0464】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)マウスまたはヒト可溶性型C型様レクチン(CLEC5A)とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号98のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/mo-CLEC5A/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)または配列番号100のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/hu-CLEC5A/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0465】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるフラビウイルス属の存在を検出するための、この融合タンパク質[SNAP-mo-CLEC5A]または[SNAP-hu-CLEC5A]の使用についても描写する。

【0466】

抗フラビウイルス性蚊タンパク質

別の一態様において、本発明は、宿主細胞において特定の抗ウイルス性蚊タンパク質、例えば、イエカ属(*Culex*)の種(cxVAGO)またはヤブカ属(*Aedes*)の種(aaVAGO)由来のVAGOタンパク質を発現させるためのベクターについて描写する。

【0467】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ヒトスジシマカ(*Aedes albopictus*)の蚊由来のVAGOタンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0468】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/aaVAGOカセット」、即ち、ヒトスジシマカの蚊由来のVAGOタンパク質をコードする配列が挿入された、上

10

20

30

40

50

に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0469】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号152の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- ヒトスジシマカの蚊由来のVAGOタンパク質をコードするDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号103のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/aaVAGOカセットを含む。

【0470】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0471】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ヒトスジシマカの蚊由来のVAGOタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号104のアミノ酸配列(SNAP様/aaVAGO/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0472】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるリガンドの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-aaVAGO]の使用についても描写する。

【0473】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ネッタイエカ(*Culex quinquefasciatus*)の蚊由来のVAGOタンパク質とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0474】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/cxVAGOカセット」、即ち、ネッタイエカの蚊由来のVAGOタンパク質をコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0475】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号152の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26のDNA配列、
- ネッタイエカの蚊由来のVAGOタンパク質をコードするDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号101のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/cxVAGOカセットを含む。

【0476】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0477】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ネッタイエカの蚊由来のVAGOタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号102のアミノ酸配列(SNAP様/cxVAGO/Histag融合タンパク質に相当)である。

10

20

30

40

50

## 【0478】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるリガンドの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-cxVAGO]の使用についても描写する。

## 【0479】

ウイルス性出血熱(Hemorrhagic fever)抗原

別の一態様において、本発明は、

- クリミア・コンゴウイルス(CCHF.N)、エボラウイルス(EBO.N)、マールブルグウイルス(MAR.N)、ラッサ熱ウイルス(LAS.N)、フニンウイルス(JUN.N)、マチュポウイルス(MAC.N)、サビアウイルス(SAB.N)またはグアナリトウイルス(GUA.N)由来のヌクレオプロテインN、

- ラッサ熱ウイルス(LAS.ectoGP1)、フニンウイルス(JUN.ectoGP1)、マチュポウイルス(MAC.ectoGP1)、サビアウイルス(SAB.ectoGP1)またはグアナリトウイルス(GUA.ectoGP1)由来のGP1の外部ドメイン、

- ラッサ熱ウイルス(LAS.ectoGP2)、フニンウイルス(JUN.ectoGP2)、マチュポウイルス(MAC.ectoGP2)、サビアウイルス(SAB.ectoGP2)またはグアナリトウイルス(GUA.ectoGP2)由来のGP2の外部ドメイン、

- オムスクウイルス(OMSK.EDIII)、キャサヌール(Kasyanur)ウイルス(KAS.EDIII)またはAlkhurmaウイルス(ALK.EDIII)由来のエンベロープEタンパク質のドメインIII

等、特定のウイルス性出血熱抗原を発現させるためのベクターについて描写する。

## 【0480】

特に、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)クリミア・コンゴウイルス(CCHF.N)由来のヌクレオプロテインNとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

## 【0481】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/CCHF.Nカセット」、即ち、クリミア・コンゴウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

## 【0482】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- クリミア・コンゴウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号108のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/CCHF.Nカセットを含む。

## 【0483】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【0484】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)クリミア・コンゴウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号109のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/CCHF.N/proTEV2/Histag融合タンパク

質に相当)である。

【0485】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるクリミア・コンゴウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-CCHF.N]の使用についても描写する。

【0486】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)エボラウイルス由来のヌクレオプロテインN(EBO.N)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0487】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/EBO.Nカセット」、即ち、エボラウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0488】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
  - 配列番号31のSNAP様配列、
  - スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
  - 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
  - エボラウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列(Genbank#NC\_002549)、
  - 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
  - スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
  - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列
- を含む、配列番号110のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/EBO.Nカセットを含む。

【0489】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0490】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)エボラウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号111のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/EBO.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0491】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるエボラウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-EBO.N]の使用についても描写する。

【0492】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)マールブルグウイルス(MAR.N)由来のヌクレオプロテインNとをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0493】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/MAR.Nカセット」、即ち、マールブルグウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

## 【0494】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- マールブルグウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列(Genbank#NC\_001608)、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号112のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MAR.Nカセットを含む。

## 【0495】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【0496】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)マールブルグウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号113のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/MAR.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

## 【0497】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるマールブルグウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNA P-MAR.N]の使用についても描写する。

## 【0498】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ラッサ熱ウイルス由来のヌクレオプロテインN(LAS.N)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

## 【0499】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/LAS.Nカセット」、即ち、ラッサ熱ウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

## 【0500】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- ラッサ熱ウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列(Genbank#NC\_004296)、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号114のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/LAS.Nカセットを含む。

## 【0501】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた

組換え細胞に関する。

【0502】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ラッサ熱ウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号115のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/LAS.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0503】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるラッサ熱ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-LAS.N]の使用についても描写する。

【0504】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)フニンウイルス由来のヌクレオプロテインN(JUN.N)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0505】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JUN.Nカセット」、即ち、フニンウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0506】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- フニンウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列(Genbank#NC\_00508

1)、

- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号116のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JUN.Nカセットを含む。

【0507】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0508】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)フニンウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号117のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/JUN.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0509】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるフニンウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-JUN.N]の使用についても描写する。

【0510】

10

20

30

40

50

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)マチュポウイルス由来のヌクレオプロテインN(MAC.N)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0511】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/MAC.Nカセット」、即ち、マチュポウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0512】

好ましい一実施形態において、このベクターは、10

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- マチュポウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列(Genbank#NC\_005078)、
- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号118のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MAC.Nカセットを含む。20

【0513】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0514】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)マチュポウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号119のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/MAC.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。30

【0515】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるマチュポウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-MAC.N]の使用についても描写する。

【0516】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)グアナリトウイルス由来のヌクレオプロテインN(GUA.N)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。40

【0517】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/GUA.Nカセット」、即ち、グアナリトウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0518】

好ましい一実施形態において、このベクターは、50

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、

- グアナリトウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列(Genbank#NC\_05077)、

- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号120のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/GUA.Nカセットを含む。

【0519】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0520】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)グアナリトウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号121のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/GUA.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0521】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるグアナリトウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-GUA.N]の使用についても描写する。

【0522】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)サビアウイルス由来のヌクレオプロテインN(SAB.N)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターに関する。

【0523】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/SAB.Nカセット」、即ち、サビアウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0524】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、
- サビアウイルス由来のヌクレオプロテインNをコードするDNA配列(Genbank#NC\_006317)、

7)、

- 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第2のDNA配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号122のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/SAB.Nカセットを含む。

【0525】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0526】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)サビアウイルス由来のヌクレオプロテインNとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ

10

20

30

40

50

(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号123のアミノ酸配列(SNAP様/proTEV1/SAB.N/proTEV2/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0527】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるサビアウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-SAB.N]の使用についても描写する。

【0528】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)オムスクウイルス由来のエンベロープ(Envelop)タンパク質EのドメインIII(OMSK.EDIIII)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

10

【0529】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/OMSK.EDIIIIカセット」、即ち、オムスクウイルス由来のEDIIIIタンパク質をコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0530】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号152の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- オムスクウイルス由来のEDIIIIタンパク質をコードするDNA配列(Genbank#NC\_005062)

、

- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号124のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/OMSK.EDIIIIカセットを含む。

20

【0531】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0532】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)オムスクウイルス由来のEDIIIIタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号125のアミノ酸配列(SNAP様/OMSK.EDIIII/Histag融合タンパク質に相当)である。

30

【0533】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるオムスクウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-OMSK.EDIIII]の使用についても描写する。

40

【0534】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)キャサヌール森林病ウイルス由来のエンベロープタンパク質EのドメインIII(KYA.EDIIII)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0535】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/KYA.EDIIIIカセット」、即ち、キャサヌール森林病ウイルス由来のEDIIIIタンパク質をコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

50

## 【0536】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号152の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- キャサヌール森林病ウイルス由来のEDIIIタンパク質をコードするDNA配列 (Genbank# JF416958)、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号126のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/KYA.EDIIIカセットを含む。

## 【0537】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【0538】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)キャサヌール森林病ウイルス由来のEDIIIタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ (前記ホモログは、上に定義されている) である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号127のアミノ酸配列 (SNAP様/KYA.EDIII/Histag融合タンパク質に相当) である。

## 【0539】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるキャサヌール森林病ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質 [SNAP-KYA.EDIII] の使用についても描写する。

## 【0540】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)Alkhurmaウイルス由来のエンベロープタンパク質EのドメインIII (ALK.EDIII) とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

## 【0541】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/ALK.EDIIIカセット」、即ち、Alkhurmaウイルス由来のEDIIIタンパク質をコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

## 【0542】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号152の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- Alkhurmaウイルス由来のEDIIIタンパク質をコードするDNA配列 (Genbank#NC\_004355)
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号128のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/ALK.EDIIIカセットを含む。

## 【0543】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【0544】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)Alkhurmaウイルス由来のEDIIIタンパク質とを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号129のアミノ酸配列(SNAP様/ALK.EDIII/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0545】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるAlkhurmaウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-ALK.EDIII]の使用についても描写する。

【0546】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメイン(LAS.ectoGP1)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0547】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/LAS.ectoGP1カセット」、即ち、ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0548】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードするDNA配列(Genbank#NC\_004296)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号130のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/LAS.ectoGP1カセットを含む。

【0549】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0550】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号131のアミノ酸配列(SNAP様/LAS.ectoGP1/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0551】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるラッサ熱ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-LAS.ectoGP1]の使用についても描写する。

【0552】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)フニンウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメイン(JUN.ectoGP1)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0553】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JUN.ectoGP1カセット」、即ち、フニンウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0554】

10

20

30

40

50

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- フニンウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードするDNA配列 (Genbank# NC\_005081)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号132のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JUN.ectoGP1カセットを含む。

【0555】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

10

【0556】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)フニンウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ (前記ホモログは、上に定義されている) である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号133のアミノ酸配列 (SNAP様/JUN.ectoGP1/Histag融合タンパク質に相当) である。

【0557】

20

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるフニンウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質 [SNAP-JUN.ectoGP1] の使用についても描写する。

【0558】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメイン (MAC.ectoGP1) とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0559】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/MAC.ectoGP1カセット」、即ち、マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

30

【0560】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードするDNA配列 (Genbank#NC\_005078)、
- 配列番号31のSNAP様配列、ならびに
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号134のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MAC.ectoGP1カセットを含む。

40

【0561】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0562】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ (前記ホモログは、上に定義されている) である。この融合ポリペプチドは、例

50

えば、配列番号135のアミノ酸配列(SNAP様/MAC.ectoGP1/Histag融合タンパク質に相当)である。

【0563】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるマチュポウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-MAC.ectoGP1]の使用についても描写する。

【0564】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメイン(GUA.ectoGP1)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

10

【0565】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/GUA.ectoGP1カセット」、即ち、グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0566】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードするDNA配列(Genbank#NC\_005077)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

20

を含む、配列番号136のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/GUA.ectoGP1カセットを含む。

【0567】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0568】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号137のアミノ酸配列(SNAP様/GUA.ectoGP1/Histag融合タンパク質に相当)である。

30

【0569】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるグアナリトウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-GUA.ectoGP1]の使用についても描写する。

【0570】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)サビアウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメイン(SAB.ectoGP1)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

40

【0571】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/SAB.ectoGP1カセット」、即ち、サビアウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0572】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

50

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインをコードするDNA配列 (Genbank#NC\_006317)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号138のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/SAB.ectoGP1カセットを含む。

## 【0573】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

10

## 【0574】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)サビアウイルス由来の糖タンパク質GP1外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ (前記ホモログは、上に定義されている) である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号139のアミノ酸配列 (SNAP様/SAB.ectoGP1/Histag融合タンパク質に相当) である。

## 【0575】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるサビアウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質 [SNAP-SAB.ectoGP1] の使用についても描写する。

20

## 【0576】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメイン (LAS.ectoGP2) とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

## 【0577】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/LAS.ectoGP2カセット」、即ち、ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

30

## 【0578】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードするDNA配列 (Genbank#NC\_004296)、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号140のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/LAS.ectoGP2カセットを含む。

40

## 【0579】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【0580】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)ラッサ熱ウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ (前記ホモログは、上に定義されている) である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号141のアミノ酸配列 (SNAP様/LAS.ectoGP2/Histag融合タンパク質に相当) で

50

ある。

【0581】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるラッサ熱ウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-LA S.ectoGP2]の使用についても描写する。

【0582】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)フニンウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメイン(JUN.ectoGP2)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

10

【0583】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/JUN.ectoGP2カセット」、即ち、フニンウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0584】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
  - フニンウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードするDNA配列(Genbank# NC\_005081)、
  - 配列番号31のSNAP様配列、
  - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列
- を含む、配列番号142のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/JUN.ectoGP2カセットを含む。

20

【0585】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0586】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)フニンウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号143のアミノ酸配列(SNAP様/JUN.ectoGP2/Histag融合タンパク質に相当)である。

30

【0587】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるフニンウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-JUN.ectoGP2]の使用についても描写する。

【0588】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメイン(MAC.ectoGP2)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

40

【0589】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/MAC.ectoGP2カセット」、即ち、マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0590】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、

50

- マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードするDNA配列 (Genbank#NC\_005078)、

- 配列番号31のSNAP様配列、ならびに

- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号144のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MAC.ectoGP2カセットを含む。

【0591】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0592】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)マチュポウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ (前記ホモログは、上に定義されている) である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号145のアミノ酸配列 (SNAP様/MAC.ectoGP2/Histag融合タンパク質に相当) である。

【0593】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるマチュポウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質 [SNAP-MA C.ectoGP2] の使用についても描写する。

【0594】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメイン (GUA.ectoGP2) とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

【0595】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/GUA.ectoGP2カセット」、即ち、グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

【0596】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、

- グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードするDNA配列 (Genbank#NC\_005077)、

- 配列番号31のSNAP様配列、

- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号146のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/GUA.ectoGP2カセットを含む。

【0597】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

【0598】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素 (AGT) (EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)グアナリトウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ (前記ホモログは、上に定義されている) である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号147のアミノ酸配列 (SNAP様/GUA.ectoGP2/Histag融合タンパク質に相当) である。

10

20

30

40

50

## 【 0 5 9 9 】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるグアナリトウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-GUA.ectoGP2]の使用についても描写する。

## 【 0 6 0 0 】

別の一実施形態において、本発明は、a)前記宿主細胞において機能的な分泌シグナルペプチドと、b)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)、その変異体、断片または触媒ドメインと、c)サビアウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメイン(SAB.ectoGP2)とをコードするヌクレオチド配列を含むベクターについて描写する。

## 【 0 6 0 1 】

好ましい一実施形態において、このベクターは、所謂「pDeSNAP Univ/SAB.ectoGP2カセット」、即ち、サビアウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードする配列が挿入された、上に定義されているpDeSNAPUniv DNAカセットを含む。

## 【 0 6 0 2 】

好ましい一実施形態において、このベクターは、

- 配列番号22の昆虫BiP配列、
- サビアウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインをコードするDNA配列(Genbank#

NC\_006317)、

- 配列番号31のSNAP様配列、
- HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列

を含む、配列番号148のヌクレオチド配列を有するpDeSNAP Univ/MAC.ectoGP2カセットを含む。

## 【 0 6 0 3 】

別の一態様において、本発明は、前記ベクターにより安定的にトランスフェクトされた組換え細胞に関する。

## 【 0 6 0 4 】

別の一態様において、本発明は、a)6-アルキルグアニン-DNA-アルキルトランスフェラーゼ酵素(AGT)(EC2.1.1.63)、その変異体または触媒ドメインと、b)サビアウイルス由来の糖タンパク質GP2外部ドメインとを含む融合ポリペプチドについて描写する。この融合ポリペプチドにおいて、前記AGT酵素は、好ましくは、配列番号2のタンパク質またはそのホモログ(前記ホモログは、上に定義されている)である。この融合ポリペプチドは、例えば、配列番号149のアミノ酸配列(SNAP様/SAB.ectoGP2/Histag融合タンパク質に相当)である。

## 【 0 6 0 5 】

よって、別の一態様において、本発明は、例えば、本発明のイムノアッセイの結果、生体試料におけるサビアウイルスの存在を同定するための、この融合タンパク質[SNAP-SAB.ectoGP2]の使用についても描写する。

## 【 0 6 0 6 】

(実施例)

本発明の文脈において、生体液におけるアルポウイルスに対する抗体の迅速な同時検出のための、マルチプレックスビーズに基づくイムノアッセイを開発した。

## 【 0 6 0 7 】

本システムは、xMAP技術(Luminex corporation)に基づき、特異的ヒト免疫グロブリンの捕捉試薬として、抗原コーティングされたマイクロスフェアの混合物を用いる。マイクロスフェア(Magplex, Luminex corporation)の別個のセットを、精製AGT融合タンパク質、即ち、SNAPをタグ付けしたウイルス組換えタンパク質: sSNAP-DV1.EDI11、sSNAP-DV2.EDI11、sSNAP-DV3.EDI11、sSNAP-DV4.EDI11、sSNAP-WN.EDI11、sSNAP-JE.EDI11、sSNAP-US.EDI11、sSNAP-TBE.EDI11、sSNAP-YF.EDI11、sSNAP-MVE.EDI11、sSNAP-Rocio.EDI11、sSNAP-WSL.EDI11、sSNAP-ZIKA.EDI11、SNAP-DV1ectoM、sSNAP-N.RVF、sSNAP-N.TOS、およびCHIK.sE2-SNAPとカップリングした。組換え抗原を、リンカーとしてAGTタンパク質の基質

10

20

30

40

50

(BG-PEG-NH<sub>2</sub>, New England Biolabs)を用いてカルボキシルマイクロスフェア表面と共有結合によりカップリングし、これにより、標準的なアミンカップリング手順と比較して抗体捕捉効率を増強させた。

【0608】

抗SNAP-タグ抗体および特異的マウスモノクローナル抗体を用いた技術的な検証は、カップリング効率を確認し、長期抗原安定性(最大6ヶ月)を実証した。いかなるペプチドまたはポリペプチドをビーズコーティングおよびその後の抗体捕捉に用いてもよい。本願はウイルス抗原に限定されない。

【0609】

## 1. 材料と方法

10

1. 次のバッファーおよび溶液を用いる:

a) PBSバッファー: 1LのH<sub>2</sub>O滅菌における100mLの10×PBS、pH7.4

b) SNAPカップリングバッファー (PBS-DTT): 1LのH<sub>2</sub>O滅菌における100mLの10×PBS、pH7.4、0.5mLの10% tween 20、1mLの1.0M DTT

c) ブロッキング/アッセイバッファー (PBS-B): 1LのH<sub>2</sub>O滅菌におけるPBS、1%BSA、pH7.4

d) 貯蔵バッファー (PBS-TBN): 1LのH<sub>2</sub>O滅菌における100mLの10×PBS、1gのBSA、2mLの10% tween 20、500mgのアジ化ナトリウム、1mLの1.0M DTT

e) 基質溶液 (4mg/mL): 2mgのBG-PEG-NH<sub>2</sub>、DMSO 200 μL

f) 活性化溶液 (EDAC/SNHS): 蒸留水における50mg/mLのEDAC溶液または50mg/mLのSNHS

【0610】

20

2. 次の材料を用いた:

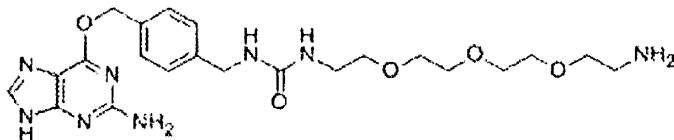
2.1. MagPlex Luminexマイクロスフェア: MC 100XX-ID (XXは蛍光領域である)、XXは、例えば、図7Bにおいて言及されている通り、26、27、28、29、34、35、36、37、45、52、53、63、64となり得る。

【0611】

2.2. hAGT基質: PEG-BG-NH<sub>2</sub> (NEB S9150S)

【0612】

【化4】



30

【0613】

2.3. 融合タンパク質SNAP-ウイルスEDIII:

AGTとウイルスEDIII部分とを含む融合タンパク質の作製は、当業者にとって周知のものである。AGT酵素が融合タンパク質において活性を維持するのであれば、この目的のためにいかなる公知の合成過程を用いてもよい。

【0614】

本事例において、配列番号2のAGT変異体SNAPを用いて、SNAP-ウイルスEDIII融合タンパク質を作製した。

40

【0615】

非脊椎動物細胞におけるフラビウイルス属由来の個々のEDIIIの大量生産のために、シヨウジョウバエS2誘導性発現系 (DES、Invitrogen) を選び、Invitrogen製のプラスミドpMT/BiP/V5-HisAを用いた。

【0616】

このプラスミドは、次のものを含有する:

- メタロチオネインプロモーターpMT、
- 配列番号22の昆虫ssBiP配列、
- BglIIおよびAgeI制限部位、

50

- AgeI制限部位の下流に位置するHis<sub>6</sub>タグをコードする配列番号28のDNA、および
- AgeI制限部位とHis<sub>6</sub>タグをコードするDNAとの間に位置する配列番号26のDNAスペーサー配列。

## 【0617】

フラビウイルス属WN、USU、JE、TBE、DEN-1からDEN-4、YF、ロシオ、MVE、ジカ、SLEおよびWSL由来のEタンパク質の全長ドメインIIIをコードする合成遺伝子を、配列番号3から配列番号14に収載する。ED IIIアミノ酸配列をSNAPタンパク質のC末端へと、両部分をリンカーGGGS(配列番号25)により離間させつつインフレームで融合させた。SNAP-EDIIIをコードするDNA配列をプラスミドpMT/BiP/V5-Histag(Invitrogen)に挿入して、プラスミドpMT/BiP/SNAP/EDIII/Histagを作製した。

10

## 【0618】

分泌型SNAP-EDIII-His<sub>6</sub>融合タンパク質の発現を駆動する、得られたプラスミドpMT/BiP/SNAP-EDIII-Histagを、選択マーカーpCo-Blastと共にS2細胞へとコトランスフェクトして、プラスミドサイジンに対し抵抗性を示す安定的なS2/sSNAP-ED III-Histag細胞株を作製した。

## 【0619】

スピナ(1000ml)において増殖させた安定的なS2細胞株を、重金属カドミウム(Cd<sup>2+</sup>)で10日間刺激し、細胞外培地から得られたタンパク質を濃縮し精製した。

## 【0620】

重金属カドミウムによる誘導10日後に、安定的なS2/sSNAP-EDIII-Histag細胞の上清において、分泌されたSNAPタグ付きEDIIIタンパク質の蓄積が観察された。

20

## 【0621】

これに従って、タンパク質配列番号21のSNAP-DEN1.EDIII、配列番号XのSNAP-DEN2.EDIII、配列番号XのSNAP-DEN3.EDIII、配列番号XのSNAP-DEN4.EDIII、配列番号XのSNAP-WN.EDIII、配列番号XのSNAP-JE.EDIII、配列番号XのSNAP-YF.EDIII、配列番号XのSNAP-MVE.EDIII、配列番号XのSNAP-Rocio.EDIII、配列番号XのSNAP-WSL.EDIII、配列番号XのSNAP-ZIKA.EDIII、配列番号XのSNAP-SLE.EDIIIを産生させた。

## 【0622】

## 3. 抗原カップリングされたビーズの調製

抗原カップリングされたビーズの作製は、二段階からなった:O<sup>6</sup>-ベンジルグアニン誘導体(BG-PEG-アミノ)によるマイクロスフェア表面の官能化と、アンカーとしてBG-PEG-アミノを用いたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質の共有結合による固定化(図1)。カルボキシルマイクロスフェア表面を、最適化された二段階カルボジイミド過程を用いてBG-PEG-アミノ基質で共有結合によりコーティングした(Wongら、Journal of Clinical Microbiology 42(1):65~72、2004)。続いて、ベンジル基をSNAPタンパク質の活性部位システインへと転移することにより、カップリングされたBG-PEG-アミノ化合物をキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質へと不可逆的に連結した。この反応の高い特異性により、融合タンパク質は、抗体との相互作用のためにウイルス抗原を到達可能なまま維持しつつ、SNAPドメインを介して排他的にカップリングされる。

30

## 【0623】

3.1. 先ず、製造業者の説明書通りに(EDACおよびSNHS活性化溶液を用いることにより)市販のビーズを活性化させ、PBSバッファー中で洗浄した。製造業者の説明書に従い、ビーズの蛍光消光を防ぐために、全工程を暗所で行った。

40

## 【0624】

カップリング過程毎に約 $1.25 \times 10^6$ 個のビーズを用いた。

## 【0625】

3.2. 次に、DMSO溶液におけるAGT基質PEG-BG-NH<sub>2</sub>を、活性化されたビーズにおいて室温で一晩添加し、続いてPBSバッファーで洗浄した。

## 【0626】

3.3. 次に、非結合カルボキシル部位をブロッキングバッファーで30分間室温にてブロッキ

50

ングし、続いてビーズをSNAPカップリングバッファーで洗浄した。

【0627】

3.4.SNAPカップリングバッファー(100 µg/mL)において再懸濁したSNAP-EDIIIタンパク質を、このように得られたビーズと共に2時間室温でインキュベートし、次に、SNAPカップリングバッファーで1回洗浄し、貯蔵バッファー(PBS-TBN)で3回洗浄した。

【0628】

#### 4. マイクロスフェア蛍光イムノアッセイ

異なるSNAP-ウイルスAgとコンジュゲートされたビーズセットを、ボルテックス攪拌により混合して、全体的なビーズ分散を確実にした。ビーズ密度を100ビーズ/µLに調整した後、ビーズセットそれぞれの25 µl(2500個のマイクロスフェアを含有)を、96ウェルマイクロタイタープレート(Bio-Plex Pro平底プレート、BioRad)の、シングルプレックスアッセイにおいては別個のウェルに移し、あるいはマルチプレックスアッセイにおいては同一ウェル内で混合した。マイクロスフェアを、磁性ビーズのためのマイクロプレート洗浄ステーション(BioPlex Pro洗浄ステーション、BioRad)を用いて、100 µLの洗浄バッファー(BioPlex洗浄バッファー、BioRad)で2回洗浄した。試料(抗体または血清)をアッセイバッファー(PBS-BSA)において希釈し、得られた溶液のうち50 µLを、コンジュゲートされたビーズを含有する試験ウェルに添加した。プレート振盪機における暗所での30分間インキュベーション後に、プレートを3回洗浄した。続いて、蛍光色素標識された二次抗体を、アッセイバッファー(PBS-BSA)において2 µg/mLに希釈し、得られた溶液のうち50 µLを、コンジュゲートされたビーズを含有する試験ウェルに添加した。プレート振盪機における暗所での30分間インキュベーション後に、先の通りにプレートを洗浄した。最後に、ストレプトアビジン-フィコエリトリン(SAPE、Invitrogen Molecular Probes)を、アッセイバッファー(PBS-BSA)において2 µg/mlに希釈し、得られた溶液のうち50 µLをマイクロプレートウェルに添加した。プレートをプレート振盪機において暗所で10分間インキュベートし、先の通りに洗浄し、その後、ウェルの内容物を125 µlのアッセイバッファー中で再懸濁した。二重レーザーフロー分析器(BioPlex 200装置、BioRad)を用いた1ウェル当たり50マイクロスフェアのフロー解析から、個々のマイクロスフェアに結合した検出抗体の蛍光強度中央値(MFI)を評価した。蛍光検出装置は、ビーズの種類を検出するための第1のレーザーと、特異的検出抗体にコンジュゲートされたフルオロフォア(赤-フィコエリトリン)を励起することにより捕捉されたIgMまたはIgGの定量化を確実にするための第2のレーザーとを備える。

【0629】

#### 4.1 抗原カップリングの確認

ウサギ抗SNAPタグポリクローナル抗体(GenScript)の希釈液を用いて、抗原カップリングされたマイクロスフェアを検査することにより、抗原カップリングを確認した。上に記載されているシングルプレックスフォーマットにおいて蛍光イムノアッセイを行った。PBS-BSAにおいて、4000ng/mLから始まり3.9ng/mLに終わる抗SNAP抗体の2倍希釈系列を行い、各希釈液の容量を、ビーズを含有する試験ウェルに添加した。ビオチンコンジュゲートされたヤギ抗ウサギIgG(50 µLのPBS-BSAにおける2 µg/mL)を二次抗体として用いて、結合した抗SNAP抗体を検出した。

【0630】

図2は、キメラSNAP-ウイルス抗原タンパク質(SNAP-DV1.EDIII、SNAP-DV2.EDIII、SNAP-DV3.EDIII、SNAP-DV4.EDIII、SNAP-WNV.EDIII、SNAP-YF.EDIII、SNAP-JE.EDIII、SNAP-TBE.EDIII)にカップリングされたマイクロスフェアの8種の異なるセットにおける抗SNAP抗体の検出に対し観察された蛍光結果を示す。

【0631】

#### 4.2 特異的抗体の検出

精製モノクローナルマウス抗体(抗WNV、抗DV1および抗DV2)およびポリクローナルマウス血清(抗DV3、抗DV4、抗YFおよび抗JE)またはヒト血清(抗DV1)を用いて、抗原コンジュゲートされたマイクロスフェアによる特異的抗体の捕捉および検出を評価した。上に記載

10

20

30

40

50

されているシングルプレックスおよびマルチプレックスフォーマットにおいて、蛍光イムノアッセイを行った。PBS-BSAにおいて、400ng/mLから始まり0.1ng/mLに終わる精製マウスモノクローナル抗体ならびに1:25から始まり1:102400に終わるマウスおよびヒト血清の4倍希釈系列を行い、各希釈液の容量を、ビーズを含有する試験ウェルに添加した。ビオチンコンジュゲートされたヤギ抗マウスIgG(50  $\mu$ LのPBS-BSAにおける2  $\mu$ g/mL)を二次抗体として用いて、結合したモノクローナルおよびポリクローナルマウス抗体を検出した。ビオチンコンジュゲートされたヤギ抗ヒトIgM(50  $\mu$ LのPBS-BSAにおける2  $\mu$ g/mL)またはビオチンコンジュゲートされたヤギ抗ヒトIgG(50  $\mu$ LのPBS-BSAにおける2  $\mu$ g/mL)を用いて、それぞれヒト血清における結合したIgMまたはIgG抗体を検出した。

【0632】

10

図3は、hAGTタンパク質の基質を介してマイクロスフェアにコンジュゲートされた(本発明のカップリング)、あるいはBio-Plexアミンカップリングキット、BIORADによりカップリングされたキメラSNAP-DV2.EDI111タンパク質における精製モノクローナル抗DV2抗体の検出のためのイムノアッセイ実験の感度を比較する。

【0633】

図4は、マイクロスフェアにカップリングされた他のキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV2.EDI111、SNAP.DV3.EDI111、SNAP.DV4.EDI111、SNAP-WNV、SNAP-YF、SNAP-JE、SNAP-TBE)による、シングルプレックスまたはマルチプレックスいずれかのフォーマットにおける、マイクロスフェアにコンジュゲートされたキメラSNAP-DV1.EDI111タンパク質における精製モノクローナル抗DV1抗体の検出のためのイムノアッセイ実験の感度を比較する。

20

【0634】

図5は、マイクロスフェアにカップリングされたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV1.EDI111、SNAP-DV2.EDI111、SNAP.DV3.EDI111、SNAP.DV4.EDI111、SNAP-WNV、SNAP-YF、SNAP-JE、SNAP-TBE)における、精製モノクローナル抗WNV抗体の希釈液の検出のためのマルチプレックスイムノアッセイ実験の反応性および特異性を示す。

【0635】

図6は、マイクロスフェアにカップリングされたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV1.EDI111、SNAP-DV2.EDI111、SNAP.DV3.EDI111、SNAP.DV4.EDI111、SNAP-WNV、SNAP-YF、SNAP-JE、SNAP-WSL、SNAP-ROCI0、SNAP-MVE、SNAP-SLE、SNAP-ZIKA)によるマルチプレックスイムノアッセイにおける、DV3に対するマウスポリクローナル血清における抗DV3 IgG検出(A)およびYFに対するマウスポリクローナル血清における抗YF IgG検出(B)の反応性および特異性を示す。

30

【0636】

図7は、マイクロスフェアにカップリングされたキメラSNAP-ウイルスAgタンパク質(SNAP-DV1.EDI111、SNAP-DV2.EDI111、SNAP.DV3.EDI111、SNAP.DV4.EDI111、SNAP-WNV、SNAP-YF、SNAP-JE、SNAP-WSL、SNAP-ROCI0、SNAP-MVE、SNAP-SLE、SNAP-ZIKA、SNAP-TBE)によるマルチプレックスイムノアッセイにおける、ヒト患者のDV1感染血清における抗DV1 IgM検出(A)および抗DV1 IgG検出(B)の反応性および特異性を示す。

【0637】

## 11. 結果

40

本発明のシステムは、特異的ヒト免疫グロブリンの捕捉試薬として抗原コーティングされたMagplexマイクロスフェア(Luminex Corporation)の混合物を用いる。内部色分けされたマイクロスフェアの各セットを、特異的組換え抗原にカップリングし、少ない試料容量で他の種類のマイクロスフェアと混合した。本システムの能力は、フロー解析ツールを用いて、1ウェル当たり最大100種類のカップリングされたマイクロスフェアを同時に解析することが可能であるという事実存する。蛍光検出装置は、ビーズの種類を検出するための第1のレーザーと、特異的検出抗体にコンジュゲートされたフルオロフォア(フィコエリトリン)を励起することによる捕捉されたIgMまたはIgGの定量化を確実にするための第2のレーザーとを備える。その広範なマルチプレックス化能力およびより低い検出限界により、このアプローチは、伝統的ELISA測定を超える相当な費用および試料の節約をもたらす

50

。

## 【0638】

現在、16種の別個のセットのマイクロスフェアを精製キメラSNAP-ウイルスAgタンパク質とカップリングすることにより、デング熱血清型1~4、ウエストナイル、黄熱、日本脳炎、ダニ媒介脳炎、セントルイス脳炎、マレー-渓谷脳炎、ヴェッセルスブロン、ジカ、ロシオ、ウスツ、リフトバレー熱およびチクングニアウイルスに特異的な血清抗体の力価測定が可能となった。1000回の個々のアッセイを行うのに十分な、1セットの抗原カップリングされたマイクロスフェア(約 $1.25 \times 10^6$ 個のマイクロスフェア)を作製するためにごく少量の組換え抗原(<50  $\mu$ g)のみが必要とされるため、このシステムの作製は、非常に時間および費用効果が高い。さらに、選択されたセットのマイクロスフェアは、MagPix(Luminex Corporation)等、利用できるコンパクトで頑強な蛍光検出システムに適應することができる。

10

## 【0639】

抗SNAP抗体を用いた抗原カップリングの評価(図2)は、カップリング効率を確認し、異なるカップリングのマイクロスフェアセット間で結合した抗原の相対含量を比較できることを実証した。精製マウス抗体を用いた抗体捕捉および検出の評価は、標準的なアミンカップリング手順により得られた抗原カップリングされたマイクロスフェアと比較して、ここで作製された抗原カップリングされたマイクロスフェアによる特異的抗体の捕捉の増強を示した(図3)。加えて、この評価は、本方法の低い検出限界を実証し、マルチプレックスが抗体検出に影響を及ぼさないことを確認した(図4)。その上、抗原コンジュゲートされたマイクロスフェアは、4 で貯蔵された場合に長期安定性を示した(>6ヶ月)。最後に、精製マウスモノクローナル抗体(図5)、ポリクローナルマウス血清におけるIgG抗体(図6A~図6B)ならびに感染したヒト由来のポリクローナル血清におけるIgMおよびIgG抗体の両方(図7)に関して、マルチプレックスイムノアッセイにおける各セットのカップリングされたマイクロスフェアの特異性を実証した。

20

## 【0640】

その広範なマルチプレックス化能力(1ウェル当たり最大100種類のカップリングされたマイクロスフェア)およびより低い検出限界により、このアプローチは、伝統的ELISA測定を超える相当な費用および試料の節約をもたらす。

## 【0641】

III. SNAPおよびシュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインを含む融合タンパク質の作製

30

## 1. 融合タンパク質SNAP-SBV.Nをコードするベクターの構築

SNAPおよびシュマレンベルクウイルスのNヌクレオプロテインを含むキメラ融合タンパク質を次の通りに得た。

## 【0642】

第1の工程において、BH80/11-4株のNヌクレオプロテインおよびNSタンパク質をコードするSセグメントのオープンリーディングフレームの配列を、その5'末端にEcoRV制限部位、その3'末端にXmaI制限部位を挿入することにより変異導入した。加えて、294Tヌクレオチドを294Aへと変異導入することにより、内部EcoRV制限部位を除去した。この変異導入された配列を配列番号17に示す。

40

## 【0643】

次に、この変異導入された配列を、配列番号34のpDeSNAP UnivカセットのEcoRVおよびXmaI制限部位に挿入し、配列番号36の「pDeSNAP Univ/SBV.N」DNAカセットを作製した。

## 【0644】

所謂「pDeSNAP Univ/SBV.N」DNAカセットは、

- 配列番号23の昆虫BiP様配列、
- 配列番号31のSNAP様配列、
- スペース配列GGGS(配列番号25)をコードする配列番号26の第1のDNA配列、
- 配列ENLYFQS(配列番号32)のpro-TEV1切断部位をコードする配列番号29のDNA配列、

50

- 配列番号17のSBV.N DNA配列(内部EcoRV部位が欠失され、2個のEcoRVおよびXmaI部位が端に付加された天然SBV.N配列に相当)、
  - 配列ENLYFQG(配列番号33)のpro-TEV2切断部位をコードする配列番号30のDNA配列、
  - HisTag配列をコードする配列番号28のDNA配列
- を含む(図9および配列番号36を参照)。

【0645】

このカセットが、加えて、ATGの上流にNheI部位、BiP様配列とSNAP様配列との間にBglII部位、両者共に終止コドンの下流に位置するAgeI部位およびHindIII部位を含むことに留意されたい。

【0646】

pDeSNAPUniv/SBV.Nカセット(図9を参照)のBglIIおよびAgeI制限部位の間に含まれる配列を酵素消化により切り取り、次にpMT/BiP/V5-Aプラスミド(Invitrogen)へとクローニングして、pMT/BiP/SNAP-SBV.Nベクターを作製した。このベクターは、SNAP-SBV.N融合タンパク質を分泌する安定的なS2細胞の作製に用いた。

【0647】

次に、pDeSNAPUniv/SBV.NカセットのNheIおよびNotI制限部位の間に含まれる配列をpcDNA3プラスミド(Invitrogen)にクローニングして、pcDNA3/SNAP-SBV.Nベクターを作製した。次に、このベクターを用いて、SNAP-SBV.N融合タンパク質を分泌する安定的な哺乳類細胞を作製する。

【0648】

## 2. 融合タンパク質SNAP-SBV.Nの産生

分泌された融合タンパク質としてSNAPタグ付きSBV.Nタンパク質の産生を可能にする、得られたプラスミドpMT/BiP/SNAP-SBV.Nを、選択マーカーpCo-Blastと共にS2細胞にコトランスフェクトして、プラストサイジンに対し抵抗性を示す安定的なS2/SNAP-SBV.N細胞株を作製した。

【0649】

この細胞株を、パスツール研究所(Institut Pasteur)、25、rue du Docteur Roux、75724 PARIS CEDEX 15の国立微生物培養物コレクション(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes)(CNCM)に番号CNCM 1-4616で寄託した。

【0650】

スピナ(1000ml)において増殖させた安定的なS2細胞株を、重金属カドミウム( $Cd^{2+}$ )で10日間刺激した。

【0651】

重金属カドミウムによる誘導10日後のS2/SNAP-SBV.N細胞の上清において、分泌されたSNAP-SBV.Nタンパク質の蓄積が観察された。

【0652】

抗HisTag抗体(1:1,000希釈)を用いた免疫プロットアッセイにより、 $Cd^{2+}$ で10日間誘導したS2/SNAP-SBV.N細胞の上清4mLから得た0.01mLを検査した(図10を参照)。

【0653】

キメラタンパク質SNAP-SBV.Nを、規定量のSNAP-TOS.Nキメラタンパク質(SNAPおよびフレボウイルスであるトスカーナウイルス由来のNヌクレオプロテインを含む融合タンパク質に相当)と比較した。

【0654】

10日間誘導されたS2/SNAP+SBV.N細胞からの精製SNAP-SBV.Nの産生は、細胞培養物1リットル当たり18mgである(図10B)。

【0655】

[参考文献]

10

20

30

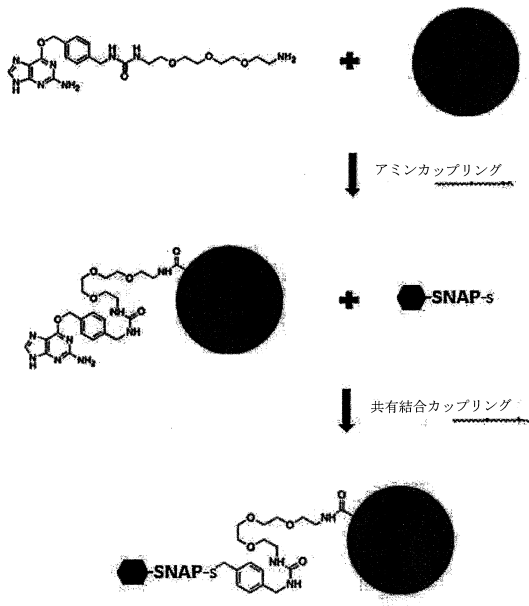
40

**BIBLIOGRAPHIC REFERENCES**

- Avrameas S. *Immunol. Today* 1991 May;12(5):154-9.
- Zimmerman CW, *Electrophoresis* 1995; Jun;16(6):941-7.
- Kim H-J. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2011
- Damoiseaux et al., *ChemBiochem.* 4:285-287, 2001 10
- Xu-Welliver et al., *Biochemical Pharmacology* 58: 1279-85, 1999
- Lim A. et al, *EMBO J.* 15: 4050-4060, 1996;
- Daniels D.S. et al, *EMBO J.* 19: 1719-1730, 2000;
- Juillerat A. et al, *Chemistry & Biology*, vol.10, 313-317, 2003
- Wong et al *Journal of Clinical Microbiology* 42, no. 1 (jan 2004): 65–72 20
- Wibley J.E.A. et al, 2000
- Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:7413-7417, 1987
- Mackey et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:8027-8031, 1988
- Wu et al., *J. Biol. Chem.*, 267:963-967, 1992;
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624, 1988; 30
- Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88:2726-2730, 1991
- Kolpe A.B. et al, *Virus Research* 2012; 168:64-72
- Pan W. et al, *The Journal of Immunology*, 2004), 172:6167-6174
- Sivakolundu S. et al, *Journal of Medical Microbiology*, 2012 40

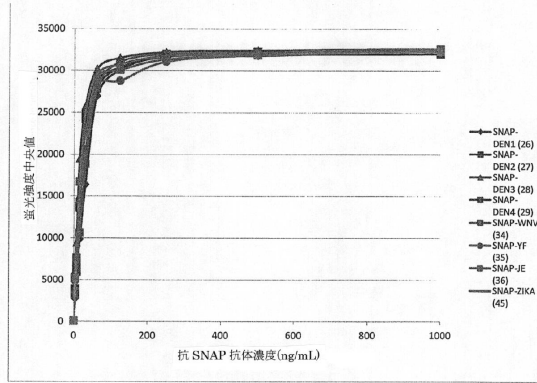
【 図 1 】

Figure 1



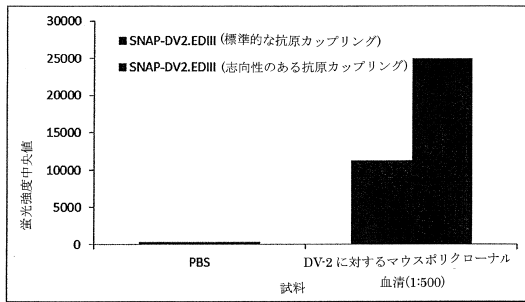
【 図 2 】

Figure 2



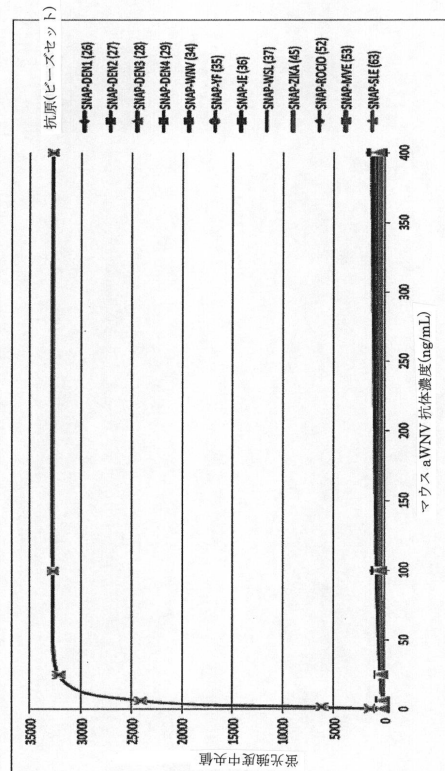
【 図 3 】

Figure 3



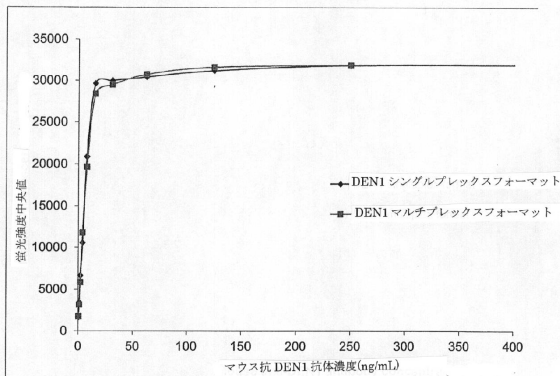
【 図 5 】

Figure 5

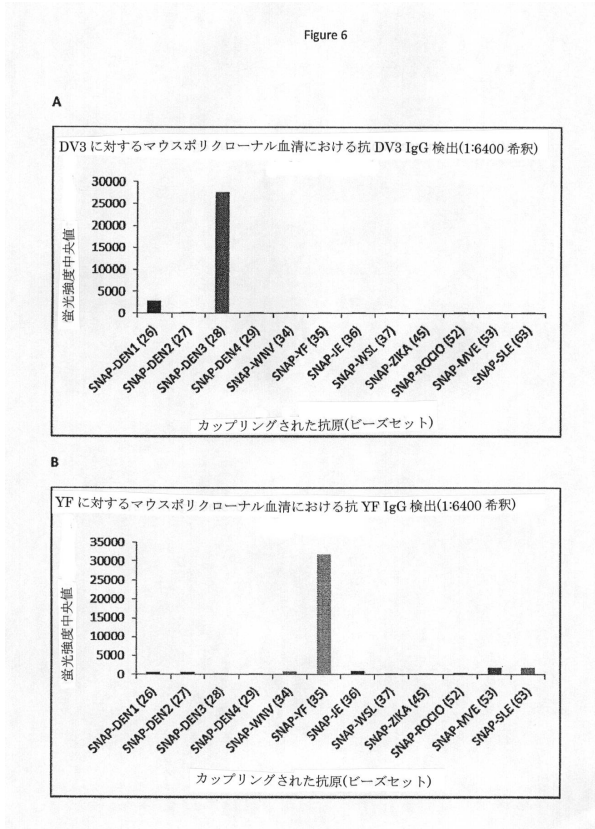


【 図 4 】

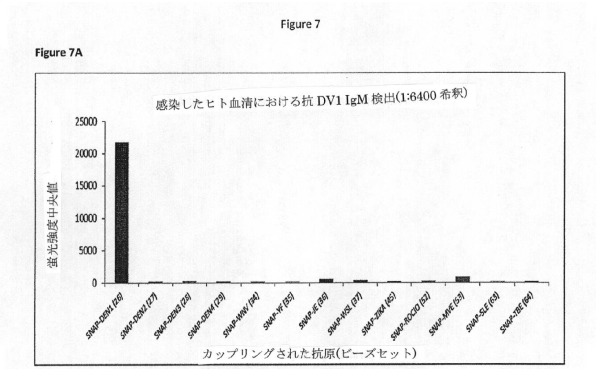
Figure 4



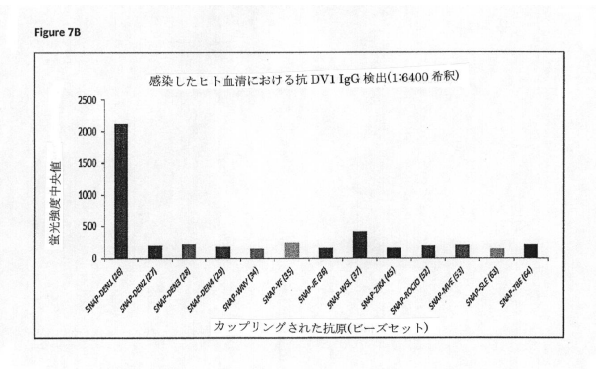
【 図 6 】



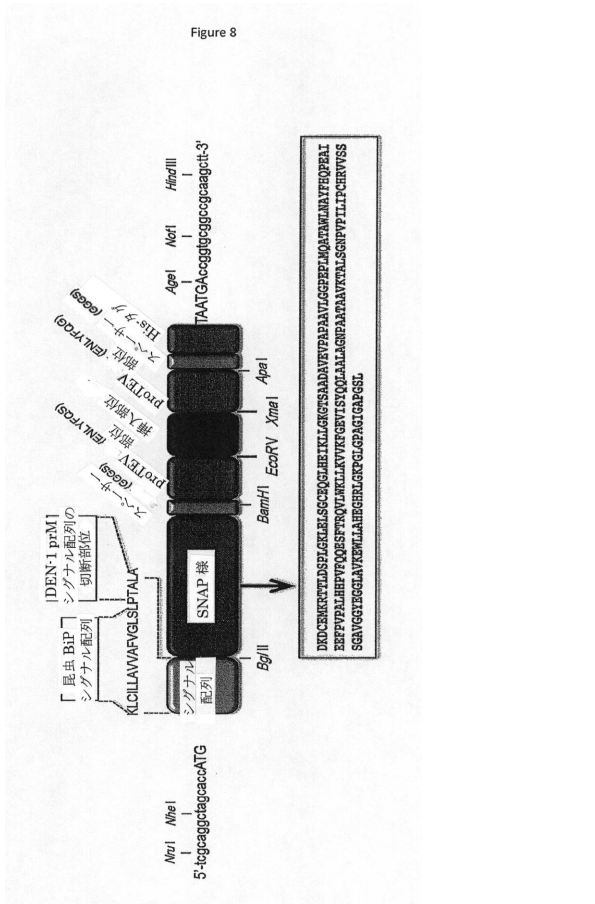
【 図 7 A 】



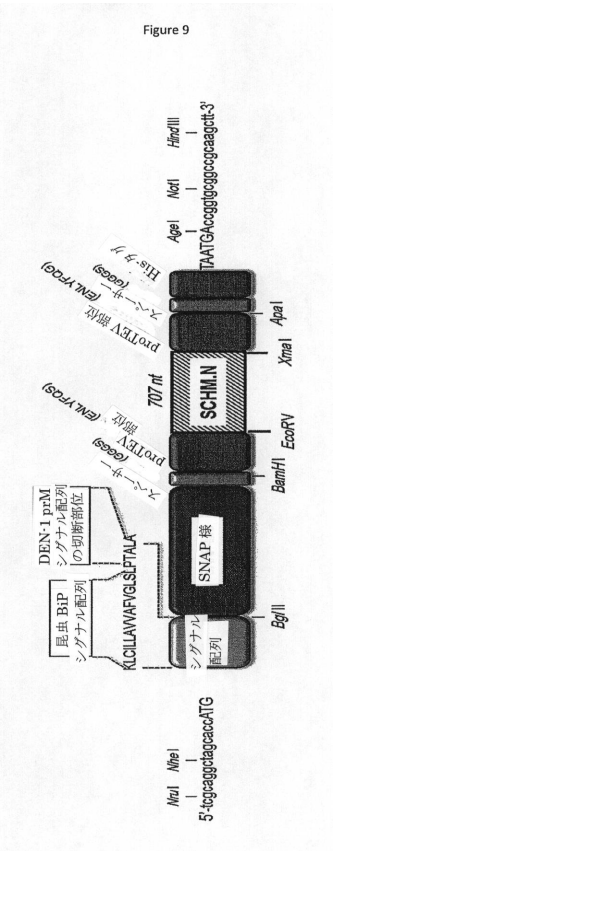
【 図 7 B 】



【 図 8 】



【 図 9 】



































**【配列表】**

0006351571000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 15/00 A

- (72)発明者 ジャン・クロード・マヌゲラ  
フランス・75018・パリ・プラス・ドゥ・ラ・シャペル・16 - 18
- (72)発明者 ジェシカ・ヴァノムウジェン  
フランス・75012・パリ・リュ・ドゥ・シャラントン・244
- (72)発明者 フィリップ・デスプレ  
フランス・92250・ラ・ガレンヌ・コロンブ・プラス・ドゥ・ラ・リベルテ・18
- (72)発明者 シルヴィ・ボル  
フランス・95200・サルセル・シュマン・デ・ラヴァンディエール・10

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2006-501286(JP,A)  
特表2004-532028(JP,A)  
特表2005-524076(JP,A)  
特表2015-500989(JP,A)  
HENRY E NEUMAN DE VEGVAR, MICROARRAY PROFILING OF ANTIVIRAL ANTIBODIES FOR THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSTICS, VACCINES, AND THERAPEUTICS, CLINICAL IMMUNOLOGY, 2004年 5月 1日, V111 N2, P196-201  
KINDERMANN MAIK, COVALENT AND SELECTIVE IMMOBILIZATION OF FUSION PROTEINS, JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 米国, ACS PUBLICATIONS, 2003年 7月 2日, V125 N2 6, P7810-7811

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / R E G I S T R Y / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	多重免疫筛选试验		
公开(公告)号	<a href="#">JP6351571B2</a>	公开(公告)日	2018-07-04
申请号	JP2015509458	申请日	2013-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所		
申请(专利权)人(译)	法国巴斯德研究所		
当前申请(专利权)人(译)	法国巴斯德研究所		
[标]发明人	ジャンクロードマヌゲラ ジェシカヴァノムウジェン フィリップデスプレ シルヴィボル		
发明人	ジャンクロードマヌゲラ ジェシカヴァノムウジェン フィリップデスプレ シルヴィボル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/536 G01N33/569 C07K19/00 C12N15/09		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/536.D G01N33/569.L G01N33/536.E C07K19/00.ZNA C12N15/00.A		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	61/642924 2012-05-04 US PCT/EP2012/074986 2012-12-10 WO		
其他公开文献	JP2015517649A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明提供了用于早期检测病原体，精确鉴定病原体和改进疾病监测的试剂盒和测定方法。更具体地，本发明公开了一种免疫测定法，其导致对感染患者的生物体液中的各种感染性病原体的抗体的快速和同时检测。该免疫测定涉及在可识别的固体支持物（例如荧光微球）上包含AGT酶和病毒抗原的融合蛋白的共价和定向偶联，所述支持物预先用AGT底物包被。这种偶联是由AGT酶在其底物上的不可逆反应介导的。与通过标准胺偶联方法产生的抗原偶联的微球相比，由此获得的抗原偶联的微球显示出增强的特异性抗体捕获。与经典ELISA或放射免疫沉淀测定相比，本发明的方法具有多重化，最小化生物样品量的能力，并且对靶抗体具有增强的灵敏度和特异性。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6351571号 (P6351571)
(45) 発行日 平成30年7月4日(2018.7.4)	(24) 登録日 平成30年6月15日(2018.6.15)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	N
G O 1 N 33/536 (2006.01)	G O 1 N 33/536	D
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569	L
C O 7 K 19/00 (2006.01)	G O 1 N 33/536	E
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C O 7 K 19/00	Z N A
請求項の数 38 (全 117 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2015-509458 (P2015-509458)	(73) 特許権者 508029653	
(86) (22) 出願日 平成25年5月3日(2013.5.3)	アンステイチュ・バスターール	
(65) 公表番号 特表2015-517649 (P2015-517649A)	フランス・F-75724・パリ・セアッ	
(43) 公表日 平成27年6月22日(2015.6.22)	クス・15・リュ・デュ・ドクトール・	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/059312	ルー・25-28	
(87) 国際公開番号 W02013/164476	(74) 代理人 100108453	
(87) 国際公開日 平成25年11月7日(2013.11.7)	弁理士 村山 清彦	
審査請求日 平成27年12月21日(2015.12.21)	100064908	
(31) 優先権主張番号 61/642,924	弁理士 志賀 正武	
(32) 優先日 平成24年5月4日(2012.5.4)	100089037	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 渡邊 隆	
(31) 優先権主張番号 PCT/EP2012/074986	100110364	
(32) 優先日 平成24年12月10日(2012.12.10)	弁理士 実広 信哉	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 マルチプレックス免疫スクリーニングアッセイ		