

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-534831

(P2004-534831A)

(43) 公表日 平成16年11月18日(2004.11.18)

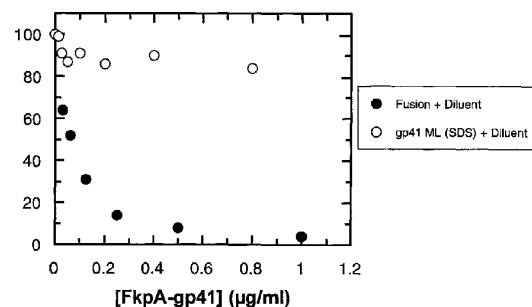
(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 19/00	C07K 19/00	4B064
A61K 39/21	A61K 39/21	4B065
A61P 37/02	A61P 37/02	4C085
C07K 14/16	C07K 14/16	4H045
C07K 14/245	C07K 14/245	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 127 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-507262 (P2003-507262)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成14年6月24日 (2002.6.24)		エフ・ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月19日 (2003.12.19)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/006956		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02003/000877		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成15年1月3日 (2003.1.3)		グレンツァーヘルストラッセ124
(31) 優先権主張番号	01115225.3	(74) 代理人	100095832
(32) 優先日	平成13年6月22日 (2001.6.22)		弁理士 細田 芳徳
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	ショルツ, クリスチャン
(31) 優先権主張番号	01120939.2		ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001.8.31)		77 ジンデルスドルファー シュトラー
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		セ 35アー
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 レトロウイルス表面糖タンパク質を含む可溶性複合体

(57) 【要約】

本発明は、HIV感染の診断に関する。本発明は特に、可溶性のレトロウイルス表面糖タンパク質 - (または膜貫通糖タンパク質) - シャペロン複合体の生成、および特に、好ましくは二重抗原架橋コンセプトによる、イムノアッセイにおけるHIVに対する抗体の検出におけるシャペロン抗原複合体の有利な使用、または免疫原としての使用を教示している。本発明はまた、それぞれ、HIV-1 gp41の改変体、またはHIV-2 gp36の改変体、ならびにペプチジル - プロリル - イソメラーゼクラスのシャペロンから選択されたシャペロンを含む可溶性の複合体を開示する。それぞれ、HIV-1 gp41の、またはHIV-2 gp36のNヘリックス状ドメインにおいて、特定のアミノ酸置換を含む改変体がまた記載される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バッファー中で、本質的に不溶性である標的タンパク質とペプチジル-プロリル-イソメラーゼクラスシャペロンとを混合する工程、ここで該タンパク質および該シャペロンの両方が可溶化される、および形成されるタンパク質-シャペロン複合体が可溶である生理的条件下にバッファーを調整する工程を含む、本質的に不溶性である標的タンパク質およびペプチジル-プロリル-イソメラーゼクラスシャペロンを含有する可溶性複合体の製造方法。

【請求項 2】

生理的バッファーが10～200mMの濃度のバッファー化合物および20～500mMの総濃度の塩を含有する請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

タンパク質が組換え産生される請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ペプチジルプロリルイソメラーゼが組換え産生される請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼが組換え産生される請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

タンパク質がアミロイド形成性タンパク質である請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

アミロイド形成性タンパク質がレトロウイルス表面糖タンパク質である請求項 6 記載の方法。

20

【請求項 8】

タンパク質がHIV-2 gp36またはHIV-1 gp41である請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

ペプチジルプロリルイソメラーゼがペプチジルプロリルイソメラーゼの結合コンピテント断片である請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

バッファー中でレトロウイルス表面糖タンパク質とペプチジルプロリルイソメラーゼとを混合する工程、ここでレトロウイルス表面糖タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼの両方が可溶化され、複合体を形成する、および複合体が可溶である生理的条件下にバッファーを調整する工程を含む、可溶性レトロウイルス表面糖タンパク質-シャペロン複合体の製造方法。

30

【請求項 11】

レトロウイルス表面糖タンパク質が組換え産生される請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

ペプチジルプロリルイソメラーゼが組換え産生される請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

レトロウイルス表面糖タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼが組換え産生される請求項 10 記載の方法。

40

【請求項 14】

レトロウイルス表面糖タンパク質がHIV gp36またはgp41である請求項 10 記載の方法。

【請求項 15】

ペプチジルプロリルイソメラーゼが、ペプチジルプロリルイソメラーゼの結合コンピテント断片を含有する請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

バッファー中でペプチジルプロリルイソメラーゼに共有結合したレトロウイルス表面糖タンパク質を可溶化させる工程、ここでレトロウイルス表面糖タンパク質が可溶化される、およびレトロウイルス表面糖タンパク質-シャペロン複合体が可溶である生理的条件下にバッファーを調整する工程を含む、可溶性レトロウイルス表面糖タンパク質-シャペロン複

50

合体の製造方法。

【請求項 17】

ペプチジルプロリルイソメラーゼがFKBPシャペロンである請求項 1、10 または 16 記載の方法。

【請求項 18】

FKBPシャペロンがSlyD、FkpAおよびトリガー因子からなる群より選ばれる請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

レトロウイルス表面糖タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼを含有してなる可溶性複合体。

10

【請求項 20】

レトロウイルス表面糖タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンが共有結合されているレトロウイルス表面糖タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼを含有してなる可溶性複合体。

【請求項 21】

共有結合が化学的共役を含む請求項 20 記載の複合体。

【請求項 22】

共有結合が組換え結合を含む請求項 21 記載の複合体。

【請求項 23】

組換え結合がペプチドリンカーを含む請求項 22 記載の複合体。

20

【請求項 24】

ペプチドリンカーが少なくとも10アミノ酸を含有してなる請求項 23 記載の複合体。

【請求項 25】

ペプチドリンカーが少なくとも15アミノ酸を含有してなる請求項 23 記載の複合体。

【請求項 26】

ペプチドリンカーが多くとも50アミノ酸を含有してなる請求項 23 記載の複合体。

【請求項 27】

ペプチドリンカーが多くとも40アミノ酸を含有してなる請求項 23 記載の複合体。

【請求項 28】

請求項 19 ~ 27 いずれか記載の可溶性複合体を含有してなる試薬の組成物。

30

【請求項 29】

サンプルと、表面糖タンパク質とペプチジルプロリルイソメラーゼシャペロンを含有する複合体を含有する組成物とを接触させる工程、および結合抗体を検出する工程を含む、サンプル中のエンベロープウイルス表面糖タンパク質に対する少なくとも1つの抗体を検出する方法。

【請求項 30】

接触させる工程が、表面糖タンパク質への抗体の結合に適切な条件下で行われる請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

結合した抗体の検出がサンプル中の抗-ウイルス抗体の存在を示す請求項 30 記載の方法

40

【請求項 32】

第1のシャペロン-抗原複合体を含有する第1の抗原および第2のシャペロン-抗原複合体を含有する第2の抗原を含む二重抗原架橋概念によるイムノアッセイ。

【請求項 33】

第1のシャペロンおよび第2のシャペロンが1つの種に由来する異なる分子である請求項 32 記載のイムノアッセイ。

【請求項 34】

第1のシャペロンおよび第2のシャペロンが異なる種に由来する請求項 32 記載のイムノアッセイ。

50

【請求項 35】

第1のシャペロンが好熱細菌に由来する請求項32～34いずれか記載のイムノアッセイ。

【請求項 36】

第2のシャペロンが好熱細菌に由来する請求項32～34いずれか記載のイムノアッセイ。

【請求項 37】

第1のシャペロンおよび第2のシャペロンが好熱細菌に由来する請求項32または34記載のイムノアッセイ。

【請求項 38】

第1の抗原複合体が固相結合基を含有する請求項32記載のイムノアッセイ。

【請求項 39】

第2の抗原複合体がマーカース基を含有する請求項32記載のイムノアッセイ。

【請求項 40】

可溶性レトロウイルス表面糖タンパク質-シャペロン複合体を含有するワクチンを被験体に注入し、それにより被験体においてレトロウイルス表面糖タンパク質に結合する抗体を誘発する工程を含む、免疫応答の誘発方法。

【請求項 41】

請求項10記載の可溶性複合体を細胞に投与することを含む、細胞へのウイルス侵入の阻害方法。

【請求項 42】

ウイルス侵入の阻害が膜融合を阻害することを含む請求項41記載の方法。

【請求項 43】

生理的バッファーが、10～200mMの濃度のバッファー化合物および20～500mMの総濃度の塩を含む請求項41記載の方法。

【請求項 44】

タンパク質が組換え産生される請求項41記載の方法。

【請求項 45】

ペプチジルプロリルイソメラーゼが組換え産生される請求項41記載の方法。

【請求項 46】

タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼが組換え産生される請求項41記載の方法。

【請求項 47】

タンパク質がアミロイド形成性タンパク質である請求項41記載の方法。

【請求項 48】

タンパク質がレトロウイルス表面アミロイド形成性糖タンパク質である請求項41記載の方法。

【請求項 49】

タンパク質がHIV-2 gp36またはHIV-1 gp41である請求項41記載の方法。

【請求項 50】

ペプチジルプロリルイソメラーゼがペプチジルプロリルイソメラーゼの結合コンピテント断片である請求項41記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、HIV感染の診断に関する。本発明は特に、可溶性のレトロウイルス表面糖タンパク質 - (または膜貫通糖タンパク質) - シャペロン複合体の生成、および特に、好ましくは二重抗原架橋コンセプト (doubleantigen bridge concept) による、イムノアッセイにおけるHIVに対する抗体の検出におけるシャペロン抗原複合体の有利な使用、または免疫原としての使用を教示している。本発明はまた、それぞれ、HIV-1gp41の改変体、またはHIV-2 gp36の改変体、ならびにペプチジル - プロリル - イソメラーゼクラスのシャペロ

10

20

30

40

50

ンから選択されたシャペロンを含む可溶性の複合体を開示する。それぞれ、HIV-1gp41の、またはHIV-2 gp36のNヘリックス状ドメインにおいて、特定のアミノ酸置換を含む改変体がまた記載される。

【0002】

背景

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、後天性免疫不全症候群の因子であり、通常、その頭文字によって、AIDSと呼ばれる。このウイルスの株には、HIV-1、およびHIV-2と命名された2つの主な株が存在する。HIウイルスは、現在、広範に伝播しており、そして世界的な健康および保健に対して重大な脅威となっており、このせいで、公的な保健機関は、HIVの診断およびAIDSの治療に関して、莫大な金額を費やさせられる。

10

【0003】

ウイルス伝播の経路の1つは、感染した血液または血液製品の輸血である。実質的に全ての先進工業国、および多くの発展途上国は、現在のところ、このウイルスのさらなる伝播を防ぐためには、全ての献血の強制的な検査を必要とする。血液によるHIV感染を、できるだけ確実に、かつ感染後すぐに診断することが、この分野における、全ての診断方法の課題である。

【0004】

基本的に、以下の3つの異なる診断様式が利用可能である：

- (1) ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような鋭敏な核酸診断手順による、血液由来のウイルスゲノム材料の診断、
- (2) 血液由来のウイルス抗原の検出、および
- (3) 体液由来のHIVに対する抗体の検出。

20

【0005】

HIV感染の経過の間、いくつかの診断上別個で、かつ診断上関連する段階が知られている。感染の初期段階では、HIVウイルス由来のタンパク質またはポリペプチドのみが見出され得る（「ウイルス感染期（viraemic phase）」）が、抗HIV抗体はまだ存在しない。その後の、セロコンバージョンと名付けられる段階で、HIV抗原に対する抗体が出現し、一方でウイルス抗原の量（ウイルス量）が低下する。セロコンバージョンの初期段階で形成される抗体のほとんどが、クラスMの免疫グロブリン（IgM）に属する。後に、HIVに対する免疫応答は、クラスGの免疫グロブリン（IgG）に切り換わり、次にこれが、HIVに対する抗体のほとんどを構築する。感染のさらなる経過の間、抗HIV抗体のレベルは、低下し得るが、体液中のウイルス量（ウイルス粒子またはウイルス抗原の存在）は再度増大し得る。HIV感染の存在についてのスクリーニングは、好ましくは、HIV抗原に対する抗体を検出する血清学的アッセイ（時々、HIV抗原の検出と組み合わせる）によって行われる。患者内の免疫応答は、感染の経過中に変化し、そしてまた患者間で異なるので、サブクラスIgM、およびIgGに属する抗HIV抗体を検出する、極めて感受性でかつ信頼のできるイムノアッセイを有することが重要である。HIV感染の検出のための多くの異なるアプローチが記載されている。ウイルスタンパク質に対する抗体の、早期で、信頼でき、かつ鋭敏な検出は、重大でかつ大変重要である。

30

【0006】

ウイルスタンパク質（しばしば、ウイルス抗原と名付けられる）は、感染の発現時、およびこの疾患の非常に後期段階でのみ検出可能であり得る。従って、p24（HIV-1由来）、またはp26（HIV-2由来）（両方ともウイルスのコアタンパク質である）を測定するアッセイなどの、ウイルス抗原の検出のためのアッセイは、HIV感染を確実に検出するために他の診断手段と組み合わせるのみ用いられ得る。

40

【0007】

宿主中において抗体形成を誘導し得、それによって診断手順において抗原として用いられ得る、ウイルス抗原の3つのグループが、理論上利用可能である。これらは、エンベロープタンパク質（env遺伝子領域によってコードされる）、ウイルス酵素、または調節性タンパク質（例えば、逆転写酵素、またはインテグラーゼ）（pol遺伝子領域によってコー

50

ドされる)、および構造的なコアタンパク質(gag遺伝子領域によってコードされる)である。HIV-1、およびHIV-2の両方におけるウイルスエンベロープタンパク質は、ポリペプチド前駆体タンパク質として合成される糖タンパク質である(HIVに関しては、gp160、HIV-2に関してはgp140)。これらの高分子量前駆体は、合成後、切断されて、それぞれ、gp120、およびgp41(HIV-1)、またはgp110、およびgp36(HIV-2)を生じる。これらの大きいポリペプチド(それぞれ、gp120、またはgp110)は、表面サブユニットを形成し、これがルーズな接触を介して、膜を貫通する、さらに小さいポリペプチド(それぞれ、gp41、およびgp36)に会合する。多くの宿主(患者)においては、エンベロープ糖タンパク質が、抗ウイルス免疫応答の好ましい標的である。Ratner, Lら、Nature 313(1985)277-84によって、特にこれらのエンベロープタンパク質の膜貫通(すなわち、それぞれgp41、またはgp36)は、これらのウイルスタンパク質の中でも最も免疫学的な可能性を保有することが実証された。

10

【0008】

HIウイルスによってコードされるポリペプチドを使用する、例えば、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)のようなイムノアッセイ法は、診断、およびスクリーニングにおいては広範に用いられている。ウイルスポリペプチドは、ウイルス材料から直接調製されるか、または組み換えDNA技術を用いるインビトロもしくはインビボの発現系に由来する。抗原生成の両方の方法とも、重大な限界がある。ウイルス調製物由来のポリペプチドは、生存可能なウイルス、または感染性遺伝子材料によって汚染され得、これによって、この材料を用いる人に対して害をもたらす。組み換え体由来材料は、非HIV宿主タンパク質によって汚染され得、これによって、このようなアッセイの特異性の低下、または感度の低下が生じ得る。

20

【0009】

ウイルス病原体のような、病原性因子に対する抗体の検出において、例えば、US4,945,042号に記載される、二重抗原架橋形式(double antigen bridge format)に従って、きわめて高頻度に、かつ極めて有利な抗体検出系が用いられる。この架橋コンセプトによるイムノアッセイは、固相に直接または間接的に結合した抗原、および同じまたは交差反応性の容易に可溶性の抗原(直接または間接的に検出可能である)の使用を必要とする。検討中の抗体は、もし存在するならば、固相結合抗原と、標識された検出抗原との間の架橋を形成する。2つの抗原が、特定の抗体によって架橋される場合にのみ、陽性のシグナルが生じる。

30

【0010】

抗HIV抗体の検出のための抗原として組換え産生されたgp41を用いるいくつかの試みが記載されている。組換え産生されたgp41は、抗HIV抗体を検出するために用いられ得るが、いくつかの限界を伴う。このようなgp41は、抗HIV抗体を測定するために、単独で、または他のHIV抗原と組み合わせでいずれかで用いられる。今日、HIV抗原、および/または抗HIV抗体の両方の検出を独立して目的とするアッセイが公知である。W093/21346においては、HIV-1gp41、およびHIV-2 gp36に対するgp24の抗原および抗体の同時の検出のための「組み合わせ試験(combi-test)」が記載される。このアッセイでは、固相が用いられ、この固相に対して組み換え産生されたgp41が直接コーティングされている。

40

【0011】

極度に高いpH値または低いpH値の使用が、溶液中でgp41(またはgp36)を保持するための1つの方法であるということもまた十分に確立されている。組み換え産生されたgp41は、ほぼpH3.0未満、またはほぼpH11.0を超えて可溶性であることが公知である。

【0012】

しかし、不幸にも、それぞれ、HIV-1 gp41、およびHIV-2 gp36は両方とも、生理的な緩衝条件下では本質的に不溶性である。

【0013】

一般的なイムノアッセイは、生理的なpHで実施される。生理的な緩衝条件下でのそれらの不溶性に起因して、多くのイムノアッセイにおいては、レトロウイルス表面糖タンパク質

50

抗原は、固相材料上に直接コーティングされて用いられる。しかし、固相材料に対する抗原の直接コーティングは、多くの場合、有害であり、そしてコンフォメーションの変化、分子変性 (unfolding)、抗原性の変化、不安定性、およびバックグラウンドの問題などの不利な点を生じる (Butler, J. E.ら、J. Immunol. Methods 150(1992)77-90を参照のこと)。

【0014】

強力なカオトロピック剤、または適切な界面活性剤によって、レトロウイルス表面糖タンパク質 (retroviral surface glycoprotein) (rsgp) を可溶性にすることが可能であるが、このような様式で可溶性にされた材料は、診断ツールとしての使用に限定される。

【0015】

生理的な緩衝条件でのレトロウイルス表面糖タンパク質の不溶性によって、さらに、これらのタンパク質には、慣用的な (生物) 化学的手順の極めて困難な標的になる。大部分の「標識化学 (labeling chemistries)」、すなわち、標識 (例えば、ポリペプチドに対するマーカー基) を結合するために用いられる化学的手順は、求核化学に基づいており、従って、pH約6~pH約8のpH幅に制限されるのではなく、従って、生理的な緩衝条件以上または以下でのみ働く。例えば、「Bioconjugation」(1998) 216~363、M.Asiam、およびA. Dent編、McMillan Reference, Londonの、Aslam, M、およびDent, A., The preparation of protein-protein conjugatesに記載されるような、これらの慣用的な手順は、レトロウイルス表面糖タンパク質を可溶化するために必要な極端なpH値 (またはSDSのような界面活性剤の存在下) では適切に作用しないか、または実行することが困難であるかのいずれかである。

【0016】

上記で言及したとおり、架橋コンセプトによるイムノアッセイは、病原性生物体と反応性の抗体の検出を目的とする広範な種々の異なるアッセイにおいて利点が証明されている。しかし、その不溶性に起因して、このようなアッセイの設定において、それぞれ、HIV-1のe-gp41分子 (すなわち、「糖タンパク質41のエクトドメイン (ectodomain of glycoprotein 41)」、またはe-gp36分子を用いることは、例えば、不可能であった。

【0017】

直接のコーティングの不利な点を補償するために、種々のアッセイが設計されており、このアッセイは、e-gp41抗原を用いることに代わって、合成的に、または組換え産生されたその抗原の部分的配列 (多少ともイムノドミナント、いわゆるループ領域にまたがる) を利用する。このようなアッセイの例は、以下に考察する特許文献に示される。

【0018】

gp41の細胞外部分におけるループ領域は、N末端ヘリックス状ドメインを、同様にヘリックス状のC末端ドメインに連結する分子の、非ヘリックス状の先端ヘアピンである。gp41に対して反応性の抗血清の大部分は、この先端ループモチーフに対する抗体を含む。従って、このジスルフィド架橋したヘアピン、またはループ構造は、gp41のイムノドミナント領域を示す。従って、組み換え的に駆動されたgp41に関連する問題を克服するための迂回路の1つは、gp41の部分的配列を表すペプチドの化学的生成である。それぞれgp41、またはgp36が、本発明において言及される場合、いわゆるエクトドメイン (ループ接続されたN-ヘリックス、およびC-ヘリックスを包含するが、N末端融合ペプチド、およびC末端膜貫通セグメントは欠く) として規定されることに注意することが重要である。

【0019】

種々のHIV抗原のペプチド断片が、関連の特許文献 (オーストラリア特許出願番号597,884 (57733/86)、ならびに米国特許第4,735,896号、および同第4,879,212号) 中で開示される。詳細には、これらの3つの明細書は、gp41糖タンパク質の保存されたイムノドミナント領域 (HIV-1の主なエンベロープタンパク質のループ領域) を開示する。HIV-2のgp36タンパク質の類似のイムノドミナント領域がまた、合成されている。これらのループ領域に対応するペプチド (このエクトドメインの先端部を構成する) は、HIV-1、およびHIV-2の早期診断を可能にし、そしてアッセイにとって十分だが至適ではない感度および良好な

10

20

30

40

50

特異性をもたらす。しかし、それらの限界は、特定の患者におけるセロコンバージョンの初日のIgM抗体の検出に関して明らかになる。

【0020】

W092/22573は、骨格と共通して、すなわち、種々の哺乳動物の免疫不全ウイルスの膜貫通エンベロープタンパク質（例えば、gp41、またはgp36）のイミノドミナント領域と共通して、免疫学的な特性を有するペプチドを開示する。このイミノドミナント領域は、異なる哺乳動物種に由来する免疫不全ウイルス単離体において高度に保存されている、ジスルフィドループを含むことをさらに確認する。

【0021】

EP396559は、HIVの天然に存在するアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を保有する、人工的ペプチドに関する。このエピトープは、やはり、それぞれgp41、またはgp36のループ構造に相当する配列に由来する。それらは、イミノドミナントループの2つのシステイン残基の間の化学的酸化段階によって形成されたジスルフィド結合を含むように、さらに純化されている。

10

【0022】

しかし、HIV感染した患者の抗HIV抗血清に含まれた抗体のかなり大きい割合が、gp41またはgp36のイミノドミナントループ由来の配列モチーフ、またはその改変体とは反応しない。これらのペプチド抗原は、有利な架橋コンセプトと組み合わせる用いられ得るが、HIVgp41のループ領域の外側のエピトープと反応性の抗体は、検出されない。HIV感染の非常に早期の診断が重要なだけでなく、HIV-1、およびHIV-2のできるだけ多くのサブタイプが検出されることも極めて重要である。エピトープがより多く、特に、rsgpの正確に折り畳まれたコンフォメーションのエピトープが、より多く存在するほど、偽陰性の診断に起因して、感染したサンプルを見逃す可能性は低くなる。

20

【0023】

従って、レトロウイルス表面糖タンパク質分子の（特に、HIV-1由来のgp41の）より大きい部分を可溶型で提供するために、継続的な努力が行われている。

【0024】

gp41の生物物理学的な、そして生化学的な特性は、過去に広範に研究されてきた。Lu, Mら、*Nat. Struct. Biol.* 2 (1995) 1075-82) は、gp41の三量体構造を部分的に解明している。gp41は、生理的な条件下で、不溶性の凝集物を形成するので、検討は、短縮型のエクストドメインgp41に対して限定された。

30

【0025】

gp41のネイティブな三量体が、3つの平行なN末端中央ヘリックス（これに対してC末端ヘリックスは、逆平行方向に詰める）を含む、6つのヘリックス状バンドルを形成することが、NMR分光法によって最近確認されている（Caffrey, Mら、*J Biol Chem* 275 (2000) 19877-82）。

【0026】

gp41の高分子凝集物がまた記載されている。このような凝集物は、gp41のいわゆる先端部ループ領域の相互作用によって形成される可能性が最も高い。

【0027】

タンパク質設計による、標的細胞へのHIV-1進入のインヒビターは、Root, M.J.ら、*Science* 291 (2001) 884-8によって開発された。このインヒビターは、gp41由来のN末端ヘリックスドメイン由来の3つのストレッチ、およびこの分子由来のC末端ヘリックスドメインの2つのストレッチを含む。しかし、この遺伝子操作された構築物は、ネイティブな分子の多くのドメイン、および多くの抗原性エピトープを欠き、特にいわゆるループモチーフ（特に免疫原性エピトープを保有することが公知である（上記を参照のこと））を含まない。

40

【0028】

従って、できるだけ多くのレトロウイルス表面糖タンパク質エピトープを可溶型で提供するという非常に大きい必要性が依然として存在する。特に種々の治療的な適用、および診

50

断的な適用における使用のために、それぞれ、HIV-1由来のgp41、またはHIV-2由来のgp36を含む、このような可溶性抗原を提供する必要性が存在する。

【0029】

より多くのレトロウイルス表面糖タンパク質エピトープ、またはそれぞれe-gp41分子もしくはe-gp36でさえ、可溶型で提供することが可能であるか否かを検討することが、本発明の課題であった。

【0030】

本発明のさらなる課題は、それぞれgp41、およびgp36の改変体（これは、取り扱うことがより容易であり、そして/または特に、イムノアッセイを実施するために必要とされるような、または免疫に必要とされるような緩衝条件下では、複合体型（この改変体およびペプチジル-プロリル-イソメラーゼクラスのシャペロンのシャペロンを含む）で可溶性である）を提供することが可能であるか否かを検討することであった。

10

【0031】

古典的な「折り畳みヘルパー（folding helpers）」として知られるシャペロンは、他のタンパク質の折り畳み、および構造的な完全性の維持を補助するポリペプチドである。それらは、インビボ、およびインビトロの両方でポリペプチドの折り畳みを促進する能力を保持する。一般に、折り畳みヘルパーは、折り畳み触媒、およびシャペロンに小分割される。折り畳み触媒は、その触媒性機能に起因してタンパク質折り畳みにおける律速段階を加速する。触媒の例は、以下にさらに記載される。シャペロンは、変性されたポリペプチドまたは部分的に変性されたポリペプチドに結合し、これによってタンパク質を再生することを補助することが公知である。従って、折り畳み触媒とは異なり、シャペロンは、結合機能を発揮するに過ぎない（Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19）。

20

【0032】

シャペロンは、タンパク質成熟、折り畳み、転位、および分解に関与する、偏在性のストレス誘導性タンパク質である（Gething, M. J., および Sambrook, J., *Nature* 355 (1992) 33-45）。正常な増殖条件下でも存在するが、それらは、ストレス条件下で、豊富に誘導される。このことによって、それらの生理的な機能が、ストレス条件に対処することであるという理論がさらに支持される。

【0033】

現在のところ、いくつかの異なるファミリーのシャペロンが知られている。これらのシャペロンの全てが、折り畳まれていないか、または部分的に折り畳まれていないタンパク質に対して結合する能力によって特徴付けられており、そしてタンパク質の正確な折り畳み、または変性もしくは凝集したタンパク質の除去に関係する生理的機能を有する。

30

【0034】

シャペロンの十分特徴付けられた例は、タンパク質のいわゆる熱ショックファミリーのメンバーである。これらは、相対的な分子量に従って命名される；例えば、hsp100、hsp90、hsp70、およびhsp60、ならびにいわゆるshsps（小熱ショックタンパク質（small heat-shock-proteins））（Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19によって、ならびにBeissinger, M. および Buchner, J., *Biol. Chem.* 379 (1998) 245-59によって記載されるような）。

40

【0035】

折り畳み触媒は、シャペロンと異なり、規定された律速段階を加速することによって折り畳みを補助し、これによって凝集しやすい折り畳み中間体の濃度を低下させる。触媒の1つのクラスである、タンパク質ジスルフィドアイソマー（あるいは、チオール-ジスルフィド-オキシド-レダクターゼと命名された）は、分泌タンパク質におけるジスルフィド結合の形成または再編成を触媒する。グラム陰性の細菌において、周辺質における分泌タンパク質の酸化折り畳みは、DsbA、DsbB、DsbC、およびDsbDと命名された、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼのカスケードによって調整される（Bardwell, J.C., *Mol Microbiol* 14 (1994) 199-205、および Missiakas, D., *ら*, *Embo J* 14 (1995) 3415-24）。

【0036】

50

ペプチジルプロリルシス/トランスイソメラーゼ (PPI) と呼ばれる折り畳み酵素の別の重要なクラスは、以下のような異なるメンバーを含む: CypA、PpiD (Dartigalongue, C., および Raina, S., *Embo J* 17 (1998) 3968-80, FkpA (Danese, P. N.ら、*Genes Dev* 9 (1995) 387-98)、誘発因子 (trigger factor) (Crooke, E., および Wickner, W., *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) 5216-20、ならびに Stoller, G.ら、*Embo J* 14 (1995) 4939-48)、および SlyD (Hottenrott, S.ら、*J Biol Chem* 272 (1997) 15697-701)。これらのなかでも、FkpA、SlyD、および誘発因子は、配列のアラインメントに基づいて、関連していることが見出されている。

【0037】

ペプチジルプロリルイソメラーゼ FkpA は、グラム陰性細菌の周辺質に局在している。このシャペロンが、細菌の外部膜タンパク質の輸送および転位に重要であることが推測されている。Ramm, K., および Pluckthun, A., *J Biol Chem* 275 (2000) 17106-13) によって、FkpA は、タンパク質の正しい折り畳みに対する、その有益な効果を、2つの異なる方法で表すことが示されている。第一に、FkpA は、初期の折り畳み中間体と相互作用し、それによってそれらの凝集を妨げる。第二に、FkpA は、可能性としては、部分的に折り畳まれている種 (それは、凝集型と平衡して存在し得る) に対する結合によっても、不活性なタンパク質を再活性化する能力を有する。

【0038】

いくつかの折り畳みヘルパーは、触媒的に活性なドメイン、およびシャペロン (またはポリペプチド結合) ドメインの両方を含む。代表的な例は、例えば、誘発因子 (Zarnt, T.ら、*J Mol Biol* 271 (1997) 827-37)、Wang, C. C., および Tsuo, C. L., *Faseb J* 7 (1993) 1515-7)、SurA (Behrens.ら、*EMBO J* (2001) 20 (1)、285-294)、および DsbA (Frech, C., ら、*Embo J* 15 (1996) 392-98) である。本発明者らの観察によれば、同じモジュール構造が、それぞれ、PPIases FkpA、および SlyD において現実化されると思われる。

【0039】

異なる独立した系において、シャペロンの強化された発現によって、ポリペプチドの組み換え生成が促進され得ることが実証されている。これに対する例は、W094/08012に見出され得る。

【0040】

タンパク質の産生の増大は、ポリペプチドコード配列、およびシャペロン配列を含む遺伝子構築物を用いることによって達成され得ることがまた、公知である。例えば、この融合コンセプトは、ヒトのプロインスリン (pro-insulin) 遺伝子、および DsbA を含む遺伝子構築物を用いることによって、*Escherichia coli* の周辺質におけるヒトのプロインスリンの有意に増大した産生を生じることが示されている (Winter, J.ら、*Journal of Biotechnology* 84 (2000) 175-185)。

【0041】

未変性様の折り畳まれたポリペプチドの産生の増大のためにシャペロンを用いるアプローチは主に、結合、およびこれによるシャペロンタンパク質の機能の可溶化に起因している。シャペロンおよび標的タンパク質を含む融合ポリペプチドの組み換え産生後、このシャペロンは習慣的に、得られたポリペプチドから切り離され、所望のポリペプチドが純粋な形態で得られる。対照的に、本発明は、一方では、レトロウイルス表面糖タンパク質と会合している、適切なシャペロンの有益な可溶性効果に基づく。

【0042】

驚くべきことに、折り畳みヘルパー、例えば、ペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPI) クラスの多くのメンバー (特に FKBP ファミリー由来) が、触媒性活性を示すだけでなく、アミロイド形成性のタンパク質の (またはより一般的に言えば、凝集する傾向にあるタンパク質の) 溶解度に対して強烈な有益な効果をもたらすことを、本発明者らは見出した。それらがそのような効果をもたらすのは、このようなタンパク質 (そうでなければ (すなわち、非シャペロンの単離型では) 凝集しやすい) と可溶性の複合体を形成することによってである。このようなタンパク質 (さもなければ、生理的条件下では、ほとんど溶解し

10

20

30

40

50

ないか、または不溶性である)は、一旦それらが、適切なPPIシャペロンと複合して結合すれば、穏やかな生理的条件下では結局、可溶性になる(すなわち、界面活性剤またはカオトロピック剤などの可溶化添加物の必要がない)。このように、本発明者らは、例えば、可溶性のタンパク質 - シャペロン複合体(例えば、凝集しやすい標的タンパク質としてHIV-1のgp41タンパク質、ならびに可溶性付与シャペロンとしてFkpA、または他のFKBPを含む)を産生することができた。

【0043】

さらに、本発明者らは、それぞれ、HIV-1 gp41、またはHIV-2 gp36の特定の十分規定された改変体が、PPI-クラスのシャペロンと可溶性の複合体を形成するのに特に適切であることを見出した。

10

【0044】

gp41、およびFkpAの複合体、またはgp36およびFkpAの複合体は、例えば、生理的条件下で、例えば、容易に可溶性であり、それらを、都合の良いpH範囲で容易に標識することが可能であり、そしてそれらを用いて、HIV(それぞれ、1または2)のそれぞれgp41、またはgp36に対する抗体の検出において、従ってHIV感染の診断において、多大な利益を得ることができる。

【0045】

詳細な説明

本発明は、本質的に不溶性である標的タンパク質、およびペプチジル - プロリル - イソメラーゼクラスのシャペロンを含む可溶性複合体を生成する方法に関し、この方法は、バッファ中でこのタンパク質およびこのシャペロンを混合する工程、ここでこのタンパク質およびシャペロンの両方は、可溶化される、ならびにこのバッファを生理的な条件に調整する工程(ここで、この形成されたタンパク質 - シャペロン複合体は可溶性である)を包含する。

20

【0046】

本発明による「標的タンパク質」とは、20mMリン酸ナトリウム、および150mM塩化ナトリウムからなるpH7.4の水性緩衝溶液中で本質的に不溶性である任意のタンパク質であってもよい。例えば、好ましい標的タンパク質は、アミロイド形成性タンパク質、アミロイド形成性ウイルスの表面糖タンパク質、レトロウイルス表面糖タンパク質、特にHIV-1gp41、HIV-2 gp36、およびHTLV gp21である。

30

【0047】

標的ポリペプチドの重要な群の1つは、いわゆるアミロイド形成性タンパク質、またはポリペプチドである。このようなアミロイド形成性タンパク質は、体液または区画中において凝集型で見出されている。周知の例は、血清アミロイドA(sAA)、いわゆるb-A4、またはAb(アルツハイマー病の脳で特徴的なアミロイド沈着を形成することが知られている42または43個のアミノ酸のポリペプチド)、いわゆるプリオンタンパク質(PrP^{Sc}型は、BSEまたはクロイツフェルトヤコブ病における凝集において蓄積する)、およびHIV-1gp41のようなレトロウイルス表面糖タンパク質(HAD(HIV関連痴呆)に罹患している患者の脳におけるアミロイド様プラークにおいて見出される)である。好ましい実施形態において、シャペロン、好ましくはPPIシャペロンを用いて、アミロイド形成性タンパク質、およびシャペロンを含む可溶性複合体を形成する。極めて有利になるように、このような複合体を、多くの異なるイムノアッセイ手順において用いてもよい。好ましくは、このような複合体を、二重抗原架橋コンセプトに従って、イムノアッセイにおいて用いる。

40

【0048】

HIVおよび他のエンベロープウイルス(例えば、HTLV、インフルエンザウイルス、およびエボラウイルス)は、全てが、表面糖タンパク質を発現し、これが細胞付着および膜融合の両方を媒介する。これらの機能を果たすために、これらの表面糖タンパク質の全てが、極端に疎水性のセグメントを含み、これがインビトロでそれらを取り扱うことを困難にさせ、凝集しやすくし、それらを、インビトロの再折り畳みの労力に関して困難な標的にさせる。さらに好ましい実施形態において、本発明は、PPIシャペロン、およびエンベロー

50

プウイルスの表面糖タンパク質を含む可溶性複合体に関する。本発明は、PPIシャペロン、およびエンベロープウイルスの表面糖タンパク質を含む複合体を、この表面糖タンパク質に対する抗体の検出のためのイムノアッセイにおいて用いることに特に関する。

【0049】

HADは、HIV感染の周知の合併症である。Caffrey, Mら（前出）によって記載されたように、組織学的な現象学に関して、HADは、クロイツフェルトヤコブ病と呼ばれる海綿状脳症に極めて類似している。クロイツフェルトヤコブ病の病因論は一般に、改変プリオンタンパク質を含むプラークのアミロイド形成性蓄積から生じると考えられる（Prusiner, S. B., Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 13363-83）。E-gp41の高分子量凝集物に關与するHADについての類似の病因論は極めて確率が高い。HIV脳症における神経学的な病変が、ピンスヴァンガー病と、病理的特徴および放射線医学的特徴を共有することは注目に値する。

10

【0050】

本発明による好ましいアミロイド形成性タンパク質は、それぞれ、HIV-1由来のgp41、HIV-2由来のgp36、またはHTLV由来のgp21である。

【0051】

タンパク質は、20mMリン酸ナトリウム（pH7.4）150mM NaClからなるバッファーにおいて、そのタンパク質が、50nM以下の濃度で可溶性である場合に、「本質的に不溶性」であるとみなされる。

【0052】

PPIシャペロンおよび標的タンパク質を含む本発明の複合体は、生理的な緩衝条件下で、例えば、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、150mMNaClからなるバッファーにおいて、このPPIシャペロン複合体中に含まれるこの標的タンパク質が、100nM以上の濃度で可溶性である場合に、「可溶性」であるとみなされる。

20

【0053】

本発明者らは、バッファー中で標的タンパク質とシャペロンとを混合する工程（ここでは、タンパク質およびシャペロンの両方とも可溶性である）、およびこのバッファーを生理的条件下に調整する工程（ここで、この形成されたタンパク質 - シャペロン複合体は、可溶性のままである）を包含する方法を開発した。

【0054】

可溶性シャペロン - 標的タンパク質複合体の生成は、可溶化バッファー条件から、すなわち、バッファー（ここでは、標的タンパク質およびシャペロンの両方が可溶性である）から開始する。「非生理的な（non-physiological）」、または「可溶化（solubilizing）」バッファーと名付けられ得る、適切なバッファーは、標的タンパク質およびPPIシャペロンの両方が変性されないか、または少なくとも不可逆的に変性されないという要件を満たさなければならない。このような緩衝条件から開始すれば、シャペロンは、標的タンパク質に結合し、そして非生理的な条件から生理的な条件への緩衝条件の変化は、標的タンパク質の沈殿なしに可能である。

30

【0055】

適切な（非生理的な）バッファー、すなわち、バッファー（ここで、本質的に不溶性である標的タンパク質、およびPPIシャペロンの両方が、可溶性である）は、高いpHもしくは低いpH、または高いカオトロピック塩濃度またはそれらの組み合わせのいずれかを利用する。

40

【0056】

PPIシャペロンおよび標的タンパク質（これは、本質的に不溶性である）を含む分子内複合体の産生の場合、非生理的なバッファーは、好ましくは、かなり高いpH、またはかなり低いpHを有するバッファーである。好ましくは、このようなバッファーは、高いpH範囲において9～12のpH、または低いpH範囲においては2～4.5のpHを有する。

【0057】

PPIシャペロンおよび標的タンパク質（これは、本質的に不溶性である）を含む分子内複

50

合体の産生の場合、可溶化バッファーは、好ましくは、約6のpHにおいて、かなり高い濃度のカオトロピック塩、例えば、6.0M塩化グアニジウムを有するバッファーである。再生の際、標的タンパク質は、その未変性様の構造および分子内複合体型を仮定する。

【0058】

本発明の状況において、生理的なバッファー条件は、必要に応じてこのバッファー中に存在し得る他の非塩成分（例えば、糖、アルコール、界面活性剤）にかかわらず、このような添加物が標的タンパク質およびシャペロンを含む複合体の溶解度を損なわない限り、5.0~8.5の間のpH値、および総塩濃度500mM未満によって規定される。

【0059】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、可溶性のレトロウイルス表面糖タンパク質 - シャペロン複合体を生成する方法に関しており、この方法は以下：バッファー中でレトロウイルス表面糖タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼを混合する工程（ここで、レトロウイルス表面糖タンパク質およびペプチジルプロリルイソメラーゼの両方は、可溶性であり、複合体を形成する）、ならびにこのバッファーを生理的な条件に調節する工程（ここで、この複合体は可溶性である）を包含する。

【0060】

「レトロウイルス表面糖タンパク質」、または「rsgp」という用語は、本発明において用いる場合、HIV-1のgp41およびHIV-2のgp36、ならびに他の哺乳動物免疫不全ウイルス由来の対応するエンベロープ糖タンパク質を含むはずである。好ましいレトロウイルス表面糖タンパク質は、HIV-1由来のgp41、HIV-2由来のgp36、およびHTLVのgp21である。特に好ましいrsgpは、HIV-1のgp41、およびHIV-2のgp36である。rsgpという用語は、ここで概説されるようにまた、天然に存在するresp、および合成的に操作されたrsgpの改変体を含む。

【0061】

それぞれgp41またはgp36のNヘリックス状ドメイン内のアミノ酸の特定の十分規定された置換が、それぞれgp41またはgp36の野生型配列を有するポリペプチドに比べて、これらの分子の全体的特性においてさらなる利点を生じることが見出されている。これらの改変体は、本発明に従って好ましい実施形態を示す。特に、Leu555、Leu566、Ile573、およびIle580の位置（ここで、これらの位置は、HIV-1gp41野生型配列（配列番号1）から公知の位置であるか、またはそれから公知の位置に相当する）の群から選択された1つ以上の位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換、および多くとも4つのアミノ酸置換を含み、その置換アミノ酸が、それぞれ、そして独立して、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群より選択されるという点で特徴付けられる、HIV-1gp41の改変体、あるいは、Leu554、Leu565、およびVal579の位置（ここで、これらの位置は、HIV-2 gp36野生型配列（配列番号2）から公知の位置であるか、またはそれから公知の位置に相当する）の群から選択された位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換、および多くとも3つのアミノ酸置換を含み、その置換アミノ酸が、それぞれ、そして独立して、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群より選択されるという点で特徴付けられるHIV-2gp36の改変体が、当該分野で公知である問題を少なくとも部分的に解決するために適切である。

【0062】

それぞれgp41またはgp36の新規な改変体は、凝集する傾向が低いほど、野生型配列のそれらの対応するポリペプチドに比べて、溶解度が向上し、取り扱いがより簡単になる。生理的緩衝条件下で、gp41またはgp36を可溶型で含む試薬を提供するための労力が一旦払われれば、溶解度の改善は、特に明白になる。ペプチジル - プロリル - イソメラーゼ（PPI）クラスのシャペロンから選択されたシャペロンによって付与された効果を有する新規な改変体の好適な特性を合わせることが特に有利であると証明されている。従って、本発明は、この改変体およびペプチジル - プロリル - イソメラーゼクラスのシャペロンのシャペロンを含む可溶性複合体の生成における、本発明において記載されたようなgp41の改変体、および/またはgp36の改変体の使用にさらに関する。

【0063】

改変HIV糖タンパク質、およびPPIクラスのシャペロンを含む可溶性複合体は好ましくは、それぞれ、改変HIVgp41、またはHIV-2 gp36、ならびにPPIクラスシャペロンの両方を含む単一の組み換えタンパク質から得られる。従って、好ましい実施形態は、本発明に記載されるようなHIV-1gp41、またはHIV-2 gp36の改変体、およびペプチジル - プロリル - イソメラーゼクラスのシャペロンから選択されたシャペロンを含む組み換えタンパク質である。

【0064】

gp41、またはgp36の新規な改変体が、野生型ポリペプチドよりも、取り扱いが容易であるという事実によって、それらの改変体は、免疫原としての使用、または抗原としての使用のような種々の目的に理想的にされる。好ましい実施形態において、本発明は、イムノアッセイにおける、本発明によるgp41、および/もしくはgp36の改変体の、またはPPIシャペロンおよびこのような改変体を含む複合体の、例えば、単一の組み換えタンパク質としての使用に関する。最も興味深いことには、レトロウイルス表面糖タンパク質、およびPPIシャペロンの両方を含む融合タンパク質は、適切な条件下で可溶化かつ再生され得、そしてHIVイムノアッセイにおいて簡便な標識および信頼性のある検出を可能にする可溶性の分子内rsgp-シャペロン複合体を形成することが見出されている。

10

【0065】

レトロウイルス表面糖タンパク質と、シャペロンとの間の可溶性複合体は、二重抗原架橋コンセプトに従って、抗体の検出のためのイムノアッセイにおいて非常に有利になるように用いることができる。

20

【0066】

HIV-1由来のgp41、またはHIV-2由来のgp36を含むrsgpシャペロン複合体は、感染の早期段階におけるHIVに対する抗体の検出に特に有利である。可溶性のシャペロン - gp41複合体、または可溶性のシャペロン - gp36複合体を用いれば、好ましくは架橋コンセプトに従って、イムノアッセイを実施することが可能であり、これによって、体液サンプル中におけるHIVに対する抗体の鋭敏かつ早期の検出が可能になる。

【0067】

シャペロンが、他の不溶性タンパク質と複合体を形成し得るという事実をまた用いて、イムノアッセイ（好ましくは、架橋コンセプトに従うイムノアッセイ）をさらに大幅に改善するという、大きい利点をえることができる。この架橋コンセプトによって、第一の抗原としてのシャペロン - 抗原複合体（ほとんどが固相側でのいわゆる捕捉抗原）、および第二のシャペロン - 抗原複合体（ほとんどが、検出側での検出抗原）の使用が可能になる。シャペロン反応性抗体の結合によって生じたバックグラウンド反応の問題を最小化するために、固相側について第一のシャペロン、そして異なる種由来の検出側について第二のシャペロンを利用することによって、このような架橋アッセイをさらに有利に改変することができる。

30

【0068】

ここで、標識されたシャペロン - 抗原複合体を使用する、架橋コンセプトに従うイムノアッセイを実施することが可能である。シャペロン - 抗原複合体（ここでは、このシャペロンのみが標識されており、これによって、この抗原は、このような標識によって改変もされず、負の影響もされない（例えば、高次構造に関して）ことが確実にされる）を生成することがまた可能である。

40

【0069】

化学的カップリングの様式およびストラテジーは、必要に応じて選択され得る。ポリペプチドの場合、-SH、-NH₂、または-COO⁻残基、ならびにチロシンのOH基、ヒスチジンのイミダゾール基、またはトリプトファンの複素環式イミノ基を標的するカップリング化学は、すぐ手が届くものである。いくつかの適切なカップリング化学が、これらの官能基の各々について公知である（Aslam, M., およびDent, A., 前出）。慣用的なタンパク質カップリング化学は、作用する緩衝条件下、例えば、約5~8.5のpH範囲内でタンパク質が可溶である

50

ことを必要とする。例えば、gp41が、このpH範囲内では、例えばSDSによって変性されない限り可溶ではないので、未変性様に折り畳まれたgp41は、これまでは、化学的カップリングを受けやすくはなかった。本明細書において本発明者らが記載する、gp41 - シャペロン複合体は、用いられる検出様式にかかわらず、イムノアッセイのための可溶性の標識されたHIVエンベロープタンパク質を生成する、都合のよい手段を提供する。

【0070】

好ましい実施形態において、本発明は、可溶性のrsgp - シャペロン複合体の生成のためのプロセスに関し、このプロセスは、可溶化されたレトロウイルス表面糖タンパク質、およびペプチジルプロリルイソメラーゼクラスから選択されたシャペロンを、非生理的緩衝条件下で混合する工程、およびその後このバッファーを生理的条件下に調整し、それによって分子内複合体を形成する工程を包含する。

10

【0071】

シャペロンおよびレトロウイルス表面糖タンパク質は、別々のポリペプチドとして用いることができるだけではない。本発明者らは、驚くべきことに、両方のタンパク質を共有結合させることが有利であるということを観察した。このような共有結合は、従来の架橋手順によって可能である；しかし、好ましくは、共有結合は、レトロウイルス表面糖タンパク質およびシャペロンを含む組み換えポリペプチドを産生することによって達成される。

【0072】

さらに好ましい実施形態において、本発明は、可溶性のrsgp-シャペロン複合体の生成のためのプロセスに関する。このプロセスは、適切な緩衝条件下で、共有結合したレトロウイルス表面糖タンパク質、およびペプチジルイソメラーゼクラスから選択されたシャペロンタンパク質を含むタンパク質を可溶化する工程、そしてその後このバッファーを生理的条件下に調節する工程を包含する。これによっても、分子内複合体が得られる。

20

【0073】

本発明は、ペプチジルプロリルシス/トランスイソメラーゼ (PPI) と命名された折り畳みヘルパーのクラスに由来するシャペロンの使用を教示する (Dartigalongue, C., および Raina (前出) を参照のこと)。このファミリーの周知の例は、以下のように呼ばれるメンバーである: CypA、PpiD (Dartigalongue, C. および Raina, S., *Embo J* 17 (1998) 3968-80; Schmid, F. X., *Molecular chaperones in the life cycle of proteins* (1998) 361-389, 編集 A. L. Fink, および Y. Goto, Marcel Decker Inc., New York), FkpA (Danese, P. N. ら, *Genes Dev* 9 (1995) 387-98)、および誘発因子 (Crooke, E., および Wickner, W., *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1987) 5216-20; Stoller, G. ら, *Embo J* 14 (1995) 4939-48)。このペプチジルプロリルイソメラーゼは、以下の3つのファミリーに小分割される: パルビュリネス (parvulines) ファミリー (Schmid, F. X. (前出), Rahfeld, J. U. ら, *FEBS Lett* 352 (1994) 180-4)、サイクロフィリンファミリー (Fischer, G. ら, *Nature* 337 (1989) 476-8)、およびFKBPファミリー (Lane, W. S. ら, *J Protein Chem* 10 (1991) 151-160)。FKBPファミリーは、興味深い生化学的特徴を示す。なぜなら、そのメンバーは、マクロライド (例えば、FK506、およびラパマイシン) に結合する能力によってもともと同定されたからである (Kay, J. E., *Biochem J* 314 (1996) 361-85)。

30

【0074】

プロリルイソメラーゼは、異なる機能の異なるサブユニットまたはモジュール、例えば、触媒活性を示すモジュール、およびシャペロンもしくは結合活性を示すモジュールを含んでもよい。FKBPファミリーのこのようなモジュールメンバーは、FkpA (Ramm, K. および Plickthun, A., *J Biol. Chem* 275 (2000) 17106-13)、SlyD (Hottenrott, S. ら, *J. Biol. Chem* 272 (1997) 15697-701)、および誘発因子 (Scholz, C. ら, *Embo J* 16 (1997) 54-8) である。好ましい実施形態において、本発明は、可溶性複合体であって、レトロウイルス表面糖タンパク質、およびペプチジルプロリルイソメラーゼクラスの折り畳み触媒から選択されたシャペロンを含む複合体に関する。

40

【0075】

当然ながら、本発明は、ペプチジルプロリルイソメラーゼクラスの特別に言及されたメン

50

バーの使用に対して制限されるものではなく、また、同じクラスから生じるが、異なる種の細菌から派生するシャペロンを用いて実施することもできる。PPIクラスのシャペロンのFKBPファミリーの好ましいメンバーが用いられる。

【0076】

さらなる実施形態において、真核生物由来の相同体を使用することが好ましく、そしてヒト起源のPPIaseを使用することが極めて好ましい。なぜなら、これらのPPIaseは、ヒト血清由来の抗体によって認識されないはずであり、従って、血清学的アッセイ（すなわち、ヒト抗体の検出に基づくアッセイ）においては妨害しないはずであるからである。

【0077】

分子シャペロンの完全な配列を常に使用する必要はないということがまた周知でありかつ理解される。必要な能力および機能を依然として保有するシャペロンの機能的断片（いわゆる、モジュール）がまた、用いられ得る（W098/13496を参照のこと）。 10

【0078】

例えば、FkpAは、細菌のサイトゾルにおける不活性前駆体分子として合成されて、細胞質膜を横切って転位される、周辺質PPIである。FkpAの活性型（成熟FkpA、または周辺質FkpA）は、シグナル配列（アミノ酸1～25）を欠き、従って前駆体分子のアミノ酸26～270を含む。FkpAに関する関連の配列情報は、登録番号P45523として、公的なデータベースから、例えば、「SWISS-PROT」から容易に入手可能である。

【0079】

FlpAに密接に関連した、いわゆるSlyDは、触媒性およびシャペロン機能を担う構造化されたN末端ドメインから、そしてほとんど構造化されていないC末端（例外的にヒスチジン残基およびシステイン残基に富む）からなる（Hottenrott, S.ら、J. Biol. Chem. 272 (1997) 15697-701）。本発明者らは、アミノ酸1-165を含むSlyDのC末端短縮改変体が、gp41、およびgp36においてその可溶性機能を効率的に発揮することを見出した。野生型SlyDにおいてとは異なり、ジスルフィドシャッフリングを損なう危険は、用いられた短縮型SlyD改変体（1-165）においては、首尾よく回避される。 20

【0080】

上記で考察されたシャペロンの改変体であって、1つまたはいくつかのアミノ酸置換または欠失を保有する改変体がまた、本発明に従うプロセスを実施するために用いられてもよい。 30

【0081】

別の供給源に由来する適切なシャペロン、およびシャペロンの適切な断片または変異体が、本実施例に記載のような手順を用いることによって容易に選択され得る。それらは、可溶性のrsgp-シャペロン複合体を生成するために、遊離型で、またはレトロウイルス表面糖タンパク質に共有結合されてのいずれかで用いられ得る。本発明による好ましい実施形態において、結合にコンピテントなPPIaseシャペロンは、レトロウイルス表面糖タンパク質に組み換え的に結合されて、細菌のサイトゾル中でこの遺伝子産物の高い発現を生じる。本発明において言及されるような結合コンピテント（bindingcompetent）なPPIaseは、その触媒性のPPIase活性にかかわらず、伸長したポリペプチド基質に対する結合（すなわち、基質結合、またはシャペロンモチーフ）を媒介する、少なくとも機能的な単位を含む。 40

【0082】

本発明者らは、また、PPIクラスの折り畳み触媒に属さないいくつかのシャペロンが、レトロウイルス表面糖タンパク質と可溶性の複合体を形成し得るということを観察した。従って、本発明に従うさらなる好ましい実施形態は、Skp（OmpHとしても公知；Missiakas, D.ら、Mol. Microbiol. 21 (1996) 871-84）と、レトロウイルス表面糖タンパク質との間の可溶性複合体である。しかし、さらに好ましい実施形態は、レトロウイルス表面糖タンパク質、およびGroEL、またはその部分を含む可溶性複合体である。Skpに対して相同であるシャペロンがまた用いられ得る。

【0083】

モジュラーPPIが、変性されたかまたは部分的に変性されたタンパク質に対して優先的に結合することは公知である（例えば、Scholzら、前出）。PPIaseは、ここで、タンパク質の折り畳みを触媒するだけでなく、このようなタンパク質と安定な複合体を形成し、それによって、溶解性が得られるという顕著な特性を有することが見出されている。驚くべきことに、研究されたPPIase（例えば、TF、SlyD、およびFkpA）は、未変性様の折り畳まれたレトロウイルス表面糖タンパク質に結合し、それによって例えば、可溶化する。本発明による「未変性様の（native-like）」、または「未変性様に折り畳まれた（native-like folded）」gp41とは、遠UV-CDによって評価される場合、二次構造における高ヘリックス含量によって、および近UV-CDによって評価される場合、三次接触によって、その両方で特徴付けられる、これは、それぞれ図1Bおよび5において示されるとおり、代表的な「gp41-サイン（signature）」に反映される。さらに、本発明による、「未変性様の（native-like）」gp41のUVスペクトルは、320nmより高い波長で有意な吸収（これは、凝集物のような迷光粒子を暗示する）を示さない。

10

【0084】

モデル生体分子間、例えば、抗体と抗原との間の複合体形成について大量の情報がある（概説については、Braden, B. C., およびPoljak, R. J., Faseb J 9 (1995) 9-16を参照のこと）。通常、複合体の形成、および解離は平行に生じ、この複合体および結合パートナーは、自由平衡において共存する。同様に、本発明に記載されるようなPPIシャペロンとアミロイド形成性タンパク質との間の複合体についても同じことが真であると考えられる。

20

【0085】

本発明に記載されるように、複合体の形成は、特に重要な特性である。なぜなら、PPIシャペロンとタンパク質（これは、例えば、生理的な緩衝条件下で、本質的に不溶性である）との間の複合体は、例えば、生理的緩衝条件下で容易に可溶であることが見出されているからである。生理的条件下で可溶性である抗原は、診断適用においては多くの利点を有する。それらは、例えば、標準物質として直接用いられてもよい。さらに、それらは、適切なマーカーに、または適切な結合基に複合体化されてもよい。

【0086】

上記で考察されたように、HIV-2由来のgp36は、類似の機能（すなわち、膜融合、およびウイルス侵入）を果たし、そしてHIV-1由来のgp41と同様の診断適合性である。レトロウイルス表面糖タンパク質のプロトタイプの例としてHIV-1のgp41を用いるこの適用において、多くの技術的問題が考察される。単に明確化のために、この考察および説明は、主にHIV-1のgp41に集中する。しかし、同様の考慮が、他のレトロウイルス表面糖タンパク質、特にHIV-2由来のgp36、およびHTLV由来のgp21にあてはまる。

30

【0087】

HIV-1、またはHIV-2の天然に存在する単離体は、もともと単離され、かつ記載されたアミノ酸配列の改変体を含み得ることが公知である。哺乳動物の免疫不全rsgpのこのような天然に存在する改変体、および合成的に操作された改変体はまた、本発明の範囲内である。

【0088】

本発明は、好ましい実施形態において、regp、またはヒト免疫不全ウイルスウイルス（HIV）の膜貫通糖タンパク質の改変体に関する。HIV-1gp41、またはHIV-2 gp36のNヘリックス状ドメインにおける特定のアミノ酸置換を含む改変体が開示される。

40

【0089】

NヘリックスおよびCヘリックス状ドメイン（ヘリックス対ヘリックスの接触に關与する）の両方のアミノ酸位置は、HIV-1gp41の文献から公知であり、そしてHIV-2相同性gp36に対して外挿され得る。これらの位置を突然変異させることは、特に、この改変体およびPPIシャペロンドメインを含む融合タンパク質の状況では、それぞれgp41、またはgp36の特性に影響することが見出されている。

【0090】

gp41ロイシンジッパーのヘリックス状ホイール突出部における「a」、および「d」のアミ

50

ノ酸位置は、本発明による改変体を作成するための好ましい標的である。「a」位置におけるアミノ酸残基（Chan, D. Cら、Cell 89 (1997) 263-73による付番）は、Q552、I559、L566、I573、およびI580である；各々の「d」位置におけるアミノ酸残基は、I548、I555、Q562、T569、およびL576である。

【0091】

このジッパーモチーフのヘリックス状の完全性を損なうことなく、溶解度を改善するために、変異位置は、2つ以上のヘリックスターンによってお互いから離されることが好ましい。この必要条件は、例えば、保存的な「a」残基であるQ552、I559、L566、およびI573の置換によって、ならびに例えば、保存的な「d」残基であるI548、L555、Q562、およびT569の置換によって満たされる。言い換えれば、突然変異された残基は、少なくとも6つの野生型アミノ酸残基によってお互いから離され、従って正確に7個のモチーフが続く。置換位置がお互いから2つ以上のヘリックスターンによって離されるという前述の状況下で改変体内の「a」、および「d」残基の両方を変異することがまた可能である。

【0092】

同様に、HIV-2のgp36エクストドメインにおける変更は、驚くべきことに、SlyDまたはFkpAに対して融合された場合、容易に溶解する組み換えタンパク質を生じることが見出された。ここで、「a」位置は、Q551、V558、L565、T572、V579であり、そして「d」位置は、I547、L554、Q561、T568、およびL575である。

【0093】

好ましくは、それぞれ、HIV-1 gp41の位置Q552、I559、L566、I573、I580、I548、L555、Q562、T569、およびL576、HIV-2gp36の位置Q551、V558、L565、T572、V579、I547、L554、Q561、T568、およびL575を含む位置の群から選択される1~6個のアミノ酸が、より小さいか、またはより親水性のアミノ酸によって置換される。

【0094】

好ましくは、置換対象のアミノ酸位置は、それぞれHIV-1のQ552、I559、L566、I573、およびI580からなる位置の群、ならびにHIV-2gp36のL554、Q561、T568、およびL575からなる位置の群より選択される。

【0095】

好ましい実施形態において、本発明は、HIV-1 gp41の改変体であって、Leu555、Leu566、Ile573、およびIle580の位置（ここで、これらの位置は、配列番号1に記載されるgp41野生型配列から公知の位置であるか、またはそれから公知の位置に相当する）の群から選択された位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換、および多くとも4つのアミノ酸置換を含む改変体であって、その置換アミノ酸が、それぞれ、そして独立して、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群より選択されるという点で特徴付けられる、改変体、に関する。

【0096】

本発明のこの好ましい実施形態は、gp41野生型配列の対応するポリペプチドに比べて、有意な改善を示す野生型gp41の改変体が提供され得るという驚くべき知見に基づく。本発明の改変体をもたらすアミノ酸置換は、Chan, D. Cら、Cell 89 (1997) 263-73から公知であって、配列番号1に示されるような、アミノ酸組成およびgp41野生型配列の番号付けに基づいて記載される。

【0097】

明白に、本発明に記載されるアミノ酸置換基はまた、他の公知のgp41、およびまだ未同定のHIV-1単離物の内部の対応する配列位置でアミノ酸を置換するために用いられ得る。「ある位置に対応する（corresponding to a position）」という用語は、HIV-1単離体、およびその改変が見出され得るか、または生成され得るが、これがさらなるアミノ酸を含んでいるか、またはアミノ酸を欠失しており、それに基づいて、配列番号1に対する配列アラインメントで、対応する配列位置または配列モチーフについての種々の絶対数が得られることを示すために用いられる。

【0098】

配列番号1の野生型配列とのgp41配列のマルチアラインメントおよび比較を、GCGPackage Version 10.2 (Genetics Computer Group, Inc) のPileUPプログラムを用いて実施する。PileUPは、Feng, D. F. Doolittle, R. F., J Mol Evol 25 (1987) 351-60のプログレッシブアラインメント法の簡便法を用いてマルチ配列アラインメントを作成し、そして同一、類似、または異なるアミノ酸残基についてのスコアリングマトリックスが適宜規定される。このプロセスは、2つの整列された配列のクラスターを生成する、2つのほとんど類似の配列のペアワイズアラインメントで開始する。次いで、このクラスターは、次の最も関連した配列に対して、または整列された配列のクラスターに対して整列され得る。配列の2つのクラスターは、2つの個々の配列のペアワイズアラインメントの単純な伸長によって整列され得る。最終アラインメントは、全ての配列が、最終ペアワイズアラインメントに含まれるまで、一連のプログレッシブ、ペアワイズアラインメント（漸増的に異なる配列およびクラスターを含む）によって達成される。従って、新規なHIV-1単離物のアミノ酸位置、または操作されたgp41のアミノ酸位置（野生型配列の555、566、573、および580の位置に相当する）は、容易に配置される。

10

【0099】

本発明によるHIV-1 gp41ポリペプチドの好ましい改変体は、その改変体が、555位にアミノ酸置換基を含むという点で特徴付けられ、ここでLeu555は、アスパラギン酸によって、またはグルタミン酸によって置換され、このグルタミン酸による置換が、最も好ましい置換である。

【0100】

20

本発明によるHIV-1 gp41ポリペプチドのさらなる好ましい改変体は、その改変体が、566位にアミノ酸置換基を含むという点で特徴付けられ、ここでLeu566は、アスパラギン酸によって、またはグルタミン酸によって置換され、このグルタミン酸による置換が、最も好ましい置換である。

【0101】

本発明によるHIV-1 gp41ポリペプチドのさらなる好ましい改変体は、その改変体が、573位にアミノ酸置換基を含むという点で特徴付けられ、ここでIle573は、セリンによって、またはトレオニンによって置換され、このセリンによる置換が、最も好ましい置換である。

【0102】

本発明によるHIV-1 gp41ポリペプチドのさらなる好ましい改変体は、その改変体が、580位にアミノ酸置換基を含むという点で特徴付けられ、ここでIle580は、アスパラギン酸によって、またはグルタミン酸によって置換され、このグルタミン酸による置換が、最も好ましい置換である。

30

【0103】

本発明はまた、HIV-2 gp36の改変体であって、Leu554、Leu565、およびVal579の位置（ここで、これらの位置は、HIV-2gp36野生型配列（配列番号2）から公知の位置であるか、またはそれから公知の位置に相当する）の群から選択された1つの位置において、少なくとも1つのアミノ酸置換、および多くとも3つのアミノ酸置換を含む改変体であって、その置換アミノ酸が、それぞれ、そして独立して、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸からなる群より選択されるという点で特徴付けられる改変体、に関する。

40

【0104】

この番号付けは、Guyader, M.ら、Nature 326 (1987) 662-9によって公開された野生型配列（配列番号2）に従う。この配列から公知の位置に相当するgp36内のアミノ酸位置は、gp41について上記されたように決定される。

【0105】

本発明によるHIV-2 gp36ポリペプチドの好ましい改変体は、その改変体が、554位にアミノ酸置換基を含むという点で特徴付けられ、ここでLeu554は、アスパラギン酸によって、またはグルタミン酸によって置換され、このグルタミン酸による置換が、最も好ましい置換である。

50

【0106】

本発明によるHIV-2 gp36ポリペプチドのさらなる好ましい改変体は、その改変体が、565位にアミノ酸換基を含むという点で特徴付けられ、ここでLeu565は、アスパラギン酸によって、またはグルタミン酸によって置換され、このグルタミン酸による置換が、最も好ましい置換である。

【0107】

本発明によるHIV-2 gp36ポリペプチドの好ましい改変体は、その改変体が、579位にアミノ酸換基を含むという点で特徴付けられ、ここでVal579は、アスパラギン酸によって、またはグルタミン酸によって置換され、このグルタミン酸による置換が、最も好ましい置換である。好ましい実施形態において、それぞれ改変体gp41、または改変体gp36は、上記のようにこのアミノ酸位置のうち2つで置換を含む。3つのアミノ酸置換を含む改変体がまた好ましい。なおさらなる好ましい実施形態において、改変体gp41は、上記に詳細に考察される4つのアミノ酸位置で置換を含む。

10

【0108】

好ましい実施形態において、それぞれ、gp41、またはgp36（すなわち、融合ペプチド、および膜貫通セグメントを欠くエクトドメイン）の完全な配列、または対応する哺乳動物免疫不全ウイルスエンベロープタンパク質（例えば、HTLV由来のgp21）の完全な配列を用いて、PPIシャペロンとの複合体を形成する。レトロウイルス表面糖タンパク質の断片（例えば、Luら（前出）によって記載されたHIV-1由来のgp41についての断片）を使用することもまた考えられる。このような断片は好ましくは、gp41の細胞外部分のC末端ヘリックス、およびN末端ヘリックスを含む。

20

【0109】

アミノ酸535位～681位を含む診断上関連するgp41（Chan, D. C.ら、Cell89（1997）263-73による命名法）は、標準的な手順による組み換え技術によって生成され得る。Luら（前出）の図1に記載されるとおり、別の興味深いgp41分子は、gp160前駆体分子のアミノ酸540～669にまたがる。

【0110】

レトロウイルス表面糖タンパク質についての代表的な例として、HIVの小エンベロープタンパク質は、取り扱いが非常に困難であり、かつ非常に異例な特性を示す。既に言及したとおり、e-gp41分子の最も重要な特徴の1つは、生理的な緩衝条件でのその不溶性である。組み換え生成されたgp41は、可溶性であり、かつpH3.0および低イオン強度において未変性様の構造を示す。しかし、このpHでさえ、バッファ中の塩濃度には敏感なままである。用いられる塩によって、100～500mMを超える塩の存在下でgp41は、沈殿する。以下により詳細に記載されるとおり、これは、カオトロピック剤によって（再度）可溶化（変性型で）され得る。

30

【0111】

生理的な緩衝条件は、通常、動物の血漿または血清に見出される塩およびpHの条件に相当すると理解されており、そして約7.4のpH値および約150mMの塩濃度によって規定される。本発明によるrsgp-シャペロン複合体は、これらの緩衝条件下で容易に可溶である。そこに存在するrsgpは、免疫学的に活性であり、従って、未変性様の構造に仕向ける。適切な界面活性剤の非存在下で、または適切な界面活性剤による事前処理なしには、gp41は、生理的な緩衝条件（例えば、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、150mMNaCl）下で、本質的に不溶性であるが、本発明によって記載された複合体は、適切なプロトコールに従った再折り畳み後に、容易に可溶性である。gp41エクトドメインは、本発明の複合体に含まれる場合、少なくとも100nMの濃度、好ましくは、1μM以上の濃度、最も好ましくは、10μM以上の濃度で可溶性である。従って、溶解度は、ナノモル未満の濃度から約マイクロモル濃度へ実質的に増大する。

40

【0112】

本発明の範囲のさらに良好な理解のために、可溶化および再生のために適用された緩衝条件は、必要に応じてかつ適切に改変されてもよく、そして本発明の過度の限定と理解され

50

るべきではなく、本発明は広範な範囲の緩衝条件にわたって首尾よく実行されるということを強調することが必要である。

【0113】

生理的バッファの全体的塩濃度は、シャペロン - gp41複合体が解離されず、そしてgp41が溶液中に留まることに注意を払いさえすれば、重要ではない。好ましくは、生理的バッファは、少なくとも10mMの緩衝系、および多くとも200mMを含む。バッファ構成成分の残りは、もしあれば、有意な緩衝能力のない塩、例えば塩化ナトリウムであり得る。この生理的バッファは、好ましくは、20～500mM、より好ましくは50～300mM、そして最も好ましくは100～200mMの塩濃度を有する。

【0114】

本発明によるプロセスにおいて、この生理的なバッファは、5.0～8.5の範囲のpH値を有するように変化されてもよい；より好ましくは、このようなバッファの範囲は、pH5.5～pH8.3である。なおより好ましくは、このような生理的バッファ条件は、上記で示されるような塩濃度、および6.0～8.0のpH値によって規定される；最も好ましくは、このような生理的バッファのpHは、6.5～7.8である。

【0115】

本発明において記載されるプロセスに従って、レトロウイルス表面糖タンパク質は、非生理的な緩衝条件下で可溶化され、シャペロンが添加され（または、共有結合したさらなるタンパク質ドメインとして既に存在する）、そして可溶化されたレトロウイルス表面糖タンパク質およびシャペロンを含む混合物が次に、生理的緩衝条件に調節される。レトロウイルス表面糖タンパク質単独では、そうされれば、自然に沈殿するが、それは、上記のプロセスでは驚くべきことに溶液中にとどまる。この重要な知見は、レトロウイルス表面糖タンパク質と、シャペロンとの間の複合体の形成に起因する可能性が最も高い。

【0116】

E. coliにおけるgp41の組み換え生成の場合、組み換え生成されたgp41は、封入体の形態において得られる。この材料は、高度にカオトロピックな試薬、例えば、7.0Mグアニジウムチオシアネートを用いて可溶化される。gp41ポリペプチドはこれらの条件下でほとんど構造化されていない。適切な工程においてこのバッファを30mMギ酸（pH3.0）に変えることによって、溶液中のgp41は、その未変性様の全ヘリックス状構造として認知されるものの形態になる。タンパク質の正しい折り畳みまたは不正確な折り畳みの状態をモニターするための1つの簡易な方法は、アミド領域（185-250nm）、および芳香族領域（260-320nm）における対応するCDスペクトルを分析することである。それに加えて、迷光粒子（凝集物のような）についての情報は、標準的なUVスペクトルから容易に得られ得る。

【0117】

ここで強調するのが重要なことは、本発明によるレトロウイルス表面糖タンパク質 - シャペロン複体内のレトロウイルス表面糖タンパク質は、未変性様折り畳みと考えられるものの形態をとるという事実である。これに反して、レトロウイルス表面糖タンパク質（カオトロピック剤によって天然のpHで可溶化されている）は、ほとんど構造化されておらず、従って規則正しい高次構造（コンフォメーション）エピトープを失っている。代替的に界面活性剤を用いることによって、レトロウイルス表面糖タンパク質を可溶化することがまた可能である。例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）は、gp41を可溶化するために首尾よく用いられている。しかし、このような「SDS - 可溶化材料（SDS-solubilized material）」は、例えば、gp41に対する抗体の検出のためのイムノアッセイにおける使用のための、選り抜きの材料ではない。さらに、（上記で考察したように）、このようなイムノアッセイは、好ましくはまた、gp41の高次構造（コンフォメーション）エピトープに対する抗体を検出する。そして界面活性剤が、高次構造（コンフォメーション）エピトープを部分的に消滅させることは排除できない。

【0118】

好ましくは、本発明によるrsgp-シャペロン複合体は、未変性様折り畳みされているrsgpによって特徴づけられる。このような複体内の、この未変性様折り畳みされたrsgpは、

10

20

30

40

50

例えば、必要な免疫学的または物理的特徴を示す。

【0119】

未変性様折り畳みを、好ましくは、近UV CD分光法によって評価するが、この方法は、緻密な球状タンパク質内の三次接触について報告する。gp41は、約3.0のpHで、そして低イオン強度の塩濃度で容易に可溶性であることが公知である。近UVCDデータによって、このようなバッファー条件下では、gp41は、未変性様折り畳みされた球状タンパク質の代表的なサインをとまなう特徴的な楕円率シグナルを示すことが実証される。図5に示されるとおり、gp41、およびFkpAを含む融合ペプチドのgp41部分は、酸性バッファー中のこの代表的な近UVCDスペクトルを示す。生理的緩衝条件下で、本発明による可溶性複合体の近UV CDスペクトルは、正確に折り畳まれたシャペロンのスペクトルと、未変性様折り畳みされたgp41のスペクトルの両方から構成される。これは、図7のFkpA-gp41融合タンパク質について示される。

10

【0120】

本発明による好ましい実施形態において、gp41-シャペロン複合体中の未変性様折り畳みを、近UVCDを分析することによって評価する。この近UV CDは、分子gp41、およびシャペロンの両方が未変性様折り畳みされていることを実証するために用いられることが好ましい。

【0121】

可溶性シャペロン - gp41複合体の生成は、非生理的緩衝条件から開始する。遊離のシャペロンと遊離の標的タンパク質（例えば、HIV-1由来のgp41）との間の複合体形成の場合、「非生理的」バッファーは、以下の2つの要件を満たさなければならない：（a）gp41が、未変性様の酸性構造で存在すること、および（b）PPIシャペロンが、少なくとも部分的に機能的（すなわち結合コンピテント）であること。このような緩衝条件から開始して、シャペロンは、アミロイド形成性タンパク質に結合し、そして非生理的条件から、幾分生理的な条件までの緩衝条件の変化が、アミロイド形成性タンパク質の沈殿なしに、可能である。

20

【0122】

シャペロンは、通常変性されたタンパク質に結合して、それらに作用し、それによってそれらの正確な（再）折り畳みを容易にするが、本発明が基づく状況は著しく異なる。適切な非生理的緩衝条件下で可溶化されたgp41は、未変性様型で存在すると考えられる（図1A、および1B、ならびに図5を参照のこと）。シャペロン機能の慣習的な見解とは異なり、本発明の方法では、シャペロンは、未変性様折り畳みタンパク質に結合して、緩衝条件（この緩衝条件下ではgp41はさもなければ不溶性であって沈殿する）において、このタンパク質を安定化するのである。

30

【0123】

本発明による好ましい実施形態において、PPIシャペロンは、FkpA、SlyD、および誘発因子からなる群より選択される。

【0124】

特にFkpA、またはSlyDがgp41の溶解度を改善して、それとともにかなり安定な複合体を形成することが見出されている。従って、さらに好ましい実施形態は、このシャペロンが、FkpA、およびSlyDを含む群から選択されるという点で特徴付けられる。最も好ましいのは、シャペロンFkpAである。

40

【0125】

さらに上記で記載したように、またシャペロンの断片は、所望の機能をもたらすために用いられ得る。モジュールシャペロンの場合、FKBPと同様に、触媒性モジュール、および結合モジュールを含み、このような断片は、結合ドメインを少なくとも含むこと、またはこれらの断片が、本質的にこの結合ドメインに匹敵する機能を少なくとも示すことが好ましい。

【0126】

FKBP12は、FKBPファミリーのヒトメンバーであり、そしてPPIaseの触媒性イソメラーゼド

50

メインから本質的になる。FKBP12は、さらなるポリペプチド結合ドメインを欠くので、これは、FKBPファミリーの他のメンバーに比べた場合、折り畳まれていないか、または部分的に折り畳まれたタンパク質基質に対して、有意に低下した結合親和性を示す。FKBP12の変性および再折り畳みは、可逆プロセスであることが示されている (Egan, D. A.ら、Biochemistry 32 (1993) 1920-7; Scholz, C.ら、J Biol Chem 271 (1996) 12703-7)。本発明者らは、FkpA (25-270)、および SlyD (1-165) の再折り畳み、および変性が、いずれも可逆であり、従ってここに記載されたプロセスの中心的な必要条件を満たすということを見出す。

【0127】

好ましい実施形態において、本発明は、gp41、および (FKBPファミリーから選択された) シャペロンを含む可溶性複合体に関する。 10

【0128】

上記のように、このような可溶性複合体であって、HIV-1由来のgp41、または別の哺乳動物免疫不全ウイルス由来の相同体を含む複合体は、PPIシャペロン (例えば、組み換え技術によって生成された)、および組み換え生成されたgp41を混合することによって容易に調製され得る。次いで、この複合体は、2つの独立した分子の間で、すなわち、分子間で形成される。

【0129】

複合体形成は、動的なプロセスであって、ここで解離および再会合が並行して生じる。これは、例えば、FkpAとgp41との間の、分子間、および分子内 (例えば、融合構築物内) の会合の両方について真である。gp41は、生理的バッファから直ちに、かつ定量的に沈殿するので、両方のパートナーの濃度を、選択して、これによって非臨界濃度、または非凝集濃度の遊離型gp41しか存在しないこと、および大量のgp41がgp41-シャペロン複合体の型で結合されかつ安定化されることを確実にしなければならない。 20

【0130】

用いたシャペロンによって、gp41分子に比較して、モル基準で、少なくとも2倍多いシャペロンを混合することが必要であることが見出されている。好ましい実施形態においては、従って、本発明は、gp41、およびシャペロン (好ましくはFkpA) の混合物を含む試薬に関する。好ましくは、このような混合物は、gp41に比べた場合、FkpAをモル過剰で含む。FkpAより3~10倍存在することが好ましい。FkpA対gp41の最も好ましいモル比は、4~6である。 30

【0131】

例えば、共有結合した、少なくとも1つのrsgpドメインおよび少なくとも1つのPPI-シャペロンドメインを含むタンパク質の異なるドメインの間の分子内複合体の形成が、例えば、安定性および生成の容易さに関して、さらなる有利な効果をもたらすということがまた見出されている。例えば、両方のドメインが共有結合されている場合、1:1 (rsgp対シャペロン) の比が、可溶性複合体を形成するのに十分であることが見出されている。

【0132】

レトロウイルス表面糖タンパク質およびシャペロンを組み換え的に連結された形態で含む可溶性複合体は、本発明によるさらなる好ましい実施形態を表す。このような組み換えポリペプチドに含まれる最も好ましいrsgpは、HIV-1由来のgp41、およびHIV-2由来のgp36である。 40

【0133】

少なくとも1つのrsgpドメイン、および少なくとも1つのPPIシャペロンドメインを含む組み換えタンパク質について、非生理的緩衝条件から、生理的緩衝条件への移行は、異なる方法で達成され得る。gp41とFkpAとの間の可溶性分子内複合体は、非生理的緩衝条件を、透析、急速希釈、またはマトリックス補助再折り畳みによって生理的緩衝条件に調節することによって容易に得られる。可溶性gp41シャペロン複合体を含む混合物は、改変のために直接用いられ得る。

【0134】

本発明による可溶性複合体（例えば、gp41およびPPIシャペロンを含む）はまた、組み換え技術によって得られた両方のタンパク質ドメイン（gp41、およびシャペロン）を含む1つのポリペプチドから開始して生成されてもよい。gp41 - シャペロン複合体は、その点で、事実上、分子内である。好ましくは、本発明による組み換えポリペプチドは、gp41とシャペロン、またはgp36とシャペロンを含む。なおさらに好ましい実施形態では、本発明は、組み換えタンパク質であって、少なくとも1つのrsgpドメイン、および少なくとも2つのPPI - シャペロンドメインを含む組み換えタンパク質に関する。1つのrsgpドメイン、および2つのPPIシャペロンを含む組み換えポリペプチドがまた好ましい。

【0135】

標準的な分子生理的技術を適用して、本発明による可溶性gp41 - シャペロン複合体を得るために用いた組み換えポリペプチドを発現する。好ましくは、このシャペロン遺伝子は、発現ベクター（これは、gp41およびシャペロンの両方についての遺伝情報、ならびに必要に応じて、適切なペプチド性リンカー配列についての遺伝情報も含む）中に、標的タンパク質遺伝子上流にインフレームで位置する。このような組み換え融合タンパク質の大規模な生成のために好ましい宿主は、E.coliである。

10

【0136】

好ましい実施形態において、本発明は、可溶性複合体であって、それぞれgp41、またはgp36、およびペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロンから選択されたシャペロンを含む複合体に関する。この可溶性複合体が、分子内複合体、であって、好ましくは、gp41、またはgp36、およびPPIシャペロンを含む組み換えポリペプチド内の分子内複合体であることがなお、さらに好ましい。最も好ましくは、組み換えポリペプチドのPPIシャペロン部分は、いずれの輸送シグナルペプチド（対応する前駆体分子の）も欠き、そして成熟PPIシャペロンに相当する。好ましい実施形態において、この組み換えタンパク質は、機能的なシグナル配列を欠くので、この遺伝子産物は、細菌のサイトゾル中に蓄積する。

20

【0137】

組換え産生されたFkpA-gp41に含まれるgp41の著しい特徴は、「非シャペロン（unchaperoned）」gp41エクストドメインに比較した場合の異例な溶解度である。「カオトロピック材料（chaotropic material）」（すなわち、6.0-7.0M GuHCl中のFkpA-gp41）は、異なる方法で再折り畳みされ得、全てが熱力学的に安定、かつ可溶性の未変性様形態になることは興味深い。再折り畳みは、透析および急速希釈の両方によって、ならびに再生サイズ排除クロマトグラフィー、またはマトリックス補助再折り畳みによって高収率で達成される。これらの知見によって、この共有結合型において、gp41-FkpA融合ポリペプチドが、準安定なタンパク質よりも熱力学的にかなり安定であることが示唆される。

30

【0138】

組み換えFkpA-gp41ポリペプチドは、異なる折り畳み要件を有する2つのタンパク質ドメインを含む。精製プロトコルは、初期の変性工程を含むので、シャペロンの折り畳みが可逆であることは必須である。実際、共有結合したタンパク質複体内でのFkpAおよびgp41の両方の可逆的かつ独立した再折り畳みについて、説得力のある分光学的な証拠が存在する。C末端切断型SlyDの再折り畳みは、いずれにせよ可逆であることが見出されている。

40

【0139】

レトロウイルス表面糖タンパク質、およびシャペロンを含む組み換えポリペプチドであって、さらにこれらの2つのポリペプチドドメインの間に適切なペプチドリinker配列を含む、ポリペプチドがまた好ましい。このようなペプチドリinker配列は、用いられたrsgpおよびシャペロンドメインの最適の分子内会合を確実にするように選択される。好ましくは、このようなリンカー配列は、約20アミノ酸長であり、そして可変性（flexibility）および溶解度の両方を支持するアミノ酸（例えば、グリシン、およびセリンなど）を含む。好ましくは、このリンカーは、10～50アミノ酸長である。より好ましくは、この長さは、12～40アミノ酸であり、そして最も好ましくは、このリンカーは、15～35アミノ酸を含む。Rsgpおよびシャペロンの両方とも、常に密接に近接している（例えば、適切なリンカー

50

によって互いに支持される)。好ましい実施形態において、この組み換えポリペプチドは、可変性のリンカーを介してその標的タンパク質に連結された成熟FkpAを含む。このことによって、データが示すとおり、さらなる安定化効果がもたらされる。

【0140】

驚くべきことに、gp41は、PPIシャペロンとgp41との間の分子内複合体の一部として、可溶性であり、かつ安定であることが見出されている。同じことが、PPIシャペロンとgp36、またはPPIシャペロンとgp21 (HTLV由来) を含む分子内複合体についても真実である。このような複合体におけるgp41の改善された安定性は、さらなる利点をもたらす。例えば、完全に再生された組み換えgp41 - シャペロン分子を非常に簡単に獲得することが可能である。組み換えタンパク質は、カオトロピック剤 (例えば、塩化グアニジウム) を用いた処理によって最初に可溶化される。可溶化された材料をゲル濾過カラム (適切な生理的バッファーを用いて平衡化された) に単に通過させることによって、共有結合したタンパク質ドメインを含む完全に再生されたタンパク質を得ることができる (実施例2.3、ならびに図7および8を参照) のこと)。

10

【0141】

可溶性分子内gp41 - シャペロン複合体は、なお、さらなる顕著な利点を示す：これは、界面活性剤の変性作用に対してかなり安定である。この効果は、この融合タンパク質が、それぞれ2つのシャペロンおよび1つのgp41、または1つのgp36を含む場合、なおさらに明白になる。ほとんどのイムノアッセイは、非特異的な結合によって生じる問題を低減し、そして少なくとも部分的に回避するために、界面活性剤の存在下で実施される。HIV診断の場合、前述の理由のせいで、ただしさらにウイルス粒子を分解しかつ破壊して、これによってウイルス抗原 (gp24など) の検出を容易にするために、かなり強力な界面活性剤が用いられる。

20

【0142】

SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) によって可溶化された、組み換え生成されたgp41エクドメインは、例えば、抗HIV抗体、またはp24抗原の検出において、慣用的に用いられるアッセイバッファーにおいて免疫反応性ではない (図9を参照のこと)。しかし、同じ緩衝条件下では、gp41 (本発明による、PPIシャペロンとの分子内複合体の一部である) は、強力に免疫反応性である。図9から判明するとおり、同じアッセイ条件下で、かつ同じ患者血清を用いて、この材料は、未変性様可溶性gp41 (さらに、試験された界面活性剤の存在下で安定である) の存在によってのみ説明され得る、優れた競合曲線を生じる。

30

【0143】

これは、本発明による、この複合体の非常に重要な特徴であって、この可溶性rsgp - シャペロン複体内のrsgpは、生理的な緩衝条件、例えば、20mMリン酸、150mM塩化ナトリウムバッファー中で、pH7.4において、未変性性折り畳みされる。これは治療適用のため、そして診断適用のための大きな利点である。好ましい実施形態において、本発明は、生理的緩衝条件下で可溶である試薬の組成物であって、分子内複合体または分子間複合体 (これは、レトロウイルス表面糖タンパク質、およびペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロンから選択されるシャペロンを含む) を含む、組成物に関する。

【0144】

従って、HIV-1由来の未変性様折り畳みgp41、およびペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロンから選択されるシャペロンを含む可溶性複合体は、本発明の非常に好ましい実施形態を表す。

40

【0145】

従って、HIV-2由来の未変性様折り畳みgp36、およびペプチジルプロリルイソメラーゼクラスのシャペロンから選択されるシャペロンを含む可溶性複合体はまた、本発明の非常に好ましい実施形態を表す。

【0146】

治療に関して、それぞれ、「可溶性、かつ未変性様折り畳みされた (soluble and native-like folded)」gp41またはgp36を提供することによってなされる進歩は、かなり明白で

50

ある。例えば、gp41は、生理的緩衝条件下で、初めて、この時、利用可能となる。

【0147】

好ましい実施形態において、記載されるような可溶性複合体は、医薬として用いるための試薬の組成物を生成するために用いられる。試薬の組成物は、生理的に許容され得る賦形剤、ならびに必要なに応じて、適切な添加物、および/または従来の補助物質とともに、gp41-シャペロン複合体を含む。

【0148】

gp41の7残基反復か、またはgp41C末端ヘリックスに由来するペプチドが、抗ウイルス活性を保有することは公知である(Wild, C.ら、Proc Natl Acad Sci USA 89 (1992) 10537-41)。それらは、gp41のいわゆる「ヘアピン中間体(hairpin-intermediate)」と特異的に相互作用することによってウイルス侵入を邪魔する(概説については、Doms, R. W., およびMoore, J. P., J Cell Biol 151 (2000) F9-14を参照のこと)。本発明者らは、本発明によるrsgp-シャペロン複合体が抗ウイルス活性を示すことを見出した。gp41-シャペロン複合体、もしくはgp36-シャペロン複合体、または両方を、第一の好ましい治療適用において治療上有効な用量で含有する、試薬の組成物を用いて、宿主生物体内のHIV進入、およびHIV伝播を防止する(「ウイルス侵入阻害(virusentry inhibition)」)。

10

【0149】

これは、哺乳動物における免疫応答を誘発するための組成物などを使用するための、gp41-シャペロン複合体を含む試薬の組成物のさらなる好ましい治療適用を表す。記載された複合体は、公知の他のいずれのHIV免疫原よりも多いgp41エピトープを利用できる(例えば、Rootら(前出)を参照のこと)。従って、この新規な免疫原は、かなり広範な免疫応答を誘導することが期待される。

20

【0150】

診断手順に関して、本発明による可溶性rsgp-シャペロン複合体の明白な利点は、例えば、レトロウイルス表面糖タンパク質(例えば、生理的緩衝条件下でのgp41)の安定性の増大、および/または診断感度の増大、および/または高次構造(コンフォメーション)的なエピトープの存在数の増大、および/または正確に折り畳まれたrsgp(gp41など)を容易に標識する能力である。

【0151】

周知の標識は、固相結合基などの、マーカー基、またはエフェクター基である。標識された可溶性rsgp-シャペロン複合体は、本発明によるさらなる好ましい実施形態を表す。

30

【0152】

標識基は、以下から選択されてもよい：任意の公知の検出可能マーカー基(例えば、色素)、蛍光標識基(例えば、化学発光基)、例えば、アクリジニウムエステル、またはジオキセタン、または蛍光色素、例えば、フルオレセイン、クマリン、ローダミン、オキサジン、レゾルフィン、シアニン、およびそれらの誘導体。標識基の他の例は、蛍光金属錯体(例えば、ルテニウム、またはユーロピウム錯体)、例えば、ELISAのために、またはCEDIAのために用いられるような酵素(Cloned Enzyme Donor Immunoassay、例えば、EP-A-0061 888)、ならびに放射性同位体。

【0153】

エフェクター基は、例えば、バイオアフィン(bioaffine)結合対の1つのパートナーを含む。アッセイを実施する間、エフェクター基は、バイオアフィン結合対の他のパートナーと特異的に、好ましくは非共有結合的に相互作用する。適切な結合対の例は、以下である：ハプテン、または抗原/抗体、ビオチン、またはビオチン類似体(例えば、アミノビオチン)、イミノビオチン、またはデスチオビオチン/アビジン、またはストレプトアビジン、糖/レクチン、核酸、または核酸類似体/相補的核酸、およびレセプター/リガンド、例えば、ステロイドホルモンレセプター/ステロイドホルモン。好ましい結合対のメンバーは、ハプテン、抗原、およびホルモンを含む。特に好ましいのは、ハプテン様ジゴキシン、およびビオチン、ならびにそれらの類似体である。

40

【0154】

50

rsgpおよびPPIシャペロンを含む可溶性複合体は、好ましくはrsgpに対する抗体の検出のためのイムノアッセイにおいて用いられる。好ましくは、gp41 - シャペロン複合体、および/またはgp36 - シャペロン複合体が用いられる。非常に好ましい実施形態において、gp41およびPPIシャペロンを含む標識された可溶性複合体は、gp41に対する抗体の検出のためのイムノアッセイにおいて用いられる。最も好ましくは、標識された複合体は、PPIシャペロンおよびgp41を含む組み換えポリペプチド内の分子内複合体である。

【0155】

イムノアッセイは、当業者に周知である。このようなアッセイを実施するための方法、ならびに実際の適用および手順は、関連の教科書にまとめられている。関連の教科書の例は、「Practice and theory of enzyme immunoassays」(1990) 221-278、編集、R. H. Burdon、およびv. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam中の、Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates、および「Methods in enzymology」(1980) 編集、S. P. Colowick, N. O. Caplan、およびS. P., Academic Press中のTijssenの種々の巻であって、免疫学的検出法を取り扱う、特に70、73、74、84、92、および121巻である。

10

【0156】

新規な可溶性rsgp - PPIシャペロン複合体を用いて、検出の様式(例えば、放射性同位体アッセイ、酵素イムノアッセイ、電気化学発光アッセイなど)、またはアッセイ原理(例えば、テストストリップアッセイ、サンドイッチアッセイ、またはホモジニアスアッセイなど)とは独立して、抗HIV抗体の検出のためのアッセイを改善し得る。

20

【0157】

HIV感染の確実で、かつ鋭敏な早期検出のために、体液サンプル中のウイルス抗原および抗ウイルス抗体の両方を測定することが必須である。本発明による可溶性複合体は、生理的緩衝条件において、抗gp41抗体、および/または抗gp36抗体の検出を可能にする。抗gp41抗体、および/または抗gp36抗体の検出は、このような併用型HIV検出システムの有益な部分である。従って、好ましい実施形態において、本発明は、HIV検出システムであって、gp41、および/またはgp36シャペロン複合体の使用に基づく抗gp41抗体、および/または抗gp36抗体の検出を包含するシステムに関する。最も好ましくは、このような複合体に基づく、抗gp41抗体、および/または抗gp36抗体の検出は、HIV抗原、好ましくはp24抗原の検出とともに実施される。

30

【0158】

先行技術から公知のとおり、細菌、真菌、またはウイルスのような感染因子に対する抗体は、好ましくは、二重抗原架橋コンセプトに従って実施されるアッセイによって検出される(時には、このアッセイコンセプト(double antigen bridge concept)はまた、二重抗原架橋コンセプトと名付けられる、なぜなら2つの抗原が抗体によって架橋されるからである)。このようなアッセイにおいては、抗体が、所定の抗原の少なくとも2つの異なる分子に、その2つ(IgG、IgA、IgE)、または10(IgM)のパラトープ(抗原結合部位)で結合する能力が必要とされ、かつ用いられる。

【0159】

この架橋コンセプトに従う体液からの抗体の検出は、多くの異なるアッセイ設定で実施され得る。簡易な設定は、固相に対する抗原の直接コーティング、および同じ抗原の標識型での使用を含む。適切なアッセイ条件下で、サンプル中の抗体は、固相結合抗原と標識抗原との間の架橋を形成する。従って、検討中の抗体がサンプル中に存在する場合のみ、架橋が形成されて、シグナルが検出され得る。

40

【0160】

「固相抗原(solid phase antigen)」、および「検出抗原(detection antigen)」の基本的な構造は、好ましくは、同じである。例えば、1または数個のエピトープを含むポリペプチドを用いて、固相を直接または間接的にコーティングしてもよいが、標識またはマーカに結合した同じ合成ポリペプチドが、検出抗原として用いられる。類似であるが、異なる抗原であって、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抗原を

50

使用することも可能である。このようなアッセイを実施するための必須の要件は、関連のエピトープ（単数または複数）が、両方の抗原上に存在することである。もちろん、二重抗原架橋アッセイ形式の多くの改変型が存在する。このような改変型は、例えば、固相に対する抗原の間接的なコーティングを含む。好ましくは、特定の結合対、最も好ましくは、ビオチン - ストレプトアビジン（またはビオチン - アビジン）系が、固相に対して抗原を間接的に結合するために用いられる。一方では、このようなシステムにおける検出のために用いられる抗原は、マーカー（例えば、放射性同位体、酵素、蛍光分子など）を直接有していなくてもよいが、それよりむしろ、例えば、ハプテン（例えば、ジゴキシン）を担持することによって、間接的に検出され得る。次いで、このような間接的な検出は、例えば、標識された抗ジゴキシン抗体によって実施され得る。

10

【0161】

好ましい実施形態において、本発明は、第一のシャペロン - 抗原複合体を含む第一の抗原、および第二のシャペロン - 抗原複合体を含む第二の抗原を含む、二重抗原架橋コンセプトに従うイムノアッセイに関する。

【0162】

さらなる好ましい実施形態において、本発明は、二重抗原架橋コンセプトに従うイムノアッセイであって、第一のシャペロン - 抗原複合体が、捕捉抗原として用いられ、そして第二のシャペロン - 抗原複合体が検出抗原として用いられることを特徴とするイムノアッセイに関する。

【0163】

本発明において記載されたようなシャペロン - 抗原複合体は、種々のポリペプチド（さもないければ取り扱いが困難である）の溶解性をもたらすだけでなく、この二重抗原架橋コンセプトに従って、極めて有利なイムノアッセイを可能にする。

20

【0164】

この二重抗原架橋コンセプトによる、このようなイムノアッセイの特に魅力的な特徴は、それぞれ、固相結合抗原との複合体形成のため、および検出抗原との複合体形成のために、異なるシャペロンを用いることが可能となるということである。アッセイのこのような改変によって、非特異的結合の問題をさらに改善する。サンプル中の抗体（シャペロンに対して反応性であり、従って偽陽性のシグナルを生じ得る）は、異なるシャペロンを用いてそれぞれ、固相抗原、および検出抗原と複合体化する場合、架橋を形成しない。従って、本発明のこの様式においては、非特異的結合に起因する陽性シグナルの可能性は、大きく低下する。従って、好ましい実施形態において、本発明は、二重抗原架橋コンセプトに従うイムノアッセイであって、第一および第二のシャペロン - 抗原複合体の第一シャペロンおよび第二シャペロンが、お互いに異なることを特徴とする、イムノアッセイに関する。

30

【0165】

最もよく特徴付けられているシャペロンのほとんどは、*Escherichia coli*から単離されており、生物工学の研究において広範に用いられる。*Escherichiacoli*は、広範に分布した細菌種であるため、多くの哺乳動物は、この細菌に由来するタンパク質に対する抗体を発現している。このような抗体によって生じる偽陽性反応の可能性を減少させるため、別個の細菌種（好ましくは好熱性の菌種）由来の少なくとも1つのPPIシャペロンを使用することが好ましい。好ましくは、このシャペロンは、特に、*Thermatogamaritima*、*Aquifex aeolicus*、および*Thermus thermophilus*を含む細菌の群の、好極限性細菌由来である。

40

【0166】

イムノアッセイ一般における、そして好ましくは架橋コンセプトに従うイムノアッセイにおけるシャペロン - 抗原複合体の使用はまた、このような複合体のシャペロンを誘導体化する可能性を提供し、そして抗原自体の改変を必要としない。第二の化学部分によるポリペプチドの改変、例えば、その分子に対する標識のカップリングは、このポリペプチドにマイナスに影響するリスクを含むということが一般に認められる。例えば、検討中のエピトープが、損なわれ得るか、または非特異的な結合が、このような標識によって生じ得る

50

。本発明に従って、シャペロン - 抗原複合体内のシャペロンを特異的に誘導体化することが、ここで、可能である。

【0167】

好ましい実施形態において、二重抗原架橋コンセプトによるイムノアッセイは、捕捉抗原として用いられる第一のシャペロン - 抗原複合体が、固相結合基を含むことをさらなる特徴とする。

【0168】

さらなる好ましい実施形態において、架橋コンセプトによるイムノアッセイが実施される。このイムノアッセイは、検出抗原として用いられる第二のシャペロン - 抗原複合体がマーカ基を含むことをさらなる特徴とする。

10

【0169】

別の実施形態において、rsgpおよびPPIシャペロンを含む可溶性複合体（例えば、gp41 - シャペロン複合体、および/またはgp36 - シャペロン複合体）はまた、被験体（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）における免疫応答を惹起するために用いられ得る。この可溶性複合体は、被験体に対して組成物（例えば、この組成物は、賦形剤、または担体を含んでもよい）として投与され得る。このような組成物はまた、アジュバントを含んでもよい。従来のアジュバントの例としては、フロイントの不完全アジュバント、フロイントの完全アジュバント、Merck65、AS-2、ミョウバン、リン酸アルミニウム、鉍物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、および表面活性物質（例えばリゾレシチン、ブルロニックポリオール類、ポリアニオン、ペプチド、油状エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノール）が挙げられるがこれらに限定されない。他の有用なアジュバントとしては、細菌莢膜多糖類、デキストラン、IL-12、GM-CSF、CD40リガンド、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-13、IL-18、または任意のサイトカインもしくは細菌のDNA断片が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0170】

1用量（投与）の可溶性複合体組成物が与えられてもよい。しかし、最初の投与後に、ブースト投与（例えば、1回、2回、3回、それ以上）が続けられてもよい。被験体に投与された用量の回数は、被験体の可溶性複合体組成物に対する応答性にある程度依存する。本発明の範囲内で、適切な投薬の回数としては、可溶性複合体に対して動物を免疫するために必要な任意の回数が挙げられる。

30

【0171】

適切な複合体組成物の第二の投与（ブースター）は、最初の投与後、約7日～1年間の間に与えられ得る。最初の投与と2回目の投与との間の時間は、14日～6ヶ月、21日～3ヶ月、しばしば、最初の投与後、約28日～2ヶ月の間であり得る。第3回目の投与（2回目のブースター）は、最初の投与後、約14日～10年の間に、例えば、最初の投与後、約14日～3年間の間に、しばしば、約21日～1年の間に、非常にしばしば、最初の投与後、約28日～6ヶ月の間に与えられてもよい。その後のブースターは、2週間間隔、または1ヶ月、3ヶ月、もしくは6ヶ月から10年間の間隔で投与されてもよい。

【0172】

典型的には、抗原に対して動物を免疫するのに十分である可溶性複合体の量（すなわち、「免疫学的に有効な用量」、または「治療上有効な用量」）が、被験体に投与される。「免疫学的に有効な量」を達成するのに十分な量は、被験体の体重および健康の全身的状态に、ならびに処方医または資格のある他の人員の判断に、ある程度依存する。

40

【0173】

可溶性複合体の有効用量は、免疫応答の誘導を達成するために動物モデルにおいて処方され得る；このようなデータを用いて、動物モデルに基づいてヒトに対する投与を容易に最適化し得る。用量は典型的には、約1fg～約100 μ gの間、しばしば、約1pg～約100 μ gの間、それよりしばしば、約1ng～約50 μ gの間、そして通常、約100ng～約50 μ gの間である。いくつかの実施形態において、用量は、被験体の体重1kgあたり、約1fg～約100 μ gの間、しばしば被験体の体重1kgあたり、約1pg～約100 μ gの間、それよりしばしば、約1ng～約5

50

0 μ gの間、そして通常、約100ng ~ 約50 μ gの間である。

【0174】

本発明の可溶性複合体含有組成物は、種々の方法、および種々の形式で投与され得る。可溶性複合体組成物は、担体、および賦形剤（例えば、バッファー、炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、またはアミノ酸（例えば、グリシン）、抗酸化剤、静菌剤、キレート剤、懸濁剤、増粘剤、および/または保存剤）；水、油、生理食塩水、水性デキストロース、およびグリセロール溶液、適切な生理的条件下に必要な他の薬学的に許容され得る補助物質（例えば、緩衝化剤、張度調節剤、湿潤剤）などを含んでもよい。従来のアジュバントもまた、この組成物中に組み込まれてもよい。

【0175】

任意の適切な担体が、本発明の組成物を投与するために用いられ得るが、担体のタイプは、投与の様式によって異なる。化合物はまた、リポソーム内にカプセル化され得る。例えば、Ticeら、米国特許5,942,252,1999に記載されるような生分解性マイクロスフェアは、ある場合には担体として都合がよい。

【0176】

従来の技術（例えば、濾過滅菌）によって達成されるような、この組成物の滅菌が望ましい。得られた水溶液は、そのまま用いるためにパッケージングされてもよいし、凍結乾燥されてもよい。

【0177】

本発明の可溶性複合体組成物は、種々の方法で投与され得る。この方法としては、注射（例えば、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内など）による方法、吸入による方法、局所投与による方法、坐剤による方法、経皮パッチを用いることによる方法、または経口による方法が挙げられる。

【0178】

注射によって投与される場合、組成物は、水溶液中に、好ましくは生理的に適合するバッファー（例えば、ハンクス溶液、リンガー溶液、20mMリン酸 150mM塩化ナトリウムバッファー（pH7.4）、または生理的食塩水のバッファー）中に処方され得る。この溶液は、懸濁剤、安定化剤、および/または分散剤のような処方剤（formulatory agent）を含んでもよい。あるいは、この組成物は、使用前の適切なビヒクル（例えば、滅菌発熱因子無含有水）との構成のために粉末型で存在してもよい。吸入送達型組成物は、適切な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、二酸化炭素、または他の適切なガス）の使用によって、圧縮パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレーとしてであってもよい。圧縮されたエアロゾルの場合、投薬量単位は、一定量を送達するためのバルブを備えることによって決定され得る。インヘイラーまたは吸入器（insufflator）における使用のための例えばゼラチンのカプセル、およびカートリッジが、処方されてもよく、これは、タンパク質および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）の粉末混合物を含有する。局所投与のために、組成物は、当該分野で周知のとおり、溶液、ゲル、軟膏、クリーム、懸濁液などとして処方されてもよい。いくつかの実施形態では、投与は、経皮パッチによる。坐剤組成物はまた、従来の坐剤基剤を含むように処方されてもよい。

【0179】

投与が経口である場合、組成物は、この組成物と薬学的に許容され得る担体とを合わせることによって容易に処方され得る。固体担体としては、マンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウムなどが挙げられる；このような担体は、経口摂取用の、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁物などの形成を可能にする。このような処方物は、粉末、カプセル、および錠剤であってもよい；適切な賦形剤としては、糖、セルロース調製物、顆粒化剤、および結合剤のような増量剤（filler）が挙げられる。

【0180】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体（結合断片（例えば、F(ab)2）、および

10

20

30

40

50

一本鎖型を含む)を生成するための方法は、周知である。しかし、多くの抗原は、十分な抗体応答を誘発できない。1つの実施形態において、本発明の可溶性複合体および抗原を含む組成物が、動物に投与され、これによって動物中の免疫応答が惹起される。ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体が、標準的な技術によって引き続き調製される。

【0181】

rsgpおよびPPIシャペロンを含む可溶性複合体(例えば、gp41-シャペロン複合体、および/またはgp36-シャペロン複合体)はまた、膜融合を阻害することなどによって、細胞へのウイルス侵入を阻害するために用いられ得る。細胞は、インビトロであっても、インビボであっても、またはエキソビボであってもよい。組成物および投与の方法は、免疫応答を惹起するために用いられた組成物および方法について記載されたものと同様である。細胞へのウイルス侵入阻害が、ワクチン接種を用いて達成されるならば、アジュバントが用いられてもよい。インビトロおよびエキソビボ投与のために、当業者は、細胞、培養条件、および時間制限(もしあれば)に部分的に基づいて適切な方法を選択する。例えば、このような有用な方法の1つは、可溶性複合体を担持するリボソームを処方することである。

10

【0182】

以下の実施例、参考文献、および図面は、本発明の理解を助けるために提供されるものであって、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に記載される。本発明の趣旨から逸脱することなく、この記載された手順において改変がなされ得ることが理解される。

【0183】

20

実施例

実施例1 gp41およびPPIシャペロンを含む可溶性分子間複合体の生成

1.1 E.coli FkpAの生成

Bothmann, H., およびPluckthum, A., J Biol Chem 275 (2000) 17100-5に従って(ただしそれをわずかに改変して)、FkpAをクローニングし、発現させ、そして精製した。保存のために、20mM NaH_2PO_4 / NaOH (pH6.0)、100mM NaClに対してタンパク質溶液を透析して、26mg/ml (1mM) に濃縮した。

【0184】

サイトゾル発現のために、上記の発現ベクターのFkpAコード配列を、シグナルペプチドをコードする配列部分を欠くように、そして代わりに成熟FkpAのコード領域のみを含むように改変した。

30

【0185】

1.2 gp41 (535-681) -His6の生成

gp41 (535-681) - His₆を、T7プロモーターベースの発現系においてクローニングして発現し、宿主細胞の封入体中に蓄積させた。単離した封入体を、6M塩化グアニジウム中で溶解した。His-タグ化タンパク質を、Ni-キレートカラム上で精製し、その後、Sepharyl 100上で、6Mグアニジウム中でゲルろ過した。Wingfield, P. T.ら、Protein Sci 6 (1997) 1653-60に記載のとおり、急速希釈によってタンパク質を再折り畳みした。最終の緩衝条件は、30mMギ酸ナトリウム(pH3.0)であった。折り畳みの状況を、近UVCDおよび遠UVCDを用いて両方の緩衝条件について評価した。図1Aおよび1Bからわかるように、遠UVCDおよび近UVCDの両方のスペクトルによって、gp41がカオトロピック剤の非存在下において、pH3.0でのみ、未変性様折り畳みをとることが示唆される。

40

【0186】

1.3 E.coli FkpAの存在下における、gp41エクトドメイン(HIV)のpH3.0から生理的pHへのpHシフト

1.3.1 コントロール実験

コントロール実験において、可溶性e-gp41 (30mMギ酸塩、pH3.0)を、20mMリン酸ナトリウム(pH7.5)、50mM NaCl, 1mM EDTAの最終緩衝条件中に100倍希釈した。最終タンパク質濃度は、約1 μ Mであった。UVスペクトルを、1分後、および10分後に記録した。非シャペロンのエクトドメインは、中性へのpHシフトの際に、自然に凝集することが、図2におけ

50

るUVスペクトルから明白である。図2は、gp41の異例な凝集傾向を強調する意図がある；この分子の自発的な凝集は、上の線によって示される段階をかなり超えて進行する。

【0187】

1.3.2 pH3.0でのFkpAとのgp41のブレインキュベーションによって中性pHにシフトできる分子シャペロンFkpAの可溶化能力について試験するために、エクトドメインgp41、およびFkpAを、1:2、および1:4の分子比で混合して（約3.5のpHで30mMギ酸塩）、1分間、同時インキュベートさせた。次いで、得られた複合体を、20mMリン酸ナトリウム（pH7.4）、50mM NaCl、1mM EDTAの緩衝条件中への12倍希釈によって、中性のpHにシフトさせた。試験管中における結合パートナーの最終濃度は、それぞれ、1μMのgp41、2μMおよび4μMのFkpAであった。全ての反応を室温で実施した。1分後、および10分後、凝集についてgp41サンプルを試験するために、UVスペクトルを記録した。図3A、および3Bから、FkpAが、用量依存性の様式で、gp41の凝集をかなり低下させることが明白である。Thermatogamaritima由来の誘発因子、およびE. coli由来のC末端切断型SlyDを用いて匹敵するデータが得られている。

10

【0188】

実施例 2

共有結合したgp41 - FkpAの組み換え生成

2.1 FkpA、およびgp41を含む発現プラスミドの構築

第一の工程において、Stratagene (La Jolla, CA; USA) のQuickChange部位特異的変異誘発キットを用いて、以下のプライマーを用い、実施例1.1のプラスミドから、成熟E. coli FkpAのコード領域における制限部位BamHIを欠失させた：

20

5' - gcgggtgttccgggtatcccaccgaattc - 3' (配列番号3)

5' - gaattcgggtgggatacccggaacacccgc - 3' (配列番号4)

この構築物を、EcFkpA (DbamHI) [GGGS]₃と命名した。

【0189】

第二の工程において、HIV-1エンベロープタンパク質由来のアミノ酸535-681をコードする遺伝子断片を、実施例1.2の構築物から、以下のプライマーを用いて、PCRによって増幅した：

5' - cgggatccgggtggcgggttcaggcgggtggctctgggtggcgggtacgctg-acgggtacaggccag - 3' (配列番号5)

30

5' - ccgctcgaggtaccacagccaatttggttat - 3' (配列番号6)

【0190】

この断片を、BamHIおよびXhoI制限部位を用いて、EcFkpA (DbamHI) [GGGS]₃中に挿入した。

【0191】

FkpAと、e-gp41との間にグリシン - セリンリンカーのコドン、FkpAのクローニングのためのリバースプライマーとともに、およびe-gp41のクローニングのためのフォワードプライマーとともに挿入した。

【0192】

得られた構築物を配列決定して、所望のタンパク質をコードすることを見出した。

40

【0193】

2.2 融合タンパク質の精製

発現プラスミドを保有するE. coli BL21細胞を、0.7のOD₆₀₀まで増殖させて、37℃の増殖温度で1mMのIPTGを添加することによって、細胞質過剰発現を誘導した。誘導の4時間後、遠心分離によって細胞を収集した（5000gで20分）。50mMリン酸ナトリウムpH7.8、6.0M Gu HCl（塩化グアニジウム）、5mMイミダゾール中に、細菌ペレットを再懸濁して、完全に溶かすために室温で（10分）撹拌した。繰り返し遠心分離（Sorvall SS34, 20000rpm, 4分）後、上清を濾過（0.8 / 0.2μm）して、Ni - NTA - カラム（NTA: ニトリロ三酢酸；Qiagen; Germantown, MD）（溶解バッファー中で事前に平衡化した）にかけた。10カラム容積の溶解バッファーを与えることによって、洗浄工程で、非特異的に結合したタンパク質を取り

50

除いた。最終的に、結合した標的タンパク質を、50mMのリン酸ナトリウム、pH2.5、6.0MG uHClを用いて溶出させて、4ml画分中に収集した。吸光度を280nmで記録した。

【0194】

得られた酸性溶液およびカオトロピック溶液は、さらなる精製工程、またはインビトロ再折り畳み実験のために4 で保存してもよい。

【0195】

この変性材料で開始して、異なる再折り畳み方法（例えば、透析、急速希釈、再生サイズ排除クロマトグラフィー、またはマトリックス補助再折り畳み）を首尾よく用いかつ実施することができ、その全てが、実質的に同じ未変性様折り畳み、および可溶性タンパク質をもたらす。

10

【0196】

2.3 透析および急速希釈による再生

上記のように可溶化された材料を、透析によって生理的緩衝条件に移行する。透析チューブの選択された排除値は、4000-6000ダルトンであった。

【0197】

エクトドメイン（共有結合したgp41およびFkpAタンパク質ドメインのgp41部分）の再折り畳みを誘導するために、50mMリン酸ナトリウム、pH2.5、50mM NaCl（塩化ナトリウム）に対する透析によって、溶出したタンパク質から、GuHClを除去した。単離されたエクトドメインは、全てヘリックスであって、この極端なpHで三次接触を形成することが周知である。近UVCDによって、組換え産生されたFkpAを分析する場合、FkpAは、同じ条件下では本質的に未構築であることが見出された。透析によるgp41-FkpAの再折り畳みが、共有結合したgp41およびFkpAタンパク質ドメインを含む、容易に可溶性のタンパク質複合体を生じることが驚くべきことである。UVスペクトル（図4）は、迷光、すなわち、300nmを超える明白な吸収を欠く。迷光は、凝集の指標であり、従って図4に示されるスペクトルは、この再折り畳みされた材料が、有意な量の凝集物を含まないことを意味する。

20

【0198】

円偏光二色性分光法（CD）は、タンパク質中の二次構造および三次構造の両方を評価するための選り抜きの方法である。芳香族領域における楕円率（260-320nm）は、タンパク質内の三次接触（すなわち、規則的に折り畳まれたタンパク質の球状構造）を報告するが、アミド領域における楕円率は、タンパク質骨格中の規則的な反復性エレメント（すなわち、二次構造）を反映する。

30

【0199】

図5に示される近UV CDスペクトルによって、エクトドメイン（融合タンパク質の状況において）が、pH2.5で、未変性様三次接触を提示するという、説得力のある証拠が提供される。共有結合したgp41/FkpAタンパク質ドメインのスペクトルは、同一条件下で単離されたエクトドメインのスペクトルとほとんど一致する（データ示さず）。以下の、gp41の典型的なサインが見出された：290nmでの最大楕円率、285nmでの特徴的な肩部分、および260nmでの別の最大値（光学的に活性なジスルフィド結合を反映する）。FkpAは、全ての各々の条件下で、近UVシグナルに貢献しないことに注目することが重要である。実際、pH2.5におけるFkpAの芳香族楕円率は事実上、基準値に等しい（データ示さず）。

40

【0200】

近UV領域からの結果と一致して、pH2.5の融合構築物の遠UV CDは、ほとんど構造化されたgp41分子を暗示する。220nmおよび208nmの2つの最大値は、全ヘリックス状エクトドメインの典型的サインを形成し、かつそれに相当する（図6）。FkpA-gp41融合ポリペプチドは、急速希釈によって、示された条件（50mMリン酸ナトリウム、pH2.5、50mM NaCl）から、生理的緩衝条件に容易に移行され得る。結論として、近UV CDおよび遠UV CDの両方とも、未変性様構造のgp41は、非常に都合のよい様式で（FkpAも含む融合タンパク質の状況において）利用可能であることを強調する。興味深いことに、本発明者らは、SlyD（1-165）-gp41型の未変性様融合ポリペプチドが、室温での50mMリン酸ナトリウムpH7.4、150mMNaClに対するカオトロピック材料（例えば、7.0M GuHClに溶解された）の透析によって、さら

50

に簡易に得られ得ることを見出す。完全に本発明に従って、例外的に実施された、2つのシャペロン-gp41融合構築物のヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号7および配列番号8に記される。

【0201】

2.4 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による再生

変性gp41-FkpAポリペプチド (50mMリン酸ナトリウム、pH7.8、7.0MGuHClに溶解した) を、Superdex 200ゲル濾過カラム (20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、50mM NaCl、1mM EDTAで平衡化した) にかけた。FkpA-gp41は、本質的に、3つの主な画分：高分子量の要素として、明らかなヘキサマー種として、そして明らかな三量体種として溶出する。この明白な三量体画分を濃縮して、近UVCD測定において、その三次構造について評価した (図7)。

10

【0202】

得られたグラフは、事実上、オーバーレイの (かぶさった) 曲線であるが、これには、キャリアタンパク質FkpA、および標的タンパク質gp41の両方が1:1の比で寄与する。最も幸運なことに、gp41は、中性のpHで三次構造を示し、そして共有結合したシャペロンによって明白に可溶化される。言い換えれば、シャペロンFkpAは、基質として、未変性様構造のエクトドメインgp41を受容し、そして中性の作業pHにおいてこの折り畳み困難なタンパク質を可溶化するのである。従って、診断目的のための多量の可溶性gp41抗原を生成するために重要な要件は満たされる。

【0203】

pH7.4でのFkpA-gp41の遠UV CD (図8) によって、近UV CDは、それぞれFkpAおよびgp41のシグナル寄与の加算性を示すということが確認される。期待通り、このスペクトルは、高度にヘリックス状のgp41エクトドメインによって支配される (それぞれ、220nm、および208nmで最大楕円率)。

20

【0204】

上述の条件下で、pH7.4で可溶化された、共有結合されたgp41/FkpAタンパク質ドメインを用いて得られたデータによって、FkpAおよびgp41が、このポリペプチド構築物内の独立して折り畳む単位として挙動することが示される。

【0205】

実施例3 イムノアッセイにおいて抗原として用いられる組み換えgp41、および組み換えFkpA-gp41複合体に対する、異なる界面活性剤の効果

30

3.1 競合型イムノアッセイ

COBAS CORE HIV Combi試験 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) は、組み換えgp41の免疫反応性について試験するための従来の手段を提供する。原理的に、このアッセイはまた、HIVのgp41に対する抗体を検出するための二重抗原コンセプトに従って働く。この固相抗原は、直接コーティングされる。検出抗原は、ペルオキシダーゼ標識されたgp41であって、ただし、SDS可溶化されたgp41材料を含む。

【0206】

HIVの検出のためのイムノアッセイにおいて、用いられる試薬は、かなり高濃度の界面活性剤を含むインキュベーションバッファー中で容易に溶解され、かつ安定であることが非常に所望される。このような界面活性剤 (例えば、TritonX-100 (登録商標)、またはNonident P-40 (登録商標)) は、ウイルス粒子を破壊するために0.1~0.2%の濃度で用いられる。

40

【0207】

実施例1に記載のように生成されたSDS可溶化gp41、およびFkpA-gp41の両方が、COBAS CORE HIV Combiアッセイにおいて競合抗原として試験された。それを行うために、市販のインキュベーションバッファーの代わりに、ヒト血清を含まないバッファーマトリックス中に0.1% TritonX100 (登録商標) を含むインキュベーションバッファーが用いられる。試験されるべき抗原は、gp41と反応性であることが公知のヒト血清と同時インキュベートされる。

【0208】

50

gp41 - FkpA抗原は、用量依存性の様式において、競合型アッセイ中のシグナルを強力にクエンチするが、SDS可溶化gp41は、本質的に非反応性である（図9）。50%阻害が、 $0.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ （ 2.2nM のモル濃度に相当する）のFkpA - gp41抗原濃度で達成される。

【0209】

試験中で、インタクトなウイルス膜を分解するために、界面活性剤（ヘルパー界面活性剤）として0.1%TritonX-100を含む希釈バッファを用いた事前処理後に、FkpA - gp41が、優れた免疫反応性を保持することが、際立っている。これは、gp41エクトドメイン単独（SDS中のgp41）に比べて顕著である。gp41エクトドメイン単独では、ヘルパー界面活性剤の存在下で、免疫活性をほぼ完全に失う（図9）。

【0210】

FkpAが、不十分な結合動態に起因して重要なエピトープをマスクするか、または試験に内在性の界面活性剤TritonX-100が、gp41抗原の凝集を誘導することによって試験能力を破壊することのいずれかが、共有結合されたgp41 - FkpA構築物の開発において主要な懸念であった。COBASCOREプラットフォームに対する多くの競合試験の実験結果によって、重要なgp41エピトープが、共有結合されたタンパク質ドメインの状態で、十分に接近可能であるという説得力のある証拠が得られる。さらに、分子内シャペロン-gp41複合体内のgp41の免疫反応性は、TritonX-100のようなヘルパー界面活性剤の存在下で保持される。

【0211】

3.2 電気化学発光アッセイ

二重抗原架橋形式による免疫アッセイは、感染性因子の血清学的な診断において大きな利点があるアッセイである。本発明によるFkpA-gp41は、生理的緩衝条件で可溶性であるので、検出原理として電気化学発光を使用する二重抗原架橋における使用に、この材料が適切であるか否かを検討することができる。

【0212】

ルテニウム標識に対してSDS可溶化gp41を結合させる試みは成功していない。しかし、FkpA-gp41は、生理的緩衝条件下で、容易に可溶であるので、疎水性Ru-標識に対するこの材料の結合は、直接証明された。記載された方法で改変された標的 - シャペロン複合体でさえ可溶性のままであることは注目すべきである。Elecsys（登録商標）試験システム（RocheDiagnostics GmbH, Germany）においてアッセイを実施するために、FkpA-gp41を、それぞれビオチン化し、ルテニル化し、そして二重抗原架橋アッセイにおいて、免疫反応性について試験した。

【0213】

いくつかの典型的な抗HIV血清であって、主にIgG（免疫グロブリンG）クラスの抗体を含む血清を試験したところ、共有結合したFkpA - gp41タンパク質ドメインを用いて陽性であった。バックグラウンドのシグナルは、 $500 \text{ng} / \text{ml}$ 程度の高さの抗原濃度でさえ、内在するガジェット（gadget）バックグラウンドに達することが見出されている。このシグナル対ノイズ比は優れていることがわかった。さらに、キャリアタンパク質（E.coli由来の分子、シャペロンFkpA）が、これらのヒト血清に含まれる抗体の非特異的結合を生じるという証拠はない。

【0214】

上記で考察したように、血清変換の早期検出は、HIVの確実な診断に重要である。感染の経過の間に、IgMクラスの抗体が最初に出現する。非常に早期に、HIV感染を確実に検出するためには、従って、IgMの認識および結合について高いエピトープ密度を有する抗原モジュールを設計することが必須である。実際、FkpA-gp41は、典型的な抗HIV、IgM型血清によって十分に認識される。さらにより重要であるのは、陽性を試験するのが困難であるサンプル（NABI（Miami, Florida）によって供給された9003および4009の血清変換パネル由来のB血清およびC血清など）が、本発明による融合構築物を用いて陽性と試験されたという事実である。これは主要な成果である。なぜなら、ペプチドに基づくgp41抗原は、これらのIgM血清と試験された場合、全く反応性ではないからである。

【0215】

10

20

30

40

50

実施例4 可溶性シャペロン-gp41複合体は、ウイルス侵入を阻害する

異なるgp41-シャペロン融合タンパク質を、インビトロアッセイにおいて、HIV-1-媒介膜融合を阻害する能力について評価した。要するに、CD4、CCR5、およびCXCR4を発現するMAGIP4-CCR5レポーター細胞株を、HIV-1株NL4-3を用いて感染させて、Meisterら、Virology (2001) 284 (2)、287-296に従ってTat依存性b-ガラクトシダーゼ活性について評価した。実際、本発明者らは、nM範囲の IC_{50} 値を有する感染の実質的阻害を観察する。例えば、SlyD-gp41 (配列番号6を参照のこと) は、 $IC_{50} < 70$ nMでもって、ウイルス侵入を有意に阻害する。

【0216】

結論として、それぞれ、HIV-1 gp41、またはHIV-2 gp36を含む可溶性分子内複合体、およびペプチジル-プロリル-イソメラーゼシャペロンは、可溶性および高次構造の統合性 (改善された抗HIV抗体試験の設計、および他の市販の適用を可能にする) に関して、著名な特色を保有する。

【0217】

実施例5 gp36エクトドメインに対するシャペロンFkpAの融合によって、インビトロで容易に再折り畳みされ得るサイトゾルポリペプチドが生じる

gp36 (gp41のHIV-2ホモログ) を、可溶性かつ免疫学的に活性な形態で得るために、本発明者らは、FF36と名付けられた構築物をクローニングした。この融合ポリペプチドは、2つのFkpA単位、およびgp36単位 (各々、可変性のグリシンリッチストレッチによって連結される) を含む。精製を容易にするために、この融合構築物をHis₆C末端を用いてタグ化した。本質的に、前述のプロトコールに従って、このタンパク質を精製した: シャペロン溶解後、タンパク質をNi-NTA-カラムに結合させて、50mMリン酸ナトリウム、pH7.8、7.0M GuHClを用いた過剰な洗浄後、pHを下げることによって溶出させた。次いで、50mMリン酸ナトリウム、pH7.8、100mM塩化ナトリウム、1mM EDTAで平衡化したゲル濾過カラムを通過させることによって、溶出したタンパク質を、再折り畳みさせた。この「再生ゲル濾過 (renaturinggel filtration)」法から得られたネイティブなタンパク質は、満足な免疫学的かつ分光学的特性を示し (図10を参照のこと)、従って、F41、またはFF41のようなgp41対応物に相当する。本明細書に記載された、この精製、および再折り畳みのプロトコールは、gp36のN末端7残基反復領域において3つの点突然変異を保有するFF36を用いて実施した (配列については、配列番号9を参照のこと)。可溶性タンパク質のより低い収率にもかかわらず、同じプロトコールがまた、wtgp36エクトドメインを含む融合構築物に首尾よく適用された。

【0218】

実施例6 可溶性の免疫反応性FkpA-gp21は、好都合でかつ再現可能な様式で獲得できるFkpA-gp21-過剰産生E. coli細胞 (配列番号10を含む) を、前記のとおり、増殖させ、誘導して、回収した。完全に溶解するために、細胞ペレットを50mMリン酸ナトリウム、pH7.8、7.0MGuHCl中で、室温で1時間攪拌させた。カオトロピック細胞溶解物を、溶解バッファ中で事前に平衡化したNi-NTA-カラム上に付与した。洗浄工程後、pHを低下させることによって、標的タンパク質 (C末端Hexa-His-Tagを保有する) を溶出させた。再折り畳みのために、50mMリン酸ナトリウム、pH7.8、7.0M100mM塩化ナトリウム中で事前に平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラムに、GuHCl中FkpA-gp21 (50mM、リン酸ナトリウム、pH6.0、7.0MGuHCl 4) を通過させた。UVスペクトルによって、FkpA-gp21が、可溶性タンパク質 (これは、非シャペロンのgp21とは対照的に、それ以上凝集する傾向がない) として溶出することが実証された (図11/1)。さらに、得られたFkpA-gp21は、競合型COBASCO RE実験において評価された場合、優れた免疫学的活性を示す (図11/2)。

【0219】

実施例7: FkpA-gp41に対するさらなるFkpAサブユニットの融合は、gp41エクトドメインの免疫学的特性を改善する

本発明者らは、融合ポリペプチド状況におけるさらなるPPIaseサブユニットが、gp41エクトドメイン-シャペロン複合体の全体的特性を改善し得るか否かという疑問に取り組んだ

。このために、本発明者らは、記載されたプロトコールによって、F41 (gp41改変体の上流に位置するFkpAドメインの1つ)、およびFF41 (gp41改変体の上流に位置する2つのFkpAドメイン) の両方を調製した。次いで、ビオチン化し、かつルテニル化した融合タンパク質をElecsys (登録商標) E2010システムにおいて評価した。この結果は、さらなるシャペロンドメインを含む、FF41構築物の改善された特性を強力に示す。

【 0 2 2 0 】

陰性の血清によるバックグラウンドシグナルであって、シグナル対ノイズ比、および力価の低い血清の確実な測定に決定的なバックグラウンドシグナルは、FF41 (約1600カウント) を、F41 (約3800カウント) と比較した場合、50パーセントよりも低下されることが見出された。

10

【 0 2 2 1 】

【 表 1 】

Table 1: F41およびFF41の比較

	F41	FF41
R1:	EMHR220	EMHR221
ESS、R1	F-41-Bi(UE)25	FF-41-Bi-UEEK
β (AL)	500ng/ml	750ng/ml
R2	EMHR221	EMHR222
ESS、R2	F-41-Ru(UE)25	FF41-2Ru-SK(4)
β (AL)	500ng/ml	750ng/ml
7つの陰性血清での平均計数	3,768	1,589

20

【 0 2 2 2 】

SS41融合タンパク質、すなわち、2つのSlyDドメイン、および1つのgp41ドメイン (シャペロンドメインに対してC末端) を含む融合タンパク質を用いて、同様の陽性の結果が得られている。

【 0 2 2 3 】

参考文献のリスト

- Aslam, M. and Dent, A., The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation"
(1998) 216-363, Eds. M. Aslam and A. Dent, McMillan Reference, London
- Bardwell, J. C., Mol Microbiol 14 (1994) 199-205
- Beissinger, M. and Buchner, J., Biol. Chem. 379 (1998) 245-59
- Bothmann, H. and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17100-5
- Braden, B. C. and Poljak, R. J., Faseb J 9 (1995) 9-16
- Buchner, J., Faseb J 10 (1996) 10-19
- Butler, J. E., et al., J. Immunol. Methods 150 (1992) 77-90 10
- Caffrey, M., et al., J Biol Chem 275 (2000) 19877-82
- Chan, D. C., et al., Cell 89 (1997) 263-73
- Crooke, E. and Wickner, W., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987) 5216-20
- Danese, P. N., et al., Genes Dev 9 (1995) 387-98
- Dartigalongue, C. and Raina, S., Embo J 17 (1998) 3968-80
- Doms, R. W. and Moore, J. P., J Cell Biol 151 (2000) F9-14
- Egan, D. A., et al., Biochemistry 32 (1993) 1920-7
- Fischer, G., et al., Nature 337 (1989) 476-8
- Frech, C., et al., Embo J 15 (1996) 392-98
- Gething, M. J. and Sambrook, J., Nature 355 (1992) 33-45 20
- Guyader, M., et al., Nature 326 (1987) 662-9
- Hottenrott, S., et al., J Biol Chem 272 (1997) 15697-701
- Kay, J. E., Biochem J 314 (1996) 361-85
- Lane, W. S., et al., J Protein Chem 10 (1991) 151-60
- Lu, M., et al., Nat. Struct. Biol. 2 (1995) 1075-82
- Meister, S., et al., Virology 284 (2001) 287-96
- Missiakas, D., et al., Embo J 14 (1995) 3415-24
- Missiakas, D., et al., Mol Microbiol 21 (1996) 871-84
- Prusiner, S. B., Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 13363-83 30
- Rahfeld, J. U., et al., FEBS Lett 352 (1994) 180-4
- Ramm, K. and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106-13
- Ratner, L., et al., Nature 313 (1985) 277-84
- Root, M. J., et al., Science 291 (2001) 884-8
- Schmid, F. X., Molecular chaperones in the life cycle of proteins in "-" (1998) 361-389, Eds.
A. L. Fink and Y. Goto, Marcel Decker In., New York
- Scholz, C., et al., Embo J 16 (1997) 54-8
- Scholz, C., et al., J Biol Chem 271 (1996) 12703-7
- Stoller, G., et al., Embo J 14 (1995) 4939-48

Tijssen, in "Methods in Enzymology" (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., Academic Press

Tijssen, P., Preparation of enzym-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam

Wang, C. C. and Tsou, C. L., Faseb J 7 (1993) 1515-7

Wild, C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 10537-41

Wingfield, P. T., et al., Protein Sci 6 (1997) 1653-60

Winter, J., et al., Journal of Biotechnology 84 (2000) 175-185

Zarnt, T., et al., J Mol Biol 271 (1997) 827-37

10

AU 597884

EP 0280211

EP 396 559

US 4,735,896

US 4,879,212

WO 92/22573

WO 93/21346

WO 94/08012

20

【図面の簡単な説明】

【0224】

【図1】図1Aおよび1Bは、HIV-1エクトドメインgp41(535-681)-His₆の遠UVCD(1A)、および近UV CD(1B)を示す。折り畳まれたgp41(太線)：緩衝条件(30mM ギ酸ナトリウム, pH3.0)を設定して、gp41の未変性様の全ヘリックス状高次構造(コンフォメーション)を誘導した；変性されたgp41(細線)：緩衝条件(50mMリン酸ナトリウムpH3.0, 7.0MGuHCl)を設定して、gp41(変性)を完全に変性する。カオトロピック塩の高いモル濃度に起因して、図1A中の参照二色性シグナル(細線)は、215nm未満の波長領域で確実にモニターすることはできない。このスペクトルは、Jasco-720分光偏光計で記録され、ノイズを低下させるために9回平均された。パスレングスは、遠UVCDについては0.2cm(図1A)、そして近UV CDについては0.5cm(図1B)であった。それぞれのタンパク質濃度は、1.5μM、および29μMであった。縦軸の単位は、平均残余楕円率(meanresidue ellipticity)であり、そしてdeg×cm²×dmol⁻¹の次元を有する。

30

【図2】図2は、生理的バッファー中における「非シャペロン(unchaperoned)」gp41の凝集を示す。3.0から7.5へのpHジャンプ後、1分(下の線)、および10分(上の線)のgp41エクトドメインのUVスペクトルを示す。凝集する分子は、迷光効果をもたらし、そして310nmを超えて明白な吸収を生じる。この図は、gp41の甚大な凝集傾向をまさに実証することを意味する；凝集過程が、上の線によって示された段階で停止しないことは注目に値する。

40

【図3】図3Aおよび3Bは、FkpAが中性のpHでgp41エクトドメインを可溶化することを示す。gp41、および成熟FkpAを、低いpHで同時インキュベートして、その後20mMリン酸ナトリウム、pH7.4；50mMNaCl, 1mM EDTAの最終バッファーにシフトした；1分後、および10分後(それぞれ、下の線、および上の線)、UVスペクトルを記録して、サンプル中の凝集の程度を評価した。図3Aは、2倍モル過剰のシャペロンによる凝集の抑制を示し、図3Bは、4倍過剰の効果を示す。gp41の最終濃度は、約1μMであった。迷光(300nmを超えて明白な吸収をもたらす)は、最小まで低下したので、FkpAは、gp41エクトドメインを用量依存性の様式で効率的に可溶化するという、説得力のある分光光度的な証拠がある。

【図4】図4は、pH2.5でのFkpA-gp41のUVスペクトルを示す。50mMリン酸ナトリウム、pH

50

2.5;50mMNaClに対する透析後の融合ポリペプチドFkpA-gp41のUVスペクトル。驚くべきことに、2つのドメイン構築物は、可溶化カオトロピック剤CuHClの除去後、完全に可溶性のままである。300nmを超える波長で基線ドリフト (baselinedrift) および有意な明白な吸収を生じることが期待される、迷光する凝集物が存在するという証拠はない。

【図5】図5は、pH2.5でのFkpA-gp41の近UV CDスペクトルを示す。20mMリン酸ナトリウム、pH2.5;50mMNaCl (20) 中で、Jasco 720分光偏光計においてスペクトルを記録して、ノイズを低下させるために9回蓄積した。タンパク質濃度は、0.5cmのパスレングスで22.5μMであった。芳香族の楕円率は、gp41の典型的な特徴を示す (基準については、図1Bを参照のこと)。pH2.5では、FkpAは、大部分が構造化されておらず、近UV-CDにおけるシグナルに対して全く寄与しない。

10

【図6】図6は、pH2.5でのFkpA-gp41の遠UV CDスペクトルを示す。20mMリン酸ナトリウム、pH2.5;50mMNaCl (20) 中で、Jasco 720分光偏光計においてスペクトルを記録して、シグナル対ノイズ比を改善するために9回蓄積した。タンパク質濃度は、0.2cmのパスレングスで2.25μMであった。220および208nmでの最小値は、融合タンパク質の状況では、gp41の大部分のヘリックス構造を暗示する。197nm未満のスペクトルノイズは、高いアミド吸収に起因しており、そして融合タンパク質のいずれの構造的特徴についても報告しない。それにもかかわらず、193nmで典型的なヘリックス最大値が推測され得る。

【図7】図7は、生理的な緩衝条件下でのFkpA-gp41の近UV CDである。20mMリン酸ナトリウム、pH7.4;50mMNaCl (20) 中で、Jasco 720分光偏光計においてスペクトルを記録して、ノイズを低下させるために9回蓄積した。タンパク質濃度は、0.5cmのパスレングスで15.5μMであった。著しいことに、gp41およびFkpAの共有結合したタンパク質ドメインの芳香族楕円率 (実線) は、pH3.0での未変性様の全ヘリックス状gp41の寄与 (下の破線) 、およびpH7.4のFkpAの寄与 (上の破線) から相加的に作成される。これによって、キャリアFkpA、および標的gp41 (すなわち、2つの別個の機能的な折り畳み単位) が、ポリペプチド融合タンパク質において連結される場合、可逆的かつ半独立的に再折り畳みすることが示される。

20

【図8】図8は、生理的な緩衝条件下でのFkpA-gp41の遠UV CDを示す。20mMリン酸ナトリウム、pH7.4;50mMNaCl (20) 中で、Jasco 720分光偏光計においてスペクトルを記録して、シグナル対ノイズ比を改善するために9回蓄積した。タンパク質濃度は、0.2cmのパスレングスで1.55μMであった。220および208nmでの強力なシグナルは、それぞれ、融合タンパク質の状況では、gp41の大部分のヘリックス状構造を暗示する。198nm未満のノイズは、高いタンパク質吸収に起因しており、そしてFkpA-gp41のいずれの二次構造的な特性も反映しない。

30

【図9】図9は、FkpA連結したgp41がHIVアッセイにおいて可溶性であり、かつ高度に免疫反応性であることを示す。FkpA-gp41は、COBASCORE HIV Combiアッセイにおける強力な競合因子である。gp41エクトドメイン単独 (白丸) と比較した、希釈バッファ (ヘルパー界面活性剤としてTritonX-100を含有する) を用いた前処理後の可溶性FkpA-gp41ポリペプチド (黒丸) の阻害能力を示す。gp41エクトドメイン (融合タンパク質の分子内複合体) は、界面活性剤の存在下でさえ高い免疫反応性を保持しているが、一方で裸のエクトドメインは、ほとんど完全に免疫反応性を失っているということが明白である。試験したHIV陽性血清は、1:3000希釈で、内部血清数21284であった。

40

【図10】図10は、再生ゲル濾過後のFF36のUVスペクトルである。このスペクトルは、gp36融合ペプチドが、実施例の節に記載のとおり再生ゲル濾過法に従ってSux200カラム上で再折り畳みされた場合に、可溶性であり、かつ凝集しないという有力な証拠を提供する。

【図11】図11 (1+2) は、FkpA-gp21が可溶性であり、かつ免疫学的に反応性の融合ポリペプチドであることを示す。再生ゲル濾過後、再折り畳みされたFkpA-gp21融合タンパク質は、高度に可溶性に溶出して、UVスペクトルにおいては凝集傾向を示さない (11/1)。HTLV陽性血清858893-00 (1:10希釈) を用いたCOBASCOREにおける競合型の免疫アッセイ実験において評価した場合、FkpA-gp21は、結局、優れた免疫学的特性を保有するよ

50

うになる (11 / 2) 。

【 図 1 】

Figure 1A:

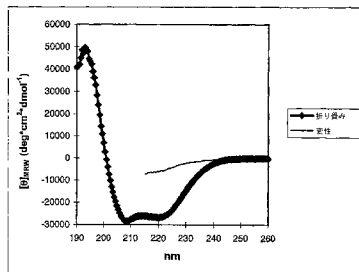
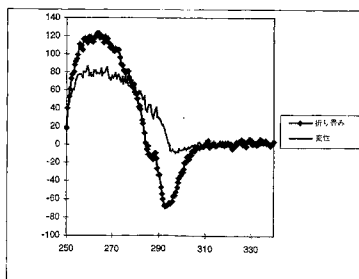
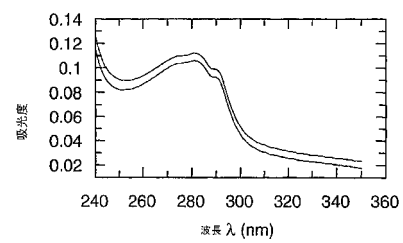


Figure 1B:



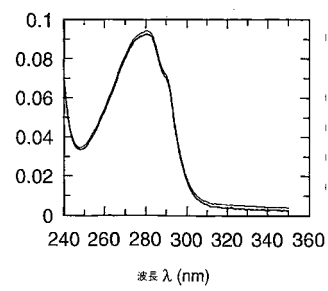
【 図 2 】

Figure 2:



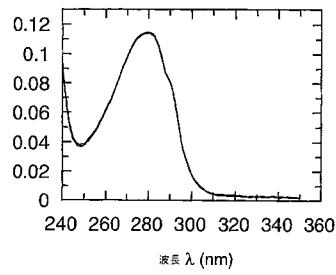
【 図 3 (a) 】

Figure 3A:



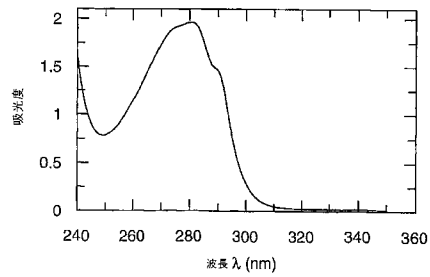
【図 3 (b)】

Figure 3B:



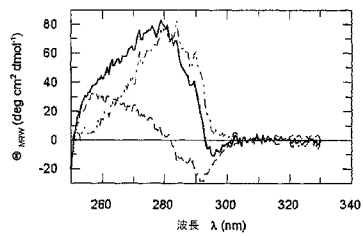
【図 4】

Figure 4:



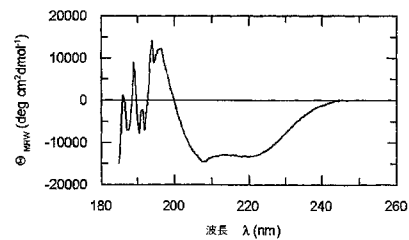
【図 7】

Figure 7:



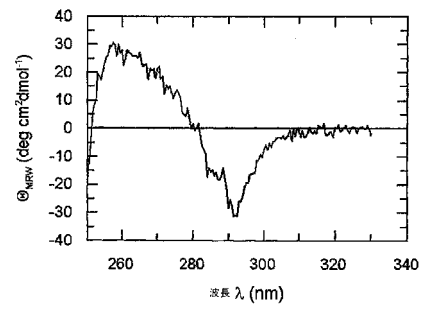
【図 8】

Figure 8:



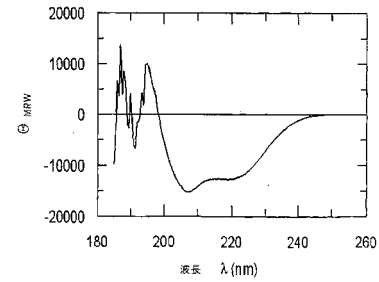
【図 5】

Figure 5:



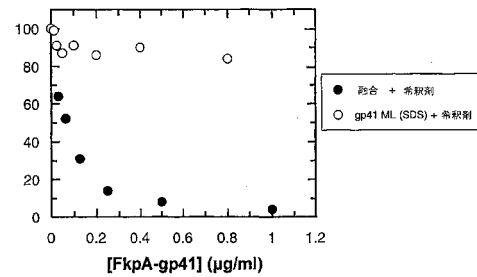
【図 6】

Figure 6:



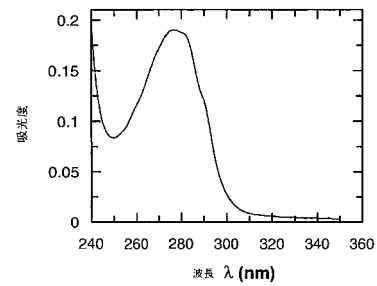
【図 9】

Figure 9:



【図 10】

Figure 10:



【 図 1 1 】

Figure 11/1

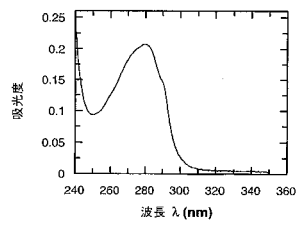
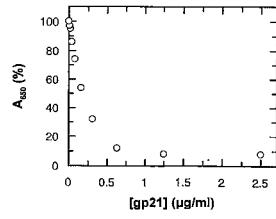


Figure 11/2



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

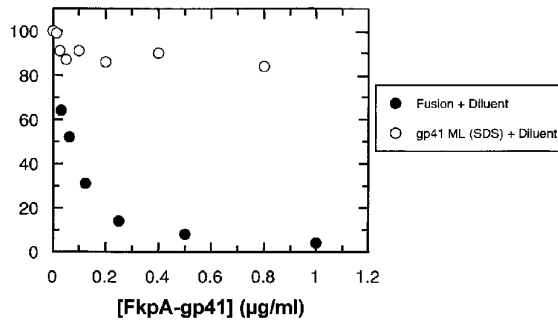
PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000877 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 9/90 (72) Inventors: SCHOLZ, Christian; Sindelsdorfer Strasse 35a, 82377 Penzberg (DE); ANDRES, Herbert; Kapellenwiese 39, 82377 Penzberg (DE); FAATZ, Elke; Steinkreuz 1, 82386 Huglfing (DE); ENGEL, Alfred; Kustermannstrasse 3a, 82327 Tutzing (DE); SIZMANN, Dorothea; Sindelsdorfer Str. 8a, 82377 Penzberg (DE).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/06956
- (22) International Filing Date: 24 June 2002 (24.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01115225.3 22 June 2001 (22.06.2001) EP
01120939.2 31 August 2001 (31.08.2001) EP
- (71) Applicant (for DE only): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE).
- (71) Applicant (for all designated States except DE): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzachstr. 124, CH-4070 Basel (CH).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BJ, BF, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: A SOLUBLE COMPLEX COMPRISING A RETROVIRAL SURFACIAL GLYCOPROTEIN



(57) Abstract: The present invention relates to the diagnosis of HIV infections. It especially teaches the production of a soluble retroviral surface glycoprotein- (or transmembrane glycoprotein)- chaperone complex and the advantageous use of a chaperone-antigen complex especially in the detection of antibodies to HIV in immunoassays, preferably according to the double antigen bridge concept, or as an immunogen. The invention also discloses soluble complexes comprising a variant of HIV-1 gp41 or a variant of HIV-2 gp36, respectively, and a chaperone selected from the peptidyl-prolyl-isomerase class of chaperones. Variants comprising specific amino-acid substitutions in the N-helical domain of HIV-1 gp41 or of HIV-2 gp36, respectively are also described.

WO 03/000877 A2

WO 03/000877 A2**Published:**

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

A soluble complex comprising a retroviral surface glycoprotein

The present invention relates to the diagnosis of HIV infections. It especially teaches the production of a soluble retroviral surface glycoprotein- (or transmembrane glycoprotein)-chaperone complex and the advantageous use of a chaperone-antigen complex, especially in the detection of antibodies to HIV in immunoassays, preferably according to the double
5 antigen bridge concept, or as an immunogen. The invention also discloses soluble complexes comprising a variant of HIV-1 gp41 or a variant of HIV-2 gp36, respectively, and a chaperone selected from the peptidyl-prolyl-isomerase class of chaperones. Variants comprising specific amino-acid substitutions in the N-helical domain of HIV-1 gp41 or of HIV-2 gp36, respectively, are also described.

10 Background

Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the agent of Acquired Immunodeficiency Syndrome, which is commonly referred to by its acronym AIDS. There are two major strains of this virus, designated HIV-1 and HIV-2. The HI-virus is nowadays widely disseminated and constitutes a serious threat to health and wealth worldwide, forcing
15 public health care systems to spend tremendous amounts of money for the diagnosis of HIV and treatment of AIDS.

One of the routes for viral spread is the transfusion of infected blood or blood products. Virtually all industrialized countries, as well as many developing countries, to date require on a mandatory basis testing of all blood donations to prevent the further spread of this
20 virus. It is the task of all diagnostic methods in the field to diagnose the infection with HIV from blood as reliably and as soon after infection as possible.

Basically, three different modes of diagnosis are available:

- (1) diagnosis of viral genomic material from blood by sensitive nucleic acid diagnostic procedures like polymerase chain reaction (PCR),
- 25 (2) the detection of viral antigens from blood, and
- (3) the detection of antibodies against HIV from bodily fluids.

During the course of an HIV infection, several diagnostically distinct and diagnostically relevant phases are known. In an early phase of infection only proteins or peptides derived from the HI virus may be found ("viraemic phase"), whereas no anti-HIV antibodies are

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 2 -

present yet. In the subsequent phase, which is termed seroconversion, antibodies against the HIV antigens appear, while the amount of viral antigens (viral load) decreases. The majority of the antibodies formed in the early phase of the seroconversion belongs to the immunoglobulin class M (IgM). Later on the immune response against HIV switches to the
5 immunoglobulin class G (IgG), which then builds up the majority of the antibodies directed against HIV. During the further course of infection the level of anti-HIV antibodies may decrease whereas the viral load (the presence of viral particles or viral antigens) in bodily fluids may increase again. The screening for the presence of HIV infection is preferably done with serological assays detecting antibodies against HIV
10 antigens, sometimes combined with the detection of HIV antigen. Since the immune response within a patient changes during the course of infection and also varies from patient to patient, it is important to have extremely sensitive and reliable immunoassays detecting anti-HIV antibodies belonging to the subclasses IgM and IgG. Many different approaches for the detection of HIV infections have been described. Early, reliable and
15 sensitive detection of antibodies against viral proteins is crucial and of major importance.

Viral proteins, which often are termed viral antigens, may be only detectable at the onset of infection and in a very late stage of the disease. Assays for detection of viral antigens, like the assays measuring p24 (from HIV-1) or p26 (from HIV-2), both of which are viral core proteins, can therefore be used only in combination with other diagnostic means to reliably
20 detect an HIV infection.

Three groups of viral antigens are theoretically available, which may induce antibody formation in the host and thus be used as antigens in diagnostic procedures. These are the envelope proteins (encoded by the *env* gene region), viral enzymes or regulatory proteins such as the reverse transcriptase or integrase (encoded by the *pol* gene region) and
25 structural core proteins (encoded by the *gag* gene region). The viral envelope proteins both in HIV-1 and HIV-2 are glycoproteins that are synthesized as polypeptide precursor proteins (gp160 for HIV and gp140 for HIV-2). These high molecular weight precursors, after synthesis, are cleaved to result in gp120 and gp41 (HIV-1) or gp110 and gp36 (HIV-2), respectively. The larger polypeptides (gp120 or gp110, respectively) form a surface
30 subunit that is associated to the membrane spanning smaller polypeptides (gp41 and gp36, respectively) via loose contacts. In many hosts (patients), envelope glycoproteins are preferred targets of the anti-viral immune response. Ratner, L., et al., Nature 313 (1985) 277-84 have demonstrated that especially the membrane spanning of these envelope proteins, i.e., gp41 or gp36, respectively, bear the most immunogenic potential among
35 these viral proteins.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 3 -

Immunoassay methods, such as, e.g., ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), employing polypeptides encoded by the HI virus, have been extensively used in diagnosis and screening. The viral polypeptides are either directly prepared from viral material, or are derived from *in vitro* or *in vivo* expression systems using recombinant DNA technology.

5 Both ways of antigen production suffer from severe limitations. Polypeptides derived from viral preparations may be contaminated by viable virus or infectious genetic material, thus posing a hazard to personnel using the material. Recombinant-derived material may be contaminated by non-HIV host proteins, which may result in reduced specificity or reduced sensitivity of such assays.

10 In the detection of antibodies against pathogenic agents, such as viral pathogens, very frequently and to great advantage antibody detection systems according to the double antigen bridge format, e.g., described in US 4,945,042, are used. The immunoassays according to this bridge concept require the use of an antigen directly or indirectly bound to a solid phase and of the same or a cross-reactive readily soluble antigen that is directly or
15 indirectly detectable. The antibodies under investigation, if present, form a bridge between the solid phase bound antigen and the labelled detection antigen. Only if the two antigens are bridged by specific antibodies a positive signal is generated.

Several attempts to use a recombinantly produced gp41 as an antigen for the detection of anti-HIV antibodies have been described. Recombinantly produced gp41, with some
20 limitations, may be used to detect anti-HIV antibodies. Such gp41 is either used alone or in combination with other HIV antigens to measure anti-HIV antibodies. Nowadays, assays are known which independently aim at the detection of both HIV antigen and/or anti-HIV antibodies. In WO 93/21346, a "combi-test" for the simultaneous detection of gp24 antigen and antibodies to HIV-1 gp41 and HIV-2 gp36 is described. In this assay, a solid phase is
25 used to which the recombinantly produced gp41 is directly coated.

It is also well established that the use of extraordinarily high or low pH values is one way to keep gp41 (or gp36) in solution. Recombinantly produced gp41 is known to be soluble around and below pH 3.0 or around and above pH 11.0.

Unfortunately, however, both HIV-1 gp41 and HIV-2 gp36, respectively, are essentially
30 insoluble under physiological buffer conditions.

Immunoassays in general are performed at physiological pH. Due to their insolubility under physiological buffer conditions, retroviral surface glycoprotein antigens in many immunoassays are used directly coated onto a solid phase material. Direct coating of

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 4 -

antigens to solid phase materials, however, is detrimental in many cases and results in disadvantages like conformational changes, molecular unfolding, change in antigenicity, instability, and in background problems (*cf.* Butler, J. E., et al., *J. Immunol. Methods* 150 (1992) 77-90).

- 5 Although it is possible to solubilize a retroviral surface glycoprotein (rsgp) by means of strongly chaotropic reagents or appropriate detergents, the material solubilized in such a manner is of limited use as a diagnostic tool.

The insolubility of retroviral surface glycoproteins at physiological buffer conditions in addition renders these proteins a very difficult target of routine (bio-)chemical procedures.

- 10 The vast majority of "labeling chemistries", *i.e.*, the chemical procedures used for binding a label, *e.g.*, a marker group to a polypeptide, is based on nucleophilic chemistry and thus rather restricted to a pH window from about pH 6 to about pH 8 and thus only works at more or less physiological buffer conditions. These routine procedures, *e.g.*, as described in Aslam, M. and Dent, A., "The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation" (1998) 216-363, Eds. M. Aslam and A. Dent, McMillan Reference, London, either do not
- 15 work properly or are difficult to carry out at the extreme pH values (or in the presence of detergents such as SDS) required to solubilize a retroviral surface glycoprotein.

As mentioned above, immunoassays according to the bridge concept have proven advantageous in a wide variety of different assays aiming at the detection of antibodies

- 20 reactive with pathogenic organisms. However, due to its insolubility, it has, *e.g.*, not been possible to use the e-gp41 molecule (*i.e.* "ectodomain of glycoprotein 41") of HIV-1 or e-gp36, respectively, in such an assay setup.

In order to compensate for the disadvantages of direct coating, a variety of assays have been designed, which instead of using the e-gp41 antigen, make use of synthetically or

- 25 recombinantly produced partial sequences thereof, more or less spanning the immunodominant so-called loop region. Examples of such assays are given in the patent literature discussed below.

The loop region in the extracellular part of gp41 is the non-helical apical hairpin of the molecule linking the N-terminal helical domain to the likewise helical C-terminal domain.

- 30 A significant part of antisera reactive to gp41 comprises antibodies to the apical loop motif. This disulfide bridged hairpin or loop structure thus represents an immunodominant region of gp41. One bypass to overcome the problems associated with recombinantly derived gp41 therefore is the chemical production of peptides representing partial

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 5 -

sequences of gp41. It is important to note that gp41 or gp36, respectively, as referred to in the present invention is defined as the so-called ectodomain encompassing the loop-connected N- and C-helices but lacking the N-terminal fusion peptide and the C-terminal transmembrane segment.

- 5 Peptide fragments of a variety of HIV antigens are disclosed in the relevant patent literature (Australian Patent Application No. 597884 (57733/86), and in U.S. Patents No. 4735896 and No. 4879212). In particular, these three specifications disclose a conserved immunodominant region of the gp41 glycoprotein, the loop region of the major envelope protein of HIV-1. An analogous immunodominant region of the gp36 protein of HIV-2
- 10 has also been synthesized. Peptides corresponding to these loop regions, which constitute the apex of the ectodomain, enable an early diagnosis of HIV-1 and HIV-2 and provide for assays with sufficient but not optimal sensitivity and good specificity. Their limitations, however, become evident with respect to detection of IgM antibodies during the first days of seroconversion in certain patients.
- 15 WO 92/22573 discloses peptides having immunological properties in common with the backbone, i.e., with an immunodominant region of the transmembrane envelope protein (e.g., gp41 or gp36) of various mammalian immunodeficiency viruses. It further confirms that this immunodominant region comprises a disulfide loop which is highly conserved in immunodeficiency virus isolates derived from different mammalian species.
- 20 EP 396 559 relates to artificial peptides bearing an amino acid sequence that corresponds to a naturally occurring amino acid sequence of a HIV. The epitopes again are derived from sequences corresponding to the loop structure of gp41 or gp36, respectively. They further have been refined to contain a disulfide bridge formed by a chemical oxidation step between the two cysteine residues of the immunodominant loop.
- 25 A quite significant percentage of antibodies as contained in anti-HIV antisera of HIV-infected patients, however, does not react with the sequence motif or its variants derived from the immunodominant loop of gp41 or gp36. Whereas these peptide antigens can be used in combination with the advantageous bridge concept, antibodies reactive with epitopes outside the loop region of HIV gp41 are not detected. Not only is the very early
- 30 diagnosis of an HIV infection crucial, it is also extremely important that as many subtypes of HIV-1 and HIV-2 as possible be detected. The more epitopes, especially of the correctly folded conformational epitopes of a rsgp, are present, the less likely it is to miss an infected sample due to a false negative diagnosis.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 6 -

Continuous efforts have therefore been undertaken to provide larger parts of a retroviral surface glycoprotein molecule, especially of gp41 from HIV-1, in soluble form.

The biophysical as well as the biochemical properties of gp41 have been extensively studied in past years. Lu, M., et al., Nat. Struct. Biol. 2 (1995) 1075-82) have partially elucidated the
5 trimeric structure of gp41. Since gp41 under physiological conditions forms an insoluble aggregate, the investigations were confined to truncated versions of the ectodomain gp41.

It has recently been confirmed by NMR spectroscopy (Caffrey, M., et al., J Biol Chem 275 (2000) 19877-82) that the native trimer of gp41 forms a six helix bundle comprising three
10 parallel N-terminal central helices to which the C-terminal helices pack in an anti-parallel orientation.

High molecular aggregates of gp41 have also been described. Such aggregates most likely form by interaction of the so-called apical loop region of gp41.

By protein design, an inhibitor of HIV-1 entry into target cells has been developed by Root, M. J., et al., Science 291 (2001) 884-8. This inhibitor comprises three stretches derived from
15 the N-terminal helical domain from the gp41 and two stretches of the C-terminal helical domain from this molecule. However, this genetically engineered construct lacks many domains and many antigenic epitopes of the native molecule, and it especially does not contain the so-called loop motif, which is known to harbor particularly immunogenic epitopes (see above).

20 A tremendous need therefore still exists to provide as many retroviral surface glycoprotein epitopes as possible in a soluble form. Especially, there is a need for providing such soluble antigens comprising gp41 from HIV-1 or gp36 from HIV-2, respectively, for use in various therapeutic as well as diagnostic applications.

It was a task of the present invention to investigate whether it is possible to provide more
25 retroviral surface glycoprotein epitopes or even the e-gp41 molecule or the e-gp36, respectively, in soluble form.

A further task of the present invention was to investigate whether it is possible to provide
30 variants of gp41 and or gp36, respectively, which are more easy to handle and/or which, especially under buffer conditions as required for performing an immunoassay or as required for immunization, are soluble in form of a complex comprising the variant and a chaperone of the peptidyl-prolyl-isomerase class of chaperones.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 7 -

Chaperones, which are known as classical "folding helpers", are polypeptides that assist the folding and maintenance of structural integrity of other proteins. They possess the ability to promote the folding of a polypeptide both *in vivo* and *in vitro*. Generally, folding helpers are subdivided into folding catalysts and chaperones. Folding catalysts accelerate the rate
5 limiting steps in protein folding due to their catalytic function. Examples of catalysts are further described below. Chaperones are known to bind to denatured or partially denatured polypeptides and thus help to re-nature proteins. Thus, unlike folding catalysts, chaperones exert a mere binding function (Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19).

Chaperones are ubiquitous stress-induced proteins involved in protein maturation, folding,
10 translocation and degradation (Gething, M. J. and Sambrook, J., *Nature* 355 (1992) 33-45). Although also present under normal growth conditions, they are abundantly induced under stress conditions. This further supports the idea that their physiological function is to cope with stress conditions.

To date, several different families of chaperones are known. All these chaperones are
15 characterized by their ability to bind unfolded or partially unfolded proteins and have a physiological function that is linked to the correct folding of proteins or the removal of denatured or aggregated protein.

Well-characterized examples of chaperones are members of so-called heat-shock families of proteins, which are designated according to their relative molecular weight; for example,
20 hsp100, hsp90, hsp70, and hsp60, as well as the so-called shsp's (small heat-shock-proteins) as described by Buchner, J., *Faseb J* 10 (1996) 10-19 and by Beissinger, M. and Buchner, J., *Biol. Chem.* 379 (1998) 245-59.

Folding catalysts, unlike chaperones, assist folding by accelerating defined rate-limiting steps, thereby reducing the concentration of aggregation-prone folding intermediates. One
25 class of catalysts, the protein disulfide isomerases (alternatively designated as thiol-disulfide-oxido-reductases), catalyzes the formation or the rearrangement of disulfide bonds in secretory proteins. In Gram-negative bacteria, the oxidative folding of secretory proteins in the periplasm is adjusted by a cascade of protein disulfide isomerases designated DsbA, DsbB, DsbC, and DsbD (Bardwell, J. C., *Mol Microbiol* 14 (1994) 199-205 and
30 Missiakas, D., et al., *Embo J* 14 (1995) 3415-24).

Another important class of folding catalysts referred to as peptidyl prolyl cis/trans isomerases (PPIs) comprise different members such as CypA, PpiD (Dartigalongue, C. and Raina, S., *Embo J* 17 (1998) 3968-80, FkpA (Danese, P. N., et al., *Genes Dev* 9 (1995) 387-

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 8 -

98), trigger factor (Crooke, E. and Wickner, W., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987) 5216-20 and Stoller, G., et al., Embo J 14 (1995) 4939-48), and Sly D (Hottenrott, S., et al., J Biol Chem 272 (1997) 15697-701). Amongst these, FkpA, SlyD and trigger factor have been found to be related based on sequence alignments.

- 5 The peptidyl prolyl isomerase FkpA has been localized to the periplasm of Gram-negative bacteria. It has been speculated that this chaperone is important for transport and translocation of bacterial outer membrane proteins. Ramm, K. and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106-13 have shown that FkpA exhibits its beneficial effect on correct folding of proteins in two distinct ways. First, FkpA interacts with early folding
10 intermediates, thus preventing their aggregation. Secondly, it has the ability to reactivate inactive protein, possibly also by binding to partially unfolded species that may exist in equilibrium with the aggregated form.

- Some folding helpers comprise both a catalytically active domain as well as a chaperone (or polypeptide binding) domain. Representative examples are, e.g., trigger factor (Zarnt, T., et al., J Mol Biol 271 (1997) 827-37), Wang, C. C. and Tsou, C. L., Faseb J 7 (1993) 1515-7),
15 SurA (Behrens et al., EMBO J.(2001) 20(1), 285-294), and DsbA (Frech, C., et al., Embo J 15 (1996) 392-98). According to our observations, the same modular structure seems to be realized in the PPIases FkpA and SlyD, respectively.

- It has been demonstrated in different independent systems that an enhanced expression of
20 chaperones may facilitate the recombinant production of a polypeptide. An example thereto can be found in WO 94/08012.

- It is also known that an increased production of proteins can be achieved by using a gene construct comprising a polypeptide coding sequence as well as a chaperone sequence. This fusion concept, for example, has been shown to result in a significantly increased
25 production of the human pro-insulin in the periplasm of *Escherichia coli* by using a gene construct comprising the human pro-insulin gene and DsbA (Winter, J., et al., Journal of Biotechnology 84 (2000) 175-185).

- The approach to use chaperones for increased production of native-like folded polypeptides is mainly due to the binding and thus solubilizing function of chaperone
30 proteins. After recombinant production of a fusion polypeptide comprising chaperone and target protein, the chaperones are customarily cleaved off from the resulting polypeptide to yield the desired polypeptide in pure form. In contrast, the present invention is based on

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 9 -

the beneficial solubilizing effect of an appropriate chaperone while being associated with a retroviral surface glycoprotein.

To our surprise we found that folding helpers, *e.g.*, many members of the peptidyl prolyl isomerase (PPI) class, especially from the FKBP family, not only exhibit catalytic activity, but also bring about drastic beneficial effects on solubility of amyloidogenic proteins, or more generally speaking, of proteins tending to aggregation. They do so by forming soluble complexes with such proteins that are otherwise (*i.e.* in an unchaperoned, isolated form) prone to aggregation. Such proteins that are otherwise hardly soluble or insoluble under physiological conditions turn out to be soluble under mild physiological conditions (*i.e.* without need for solubilizing additives such as detergents or chaotropic agents) once they are bound in a complex with the appropriate PPI chaperone. Thus, we were able to produce, for example, soluble protein-chaperone complexes comprising, *e.g.*, the gp41 protein of HIV-1 as an aggregation prone target protein and FkpA or other FKBP's as solubility-conferring chaperones.

In addition, we have found that certain well defined variants of HIV-1 gp41 or of HIV-2 gp36, respectively, are especially suited to form a soluble complex with chaperones of the PPI-class.

The complexes of gp41 and FkpA or of gp36 and FkpA, for example, are readily soluble, *e.g.*, under physiological conditions, they can be easily labeled in convenient pH ranges, and they can be used to great advantage in the detection of antibodies against gp41 or gp36, respectively, of HIV (1 or 2, respectively) and therefore in the diagnosis of an HIV infection.

Brief description of the Figures

Figures 1A and 1B Far (1A) and near (1B) UV CD of the HIV-1 ectodomain gp41 (535-681)-His₆

Folded gp41(thick line): buffer conditions (30 mM sodium formate, pH 3.0) were set to induce a native-like all-helical conformation of gp41; Denatured gp41(thin line): buffer conditions (50 mM sodium phosphate pH 3.0, 7.0 M GuHCl) were set to completely denature (unfold) gp41. Due to the high molarity of the chaotropic salt, the reference dichroic signal in Fig 1A (thin line) cannot be reliably monitored in the wave length region below 215 nm. The spectra were recorded on a Jasco-720 spectropolarimeter and were averaged nine times to lower the noise. Path length was 0.2 cm for far UV CD (Figure

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 10 -

1A) and 0.5 cm for near UV CD (Figure 1B). The respective protein concentrations were 1.5 μM and 29 μM . Units of the ordinates are mean residue ellipticity and have the dimension $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$.

Figure 2 Aggregation of "unchaperoned" gp41 in physiological buffer.

5 Shown are UV spectra of the gp41 ectodomain one minute (lower line) and 10 minutes (upper line) after a pH jump from 3.0 to 7.5. Aggregating molecules lead to stray light effects and cause the apparent absorption beyond 310 nm. The figure is meant just to demonstrate the enormous aggregation tendency of gp41; it is noteworthy that the aggregation process does not stop at the stage indicated by the upper line.

10 Figures 3A and 3B FkpA solubilizes the gp41 ectodomain at neutral pH

gp41 and mature FkpA were co-incubated at low pH and afterwards shifted to final buffer conditions of 20 mM sodium phosphate, pH 7.4; 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. After 1 and 10 minutes (lower and upper line, respectively) UV spectra were recorded to assess the extent of aggregation in the samples. Figure 3A shows the suppression of aggregation by a
 15 two-fold molar excess of the chaperone, Figure 3B shows the effect of a four-fold excess. The final concentration of gp41 was about 1 μM . Since stray light (leading to an apparent absorption beyond 300 nm) was reduced to a minimum, there is compelling spectroscopic evidence that FkpA efficiently solubilizes the gp41 ectodomain in a dose-dependent fashion.

20 Figure 4 UV spectrum of FkpA-gp41 at pH 2.5

UV-spectrum of the fusion polypeptide FkpA-gp41 after dialysis against 50 mM sodium phosphate, pH 2.5; 50 mM NaCl. Surprisingly, the two-domain construct remains completely soluble after removal of the solubilizing chaotropic agent GuHCl. There is no evidence for the existence of light-straying aggregates that would be expected to
 25 cause a baseline drift and significant apparent absorption at wavelengths beyond 300 nm.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 11 -

Figure 5 Near UV CD spectrum of FkpA-gp41 at pH 2.5

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM sodium phosphate, pH 2.5; 50 mM NaCl at 20°C and was accumulated nine times to lower the noise. Protein concentration was 22.5 μ M at a path length of 0.5 cm. The aromatic
5 ellipticity shows the typical signature of gp41 (for reference see Fig 1B). At pH 2.5, FkpA is largely unstructured and does not contribute to the signal in the Near-UV-CD at all.

Figure 6 Far UV CD spectrum of FkpA-gp41 at pH 2.5

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM sodium phosphate pH 2.5; 50 mM NaCl at 20°C and was accumulated nine times to improve the
10 signal-to-noise ratio. Protein concentration was 2.25 μ M at a path-length of 0.2 cm. The minima at 220 and 208 nm point to a largely helical structure of gp41 in the context of the fusion protein. The spectral noise below 197 nm is due to the high amide absorption and does not report on any structural features of the fusion protein. Nevertheless, the typical helix-maximum at 193 nm can be guessed.

15 Figure 7 Near UV CD of FkpA-gp41 under physiological buffer conditions.

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM sodium phosphate, pH 7.4; 50 mM NaCl at 20°C and was accumulated nine times to lower the noise. Protein concentration was 15.5 μ M at a path-length of 0.5 cm. Strikingly, the
20 aromatic ellipticity of the covalently linked protein domains of gp41 and FkpA (continuous line) is made up additively from the contributions of native-like all-helical gp41 at pH 3.0 (lower dashed line) and the contributions of FkpA at pH 7.4 (upper dashed line). This indicates that the carrier FkpA and the target gp41 (i.e. two distinct functional folding units) refold reversibly and quasi-independently when linked in a polypeptide fusion protein.

25 Figure 8 Far UV CD of FkpA-gp41 under physiological buffer conditions.

The spectrum was recorded on a Jasco 720 spectropolarimeter in 20 mM Sodium phosphate, pH 7.4; 50 mM NaCl at 20°C and accumulated nine times to improve the signal-to-noise ratio. Protein concentration was 1.55 μ M at a path-length of 0.2 cm. The
strong signals at 222 nm and 208 nm, respectively, point to a largely helical structure of

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 12 -

gp41 in the context of the fusion construct. The noise below 198 nm is due to the high protein absorption and does not reflect any secondary structural properties of FkpA-gp41.

Figure 9 FkpA-linked gp41 is both soluble and highly immunoreactive in an HIV-assay

5 FkpA-gp41 is a strong competitor in the COBAS CORE HIV Combi assay. Shown is the inhibitory potential of the soluble FkpA-gp41 polypeptide (filled circles) after pretreatment with diluent buffer (containing Triton X-100 as a helper detergent) in comparison to the gp41 ectodomain alone (empty circles). It is evident that the gp41 ectodomain (within the intramolecular complex of the fusion protein) retains its high immunoreactivity even in the
10 presence of detergent, whereas the naked ectodomain almost completely loses immunoreactivity. The HIV-positive serum tested was internal serum number 21284 in a dilution of 1:3000.

Figure 10 UV-spectrum of FF36 after renaturing gel filtration

The spectrum provides compelling evidence that the gp36 fusion peptide is soluble and
15 does not aggregate when refolded on a Sux 200 column according to the renaturing gel filtration method as described in the Examples section.

Figure 11 (1 + 2) FkpA-gp21 is both a soluble and an immunologically reactive fusion polypeptide

After renaturing gel filtration, the refolded FkpA-gp21 fusion protein elutes highly soluble
20 and shows no aggregation tendency in the UV-spectrum (11/1). When assessed in a competitive-type immunoassay experiment in the COBAS CORE with HTLV-positive serum 858893-00 (1:10 dilution), FkpA-gp21 turns out to possess excellent immunological properties (11/2).

Detailed description

25 The present invention relates to a method of producing a soluble complex comprising a target protein which is essentially insoluble and a peptidyl-prolyl-isomerase class chaperone comprising mixing said protein and said chaperone in a buffer wherein both, the protein and the chaperone are solubilized and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the protein-chaperone complex formed is soluble.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 13 -

A "target protein" according to the present invention may be any protein which is essentially insoluble in an aqueous buffer solution with pH 7.4 consisting of 20mM sodium phosphate and 150 mM sodium chloride. Preferred target proteins for example are amyloidogenic proteins, surface glycoproteins of amyloidogenic viruses, retroviral surface glycoproteins, especially HIV-1 gp41, HIV-2 gp36 and HTLV gp21.

One important group of target polypeptides are the so-called amyloidogenic proteins or polypeptides. Such amyloidogenic proteins have been found in aggregated form in bodily fluids or compartments. Well-known examples are serum amyloid A (sAA), the so-called β -A4 or $\Lambda\beta$ (a polypeptide of 42 or 43 amino acids known to form the characteristic amyloid deposits in brains of Alzheimer's Disease), the so-called prion proteins (the PrP^{Sc} form accumulates in aggregates in BSE or Creutzfeldt-Jacob disease), and retroviral surface glycoproteins, like HIV-1 gp41, which is found in amyloid-like plaques in the brain of patients suffering from HAD (HIV associated dementia). In a preferred embodiment, a chaperone, preferably a PPI chaperone, is used to form a soluble complex comprising an amyloidogenic protein and the chaperone. To great advantage such a complex can be used in many different immunoassay procedures. Preferably such a complex is used in an immunoassay according to the double antigen bridge concept.

HIV and other enveloped viruses, such as HTLV, influenza virus and Ebola virus, all express surface glycoproteins that mediate both cell attachment and membrane fusion. To serve these functions, all these surface glycoproteins contain extremely hydrophobic segments rendering them difficult to handle *in vitro*, prone to aggregation, and making them challenging targets for *in vitro* refolding attempts. In a further preferred embodiment, the present invention relates to a soluble complex comprising a PPI chaperone and a surface glycoprotein of an enveloped virus. It especially relates to the use of a complex comprising a PPI chaperone and a surface glycoprotein of an enveloped virus in an immunoassay for the detection of antibodies to the surface glycoprotein.

HAD is a well-known complication of HIV infection. As described by Caffrey, M., *et al. supra*, with respect to histological phenomenology, HAD is very similar to the spongiform encephalopathy called Creutzfeldt-Jacob disease. The etiology of Creutzfeldt-Jacob disease is generally considered to arise from the amyloidogenic accumulation of plaques comprising a modified prion protein (Prusiner, S. B., Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 13363-83). An analogous pathogenesis for HAD involving high molecular weight aggregates of e-gp41 is very likely. It is noteworthy that the neurological lesions in HIV encephalopathy share pathological and radiological features with Binswanger's disease.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 14 -

Preferred amyloidogenic proteins according to the present invention are gp41 derived from HIV-1, gp36 derived from HIV-2, or gp21 derived from HTLV, respectively.

A protein is considered "essentially insoluble" if in a buffer consisting of 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl it is soluble in a concentration of 50 nM or less.

- 5 A complex according to the present invention comprising a PPI-chaperone and a target protein is considered "soluble" if under physiological buffer conditions, e. g. in a buffer consisting of 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl the target protein comprised in the PPI-chaperone complex is soluble in a concentration of 100 nM or more.

- 10 We developed a method comprising the steps of mixing the target protein and the chaperone in a buffer wherein both, the protein and the chaperone are solubilized and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the protein-chaperone complex formed remains soluble.

- 15 Production of the soluble chaperone-target protein complex starts from a solubilizing buffer condition, i.e. from a buffer wherein both, the target protein and the chaperone are soluble. An appropriate buffer, which may be termed "non-physiological" or "solubilizing" buffer has to meet the requirement that both the target protein and the PPI chaperone are not denatured or at least not irreversibly denatured. Starting from such buffer conditions, the chaperone binds to the target protein, and a change of the buffer conditions from non-physiological to physiological conditions is possible without precipitation of the target
20 protein.

An appropriate (non-physiological) buffer, i.e., a buffer wherein both the target protein which is essentially insoluble and the PPI-chaperone are soluble either makes use of high or low pH, or of a high chaotropic salt concentration or of a combination thereof.

- 25 In case of the production of an intermolecular complex comprising a PPI-chaperone and a target protein which is essentially insoluble the non-physiological buffer preferably is a buffer with rather a high or rather a low pH. Preferably such buffer has a pH of 9 to 12 in the high pH-range or of 2 to 4.5 in the low pH-range.

- 30 In case of the production of an intramolecular complex comprising a PPI-chaperone and a target protein which is essentially insoluble the solubilizing buffer preferably is a buffer with rather a high concentration of a chaotropic salt, e.g., 6.0 M guanidinium chloride at a

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 15 -

pH of about 6. Upon renaturation the target protein assumes its native-like structure and the intramolecular complex forms.

In the context of this invention physiological buffer conditions are defined by a pH value between 5.0 and 8.5 and a total salt concentration below 500 mM, irrespective of other
5 non-salt ingredients that optionally may be present in the buffer (e.g. sugars, alcohols, detergents) as long as such additives do not impair the solubility of the complex comprising the target protein and the chaperone.

In a further preferred embodiment the present invention relates to a method of producing a soluble retroviral surface glycoprotein-chaperone complex comprising: mixing a
10 retroviral surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase in a buffer wherein both the retroviral surface glycoprotein and the peptidyl prolyl isomerase are solubilized and form a complex, and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the complex is soluble.

The term "retroviral surface glycoprotein" or "rsgp" as used in the present invention shall
15 comprise gp41 of HIV-1 and gp36 of HIV-2, as well as corresponding envelope glycoproteins derived from other mammalian immunodeficiency viruses. Preferred retroviral surface glycoproteins are gp41 from HIV-1, gp36 from HIV-2 and gp21 of HTLV. Especially preferred rsgps are gp41 of HIV-1 and gp36 of HIV-2. The term rsgp as
20 outlined here does also comprise naturally occurring as well as synthetically engineered variants of a rsgp.

It has been found that certain well-defined substitutions of amino acids within the N-helical domain of gp41 or gp36, respectively, bring about further advantages in the overall properties of these molecules as compared to polypeptides having the wild-type sequence of gp41 or gp36, respectively. These variants represent a preferred embodiment according
25 to the present invention. Especially a variant of HIV-1 gp41 comprising at least one amino acid substitution and at most four amino acid substitutions at one or more positions selected from the group of positions Leu 555, Leu 566, Ile 573, and Ile 580, wherein these positions are the positions known from the HIV-1 gp41 wild-type sequence (SEQ ID NO: 1) or correspond to the positions known therefrom, characterized in that the substitution
30 amino acid is or, respectively and independently, are selected from the group consisting of serine, threonine, asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid, or a variant of HIV-2 gp36 comprising at least one amino acid substitution and at most three amino acid substitutions at a position selected from the group of positions Leu 554, Leu 565, and Val 579, wherein these positions are the positions known from the HIV-2 gp36 wild-type

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 16 -

sequence (SEQ ID NO: 2) or correspond to the positions known therefrom, characterized in that the substitution amino acid is or, respectively and independently, are selected from the group consisting of serine, threonine, asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid, is appropriate to at least partially solve the problems known from the art.

- 5 The novel variants of gp41 or gp36, respectively, are less prone to aggregation, better soluble and more easy to handle as compared to their corresponding polypeptides of the wild-type sequences. The improved solubility becomes especially evident once attempts are made to provide for a reagent which under physiological buffer conditions comprises gp41 or gp36 in soluble form. It has proven especially advantageous to combine the favorable
- 10 properties of the novel variants with the effects rendered by a chaperone selected from the peptidyl-prolyl-isomerase (PPI) class of chaperones. Therefore the invention further relates to the use of a variant of gp41 and/or a variant of gp36 as described in the present invention in the production of a soluble complex comprising said variant and a chaperone of the peptidyle-prolyl-isomerase class of chaperones.
- 15 A soluble complex comprising a variant HIV-glycoprotein and a PPI-class chaperone is preferably obtained from a single recombinant protein comprising both a variant HIV gp41 or HIV-2 gp36, respectively and a PPI class chaperone. Thus a preferred embodiment is a recombinant protein comprising a variant of HIV-1 gp41 or HIV-2 gp36 as described in the present invention and a chaperone selected from the peptidyle-prolyl-isomerase class of
- 20 chaperones.

- The fact that the novel variants of gp41 or gp36 are more easy to handle as the wild-type polypeptides renders them ideal for various purposes like use as an immunogen or use as an antigen. In a preferred embodiment the present invention is directed to the use of a variant of gp41 and/or of gp36 according to the present invention or of a complex
- 25 comprising a PPI chaperone and such variant, e.g., as a single recombinant protein, in an immunoassay. Most intriguingly, a fusion protein comprising both a retroviral surface glycoprotein and a PPI chaperone can be solubilized and renatured under appropriate conditions and has been found to form a soluble intramolecular rsgp-chaperone complex that enables convenient labeling and reliable detection in an HIV-immunoassay.
- 30 The soluble complex between a retroviral surface glycoprotein and a chaperone can be used to great advantage in an immunoassay for detection of antibodies according to the double antigen bridge concept.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 17 -

An rsgp-chaperone complex comprising gp41 from HIV-1 or gp36 from HIV-2 is especially advantageous in the detection of antibodies against HIV in an early phase of infection. With a soluble chaperone-gp41 complex or a soluble chaperone-gp36 complex, it is possible to perform an immunoassay, preferably according to the bridge concept, which
5 allows for sensitive and early detection of antibodies against HIV in a bodily fluid sample.

The fact that chaperones can form complexes with otherwise insoluble proteins can also be used with great advantage in order to more generally improve immunoassays, preferably immunoassays according to the bridge concept. The bridge concept allows for the use of a chaperone-antigen complex as a first antigen (mostly a so-called capturing antigen on the
10 solid phase side) and a second chaperone-antigen complex (mostly a detection antigen on the detection side). In order to minimize background reaction problems caused by binding of chaperone-reactive antibodies, such bridge assays can further be advantageously modified by making use of a first chaperone for the solid phase side and a second chaperone for the detection side derived from different species.

15 It is now possible to perform immunoassays according to the bridge concept employing a labeled chaperone-antigen complex. It is also possible to produce a chaperone-antigen complex wherein solely the chaperone is labeled, making sure that the antigen is not modified or negatively influenced (e.g. in terms of conformation) by such labeling.

The mode and strategy of chemical coupling can be selected as required. In case of polypeptides, coupling chemistries targeting -SH, -NH₂ or -COO⁻ residues as well as the -OH group of tyrosines, the imidazol group of histidines, or the heterocyclic imino groups of tryptophanes are at hand. Several appropriate coupling chemistries are known for each
20 of these functional groups (Aslam, M. and Dent, A., *supra*). Routine protein coupling chemistries require a protein to be soluble under the working buffer conditions, e.g., within a pH range of about 5 to 8.5. As, e.g., gp41 is not soluble in this pH range unless denatured, e.g., by SDS, native-like folded gp41 has hitherto not been amenable to chemical coupling. The gp41-chaperone complexes we describe here provide a convenient means to produce soluble labeled HIV-envelope proteins for immunoassays irrespective of the detection
25 format used.

30 In a preferred embodiment, the present invention relates to the process for the production of a soluble rsgp-chaperone complex comprising the steps of mixing a solubilized retroviral surface glycoprotein and a chaperone selected from the peptidyl prolyl isomerase class under non-physiological buffer conditions and thereafter adjusting the buffer to physiological conditions thus forming an intermolecular complex.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 18 -

A chaperone and a retroviral surface glycoprotein can not only be used as separate polypeptides. We surprisingly have observed that it is advantageous to link both proteins covalently. Such covalent linkage is possible by conventional chemical cross-linking procedures; preferably, however, the covalent linkage is achieved by producing a recombinant polypeptide comprising a retroviral surface glycoprotein and a chaperone.

In a further preferred embodiment, the present invention relates to a process for the production of a soluble rsgp-chaperone complex comprising the steps of solubilizing, under appropriate buffer conditions, a protein comprising a covalently linked retroviral surface glycoprotein and a chaperone protein selected from the peptidyl prolyl isomerase class and thereafter adjusting the buffer to physiological conditions. This way an intramolecular complex is obtained.

The present invention teaches the use of chaperones derived from the class of folding helpers termed peptidyl prolyl cis/trans isomerases (PPIs) (*cf.* Dartigalongue, C. and Raina, *supra*). Well-known examples of this family are members called CypA, PpiD (Dartigalongue, C. and Raina, S., *Embo J* 17 (1998) 3968-80; Schmid, F. X., *Molecular chaperones in the life cycle of proteins* (1998) 361-389, Eds. A. L. Fink and Y. Goto, Marcel Dekker Inc., New York), FkpA (Danese, P. N., et al., *Genes Dev* 9 (1995) 387-98) and trigger factor (Crooke, E. and Wickner, W., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 5216-20; Stoller, G., et al., *Embo J* 14 (1995) 4939-48).

The peptidyl prolyl isomerases are subdivided into three families, the parvulines (Schmid, F.X., *supra*, Rahfeld, J. U., et al., *FEBS Lett* 352 (1994) 180-4) the cyclophilins (Fischer, G., et al., *Nature* 337 (1989) 476-8, and the FKBP family (Lane, W. S., et al., *J Protein Chem* 10 (1991) 151-60). The FKBP family exhibits an interesting biochemical feature since its members have originally been identified by their ability to bind to macrolides, *e.g.*, FK 506 and rapamycin (Kay, J. E., *Biochem J* 314 (1996) 361-85).

Prolyl isomerases may comprise different subunits or modules of different function, *e.g.*, a module exhibiting catalytic activity and a module exhibiting the chaperone or binding activity. Such modular members of the FKBP family are FkpA (Ramm, K. and Pluckthun, A., *J Biol Chem* 275 (2000) 17106-13), SlyD (Hottenrott, S., et al., *J Biol Chem* 272 (1997) 15697-701) and trigger factor (Scholz, C., et al., *Embo J* 16 (1997) 54-8). In a preferred embodiment the invention relates to a soluble complex comprising a retroviral surface glycoprotein and a chaperone selected from the peptidyl prolyl isomerase class of folding catalysts.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 19 -

Of course, the present invention is not restricted to the use of the specifically mentioned members of the peptidyl prolyl isomerase class, but can also be performed using chaperones stemming from the same class but derived from a different species of bacteria. Preferably members of the FKBP family of the PPI class of chaperones are used.

- 5 In a further embodiment, it is preferred to use homologues derived from eucaryotic organisms, and it is very preferred to use PPIases from human origin because these PPIases should not be recognized by antibodies from human sera and thus should not interfere in serological assays (i.e. assays based on the detection of human antibodies).

- 10 It is also well known and appreciated that it is not necessary to always use the complete sequence of a molecular chaperone. Functional fragments of chaperones (so-called modules) which still possess the required abilities and functions may also be used (cf. WO 98/13496).

- 15 For instance, FkpA is a periplasmic PPI that is synthesized as an inactive precursor molecule in the bacterial cytosol and translocated across the cytoplasmic membrane. The active form of FkpA (mature FkpA or periplasmic FkpA) lacks the signal sequence (amino acids 1 to 25) and thus comprises amino acids 26 to 270 of the precursor molecule. Relevant sequence information relating to FkpA can easily be obtained from public databases, e.g., from "SWISS-PROT" under accession number P 45523.

- 20 A close relative of FkpA, namely SlyD, consists of a structured N-terminal domain responsible for catalytic and chaperone functions and of a largely unstructured C-terminus that is exceptionally rich in histidine and cysteine residues (Hottenrott, S., et al., J Biol Chem 272 (1997) 15697-701). We found that a C-terminal truncated variant of SlyD comprising amino acids 1-165 efficiently exerts its solubilizing functions on gp41 and gp36. Unlike in the wild-type SlyD, the danger of compromising disulfide shuffling is successfully
25 circumvented in the truncated SlyD-variant (1-165) used.

Variants of the above-discussed chaperones, bearing one or several amino acid substitutions or deletions, may also be used to perform a process according to the present invention.

- 30 Appropriate chaperones from alternative sources, and appropriate fragments or mutants of chaperones, can be easily selected by using the procedures as described in the Examples. They can be used either in free form or covalently linked to a retroviral surface glycoprotein in order to produce a soluble rsgp-chaperone complex. In a preferred embodiment

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 20 -

according to the present invention, a binding-competent PPIase chaperone is recombinantly linked to a retroviral surface glycoprotein to yield high expression of the gene product in the bacterial cytosol. A binding-competent PPIase as referred to in the present invention encompasses at least the functional unit that mediates binding to
5 extended polypeptide substrates (i.e. the substrate binding or chaperone motif), irrespective of its catalytic PPIase activity.

We have also observed that some chaperones not belonging to the PPI class of folding catalysts can form a soluble complex with a retroviral surface glycoprotein. A further preferred embodiment according to the present invention therefore is a soluble complex
10 between Skp (also known as OmpH; Missiakas, D., et al., Mol Microbiol 21 (1996) 871-84) and a retroviral surface glycoprotein. Yet a further preferred embodiment is a soluble complex comprising a retroviral surface glycoprotein and GroEL or parts thereof. Chaperones which are homologous to Skp may also be used.

It is known (*e.g.*, Scholz *et al.*, *supra*) that modular PPIs preferentially bind to denatured or partially denatured proteins. PPIases have now been found to have the striking property of
15 not only catalyzing the folding of proteins, but also of forming stable complexes with such proteins, thereby conferring solubility. Surprisingly the PPIases studied (such as TE, SlyD and FkpA) bind to and thus, *e.g.*, solubilize native-like folded retroviral surface glycoprotein. "Native-like" or "native-like folded" gp41, according to the present invention, is characterized both by a high helical content in secondary structure as assessed
20 by Far-UV-CD and by tertiary contacts as assessed by Near-UV-CD, which are reflected in the typical "gp41-signature" as shown in Figs 1B and 5, respectively. Furthermore, the UV-spectrum of "native-like" gp41, according to the present invention, does not show significant absorption at wavelengths higher than 320 nm (which would point to light-
25 straying particles such as aggregates).

There is a wealth of information on complex formation between model biomolecules, *e.g.*, between an antibody and an antigen (for review see Braden, B. C. and Poljak, R. J., Faseb J
9 (1995) 9-16). Usually, complex formation and dissociation occur in parallel, the complex and the binding partners coexist in free equilibrium. Likewise, the same seems true for
30 complexes between PPI chaperones and amyloidogenic proteins as described in the present invention.

The formation of a complex, as described in the present invention, is an especially important property because complexes between the PPI chaperone and a protein which is essentially insoluble, *e.g.*, under physiological buffer conditions have been found to be

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 21 -

readily soluble, e.g., under physiological buffer conditions. Antigens which are soluble under physiological conditions are of tremendous advantage in diagnostic applications. They can be directly used, e.g., as standard material. Furthermore, they can be conjugated to appropriate markers or to appropriate binding groups.

- 5 As discussed above, gp36 from HIV-2 serves similar functions (*i.e.*, membrane fusion and virus entry) and is of similar diagnostic relevance as gp41 from HIV-1. Many technical problems are discussed in this application using gp41 of HIV-1 as a prototypical example of a retroviral surface glycoprotein. Only for the sake of clarity, the discussion and description predominantly focuses on gp41 of HIV-1. However, similar considerations apply for other
- 10 retroviral surface glycoproteins, especially for gp36 from HIV-2 and for gp21 from HTLV.

It is known that naturally occurring isolates of HIV-1 or HIV-2 may comprise variants of the originally isolated and described amino acid sequences. Such naturally occurring as well as synthetically engineered variants of mammalian immunodeficiency rsgps are also within the scope of the present invention.

- 15 The present invention in a preferred embodiment relates to variants of the rsgp or transmembrane glycoprotein of the human immunodeficiency virus (HIV). Variants comprising specific amino acid substitutions in the N-helical domain of HIV-1 gp41 or of HIV-2 gp36, are disclosed.

- The amino acid positions of both the N-helical as well as the C-helical domains involved in
- 20 helix-to-helix contact are known from the literature for HIV-1 gp41 and can be extrapolated to the HIV-2 homologue gp36. It has been found that mutating these positions influences the properties of gp41 or gp36, respectively, especially in the context of a fusion protein comprising this variant and a PPI-chaperone domain.

- The "a" and "d" amino acid positions in the helical wheel projection of the gp41 leucine
- 25 zipper are preferred targets to create a variant according to the present invention. Amino acid residues in the "a" position (numbering according to Chan, D. C., et al., Cell 89 (1997) 263-73) are Q552, I559, L566, I573 and I580; the respective "d" positions are I548, L555, Q562, T569 and L576.

- In order to improve solubility without compromising the helical integrity of the zipper
- 30 motif, it is preferred that the mutation positions are separated from each other by more than one helical turn. This prerequisite is met, e.g. by substitution of the consecutive "a"-

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 22 -

residues Q552, I559, L566 and I573 as well as, e.g., by substitution of the consecutive "d"-
residues I548, L555, Q562 and T569. In other words, the mutated residues are separated
from each other by at least 6 wild-type amino acid residues, thus following exactly the
heptad motif. It is also possible to mutate both "a" and "d" residues within a variant under
5 the aforementioned condition that substitution positions are separated from each other by
more than one helical turn.

Likewise, alterations in the gp36 ectodomain of HIV-2 were surprisingly found to yield a
readily soluble recombinant protein when fused to SlyD or FkpA. Here, the "a" positions
are Q551, V558, L565, T572, V579, and the "d" positions are I547, L554, Q561, T568 and
10 L575.

Preferably, 1 to 6 amino acids selected from the group of positions comprising the
positions Q552, I559, L566, I573, I580, I548, L555, Q562, T569, and L576 of HIV-1 gp41 or
Q551, V558, L565, T572, V579, I547, L554, Q561, T568, and L575 of HIV-2 gp36,
respectively, are substituted by a smaller or more hydrophilic amino acid.

15 Preferably, the amino acid positions to be substituted are selected from the group of
positions consisting of Q552, I559, L566, I573, and I580 of HIV-1 and from the group
consisting of, L554, Q561, T568, and L575 of HIV-2, respectively.

In a preferred embodiment the present invention relates to a variant of HIV-1 gp41
comprising at least one and at most four amino acid substitution(s) at (a) position(s)
20 selected from the group of positions Leu 555, Leu 566, Ile 573, and Ile 580, wherein these
positions are the positions known from the gp41 wild-type sequence described in SEQ ID
NO: 1 or correspond to these positions known therefrom, characterized in that the
substitution amino acid is or respectively and independently are selected from the group
consisting of serine, threonine, asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid.

25 This preferred embodiment of the present invention is based on the surprising finding that
variants of wild-type gp41 can be provided, which represent significant improvements as
compared to the corresponding polypeptide of the gp41 wild-type sequence. The amino
acid substitutions leading to the variants of the present invention are described based on
the amino acid composition and numbering of the gp41 wild-type sequence as known from
30 Chan, D. C., et al., Cell 89 (1997) 263-73) and given in SEQ ID NO: 1.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 23 -

Obviously, the amino acid substitutions described in the present invention can also be used to substitute amino acids at corresponding sequence positions within gp41 of other known and yet un-identified HIV-1 isolates. The term "corresponding to a position" is used to indicate that HIV-1 isolates and variants thereof may also be found or generated
5 comprising additional amino acids or lacking amino acids, which upon sequence alignment to SEQ ID NO: 1 results in a different absolute number for the corresponding sequence position or sequence motif.

The multiple alignment and comparison of a gp41 sequence with the wild-type sequence of SEQ ID NO: 1 is performed with the PileUp program of GCG Package Version 10.2
10 (Genetics Computer Group, Inc.). PileUp creates a multiple sequence alignment using a simplification of the progressive alignment method of Feng, D. P. Doolittle, R. F., J Mol Evol 25 (1987) 351-60, and the scoring matrixes for identical, similar, or different amino acid residues are defined accordingly. This process begins with the pairwise alignment of the two most similar sequences, producing a cluster of two aligned sequences. This cluster
15 can then be aligned to the next most related sequence or cluster of aligned sequences. Two clusters of sequences can be aligned by a simple extension of the pairwise alignment of two individual sequences. The final alignment is achieved by a series of progressive, pairwise alignments that include increasingly dissimilar sequences and clusters, until all sequences have been included in the final pairwise alignment. The amino acid positions of a novel
20 HIV-1 isolate or of engineered gp41 molecules which correspond to the positions 555, 566, 573 and 580 of the wild-type sequence thus are easily located.

A preferred variant of an HIV-1 gp41 polypeptide according to the present invention is characterized in that it comprises an amino acid substitution at position 555, wherein Leu 555 is substituted by aspartic acid or by glutamic acid, the substitution by glutamic acid
25 being the most preferred substitution.

A further preferred variant of an HIV-1 gp41 polypeptide according to the present invention is characterized in that it comprises an amino acid substitution at position 566, wherein Leu 566 is substituted by aspartic acid or by glutamic acid, the substitution by glutamic acid being the most preferred substitution.

30 A further preferred variant of an HIV-1 gp41 polypeptide according to the present invention is characterized in that it comprises an amino acid substitution at position 573, wherein Ile 573 is substituted by serine or by threonine, the substitution by serine being the most preferred substitution.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 24 -

A further preferred variant of an HIV-1 gp41 polypeptide according to the present invention is characterized in that it comprises an amino acid substitution at position 580, wherein Ile 580 is substituted by aspartic acid or by glutamic acid, the substitution by glutamic acid being the most preferred substitution.

- 5 The present invention also relates to a variant of HIV-2 gp36 comprising at least one amino acid substitution and at most three amino acid substitutions at a position selected from the group of positions Leu 554, Leu 565, and Val 579, wherein these positions are the positions known from the HIV-2 gp36 wild-type sequence (SEQ ID NO: 2) or correspond to the positions known therefrom, characterized in that the substitution amino acid is or
10 respectively and independently are selected from the group consisting of serine, threonine, asparagine, glutamine, aspartic acid and glutamic acid.

The numbering follows the wild-type sequence (SEQ ID NO: 2) published by Guyader, M., et al., Nature 326 (1987) 662-9. Amino acid positions within gp36 which correspond to the positions known from this sequence are determined as described above for gp41.

- 15 A preferred variant of an HIV-2 gp36 polypeptide according to the present invention is characterized in that it comprises an amino acid substitution at position 554, wherein Leu 554 is substituted by aspartic acid or by glutamic acid, the substitution by glutamic acid being the most preferred substitution.

- A preferred variant of an HIV-2 gp36 polypeptide according to the present invention is
20 characterized in that it comprises an amino acid substitution at position 565, wherein Leu 565 is substituted by aspartic acid or by glutamic acid, the substitution by glutamic acid being the most preferred substitution.

- A preferred variant of an HIV-2 gp36 polypeptide according to the present invention is characterized in that it comprises an amino acid substitution at position 579, wherein Val
25 579 is substituted by aspartic acid or by glutamic acid, the substitution by glutamic acid being the most preferred substitution. In a preferred embodiment the variant gp41 or the variant gp36, respectively, comprises substitutions at two of the amino acid positions, as described above. Variants comprising three amino acid substitutions are also preferred. In yet a further preferred embodiment the variant gp41 comprises substitutions at the four
30 amino acid positions discussed in detail above.

In a preferred embodiment, the complete sequence of gp41 or gp 36, respectively, (i.e., the ectodomain lacking the fusion peptide and the transmembrane segment) or of a

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 25 -

corresponding mammalian immunodeficiency viral envelope protein (e.g., gp21 from HTLV), is used to form a complex with a PFI chaperone. It is also conceivable to use fragments of a retroviral surface glycoprotein such as the one for gp41 from HIV-1 described by Lu *et al.*, *supra*. Such fragments preferably comprise the C-terminal helix as well as the N-terminal helix of the extracellular part of gp41.

A diagnostically relevant gp41 comprising the amino acid positions 535 to 681 (nomenclature according to Chan, D. C., *et al.*, Cell 89 (1997) 263-73) may be produced by recombinant techniques according to standard procedures. As described in Figure 1 of Lu *et al.*, *supra*, another interesting gp41 molecule spans the amino acids 540 – 669 of the gp160 precursor molecule.

As a typical example for a retroviral surface glycoprotein, the small envelope protein of HIV is extremely difficult to handle and exhibits quite unusual properties. As already mentioned, one of the most critical features of the e-gp41 molecule is its insolubility at physiological buffer conditions. Recombinantly produced gp41 is both soluble and displays a native-like structure at pH 3.0 and low ionic strength. However, even at this pH, it remains sensitive to the salt concentration in the buffer. Dependent on the salt used, gp41 precipitates in the presence of more than 100 to 500 mM salt. As will be discussed in more detail below, it can (again) be solubilized (in denatured form) by chaotropic agents.

Physiological buffer conditions usually are understood to correspond to salt and pH-conditions found in plasma or serum of animals and are defined by a pH value of around 7.4 and a salt concentration of about 150 mM. The rsgp-chaperone complex according to the present invention is readily soluble under these buffer conditions. The rsgp present therein is immunologically active, thus pointing to a native-like structure. Whereas gp41 in the absence of, or without pre-treatment by, an appropriate detergent is essentially insoluble under physiological buffer conditions (e.g., 20 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl), the described complex according to this invention is readily soluble after refolding according to the appropriate protocol. The gp41 ectodomain, as comprised in the inventive complex, is soluble at least at a concentration of 100 nM, preferably at a concentration of 1 μ M and above, most preferred at 10 μ M or more. Thus, solubility is substantially increased from sub-nanomolar to about micromolar concentrations.

For a better understanding of the scope of the present invention, it is necessary to emphasize that the buffer conditions applied for solubilization and renaturation may be modified as required and appropriate and must not be understood as an undue restriction of the invention, which is carried out successfully over a broad range of buffer conditions.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 26 -

The overall salt concentration of the physiological buffer is not critical as long as care is taken that the chaperone-gp41 complex is not dissociated, and gp41 stays in solution. Preferably the physiological buffer comprises at least 10 mM of the buffer system and at most 200 mM. The rest of the buffer constituents, if any, may be a salt without significant
5 buffer capacity, e.g., sodium chloride. The physiological buffer preferably has a salt concentration between 20 and 500 mM, more preferred between 50 and 300 mM, and most preferred between 100 and 200 mM.

In a process according to the present invention, the physiological buffer may be varied to have a pH value in the range of 5.0 to 8.5; more preferred, the range of such buffer is
10 between pH 5.5 and pH 8.3. Even more preferred, such physiological buffer conditions are defined by the salt concentrations as given above and a pH value between 6.0 and 8.0; most preferred, the pH of such physiological buffer is between 6.5 and 7.8.

According to a process as described in the present invention, a retroviral surface glycoprotein is solubilized under non-physiological buffer conditions, the chaperone is
15 added (or already present as a covalently linked further protein domain), and the mixture comprising the solubilized retroviral surface glycoprotein and the chaperone is then adjusted to physiological buffer conditions. Whereas a retroviral surface glycoprotein alone would spontaneously precipitate when doing so, it surprisingly stays in solution in the above process. This important finding is most likely due to the formation of a complex
20 between retroviral surface glycoprotein and the chaperone.

In case of the recombinant production of gp41 in *E. coli*, the recombinantly produced gp41 is obtained in the form of inclusion bodies. This material is solubilized using a highly chaotropic reagent, e.g., 7.0 M guanidinium thiocyanate. The gp41 polypeptide is largely unstructured under these conditions. By changing the buffer in appropriate steps to 30 mM
25 formic acid at pH 3.0, the gp41 in solution assumes what is perceived as its native like all-helical structure. One easy way to monitor the status of correct or incorrect folding of a protein is to analyze the corresponding CD spectrum in the amide (185 – 250 nm) and the aromatic (260-320 nm) regions. Besides, information on light-straying particles (like aggregates) can easily be obtained from standard UV spectra.

30 What is important to emphasize here is the fact that the retroviral surface glycoprotein within the retroviral surface glycoprotein-chaperone complex, according to the present invention, does adopt what is considered to be a native-like fold. On the contrary, retroviral surface glycoprotein, which has been solubilized at neutral pH by chaotropic agents, is largely unstructured, thus losing ordered conformation epitopes. It is also

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 27 -

possible to solubilize a retroviral surface glycoprotein alternatively by using detergents. For example, sodium dodecyl sulfate (SDS) has successfully been used to solubilize gp41. However, such "SDS-solubilized material" is not the material of choice, e.g., for use in an immunoassay for detection of antibodies to gp41. Furthermore (as discussed above) such
5 immunoassays preferably also detect antibodies to conformational epitopes of gp41, and it cannot be excluded that detergents do partially abolish conformational epitopes.

Preferably, the rsgp-chaperone complex according to the present invention is characterized by the rsgp being native-like folded. The native-like folded rsgp within such a complex, e.g., exhibits the required immunological or physical features.

10 Native-like folding is preferably assessed by near UV CD spectroscopy, which reports on tertiary contacts within compact globular proteins. It is known that gp41 is readily soluble at about pH 3.0 and a salt concentration of low ionic strength. Near UV CD data demonstrate that under such buffer conditions, gp41 exhibits a characteristic ellipticity signal with the typical signature of a native-like folded globular protein. As shown in Figure
15 5, the gp41 part of a fusion peptide comprising gp41 and FkpA exhibits this typical near UV CD spectrum in acidic buffer. Under physiological buffer conditions, the near UV CD spectrum of a soluble complex according to the present invention is composed of both the spectra of the correctly folded chaperone and the native-like folded gp41. This is shown for the FkpA-gp41 fusion protein in Figure 7.

20 In a preferred embodiment according to the present invention the native-like fold of gp41 in a gp41-chaperone complex is assessed by analyzing the near UV CD. It is preferred that this near UV CD is used to demonstrate that both molecules gp41 and chaperone are native-like folded.

Production of the soluble chaperone-gp41 complex starts from non-physiological buffer
25 conditions. In the case of complex formation between free chaperone and free target protein (e.g. gp41 from HIV-1), the "non-physiological" buffer has to meet two requirements, that (a) gp41 is present in its native-like acidic structure, and (b) the PPI chaperone is at least partially functional (i.e. binding-competent). Starting from such buffer conditions, the chaperone binds to the amyloidogenic protein, and a change of the
30 buffer conditions from non-physiological to more or less physiological conditions is possible without precipitation of the amyloidogenic protein.

Whereas chaperones usually bind to denatured proteins and act upon them, thereby facilitating their correct (re-)folding, the situation on which the present invention is based

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 28 -

is strikingly different. The gp41 solubilized under appropriate non-physiological buffer conditions seems to be present in a native-like form (*cf.* Figures 1A and 1B and Figure 5). Different from the customary view of chaperone functions, in the inventive method the chaperone appears to bind to the native-like folded protein and to stabilize this protein at
5 buffer conditions under which gp41 is otherwise insoluble and precipitates.

In a preferred embodiment according to the present invention, the PPI chaperone is selected from the group comprising FkpA, SlyD and trigger factor.

It has been found that especially FkpA or SlyD improve the solubility of gp41 and form rather stable complexes therewith. A further preferred embodiment therefore is
10 characterized in that the chaperone is selected from the group comprising FkpA and SlyD. Most preferred is the chaperone FkpA.

As described further above, also fragments of chaperones may be used to bring about the desired function. In case of the modular chaperones, like the FKBP, comprising a catalytic module and a binding module, it is preferred that such fragments at least comprise the
15 binding domain, or that these fragments at least exhibit essentially a function comparable to the binding domain.

FKBP12 is a human member of the FKBP family and essentially comprises the catalytic isomerase domain of a PPIase. Since it lacks an additional polypeptide-binding domain, it displays significantly reduced binding affinity towards unfolded or partially folded protein
20 substrates as compared to other members of the FKBP family. It has been shown that unfolding and refolding of FKBP12 is a reversible process (Egan, D. A., et al., Biochemistry 32 (1993) 1920-7; Scholz, C., et al., J Biol Chem 271 (1996) 12703-7). We find that refolding and unfolding of FkpA (25-270) and SlyD (1-165) are reversible either, thus fulfilling a pivotal requisite of the process described here.

25 In a preferred embodiment, the present invention relates to a soluble complex comprising gp41 and a chaperone selected from the FKBP family.

As described above, such soluble complexes comprising gp41 from HIV-1, or a homologue derived from another mammalian immunodeficiency virus, can be easily prepared by mixing the PPI chaperone (*e.g.*, produced by recombinant techniques) and a recombinantly
30 produced gp41. The complex then is formed between two independent molecules, *i.e.*, intermolecularly.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 29 -

Complex formation is a dynamic process in which dissociation and re-association occur in parallel. This is true for both the intermolecular and the intramolecular (*e.g.*, in a fusion construct) association between, *e.g.*, FkpA and gp41. Since gp41 immediately and quantitatively precipitates from a physiological buffer solution, concentrations of both
5 partners have to be chosen which ensure that only a non-critical or non-aggregating concentration of gp41 in free form is present, and that the vast majority of gp41 is bound and stabilized in form of a gp41-chaperone complex.

Depending on the chaperone used, it has been found necessary to mix on a molar basis at least 2 times as many chaperones as compared to gp41 molecules. In a preferred
10 embodiment, the invention therefore relates to a reagent comprising a mixture of gp41 and a chaperone, preferably FkpA. Preferably such mixture contains FkpA in molar excess as compared to gp41. It is preferred that 3 to 10 times more FkpA is present. The most preferred molar ratio of FkpA to gp41 is between 4 and 6.

It has been also found that the formation of an intramolecular complex, *e.g.*, between the different domains of a protein comprising covalently linked at least one rsgp domain and at
15 least one PPI-chaperone domain, leads to additional advantageous effects, for example in terms of stability and ease of production. It has, for example, been found that a ratio of 1:1 (rsgp to chaperone) is sufficient to form the soluble complex if both domains are covalently linked.

20 A soluble complex comprising a retroviral surface glycoprotein and a chaperone in a recombinantly linked form represents a further preferred embodiment according to the present invention. Most preferred rsgps comprised in such a recombinant polypeptide are gp41 from HIV-1 and gp36 from HIV-2.

For a recombinant protein comprising at least one rsgp domain and at least one PPI-chaperone domain the transfer from non-physiological to physiological buffer conditions
25 can be accomplished in different ways. Soluble intramolecular complexes between gp41 and FkpA are easily obtained by adjusting the non-physiological buffer conditions to physiological buffer conditions by dialysis, rapid dilution or matrix-assisted refolding. The mixture comprising the soluble gp41-chaperone complex can be directly used for
30 modification.

A soluble complex comprising, *e.g.*, gp41 and a PPI chaperone according to the present invention, can also be produced starting from one polypeptide comprising both protein domains (gp41 and chaperone) obtained by recombinant techniques. The gp41-chaperone

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 30 -

complex therein is intramolecular in nature. Preferably the recombinant polypeptide according to the present invention comprises gp41 and a chaperone or gp36 and a chaperone. In yet a further preferred embodiment the present invention relates to a recombinant protein comprising at least one rsgp domain and at least two PPI-chaperone domains. Recombinant polypeptides comprising one rsgp domain and two PPI-chaperones are also preferred.

The recombinant polypeptide used to obtain a soluble gp41-chaperone complex according to the present invention is expressed, applying standard molecular biology techniques. Preferably the chaperone gene is placed in frame upstream the target protein gene into an expression vector comprising both the genetic information for gp41 and the chaperone and optionally also the genetic information for an appropriate peptidic linker sequence. A preferred host for large-scale production of such a recombinant fusion protein is *E. coli*.

In a preferred embodiment, the present invention relates to a soluble complex comprising gp41 or gp36, respectively, and a chaperone selected from the peptidyl prolyl isomerase class of chaperones. It is yet further preferred that this soluble complex is an intramolecular complex, preferably an intramolecular complex within a recombinant polypeptide comprising gp41 or gp36 and a PPI chaperone. Most preferred, the PPI chaperone part of the recombinant polypeptide lacks any export signal peptide (of the corresponding precursor molecule) and corresponds to the mature PPI chaperone. Since in this preferred embodiment the recombinant protein lacks a functional signal sequence, the gene product accumulates in the bacterial cytosol.

A striking feature of gp41 comprised in a recombinantly produced FkpA-gp41 is its exceptional solubility as compared to the "unchaperoned" gp41 ectodomain. It is interesting that the "chaotropic material" (i.e. FkpA-gp41 in 6.0-7.0 M GuHCl) can be refolded in different ways, all resulting in a thermodynamically stable and soluble native-like form. Refolding is achieved at high yields, both by dialysis and by rapid dilution, as well as by renaturing size exclusion chromatography or matrix-assisted refolding. These findings suggest that in this covalently linked form, the gp41-FkpA fusion polypeptide is a thermodynamically stable rather than a metastable protein.

The recombinant FkpA-gp41 polypeptide comprises two protein domains having different folding requirements. Since the purification protocol includes an initial denaturation step, it is mandatory that the folding of the chaperone be reversible. Indeed, there is compelling spectroscopic evidence for the reversible and independent refolding of both FkpA and gp41

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 31 -

within the covalently linked protein complex. Refolding of a C-terminally truncated SlyD has been found to be reversible, either.

- Also preferred is a recombinant polypeptide comprising a retroviral surface glycoprotein and a chaperone that additionally comprises an appropriate peptide linker sequence
5 between these two polypeptide domains. Such a peptide linker sequence is selected to ensure optimal intramolecular association of the rsgp and the chaperone domain used. Preferably, such a linker sequence is about 20 amino acids long and comprises amino acids supporting both flexibility and solubility, such as *e.g.*, glycine and serine. Preferably the linker is 10 to 50 amino acids in length. More preferred, the length is 12 to 40 amino acids,
10 and most preferred, the linker comprises 15 to 35 amino acids. Both the rsgp and the chaperone are always in close proximity (held together, *e.g.*, by an appropriate linker). In a preferred embodiment the recombinant polypeptide comprises mature FkpA linked to its target protein via a flexible linker. This, as the data indicate, brings about an additional stabilizing effect.
- 15 It has surprisingly been found that gp41, as part of the intramolecular complex between a PPI chaperone and gp41, is both soluble and stable. The same holds true for an intramolecular complex comprising a PPI chaperone and gp36 or a PPI chaperone and gp21 from HTLV. The improved stability of gp41 in such a complex brings about additional advantages. For example, it is possible to obtain a fully re-natured recombinant
20 gp41-chaperone molecule very easily. The recombinant protein is initially solubilized by treatment with a chaotropic agent (*e.g.*, guanidinium chloride). By simply passing the solubilized material over a gel filtration column, equilibrated with the appropriate physiological buffer, a fully re-natured protein comprising the covalently linked protein domains can be obtained (*cf.* Example 2.3 and Figures 7 and 8).
- 25 The soluble intramolecular gp41-chaperone complex exhibits yet a further striking advantage: it is rather stable against the denaturing effects of detergents. This effects becomes even more pronounced, if the fusion protein contains two chaperones and one gp41 or one gp36, respectively. Most immunoassays are performed in the presence of detergents in order to reduce, and at least partially avoid, problems caused by non-specific
30 binding. In the case of HIV diagnosis, rather strong detergents are used because of the aforementioned reason, but also to disintegrate and disrupt virus particles and thus to facilitate detection of viral antigens, like gp24.

The recombinantly produced gp41 ectodomain solubilized by SDS (sodium dodecyl sulfate) is not immunoreactive in an assay buffer routinely used, *e.g.* in the detection of

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 32 -

anti-HIV-antibodies or p24 antigen. *cf.* Figure 9). Under the same buffer conditions, however, the gp41, which is part of an intramolecular complex with a PPI chaperone according to this invention, is strongly immunoreactive. As can be seen from Figure 9, under the same assay conditions and with the same patient serum, this material yields
 5 excellent competition curves, which can only be explained by the presence of a native-like soluble gp41, which in addition is stable in the presence of the detergent tested.

It is a very important feature of the complex, according to the present invention, that rsgp within the soluble rsgp-chaperone complex is native-like folded under physiological buffer conditions, *e.g.*, at pH 7.4 in 20 mM phosphate 150 mM sodium chloride buffer. This is a
 10 tremendous advantage for therapeutic as well as for diagnostic applications. In a preferred embodiment, the present invention relates to a composition of reagents that is soluble under physiological buffer conditions, comprising an intra- or an inter-molecular complex comprising a retroviral surface glycoprotein and a chaperone selected from the peptidyl prolyl isomerase class of chaperones.

15 A soluble complex comprising native-like folded gp41 from HIV-1 and a chaperone selected from the peptidyl prolyl isomerase class of chaperones therefore represents a very preferred embodiment of the present invention.

A soluble complex comprising native-like folded gp36 from HIV-2 and a chaperone selected from the peptidyl prolyl isomerase class of chaperones therefore also represents a
 20 very preferred embodiment of the present invention.

In terms of therapy, the progress made by providing a "soluble and native-like folded" gp41 or gp36, respectively, is quite obvious. For the first time, *e.g.*, gp41 is now available for injection under physiological buffer conditions.

In a preferred embodiment, the soluble complex as described is used to produce a
 25 composition of reagents for use as a medicament. The composition of reagents comprises the gp41-chaperone complex together with physiologically acceptable excipients and, where appropriate, suitable additives and/or conventional auxiliary substances.

It is known that peptides derived from the gp41 heptad repeat or from the gp41 C-terminal helix possess antiviral activity (Wild, C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 10537-
 30 41). They hinder virus entry by specifically interacting with a so-called "hairpin-intermediate" of gp41 (for review see Doms, R. W. and Moore, J. P., J Cell Biol 151 (2000) F9-14). We have found that a rsgp-chaperone complex according to the present invention

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 33 -

exhibits antiviral activity. The composition of reagents containing the gp41-chaperone complex or a gp36-chaperone complex or both in a therapeutically effective dose in a first preferred therapeutic application is used to prevent HIV entry and HIV spread within the host organism ("virus entry inhibition").

- 5 It represents a further preferred therapeutic application of a composition of reagents comprising a gp41-chaperone complex to use such a composition for eliciting an immune response in a mammal. The complex described makes available much more gp41 epitopes than any other HIV immunogen known, *cf., e.g., Root et al., supra*. The novel immunogen therefore is expected to induce a much broader immune response.
- 10 With respect to diagnostic procedures, obvious advantages of a soluble rsgp-chaperone complex according to the present invention are, *e.g.,* the increased stability of a retroviral surface glycoprotein, such as gp41 under physiological buffer conditions, and/or the increase in diagnostic sensitivity, and/or the increased numbers of conformational epitopes present, and/or the possibility to easily label a correctly folded rsgp, like gp41.
- 15 Well-known labels are marker groups or effector groups, like solid phase binding groups. A labeled soluble rsgp-chaperone complex represents a further preferred embodiment according to the present invention.

The labeling group can be selected from any known detectable marker groups, such as dyes, luminescent labeling groups such as chemiluminescent groups, *e.g.,* acridinium esters or dioxetanes, or fluorescent dyes, *e.g.,* fluorescein, coumarin, rhodamine, oxazine, resorufin, cyanine and derivatives thereof. Other examples of labeling groups are luminescent metal complexes, such as ruthenium or europium complexes, enzymes, *e.g.,* as used for ELISA or for CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay, *e.g.,* EP-A-0 061 888), and radioisotopes.

- 25 Effector groups comprise, for example, one partner of a bioaffine binding pair. While performing an assay, the effector group interacts specifically and preferably non-covalently with the other partner of the bioaffine binding pair. Examples of suitable binding pairs are hapten or antigen/antibody, biotin or biotin analogues such as aminobiotin, iminobiotin or desthiobiotin/avidin or streptavidin, sugar/lectin, nucleic acid or nucleic acid analogue/complementary nucleic acid, and receptor/ligand, *e.g.,* steroid hormone receptor/steroid hormone. Preferred binding pair members comprise hapten, antigen and hormone. Especially preferred are haptens like digoxin and biotin and analogues thereof.
- 30

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 34 -

The soluble complex comprising rsgp and a PPI chaperone is preferably used in an immunoassay for detection of antibodies to the rsgp. Preferably gp41- and/or gp36-chaperone complexes are used. In a very preferred embodiment, a labeled soluble complex comprising gp41 and a PPI chaperone is used in an immunoassay for detection of
 5 antibodies to gp41. Most preferred, the labeled complex is an intramolecular complex within a recombinant polypeptide comprising the PPI chaperone and gp41.

Immunoassays are well known to the skilled artisan. Methods for carrying out such assays as well as practical applications and procedures are summarized in related textbooks. Examples of related textbooks are Tijssen, P., Preparation of enzym-antibody or other
 10 enzyme-macromolecule conjugates in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam) and various volumes of Tijssen, in "Methods in Enzymology" (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., Academic Press), dealing with immunological detection methods, especially volumes 70, 73, 74, 84, 92 and 121.

15 The novel soluble rsgp-PPI chaperone complex can be used to improve assays for the detection of anti-HIV antibodies independently of the mode of detection (*e.g.*, radioisotope assay, enzyme immunoassay, electrochemiluminescence assay, *etc.*) or the assay principle (*e.g.*, test strip assay, sandwich assay, or homogenous assay, *etc.*).

For the reliable and sensitive early detection of an HIV infection, it is essential to measure
 20 both viral antigen as well as anti-viral antibody in bodily fluid samples. The soluble complex according to the present invention enables the detection of anti-gp41 and/or anti-gp36 antibodies, at physiological buffer conditions. The detection of anti-gp41 and/or anti-gp36 antibodies is a valuable part of such combined HIV detection systems. In a preferred embodiment, the present invention therefore relates to HIV detection systems comprising
 25 the detection of anti-gp41 and/or anti-gp36 antibodies based on the use of a gp41 and/or a gp36 chaperone complex. Most preferred, the detection of anti-gp41 and/or anti-gp36 antibodies based on such complex is carried out together with the detection of an HIV antigen, preferably the p24 antigen.

As known from the art, antibodies to infectious agents such as bacteria, fungi or viruses, are
 30 preferably detected by an assay performed according to the double antigen bridge concept (sometimes this assay concept is also termed double antigen bridge concept, because the two antigens are bridged by an antibody). In such an assay the ability of an antibody to bind at least two different molecules of a given antigen with its two (IgG, IgA, IgE) or 10 (IgM) paratopes is required and used.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 35 -

Detection of antibodies from bodily fluids according to the bridge concept may be performed in many different assay setups. A simple setup comprises the direct coating of an antigen to a solid phase and the use of the same antigen in a labeled form. Under appropriate assay conditions, an antibody in a sample forms a bridge between the solid
5 phase bound antigen and the labeled antigen. Therefore, only if the antibody under investigation is present in the sample is a bridge formed, and a signal can be detected.

The basic structures of "solid phase antigen" and the "detection antigen" preferably are the same. For example, a polypeptide comprising one or several epitopes may be used directly or indirectly coated to a solid phase, and the same synthetic polypeptide, however, bound
10 to a label or marker is used as detection antigen. It is also possible to use similar but different antigens, which are immunologically cross-reactive in a double antigen bridge assay. The essential requirement for performing such assays is that the relevant epitope or the relevant epitopes are present on both antigens. Obviously, there are many variants of the double antigen bridge assay format. Such variants comprise, for example, the indirect
15 coating of an antigen to a solid phase. Preferably, a specific binding pair, most preferably the biotin-streptavidin (or -avidin) system, is used to indirectly bind an antigen to a solid phase. On the other hand, the antigen used for detection in such a system may not directly carry a marker (e.g., a radioisotope, enzyme, fluorescent molecule, etc.), but rather may be indirectly detectable by, e.g., carrying a hapten (for example, digoxin). Such indirect
20 detection then, e.g., may be performed by a labeled anti-digoxin antibody.

In a preferred embodiment the present invention relates to an immunoassay according to the double antigen bridge concept, comprising: a first antigen comprising a first chaperone-antigen complex, and a second antigen comprising a second chaperone-antigen complex

25 In a further preferred embodiment, the present invention relates to an immunoassay according to the double antigen bridge concept characterized in that a first chaperone-antigen complex is used as capture antigen and a second chaperone-antigen complex is used as detection antigen.

30 The chaperone-antigen complexes as described in the present invention not only bring about the solubility of various polypeptides that are otherwise difficult to handle, but they also allow for a very advantageous immunoassay according to the double antigen bridge concept.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 36 -

It is an especially attractive feature of such an immunoassay according to the double antigen bridge concept, that it is now possible to use different chaperones for complex formation with the solid phase bound antigen and for complex formation with the detection antigen, respectively. Such modification of an assay further improves upon the problem of non-specific binding. Antibodies in a sample, which would be reactive to a chaperone and thus might cause a false positive signal, will not form a bridge if different chaperones are used to complex the solid phase antigen and the detection antigen, respectively. Therefore, in this mode of the invention, the likelihood of a positive signal due to non-specific binding is largely reduced. In a preferred embodiment, the present invention therefore relates to an immunoassay according to the double antigen bridge concept which is characterized in that the first chaperone and the second chaperone of a first and a second chaperone-antigen complex differ from each other.

Most of the chaperones that are best characterized have been isolated from *Escherichia coli*, which is widely used in biotechnological research. Since *Escherichia coli* is a widely distributed bacterial species, many mammals have developed antibodies against proteins derived from this bacterium. In order to reduce the likelihood of false positive reactions caused by such antibodies, it is preferred to use at least one PPI chaperone derived from a distinct bacterial species, preferably a thermophilic one. Preferably the chaperone is derived from extremophilic bacteria, especially of the group of bacteria comprising *Thermatoga maritima*, *Aquifex aeolicus* and *Thermus thermophilus*.

The use of a chaperone-antigen complex in an immunoassay in general, and preferably in an immunoassay according to the bridge concept, also provides the possibility to derivatise the chaperone of such a complex and does not require the modification of the antigen itself. It is generally accepted that the modification of a polypeptide by a second chemical moiety, for example, the coupling of a label to that molecule, includes the risk of negatively influencing the polypeptide. For example, the epitope under investigation may be compromised, or non-specific binding may be caused by such labeling. According to the present invention, it is now possible to derivatise specifically the chaperone within a chaperone-antigen complex.

In a preferred embodiment, an immunoassay according to the double antigen bridge concept is further characterized in that the first chaperone-antigen complex used as capture antigen comprises a solid phase binding group.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 37 -

In a further preferred embodiment, an immunoassay according to the bridge concept is performed, which is further characterized in that the second chaperone-antigen complex used as detection antigen comprises a marker group.

In another embodiment, a soluble complex comprising rsgp and a PPI chaperon, such as gp41- and/or gp36- chaperone complexes, may also be used to elicit an immune response in a subject, such as a human or non-human animal. The soluble complexes may be administered to a subject in compositions, such as those that may contain an excipient or carrier. Such compositions may also include an adjuvant. Examples of conventional adjuvants include, but are not limited to, Freund's incomplete, Freund's complete, Merck 65, AS-2, alum, aluminum phosphate, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. Other useful adjuvants include, but are not limited to, bacterial capsular polysaccharides, dextran, IL-12, GM-CSF, CD40 ligand, IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IL-18 or any cytokine or bacterial DNA fragment.

One dose (administration) of a soluble complex composition may be given. However, the first administration may be followed by boosting doses, such as once, twice, three times or more. The number of doses administered to a subject depends on in part by the response of a subject to a soluble complex composition. Within the scope of the present invention, a suitable number of doses includes any number required to immunize an animal to soluble complex.

A second administration (booster) of the soluble complex composition may be given between about 7 days and 1 year after the first administration. The time between the first and second administrations may be 14 days to 6 months, 21 days and 3 months, often between about 28 days and 2 months after the original administration. A third administration (second booster) may be given between about 14 days and 10 years after the first administration, e.g., between about 14 days and 3 years, often between about 21 days and 1 year, very often between about 28 days and 6 months after the first administration. Subsequent boosters may be administered at 2 week intervals, or 1 month, 3 month or 6 month to 10 year intervals.

Typically, the amount of soluble complex will be administered to a subject that is sufficient to immunize an animal against an antigen (i.e., an "immunologically effective dose" or a "therapeutically effective dose"). An amount adequate to accomplish an "immunologically

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 38 -

effective dose" will depend in part on the weight and general state of health of the subject, and the judgment of the prescribing physician or other qualified personnel.

The effective dose of the soluble complex can be formulated in animal models to achieve an induction of an immune response; such data can be used to readily optimize administration to humans based on animal data. A dose will typically be between about 1 fg and about 100 µg, often between about 1 pg and about 100 µg, more often between about 1 ng and about 50 µg, and usually between about 100 ng and about 50 µg. In some embodiments, the dose is between about 1 fg and about 100 µg per kg subject body weight, often between about 1 pg and about 100 µg, more often between about 1 ng and about 50 µg, and usually between about 100 ng and about 50 µg per kg subject body weight.

The soluble complex-containing compositions of the invention may be administered in a variety of ways and in various forms. A soluble complex composition may include carriers and excipients, such as buffers, carbohydrates, mannitol, proteins, polypeptides or amino acids such as glycine, antioxidants, bacteriostats, chelating agents, suspending agents, thickening agents and/or preservatives; water, oils, saline solutions, aqueous dextrose and glycerol solutions, other pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as buffering agents, tonicity adjusting agents, wetting agents, etc.. A conventional adjuvant may also be incorporated into the composition.

While any suitable carrier may be used to administer the compositions of the invention, the type of carrier will vary depending on the mode of administration. Compounds may also be encapsulated within liposomes. Biodegradable microspheres are convenient in some instances as carriers; for example, such as those described in (Tice et al., US Patent 5,942,252, 1999).

Sterilization of the compositions is desirable, such as that accomplished by conventional techniques, such as sterile filtering. The resulting aqueous solutions may be packaged for use as is, or lyophilized.

The soluble complex compositions of the invention may be administered in a variety of ways, including by injection (e.g., intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal etc.), by inhalation, by topical administration, by suppository, by using a transdermal patch or by mouth.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 39 -

When administration is by injection, compositions may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks solution, Ringer's solution, 20 mM phosphate 150 mM sodium chloride buffer (pH 7.4), or physiological saline buffer. The solution may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the composition may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use. Inhalation-delivered compositions may be as aerosol sprays from pressurized packs or a nebulizer with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. Capsules and cartridges of, e.g., gelatin for use in an inhaler or insufflator may be formulated containing a powder mix of the proteins and a suitable powder base such as lactose or starch. For topical administration, the compositions may be formulated as solutions, gels, ointments, creams, suspensions, and the like, as are well known in the art. In some embodiments, administration is by means of a transdermal patch. Suppository compositions may also be formulated to contain conventional suppository bases.

When administration is oral, a composition can be readily formulated by combining the composition with pharmaceutically acceptable carriers. Solid carriers include mannitol, lactose, magnesium stearate, etc.; such carriers enable the formation of tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions etc., for oral ingestion. Such formulations may be powders, capsules and tablets; suitable excipients include fillers such as sugars, cellulose preparation, granulating agents, and binding agents.

Methods of producing polyclonal and monoclonal antibodies, including binding fragments (e.g., F(ab)2) and single chain versions are well known. However, many antigens are incapable of triggering an adequate antibody response. In one embodiment, a composition comprising a soluble complex of the invention and an antigen is administered to an animal, thus eliciting an immune response in the animal. Polyclonal or monoclonal antibodies are subsequently prepared by standard techniques.

The soluble complex comprising rsgp and a PPI chaperon, such as gp41- and/or gp36-chaperone complexes, may also be used to inhibit viral entry into a cell, such as by inhibiting membrane fusion. The cell may be in vitro, in vivo, or ex vivo. The compositions and methods of administration are similar to those described for compositions and methods used to elicit an immune response. If inhibiting viral entry into a cell is accomplished using vaccination, then adjuvants may be used. For in vitro and ex vivo administrations, one of skill in the art will choose appropriate methods based partly

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 40 -

on the cell(s), culture conditions and time constraints (if any). For example, one such useful method would be to formulate liposomes that carry the soluble complexes.

The following examples, references, and figures are provided to aid the understanding of the present invention, the true scope of which is set forth in the appended claims. It is understood that modifications can be made in the procedures set forth without departing from the spirit of the invention.

EXAMPLES

Example 1 Production of a soluble intermolecular complex comprising gp41 and a PPI chaperone

1.1 Production of E.coli FkpA

FkpA was cloned, expressed and purified according to Bothmann, H. and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17100-5 with some minor modifications. For storage, the protein solution was dialyzed against 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 6.0), 100 mM NaCl and concentrated to 26 mg/ml (1 mM).

For cytosolic expression, the FkpA-coding sequence of the above expression vector was modified to lack the sequence part coding for the signal peptide and to comprise instead only the coding region of mature FkpA.

1.2 Production of gp41 (535-681)-His₆

gp41 (535-681)-His₆ was cloned and expressed in a T7 promotor-based expression system and accumulated in inclusion bodies in the host cell. The isolated inclusion bodies were dissolved in 6 M guanidinium chloride. The His-tagged protein was purified on a Ni-chelate column, followed by gel filtration in 6 M guanidinium on Sephacryl 100. The protein was refolded by rapid dilution as described by Wingfield, P. T., et al., Protein Sci 6 (1997) 1653-60. The final buffer conditions were 30 mM sodium formate, pH 3.0. Status of folding was assessed for both buffer conditions using near and far UV CD. As can be seen in Figures 1A and 1B, both Far and Near UV CD spectra suggest that gp41 adopts a native-like fold only at pH 3.0 in the absence of chaotropic agent.

1.3 pH-shift of the gp41 ectodomain (HIV) from pH 3.0 to physiological pH in the presence of E. coli FkpA

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 41 -

1.3.1 Control experiment

In a control experiment, soluble e-gp41 (in 30 mM formate, pH 3.0) was diluted 100 fold into final buffer conditions of 20 mM Sodium phosphate (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. The final protein concentration was about 1 μ M. UV spectra were recorded after 1 minute and 10 minutes. It is obvious from the UV spectra in Figure 2 that the unchaperoned ectodomain spontaneously aggregates upon pH shift to neutral. Figure 2 is meant to emphasize the exceptional aggregation tendency of gp41; the spontaneous aggregation of the molecule proceeds far beyond the stage indicated by the upper line.

1.3.2 Preincubation of gp41 with FkpA at pH 3.0 enables shift to neutral pH

To test for the solubilizing potential of the molecular chaperone FkpA, the ectodomain gp41 and FkpA were mixed in a molar ratio of 1:2 and 1:4 (in 30 mM formate at a pH of approximately 3.5) and co-incubated for 1 minute. Then, the resulting complex was shifted to neutral pH by 12-fold dilution into buffer conditions of 20 mM sodium phosphate pH (7.4), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. The final concentrations of the binding partners in the test tube were 1 μ M gp41, 2 μ M and 4 μ M FkpA, respectively. All reactions were carried out at room temperature. After 1 and 10 minutes, UV spectra were recorded to test the gp41 samples for aggregates. From Figures 3A and 3B, it is evident that FkpA substantially reduces the aggregation of gp41 in a dose-dependent fashion. Comparable data have been obtained with trigger factor from *Thermatoga maritima* and with a C-terminally truncated SlyD from *E. coli*.

Example 2 Recombinant production of a covalently linked gp41-FkpA

2.1 Construction of an expression plasmid comprising FkpA and gp41

In the first step, the restriction site *Bam*HI in the coding region of the mature *E. coli* FkpA from plasmid of Example 1.1 was deleted using the QuikChange site-directed mutagenesis kit of Stratagene (La Jolla, CA; USA) with the primers:

5'-gcgggtgtccggatccaccgaattc-3' (SEQ ID NO: 3)

5'-gaattcgggtggataccgggaacacccgc-3' (SEQ ID NO: 4)

The construct was named EcFkpA(Δ BamHI)[GGGS]₃.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 42 -

In a second step, a gene fragment encoding amino acids 535-681 from HIV-1 envelope protein was amplified by PCR from the construct of Example 1.2 using the primers:

5'-~~ggg~~atccggg~~ggg~~cggttcaggcgg~~ggg~~gactctggggcggtacgctg-acgtacaggccag-3' (SEQ ID NO: 5)

5'-cgcctcgagggtaccacagccaattgttat-3' (SEQ ID NO: 6)

- 5 The fragment was inserted into EcFkpA(Δ BamHI)[GGGS]₃ using *Bam*HI and *Xho*I restriction sites.

The codons for glycine-serine linker between FkpA and e-gp41 were inserted with reverse primer for cloning of FkpA and with forward primer for cloning of e-gp41.

The resulting construct was sequenced and found to encode the desired protein.

10 2.2 Purification of the fusion protein

- E. coli* BL21 cells harboring the expression plasmid were grown to a OD₆₀₀ of 0.7, and cytosolic overexpression was induced by adding 1 mM of IPTG at a growth temperature of 37°C. Four hours after induction, the cells were harvested by centrifugation (20 min at 5000 g). The bacterial pellet was resuspended in 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 6.0 M
- 15 GuHCl (guanidinium chloride), 5 mM imidazole and stirred at room temperature (10 min) for complete lysis. After repeated centrifugation (Sorvall SS34, 20000 rpm, 4°C), the supernatant was filtered (0.8/0.2 μ m) and applied to a Ni-NTA-column (NTA: Nitrilotriacetate; Qiagen; Germantown, MD), pre-equilibrated in lysis buffer.
- 20 Unspecifically bound proteins were removed in a washing step by applying 10 column volumes of lysis buffer. Finally, the bound target protein was eluted with 50 mM sodium phosphate, pH 2.5, 6.0 M GuHCl, and was collected in 4 ml fractions. The absorbance was recorded at 280 nm.

The resulting acidic and chaotropic solution may be stored at 4°C for further purification steps or *in vitro* refolding experiments.

- 25 Starting with this unfolded material, different refolding methods, such as dialysis, rapid dilution, renaturing size exclusion chromatography or matrix-assisted refolding can be used and carried out successfully, all of them leading to virtually the same native-like folded and soluble protein.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 43 -

2.3 Renaturation by dialysis and rapid dilution

Material, solubilized as described above, is transferred into physiological buffer conditions by dialysis. The chosen cut-off value of the dialysis tubing was 4000 – 6000 Daltons.

- To induce refolding of the ectodomain (the gp41 part of the covalently linked gp41 and FkpA protein domains), GuHCl was removed from the eluted protein by dialysis against 50 mM sodium phosphate, pH 2.5, 50 mM NaCl (sodium chloride). It is well known that the isolated ectodomain is all-helical and forms tertiary contacts at this extreme pH. When analyzing recombinantly produced FkpA by means of near UV CD, it was found that FkpA is essentially unstructured under the same conditions. It is surprising that refolding of gp41-FkpA by dialysis results in a readily soluble protein complex comprising the covalently linked gp41 and FkpA protein domains. The UV spectrum (Figure 4) lacks stray light, *i.e.*, apparent absorption beyond 300 nm. Stray light would be indicative of aggregates, thus the spectrum shown in Figure 4 implies that the re-folded material does not contain significant amounts of aggregates.
- 15 Circular dichroism spectroscopy (CD) is the method of choice to assess both secondary and tertiary structure in proteins. Ellipticity in the aromatic region (260-320 nm) reports on tertiary contacts within a protein (*i.e.*, the globular structure of a regularly folded protein), whereas ellipticity in the amide region reflects regular repetitive elements in the protein backbone, *i.e.*, secondary structure.
- 20 The near UV CD spectrum shown in Figure 5 provides compelling evidence that the ectodomain (in the context of the fusion protein) displays native-like tertiary contacts at pH 2.5. The spectrum of the covalently linked gp41/FkpA protein domains almost coincides with the spectrum of the isolated ectodomain under identical conditions (data not shown). The typical signature of gp41 was found: a maximum of ellipticity at 290 nm, a characteristic shoulder at 285 nm and another maximum at 260 nm reflecting an optically active disulfide bridge. It is important to note that FkpA does not contribute to the near UV signal at all under the respective conditions. In fact, the aromatic ellipticity of FkpA at pH 2.5 virtually equals the baseline (data not shown).
- 25 In agreement with the results from the near UV region, the far UV CD of the fusion construct at pH 2.5 points to a largely structured gp41 molecule. The two maxima at 220 nm and 208 nm make up, and correspond to, the typical signature of an all-helical ectodomain (Figure 6). From the conditions indicated (50 mM sodium phosphate, pH 2.5, 50 mM NaCl), the FkpA-gp41 fusion polypeptide can easily be transferred to physiological

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 44 -

buffer conditions by rapid dilution. In conclusion, both near and far UV CD underline that native-like structured gp41 is available (in the context of the fusion protein also containing FkpA) in a very convenient fashion. Interestingly, we find that a native-like fusion polypeptide of the SlyD(1-165)-gp41 type can be obtained even simpler by dialysis of the

5 chaotropic material (dissolved, *e.g.* in 7.0 M GuHCl) against 50 mM sodium phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl at room temperature. The nucleotide sequences of two chaperone-gp41 fusion constructs which performed exceptionally well according to the present invention are depicted in SEQ ID NO: 7 and SEQ ID NO: 8, respectively.

2.4 Renaturation by size exclusion chromatography (SEC)

10 Unfolded gp41-FkpA polypeptide (dissolved in 50 mM sodium phosphate, pH 7.8, 7.0 M GuHCl) was applied onto a Superdex 200 gel filtration column equilibrated with 20 mM sodium phosphate, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA. FkpA-gp41 elutes essentially in three main fractions: as a high molecular associate, as an apparent hexamer species and as an apparent trimer species. The apparent trimer fraction was concentrated and assessed for

15 its tertiary structure in a near UV CD measurement (Figure 7).

The resulting graph is virtually an overlay curve to which both the carrier protein FkpA and the target protein gp41 contribute in a 1:1 ratio. Most fortunately, gp41 displays tertiary structure at neutral pH and is evidently solubilized by the covalently bound chaperone. In other words, the chaperone FkpA seems to accept the native-like structured ectodomain

20 gp41 as a substrate and to solubilize this hard-to-fold protein at a neutral working pH. Thus, a crucial requirement for producing high amounts of soluble gp41 antigen for diagnostic purposes is fulfilled.

The far UV CD of FkpA-gp41 at pH 7.4 (Figure 8) confirms the near UV CD results in that it shows the additivity of the signal contributions of FkpA and gp41, respectively. As

25 expected, the spectrum is dominated by the highly helical gp41 ectodomain (maximal ellipticity at 220 nm and 208 nm, respectively).

The data obtained with the covalently linked gp41/FkpA protein domains solubilized at pH 7.4 under the conditions mentioned above indicate that FkpA and gp41 behave as independently folding units within the polypeptide construct.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 45 -

Example 3 Effect of different detergents upon recombinant gp41 and a recombinant FkpA-gp41 complex used as antigen in an immunoassay

3.1 Competitive-type immunoassay

5 The COBAS CORE HIV Combi test (Roche Diagnostics GmbH, Germany) provides a convenient means to test for the immunoreactivity of recombinant gp41. In principle, this assay also works according to the double antigen bridge concept for detecting antibodies against gp41 of HIV. The solid phase antigen is directly coated. The detection antigen is a peroxidase-labeled gp41 comprising, however, SDS-solubilized gp41 material.

10 In immunoassays for detection of HIV, it is highly desirable that the reagents used be readily soluble and stable in an incubation buffer comprising rather high concentrations of detergent. Such detergents, e.g., Triton X-100® or Nonidet P-40®, are used at a concentration of 0.1 to 0.2% for disrupting viral particles.

15 Both SDS-solubilized gp41 as well as FkpA-gp41 produced as described in Example 1, have been tested as competing antigens in the COBAS CORE HIV Combi assay. In order to do so, instead of the commercial incubation buffer, an incubation buffer comprising 0.1% Triton X 100® in a buffer matrix free of human serum is used. The antigen to be tested is co-incubated with a human serum known to be reactive with gp41.

20 The gp41-FkpA antigen, in a dose-dependent fashion, strongly quenches the signal in a competitive type assay, whereas the SDS-solubilized gp41 is essentially unreactive (Figure 9). Fifty percent inhibition is achieved at an FkpA-gp41 antigen concentration of 0.1 µg/ml, corresponding to a molar concentration of 2.2 nM.

25 It is remarkable that FkpA-gp41 retains its excellent immunoreactivity after pretreatment with diluent buffer which contains 0.1% Triton X-100 as a detergent (helper detergent) for disintegrating intact viral membranes in the test. This is in marked contrast to the gp41 ectodomain alone (gp41 in SDS), which in the presence of the helper detergent loses its immunoreactivity almost completely (Figure 9).

30 It was a major concern in the development of the covalently linked gp41-FkpA construct that either the FkpA would mask crucial epitopes due to insufficient binding dynamics or that the test-inherent detergent Triton X-100 would destroy the test performance by inducing aggregation of the gp41 antigen. The experimental results of many competition tests on the COBAS CORE platform provide compelling evidence that crucial gp41

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 46 -

epitopes are well-accessible in the context of the covalently linked protein domains. Moreover, the immunoreactivity of gp41 within the intramolecular chaperone-gp41 complex is retained in the presence of helper detergents like Triton X-100.

3.2 Electrochemiluminescence assay

5 Immunoassays according to the double antigen bridge format are of great advantage in the serological diagnosis of infectious agents. Since FkpA-gp41, according to the present invention is soluble at physiological buffer conditions, it has been possible to investigate whether this material is suitable for use in a double antigen bridge assay employing electrochemiluminescence as a detection principle.

10 Attempts to couple SDS-solubilized gp41 to Ruthenium-labels have not been successful. Since, however, FkpA-gp41 is readily soluble under physiological buffer conditions, coupling of this material to hydrophobic Ru-labels proved straightforward. It is noteworthy that even the target-chaperone complex modified in the way described remains soluble. In order to perform the assay on the Elecsys® test system (Roche Diagnostics GmbH,
15 Germany), FkpA-gp41 was biotinylated and ruthenylated, respectively, and tested for immunoreactivity in a double antigen bridge assay.

Several representative anti-HIV sera containing mainly IgG (immunoglobulin G) class antibodies tested highly positive with the covalently linked FkpA-gp41 protein domains. It also has been found that the background signal approaches the intrinsic gadget
20 background, even at antigen concentrations as high as 500 ng/ml. The signal-to-noise ratio turned out to be excellent. Moreover, there is no evidence that the carrier protein, the molecular chaperone FkpA from *E. coli*, causes non-specific binding of antibodies contained in these human sera.

As discussed above, the early detection of seroconversion is crucial to the reliable diagnosis
25 of HIV. During the course of infection, antibodies of the IgM class appear first. In order to detect HIV infection reliably in a very early phase, it is therefore mandatory to design an antigen module with high epitope density for IgM recognition and binding. Indeed, FkpA-gp41 is well recognized by typical anti-HIV, IgM-type sera. What is even more important is the fact that samples that are difficult to test positive, like the B and C sera from the 9003
30 and 4009 seroconversion panel as supplied by NABI (Miami, Florida), tested positive with the fusion construct according to the present invention. This is a major achievement since gp41 antigens on a peptide basis are not reactive at all when tested with these IgM sera.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 47 -

Example 4 Soluble chaperone-gp41 complexes inhibit virus entry

Different gp41-chaperone fusion proteins were assessed for their ability to inhibit HIV-1-mediated membrane fusion in an *in vitro* assay. In short, MAGI P4-CCR5 reporter cell lines expressing CD4, CCR5 and CXCR4 were infected with HIV-1 strain NL4-3 and assessed for Tat-dependent β -galactosidase activity according to Meister et al., Virology (2001) 284(2), 287-296. Indeed, we observe a substantial inhibition of infection with IC_{50} values in the nM range. SlyD-gp41, for instance (see SEQ ID No 6) inhibits virus entry significantly with an IC_{50} of < 70 nM.

In conclusion, the soluble intramolecular complex comprising HIV-1 gp41 or HIV-2 gp36, respectively, and a peptidyl-prolyl-isomerase chaperone possesses outstanding properties with respect to solubility and conformational integrity that allow for the design of improved anti-HIV antibody tests and other commercial applications.

Example 5 Fusion of the chaperone FkpA to the gp36 ectodomain yields a cytosolic polypeptide that can easily be refolded *in vitro*.

In order to obtain gp36, the HIV-2 homologue of gp41, in a soluble and immunologically active form, we cloned a construct termed FF36. This fusion polypeptide comprises two FkpA units and a gp36 unit, each linked by a flexible glycine-rich stretch. To facilitate purification, the fusion construct was tagged with His₆ C-terminally. The protein was essentially purified according to the aforementioned protocol: After chaotropic lysis, the protein was bound to a Ni-NTA-column and was – after excessive washing with 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 7.0 M GuHCl - eluted by lowering the pH. The eluted protein was then refolded by passing it over a gel filtration column equilibrated with 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 100 mM sodium chloride, 1 mM EDTA. The native protein resulting from this „renaturing gel filtration“ method displayed satisfying immunological and spectroscopic properties (see Fig. 10), thus corresponding to gp41 counterparts such as F41 or FF41. The purification and refolding protocol as described here was carried out with FF36 bearing three point mutations in the N-terminal heptad repeat region of gp36 (for sequence see SEQ ID NO: 9). The same protocol was also successfully applied to a fusion construct comprising the wt gp36 ectodomain, albeit with lower yields of soluble protein.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 48 -

Example 6 Soluble, immunoreactive FkpA-gp21 can be obtained in a convenient and reproducible fashion.

FkpA-gp21-overproducing *E. coli* cells (comprising: SEQ ID NO: 10) were grown, induced and harvested as described before. For complete lysis, cell pellets were stirred in 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 7.0 M GuHCl at room temperature for 1 hour. The chaotropic cell lysate was applied onto a Ni-NTA-column preequilibrated in lysis buffer. After the washing step the target protein (which bears a C-terminal Hexa-His-Tag) was eluted by lowering the pH. For refolding, FkpA-gp21 (stored in 50 mM sodium phosphate pH 6.0, 7.0 M GuHCl at 4°C) was passed over a Superdex 200 gel filtration column pre-equilibrated in 50 mM sodium phosphate pH 7.8, 100 mM sodium chloride. UV-spectra demonstrated that FkpA-gp21 elutes as a soluble protein which is – in contrast to the unchaperoned gp21- no more prone to aggregation (Fig.11/1). Moreover, the resulting FkpA-gp21 exhibits excellent immunological activity when assessed in a competitive type COBAS CORE experiment (Fig. 11/2).

Example 7: Fusion of an additional FkpA-subunit to FkpA-gp41 improves immunological properties of the gp41 ectodomain.

We addressed the question if an additional PPlase subunit within the fusion polypeptide context might improve the overall properties of the gp41 ectodomain-chaperone complex. To this end, we prepared both F41 (one FkpA domain located upstream to the gp41 variant) and FF41 (two FkpA domains located upstream to the gp41 variant) according to the described protocol. The biotinylated and ruthenylated fusion proteins were then assessed in the Elecsys® E2010 system. The results are strongly indicative for improved properties of the FF41 construct, containing an additional chaperone domain.

Background signals with negative sera which are decisive for signal-to-noise-ratio and reliable measurement of low titer sera were found to be reduced by more than fifty percent, when FF41 (about 1600 counts) was compared to F41 (about 3800 counts).

Table 1: Comparison of F41 and FF41

	F41	FF41
R1:	EMHR220	EMHR221
ESS in R1	F-41-Bi(UE)25	FF-41-Bi-UEEK
β (AL)	500ng/ml	750ng/ml
R2	EMHR221	EMHR222
ESS in R2	F-41-Ru(UE)25	FF41-2Ru-SK(4)
β (AL)	500ng/ml	750ng/ml
Average counts with 7 negative sera	3,768	1,589

Similar positive results have been obtained with a SS41 fusion protein, ie. a fusion protein containing two SlyD domains and one gp41 domain C-terminal to the chaperone domains.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 50 -

Reference List

- Aslam, M. and Dent, A., The preparation of protein-protein conjugates in "Bioconjugation" (1998) 216-363, Eds. M. Aslam and A. Dent, McMillan Reference, London
- 5 Bardwell, J. C., Mol Microbiol 14 (1994) 199-205
 - Beissinger, M. and Buchner, J., Biol. Chem. 379 (1998) 245-59
 - Bothmann, H. and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17100-5
 - Braden, B. C. and Poljak, R. J., Faseb J 9 (1995) 9-16
 - Buchner, J., Faseb J 10 (1996) 10-19
 - 10 Butler, J. E., et al., J. Immunol. Methods 150 (1992) 77-90
 - Caffrey, M., et al., J Biol Chem 275 (2000) 19877-82
 - Chan, D. C., et al., Cell 89 (1997) 263-73
 - Crooke, E. and Wickner, W., Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987) 5216-20
 - Danese, P. N., et al., Genes Dev 9 (1995) 387-98
 - 15 Dartigalongue, C. and Raina, S., Embo J 17 (1998) 3968-80
 - Doms, R. W. and Moore, J. P., J Cell Biol 151 (2000) F9-14
 - Egan, D. A., et al., Biochemistry 32 (1993) 1920-7
 - Fischer, G., et al., Nature 337 (1989) 476-8
 - Frech, C., et al., Embo J 15 (1996) 392-98
 - 20 Gething, M. J. and Sambrook, J., Nature 355 (1992) 33-45
 - Guyader, M., et al., Nature 326 (1987) 662-9
 - Hottenrott, S., et al., J Biol Chem 272 (1997) 15697-701
 - Kay, J. E., Biochem J 314 (1996) 361-85
 - Lane, W. S., et al., J Protein Chem 10 (1991) 151-60
 - 25 Lu, M., et al., Nat. Struct. Biol. 2 (1995) 1075-82
 - Meister, S., et al., Virology 284 (2001) 287-96
 - Missiakas, D., et al., Embo J 14 (1995) 3415-24
 - Missiakas, D., et al., Mol Microbiol 21 (1996) 871-84
 - Prusiner, S. B., Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 13363-83
 - 30 Rahfeld, J. U., et al., FEBS Lett 352 (1994) 180-4
 - Ramm, K. and Pluckthun, A., J Biol Chem 275 (2000) 17106-13
 - Ratner, L., et al., Nature 313 (1985) 277-84
 - Root, M. J., et al., Science 291 (2001) 884-8
 - Schmid, F. X., Molecular chaperones in the life cycle of proteins in "-" (1998) 361-389, Eds. A. L. Fink and Y. Goto, Marcel Decker In., New York
 - 35 Scholz, C., et al., Embo J 16 (1997) 54-8
 - Scholz, C., et al., J Biol Chem 271 (1996) 12703-7
 - Stoller, G., et al., Embo J 14 (1995) 4939-48

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 51 -

- Tijssen, in "Methods in Enzymology" (1980), Eds. S. P. Colowick, N. O. Caplan and S. P., Academic Press
- Tijssen, P., Preparation of enzym-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990) 221-278, Eds. R. H. Burdon and v. P. H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam
- 5 Wang, C. C. and Tsou, C. L., FASEB J 7 (1993) 1515-7
- Wild, C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 10537-41
- Wingfield, P. T., et al., Protein Sci 6 (1997) 1653-60
- Winter, J., et al., Journal of Biotechnology 84 (2000) 175-185
- 10 Zarnt, T., et al., J Mol Biol 271 (1997) 827-37
- AU 597884
- EP 0280211
- EP 396 559
- 15 US 4,735,896
- US 4,879,212
- WO 92/22573
- WO 93/21346
- WO 94/08012

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 52 -

Claims

1. A method of producing a soluble complex comprising a target protein which is essentially insoluble and a peptidyl-prolyl-isomerase class chaperone comprising mixing said protein and said chaperone in a buffer wherein both, the protein and the
5 chaperone are solubilized and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the protein-chaperone complex formed is soluble.
2. The method of claim 1, wherein the physiological buffer comprises a buffer compound in a concentration of 10 to 200 mM and a total concentration of salt of 20 - 500 mM.
3. The method of claim 1, wherein the protein is produced recombinantly.
- 10 4. The method of claim 1, wherein the peptidyl prolyl isomerase is produced recombinantly.
5. The method of claim 1, wherein the protein and the peptidyl prolyl isomerase are produced recombinantly
6. The method of claim 1, wherein the protein is an amyloidogenic protein.
- 15 7. The method of claim 6, wherein the amyloidogenic protein is a retroviral surface glycoprotein.
8. The method of claim 1, wherein the protein is HIV-2 gp36 or HIV-1 gp41.
9. The method of claim 1, wherein the peptidyl prolyl isomerase is a binding-competent fragment of the peptidyl prolyl isomerase.
- 20 10. A method of producing a soluble retroviral surface glycoprotein-chaperone complex comprising: mixing a retroviral surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase in a buffer wherein both the retroviral surface glycoprotein and the peptidyl prolyl isomerase are solubilized and form a complex, and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the complex is soluble.
- 25 11. The method of claim 10, wherein the retroviral surface glycoprotein is produced recombinantly.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 53 -

12. The method of claim 10, wherein the peptidyl prolyl isomerase is produced recombinantly.
13. The method of claim 10, wherein the retroviral surface glycoprotein and the peptidyl prolyl isomerase are produced recombinantly.
- 5 14. The method of claim 10, wherein the retroviral surface glycoprotein is HIV gp36 or gp41.
15. The method of claim 10, wherein the peptidyl prolyl isomerase comprises a binding-competent fragment of the peptidyl prolyl isomerase.
- 10 16. A method of producing a soluble retroviral surface glycoprotein-chaperone complex, comprising: solubilizing a retroviral surface glycoprotein covalently linked to a peptidyl prolyl isomerase in a buffer wherein the retroviral surface glycoprotein is solubilized, and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the retroviral surface glycoprotein-chaperone complex is soluble.
- 15 17. The method of claim 1, 10 or 16, wherein the peptidyl prolyl isomerase is a FKBP chaperone.
18. The method of claim 17, wherein the FKBP chaperone is selected from the group consisting of SlyD, FkpA and trigger factor.
19. A soluble complex comprising: a retroviral surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase.
- 20 20. A soluble complex comprising: a retroviral surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase, wherein the retroviral surface glycoprotein and the peptidyl prolyl isomerase chaperone are covalently linked.
21. The complex of claim 20, wherein the covalently linked comprises chemically coupled.
22. The complex of claim 21, wherein the covalently linked comprises recombinantly linked.
- 25 23. The complex of claim 22, wherein the recombinantly linked comprises a peptide linker.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 54 -

24. The complex of claim 23, wherein the peptide linker comprises at least 10 amino acids.
25. The complex of claim 23, wherein the peptide linker comprises at least 15 amino acids.
26. The complex of claim 23, wherein the peptide linker comprises at most 50 amino acids.
27. The complex of claim 23, wherein the peptide linker comprises at most 40 amino acids.
- 5 28. A composition of reagents comprising the soluble complex of any of claims 19 to 27.
29. A method of detecting at least one antibody to an envelope virus surface glycoprotein in a sample, comprising: contacting the sample and a composition comprising a complex comprising the surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase chaperone, and detecting bound antibodies.
- 10 30. The method of claim 29, wherein the contacting is conducted under conditions appropriate for binding of the antibodies to the surface glycoprotein.
31. The method of claim 30, wherein the detecting bound antibodies is indicative for the presence of anti-viral antibodies in the sample.
32. An immunoassay according to the double antigen bridge concept, comprising: a first antigen comprising a first chaperone-antigen complex, and a second antigen comprising a second chaperone-antigen complex.
- 15 33. The immunoassay of claim 32, wherein the first chaperone and the second chaperone are different molecules derived from one species.
34. The immunoassay of claim 32, wherein the first chaperone and the second chaperone are derived from different species
- 20 35. The immunoassay of any of claims 32 to 34, wherein the first chaperone is derived from a thermophilic bacterium.
36. The immunoassay of any of claims 32 to 34, wherein the second chaperone is derived from a thermophilic bacterium.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 55 -

37. The immunoassay of claim 32 or 34, wherein the first chaperone and the second chaperone are derived from thermophilic bacteria.
38. The immunoassay of claim 32, wherein the first antigen complex comprises a solid phase binding group.
- 5 39. The immunoassay of claim 32, wherein the second antigen complex comprises a marker group.
40. A method of eliciting an immune response, comprising: injecting into a subject a vaccine comprising a soluble retroviral surface glycoprotein-chaperone complex thereby eliciting antibodies in a subject that bind the retroviral surface glycoprotein.
- 10 41. A method of inhibiting virus entry into a cell, comprising: administering to a cell a soluble complex of claim 10.
42. The method of claim 41, wherein the inhibiting virus entry comprises inhibiting membrane fusion.
43. The method of claim 41, wherein the physiological buffer comprises a buffer compound in a concentration of 10 to 200 mM and a total concentration of salt of 20 -
15 500 mM.
44. The method of claim 41, wherein the protein is produced recombinantly.
45. The method of claim 41, wherein the peptidyl prolyl isomerase is produced recombinantly.
- 20 46. The method of claim 41, wherein the protein and the peptidyl prolyl isomerase are produced recombinantly
47. The method of claim 41, wherein the protein is an amyloidogenic protein.
48. The method of claim 41, wherein the protein is a retroviral surface amyloidogenic glycoprotein.
- 25 49. The method of claim 41, wherein the protein is HIV-2 gp36 or HIV-1 gp41.

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 56 -

50. The method of claim 41, wherein the peptidyl prolyl isomerase is a binding-competent fragment of the peptidyl prolyl isomerase.

WO 03/000877

1/8

PCT/EP02/06956

Figure 1A:

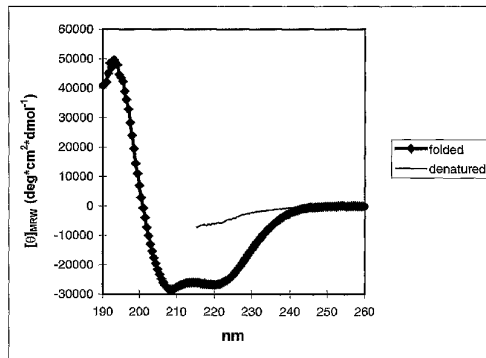
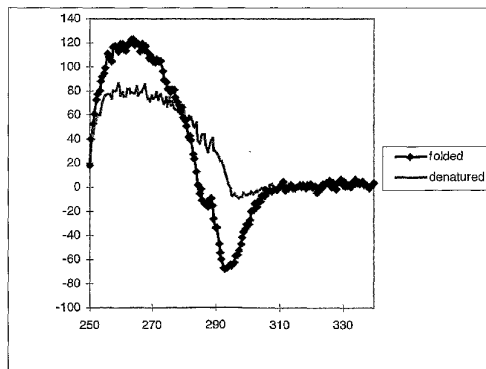


Figure 1B:



WO 03/000877

2/8

PCT/EP02/06956

Figure 2:

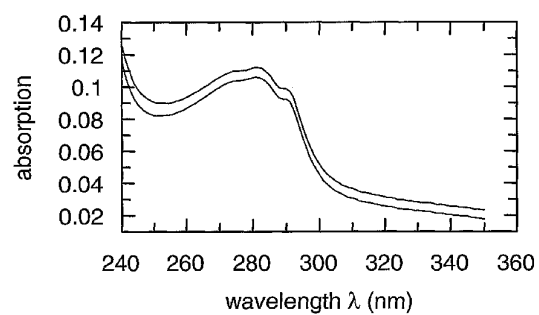
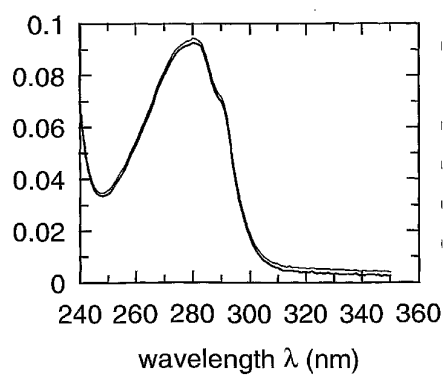


Figure 3 A:



WO 03/000877

3/8

PCT/EP02/06956

Figure 3B:

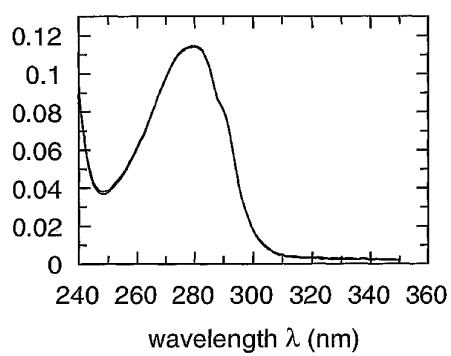
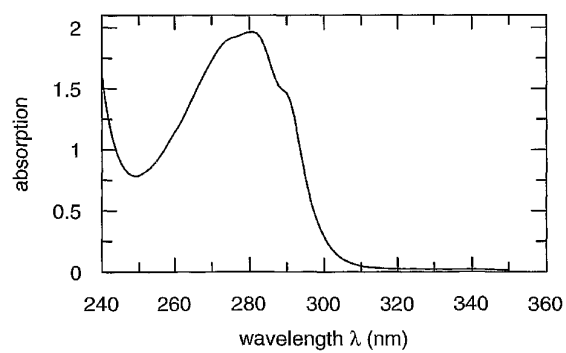


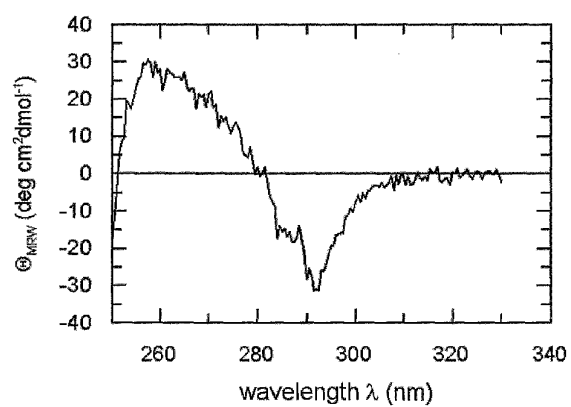
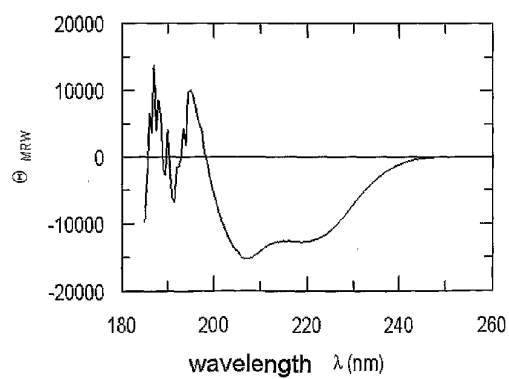
Figure 4:



WO 03/000877

4/8

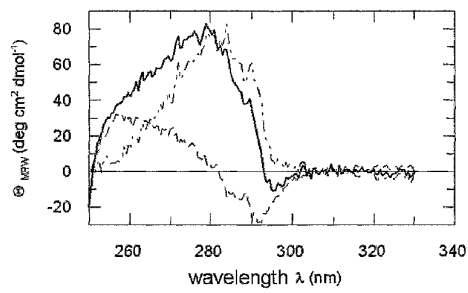
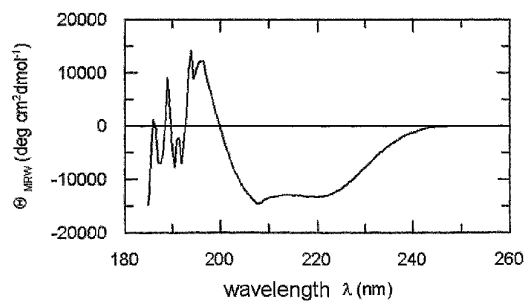
PCT/EP02/06956

Figure 5:Figure 6:

WO 03/000877

5/8

PCT/EP02/06956

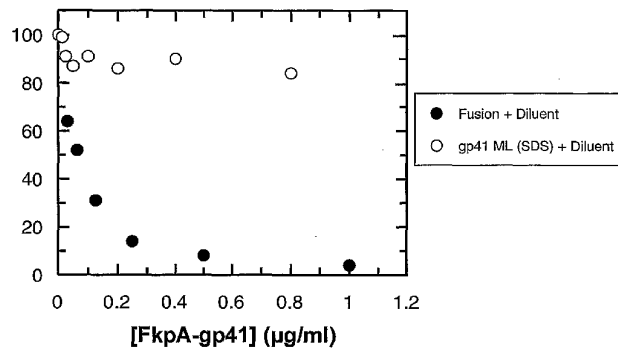
Figure 7:Figure 8:

WO 03/000877

6/8

PCT/EP02/06956

Figure 9:

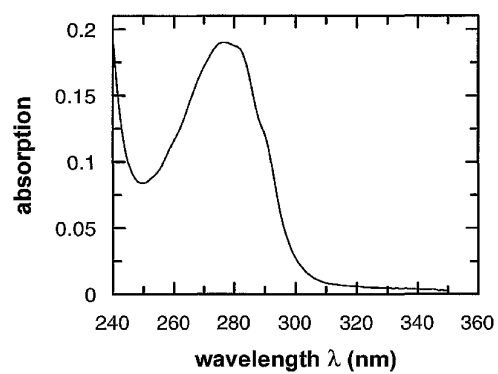


WO 03/000877

7/8

PCT/EP02/06956

Figure 10



WO 03/000877

8/8

PCT/EP02/06956

Figure 11/1

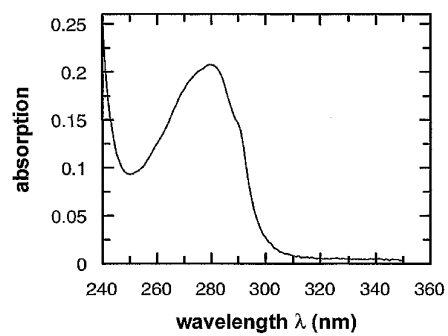
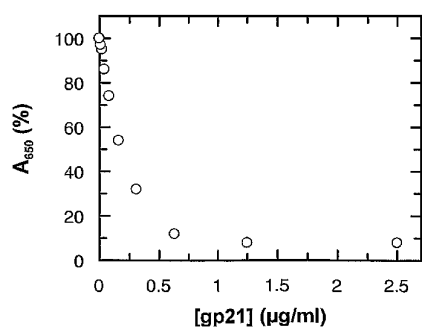


Figure 11/2



WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 1 -

Sequence listing

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> A soluble complex comprising a retroviral surface
glycoprotein

<130> 19290WO-WN

10 <140>
<141>

<150> EP01115225.3
<151> 2001-06-22

15 <150> EP01120939.2
<151> 2001-08-31

<160> 10

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 147

25 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

30 <223> Description of Artificial Sequence:corresponds to
positions 535 to 681 of envelope protein of HIV-1

<400> 1

Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
1 5 10 15

35 Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu
20 25 30

40 Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala
35 40 45

Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys
50 55 60

45 Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp
65 70 75 80

Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
85 90 95

50 Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile
100 105 110

55 Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu
115 120 125

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 2 -

Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp
 130 135 140
 5 Leu Trp Tyr
 145
 <210> 2
 10 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> Description of Artificial Sequence:corresponds to
 positions 534 to 676 of envelope protein of HIV-2
 <400> 2
 Leu Thr Val Ser Ala Gln Ser Arg Thr Leu Leu Ala Gly Ile Val Gln
 20 1 5 10 15
 Gln Gln Gln Gln Leu Leu Asp Val Val Lys Arg Gln Gln Glu Leu Leu
 20 25 30
 25 Arg Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Asn Leu Gln Ala Arg Val Thr Ala
 35 40 45
 Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp Gln Ala Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys
 50 55 60
 30 Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr Val Pro Trp Val Asn Asp Ser
 65 70 75 80
 Leu Ala Pro Asp Trp Asp Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Lys Gln
 35 85 90 95
 Val Arg Tyr Leu Glu Ala Asn Ile Ser Lys Ser Leu Glu Gln Ala Gln
 100 105 110
 40 Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asn Ser Trp
 115 120 125
 Asp Ile Phe Gly Asn Trp Phe Asp Leu Thr Ser Trp Val Lys Tyr
 130 135 140
 45
 <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 50 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer1
 55 <400> 3
 gcgggtgttc cgggtatccc accgaattc

29

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 3 -

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 5 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer2

 10 <400> 4
 gaattcgggtg ggatacccg g aacacccgc 29

 <210> 5
 15 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 20 <223> Description of Artificial Sequence:primer3

 <400> 5
 cgggatccgg tggcgggttca ggcgggtggct ctgggtggcgg tacgctgacg gtacaggcca 60
 g 61
 25

 <210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 30 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer4

 35 <400> 6
 ccgctcggagg taccacagcc aatttgttat 30

 <210> 7
 40 <211> 1269
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 45 <223> Description of Artificial Sequence::coding for a
 FkpA-gp41 fusion protein

 <400> 7
 atggctgaag ctgcaaaacc tgctacaact gctgacagca aagcagcgtt caaaaatgac 60
 50 gatcagaaat cagcttatgc actgggtgct tegctgggtc gttacatgga aaactctctt 120
 aaagacaag aaaaactggg catcaactg gataaagatc agctgatcgc tgggtttcag 180
 gatgcatttg ctgataagag caaactctcc gaccaagaga tcgaacagac tctgcaagca 240
 ttgcaagctc gcgtgaagtc ttctgtctcag gcgaagatgg aaaaagacgc ggcgtataac 300
 gaagcaaaag gtaaagagta ccgcgagaaa ttggccaaag agaaaggtgt gaaaacctct 360
 55 tcaactggtc tggtttatca ggtagtagaa gcgggtaag gcgaagcacc gaaagacagc 420
 gatactgttg tagtgaacta caaaggtacy ctgatcgcag gtaaagagtt cgacaactct 480

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 4 -

```

tacaccggtg gtgaaccgct ctcttccgt      ctggacggtg ttatccggg ttggacagaa
540
ggtctgaaga acatcaagaa aggcggtgaag atcaaaactgg ttattccacc agaactggct 600
tacggcaaaag cgggtgttcc gggatatcca cgaattcta cctgggtgtt tgacgtagag 660
5 ctctgggatg tgaaccacgc gccgaaggct gatcaaaagc cgggaagctga tgcgaaagcc 720
gcagattctg ctaaaaaagg tggcgggtcc ggcggtggct ctgggtggcg atccggtggc 780
ggttccggcg gtggtctctg tggcgggtac ctgacgttac aggcacagca attattgtct 840
ggtatagtgc agcagcagaa caatgagctg agggctattg aggcgcaaca gcatctggag 900
caactcacag tctggggcac caagcagctc caggcaagag aactggctgt ggaagatac 960
10 ctaaagatc aacagctcct ggggatttgg ggttgcctg gaaaactcat ttgaccact
1020
gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat aaatctctg aacagatttg gaataacatg
1080
acctggatgg agtgggacag agaaattaac aattacacaa gcttaataca ttctttaatt
15 1140
gaagatcgc aaaaccagca agaaaagaat gaacaagaat tattggaatt agataaatgg
1200
gcaagtttgg ggaattgggt taacataaca aattggctgt ggtacctga gccaccacc
1260
20 caccaccac
1269

<210> 8
25 <211> 1026
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Description of Artificial Sequence: coding for a
    SlyD-gp41 fusion protein

<400> 8
35 atgaaagtag caaaagacct ggtgggtcagc ctggcctatc aggtacgtac agaagacggt 60
gtgttggttg atgagtctcc ggtgagtggc ccgctggact acctgcattg tcacggttcc 120
ctgatctctg gcctggaaac ggcgctggaa ggtcatgaag ttggcgacaa atttgatgtc 180
gctgttggcg cgaacgacgc ttacggtcag tacgacgaaa acctggtgca acgtgttcct 240
aaagacgtat ttatggcggt tgatgaactg caggtaggta tgcgtttcct ggtgaaacc 300
gaccagggtc cgttaccggt tgaatcactg cgggttgaag acgacacgt cgtggttgat 360
40 ggtaacaca tgctggcggg tcgaacactg aaattcaac ttgaagtgtt ggcgattcgc 420
gaacgactg aagaagaact ggtcatggt cacttcacg gcgcgcacga tcaccaccac 480
gatcacgacc acgacggtgg cggttccggc ggtggtctct gtggcggatc cgggtggcgt 540
tcggcgggtg gctctggtgg cggtagcgtg acggtacagg ccagacaatt attgtctggt 600
atagtgcagc agcagaacaa tgagctgagg gctattgagg cgcacacaga tctggagcaa 660
45 ctcacagtc cgggcaccaa gcagctccag gcaagagaa ttgctgtgga aagataccta 720
aagatcaac agctcctggg gatctgggt tgcctggaa aactcatttg caccactgct 780
gtgccttggg atgctagtgg gactaataaa tctctgggac agatttggaa taacatgacc 840
tggatggagt ggaacagaga aattaacaat tacacaagct taatacatc ctaattgaa 900
gaatcgcaaa accagcaaga aaagaatgaa caagaattat tgggaattga taaatgggca 960
50 agtttggga attggtttaa cataacaatt tggctgtggt acctcgagca ccaccaccac
1020
caccac
1026

55 <210> 9

```

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 5 -

<211> 688
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

5 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:FkpAFkpA₃₆
 (3mut) fusion protein

<400> 9

10 Met Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ala Ala
 1 5 10 15

 Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu
 20 25 30

15 Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile
 35 40 45

 Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala
 50 55 60

20 Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala
 65 70 75 80

25 Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp
 85 90 95

 Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala
 100 105 110

30 Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val
 115 120 125

 Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val
 130 135 140

35 Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser
 145 150 155 160

40 Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro
 165 170 175

 Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys
 180 185 190

45 Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly
 195 200 205

 Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val
 210 215 220

50 Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala
 225 230 235 240

55 Ala Asp Ser Ala Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 6 -

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Glu Ala
 260 265 270
 5 Ala Lys Pro Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp
 275 280 285
 Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met
 290 295 300
 10 Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys
 325 330 335
 15 Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg
 340 345 350
 20 Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn
 355 360 365
 Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly
 370 375 380
 25 Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly
 385 390 395 400
 Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys
 405 410 415
 30 Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly
 420 425 430
 35 Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu
 435 440 445
 Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro
 450 455 460
 40 Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn
 465 470 475 480
 Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro
 485 490 495
 45 Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala
 500 505 510
 50 Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 515 520 525
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Leu Thr Val Ser Ala Gln Ser
 530 535 540
 55 Arg Thr Leu Leu Ala Gly Ile Val Gln Gln Gln Gln Gln Glu Leu Asp

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 7 -

545 550 555 560
 Val Val Lys Arg Gln Gln Glu Leu Glu Arg Leu Thr Val Trp Gly Thr
 565 570 575
 5 Lys Asn Leu Gln Ala Arg Glu Thr Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp
 580 585 590
 10 Gln Ala Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His
 595 600 605
 Thr Thr Val Pro Trp Val Asn Asp Ser Leu Ala Pro Asp Trp Asp Asn
 610 615 620
 15 Met Thr Trp Gln Glu Trp Glu Lys Gln Val Arg Tyr Leu Glu Ala Asn
 625 630 635 640
 Ile Ser Lys Ser Leu Glu Gln Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met
 645 650 655
 20 Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asn Ser Trp Asp Ile Phe Gly Asn Trp Phe
 660 665 670
 25 Asp Leu Thr Ser Trp Val Lys Tyr Leu Glu His His His His His His
 675 680 685

 30 <210> 10
 <211> 385
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:FkpA-gp21
 fusion protein
 40 <400> 10
 Met Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala Thr Thr Ala Asp Ser Lys Ala Ala
 1 5 10 15
 Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu
 45 20 25 30
 Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile
 35 40 45
 50 Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala
 50 55 60
 Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 55 Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 8 -

	85	90	95
	Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala		
	100	105	110
5	Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val		
	115	120	125
10	Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val		
	130	135	140
	Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser		
	145	150	155
15	Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro		
	165	170	175
	Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys		
	180	185	190
20	Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly		
	195	200	205
	Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val		
25	210	215	220
	Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala		
	225	230	235
30	Ala Asp Ser Ala Lys Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	245	250	255
	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ala		
	260	265	270
35	Ser Gly Lys Ser Leu Leu His Glu Val Asp Lys Asp Ile Ser Gln Leu		
	275	280	285
	Thr Gln Ala Ile Val Lys Asn His Lys Asn Leu Leu Lys Ile Ala Gln		
40	290	295	300
	Tyr Ala Ala Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Trp Glu Gln		
	305	310	315
45	Gly Gly Leu Cys Lys Ala Leu Gln Glu Gln Cys Cys Phe Leu Asn Ile		
	325	330	335
	Thr Asn Ser His Val Ser Ile Leu Gln Glu Arg Pro Pro Leu Glu Asn		
	340	345	350
50	Arg Val Leu Thr Gly Trp Gly Leu Asn Trp Asp Leu Gly Leu Ser Gln		
	355	360	365
55	Trp Ala Arg Glu Ala Leu Gln Thr Gly Leu Glu His His His His His		
	370	375	380

WO 03/000877

PCT/EP02/06956

- 9 -

H1a
385

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

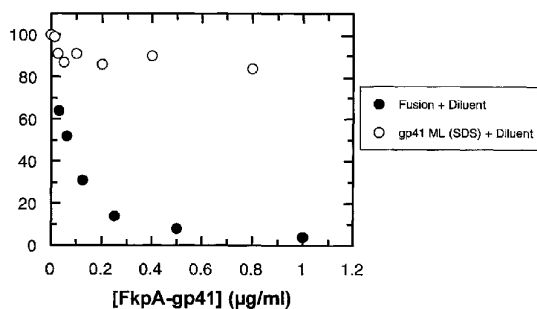
PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000877 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 9/90, C07K 14/16, G01N 33/569, A61K 38/52, 39/21
- (21) International Application Number: PCT/EP02/06956
- (22) International Filing Date: 24 June 2002 (24.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01115225.3 22 June 2001 (22.06.2001) EP
01120939.2 31 August 2001 (31.08.2001) EP
- (71) Applicant (for DE only): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, 68305 Mannheim (DE).
- (71) Applicant (for all designated States except DE): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzachstr. 124, CH-4070 Basel (CH).
- (72) Inventors: SCHOLZ, Christian; Sindelsdorfer Strasse 35a, 82377 Penzberg (DE); ANDRES, Herbert; Kapellenwiese 39, 82377 Penzberg (DE); FAATZ, Elke; Steinkreuz 1, 82386 Huglfing (DE); ENGEL, Alfred; Kustermannstrasse 3a, 82327 Tutzing (DE); SZIMANN, Dorothea; Sindelsdorfer Str. 8a, 82377 Penzberg (DE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EL, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
30 October 2003

[Continued on next page]

(54) Title: A SOLUBLE COMPLEX COMPRISING A RETROVIRAL SURFACE GLYCOPROTEIN



(57) Abstract: The present invention relates to the diagnosis of HIV infections. It especially teaches the production of a soluble retroviral surface glycoprotein- (or transmembrane glycoprotein)- chaperone complex and the advantageous use of a chaperone-antigen complex especially in the detection of antibodies to HIV in immunoassays, preferably according to the double antigen bridge concept, or as an immunogen. The invention also discloses soluble complexes comprising a variant of HIV-1 gp41 or a variant of HIV-2 gp36, respectively, and a chaperone selected from the peptidyl-prolyl-isomerase class of chaperones. Variants comprising specific amino-acid substitutions in the N-helical domain of HIV-1 gp41 or of HIV-2 gp36, respectively are also described.

WO 03/000877 A3 

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC/EP 02/06956
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/36 C07K14/16 G01N33/569 A61K38/52 A61K39/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SPETH C ET AL: "A 60 KD HEAT-SHOCK PROTEIN-LIKE MOLECULE INTERACTS WITH THE HIV TRANSMEMBRANE GLYCOPROTEIN GP41" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 36, no. 9, 1999, pages 619-628, XP001628925 ISSN: 0161-5890 the whole document, in particular p. 626, right-handed column, 2nd paragraph ---	
A	US 6 297 420 B1 (DAVIS GREGORY D ET AL) 27 March 2001 (2001-03-27) The whole document, in particular Fig. 2 and claim 13 --- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual compilation of the international search		Date of mailing of the international search report
3 June 2003		02.07.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5516 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 01 651 650 04 Fax: (+31-70) 340-3013		Authorized officer Bassias, I

Form PC/PISA/10 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/06956

C./Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 29605 A (REIMANN HANSJOERG SCHIRMBECK REINHOLD (DE)) 13 April 2000 (2000-04-13) the whole document ---	
A	EP 1 077 262 A (HOFFMANN LA ROCHE) 21 February 2001 (2001-02-21) the whole document ---	
A	GOETHEL S F ET AL: "PEPTIDE-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASES, A SUPERFAMILY OF UBIQUITOUS FOLDING CATALYSTS" CHLS CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 55, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 423-436, XP001034726 ISSN: 1420-682X the whole document, in particular p. 432, right-handed column - p.434 ---	
A	OTTEKEN A ET AL: "CALRETICULIN INTERACTS WITH NEWLY SYNTHESIZED HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 ENVELOPE GLYCOPROTEIN, SUGGESTING A CHAPERONE FUNCTION SIMILAR TO THAT OF CALNEKIN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 271, no. 1, 5 January 1996 (1996-01-05), pages 97-103, XP001019156 ISSN: 0021-9258 the whole document -----	

Form PCT/ISA219 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/66956**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT,
all additional fees are to be refunded.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-31
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 /06956

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-9

A method of producing a soluble complex comprising a target protein which is insoluble and a peptidyl-prolyl-isomerase class chaperone comprising mixing said protein and said chaperone in a buffer wherein both, the protein and the chaperone are solubilized and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the protein-chaperone complex formed is soluble.

2. Claims: 10-15

A method of producing a soluble retroviral surface glycoprotein-chaperone complex comprising: mixing a retroviral surface glycoprotein and a peptidyl-prolyl-isomerase in a buffer wherein both, the glycoprotein and the chaperone are solubilized and form a complex, and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the complex is soluble.

3. Claims: 16-18

A method of producing a soluble retroviral surface glycoprotein-chaperone complex comprising: solubilizing a retroviral surface glycoprotein covalently linked to a peptidyl-prolyl-isomerase in a buffer wherein the retroviral surface glycoprotein is solubilized, and adjusting the buffer to physiological conditions wherein the retroviral surface glycoprotein-chaperone complex is soluble.

4. Claims: 19-28

A soluble complex comprising: a retroviral surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase and a composition of reagents comprising said complex.

5. Claims: 29-31

A method of detecting an antibody to an envelope virus surface glycoprotein in a sample, comprising: contacting the sample and a composition comprising a complex which comprises the surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase chaperone and detecting bound antibodies.

6. Claims: 32-39

An immunoassay according to the double antigen bridge

International Application No. PCT/EP 02/06956

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 219

concept, comprising: a first chaperone-antigen complex, and a second antigen comprising a second chaperone-antigen complex.

7. Claim : 49

A method of eliciting an immune response, comprising: injecting into a subject a vaccine comprising a soluble retroviral surface glycoprotein-chaperone complex thereby eliciting antibodies in a subject that bind the retroviral surface glycoprotein.

8. Claims: 41-50

A method of inhibiting virus entry into a cell, comprising: administering to a cell a soluble complex of a retroviral surface glycoprotein and a peptidyl prolyl isomerase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PC1/EP 02/66956

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6207420	B1	27-03-2001	US 5989868 A 23-11-1999
			AU 9482098 A 29-03-1999
			NO 9913091 A1 18-03-1999
WO 0020606	A	13-04-2000	WO 0029606 A1 13-04-2000
			AU 9629498 A 26-04-2000
			CA 2344993 A1 13-04-2000
			EP 1117803 A1 25-07-2001
EP 1077262	A	21-02-2001	EP 1077263 A1 21-02-2001
			EP 1077262 A1 21-02-2001
			CA 2313248 A1 29-01-2001
			CN 1283702 A 14-02-2001
			JP 2001061487 A 13-03-2001
			US 6455279 B1 24-09-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 P 21/02	Z N A C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/532	
G 0 1 N 33/532	G 0 1 N 33/569	H
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	E

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 アンドレス, ヘルベルト
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 8 2 3 7 7 カペレンヴィーゼ 3 9

(72) 発明者 ファーツ, エルケ
 ドイツ連邦共和国 フグルフィンク 8 2 3 8 6 シュタインクロイツ 1

(72) 発明者 エンゲル, アルフレート
 ドイツ連邦共和国 トゥーツィング 8 2 3 2 7 クスターマンシュトラッセ 3 アー

(72) 発明者 ジツマン, ドロテア
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 8 2 3 7 7 ジンデルスドルファー シュトラッセ 8 アー

F ターム (参考) 4B064 AG01 AG32 CA02 CA19 CC01 CC24 CE02 CE03 CE12 CE20
 DA01 DA15
 4B065 AA94X BA30 CA44
 4C085 AA03 BA65 CC08 EE01
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA05 CA11 DA86 DA89
 EA29 EA53 FA74 GA01 GA15 GA22 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004534831A5	公开(公告)日	2005-09-15
申请号	JP2003507262	申请日	2002-06-24
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	シヨルツクリスチャン アンドレスヘルベルト ファーツエルケ エンゲルアルフレート ジツマンドロテーア		
发明人	シヨルツ,クリスチャン アンドレス,ヘルベルト ファーツ,エルケ エンゲル,アルフレート ジツマン,ドロテーア		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/21 A61K47/48 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P37/02 C07K14/00 C07K14/16 C07K14/195 C07K14/245 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N9/90 C12N15/62 C12P21/02 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K47/64 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K14/005 C07K2319/00 C12N9/90 C12N2740/16122 G01N33/54306 G01N33/56911 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N2333/005 G01N2333/16 G01N2333/195 G01N2469/20		
FI分类号	C07K19/00 A61K39/21 A61P37/02 C07K14/16 C07K14/245 C12P21/02.ZNA.C G01N33/532 G01N33/569.H C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B064/AG01 4B064/AG32 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/CE03 4B064/CE12 4B064/CE20 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA94X 4B065/BA30 4B065/CA44 4C085/AA03 4C085/BA65 4C085/CC08 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA05 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA29 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045/GA01 4H045/GA15 4H045/GA22 4H045/GA26		
优先权	2001115225 2001-06-22 EP 2001120939 2001-08-31 EP		
其他公开文献	JP2004534831A JP4262594B2		

摘要(译)

本发明涉及HIV感染的诊断。它特别教导了可溶性逆转录病毒表面糖蛋白 - (或跨膜糖蛋白) - 伴侣复合物的产生以及伴侣 - 抗原复合物的有利用途, 特别是在免疫测定中检测HIV抗体时, 优选根据双抗原桥概念, 或作为免疫原。本发明还公开了可溶性复合物, 其分别包含HIV-1 gp41的变体或HIV-2 gp36的变体, 以及选自肽基 - 脯氨酰 - 异构酶类伴侣蛋白的分子伴侣。还描述了分别在HIV-1 gp41或HIV-2 gp36的N-螺旋结构域中包含特定氨基酸取代的变体。

