

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5985657号
(P5985657)

(45) 発行日 平成28年9月6日(2016.9.6)

(24) 登録日 平成28年8月12日(2016.8.12)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	14/20	(2006.01)	C O 7 K 14/20
C12N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C12P	21/00	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
GO1N	33/53	(2006.01)	C 1 2 P 21/00 C
			G O 1 N 33/53 N

請求項の数 14 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2014-552565 (P2014-552565)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月16日 (2013.1.16)
 (65) 公表番号 特表2015-506364 (P2015-506364A)
 (43) 公表日 平成27年3月2日 (2015.3.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/000108
 (87) 国際公開番号 W02013/107633
 (87) 国際公開日 平成25年7月25日 (2013.7.25)
 審査請求日 平成27年1月16日 (2015.1.16)
 (31) 優先権主張番号 12000310.8
 (32) 優先日 平成24年1月19日 (2012.1.19)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性免疫反応性梅毒トレポネーマ (Treponema pallidum) TpN47抗原

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号4のアミノ酸残基376~503(ドメインC)を欠くという条件で、配列番号3のアミノ酸残基376~487(ドメインB)を含む、可溶性梅毒トレポネーマ (Treponema pallidum) 抗原47 (TpN47抗原) であって、該TpN47抗原がシャペロンに融合している、前記抗原。

【請求項2】

配列番号4のアミノ酸残基376~503(ドメインC)を欠くという条件で、配列番号2のアミノ酸残基376~572(ドメインA+B)を含む、可溶性梅毒トレポネーマ抗原47 (TpN47抗原) であって、該TpN47抗原がシャペロンに融合している、前記抗原。

【請求項3】

配列番号6のアミノ酸残基376~458(ドメインD)をさらに含む、請求項1または2記載の可溶性梅毒トレポネーマ抗原47 (TpN47抗原) (ドメインBまたはA+B)。

【請求項4】

配列番号4のアミノ酸残基376~503(ドメインC)を欠くという条件で、配列番号3のアミノ酸残基376~487(ドメインB)を含み、配列番号6のアミノ酸残基376~458(ドメインD)をさらに含む、可溶性梅毒トレポネーマ抗原47 (TpN47抗原)。

【請求項 5】

配列番号 4 のアミノ酸残基 376 ~ 503 (ドメイン C) を欠くという条件で、配列番号 2 のアミノ酸残基 376 ~ 572 (ドメイン A + B) を含み、配列番号 6 のアミノ酸残基 376 ~ 458 (ドメイン D) をさらに含む、可溶性梅毒トレポネーマ抗原 47 (TpN47 抗原)。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の梅毒トレポネーマ抗原 47 (TpN47 抗原) をコードする、組換え DNA 分子。

【請求項 7】

機能可能であるように連結された請求項 6 記載の組換え DNA 分子を含む、発現ベクター。

10

【請求項 8】

請求項 7 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 9】

- 請求項 8 記載の宿主細胞を培養し
- 前記 TpN47 抗原を発現させ、そして
- 前記 TpN47 抗原を精製する

工程を含む、可溶性および免疫反応性梅毒トレポネーマ抗原 47 (TpN47 抗原) を産生する方法。

【請求項 10】

20

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の TpN47 抗原、および TpN17 抗原および TpN15 抗原からなる群より選択される少なくとも 1 つのさらなる梅毒トレポネーマ抗原を含む、少なくとも 2 つの梅毒トレポネーマ抗原の組成物。

【請求項 11】

単離試料において、梅毒トレポネーマに特異的な抗体を検出するための方法であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の TpN47 抗原、または請求項 10 記載の抗原の組み合わせまたは組成物を、前記梅毒トレポネーマ抗体の捕捉試薬として、および/または結合パートナーとして用いる、前記方法。

【請求項 12】

30

単離試料において、梅毒トレポネーマに特異的な抗体を検出するための方法であって、
a) 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の TpN47 抗原または請求項 10 記載の少なくとも 2 つの梅毒トレポネーマ抗原の組成物と、体液試料を混合することによって、免疫反応混合物を形成すること

b) 体液試料中に存在する前記トレポネーマ抗原またはトレポネーマ抗原の組成物に対する抗体が、前記トレポネーマ抗原またはトレポネーマ抗原の組成物と免疫反応して、免疫反応産物を形成することを可能にするために十分な期間、前記免疫反応混合物を維持すること；そして

c) 前記免疫反応産物のいずれかの存在および/または濃度を検出することを含む、前記方法。

【請求項 13】

40

抗梅毒トレポネーマ抗体の検出のための *in vitro* 診断試験における、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の TpN47 抗原、または請求項 10 記載の梅毒トレポネーマ抗原の組成物の使用。

【請求項 14】

少なくとも請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の TpN47 抗原、または請求項 10 記載の組成物を含む、抗梅毒トレポネーマ抗体の検出のための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*) 抗原 47 (T 50

p N 4 7) の可溶性で、安定な、そして免疫反応性の変異体であって、抗原が T p N 4 7 のアミノ酸 2 2 4 ~ 3 5 1 (すなわちドメイン C) を欠くという条件で、 T p N 4 7 タンパク質分子の少なくともアミノ酸残基 6 3 ~ 1 7 4 (すなわちドメイン B) を含み、 T p N 4 7 抗原がシャペロンに融合している、前記変異体に関する。本発明はさらに、これらの抗原がドメイン C を欠くという条件で、ドメイン B および D またはドメイン A + B および D を含む可溶性梅毒トレポネーマ抗原 4 7 (T p N 4 7 抗原) に関する。さらに、本発明は、これらの可溶性で、安定な、そして免疫反応性の T p N 4 7 変異体を産生する方法、ならびに単離試料中の梅毒トレポネーマに対する抗体の検出に向けられる免疫診断アッセイにおける、これらの抗原の使用に関する。

【発明の概要】

【 0 0 0 2 】

梅毒トレポネーマは、スピロヘータの細菌ファミリーに属し、そして梅毒の原因病原体である。梅毒 (S y p h i l i s 、 また L u e s と も) は、主に、性的接触によって伝染する。梅毒トレポネーマはまた、妊娠中に母親から赤ん坊にうつる可能性もある。この疾患は、別個の臨床段階および長期間の潜伏性無症候性感染によって特徴付けられる。多くの人々は症状に気づかず、そしてしたがって梅毒感染に何年も気づかない。一次感染は限定され、そして通常、小さい無痛の潰瘍を引き起こす (第一段階、 「梅毒 I」) 。ペニシリンによって治療されずに放置されると、疾患は第二段階の梅毒 II に進行し (感染約 8 週後) 、これはインフルエンザ様症状、かゆみのない皮膚発疹およびリンパ節腫脹を伴う。数年後、梅毒 III の段階で、梅毒性結節が全身に現れる。最終段階 (梅毒 IV) は、中枢神経系の崩壊によって特徴付けられ、最終的に、神経学的障害および心臓障害、全身麻痺、運動失調、認知症および失明につながる。

【 0 0 0 3 】

20 世紀半ばにペニシリンが導入されて以来、有効な療法が利用可能になっているが、梅毒はなお、重要な世界的健康問題であり続けている。抗生物質療法を補助し、そしてしたがって梅毒の蔓延を防止するため、トレポネーマに感染した患者を同定することが必須である。その結果、梅毒トレポネーマに対する抗体の検出のため、イムノアッセイなどの信頼性がある診断ツールを提供する必要がある。さらに、血清学的適用における特異的化合物として用いるため、組換えタンパク質は、可溶性、安定性および抗原性などのいくつかの必要条件を満たす必要がある。

【 0 0 0 4 】

梅毒トレポネーマ (梅毒感染の原因病原体) の膜会合ポリペプチドの 1 つは、 4 3 4 アミノ酸残基からなる巨大タンパク質である、 T p N 4 7 である。 T p N 4 7 は、トレポネーマに対する体液性免疫反応において免疫優性と見なされており (F o l i a M i c r o b i o l . (2 0 0 3) 4 8 (4) , 5 4 9 - 5 5 3) 、そして T p N 4 7 に向けられる抗体は、しばしば、トレポネーマに感染した個体由来のヒト血清に見出される。したがって、組換え T p N 4 7 の可溶性および抗原性変異体は、高い感受性および特異性を組み合わせたトレポネーマ抗体を検出するイムノアッセイを確立するための貴重な成分であろう。最高の場合、こうした抗原は、 I g G および I g M 分子両方の検出を可能にするはずである。

【 0 0 0 5 】

T p N 4 7 の組換え変異体が文献に記載されてきている。 J o u r n a l o f I m m u n o l o g y (1 9 9 6) J u l 1 5 ; 1 5 7 (2) : 7 2 0 - 3 1 において、 B a u g h n らは、 T p N 4 7 の全配列を含む、 1 2 量体ペプチドのエピトープスキャン (重複 8 アミノ酸残基、オフセット 4 アミノ酸残基) に関して報告する。このスキャンに基づき、著者らは、長さ 9 ~ 2 9 アミノ酸残基の範囲の、 1 0 もの免疫優性 T p N 4 7 断片を記載する。 T p N 4 7 の結晶構造およびドメイントポロジーもまた記載されてきている (J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y (2 0 0 2) , 2 7 7 (4) , 4 1 8 5 7 - 4 1 8 6 4 , D e k a ら) 。

【 0 0 0 6 】

10

20

30

40

50

トレポネーマ抗体を検出するためのイムノアッセイが当該技術分野に知られる。例えば、Rostopirara (Folia Microbiol. 48 (4), 549-553, 2003) は、免疫優性抗原の1つとしてTpN47を同定する、TpN17およびTpN47の組み合わせを用いて梅毒を診断するためのイムノアッセイを記載する。この刊行物において、全長TpN47を抗原として用いた。

【0007】

本発明者らは、大腸菌 (E. coli) 宿主 (BL21/DE3) において、TpN47の全長変異体を過剰産生し、そしてTpN47抗原を均質に調製することに成功した。さらに、TpN47の全長型を用いた本発明者らの最初の実験によって、このタンパク質が35より高い温度で凝集する傾向があることが明白に明らかになった。EcSlyD-EcSlyDまたはさらに(より熱安定性の)EcSlpA-EcSlpAなどのタンデムシャペロン融合体の融合にもかかわらず、全長TpN47は、必然的に、35を超えた温度で高分子量会合物に凝集する。梅毒トレポネーマは、むしろ温度感受性の病原体として知られ、主要膜タンパク質の1つが温度感受性を共有するという発見はそれほど驚くべきことではないようである。いずれにしても、イムノアッセイ中のタンパク質性成分の熱誘導性凝集プロセスは、通常、シグナルの喪失または特異性の喪失のいずれかを生じる。したがって、全長TpN47 (SlyDまたはSlpAなどの可溶性増進シャペロンとの融合においてさえ) が、中程度に上昇した温度 (>35) であっても凝集する傾向があるという事実は、この分子を、DAGS形式の感受性イムノアッセイにおける、単純でそして簡単な適用から明らかに排除する。

【0008】

TpN47に関する詳細な構造的知識 (Dekaら Journal of Biological Chemistry (2002), 277(4), 41857-41864) があるにもかかわらず、先行技術は、TpN47の顕著な熱不安定を開示せず、また熱誘導性凝集、およびそれと同時の、試料中の梅毒トレポネーマに対する抗体の検出に向けられるイムノアッセイにおける感受性の喪失の問題を克服するTpN47抗原変異体を開示しない。

【0009】

Guoら (Xiamen Daxue Xuebao-Ziran Kexue Ban (2008), 47(6), 874-878) は、大腸菌において組換え発現される特異的可溶性TpN47 N末端またはC末端一部切除 (truncated) 突然変異体を記載する。しかし、全長TpN47タンパク質の熱不安定性および凝集の傾向の問題には取り組んでいない。さらにGuoらのデータは、TpN47のドメインCおよびDの組み合わせ (C190) が、全長TpN47タンパク質の抗原性とほぼ同等であると示唆している。

【0010】

梅毒トレポネーマ抗原47 (TpN47抗原) の可溶性で、安定な、そして免疫反応性の変異体であって、抗原がTpN47のドメインC (aa 224~351) を欠くという条件で、TpN47タンパク質分子の少なくともドメインB (aa 63~174) を含み、TpN47抗原がシャペロンと融合している、前記変異体を生成することによって、安定性の問題は、本発明によって解決されている。

【0011】

この問題のさらなる解決は、ドメインBおよびDを含む可溶性TpN47抗原 (配列番号1のaa 63~174および352~434) またはドメインA+BおよびDを含むTpN47抗原 (配列番号1のaa 26~223および352~434) である。どちらの変異体も、TpN47のドメインCを欠く。

【0012】

本発明は、可溶性梅毒トレポネーマ抗原に、すなわちTpN47抗原であって、TpN47抗原がドメインC (配列番号1のアミノ酸残基224~351) を欠くという条件で、少なくともドメインB (配列番号1のアミノ酸残基63~174) または少なくともド

10

20

30

40

50

メイン A + B (配列番号 1 のアミノ酸残基 26 ~ 223) を含み、シャペロンに融合している、前記抗原に関する。本発明はまた、これらの抗原がドメイン C (配列番号 1 のアミノ酸残基 224 ~ 351) を欠くという条件で、少なくともドメイン B (配列番号 1 のアミノ酸残基 63 ~ 174) およびドメイン D (配列番号 1 のアミノ酸残基 352 ~ 434)、またはドメイン A + B (配列番号 1 のアミノ酸残基 26 ~ 223) およびドメイン D (配列番号 1 のアミノ酸残基 352 ~ 434) を含む、可溶性 TpN47 抗原にも関する。可溶性をさらに増加させるため、これらの抗原をシャペロンに融合させてもよいし、または別の融合パートナーに融合させてもよい。

【0013】

本発明はさらに、前記 TpN47 抗原をコードする組換え DNA 分子に関し、そして本発明はまた、機能可能であるように連結されているかまたは組み込まれている、TpN47 抗原をコードする上述の DNA を含有する発現ベクターにも関する。本発明はまた、前記発現ベクターで形質転換された宿主細胞にも、そしてまた前記 TpN47 抗原を産生する方法にも関する。

10

【0014】

さらに、本発明は、梅毒の検出のための *in vitro* 診断法に、すなわち前記 TpN47 抗原変異体を用いて、TpN47 に対する抗体を検出する方法に関し、そして本発明はまた、本発明記載の TpN47 抗原を含む試薬試験キットにも関する。本発明はまた、例えば TpN47 抗原および TpN17 または TpN15 抗原を含む、少なくとも 2 つの梅毒トレポネーマ抗原の組成物にも関する。別の態様において、前記組成物は、TpN47 抗原ならびに TpN17 および TpN15 抗原の両方を含む。さらに、本発明は、これらの抗原を産生する方法、ならびに単離試料中の梅毒トレポネーマに対する抗体の検出のための免疫診断アッセイにおけるこれらの抗原の使用に関する。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

図 1 ~ 6 は、Superdex 200 HR 10/30 カラム上の別個の EcSlyD - EcSlyD - TpN47 ドメイン構築物の分析ゲル濾過プロファイルを示す。実施例 5 もまた参照されたい。およそ 200 μ l の 1.3 mg/ml タンパク質溶液 (150 mM リン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl、0.5 mM EDTA 中に溶解された融合タンパク質) を SEC カラム上に適用し、そして 0.8 ml/分の流速で、280 nm で溶出を監視した。FPLC 標準 (薄い灰色の点線) は、 β -ガラクトシダーゼ (465 000 Da)、ヒツジ IgG (150 000 Da)、ヒツジ IgG Fab 断片 (50 000 Da)、ウマ・ミオグロビン (17 000 Da)、および二ペプチド、グリシン - チロシン (238 Da) を含有する。

30

【0016】

すべてのタンパク質構築物を、15.2 μ M ~ 26.5 μ M のモル濃度に同等の 1.3 mg/ml の濃度で、同一緩衝剤濃度 (150 mM リン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl、0.5 mM EDTA) 下、一晚インキュベーション (18 時間) で、温度上昇 (35、40) に供した。熱ストレス後、タンパク質試料を遠心分離に供し、そして次いで、上述のような FPLC 分析によって、凝集傾向に関して評価した。

40

【図 1】図 1 は、Superdex 200 カラム上、分析ゲル濾過によって評価した際の EcSlyD - EcSlyD - TpN47 / AB (26 ~ 223) の熱安定性を示す。300 μ g タンパク質に相当する 230 μ l をカラムに適用した。4、35 および 40 でのインキュベーション後の TpN47 / AB の溶出プロファイルは非常によく一致する。凝集または会合プロセスの気配は全くない。280 nm での吸収によって監視した際の溶出プロファイルは、40 などの上昇した温度であっても、可溶性タンパク質断片 TpN47 / AB を示す。

【図 2】図 2 は、Superdex 200 カラム上、分析ゲル濾過によって評価した際の EcSlyD - EcSlyD - TpN47 / B (63 ~ 174) の熱安定性を示す。350 μ g タンパク質に相当する 270 μ l をカラムに適用した。4、35 および 40

50

でのインキュベーション後のTpN47/Bの溶出プロファイルはほぼ完全に一致する。凝集または会合プロセスの気配は全くない。280nmでの吸収によって監視した際の溶出プロファイルは、タンパク質断片TpN47/Bが可溶性であり、そして40 などの上昇した温度であっても安定であるという、説得力がある証拠を示す。

【図3】図3は、Superdex 200カラム上、分析ゲル濾過によって評価した際のEcslyD-EcslyD-TpN47/C(224~351)の熱安定性を例示する。200µgタンパク質に相当する154µlをカラムに適用した。4 および35でのインキュベーション後のTpN47/Cの溶出プロファイルはほぼ完全に一致する。しかし、35 であっても、非常に少量のTpN47 Cがゲル濾過カラムのボイド容量中に溶出し(連続した濃い灰色の線)、これは凝集プロセスの開始を示す。40 でのインキュベーション後、溶出タンパク質のほぼ1/3が、SECカラムのボイド容量中に溶出し、これは、巨大な凝集タンパク質粒子の形成を示す。図3から、TpN47ドメインCが35 を超える温度で凝集する実質的な傾向を所持することが明らかとなる。

【図4】図4は、Superdex 200カラム上、分析ゲル濾過によって評価した際のEcslyD-EcslyD-TpN47/CD(224~434)の熱安定性を示す。250µgタンパク質に相当する195µlをカラムに適用した。4 でのインキュベーション後のTpN47/CDの溶出プロファイルは、優れた対称的なピークを示し、可溶性でそして均質なタンパク質であることを示す。35 でインキュベーションした際、EcslyD-EcslyD-TpN47/CDは、対応するプロファイルによって判断されるように、巨大な凝集タンパク質粒子を形成し、これはタンパク質のかなりの部分がゲル濾過カラムのボイド容量で溶出することを示す(連続した濃い灰色の線)。40 でインキュベーションした後、CD融合タンパク質の最大の部分は、ゲル濾過カラムのボイド容量中に溶出する(連続した黒線)。図4から、TpN47のC末端部分、すなわち融合タンパク質CDが、35 などの中程度に上昇した温度であっても凝集する非常に本質的な傾向を所持することが明らかである。

【図5】図5は、Superdex 200カラム上、分析ゲル濾過によって評価した際のEcslyD-EcslyD-TpN47/D(352~434)の熱安定性を例示する。430µgタンパク質に相当する331µlをカラムに適用した。4、35 および40 でのインキュベーション後のTpN47/Dの溶出プロファイルはほぼ区別不能であり、そして完璧に一致する。凝集または会合プロセスの気配はどんなものであってもなくない。280nmでの吸収によって監視した際の溶出プロファイルは、タンパク質断片TpN47/Dが完全に可溶性であり、そして40 などの上昇した温度であっても安定であるという、説得力がある証拠を示す。

【図6】図6は、Superdex 200カラム上、分析ゲル濾過によって評価した際の全長TpN47変異体EcslyD-EcslyD-TpN47/ABCD(21~434)の熱安定性を示す。117µgタンパク質に相当する90µlをカラムに適用した。4 でのインキュベーション後のTpN47/ABCDの溶出プロファイルは、13.5mlの溶出体積で優れたピークを示し、可溶性でそして均質なタンパク質であることを示す。35 でインキュベーションした際、EcslyD-EcslyD-TpN47/ABCDは、対応するプロファイルによって判断されるように、巨大凝集タンパク質粒子を形成し、これはタンパク質の66%より多くが、SECカラムのボイド容量中に溶出することを示す(連続した濃い灰色の線)。40 でインキュベーションした後、ほぼ96%の全長TpN47が、ゲル濾過カラムのボイド容量中に溶出する(連続した黒線)。図6から、全長TpN47が、35 などの中程度に上昇した温度であっても凝集する非常に本質的な傾向を所持することが明らかである。

【0017】

全長タンパク質が不足していたため、わずか117µgのEcslyD-EcslyDをSuperdexカラム上に適用し(より低い吸収シグナルを生じ)、これは他のTpN47変異体と比較した際、わずかな部分でしかなかった。しかし、熱ストレス評価は、各TpN47変異体と同一の条件下で行われた。

10

20

30

40

50

【図7】図7は、免疫優性TpN47抗原変異体に関する検索におけるB細胞エピトープマッピングの本発明者らの戦略を示す。上部：TpN47 N末端に融合したEcSlyD-EcSlyDを含む全長TpN47(21~434、ドメインABCDを含む)。中央部分：個々のTpN47ポリペプチド断片(EcSlyDへの融合は示さない)、はしご状の順序で：配列番号8~16にしたがった、TpN47ポリペプチド断片、30~66、106~132、137~170、197~219、225~250、273~296、321~362、368~388、391~434；実施例4にしたがった、これらのペプチドの免疫反応性に関する実験結果を表2に示す(図8a~c)。下部：全長TpN47に対する、TpN47ドメインB、A、B、C、DおよびCDの位置(EcSlyD-EcSlyDへの融合は示さない)；実施例4にしたがった、これらのTpN47融合

10

変異体の免疫反応性(すなわち抗原性)に関する実験結果を表3に示す(図9)。
【図8-1】図8a~cは、実施例4において得られる結果を含有する表2を示す：EcSlyDシャペロンに融合した小分子(直鎖)非構造化TpN47断片の免疫学的反応性。ElecSys(登録商標)2010分析装置を用いることによって、イムノアッセイを実行した。シグナル動力学を、トレポネーマ陰性試料に関して得られる平均値に対して規準化する。トレポネーマ陽性血清をBoca Biolistics(米国フロリダ州ココナツクリーク)より購入し、トレポネーマ陰性対照は、内部献血者であった。右の列(実験10、全長TpN47)は、それぞれ、図8a、b、およびcの各々に同一であることに注目されたい。

【図8-2】図8a~cは、実施例4において得られる結果を含有する表2を示す：EcSlyDシャペロンに融合した小分子(直鎖)非構造化TpN47断片の免疫学的反応性。ElecSys(登録商標)2010分析装置を用いることによって、イムノアッセイを実行した。シグナル動力学を、トレポネーマ陰性試料に関して得られる平均値に対して規準化する。トレポネーマ陽性血清をBoca Biolistics(米国フロリダ州ココナツクリーク)より購入し、トレポネーマ陰性対照は、内部献血者であった。右の列(実験10、全長TpN47)は、それぞれ、図8a、b、およびcの各々に同一であることに注目されたい。

20

【図8-3】図8a~cは、実施例4において得られる結果を含有する表2を示す：EcSlyDシャペロンに融合した小分子(直鎖)非構造化TpN47断片の免疫学的反応性。ElecSys(登録商標)2010分析装置を用いることによって、イムノアッセイ

30

を実行した。シグナル動力学(SD)を、トレポネーマ陰性試料に関して得られる平均値に対して規準化する。トレポネーマ陽性血清をBoca Biolistics(米国フロリダ州ココナツクリーク)より購入し、陰性対照は、内部献血者であった。

40

【図10】図10は、表4を示す：熱ストレス(42で72時間)に続くTpN47ドメインAB(26~223)およびB(63~174)の残渣抗原性。ドメインABおよびドメインBのどちらも記載するような可溶性増進タンデムシャペロンモジュールEcSlyD-EcSlyDに融合させた。ElecSys(登録商標)2010分析装置を用いることによって、イムノアッセイを実行した。シグナル動力学(SD)を、トレポネーマ陰性試料に関して得られる平均値に対して規準化する。トレポネーマ陽性血清をSeracare(米国マサチューセッツ州)より購入し、トレポネーマ陰性対照をTrina Bioreactives AG(スイス・ナニコン)より購入した。

50

【図11】図11は、表5を示す：熱ストレス（42 で72時間）に続く、TpN47ドメインC（224～351）およびD（352～434）の残渣抗原性。ドメインCおよびDのどちらも、記載するような可溶性増進タンデムシャペロンモジュールEcSlyD - EcSlyDに融合させた。E l e c s y s（登録商標）2010分析装置を用いることによって、イムノアッセイを実行した。シグナル動力学（SD）を、トレポネーマ陰性試料に関して得られる平均値に対して規準化する。トレポネーマ陽性血清をS e r a C a r e（米国マサチューセッツ州）より購入し、トレポネーマ陰性対照をT r i n a B i o r e a c t i v e s A G（スイス・ナニコン）より購入した。

【図12】図12は、表6を示す：熱ストレス（42 で72時間）に続く、TpN47/CD（224～434）および全長TpN47（21～434）の残渣抗原性。ドメインCDおよび全長TpN47のどちらも、記載するような可溶性増進タンデムシャペロンモジュールEcSlyD - EcSlyDに融合させた。E l e c s y s（登録商標）2010分析装置を用いることによって、イムノアッセイを実行した。シグナル動力学（SD）を、トレポネーマ陰性試料に関して得られる平均値に対して規準化する。トレポネーマ陽性血清をS e r a C a r e（米国マサチューセッツ州）より購入し、トレポネーマ陰性対照をT r i n a B i o r e a c t i v e s A G（スイス・ナニコン）より購入した。

10

【0018】

配列表にさらに詳述するように、以下のタンパク質配列を本明細書内で用いる：

配列番号1は、2つの大腸菌SlyD分子に融合した全長TpN47を示す：

20

E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7（S w i s s P r o t P 2 9 7 2 3の a a 2 1 ~ 4 3 4 T p N 4 7を下線で示す）；315位において、システインはアラニンに置換されており、そして精製目的のため、ヘキサ - ヒスチジンタグがC末端に付加されている。

【0019】

【化1】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLGHGGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFVGMVDEL QVGMRF LAET DQGPV PVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG
 SGGGGGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPV SAPLD YLHG HGLIS GLETAL EGH E
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVD ELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGGSSH ETHYGYATLS YADYWAGELG QSRDVLLAGN AEADRAGDLD
AGMFDVAVSRA THGHGAFRQQ FOYAVEVLGE KVL SKQETED SRGRKKWEYE TDPSVTKMVR
ASASFQDLGE DGEIKFEAVE GAVALADRAS SFMVDSEEYK ITNVKVHGMK FVPVAVPHEL
KGIAKEKFHF VEDSRVTENT NGLKTMLTED SFSARKVSSM ESPHDLVVDT VGTGYHSRFG
SDAEASVMLK RADGSEL SHR EFIDYVMNFN TVRYDYGD D ASYTNLMASY GTKHSADSWW
KTGRVPRISA GINYGFDR EK GSGPGYYRLT LIANGYRDVV ADVRFLPKYE GNIDIGLKGK
VLTI GGADAE TLM DAAVDVF ADGQPKLVSD QAVSLGQNVL SADFTP GTEY TVEVRFKEFG
 SVRAKVVAQL EHHHHHH

30

40

【0020】

配列番号2は、2つの大腸菌SlyD分子に融合したTpN47のドメインABを示す：
 E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 / A B（S w i s s P r o t P 2 9 7 2

50

3のaa 26~223 TpN47を下線で示す) ; 精製目的のため、ヘキサ - ヒスチジンタグがC末端に付加されている。

【0021】

【化2】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHR DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
 SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETAL E GHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGETHYG YATLSYADYW AGELGQSRDV LLAGNAEADR AGDLLDAGMFD
AVSRAHGHGA FRQQFYAVE VLGEKVLKQ ETEDSRGRKK WEYETDPSVT KMVRASASFO
DLGEDGEIKF EAVEGAVALA DRASSEMVDS EYKITNVKV HGMKFVPAV PHELKGIKE
KFHFVEDSRV TENTINGLKTMLTEDSFSARK VSLEHHHHH

10

【0022】

配列番号3は、2つの大腸菌SlyD分子に融合したTpN47のドメインBを示す：
 EcSlyD - EcSlyD - TpN47/B (Swiss Prot P29723の
 aa 63~174 TpN47を下線で示す) ; 精製目的のため、ヘキサ - ヒスチジン
 タグがC末端に付加されている。

【0023】

【化3】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETAL E GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHR DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
 SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETAL E GHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGDL D A G M F D A V S R A T H G H G A F R Q Q F Q Y A V E V L G E K V L S K Q E T E D S R
GRKKWEYETD PSVTKMVRAS ASFQDLGEDG EIKFEAVEGA VALADRASSF MVDSEYKIT
NVKVHGMLEH HHHH

30

【0024】

配列番号4は、2つの大腸菌SlyD分子に融合したTpN47のドメインCを示す：
 EcSlyD - EcSlyD - TpN47/C (Swiss Prot P29723の
 aa 224~351 TpN47を下線で示す) ; 315位において、システインはア
 ラニンに置換されており、そして精製目的のため、ヘキサ - ヒスチジンタグがC末端に付
 加されている。

【0025】

40

【化4】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFIMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG
 SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGSMESP HDLVVDTVGT GYHSRFGSDA EASVMLKRAD GSELSHREFI
 DYVMNFNTVR YDYYGDDASY TNLMASYGTK HSADSWWKTG RVPRISAGIN YGFDRFKGSG
 PGYRRLTLIA NGYRDVVADV RFLLEHHHHH H

10

【0026】

配列番号5は、2つの大腸菌SlyD分子に融合したTpN47のドメインCDを示す：
 EcSlyD - EcSlyD - TpN47 / CD (Swiss Prot P29723のaa 224 ~ 434 TpN47)；315位において、システインはアラニンに
 置換されており、そして精製目的のため、ヘキサ - ヒスチジンタグがC末端に付加されて
 いる。

20

【0027】

【化5】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFIMGVDEL QVGMFLAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAHG HVHGAHDHHH DHDHDGGGSG GSGGGGSGGG
 SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHD HDGGGSGGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGSMESP HDLVVDTVGT GYHSRFGSDA EASVMLKRAD GSELSHREFI
 DYVMNFNTVR YDYYGDDASY TNLMASYGTK HSADSWWKTG RVPRISAGIN YGFDRFKGSG
 PGYRRLTLIA NGYRDVVADV RFLPKYEGNI DIGLKGKVLV IGGADAETLM DAAVDVFADG
 QPKLVSDQAV SLGQNVLSAD FTPGTEYTVE VRFKEFGSVR AKVVAQLEHH HHHH

30

【0028】

配列番号6は、2つの大腸菌SlyD分子に融合したTpN47のドメインDを示す：
 EcSlyD - EcSlyD - TpN47 / CD (Swiss Prot P29723
 のaa 352 ~ 434 TpN47)

40

【0029】

【化6】

MKVAKDLVVS LAYQVRTEDG VLVDESPVSA PLDYLHGHGS LISGLETALE GHEVGDKFDV
 AVGANDAYGQ YDENLVQRVP KDVFEMGVDEL QVGMRFLEAET DQGPVPVEIT AVEDDHVVVD
 GNHMLAGQNL KFNVEVVAIR EATEEELAAG HVHGAHDHHD DHDHDGGGSG GSGGGSGGG
 SGGGSGGGKV AKDLVVSLAY QVRTEDGVLV DESPVSAPLD YLHGHGSLIS GLETALEGHE
 VGDKFDVAVG ANDAYGQYDE NLVQRVPEKDV FMGVDELQVG MRFLAETDQG PVPVEITAVE
 DDHVVVDGNH MLAGQNLKFN VEVVAIREAT EEELAHGHVH GAHDHHDHHD HDGGGSGGGG
 GGGSGGGSGG GSGGGPKYEG NIDIGLKGKV LTIGGADAET LMDAAVDVFA DGQPKLVSDQ
AVSLGQNVLS ADETPGTEYT VEVRFKEFGS VRAKVVAQLE HHHHHH

10

【0030】

配列番号7は、実施例1に示すリンカー配列(GGGG)₅GGGを示す。グリシンリ
 ッチ柔軟性リンカー配列を2つの大腸菌SlyD分子の間に挿入し、そしてまたSlyD
 およびTpN47抗原の間にも挿入する。

【0031】

【化7】

GGGSGGGSGG GSGGGSGGG GGG

20

【0032】

配列番号8は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p02-1、Swiss
 Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸30~66
 を示す：

【0033】

【化8】

GYATLSYADY WAGELGQSRD VLLAGNAEAD RAGDLDA

【0034】

配列番号9は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p03-1、Swiss
 Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸106~1
 32を示す：

30

【0035】

【化9】

SRGRKKWEYE TDPSVTKMVR ASASFQD

【0036】

配列番号10は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p04-1、Swiss
 Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸137~
 170を示す：

【0037】

【化10】

GEIKFEAVEG AVALADRASS FMVDSEYKI TNVK

40

【0038】

配列番号11は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p05-1、Swiss
 Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸197~
 219を示す：

【0039】

【化11】

EDSRVTENTN GLKTMLTEDS FSA

【0040】

配列番号12は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p06 - 1、Swiss Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸225～250を示す：

【0041】

【化12】

MESPHDLVVD TVGTGYHSRF GSDAEA

10

【0042】

配列番号13は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p07 - 1、Swiss Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸273～296を示す：

【0043】

【化13】

NFNTVRYDYY GDDASYTNLM ASYG

【0044】

配列番号14は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p08 - 1、Swiss Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸321～362を示す：

20

【0045】

【化14】

FDRFKGSGPG YYRLTLIANG YRDVVADVRF LPKYEGNIDI GL

【0046】

配列番号15は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p09 - 1、Swiss Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸368～388を示す：

【0047】

30

【化15】

TIGGADAETL MDAAVDVFAD G

【0048】

配列番号16は、TpN47ペプチドEcSlyD - TpN47/p10 - 1、Swiss Prot P29723記載の梅毒トレポネーマ47抗原配列のアミノ酸391～434を示す：

【0049】

【化16】

KLVSDQAVSL GQNVLSADFT PGTEYTVEVR FKEFGSVRAK VVAQ

40

【0050】

発明の詳細な説明

本発明は、可溶性梅毒トレポネーマ抗原に、より正確にはトレポネーマ抗原TpN47の可溶性変異体に関する。本発明記載のTpN47抗原は、ドメインC（配列番号1のアミノ酸残基224～351）を欠き、そして安定であるとともに、*in vitro*診断イムノアッセイにおいて免疫反応性である。

【0051】

本発明者らは、形質転換原核宿主細胞から、全長TpN47を均質に精製することに成功した。TpN47の全長型を用いた本発明者らの最初の実験によって、このタンパク質

50

が、中程度に上昇した温度に曝露された際、凝集する傾向があることが明白に明らかになった。全長TpN47は、全長抗原にE c S l y D - E c S l y Dまたはさらに（より熱安定性の）E c S l p A - E c S l p Aなどの非常に可溶性であるタンデムシャペロン融合体を融合させても、35 を超える温度で、不可避免的に高分子量会合物に凝集する。全長TpN47によって提示される安定性の問題を解決するため、本発明者らは、大腸菌において、シャペロン融合タンパク質として小分子TpN47断片をクローニングし、そして過剰発現させ、断片を均質に精製し（クーマシー染色SDS-PAGEゲルによって判断されるように）、そしてそれぞれの抗原性に関して評価した。簡潔には、このアプローチは完全に失敗であった。驚いたことに、10の断片のうち1つしか有意な（かなり劣ってはいたが）抗原性を示さなかった（表2/図8a、TpN47 30~66を参照されたい）。残りの有望な小分子TpN47断片はまったく活性ではなかった。この発見は、驚くべきことに、Baughnら、J. Immunol. (1996) 157(2), 720-731に提供される文献データと一致しない。その結果、本発明者らは、全長TpN47の熱誘導性凝集を回避する別の方法を検索しなければならなかった。

【0052】

TpN47の小分子でそしておそらく構造化されていないペプチド断片に重点を置く代わりに、本発明者らは、TpN47のコンホメーション的にフォールディングされた部分を設計することを試みた。Journal of Biological Chemistry (2002), 277(4), 41857-41864において、Dekらは、TpN47の結晶構造を提示し、そしてこのタンパク質のドメインポロジを明らかにする。この研究にしたがって、TpN47は、4つのドメインからなり、すなわちTpN47は、4つの自律性フォールディング単位を含む。しかし、Dekらは、同定されたドメインの免疫学的特徴に関しては述べていない。

【0053】

驚くべきことに、本発明者らは、TpN47ドメインおよびドメインの組み合わせAB、B、C、CDおよびDを大腸菌宿主において成功裡に発現させることが可能であった。本発明の1つの態様において、TpN47抗原を、S l y D、F k p A、S l p AおよびS k pなどのシャペロンモジュールと融合させて産生した。これらの構築物すべてを均質に精製して、そして自動化E l e c s y s分析装置において、ヒト抗梅毒血清を用いて抗原性に関して評価した。結果は非常に明快であった：抗原性はかなり高く、そしてC < D < C D < B < < A Bの順に増加した。興味深いことに、ドメインCは、温度ストレスアッセイにおいて、不安定であると同定可能であった（ドメインCおよびドメインの組み合わせCDは、>35 の温度でのインキュベーションに際して強力に凝集し、一方、AB、BおよびDは完全に可溶性のままであった）。簡潔には、AB、BおよびDは、全長TpN47に比較した際、わずかに抗原性が減少しているが、可溶性が顕著に改善されたTpN47断片と同定された。したがって、本発明者らが設計した実験のデータは、Cドメインを欠くTpN47変異体が、可溶性および安定性に関して有意に改善されている、説得力がある証拠を提供する。

【0054】

本発明の1つの態様において、したがって、抗原は、梅毒トレポネーマ抗原47（TpN47）のドメインBを含み、そしてTpN47のドメインCを欠き、すなわち本発明は、可溶性梅毒トレポネーマ抗原47（TpN47抗原）であって、前記抗原が配列番号1のアミノ酸残基224~351（ドメインC）を欠くという条件で、そしてTpN47抗原がシャペロンに融合している、配列番号1のアミノ酸残基63~174（ドメインB）を含む、前記抗原に関する。

【0055】

本発明のさらなる態様は、ドメインAおよびBを含み、そしてドメインCを欠く、TpN47抗原である。これは、本発明が、可溶性TpN47抗原であって、前記抗原が配列番号1のアミノ酸残基224~351（ドメインC）を欠くという条件で、配列番号1のアミノ酸残基26~223（ドメインA+B）を含む、前記抗原を含むことを意味する。

10

20

30

40

50

さらなる態様において、TpN47抗原は、ドメインBまたはドメインA+Bを含み、ここでドメインDはTpN47抗原のさらなる部分である。しかし、これらの態様においてもまた、ドメインCは失われている。ドメインDは、配列番号1のアミノ酸残基352~434を含む。やはりこれらの態様において、TpN47抗原はシャペロンに融合している。

【0056】

さらなる態様は、配列番号1のアミノ酸残基63~174(ドメインB)を含む可溶性梅毒トレポネーマ抗原47(TpN47抗原)であって、前記抗原が配列番号1のアミノ酸残基224~351(ドメインC)を欠くという条件で、配列番号1のアミノ酸残基352~434(ドメインD)をさらに含む、前記抗原に関する。

10

【0057】

さらなる態様は、配列番号1のアミノ酸残基26~223(ドメインA+B)を含む可溶性梅毒トレポネーマ抗原47(TpN47抗原)であって、前記抗原が配列番号1のアミノ酸残基224~351(ドメインC)を欠くという条件で、配列番号1のアミノ酸残基352~434(ドメインD)をさらに含む、前記抗原に関する。

【0058】

本発明にしたがって、用語トレポネーマは、梅毒を引き起こす病原体である生物、梅毒トレポネーマに関する完全な用語の短い型であり、そしてどちらの用語も交換可能に使用可能である。

【0059】

「TpN47抗原」は、免疫学的アッセイで使用するための抗原として適切なTpN47アミノ酸配列を含有するタンパク質である。これは、本発明記載の抗原が、生理学的緩衝条件下で、例えばリン酸緩衝系中、周囲温度で、界面活性剤の添加を伴わず、可溶性であることを意味する。抗原はまた、ヒト血清などの単離試料中に存在する、TpN47に特異的な抗体、例えば抗TpN47抗体に結合するか、またはこうした抗体に認識され、そして結合されることも可能である。

20

【0060】

本発明にしたがって、また、TpN47抗原の変異体も含まれる。用語「変異体」は、この背景において、タンパク質に実質的に類似のタンパク質またはタンパク質断片(すなわちポリペプチドまたはペプチド)に関する。特に、変異体は、最も広く行き渡っているタンパク質アイソフォームのアミノ酸配列に比較して、アミノ酸交換、欠失または挿入を示す、アイソフォームであることも可能である。1つの態様において、こうした実質的に類似のタンパク質は、タンパク質の最も広く行き渡っているアイソフォームに対して、少なくとも80%、別の態様において、少なくとも85%または少なくとも90%、さらに別の態様において少なくとも95%の配列類似性を有する。用語「変異体」はまた、グリコシル化またはリン酸化タンパク質などの翻訳後修飾されたタンパク質にも関する。本発明にしたがって、変異体は、*in vitro*診断イムノアッセイにおいて免疫反応性が維持される限り、すなわち変異体が試料中に存在する抗TpN47抗体に結合し、そしてこれを検出可能である限り、TpN47抗原変異体と分類される。「変異体」はまた、例えば、タンパク質または抗原への標識またはキャリア部分の共有または非共有結合によって修飾されているタンパク質または抗原である。ありうる標識は、放射性、蛍光、化学発光、電気化学発光、酵素またはその他、例えばジゴキシゲニンまたはビオチンのようなものである。これらの標識は、当業者に知られる。

30

40

【0061】

本発明記載の抗原を別のタンパク質に融合させてもよい。用語「融合タンパク質」は、本発明において、本発明記載のTpN47抗原に対応する少なくとも1つのタンパク質部分および融合パートナーの役割を果たす別のタンパク質由来の少なくとも1つのタンパク質部分を含むタンパク質を指す。

【0062】

本発明の別の態様にしたがって、TpN47抗原をシャペロンに融合させてもよい。古

50

典型的フォールディングヘルパーとして知られるシャペロンは、他のタンパク質のフォールディングおよび構造完全性の維持を補助するタンパク質である。フォールディングヘルパーの例は、WO 03/000877に詳細に記載される。本発明にしたがって、ペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロン、例えばFKBPファミリーのシャペロンを、TpN47抗原への融合に用いてもよい。TpN47抗原の融合パートナーとして適したFKBPシャペロンの例は、FkpA、SlyDおよびSlpAである。TpN47の融合パートナーとして適したさらなるシャペロンは、Skpであり、これはFKBPファミリーに属さない、大腸菌由来の周辺質三量体シャペロンである。常にシャペロンの完全配列を使用する必要はない。必要な能力および機能をなお所持するシャペロンの機能性断片（いわゆる結合コンピテントモジュール）もまた用いてもよい（WO 98/13496を参照されたい）。

10

【0063】

本発明のさらなる態様にしたがって、FKBPシャペロンの少なくとも1つまたは少なくとも2つのモジュール、例えば大腸菌SlyD、SlpAまたはFkpAを、TpN47抗原の発現のための融合部分として用いる。シャペロンSkpもまた、融合パートナーとして用いてもよい。2つのFKBPシャペロンドメインの融合は、生じる融合ポリペプチドの可溶性改善を生じる。融合部分は、TpN47抗原のN末端に位置してもまたはC末端に位置しても、あるいは両端（サンドイッチ状）に位置してもよい。

【0064】

組換えDNA技術によって、本発明記載のTpN47抗原を生成し、そして調製してもよい。したがって、本発明の別の側面は、上にさらに定義するようなTpN47抗原およびその変異体をコードする組換えDNA分子である。

20

【0065】

用語「組換えDNA分子」は、遺伝子操作技術によって、または化学合成によって、ポリヌクレオチドの単離セグメントの人工的操作によって達成される配列の、そうでなければ分離された2つのセグメントを組み合わせることによって作製される分子を指す。これを行う際、望ましい機能のポリヌクレオチドセグメントをともに連結して、機能の望ましい組み合わせを生じてもよい。原核あるいは低次または高次の真核宿主細胞において、タンパク質を発現させるための組換えDNA技術が、当該技術分野に周知である。これらは、例えば、Sambrookら（1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual）に記載されてきている。

30

【0066】

本発明のさらなる主題は、梅毒トレポネーマ抗原47（TpN47）をコードする組換えDNA分子であって、前記組換えDNA分子が配列番号1のアミノ酸残基224～351（ドメインC）のコード領域を欠くという条件で、配列番号1のアミノ酸残基63～174（ドメインB）記載のアミノ酸配列を含む、TpN47抗原をコードするヌクレオチド配列を含む、前記DNA分子に関連する。

【0067】

本発明の別の態様において、組換えDNA分子は、前記組換えDNA分子が配列番号1のアミノ酸残基224～351（ドメインC）のコード領域を欠くという条件で、配列番号1のアミノ酸残基26～223（ドメインA+B）記載のアミノ酸配列を含むTpN47抗原をコードする。

40

【0068】

本発明のさらなる態様において、組換えDNA分子は、配列番号1のアミノ酸残基63～174（ドメインB）またはアミノ酸残基26～223（ドメインA+B）記載のアミノ酸配列を含むTpN47抗原をコードする。さらに、組換えDNA分子は、ドメインD、すなわち配列番号1のアミノ酸残基352～434を含むアミノ酸配列をコードする。前述のように、やはりこれらの態様において、前記組換えDNA分子が配列番号1のアミノ酸残基224～351（ドメインC）のコード領域を欠くという但し書きが当てはまる。

50

【 0 0 6 9 】

本発明記載の組換えDNA分子はまた、TpN47抗原および融合部分の間に、そしてまたいくつかの融合部分の間に、10～100アミノ酸残基のリンカーペプチドをコードする配列も含有してもよい。こうしたリンカー配列は、例えば、タンパク質分解性切断部位を宿してもよい。

【 0 0 7 0 】

本発明のさらなる側面は、機能可能であるように連結された本発明記載の組換えDNA分子、すなわちTpN47抗原をコードする組換えDNA分子、またはTpN47抗原およびペプチジルプロピルイソメラーゼシャペロン、例えばFKBPシャペロンを含む融合タンパク質をコードする組換えDNA分子であって、FKBPシャペロンがFkpA、S1yDおよびS1pAより選択される前記組換えDNA分子を含む発現ベクターである。代替態様において、組換えDNA分子は、TpN47抗原およびSkpを含む融合タンパク質をコードする。本発明記載の組換えDNAを含む発現ベクターを用いて、細胞不含翻訳系においてTpN47抗原を発現させてもよいし、または当該技術分野に周知の方法にしたがって、TpN47抗原の発現のために宿主細胞を形質転換してもよい。したがって、本発明の別の側面は、本発明記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。本発明の1つの態様において、組換えTpN47抗原は大腸菌細胞において産生される。

【 0 0 7 1 】

やはり意図されるのは、TpN47抗原、およびシャペロン、例えばSkpまたはペプチジルプロピルイソメラーゼクラスのシャペロン、例えばFKBPシャペロンを含有する融合タンパク質としてもまた産生されてもよい、可溶性で、安定な、そして免疫反応性であるTpN47抗原を産生するための方法である。本発明のさらなる態様において、前記FKBPシャペロンは、S1yD、FkpAおよびS1pAからなる群より選択される。

【 0 0 7 2 】

この方法は

a) TpN47抗原をコードする遺伝子を含有する上述の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養し

b) 前記TpN47抗原をコードする遺伝子を発現させ

c) 前記TpN47抗原を精製する

工程を含む。場合によって、さらなる工程d)として、当該技術分野に知られる再フォーリング技術によって、TpN47抗原を可溶性および免疫反応性コンホメーションにするように、機能性可溶化を実行する必要がある。

【 0 0 7 3 】

本発明のさらなる側面は、単離ヒト試料中の抗トレポネーマ抗体の検出のための方法であって、本発明記載のTpN47抗原を抗体の結合パートナーとして用いる、前記方法に関する。本発明はしたがって、単離試料において、トレポネーマに特異的な抗体の検出のための方法であって、

a) 本発明記載のTpN47抗原と体液試料を混合することによって、免疫反応混合物を形成し

b) 体液試料中に存在する前記TpN47抗原に対する抗体が前記TpN47抗原と免疫反応して、免疫反応産物を形成するのを可能にするために十分な期間、前記免疫反応混合物を維持し；そして

c) 任意の前記免疫反応産物の存在および/または濃度を検出する

工程を含む、前記方法に関する。

【 0 0 7 4 】

さらなる側面において、前記方法は、IgGおよびIgMサブクラスのトレポネーマ抗体を検出するのに適している。

抗体の検出のためのイムノアッセイは、当該技術分野に周知であり、そしてこうしたアッセイならびに実際の適用および方法を実行するための方法も同様である。本発明記載のTpN47抗原を用いて、用いる標識に独立に、そして検出様式（例えば放射性同位体ア

10

20

30

40

50

ッセイ、酵素イムノアッセイ、電気化学発光アッセイ等)またはアッセイ原理(例えば試験ストリップアッセイ、サンドイッチアッセイ、間接的試験概念または均質アッセイ等)に独立に、抗トレポネーマ抗体の検出のためのアッセイを改善することも可能である。専門家に知られるすべての生物学的液体が、抗トレポネーマ抗体の検出のための試料として使用可能である。用いられる試料は通常、全血、血清、血漿、尿または唾液のような体液である。

【0075】

本発明のさらなる態様は、いわゆる二重抗原サンドイッチ概念(DAGS)にしたがって行われる、単離試料中の抗トレポネーマ抗体を検出するためのイムノアッセイである。ときに、このアッセイ概念はまた、二重抗原架橋概念とも呼ばれ、これは、2つの抗原が抗体分析物によって架橋されるためである。こうしたアッセイにおいて、抗体が、所定の抗原の少なくとも2つの異なる分子と、その2つの(IgG、IgA、IgE)または10の(IgM)パラトープを結合させる能力が必要であり、そして利用される。

10

【0076】

より詳細には、抗トレポネーマ抗体を含有する試料を、2つの異なるTpN47抗原、すなわち、前記抗原の各々が前記抗トレポネーマ抗体と特異的に結合する、第一の(「固相」)TpN47抗原および第二のTpN47(「検出」)抗原とインキュベーションすることによって、二重抗原架橋形式にしたがった抗トレポネーマ抗体の決定のためのイムノアッセイを実行する。第一の抗原を直接または間接的に固相に結合させてもよく、そして該抗原は通常、生物アフィニティ(bioaffinity)結合対、例えばビオチンおよびアビジンの一部であるエフェクター基を所持する。例えば、第一の抗原をビオチンにコンジュゲート化させる場合、固相をアビジンまたはストレプトアビジンでコーティングする。第二の抗原は標識を所持する。こうして、第一の抗原、試料抗体および第二の抗原を含む免疫反応混合物が形成される。前記抗原への試料の添加前に、または免疫反応混合物を形成した後に、第一の抗原が結合可能な固相を添加する。体液中の前記TpN47抗原に対して、抗トレポネーマ抗体が免疫反応して、免疫反応産物を形成するのに十分な期間、この免疫反応混合物を維持する。次の工程は、液相が固相から分離する分離工程である。最後に、前記免疫反応産物いずれかの存在を、固相または液相または両方で検出する。

20

【0077】

前記DAGSイムノアッセイにおいて、「固相抗原」および「検出抗原」の基本構造は、本質的に同じである。二重抗原架橋アッセイにおいて、免疫学的に交差反応性である、類似のしかし異なるTpN47抗原を用いることも可能である。こうしたアッセイを実行するための本質的な必要条件是、単数または複数の適切なエピトープが両方の抗原上に存在することである。本発明にしたがって、各TpN47抗原に関する異なる融合部分(例えば、固相側上でTpN47に融合したSlyD、および検出側上でTpN47に融合したFkpA)を用いることが可能であり、これは、こうした変異体が、非特異的結合の問題を有意に緩和し、そしてしたがって偽陽性結果のリスクを軽減するためである。

30

【0078】

本発明のさらなる態様は、したがって、本発明記載の第一のTpN47抗原または融合タンパク質、および本発明記載の第二のTpN47抗原または融合タンパク質を用いる、二重抗原架橋にしたがったイムノアッセイである。

40

【0079】

本発明はさらに、抗トレポネーマ抗体の検出のための診断試験において、TpN47の少なくとも1つの抗原の使用に関する。

本発明のさらなる主題は、イムノアッセイのための通常の試験添加剤に加えて、測定しようとするトレポネーマ抗体に特異的に結合するのに適したTpN47抗原の少なくとも1つの抗原を含有し、そしておそらく、標識ならびに必要なであれば他の通常の添加剤を所持する、トレポネーマに対する抗体の検出のための試薬キットである。特に、試薬キットは、抗原各々が配列番号1のアミノ酸残基224~351(ドメインC)に対応する配列を欠くという条件で、配列番号1のアミノ酸残基63~174(ドメインB)を含むTp

50

N 4 7 抗原、または配列番号 1 のアミノ酸残基 2 6 ~ 2 2 3 (ドメイン A + B) を含む T p N 4 7 抗原を含有する。前記試薬キットの一部である抗原はシャペロンに融合している。

【 0 0 8 0 】

さらなる態様において、前記試薬キットは、先に定義するようなドメイン B または A + B を含み、そしてさらにドメイン D、すなわち配列番号 1 のアミノ酸残基 3 5 2 ~ 4 3 4 を含む、T p N 4 7 抗原を含む。また、この態様において、T p N 4 7 抗原はドメイン C を欠き、すなわちアミノ酸残基 2 2 4 ~ 3 5 1 は、この T p N 4 7 抗原には存在しない。

【 0 0 8 1 】

さらに、上に定義するような試薬キットは、平均的な当業者に用いられるような、通常の添加剤、緩衝剤、塩、界面活性剤等を含む、対照および標準溶液、ならびに 1 またはそれより多い溶液中の試薬を含有する。

【 0 0 8 2 】

別の側面は、本発明記載の T p N 4 7 抗原のワクチンとしての使用である。活性成分として免疫原性ポリペプチドを含有するワクチンの調製が当該技術分野に知られる。こうしたワクチンは、一般的に、溶液または懸濁物のいずれかとして、注射剤として調製される。活性成分、すなわち T p N 4 7 抗原またはその融合タンパク質を、薬学的に許容可能であり、そして活性成分と適合する賦形剤、例えば水、水性生理学的緩衝液、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールと混合する。ワクチンは、好適には、注射によって非経口的に投与される。

【 0 0 8 3 】

別の態様は、本発明記載の T p N 4 7 抗原、ならびに T p N 1 7 抗原および T p N 1 5 抗原からなる群より選択される少なくとも 1 つのさらなる梅毒トレポネーマ抗原を含む、少なくとも 2 つの梅毒トレポネーマ抗原の組成物であり、したがって、前記組成物は、T p N 4 7 抗原、T p N 1 7 抗原または T p N 1 5 抗原または T p N 1 5 および T p N 1 7 抗原の両方を含む。さらにさらなる態様は、本発明記載の T p N 4 7 抗原、ならびに T p N 1 7 および T p N 1 5 抗原の両方を含む、少なくとも 3 つの梅毒トレポネーマ抗原の組成物である。

【 0 0 8 4 】

本発明はまた、抗梅毒トレポネーマ抗体の検出のための *in vitro* 診断試験における、本発明記載の T p N 4 7 抗原の使用に関する。

実施例セクションは、本発明をさらに例示する。特に、実施例は、本発明者らが、全長 T p N 4 7 タンパク質分子より、より可溶性でそして有意により熱不安定性でない T p N 4 7 の変異体を開発しそして生成したことを例示する。可溶性および安定性の両方が改善されている。本発明者らの T p N 4 7 変異体は、例えば大腸菌において豊富に過剰発現可能であり、固定金属キレートクロマトグラフィ (I M A C) を通じて、容易に精製および再フォールディングされ、満足できる安定性特性を示し、そしてヒト血清中の抗トレポネーマ抗体を信頼性をもって検出するために使用可能である (さらなる態様において、梅毒トレポネーマ由来の 2 つの他の免疫優性膜タンパク質 T p N 1 7 および / または T p N 1 5 と組み合わせる)。天然オリゴマー由来の F k p A - T p N 4 7 / A B および S k p - T p N 4 7 / A B 融合タンパク質が、I g M 分子さえも検出するのに十分なエピトープ密度で、天然オリゴマーを形成することは注目に値する。本発明者らは、総免疫グロブリンの検出 (すなわち I g G および I g M 両方の検出) のためのイムノアッセイを開発することを目的とするため、オリゴマー種 F k p A - T p N 4 7 / A B および S k p - T p N 4 7 / A B を、D A G S 形式の両方の側での特定因子 (s p e c i f i e r) として (例えば F k p A - T p N 4 7 / A B - ビオチンおよび S k p - T p N 4 7 / A B - ルテニウム、またはその逆)、好適に使用することも可能である。

【実施例】

【 0 0 8 5 】

実施例 1

TpN47およびTpN47シャペロン融合ポリペプチドのクローニングおよび精製
発現カセットのクローニング

Novagen (米国ウィスコンシン州マディソン) の pET24a 発現プラスミドに基づいて、EcSlyD-EcSlyD-TpN47 融合タンパク質をコードする発現カセットを、本質的に記載されるように得た (Scholz, C.ら, J. Mol. Biol. (2005) 345, 1229-1241)。TpN47 抗原の配列を、SwissProt データベースから回収した (SwissProt ID P29723)。N 末端にインフレームで融合させたグリシンリッチリンカー領域を含む、成熟 TpN47 aa21~434 (アミノ酸残基 1~20 に渡るシグナルペプチドを省いた) をコードする合成遺伝子を Medigenomix (ドイツ・マルティンスリート) より購入した。酸化または分子間ジスルフィド架橋などの望ましくない副作用を防止するため、TpN47 の 315 位のユニークなシステイン残基をアラニンに変更した。BamHI および XhoI 制限部位は、それぞれ、TpN47 コード領域の 5' 端および 3' 端にあった。グリシンリッチリンカー領域を通じて連結され、そして C 末端にさらなるリンカー領域部分を含む、2 つの EcSlyD 単位をコードするさらなる合成遺伝子 (配列番号 1 記載の残基 1~165、SwissProt 寄託番号 P0A9K9) を、同様に、Medigenomix から購入した。NdeI および BamHI 制限部位は、それぞれ、このカセットの 5' 端および 3' 端にあった。単純な連結によって、シャペロン部分 EcSlyD-EcSlyD および TpN47 抗原部分のインフレーム融合を可能にするように、遺伝子および制限部位を設計した。偶発性の組換えプロセスを回避し、そして大腸菌宿主における発現カセットの遺伝的安定性を増加させるため、EcSlyD 単位をコードするヌクレオチド配列は縮重しており、伸長されたリンカー領域をコードするヌクレオチド配列も同様であり、すなわち、異なるコドンの組み合わせを用いて、同一アミノ酸配列をコードした。

10

20

【0086】

pET24a ベクターを NdeI および XhoI で消化し、そしてトレポネーマ TpN47 断片 21~434 (Cys 315 Ala) にインフレームで融合させたタンデム-SlyD を含むカセットを挿入した。SlyD または Skp または FkpA を含む発現カセット、ならびに全長 TpN47 と異なるターゲットポリペプチド、特にドメインおよびドメインの組み合わせ、B (TpN47 63~174)、AB (TpN47 26~223)、C (TpN47 224~351)、CD (TpN47 224~434) および D (TpN47 352~434) を含む発現カセットを、それに合うように構築した。すべての組換え融合ポリペプチド変異体は、Ni-NTA 補助精製および再フォールディングを容易にするため、C 末端ヘキサヒスチジンタグを含有した。QuickChange (Stratagene、米国カリフォルニア州ラホヤ) および標準的 PCR 技術を用いて、点突然変異、欠失、挿入および伸長変異体またはそれぞれの発現カセットにおける制限部位を生成した。

30

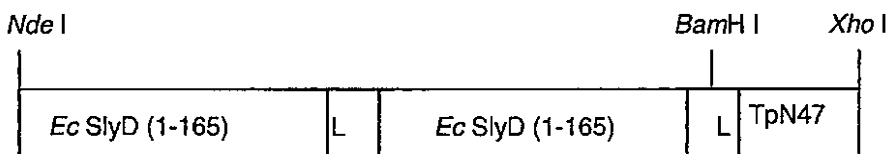
【0087】

以下の図は、N 末端にインフレームで融合した 2 つの SlyD シャペロン単位を所持するトレポネーマ TpN47 全長抗原 21~434 のスキームを示す。SlyD 融合パートナーの大腸菌起源を示すため、示す融合ポリペプチドは、EcSlyD-EcSlyD-TpN47 (21~434) と名付けられてきている。

40

【0088】

【化17】



L = (GGGS)₅GGG-リンカー

50

【0089】

生じたプラスミドの挿入物を配列決定し、そしてこれが所望の融合タンパク質をコードすることが見出された。各個々のTpN47抗原の完全アミノ酸配列を配列番号1~6に示す。リンカーLのアミノ酸配列を配列番号7に示す。

【0090】

TpN47を含む融合タンパク質の精製

実質的に同一のプロトコルを用いることによって、すべてのTpN47融合タンパク質変異体を精製した。特定のpET24a発現プラスミドを宿する大腸菌BL21(DE3)細胞を、カナマイシン(30 μ g/ml)を加えたLB培地中、37 $^{\circ}$ Cで、1.5のOD₆₀₀まで増殖させ、そして1mMイソプロピル- β -チオガラクトシドを添加することによって、細胞質ゾル過剰発現を誘導した。誘導3時間後、遠心分離(5000gで20分間)によって細胞を採取し、凍結し、そして-20 $^{\circ}$ Cで保存した。細胞溶解のため、凍結ペレットを冷却50mMリン酸ナトリウムpH8.0、7.0M GdmCl、5mMイミダゾール中に再懸濁し、そして懸濁物を氷上で2時間、完全に細胞溶解するまで攪拌した。遠心分離および濾過(0.45 μ m/0.2 μ m)後、未精製溶解物を、5.0mM TCEPを含む溶解緩衝液で平衡化させたNi-NTAカラム上に適用した。続く洗浄工程をそれぞれのターゲットタンパク質に合わせて調整し、そして、これは5~15mMイミダゾールの範囲であった(50mMリン酸ナトリウムpH8.0、7.0M GdmCl、5.0mM TCEP中)。少なくとも10~15体積の洗浄緩衝液を適用した。次いで、GdmCl溶液を50mMリン酸カリウムpH8.0、100mM KCl、10mMイミダゾール、5.0mM TCEPに交換し、マトリックス結合タンパク質のコンホメーション再フォールディングを誘導した。同時精製プロテアーゼの再活性化を回避するため、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Complete(登録商標)EDTA不含、Roche)を再フォールディング緩衝液中に含めた。総量15~20カラム体積を一晩反応中に適用した。次いで、3~5カラム体積の50mMリン酸カリウムpH8.0、100mM KCl、10mMイミダゾールで洗浄することによって、TCEPおよびComplete(登録商標)EDTA不含阻害剤カクテルを取り除いた。続いて、非特異的に結合するタンパク質混入物質を除去するため、やはり50mMリン酸カリウムpH8.0、100mM KCl中のイミダゾール濃度を25mMに上昇させた。次いで、同じ緩衝液中の500mMイミダゾールによって、天然タンパク質を溶出させた。Tricine-SDS-Pageによって純度に関してタンパク質含有分画を評価し、そしてプールした。最後に、タンパク質を、サイズ排除クロマトグラフィ(Superdex HiLoad, Amersham Pharmacia)に供し、そしてタンパク質含有分画をプールし、そしてAmiconセル(YM10)において10~20mg/mlに濃縮した。

【0091】

カップリング精製および再フォールディングプロトコルの後、それぞれのターゲットタンパク質に応じて、およそ5~20mgのタンパク質収量が、1gの大腸菌湿細胞から得られた。

【0092】

実施例2分光学的測定

Uvikon XL二重光線分光光度計を用いて、タンパク質濃度測定を行った。Pace(1995), Protein Sci. 4, 2411-2423によって記載される方法を用いることによって、モル消光係数(ϵ_{280})を決定した。別個のTpN47融合ポリペプチドに関して用いたモル消光係数(ϵ_{280})を表1に明記する。

【0093】

表1: 本実験で用いたTpN47融合変異体のタンパク質パラメータ

【0094】

【表 1】

融合タンパク質	TpN47 断片 (aa 残基)	分子量 (Da)	pI	ϵ_{M280} $M^{-1}cm^{-1}$	Abs _{0.1%} (= 1 mg/ml)
TpN47 ドメイン変異体					
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -TpN47	21-434	85390	4.9	63720	0.746
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -TpN47/AB	26-223	61641	4.8	33350	0.541
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -TpN47/B	63-174	52267	4.8	21890	0.419
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -TpN47/D	352-434	48561	4.7	14900	0.307
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -TpN47/C	224-351	52249	4.9	39310	0.725
<i>EcSlyD-EcSlyD</i> -TpN47/CD	224-434	62976	4.8	42290	0.672
TpN47 ペプチド変異体					
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p02-1	30-66	24382	4.7	15930	0.653
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p03-1	106-132	23667	5.1	12950	0.547
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p04-1	137-170	24211	4.8	7450	0.308
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p05-1	197-219	23052	4.8	5960	0.259
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p06-1	225-250	23284	4.8	7450	0.320
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p07-1	273-296	23307	4.8	13410	0.575
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p08-1	321-362	25274	5.0	11920	0.472
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p09-1	368-388	22545	4.7	5960	0.264
<i>EcSlyD</i> -TpN47/p10-1	391-434	25279	5.0	7450	0.295

【0095】

TpN47 ドメイン変異体のアミノ酸配列を配列番号 1 ~ 6 に示す。TpN47 ペプチド変異体 p02-1 ~ P10-1 の Swiss Prot P29723 由来の TpN47 特異的配列を配列番号 8 ~ 16 に要約する。

【0096】

実施例 3融合タンパク質へのビオチンおよびルテニウム部分のカップリング

融合ポリペプチドのリジン - アミノ基を、10 ~ 30 mg/ml のタンパク質濃度で、N-ヒドロキシ-スクシンイミド活性化ビオチンおよびルテニウム標識分子を用いて、それぞれ修飾した。標識/タンパク質比は、それぞれの融合タンパク質に応じて、2 : 1 ~ 5 : 1 (mol : mol) で多様であった。反応緩衝液は、150 mM リン酸カリウム pH 8.0、100 mM KCl、1 mM EDTA であった。反応を室温で 15 分間実行し、そして 10 mM の最終濃度まで、緩衝 L-リジンを添加することによって停止した。標識の加水分解不活性化を回避するため、乾燥 DMSO (Seccosolv 品質、Merck、ドイツ) 中、それぞれのストック溶液を調製した。反応緩衝液中 20% までの DMSO 濃度は、研究したすべての融合タンパク質によってよく許容された。カップリング反応後、ゲル濾過カラム (Superdex 200 HiLoad) 上に、未精製タンパク質コンジュゲートを通過させることによって、未反応未結合標識を除去した。

【0097】

実施例 4

ポリペプチド融合タンパク質の免疫学的反応性

異なる融合タンパク質の免疫学的反応性（すなわち抗原性）を自動化 E l e c s y s（登録商標）2010分析装置（R o c h e D i a g n o s t i c w s G m b H）において評価した。E l e c s y s（登録商標）は、R o c h eグループの登録商標である。二重抗原サンドイッチ形式で測定を行った。

【0098】

E l e c s y s（登録商標）2010のシグナル検出は、電気化学発光に基づく。ビオチン-コンジュゲート（すなわち捕捉抗原）は、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズ表面上に固定され、一方、検出抗原は、シグナル伝達部分として、複合体化ルテニウムカチオン（レドックス状態2+および3+の間で切り替わる）を所持する。特異的免疫グロブリン分析物の存在下で、発色性ルテニウム複合体は固相に架橋され、そして白金電極での励起後、620nmで光を放出する。シグナル出力は、恣意的光単位である。

10

【0099】

二重抗原サンドイッチ（D A G S）イムノアッセイ形式で、組換えトレポネーマTpN47変異体を対で評価した。例えば、E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 / A B（26~223）-ビオチン・コンジュゲートを、各70ng/mlの濃度で、E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 / A B（26~223）-ルテニウム複合体コンジュゲートとともに評価した。さらに、E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 / B（63~174）-ビオチン・コンジュゲートを、各70ng/mlの濃度で、E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 / B（63~174）-ルテニウム複合体コンジュゲートとともに適用した。

20

【0100】

TpN47の融合ポリペプチド変異体のビオチンおよびルテニウム・コンジュゲートを各70ng/mlの濃度で適用した。すべての測定において、化学的に重合した、未標識の過剰量（~10μg/ml）のE c S l y D - E c S l y Dを、抗干渉物質として反応緩衝液中に組み入れ、シャペロン融合単位を通じた免疫学的交差反応を回避した。抗トレポネーマ陰性ヒト血清を対照として用いた。

【0101】

表2（図8a~c）において、TpN47ペプチド融合変異体（表1に列举）の免疫学的活性を示す。全長TpN47分子に比較した際、小分子TpN47断片の抗原性は非常に劣っていることが一目で明らかである。E c S l y D - T p N 4 7 / p 0 2 - 1（TpN47 30~66）のみが、非常に低い度合いではあるが、有意な抗原性を示す。本発明者らの結果から、本発明者らは、TpN47のごくN末端にある部分に、いくつかの弱い直鎖エピトープが存在する可能性がある一方、TpN47分子の残りは本発明者らのD A G S設定で検出可能ないかなる直鎖エピトープも持たないと結論づけられた。この発見は、トレポネーマ抗原TpN47内の免疫優性小分子エピトープに関する文献データ報告と著しく食い違う（B a u g h nら, J o u r n a l o f I m m u n o l o g y（1996）J u l 15; 157（2）: 720-31）。これらの文献データと対照的に、小分子TpN47断片での本発明者らの実験的知見は、直鎖エピトープが、トレポネーマ感染後の体液性免疫反応において、むしろ従属的な役割を果たすことが示唆される。

30

40

【0102】

直接の結果として、本発明者らは、直鎖エピトープを同定するさらなる試みを放棄し、そしてその代わりにコンホメーションエピトープの同定に重点を置いた。この目的を達成するため、本発明者らは、R a n j i tら, J . B i o l . C h e m .（2002）277（44）, p p 41857-41864に開示するTpN47ドメインをターゲットングした。非構造化小分子ペプチドとは異なり、タンパク質の単離されたドメイン（すなわち自律性フォールディング単位）は、定義されたコンホメーションを採用すると推定され、そしてしたがって、コンホメーションエピトープを提示すると予期される。

50

しかし、単離されたTpN47ドメインが、全長タンパク質の構造的背景から取り除かれた際に、天然様コンホメーションを採用可能であるかどうかはまったく明らかでなかった。実際には、単離TpN47ドメインは、小分子非構造化TpN47断片に比較した際、非常に高い免疫学的活性を示すことが明らかになった（結果に関しては、表3、図9を参照されたい）。これらのデータから、本発明者らは、単離ドメインが、実際に、秩序だった天然様コンホメーションを採用することが可能であると推測する。本発明者らの免疫学的評価から判断した際、ドメイン断片の抗原性は、 $C < D < CD < B < AB < ABCD$ の順に増加する；特に、TpN47ドメインの組み合わせABは、抗トレポネーマ陽性ヒト血清と、全長タンパク質のシグナルレベルの約50%を生じる。

【0103】

実施例5

FPLC分析によって評価した際のTpN47ドメイン融合体の熱安定性

TpN47ドメイン（すなわち、定義されたコンホメーションを持つ、秩序だった自律性フォールディング単位）が有意な抗原性を示すという、説得力がある証拠が集められてきていることから、本発明者らは、別個のドメインが、熱ストレスに曝露された際、異なる安定性を所持するかどうか疑問に思った。この疑問に取り組むため、本発明者らはすべてのTpN47ドメイン融合タンパク質を、同一条件下でインキュベーションし、そしてこれらを上昇した温度に供した（150mMリン酸カリウムpH8.0、100mM KCl、0.5mM EDTA中、30、35および40、各1.3mg/mlのタンパク質濃度で一晩インキュベーション）。次いで、本発明者らは、各TpN47融合タンパク質に関して、分析サイズ排除クロマトグラフィ（Superdex 200）によってすべての試料を評価し、そしてシグナル回復（吸収曲線下のピーク面積）および凝集傾向（すなわちゲル濾過カラムのボイド容量における巨大粒子の溶出）の両方をチェックした。結果を図1～6に示す。温度誘導性凝集物を形成する傾向は、全長TpN47 > CD > C > D、B、ABの順に有意に減少することがわかった。簡潔には、TpN47ドメインD、BおよびABは、全長TpN47よりも凝集する傾向がはるかに低い。熱ストレスに際して、これらは、常に、溶出プロファイル中、優れたシグナル回復を示し、そして会合物または凝集物を形成する傾向は無視できる程度にしか示さない。逆に、ドメインCを含むすべてのTpN47変異体（すなわち全長TpN47、C、CD）は、35などの中程度に上昇した温度であっても、凝集する強い傾向を示す。

【0104】

実施例6

Electsys（登録商標）測定によって評価した際のイムノアッセイにおけるTpN47ドメイン融合体の熱安定性

Electsys（登録商標）測定による、別個のTpN47融合タンパク質の熱耐性を確かめるため、EcSlyD - EcSlyD - TpN47変異体を、以下のような上昇した温度条件に供した：EcSlyD - EcSlyD - TpN47ピオチンおよびルテニウム・コンジュゲートを、42で3日間、別個にインキュベーションした。このストレスアッセイ中のコンジュゲートの濃度は、各70ng/ml（～1nM）であり、アッセイ緩衝液は、100mM MES pH6.5、300mM NaCl、2mM EDTAであった。続いて、上述の実験条件下、Electsys（登録商標）2010自動化分析装置において、熱ストレスを掛けた試料を、残渣免疫学的反応性（すなわち残渣抗原性）に関して評価した。EcSlyD - EcSlyD - TpN47の曝露されていない試料（2～8で保存）を参照として用いた。

【0105】

実験結果を表4～6（図10～12）に示す。

表4（図10）は、記載するような自動化Electsys（登録商標）分析装置において、ヒト抗トレポネーマ陽性および抗トレポネーマ陰性血清と、EcSlyD - EcSlyD - TpN47 / AB（26～223）およびEcSlyD - EcSlyD - TpN47 / B（63～174）の免疫学的反応性を示す。42の厳しい3日間インキュベシ

10

20

30

40

50

ヨンの前および後の、抗原変異体両方の成績を示す。表5(図11)は、E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 C (2 2 4 ~ 3 5 1) および E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 D (3 5 2 ~ 4 3 4) の抗原性を示し、そして表6(図12)は、E c S l y D - E c S l y D - T p N 4 7 C D (2 2 4 ~ 4 3 4) および全長 T p N 4 7 (2 1 ~ 4 3 4) の抗原性を示す。

【0106】

実験結果は、シグナル回復に関して、全長 T p N 4 7 タンパク質に勝る熱ストレス T p N 4 7 ドメインの優位性を明らかに立証する。

熱曝露に際して、全長 T p N 4 7 (2 1 ~ 4 3 4) のシグナル回復は、最初の値のほぼ 5 0 % に低下し、一方、T p N 4 7 / B、T p N 4 7 / A B および T p N 4 7 / D のシグナル回復は、それぞれ、最初の値の ~ 9 3 %、~ 8 8 % および 1 0 0 % に達する。したがって、シグナル回復は、全長分子の代わりに T p N 4 7 のドメインを用いた際に、顕著に増進する。

10

【0107】

T p N 4 7 (2 2 4 ~ 3 5 1) の C ドメインが、いかなる免疫学的活性も示さないことは注目に値する(結果に関しては表5、図11を参照されたい)。この発見は、明らかに、他の T p N 4 7 ドメインおよびドメインの組み合わせ、B、A B、C D および D に見出される抗原性と対照的である。外見上、C ドメインは、少なくとも単離されると、T p N 4 7 タンパク質分子の驚くべき抗原性にほとんどまたはまったく寄与しない。

【0108】

T p N 4 7 の C D 融合変異体 (2 2 4 ~ 4 3 4) は、熱ストレス後のシグナル回復が、ほぼ 7 0 % に達し、そして明らかに、他の T p N 4 7 ドメインおよびドメインの組み合わせより劣っている点で顕著である(結果に関しては、表6、図12を参照されたい)。D ドメイン単独のシグナル回復は非常に高く、そして熱ストレス後、ほぼ不変である(表5、図11を参照されたい)。

20

【0109】

要約すると、T p N 4 7 ドメイン B、A B および D は、全長 T p N 4 7 に比較した際、熱曝露に際して、明らかに増進されたシグナル回復を示す。

本発明によれば、ドメイン C (2 2 4 ~ 3 5 1) は、免疫診断目的のために重要でなく、これは T p N 4 7 抗原性に目立って貢献しないためである。さらに、ドメイン C は、ドメイン D と融合された際、構築物 C D (2 2 4 ~ 4 3 4) の安定性を弱め、該構築物は、全長 T p N 4 7 を除いて、試験したすべてのドメインおよびドメインの組み合わせのうち、最低のシグナル回復を示す(~ 7 0 %、結果に関しては、表6、図12を参照されたい)。

30

【0110】

E l e c s y s (登録商標)などの自動化イムノアッセイによって評価した際の、別個の T p N 4 7 ドメインの相対シグナル収量(熱ストレスに際して)は、F P L C 分析における本発明者らの知見とよく一致する。これは、どちらの実験も非常に異なる濃度で行われているため、いっそう驚くべきことである。F P L C 分析中のタンパク質濃度は、中程度のマイクロモル範囲 (1 5 . 2 μ M ~ 2 6 . 7 μ M) であり、一方、免疫学的分析におけるタンパク質濃度は、非常に低いナノモル範囲 (0 . 8 2 n M ~ 1 . 4 4 n M) であった。T p N 4 7 ドメイン C などの凝集誘導ドメインの除去は、高タンパク質濃度の条件下で、最適な結果を生じる(すなわち凝集効果を軽減する)はずである。

40

【0111】

本発明者らの免疫学的データは、ドメイン C の除去が、非常に低いタンパク質濃度の条件下であってさえ、明らかに残りの T p N 4 7 分子の安定性および可溶性の両方を改善することを明確に示す。この発見によって、より頑強なイムノアッセイキットの開発が可能になり、そして抗トレポネーマ抗体の T p N 4 7 に基づく血清学的検出において大きな成果を構成する。

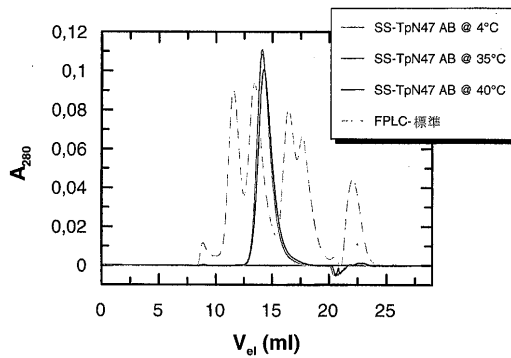
【0112】

50

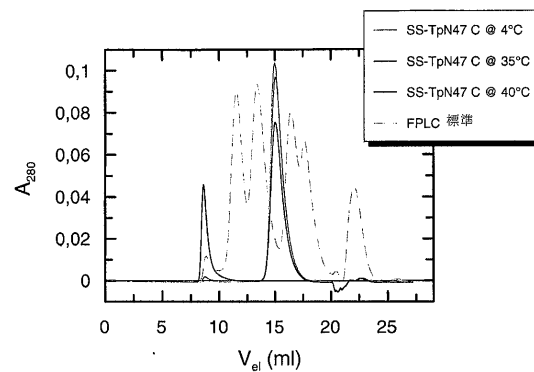
本発明者らの実験は、35 を超える中程度に上昇した温度に曝露された際、全長TpN47が極度に凝集する傾向を有する、説得力がある証拠を提供する。これらの観察から、本発明者らは、アッセイ混合物からこの凝集傾向分子の熱に誘導される喪失を回避するよう用心しない限り、全長組換えTpN47の使用が、トレポネーマイムノアッセイいずれの特異性および感度にも非常に重要であると推測する。TpN47の熱誘導性凝集を回避する（または少なくとも軽減する）単純でそして好適な方法を本出願に開示する：該方法は、抗原性に直接寄与しないようであり、そしてその上、TpN47分子内の一般的に不安定化させる因子を構成するようである、TpN47ドメインCを単純に除去することにある。（AB、BおよびDにおけるように）TpN47ドメインCが除外されるとただちに、TpN47タンパク質分子の熱不安定性は有意に軽減される。

10

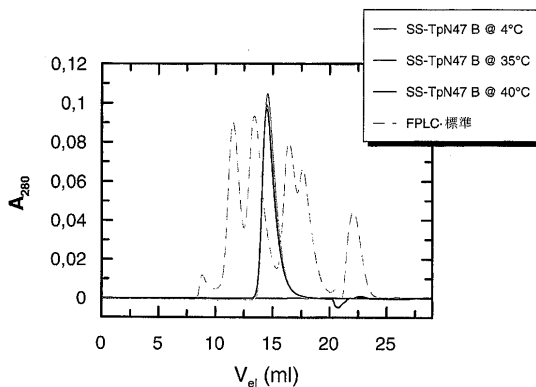
【 図 1 】



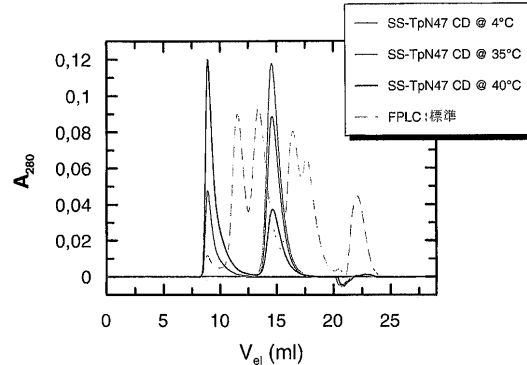
【 図 3 】



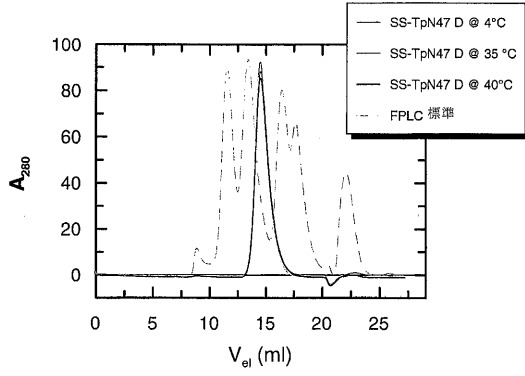
【 図 2 】



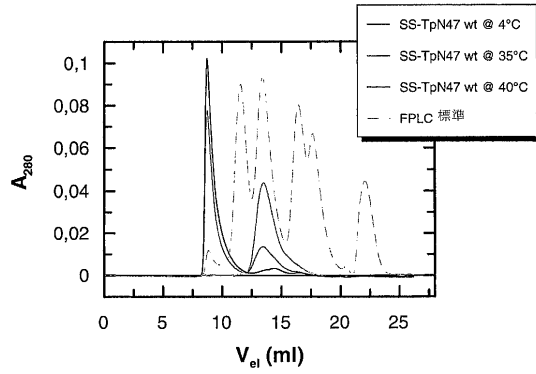
【 図 4 】



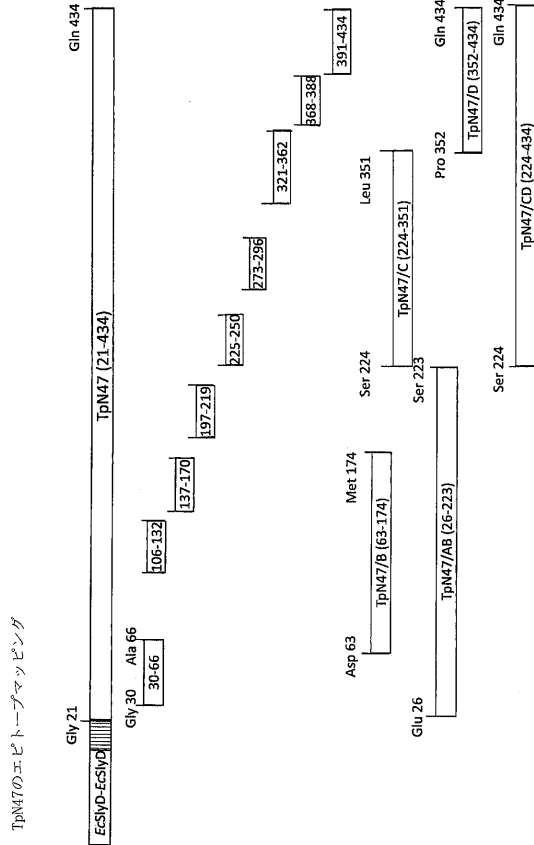
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 - 1 】

表 2 図 8 a / 1 2

実験	1	2	3	10
R1	組換え EcSiD-TpN47 (30-66)	組換え EcSiD-TpN47 (106-132)	組換え EcSiD-TpN47 (137-170)	組換え EcSiD-TpN47 (21-434)
標準	B(DDS)	B(DDS)	B(DDS)	B(DDS)
モノコンジュゲートの濃度	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml
R2	組換え EcSiD-TpN47(30-66)	組換え EcSiD-TpN47(106-132)	組換え EcSiD-TpN47(137-170)	組換え EcSiD-TpN47(21-434)
標準	BPRu(SK(2)DSS)	BPRu(SK(2)DSS)	BPRu(SK(2)DSS)	BPRu(SK(2)DSS)
モノコンジュゲートの濃度	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml
試料	シグナル 動力学	シグナル 動力学	シグナル 動力学	シグナル 動力学
発性血球平均	491	511	501	900
内服ドナー	4320	486	486	486
内服ドナー	4321	496	523	508
内服ドナー	4322	521	609	556
内服ドナー	4511	469	507	486
内服ドナー	4316	485	483	491
内服ドナー	4345	466	512	514
内服ドナー	4314	473	496	487
内服ドナー	4474	482	513	504
内服ドナー	4475	492	502	489
内服ドナー	4476	492	502	489
抗体 IgG	1209A178	1,543	314	524
抗体 IgG	1209A178	1,220	2,249	511
抗体 IgG	1209A177	8,601	17,52	962
抗体 IgG	1209A176	678	1,38	486
抗体 IgG	1209A174	718	1,46	489
抗体 IgM	1209A192	8,201	16,71	580
抗体 IgM	1209A191	10,513	21,42	807
抗体 IgM	1209A188	18,647	37,89	498
抗体 IgM	1209A187	507	1,03	514
抗体 IgM	1209A186	62,458	127,26	5,760

【 図 8 - 2 】

表 2 図 8 b / 1 2

実験	4	5	6	10
R1	組換え EcSiD-TpN47 (197-219)	組換え EcSiD-TpN47 (225-250)	組換え EcSiD-TpN47 (273-296)	組換え EcSiD-TpN47 (21-434)
標準	B(DDS)	B(DDS)	B(DDS)	B(DDS)
モノコンジュゲートの濃度	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml
R2	組換え EcSiD-TpN47(197-219)	組換え EcSiD-TpN47(225-250)	組換え EcSiD-TpN47(273-296)	組換え EcSiD-TpN47(21-434)
標準	BPRu(SK(2)DSS)	BPRu(SK(2)DSS)	BPRu(SK(2)DSS)	BPRu(SK(2)DSS)
モノコンジュゲートの濃度	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml
試料	シグナル 動力学	シグナル 動力学	シグナル 動力学	シグナル 動力学
発性血球平均	503	497	497	900
内服ドナー	4320	496	494	504
内服ドナー	4321	507	500	524
内服ドナー	4322	545	515	558
内服ドナー	4511	497	493	512
内服ドナー	4316	487	496	487
内服ドナー	4345	516	511	512
内服ドナー	4314	477	495	479
内服ドナー	4474	483	496	497
内服ドナー	4475	521	1,04	491
内服ドナー	4476	502	1,00	482
抗体 IgG	1209A179	508	1,01	510
抗体 IgG	1209A178	506	1,01	488
抗体 IgG	1209A177	631	1,25	556
抗体 IgG	1209A176	503	1,00	485
抗体 IgG	1209A174	488	0,97	483
抗体 IgM	1209A192	533	1,06	505
抗体 IgM	1209A191	643	1,28	816
抗体 IgM	1209A188	495	0,98	488
抗体 IgM	1209A187	523	1,04	507
抗体 IgM	1209A186	885	1,96	789

【 8 - 3 】

表 2

図 8 c / 1 2

元種	7	8	9	10
R1	組換え <i>EcSlyD</i> - TpN47 (321-362) B(DD5)	組換え <i>EcSlyD</i> - TpN47 (369-388) B(DD5)	組換え <i>EcSlyD</i> - TpN47 (391-434) B(DD5)	組換え <i>EcSlyD</i> - TpN47 (21-434) B(DD5)
R2	70 ng/ml TpN47(321-362) BPrU(SK(2)DSS)	70 ng/ml TpN47(369-388) BPrU(SK(2)DSS)	70 ng/ml TpN47(391-434) BPrU(SK(2)DSS)	70 ng/ml TpN47(21-434) BPrU(SK(2)DSS)
測定項目	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml
測定方法	シグナル 検出力	シグナル 検出力	シグナル 検出力	シグナル 検出力
検出率 (%)	498 1.00	489 1.00	518 1.00	900 1.00
内部標準	4320	458 0.98	482 0.99	502 0.57
内部標準	4321	503 1.01	495 1.01	521 1.01
内部標準	4322	553 1.11	518 1.06	577 1.11
内部標準	4511	488 0.98	478 0.98	531 1.02
内部標準	4316	478 0.96	487 1.00	503 0.97
内部標準	4345	500 1.01	496 1.01	530 1.02
内部標準	4314	478 0.96	473 0.97	485 0.94
内部標準	4474	491 0.99	490 1.00	514 0.99
内部標準	4475	495 0.99	478 0.96	503 0.97
内部標準	4476	502 1.01	492 1.01	517 1.00
検出率 (%)	508 1.02	492 1.01	515 0.99	91.925 102.13
検出率 (%)	487 0.98	494 1.01	523 1.01	10.326 11.47
検出率 (%)	635 1.28	556 1.14	845 1.63	200.660 222.93
検出率 (%)	507 1.02	492 1.01	528 1.02	37.500 41.66
検出率 (%)	480 0.98	468 0.96	500 0.98	225.310 250.32
検出率 (%)	498 1.00	485 0.99	576 1.11	171.322 190.34
検出率 (%)	480 0.96	569 1.20	688 1.33	109.434 121.58
検出率 (%)	482 0.97	483 0.99	508 0.98	160.090 177.86
検出率 (%)	506 1.02	514 1.05	531 1.02	9.991 11.10
検出率 (%)	1.282 2.58	720 1.47	1.656 3.20	164.024 182.23

【 9 】

Figure 9/12

R1: <i>EcSlyD</i> - <i>EcSlyD</i> -TpN47	A-B (26-223)	B (63-174)	C (224-351)	D (352-434)	CD (224-434)	ARCd (21-434)
R2: <i>EcSlyD</i> - <i>EcSlyD</i> -TpN47	A-B (26-223)	B (63-174)	C (224-351)	D (352-434)	CD (224-434)	ARCd (21-434)
測定項目	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml	70 ng/ml
測定方法	シグナル 検出力	シグナル 検出力	シグナル 検出力	シグナル 検出力	シグナル 検出力	シグナル 検出力
検出率 (%)	454	467	594	472	541	515
内部標準	4320	476 1.02	580 0.98	477 1.01	529 0.98	518 1.01
内部標準	4321	476 1.02	608 1.02	482 1.02	551 1.02	528 1.02
内部標準	4322	468 1.03	623 1.05	481 1.02	557 1.03	525 1.02
内部標準	4475	449 0.98	568 0.99	471 1.00	542 1.00	519 1.01
内部標準	4474	444 0.98	561 1.00	459 0.97	551 1.02	519 1.01
内部標準	4345	465 1.02	574 0.97	509 1.08	558 0.99	508 0.98
内部標準	4314	449 0.99	495 0.96	448 0.95	527 0.98	494 0.96
内部標準	4316	447 0.98	460 0.96	456 0.97	534 0.99	503 0.96
内部標準	4476	453 1.00	596 1.00	462 0.98	540 1.00	527 1.02
検出率 (%)	12.359 17.217	7.615 11.616	24.63 36.30	15.227 28.17	20.922 37.49	57.49
検出率 (%)	6.680 9.608	4.308 6.308	13.315 19.965	8.614 12.908	11.711 20.922	32.601
検出率 (%)	60.282 86.633	41.969 59.633	113.272 163.633	73.633 106.633	106.633 153.633	306.633
検出率 (%)	6.447 9.063	4.247 5.947	12.897 17.897	8.447 11.647	11.647 16.447	32.447
検出率 (%)	44.791 62.447	29.447 41.447	88.447 122.447	58.447 81.447	81.447 114.447	244.447
検出率 (%)	75.638 106.633	50.638 71.638	132.638 186.633	88.638 122.638	122.638 174.638	344.638
検出率 (%)	121.724 167.268	81.724 114.724	207.268 290.268	140.268 194.268	194.268 274.268	744.268
検出率 (%)	45.905 64.271	30.271 42.271	76.271 106.271	51.271 71.271	71.271 100.271	244.271
検出率 (%)	162.863 226.863	108.863 149.863	276.863 386.863	186.863 260.863	260.863 364.863	944.863

表 3

【 10 】

表 4

R1	<i>EcSlyD</i> - <i>EcSlyD</i> -TpN47 [A] -Bi				<i>EcSlyD</i> - <i>EcSlyD</i> -TpN47 [B] -Bi			
	TpN47 (26-223)				TpN47 (63-174)			
	72h 4°C	72h 42°C	72h 4°C	72h 42°C	72h 4°C	72h 42°C	72h 4°C	72h 42°C
検出率 (%)	2.892 6.44	2.691 5.88	1.682 3.94	1.682 3.78	1.682 3.78	1.682 3.78	1.682 3.78	1.682 3.78
検出率 (%)	47.659 106	42.159 93.1	45.895 97.2	42.945 91.8	45.895 97.2	42.945 91.8	45.895 97.2	42.945 91.8
検出率 (%)	37.619 83.8	33.297 73.5	38.750 77.8	35.793 72.2	38.750 77.8	35.793 72.2	38.750 77.8	35.793 72.2
検出率 (%)	17.346 38.7	15.372 33.9	10.361 21.9	9.617 20.5	10.361 21.9	9.617 20.5	10.361 21.9	9.617 20.5
検出率 (%)	18.178 40.5	15.656 34.6	10.606 22.5	9.703 20.9	10.606 22.5	9.703 20.9	10.606 22.5	9.703 20.9
検出率 (%)	23.179 51.6	20.424 45.1	13.492 28.6	12.700 27.1	13.492 28.6	12.700 27.1	13.492 28.6	12.700 27.1
検出率 (%)	447 1.00	447 0.987	478 1.01	468 0.989	478 1.01	468 0.989	478 1.01	468 0.989
検出率 (%)	450 1.00	467 1.03	462 0.979	463 0.990	462 0.979	463 0.990	462 0.979	463 0.990
検出率 (%)	449 1.00	460 1.02	482 1.02	471 1.01	482 1.02	471 1.01	482 1.02	471 1.01
検出率 (%)	450 1.00	437 0.966	466 0.987	470 1.01	466 0.987	470 1.01	466 0.987	470 1.01
検出率 (%)	449	453	472	468	472	468	472	468

【 11 】

表 5

R1	<i>EcSlyD</i> - <i>EcSlyD</i> -TpN47 [C] -Bi				<i>EcSlyD</i> - <i>EcSlyD</i> -TpN47 [D] -Bi			
	TpN47 (224-351)				TpN47 (352-434)			
	72h 4°C	72h 42°C	72h 4°C	72h 42°C	72h 4°C	72h 42°C	72h 4°C	72h 42°C
検出率 (%)	619 1.01	658 1.03	1,417 3.02	1,424 3.03	619 1.01	658 1.03	1,417 3.02	1,424 3.03
検出率 (%)	618 1.01	665 1.04	1,684 3.59	1,673 3.56	618 1.01	665 1.04	1,684 3.59	1,673 3.56
検出率 (%)	643 1.06	680 1.03	5,031 10.7	5,133 10.9	643 1.06	680 1.03	5,031 10.7	5,133 10.9
検出率 (%)	612 1.00	670 1.05	4,009 8.54	4,180 8.91	612 1.00	670 1.05	4,009 8.54	4,180 8.91
検出率 (%)	655 1.07	689 1.05	2,264 4.82	2,370 5.05	655 1.07	689 1.05	2,264 4.82	2,370 5.05
検出率 (%)	624 1.02	659 1.03	2,301 4.90	2,386 5.04	624 1.02	659 1.03	2,301 4.90	2,386 5.04
検出率 (%)	623 1.02	655 1.03	2,733 5.82	2,844 6.06	623 1.02	655 1.03	2,733 5.82	2,844 6.06
検出率 (%)	607 1.00	648 1.01	460 0.98	469 0.98	607 1.00	648 1.01	460 0.98	469 0.98
検出率 (%)	614 1.01	626 0.981	475 1.01	480 1.01	614 1.01	626 0.981	475 1.01	480 1.01
検出率 (%)	610 1.00	645 1.01	469 1.00	468 1.00	610 1.00	645 1.01	469 1.00	468 1.00
検出率 (%)	608 1.00	635 0.995	472 1.01	471 1.00	608 1.00	635 0.995	472 1.01	471 1.00
検出率 (%)	610	658	469	469	610	658	469	469

【 1 2 】

表 6

R1	EcsSYD-EcsSYD-TpN47[CD] -BI TpN47 (224-434)				EcsSYD-EcsSYD-TpN47[ABCD] -BI TpN47 (21-434)			
	70ng/ml				70ng/ml			
	72h 4°C	72h 42°C	シグナル強さ		72h 4°C	72h 42°C	シグナル強さ	
	EcsSYD-EcsSYD-TpN47[CD] -Ru TpN47 (224-434)				EcsSYD-EcsSYD-TpN47[ABCD] -Ru TpN47 (21-434)			
R2	70ng/ml				70ng/ml			
	72h 4°C	72h 42°C	シグナル強さ		72h 4°C	72h 42°C	シグナル強さ	
	カウント	SD	カウント	SD	カウント	SD	カウント	SD
	BM 200830	1,803	3.41	1,442	2.67	80.0%	8.50	2,217
BM 200831	2,272	4.30	1,775	3.29	78.1%	5.93	2,009	4.80
BM 202017	7,532	14.3	5,116	9.48	67.9%	77.703	155	44.871
BM 202018	5,967	11.3	4,044	7.49	67.8%	62.711	125	36.044
BM 206252	3,531	6.68	2,550	4.72	72.2%	22.806	45.6	10.179
BM 206253	3,465	6.56	2,565	4.75	74.0%	23.101	46.2	10.556
BM 206254	4,231	8.01	2,958	5.48	68.9%	29.053	58.2	13.151
Trima #097	531	1.006	536	0.993	101%	482	0.984	540
Trima #098	531	1.005	539	0.988	101%	489	0.998	546
Trima #099	526	0.995	548	1.014	104%	505	1.011	547
Trima #100	525	0.994	537	0.985	102%	503	1.006	542
BM平均	528		540			500		544

【 配列表 】

000598565700001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100157923
弁理士 鶴喰 寿孝
- (72)発明者 ファーツ, エルケ
ドイツ国 8 2 3 8 6 フーグルフィンゲ, シュタインクロイツ 1
- (72)発明者 シャアーシュミット, ペーター
ドイツ国 8 9 0 7 3 ウルム, ウンター・デア・メッツィヒ 8
- (72)発明者 シュミット, ウルバン
ドイツ国 8 2 4 3 1 コツヘル, オルタラー・シュトラーセ 1 3
- (72)発明者 ショルツ, クリステリアン
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ジンデルスドルファー・シュトラーセ 3 5 アー

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 特開2009-284902(JP, A)
米国特許第05681934(US, A)
特開平11-287804(JP, A)
特開平11-014627(JP, A)
国際公開第2011/125872(WO, A1)
Expression of *Treponema pallidum* 47 ku fragments and analysis of its epitope., Xiamen
Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 2008年, 47(6), 874-878

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 14/20
C12N 15/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)
WPIDS(STN)

专利名称(译)	可溶性免疫反応性梅毒トレポネーマ(Treponemapallidum)TpN47抗原		
公开(公告)号	JP5985657B2	公开(公告)日	2016-09-06
申请号	JP2014552565	申请日	2013-01-16
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ファーツエルケ シャアーシュミットペーター シュミットウルバン シヨルツクリスティアン		
发明人	ファーツ,エルケ シャアーシュミット,ペーター シュミット,ウルバン シヨルツ,クリスティアン		
IPC分类号	C07K14/20 C12N15/09 C12P21/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/571 C07K14/20 C07K2319/00 G01N2333/20 G01N2469/20		
FI分类号	C07K14/20 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA.A C12P21/00.C G01N33/53.N		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 鶴喰 寿孝		
审查员(译)	三罗·哈马达		
优先权	2012000310 2012-01-19 EP		
其他公开文献	JP2015506364A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及包含完整TpN47蛋白分子的至少结构域B或至少结构域A和B，任选地结构域D的梅毒螺旋体抗原47 (TpN47抗原)的可溶变体，条件是所有抗原缺少结构域C(氨基酸残基TpN47的224到351)。此外，本发明涵盖了编码抗原的DNA，产生这些抗原的方法以及这些抗原在免疫诊断测定中用于检测分离样品中针对梅毒螺旋体的抗体的用途。

