

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3445984号
(P3445984)

(45)発行日 平成15年9月16日(2003.9.16)

(24)登録日 平成15年6月27日(2003.6.27)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

N

C 1 2 N 15/09

33/569

H

// G 0 1 N 33/569

C 1 2 N 15/00

A

請求項の数 7 (全 27数)

(21)出願番号 特願2001 - 538565(P2001 - 538565)

(86)(22)出願日 平成12年11月15日(2000.11.15)

(65)公表番号 特表2003 - 515113(P2003 - 515113A)

(43)公表日 平成15年4月22日(2003.4.22)

(86)国際出願番号 PCT/KR00/01305

(87)国際公開番号 W001/036688

(87)国際公開日 平成13年5月25日(2001.5.25)

審査請求日 平成14年5月15日(2002.5.15)

(31)優先権主張番号 1999/50510

(32)優先日 平成11年11月15日(1999.11.15)

(33)優先権主張国 韓国(KR)

(73)特許権者 501262167

バイロメッド・リミテッド

V I R O M E D L I M I T E D

大韓民国151 - 818ソウル、クワナク、ボ
ンチョンドン・ナンバー1510 - 8番

(72)発明者 キム・スンヨン

大韓民国140 - 030ソウル、ヨンサンク、イ
チョンドン300 - 127、ハンガン・マンショ
ン18 - 302

(72)発明者 バク・オンジン

大韓民国150 - 044ソウル、ヨンドンボク、
ダンサンドン4ガ30 - 1番、ダンサン・ヒュ
ンデ・5アパートメント502 - 802

(74)代理人 100062144

弁理士 青山 葆 (外 3 名)

審査官 山村 祥子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子治療を受けた患者の血清中にマウス白血病ウイルスに対する抗体が存在するかどうかを検
出する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 レトロウイルスベクターを用いて遺伝子
治療を受けた患者が複製可能ウイルスに暴露されたかど
うかを検出する方法であって、抗原タンパク質としてマ
ウス白血病ウイルス(MLV)の E nvタンパク質の一部と患
者の血清とを反応させる工程；および患者の血清中に E
nvタンパク質に対する抗体が存在するかどうかを測定す
る工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】 前記 E nvタンパク質の一部が、配列番号
6 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記 E nvタンパク質の一部が、マルト
ース結合タンパク質 (MBP)または 1 1 個のアミノ酸からな
る T 7 標識 (Tag)と融合された形態である、請求項 1 記
載の方法。

【請求項 4】 前記 E nvタンパク質を、前記反応工程前

に自動化されたマイクロアレイヤーを用いて、タンパク
質チップの微小基板上に固定する工程をさらに含む、請
求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 レトロウイルスベクターを用いて遺伝子
治療を受けた患者から複製可能ウイルスに対する抗体を
検出するための診断キットであって、MLVの E nvタンパ
ク質の一部を含むことを特徴とするキット。

【請求項 6】 前記 E nvタンパク質の一部が、配列番号
6 のアミノ酸配列を有する、請求項 5 記載のキット。

【請求項 7】 前記 E nvタンパク質の一部が、タンパク
質チップの微小基板上に固定されている、請求項 5 記載
のキット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】 発明の分野

本発明は、事前に遺伝子治療を受けた患者が遺伝子治療

の際、複製可能レトロウイルス(replication competent retrovirus, RCR)に暴露されたかを検査するためにレトロウイルスのGagまたはEnvタンパク質の特定部分を用いて患者血清中のMLV(murine leukemia virus)に対する抗体の存在を検出する方法に関する。

【0002】背景技術

遺伝子治療は、生きている細胞の遺伝学的修飾に基づく医学的介入である。細胞は生体外連続投与のために修飾されるか、患者に直接的に投与された遺伝子治療産物によって生体内で変形される。

【0003】MLV - 由来レトロウイルスベクターは、最も頻繁に用いられる遺伝子伝達体(gene delivery vehicle)であって、承認された臨床試験の40%以上で使用されている。ウイルスベクターは遺伝子伝達体として広範囲に使用されているが、それ自体の高い遺伝子伝達効率のために安全性に対する問題がいつも提起されている。これは、部分的に不完全であると考えられるウイルスが大量生産工程の間に成長し得るウイルス、いわゆる複製可能ウイルス(replication competent virus, RC 10 V)、レトロウイルスの場合にはRCRに転換され得るからである。たとえ小量であってもRCRの存在は遺伝子治療過程を経る患者に深刻な危険性を与える。したがって、米国食品医薬品安全庁(FDA)のガイドラインは組換えウイルスの生産工程はもちろん、レトロウイルスベクターを患者に投与した後も定期的に複製可能レトロウイルス(RCR)が形成されたかどうかを確認するように要求している。RCRの存在は少なくとも三つの段階で確認しなければならない。第1段階は、生産細胞株からウイルスベクターを生産する段階および/またはウイルスベクターを標的細胞に形質導入する前段階である。また、米国食品医薬品安全庁はレトロウイルスベクターによって導入された治療遺伝子を含む遺伝子組換え細胞を患者に投与した以後にも長い間発生可能なRCRの存在を検出することを勧めている。実際に臨床試験の第1相において約10~20名の患者を対象とし、年3回にわたってRCRが存在するかどうかを分析している。

【0004】RCRを検出するために、MLVに非常に敏感なMus dunni細胞を用いた分析、逆転写酵素分析、重合酵素連鎖反応(PCR)などのいくつかの分析方法が用いられる。

【0005】Mus dunni細胞を用いたRCR検出方法は一般的に次のような方法で行われる。ウイルス生産細胞またはウイルス含有上澄液をハイグロマイシン(hygromycin)またはLacZのような適当な標識遺伝子を含むMus dunni細胞とともに培養して得る。このような同時 - 培養から得られた培養上澄液は標識遺伝子を発現するウイルスが存在するかどうかを確認するために適当な標的細胞に感染させて使用する(Forestell et al., J. Virol. Methods 60:171-178, 1996)。この方法は、標識遺伝子がMus dunni細胞内に既に存在する標識遺伝子を含むレ 50

トロウイルスと(遺伝子伝達体として使用された)レトロウイルスベクター間の組換えによって回復され得る原理を用いたものである。Mus dunni細胞はまたS⁺L⁻焦点分析(S⁺L⁻ focus assay, Haapala DK et al., J. Virology 53:827-833, 1985)にも用いられる。RCRはウイルス生産細胞またはウイルス生産細胞から得られた培養上澄液をMus dunni細胞とともに培養した後焦点の形成により検出され得る。これらの方法は、RCRの力価を増加させるためにウイルス上澄液またはウイルス生産細胞株をMus dunni細胞とともに数回継代培養しなければならないので、1ヶ月以上の期間がかかる。さらに、S⁺L⁻分析自体でも5~7日がかかる。

【0006】逆転写酵素分析方法は、組換えを通じて作られたRCRのみが逆転写酵素活性を示す性質を用いたものである。PCRによる方法は、一般的にレトロウイルスベクターには存在しないウイルス由来のGagまたはEnv配列を増幅させることによりRCRを検出する。この方法は、現在一般的な臨床治療に最も多く用いられる方法であるが、感度が高すぎ、再現性が非常に低いという問題がある(Long et al., Human Gene Ther. 9:1165-1172, 1998; Otto et al., Human Gene Ther. 5: 567-575, 1994)。このように前述の方法は多くの時間と手間がかかるだけでなく、反復再現性と感度が低いという問題がある。

【0007】したがって、より高い感度を保持しながらも所要分析時間およびサンプル量が少なく、より経済的な方法を開発するための研究が行われてきたが、これまで感度を非常に高い程度に保持できる方法は開発されていない。このような研究の一環として、ELISAを用いて抗-MLV抗体を測定することによりRCRを検出する方法が報告されている(Martineau et al., Human Gene Therapy 8:1231-1241, 1997)。しかし、この方法は、全MLVウイルスを抗原として用いるため、反応特異性と感度の点で満足すべき水準に達していない。

【0008】前記のように既存のRCR分析方法の問題を克服するために、本発明者らはMLV由来の特定タンパク質を患者の血清と反応させてレトロウイルス遺伝子治療後抗体の存在を容易に確認できる高効率のRCR検出方法を開発した。この方法は、GagまたはEnvタンパク質の切片がRCR分析のために必要な程度の反応特異性と感度をすべて有することを確認した。特に、本発明では、ウイルスタンパク質のどの切片が抗原として使用でき、また、前記タンパク質を用いてどのようにRCR検出においてウイルスタンパク質に対する抗体の存在の有無を検出できるかを確認した。

【0009】発明の要約

したがって、本発明の目的は、血清中のRCRに対する抗体を検出することにより、事前に遺伝子治療を受けた患者がRCRに暴露されたかどうかを正確かつ簡便に確認する方法を提供することである。

【0010】また、本発明の他の目的は、RCRに対するヒト患者の可能性のある事前暴露を検出するにあたり、高い感度および反応特異性を同時に保持しながらも、時間的に効率がよく最小量の試料のみを使用する方法を提供することである。

【0011】発明の詳細な記載

本発明は、遺伝子治療用ウイルスベクターが由来するレトロウイルスのGagまたはEnvタンパク質の特定抗原の一部を用いて患者血清中の抗体の存在を測定することにより、事前に遺伝子治療を受けた患者がRCRに暴露されたかどうかを確認する方法を提供する。

【0012】具体的には、本発明は、抗原-抗体反応を通じて患者の血清中に存在する抗体を測定するRCR検出方法を提供する。本発明の方法において、その産物がRCR内に存在するとされるウイルス由来遺伝子の特異的な切片は発現ベクター内にクローニングされ、大腸菌から生産され、分離された後、遺伝子治療を受けた患者の血清と反応させるのに用いられる。

【0013】遺伝子治療に用いられるレトロウイルスベクターは元のウイルスゲノムから大部分のGag、pol およびEnv遺伝子が除去されたため、一般的に複製が不可能である。パッケージング細胞株においては、タンパク質がin transとして提供され、ウイルス粒子内に(パッケージングシグナル配列を含む)ウイルスゲノムRNAをパッケージングするのに用いられる。GagまたはEnvタンパク質はMLVベクターで遺伝子組換え細胞が処理されたヒト患者の血清中に存在しないだけでなく、多量でピリオン(virion)内に存在して高い免疫原性を期待できるので、抗原タンパク質(antigenic protein)として好ましい。

【0014】本発明においては、遺伝子伝達体として最も頻繁に用いられているMLVをRCR検出システムを開発するためのモデルシステムとして使用する。MLVの場合、抗原がMLV GagまたはEnvタンパク質の一部であることが特に好ましい。本発明では、(配列番号2を含む)MLV Gagタンパク質の特異的な部分および(配列番号6を含む)MLV Envタンパク質の特異的な部分が感度および反応特異性の面で非常に有用であることを確認した。

【0015】前記抗原タンパク質は精製を容易にするためにマルトース結合タンパク質(maltose binding protein; MBP)または11個のアミノ酸からなるT7標識(Tag)と融合された融合タンパク質として発現され得る。

【0016】本発明の抗原-抗体反応を用いたRCR検出方法はELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)、ウエスタンブロット分析(western blotting)、FLISA(fluorescence-linked immunosorbent assay)を含む様々な方法および抗原-抗体の結合を検出できるすべての分析方法に適用され得る。また、各々の方法は全体的な分析の正確性をより増加させるために他の方法と組合せて使

用してもよい。

【0017】本発明の抗原タンパク質は自動化されたマイクロアレイヤーおよび適当なリーダー(スキャナー)を用いてタンパク質チップの形に製作されてもよい。大量の試料が単一チップ上に集積され得るタンパク質チップを用いて分析の大量化、自動化および効率化をなすことができる。

【0018】本発明のRCV検出方法のための抗原タンパク質は抗原遺伝子を含む発現プラスミドを製作し、大腸菌などにおいて前記遺伝子を発現させて公知の方法に従って大量生産できる。本発明においては、好ましい発現ベクターの一例として配列番号2の抗原タンパク質(CA)を発現する発現ベクターと配列番号6の抗原タンパク質(SU-1)を発現する発現ベクターを提供する。本発明者らは、前記ベクターを各々1999年11月1日付および2000年11月10日付で韓国微生物培養センターに寄託番号KCCM-10173およびKCCM-10224として寄託した。

【0019】本発明の好ましい実施例においては、MLVに対する抗体を検出するための抗原として、MLV Gagタンパク質の一部であるp30(capsid protein; CA)とp15E(TM)およびgp70(プロリン-豊富配列を含む上流; SU-1)抗原を選択した。カプシドタンパク質p30は大部分のレトロウイルスにおいて高い水準で発現され、一般的に互いに違う亜型間でもアミノ酸配列がよく保存されていることが知られている。免疫原性がより高いと期待されるEnv抗原は診断試薬の主な標識抗原として選択されて使用されている。Envタンパク質の膜貫通ドメイン(transmembrane domain, TM)と外部ドメイン(extracellular domain, SU-1)間の抗原性に差があると判断され、二つの部位をすべてクローニングした。これらの選択された抗原CA、TMおよびSU-1のゲノムにおける位置を図1に示す。

【0020】MLV GagおよびEnvのアミノ酸配列に基づいて塩基配列がよく保存された部分を選択した。次いで、CA、TMおよびSU-1の一部をコードする遺伝子切片をPCRで増幅した後、発現ベクターに挿入した。タンパク質の精製を容易にするためにMBP融合タンパク質の形態に発現させるpMAL-c2ベクターまたはT7標識と結合した形態に発現させるpET-17bおよびpET-3aベクターを用いた。大腸菌におけるタンパク質発現を確認した結果、用いられた塩基配列によって大腸菌における発現量と抗体反応性に大きな差を示した。そのうち、特に263個のアミノ酸からなるCAと197個のアミノ酸からなるSU-1が最も高い発現量と抗体反応性を示した。一方、SU-1抗原タンパク質をpET-17bに挿入した場合には、その発現量が非常に低くて以後の実験に用いなかった。

【0021】大腸菌における抗原タンパク質の発現をIPGを添加して誘導し、SDS-PAGEを通じて標的タンパ

ク質の存在を確認した後、これをカラムクロマトグラフィーで分離精製した。IPTGを添加する前には本発明の抗原タンパク質はその発現量が非常に少なかったが、IPTGを添加した以後には総タンパク質の約10～20%程に増加した。前記抗原は精製後にはほとんど単一バンドとして検出されたため、精製度が高いことが分かる(図5)。一方、本発明のまた他の実施例においては前記で製造した抗原タンパク質が抗-MLV抗体と反応特異性および感度を有するかを確認するためにウエスタンブロット分析およびELISAを行った。

【0022】融合タンパク質MBP-CAをプロテアーゼ因子Xa(factor Xa)で切断して純粋なCAタンパク質を得た。精製されたCAをウサギに腹腔内注射し、抗-CA抗体を含むウサギ血清を得た。抗-MLV抗体は(全体ウイルスとして)MLVをマウスの尾静脈に接種して免疫されたマウスからMLV陽性血清を回収して製造した。ウサギ抗-CA血清およびマウス抗-MLV血清を用いた理由はヒトがMLVに感染する場合は極めて稀であり、感染者の血液を確保することが不可能なためである。本発明の抗原タンパク質を前記で製造したウサギ抗-CA血清およびマウス抗-MLV血清と反応させてウエスタンブロット分析を行った。その結果、各抗原は抗体に対して特異的に反応することを確認した(図6aおよび図6b参照)。Gagの場合、CAとT7-CAのいずれの場合においても5000倍に希釈されたウサギ血清と非常に強く反応したが、Envタンパク質であるTMやSU-1とは反応しなかった。また、Envの場合、マウス抗-MLV血清と反応させたときT7-CAとT7-SU-1のみが反応を示し、これらの中でもSU-1の反応がCAの反応より強く、T7-TMは全く反応しなかった。

【0023】また、本発明のまた他の実施例においては、抗原タンパク質と抗体に対してELISAを行って反応特異性および感度を調査した。ELISAの判定基準値は陰性対照群(正常のウサギ血清または正常のマウス血清)と反応させた場合の吸光度値の平均に0.3を加えた値とした。結果は実験群のS/CO(sample OD/cutoff value)として示したが、S/COが1を超えると陽性であると判定した。

【0024】その結果、ウサギ抗-CA血清に対して(いずれの標識タンパク質も含まない)CAとT7-CA抗原のいずれにおいてS/CO値が、4以上で陽性として判定されたが、MBP-TM、T7-TMおよびT7-SU-1はS/CO値が、1以下で陰性として判定された。このような結果は、前記のウエスタンブロット分析結果とも一致するもので、本発明のCA抗原が非常に高い反応特異性を有することを示す。マウス抗-MLV血清に対してCAおよびT7-CA抗原とT7-SU-1はS/CO値が、3以上であるのに対し、MBP-TMとT7-TMはS/CO値が、1以上2未満であった。このような結果はこれらの抗原タンパク質の抗原性に差があることを示す。

【0025】このような結果に基づいて、非常に高い抗原性を示すT7-CAおよびT7-SU-1を対象にELISA感度調査を行った。試料を2倍数ずつ段階的に希釈してELISAを行うことにより抗原の感度を調査した。ウサギ血清の場合、最高64万倍、マウス血清の場合最高2,560倍まで段階的に希釈してELISAを行った。マウス血清の場合RCRに暴露されたヒトの血清と類似する条件にするために初期原液をヒト血清で10倍希釈して用いた。T7-CA抗原はウサギ抗-CA血清に対して16万倍希釈までS/CO 3以上の高い感度を示し(図7a参照)、T7-SU-1抗原はマウス抗-MLV血清に対して64倍希釈比率までS/CO 4以上の高い陽性反応を示した(図7b参照)。また、T7-CAとT7-SU-1はマウス抗-MLV血清において各々64倍および256倍の希釈比率までS/CO 3以上の陽性反応を示した。これらの二つの抗原を混合して使用した場合にも256倍希釈比率までS/CO 2以上の高い陽性反応を示した(図7c参照)。前記結果は、CAおよびSU-1抗原は非常に高い感度と特異度を有するので、遺伝子治療を受けた患者の血清中でMLV抗体を検出することにより、同種組換えによるRCR形成可否を確認するための方法に効果的に使用できることを示す。また、T7-SU-1抗原の場合、希釈比率が高くなるほどS/CO値の減少がT7-CAに比べて緩やかであった。これは、T7-SU-1を単一抗原として用いる場合にも安定的な抗-MLV抗体診断用抗原として効率的に機能することを示す。

【0026】さらに、本発明のまた他の実施例においては、アミノアルキルシランでコーティングされたスライドガラス(「チップ」)にT7-CA、T7-TMおよびT7-SU-1抗原タンパク質を固定したタンパク質チップを用いて大量分析への適用可能性を検討した。T7-CAおよびT7-SU-1抗原はタンパク質チップを用いた抗原-抗体反応においても高い反応特異性と感度を示した。

【0027】以下、実施例によって本発明をより詳細に説明する。但し、下記実施例は本発明を例示するのみであり、本発明の内容が下記実施例に限定されないことは本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者に自明である。

【0028】実施例

実施例1：MLV抗原のクローニングおよび発現ベクターの製作

CA(p30)、TM(p15E)およびSU-1(gp70、プロリン-豊富配列の上流)の一部をコードするDNA切片をPCRで増幅した。

【0029】鋳型としてはpMLV(Shinnick et al., Nature 293: 543-548, 1981)を用い、CA、TMおよびSU-1を増幅するために特定制限酵素部位を有する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。前記PCRに用いられたプライマーの塩基配列は配列番号7～18として示したが、増幅対象遺伝子および制限部位に従

って下記表 1 に示す。

【 0 0 3 0 】

【表 1】

標的遺伝子	方向	制限酵素	配列番号
CA	5'プライマー	EcoR I	7
		BamH I	8
	3'プライマー	Sal I	9
TM	5'プライマー	EcoR I	10
		BamH I	11
	3'プライマー	Sal I	12
SU-1	5'プライマー	BamH I	13
	3'プライマー	BamH I	14

【 0 0 3 1 】 P C R 反応は鋳型として p M L V ゲノムを用いて 9 4 で 1 分間変性工程(denaturation)、5 5 で 1 分間のアニーリング工程(annealing)、7 2 で 9 0 秒間の延長工程(extension)の手順を 3 0 回繰り返して反応を行った。P C R 反応液は 1 0 p m o l / μ l 濃度のプライマーを各々 1 μ l ずつ、2.5 単位の T a g 重合酵素(Expand High Fidelity PCR System(Roche、米国))を含んでいた。各々の増幅された P C R 産物を p C R Blunt ベクター(Invitrogen、オランダ)と p C R 2.1 ベクター(Invitrogen、オランダ)にクローニングした。具体的に、C A 遺伝子切片を配列番号 7 と 9 または 7 と 8 のプライマー組合せを用いて増幅し、T M 遺伝子切片は配列番号 1 0 と 1 2 または 1 1 と 1 2 のプライマー組合せを用いて増幅した。増幅された切片を各々 p C R Blunt ベクターに挿入した。一方、配列番号 1 3 および 1 4 のプライマー組合せを用いて増幅された S U - 1 遺伝子切片は p C R 2.1 ベクターに挿入した。

【 0 0 3 2 】これらの各々の遺伝子によって発現されるタンパク質が M B P (maltose binding protein) と融合タンパク質の形態に発現されるか、アミノ - 末端に 1 1 個のアミノ酸(Met-Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Glu-Glu-Met-Gly)からなる T7 標識(Tag)と結合された形態に発現させるために、前記遺伝子を p M A L - c 2 (New England Bio Labs, USA)、p E T - 17 b (Novagen, USA) または p E T - 3 a (Novagen, USA) ベクターに各々再クローニングした。これらの発現ベクターの製作過程を図 2 および 3 に示す。

【 0 0 3 3 】まず、配列番号 7 および 9 のプライマー対を用いて増幅された 7 6 8 b p の C A 切片を p M A L - c 2 の E c o R I / S a l I 位置に挿入して発現ベクター M B P - C A を製作した。配列番号 8 および 9 のプライマー対で増幅された 7 3 4 b p の C A 切片を p E T - 17 b の B a m H I / X h o I 位置に挿入して発現ベクター T 7 - C A を製作した。配列番号 1 0 および 1 2 のプライマー対を用いて増幅された 3 9 6 b p の T M 切片は p M A L - c 2 の E c o R I / S a l I 位置に挿入して発現ベ

クター M B P - T M を製作した。配列番号 1 1 および 1 2 のプライマー対を用いて増幅された 3 6 9 b p の T M 切片は p E T - 17 b の B a m H I / X h o I 位置に挿入して発現ベクター T 7 - T M を製作した。配列番号 1 3 および 1 4 のプライマー対で増幅された 5 9 1 b p の S U - 1 切片は p E T - 3 a の B a m H I 位置に挿入して発現ベクター T 7 - S U - 1 を製作した。前記組換え発現ベクターのうち p E T - 17 b と p E T - 3 a 由来の発現プラスミドは E. coli B L 21 (DE3) に形質転換させた後用いた。

【 0 0 3 4 】前記 T 7 - C A ベクターで形質転換された大腸菌菌株(BL21-T7-p30)と T 7 - T M ベクターで形質転換された大腸菌菌株(BL21-T7-p15E)は 1 9 9 9 年 1 1 月 1 日付で韓国微生物培養センターに寄託し(寄託番号: KCCM-10173 および KCCM-10174)、T 7 - S U - 1 ベクターで形質転換された大腸菌菌株(BL21-T7-gp70)は 2 0 0 0 年 1 1 月 1 0 日付で同センターに寄託した(寄託番号: KCCM-10224)。

【 0 0 3 5 】実施例 2 : 大腸菌において M L V 抗原の発現および精製

M L V G a g または E n v 発現ベクターで形質転換された大腸菌を 600 n m で吸光度が 0.5 に至るまで 1 l の L A 培地(2% バクトトリプトン B, 1% 酵母抽出物, 2% NaCl, 1 × アンピシリン)で 3 7 で振盪培養した。最終濃度が 1 m M になるように 1 M の I P T G (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoid)を加えて G a g の C A、E n v の T M および S U - 1 抗原を各々発現させた。I P T G 誘導前には極めて少量の抗原が発現されたが、I P T G 誘導後には発現水準が全タンパク質の 1 0 ~ 2 0 % 程度に増加した(図 4 a および 4 b 参照)。

【 0 0 3 6 】以後、4、5000 r p m で 1 0 分間遠心分離して細胞を得た。細胞ペレットを溶解緩衝液(lysis buffer; 20 m M Tris, 2 m M EDTA, 1 m M フェニルメチルスルホニルフルオリド, p H 8.0)で完全に溶解した後、溶解物を氷に 2 0 分間静置した。これを 5 分間超音波粉砕して大腸菌を破砕し、さらに遠心分離して菌破砕沈殿物と上澄液を得た。

【0037】pET-17bから発現される抗原の場合、沈殿物を8 Mウレア溶液で溶解した後溶液のpHを5.6に調節し、予め平衡緩衝液(酢酸ナトリウム中8 M ウレア, pH 5.6)で平衡化させたQセファロース高速カラム(Amersham Pharmacia Biotech., スウェーデン)に載せた後、カラムを3倍容積以上の平衡緩衝液で洗浄した。溶出液の吸光度を測定して平衡を確認し、50 mMから500 mMまでNaCl濃度勾配をかけて標的抗原を精製した。pET-3aから発現されるSU-1抗原は、溶液のpHは9.6に調整し、平衡緩衝液として8 Mウレアを含む炭酸溶液(炭酸ナトリウム中8 M ウレア, pH 9.6)を用い、S Pセファロース高速カラム(Amersham Pharmacia Biotech., スウェーデン)を用いたことを除いては、前記と同様の工程で分離する。

【0038】pMAL-c2から発現される抗原の場合、菌破碎沈殿物をアミロース樹脂平衡緩衝液(20 mM Tris-HCl,*

* 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -メルカプトエタノール, pH 7.4)に完全に溶解し、前記緩衝液で平衡化されたアミロース樹脂カラム(NewEngland BioLabs, USA)に菌破碎溶解液を載せた後、カラムを10倍容積の前記平衡緩衝液で洗浄した。標的抗原を溶出緩衝液(平衡緩衝液中10 mMマルトース, pH 7.4)で精製し、溶出液の吸光度を280 nmで測定した。その後、必要に応じて因子XaでMBPを除去して以後の実験に用いた。

【0039】前記工程を通じて分離精製された抗原の純度をSDS-PAGEで確認した。各抗原はカラムクロマトグラフィーで分離した後はほとんど単一バンドとして検出され、精製度が高いことが示された(図5参照)。大腸菌菌株から発現される各々の抗原タンパク質の発現程度を下記表2に示す。

【0040】

【表2】

タンパク質 ベクター	CA	TM	SU-1
pMAL-c2	+++++	+++++	Na ⁺
pET-17b	+++++	+++	+
pET-3a	Na ⁺	Na ⁺	+++++

+の数は生産されたタンパク質の程度を示す。

Na⁺: 適用不可

【0041】pET-17bにクローニングされた591 bpのSU-1切片は前記表に要約したように、その発現量が極めて少なかったため以後の実験には使用しなかった。

【0042】実施例3: M L V抗原による動物の免疫化 30
動物を免疫するための免疫源としてはM L Vウイルスで形質感染された細胞から得られた培養上澄液とMBP-CAからMBP標識を除去して製造されたC A 抗原を用いた。

【0043】M L Vウイルスはヒト腎臓細胞である293 T細胞株に3プラスミド形質感染法(3 plasmid transfection; Yuco et al., Nucleic Acids Res. 23-24, 1995)でpDOAI-CATプラスミドを形質感染させ、48時間後ウイルスを含む上澄液を0.45 μ m膜フィルターで濾過して無細胞ウイルス上澄液を準備した。前記で得られたウイルス上澄液を5週齢のマウス20匹の尾静脈に各々100 μ lずつ2週間4回にわたって注射した。

【0044】C A抗原の場合、前記実施例3で精製されたMBP-CAをプロテアーゼ因子Xaで切断してC Aのみを分離した。これをフロインド完全アジュバント(Freund's complete adjuvant; GibcoBRL, USA)と1:1で混合し、8週齢のウサギ2匹に各々100 μ g/mlの濃度で4週間にわたって3回注射した。

【0045】免疫化が終了後、各実験動物の心臓から採血してM L Vに対する陽性血清を確保し、この血清は精製された抗原とともに以後のウエスタンブロット分析 50

とELISAに用いた。

【0046】実施例4: ウエスタンブロット分析

実施例2で製造されたM L V抗原が実際にM L V抗体に効率的に反応するかどうかを調査するために、C A、T MおよびSU-1抗原と前記実施例3で得られたC AまたはM L Vに対する免疫抗体間の反応の程度をウエスタンブロットで分析した。ヒトがM L Vに感染する場合は極めて稀であり、感染者血液の確保が難しいため、本実験においては実施例3で準備したウサギ抗-C A血清およびマウス抗-M L V血清を用いた。

【0047】精製された抗原はミニゲル装置(#SE280, Hoefer Pharmacia Biotech., 米国)を用いてSDS-PAGEを行った後、ニトロセルロース膜に抗原を電気伝達させた。前記膜を遮断緩衝液(blocking buffer; 5%脱脂油, 0.1% ツイーン 20, トリス緩衝生理食塩水)に浸漬して1時間ゆっくり攪拌し、反応終了後溶液を捨て、各々ウサギ抗-C A血清およびマウス抗-M L V血清を遮断緩衝液で5000倍および500倍希釈して室温で抗原を結合した膜と1時間反応させた。これをTBSTで3回洗浄した後各々西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を結合したヤギ抗-ウサギIgG抗体またはヤギ抗-マウスIgG抗体を遮断緩衝液で10000倍希釈した溶液と室温で30分間反応させた後、同様の方法で膜を3回洗浄した。洗浄が終了後、E C L溶液(Luminol/Enhancer and stable peroxide solution, Amersham)を膜一枚当たり1 mlずつ添加して室温で1分間反応させ、これを暗室で感光フィル

ムに晒した後、現像液を用いてバンドを検出した。

【0048】ウエスタンブロット分析の結果、分離精製された抗原はすべて各抗体に特異的に反応した。Gagの場合には、CAとT7-CA両方とも5000倍に希釈されたウサギ血清と非常に強く反応し、Envタンパク質であるTMまたはSU-1とは反応しなかった(図6a参照)。Envの場合には、マウス抗-MLV血清と反応させたときT7-CAとT7-SU-1のみが反応を示し、これらの中でもSU-1の反応がCAより強く、T7-TMは反応を示さなかった(図6b参照)。

【0049】実施例5：ELISA

ウイルス感染に対する診断は一般的にELISAを用いた抗体分析を通じて行われる。本発明の抗原がRCR検出のためのELISA反応に要求される特異性および感度を有するか確認するために一連の実験を行った。前記実施例2で精製した抗原を各々50mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.6)を用いて5μg/mlの濃度になるように希釈した後、希釈した抗原をウエル当り100μlずつ96ウェルマイクロプレート(Nunc, USA)に添加し、室温で18時間静置した。これに0.5%ウシ血清アルブミン(BS 20 A)を含有するPBS(pH 7.2)をウエル当り100μlずつ添加した。室温で1時間反応させた後、前記プレート*

S/CO	CA	T7-CA	MBP-TM	T7-TM	T7-SU-1
ウサギ抗-CA	4.71	4.75	0.92	0.50	0.69
マウス抗-MLV	3.01	3.18	2.18	1.18	3.82

【0052】ウサギ抗-CA血清に対してCAとT7-CA抗原のいずれにおいてS/CO値が4以上で、陽性として判定されたが、MBP-TM、T7-TMおよびT7-SU-1はS/CO値が1以下で、陰性として判定された。このような結果は前述のウエスタンブロット分析結果とも一致するものであって、本発明に用いられたCA抗原が非常に高い特異性を有することを示すものである。

【0053】マウス抗-MLV血清に対してCAおよびT7-CA抗原とT7-SU-1はS/CO値が3以上であるのに比べて、MBP-TMとT7-TMはS/CO値が1以上2未満であって、抗原性に差異を示した。このような結果に基づいてT7-CAおよびT7-SU-1をELISAシステムに用いる抗原として選択した。

【0054】実施例6：CAおよびSU-1抗原に対するELISA感度調査

前記実施例5の結果から、T7-CAとT7-SU-1抗原はウサギ抗-CA血清およびマウス抗-MLV血清に対して非常に高い反応特異性を示すことが分かる。前記抗原の感度をELISAで分析した。T7-CAおよびT7-SU-1でコーティングされたプレートに2倍数ずつ段階的に希釈した試料を添加し、実施例5と同様の方法でELISAを行った。ウサギ血清の場合、最終濃度が最高64万倍、マウス血清の場合最終濃度が最高2560倍まで段階的に希釈してEL 50

*に血清試料を添加した。この際、ウサギ抗-CAおよびマウス抗-MLV血清を陽性対照群として、正常のウサギまたはマウス血清を陰性対照群として用いた。希釈液(遮断緩衝液中0.25%ツイーン20)に各々1000倍および10倍に希釈した血清をウエル当り100μlずつ添加し、37℃恒温器で1時間培養させた。培養が終了した後、プレートをPBST(PBS中、0.05%ツイーン20)で5回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合されたヤギ抗-ウサギIgG抗体またはヤギ抗-マウスIgG抗体を10000倍希釈してウエル当り100μlずつ添加した。前記プレートを37℃恒温器で30分間反応させ、PBST(PBS中、0.05%ツイーン20)で5回洗浄した後、基質としてTMB(tetramethoxybenzidine)溶液をウエル当り100μlずつ添加して室温で30分間反応させた。その後、0.5NH₂SO₄溶液100μlを添加して反応を終了し、450nmで吸光度を測定した。

【0050】本実験において、ELISA判定基準値は陰性対照群の吸光度値の平均に0.3を加えた値とし、結果をS/CO(sample OD/cutoff value)として示したが、この比率が1を超えたとき陽性として判定した(表3)。

【0051】

【表3】

S/CO	CA	T7-CA	MBP-TM	T7-TM	T7-SU-1
ウサギ抗-CA	4.71	4.75	0.92	0.50	0.69
マウス抗-MLV	3.01	3.18	2.18	1.18	3.82

ISAを行うが、マウス血清の場合RCRに暴露されたヒトの血清と類似する条件にするために初期原液をヒト血清で10倍希釈して用いた。

【0055】各抗原の感度をS/CO値として図7に示す：ウサギ抗-CA血清に対するT7-CA抗原のS/COは図7aに、マウス抗-MLV血清に対するT7-SU-1抗原のS/COは図7bに、そしてT7-CAおよびT7-SU-1のマウス抗-MLV血清に対するS/COは図7cに示す。

【0056】T7-CAは高い感度を示した：T7-CA抗原はウサギ抗-CA血清に対して16万倍希釈した場合までS/CO 3以上の高い感度を示し、対照群である正常のウサギ血清においては図に示すようにS/CO 1未満の陰性反応を示した(図7a参照)。T7-SU-1抗原の場合、正常のマウス血清に対しては陰性反応を示したが、マウス抗-MLV血清に対しては64倍希釈比率までS/CO 4以上の高い陽性反応を示した(図7b参照)。また、T7-CAとT7-SU-1はマウス抗-MLV血清において各々64倍および256倍の希釈比率までS/CO 3以上の陽性反応を示し、これらの二つの抗原を混合して使用した場合にも256倍の希釈比率までS/CO 2以上の高い陽性反応を示した(図7c参照)。前記結果は、CAおよびSU-1抗原は非常に高い感度と特異性を有

するので、遺伝子治療を受けた患者が R C R に暴露されたかどうかを確認するのに効果的に使用できることを示す。

【 0 0 5 7 】 T7-SU-1 抗原の場合、稀釈比率が高くなるほど S / C O 値の減少が T7-CA に比べて緩やかであった。したがって、T7-SU-1 を単一抗原として用いた場合にも安定した M L V 抗体診断用抗原として高い可能性を有することが分かる。

【 0 0 5 8 】 実施例 7 : タンパク質チップを用いた E L I S A

タンパク質チップを用いる場合、多量の試料を短時間で分析することができる。R C R 検出のためにこのようなタンパク質チップの使用可能性を確認すべく、本発明者らは微細配列システムである GMS417 アレイヤー (Genetic Microsystems, USA) を用いて、生成した抗原をスライドガラス(「チップ」)にプリンティングしてタンパク質チップを製作した。

【 0 0 5 9 】 まず、T7-CA、T7-TM および T7-SU-1 抗原を 1 0 0 μ g / m l の濃度で 9 6 ウェルマイクロプレートに分株した後マイクロアレイヤーに装着した。セット当 20
り 4 0 0 スポット (spots/set) ずつ 4 セットを有する 2.5 $\times$ 7.5 cm イズの顕微鏡用スライドガラス (microscope glass slide; Sigma, USA) 上にスポット当り 1 0 p l の抗原を配置 (spotting) した。スライドガラスはアミノアルキルシランでコーティングされたものを使用した。

【 0 0 6 0 】 前記抗原がスポッティングされたスライドガラスを室温で 4 0 分間静置した後、前記スライドガラスを 1 0 0 % エタノールに浸漬してコーティングされた抗原を固定した後、スライドガラスを完全に乾燥した。

【 0 0 6 1 】 各々の抗原について調製されたタンパク質 30
チップを用いて実施例 5 と同様の方法で抗原 - 抗体反応を行った。本実験においては、ウサギ抗 - C A 血清、マウス抗 - M L V 血清および対照群として正常のマウス血清を用いた。一つのチップには単一種類の抗体のみを反

応させた。抗原 - 抗体反応が終わった後、タンパク質チップは高速蛍光スキャン装置である GMS418 配列スキャナー (GMS418 Array Scanner; Genetic MicroSystems, G M200) を用いてスライドガラスに付け加えられた蛍光物質接合性抗 - ウサギまたは抗 - マウス IgG 抗体 (fluorescent conjugate anti-rabbit or anti-mouse IgG; Pierce, USA) から生成した蛍光を検出した。スライドガラスの表面を 5 3 2 nm でフライング 5 3 2 nm でフライングオブジェクトマイクロスコープ (flying objective microscope) で読取り、発現データ解釈ソフトウェアである ImageTM (Genetic Micro Systems, version 2.0) でデータを解釈した (図 8 参照)。

【 0 0 6 2 】 図 8 a はウサギ抗 - C A 血清を用いた実験結果であり、図 8 b および 8 c はマウス抗 - M L V 血清および正常のマウス血清を用いた実験結果である。T7-CA 抗原はウサギ抗 - C A 血清とマウス抗 - M L V 血清のいずれにおいて強い陽性反応を示す反面、T7-TM 抗原はウサギ抗 - C A 血清においては陰性反応を、マウス抗 - M L V 血清においては陽性反応を示したが、T7-CA 抗原に比べて相対的に低い抗原性を示した。T7-SU-1 抗原はウサギ抗 - C A 血清においては陰性反応を、マウス抗 - M L V 血清においては強い陽性反応を示し、実施例 5 および 6 の ELISA 結果と一致することが確認できた。また、正常のマウス血清においては T7-CA、T7-TM および T7-SU-1 抗原のいずれにおいて陰性反応を示した。前記結果から本発明の C A 抗原と SU-1 抗原はタンパク質チップシステムに使用できることを確認した。

【 0 0 6 3 】 国際様式

下記国際寄託機関で定めた規則 7.1 に基づいて発行された原寄託に関する受託証

受領人 : キム スンヨン

300-127 大韓民国ソウル龍山区二村洞ハンガン Apt. 18-30
2

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識： BL21-T7-p30(T7-CA)	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10173
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている： ☐ 科学的性質 ☐ 分類学上の位置 (適用欄に x を表示)	
III.受付および受託	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 11 月 1 日付で受け付けられた。	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物培養センター 住所：120-091 大韓民国ソウル西大門区 弘濟 1 洞 Yurim B/D 361-221	本国際寄託機関の 代表者署名： 日付：1999 年 11 月 8 日

【 0 0 6 4 】特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約
 国際様式
 下記国際寄託機関で定めた規則 7.1 に基づいて発行され

た原寄託に関する受託証
 受領人：キム スンヨン
 300-127 大韓民国ソウル龍山区二村洞ハンガン Apt. 18-30
 2

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識： BL21-T7-p15E(T7-TM)	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10174
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている： ☐ 科学的性質 ☐ 分類学上の位置 (適用欄に x を表示)	
III.受付および受託	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 1999 年 11 月 1 日付で受け付けられた。	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物培養センター 住所：120-221 大韓民国ソウル西大門区 弘濟 1 洞 Yurim B/D 361-091	本国際寄託機関の 代表者署名： 日付：1999 年 11 月 8 日

【 0 0 6 5 】特許手続上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約
 国際様式
 下記国際寄託機関で定めた規則 7.1 に基づいて発行され

た原寄託に関する受託証
 受領人：キム スンヨン
 大韓民国ソウル龍山区二村洞ハンガン Apt. 18-302

I.微生物の表示	
寄託者による識別標識： T7-SU-1(BL21)(pET3a-gp70.1)	国際寄託機関が付与した受託番号： KCCM-10224
II.科学的性質および／または提示された分類学上の位置	
上記 I 欄に表示された微生物には次が添付されている： [] 科学的性質 [] 分類学上の位置 (適用欄に x を表示)	
III.受付および受託	
本国際寄託機関は、上記 I に表示された微生物を受託し、上記微生物は 2000 年 11 月 10 日付で受け付けられた。	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国微生物培養センター 住所：120-221 大韓民国ソウル西大門区 弘濟 1 洞 Yurim B/D 361-091	本国際寄託機関の 代表者署名： 日付：2000 年 11 月 14 日

[図面の簡単な説明]

【図 1】 M L V のゲノム構造と遺伝子産物を示す模式図である。

【図 2】 M L V Gag の p30(CA) または Env の p15E(TM) がマルトース結合タンパク質(maltose binding protein; MBP)と融合した形態に発現され得るように前記タンパク質をコードする DNA を pMAL-c2 ベクターに挿入して組換えプラスミドを製作する過程を示す模式図である。

【図 3】 C A、T M または M L V Env の gp70(SU-1) が各々 T 7 標識と融合した形態に発現され得るように前記タンパク質をコードする DNA を pET-17b または pET-3a ベクターに挿入して組換えプラスミドを製作する過程を示す模式図である。

【図 4a】 大腸菌において IPTG で誘導する前と後の M L V Gag (CA) タンパク質の発現程度を示す SDS-PAGE 写真である。

レイン 1：対照群(pMAL-c2 を IPTG で誘導)
レイン 2 および 3：MBP-CA の IPTG 誘導前および後(70 kDa)

レイン 4 および 5：T7-CA の IPTG 誘導前および後(31 kDa)

【図 4b】 大腸菌において IPTG で誘導する前と後の M L V Env(TM および SU-1) タンパク質の発現程度を示す

DS-PAGE 写真である。

レイン 1：対照群(pMAL-c2 を IPTG で誘導)

レイン 2 および 3：MBP-TM の IPTG 誘導前および後(57 kDa)

レイン 4 および 5：T7-TM の IPTG 誘導前および後(17 kDa)

レイン 6 および 7：T7-SU-1 の IPTG 誘導前および後(24 kDa)

【図 5】 大腸菌において生産された抗原タンパク質を回収した後、カラムクロマトグラフィー(MBP 融合タンパク質の場合アミロース樹脂カラムで、T 7 タグが結合されたタンパク質の場合セファロースカラムで分離)を通じて精製した結果を示すゲル写真である。

【図 6】 レイン 1：プロテアーゼ因子 X a (protease factor Xa) で MBP 部分を除去した C A

レイン 2：T7-CA

レイン 3：MBP-TM

レイン 4：T7-TM

レイン 5：T7-SU-1

【図 6a】 pMAL-c2、pET-17b または pET-3a ベクターから発現された組換えタンパク質 C A、T M および SU-1 をウサギ抗 - C A 血清と反応させたウェスタンブロット分析結果を示す写真である。

レイン 1：C A

レイン 2：T7-CA

レイン 3：MBP-TM

レイン 4：T7-TM

レイン 5：T7-SU-1

【図 6 b】 pET-17bまたはpET-3aベクターから発現された組換えタンパク質 C A、T MおよびSU-1をマウス抗 - M L V血清と反応させたウエスタンブロット分析結果を示す写真である。

レイ ン 1 : T7-CA

レイ ン 2 : T7-TM

レイ ン 3 : T7-SU-1

【図 7 a】 ウサギ抗 - C A血清を陽性対照群、正常のウサギ血清を陰性対照群としてELISAを行った後、T7-CAの反応特異性を S / C O (試料の吸収度と判定基準値の吸光度比率)として示したグラフである。

【図 7 b】 マウス抗 - M L V血清を陽性対照群、正常

のマウス血清を陰性対照群としてELISAを行った後、T7-SU-1の反応特異性を S / C Oとして示したグラフである。

【図 7 c】 マウス抗 - M L V血清を用いてT7-CAおよびT7-SU-1を各々単独でまたは混合してELISA反応を行った後、反応特異性を比較して示したグラフである。

【図 8】 T7-CA、T7-TMおよびT7-SU-1を各々タンパク質チップの形態に製造し、ウサギ抗 - C A血清 (a)、マウス抗 - M L V血清(b)および正常のマウス血清(c)と反応させて反応特異性を調査した結果を示す写真である。

10

SEQUENCE LISTING

<110> KIM, Sun Young

<120> Method for detecting replication competent viruses in the sera of subjects receiving gene therapy

<130> OPF0068/PCT

<150> KR 99-50510

<151> 1999-11-15

<160> 14

<170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 768

<212> DNA

<213> Murine leukemia virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(768)

<223> DNA encoding partial Gag protein, p30 (CA)

<400> 1

gga aac gga cag ctt caa tac tgg ccg ttc tcc tct tct gac ctt tac 48

Gly Asn Gly Gln Leu Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ser Ser Asp Leu Tyr

1 5 10 15

aac tgg aaa aat aat aac cct tct ttt tct gaa gat cca ggt aaa ctg 96

Asn Trp Lys Asn Asn Asn Pro Ser Phe Ser Glu Asp Pro Gly Lys Leu

20 25 30

aca gct ctg atc gag tct gtt ctc atc acc cat cag ccc acc tgg gac 144

Thr Ala Leu Ile Glu Ser Val Leu Ile Thr His Gln Pro Thr Trp Asp

35 40 45

gac tgt cag cag ctg ttg ggg act ctg ctg acc gga gaa gaa aaa caa 192

Asp Cys Gln Gln Leu Leu Gly Thr Leu Leu Thr Gly Glu Glu Lys Gln

50 55 60

cgg	gtg	ctc	tta	gag	gct	aga	aag	cgg	gtg	cgg	ggc	gat	gat	ggg	cgc	240
Arg	Val	Leu	Leu	Glu	Ala	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Gly	Asp	Asp	Gly	Arg	
65					70					75					80	
ccc	act	caa	ctg	ccc	aat	gaa	gtc	gat	gcc	gct	ttt	ccc	ctc	gag	cgc	288
Pro	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Glu	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Arg	
				85					90					95		
cca	gac	tgg	gat	tac	acc	acc	cag	gca	ggg	agg	aac	cac	cta	gtc	cac	336
Pro	Asp	Trp	Asp	Tyr	Thr	Thr	Gln	Ala	Gly	Arg	Asn	His	Leu	Val	His	
		100						105					110			
tat	cgc	cag	ttg	ctc	cta	gcg	ggg	ctc	caa	aac	gcg	ggc	aga	agc	ccc	384
Tyr	Arg	Gln	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Arg	Ser	Pro	
		115					120					125				
acc	aat	ttg	gcc	aag	gta	aaa	gga	ata	aca	caa	ggg	ccc	aat	gag	tct	432
Thr	Asn	Leu	Ala	Lys	Val	Lys	Gly	Ile	Thr	Gln	Gly	Pro	Asn	Glu	Ser	
	130					135					140					
ccc	tgc	gcc	ttc	cta	gag	aga	ctt	aag	gaa	gcc	tat	cgc	agg	tac	act	480
Pro	Ser	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Tyr	Arg	Arg	Tyr	Thr	
145				150					155					160		
ccg	tat	gac	cct	gag	gac	cca	ggg	caa	gaa	act	aat	gtg	tct	atg	tct	528
Pro	Tyr	Asp	Pro	Glu	Asp	Pro	Gly	Gln	Glu	Thr	Asn	Val	Ser	Met	Ser	
			165				170					175				
ttc	att	tgg	cag	tct	gcc	cca	gac	att	ggg	aga	aag	tta	gag	agg	tta	576
Phe	Ile	Trp	Gln	Ser	Ala	Pro	Asp	Ile	Gly	Arg	Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	
		180					185					190				
gaa	gat	tta	aaa	aac	aag	acg	ctt	gga	gat	ttg	gtt	aga	gag	gca	gaa	624
Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Thr	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Glu	Ala	Glu	
		195					200					205				
aag	atc	ttt	aat	aaa	cga	gaa	acc	cgg	gaa	gaa	aga	gag	gaa	cgt	atc	672
Lys	Ile	Phe	Asn	Lys	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	Glu	Glu	Arg	Ile	
	210					215					220					
agg	aga	gaa	aca	gag	gaa	aaa	gaa	gaa	cgc	cgt	agg	aca	gag	gat	gag	720
Arg	Arg	Glu	Thr	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Arg	Arg	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	
225				230					235						240	

cag aaa gag aaa gaa aga gat cgt agg aga cat aga gag atg agc taa
 Gln Lys Glu Lys Glu Arg Asp Arg Arg Arg His Arg Glu Met Ser ***
 245 250 255

768

<210> 2
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Murine leukemia virus

<400> 2
 Gly Asn Gly Gln Leu Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ser Ser Asp Leu Tyr
 1 5 10 15
 Asn Trp Lys Asn Asn Asn Pro Ser Phe Ser Glu Asp Pro Gly Lys Leu
 20 25 30
 Thr Ala Leu Ile Glu Ser Val Leu Ile Thr His Gln Pro Thr Trp Asp
 35 40 45
 Asp Cys Gln Gln Leu Leu Gly Thr Leu Leu Thr Gly Glu Glu Lys Gln
 50 55 60
 Arg Val Leu Leu Glu Ala Arg Lys Ala Val Arg Gly Asp Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Pro Thr Gln Leu Pro Asn Glu Val Asp Ala Ala Phe Pro Leu Glu Arg
 85 90 95
 Pro Asp Trp Asp Tyr Thr Thr Gln Ala Gly Arg Asn His Leu Val His
 100 105 110
 Tyr Arg Gln Leu Leu Leu Ala Gly Leu Gln Asn Ala Gly Arg Ser Pro
 115 120 125
 Thr Asn Leu Ala Lys Val Lys Gly Ile Thr Gln Gly Pro Asn Glu Ser
 130 135 140
 Pro Ser Ala Phe Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Arg Tyr Thr
 145 150 155 160
 Pro Tyr Asp Pro Glu Asp Pro Gly Gln Glu Thr Asn Val Ser Met Ser
 165 170 175

Phe Ile Trp Gln Ser Ala Pro Asp Ile Gly Arg Lys Leu Glu Arg Leu
 180 185 190
 Glu Asp Leu Lys Asn Lys Thr Leu Gly Asp Leu Val Arg Glu Ala Glu
 195 200 205
 Lys Ile Phe Asn Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg Ile
 210 215 220
 Arg Arg Glu Thr Glu Glu Lys Glu Glu Arg Arg Arg Thr Glu Asp Glu
 225 230 235 240
 Gln Lys Glu Lys Glu Arg Asp Arg Arg Arg His Arg Glu Met Ser ***
 245 250 255

<210> 3
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> Murine leukemia virus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(396)
 <223> DNA encoding partial Env protein, p15E (TM)

<400> 3
 gaa ccg gtg tcg tta acc ctg gcc cta tta ttg ggt gga cta acc atg 48
 Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr Met
 1 5 10 15
 ggg gga att gcc gct gga ata gga aca ggg act act gct cta atg gcc 96
 Gly Gly Ile Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Met Ala
 20 25 30
 act cag caa ttc cag cag ctc caa gcc gca gta cag gat gat ctc agg 144
 Thr Gln Gln Phe Gln Gln Leu Gln Ala Ala Val Gln Asp Asp Leu Arg
 35 40 45
 gag gtt gaa aaa tca atc tct aac cta gaa aag tct ctc act tcc ctg 192
 Glu Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu
 50 55 60

tct gaa gtt gtc cta cag aat cga agg ggc cta gac ttg tta ttt cta 240
 Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu
 65 70 75 80

aaa gaa gga ggg ctg tgt gct gct cta aaa gaa gaa tgt tgc ttc tat 288
 Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr
 85 90 95

gcg gac cac aca gga cta gtg aga gac agc atg gcc aaa ttg aga gag 336
 Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met Ala Lys Leu Arg Glu
 100 105 110

agg ctt aat cag aga cag aaa ctg ttt gag tca act caa gga tgg ttt 384
 Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Ser Thr Gln Gly Trp Phe
 115 120 125

gag gga ctg taa 396
 Glu Gly Leu ***
 130

<210> 4
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Murine leukemia virus

<400> 4
 Glu Pro Val Ser Leu Thr Leu Ala Leu Leu Gly Gly Leu Thr Met
 1 5 10 15

Gly Gly Ile Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr Thr Ala Leu Met Ala
 20 25 30

Thr Gln Gln Phe Gln Gln Leu Gln Ala Ala Val Gln Asp Asp Leu Arg
 35 40 45

Glu Val Glu Lys Ser Ile Ser Asn Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu
 50 55 60

Ser Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Glu Gly Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr
 85 90 95

Ala Asp His Thr Gly Leu Val Arg Asp Ser Met Ala Lys Leu Arg Glu
 100 105 110

Arg Leu Asn Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Ser Thr Gln Gly Trp Phe
 115 120 125

Glu Gly Leu ***
 130

<210> 5
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> Murine leukemia virus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(591)
 <223> DNA encoding partial Env protein, gp70 (SU-1)

<400> 5
 agc ccc cat cag gtc ttt aat gta acc tgg aga gtc acc aac ctg atg 48
 Ser Pro His Gln Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu Met
 1 5 10 15

act ggg cgt acc gcc aat gcc acc tcc ctc ctg gga act gta caa gat 96
 Thr Gly Arg Thr Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln Asp
 20 25 30

gcc ttc cca aaa tta tat ttt gat cta tgt gat ctg gtc gga gag gag 144
 Ala Phe Pro Lys Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu Glu
 35 40 45

tgg gac cct tca gac cag gaa ccg tat gtc ggg tat ggc tgc aag tac 192
 Trp Asp Pro Ser Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys Tyr
 50 55 60

ccc gca ggg aga cag cgg acc cgg act ttt gac ttt tac gtg tgc cct 240
 Pro Ala Gly Arg Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys Pro
 65 70 75 80

ggg cat acc gta aag tgg ggg tgt ggg gga cca gga gag ggc tac tgt 288
 Gly His Thr Val Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Cys

85	90	95	
ggt aaa tgg ggg tgt gaa acc acc gga cag gct tac tgg aag ccc aca			336
Gly Lys Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Gln Ala Tyr Trp Lys Pro Thr			
100	105	110	
tca tgg tgg gac cta atc tcc ctt aag cgc ggt aac acc ccc tgg gac			384
Ser Ser Trp Asp Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp Asp			
115	120	125	
acg gga tgc tct aaa gtt gcc tgt ggc ccc tgc tac gac ctc tcc aaa			432
Thr Gly Cys Ser Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser Lys			
130	135	140	
gta tcc aat tcc ttc caa ggg gct act cga ggg ggc aga tgc aac cct			480
Val Ser Asn Ser Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn Pro			
145	150	155	160
cta gtc cta gaa ttc act gat gca gga aaa aag gct aac tgg gac ggg			528
Leu Val Leu Glu Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp Gly			
165	170	175	
ccc aaa tgg tgg gga ctg aga ctg tac cgg aca gga aca gat cct att			576
Pro Lys Ser Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro Ile			
180	185	190	
acc atg ttc tcc ctg			591
Thr Met Phe Ser Leu			
195			
<210> 6			
<211> 197			
<212> PRT			
<213> Murine leukemia virus			
<400> 6			
Ser Pro His Gln Val Phe Asn Val Thr Trp Arg Val Thr Asn Leu Met			
1	5	10	15
Thr Gly Arg Thr Ala Asn Ala Thr Ser Leu Leu Gly Thr Val Gln Asp			
20	25	30	
Ala Phe Pro Lys Leu Tyr Phe Asp Leu Cys Asp Leu Val Gly Glu Glu			

35 40 45
 Trp Asp Pro Ser Asp Gln Glu Pro Tyr Val Gly Tyr Gly Cys Lys Tyr
 50 55 60
 Pro Ala Gly Arg Gln Arg Thr Arg Thr Phe Asp Phe Tyr Val Cys Pro
 65 70 75 80
 Gly His Thr Val Lys Ser Gly Cys Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Lys Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Gln Ala Tyr Trp Lys Pro Thr
 100 105 110
 Ser Ser Trp Asp Leu Ile Ser Leu Lys Arg Gly Asn Thr Pro Trp Asp
 115 120 125
 Thr Gly Cys Ser Lys Val Ala Cys Gly Pro Cys Tyr Asp Leu Ser Lys
 130 135 140
 Val Ser Asn Ser Phe Gln Gly Ala Thr Arg Gly Gly Arg Cys Asn Pro
 145 150 155 160
 Leu Val Leu Glu Phe Thr Asp Ala Gly Lys Lys Ala Asn Trp Asp Gly
 165 170 175
 Pro Lys Ser Trp Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Thr Asp Pro Ile
 180 185 190
 Thr Met Phe Ser Leu
 195

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> EcoRI-tagged 5' primer for PCR of CA

<400> 7
 gaattcggaa acggacagct t

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BamHI-tagged 5' primer for PCR of CA

<400> 8
 ggatccggttc tctcttct

19

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sall-tagged 3' primer for PCR of CA

<400> 9
 gtgacttag ctcctctctc tctatg

26

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> EcoRI-tagged 5' primer for PCR of TM

<400> 10
 gaattcgaac cgggtcgtt aacc

24

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BamHI-tagged 5' primer for PCR of TM

<400> 11
ggatccgcta ttattgggtg ga

22

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SalI-tagged 3' primer for PCR of TM

<400> 12
gtcgacttac agtccctcaa acca

24

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BamHI-tagged 5' primer for PCR of SU-1

<400> 13
ggatccagcc cccatcaggt cttt

24

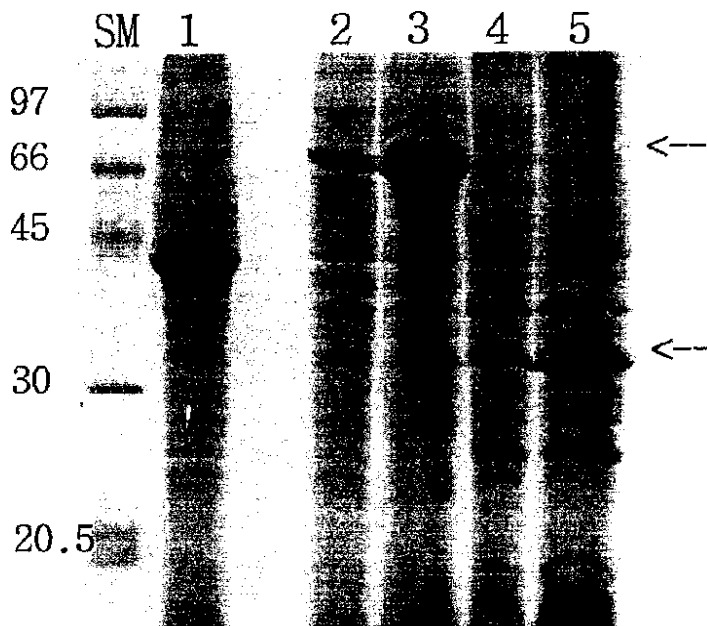
<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BamHI-tagged 3' primer for PCR of SU-1

<400> 14
ggatcccttac aggagaaca tggt

24

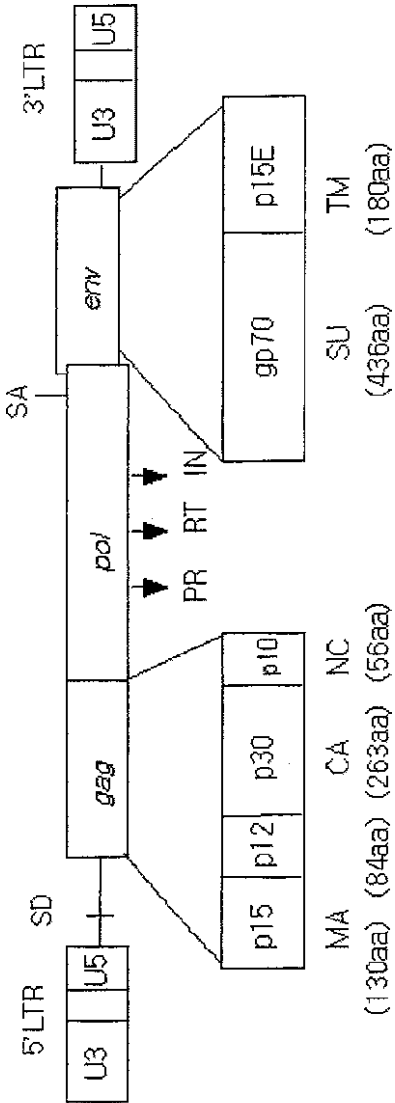
【図 4 a】



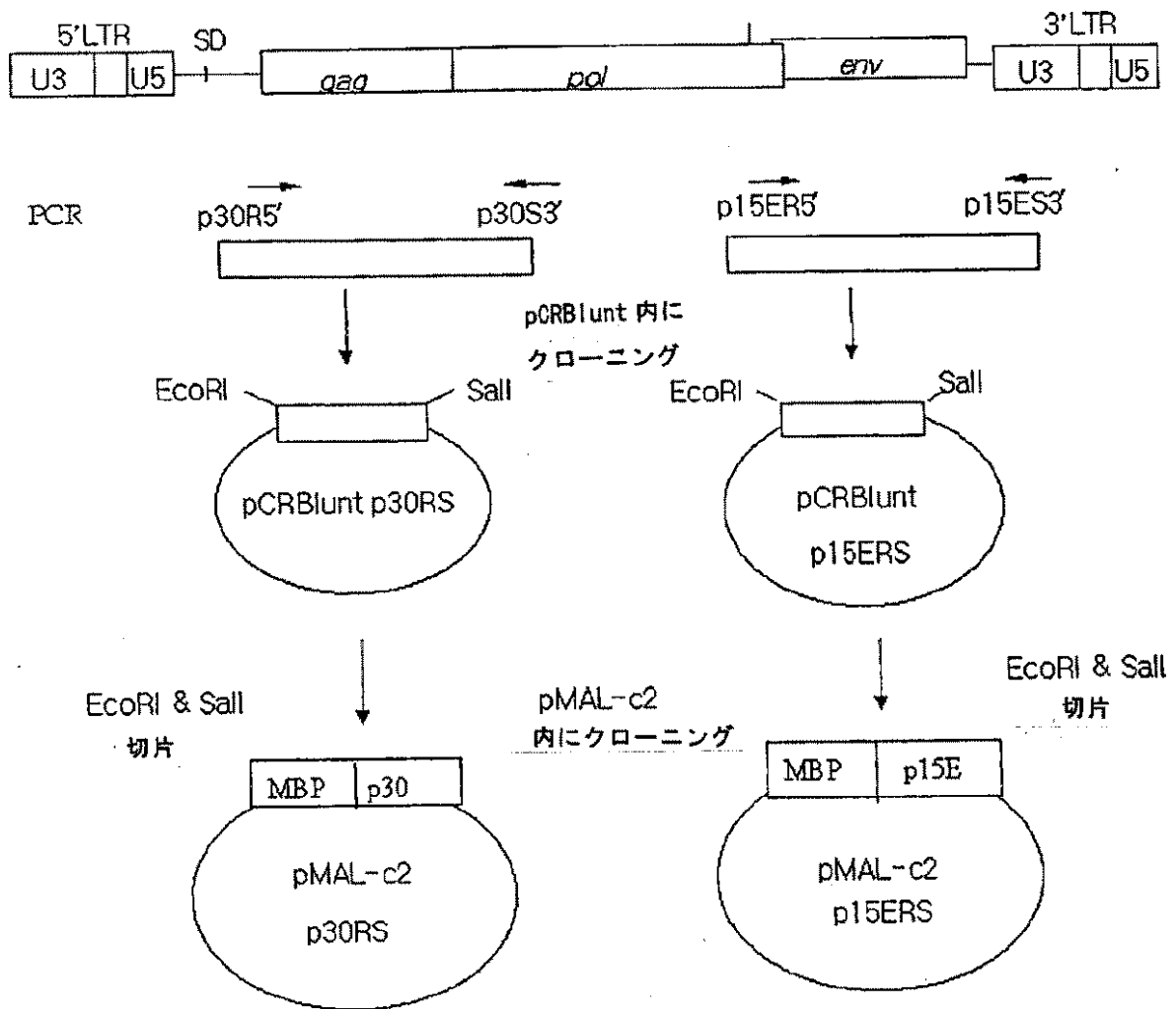
【図 6 a】



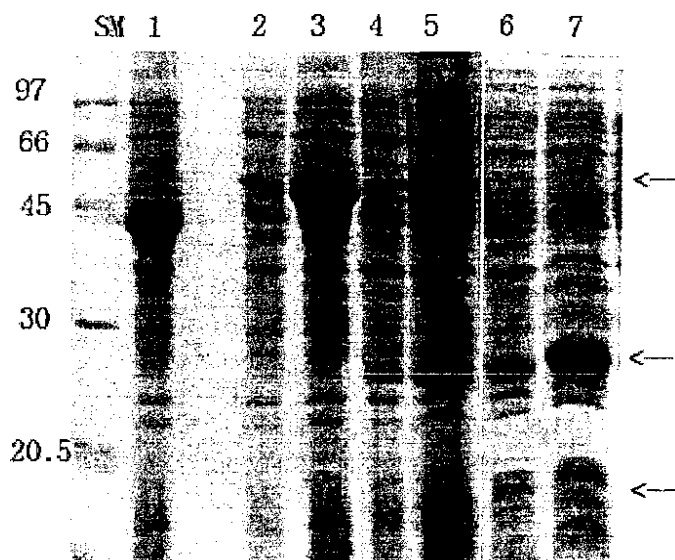
【図 1】



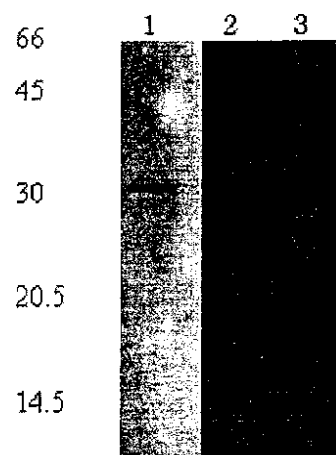
【図 2】



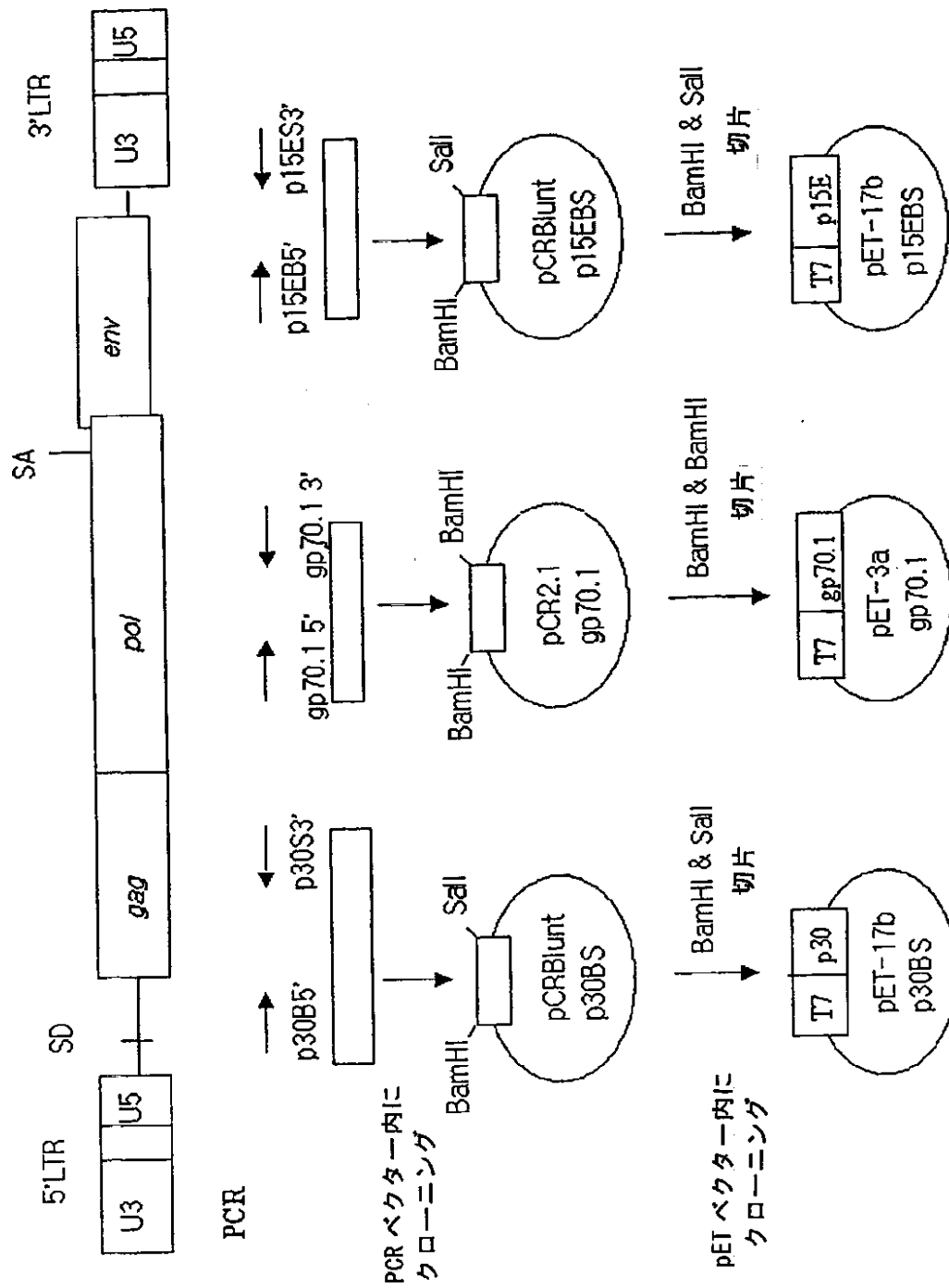
【図 4 b】



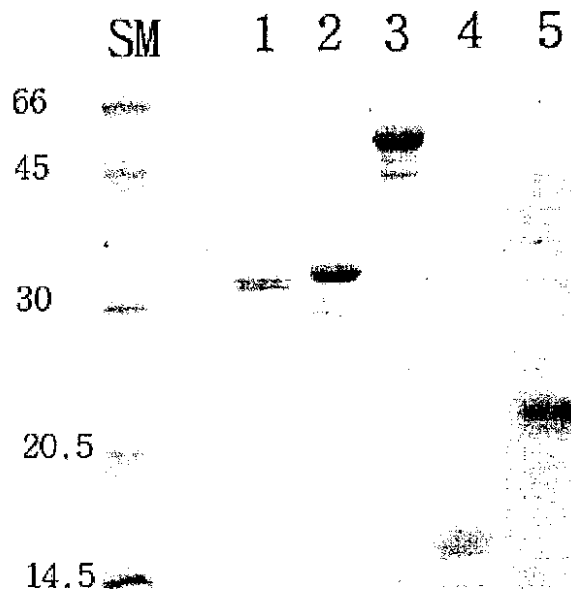
【図 6 b】



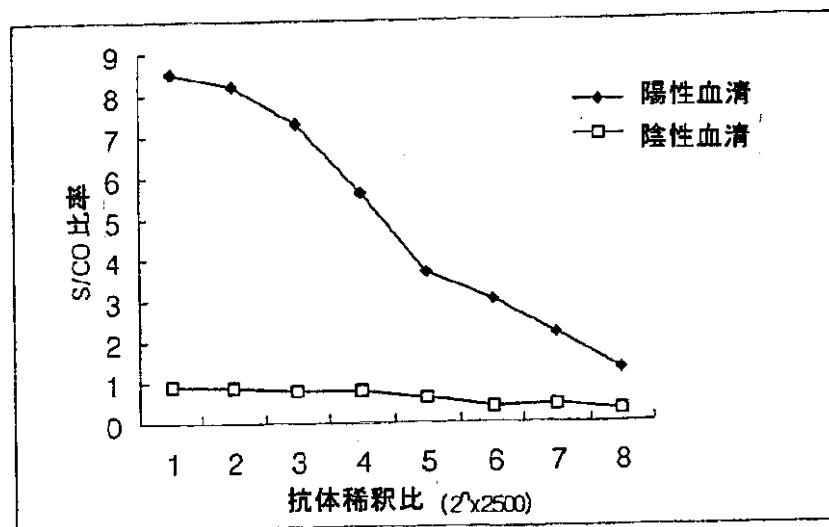
【図 3】



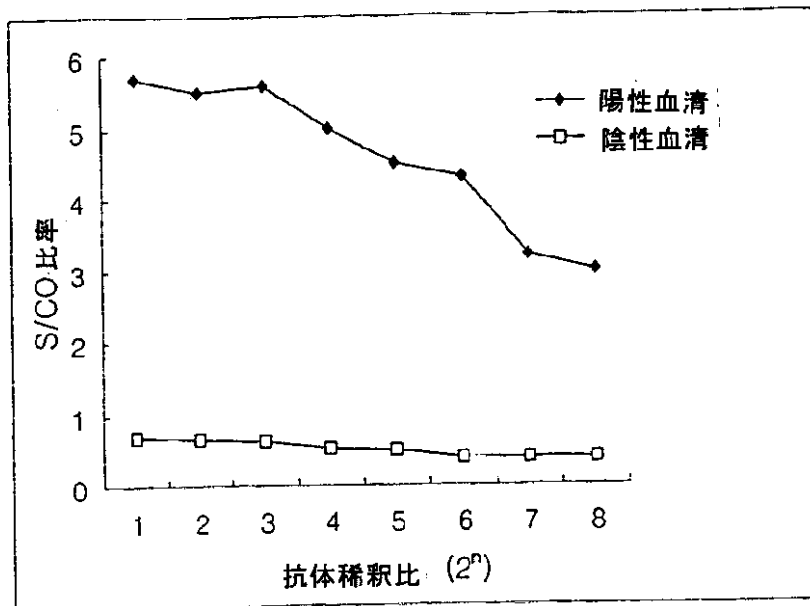
【図 5】



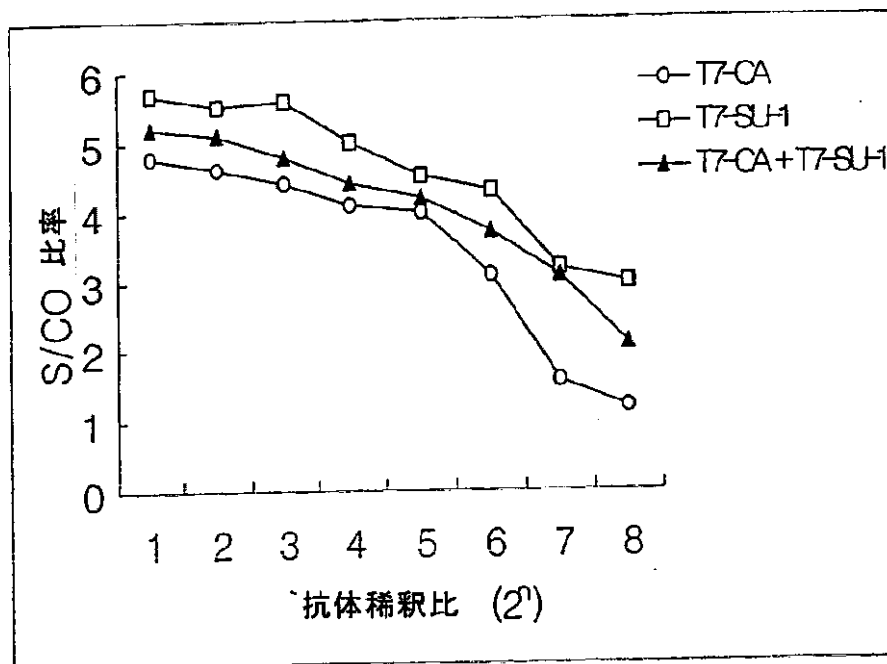
【図 7 a】



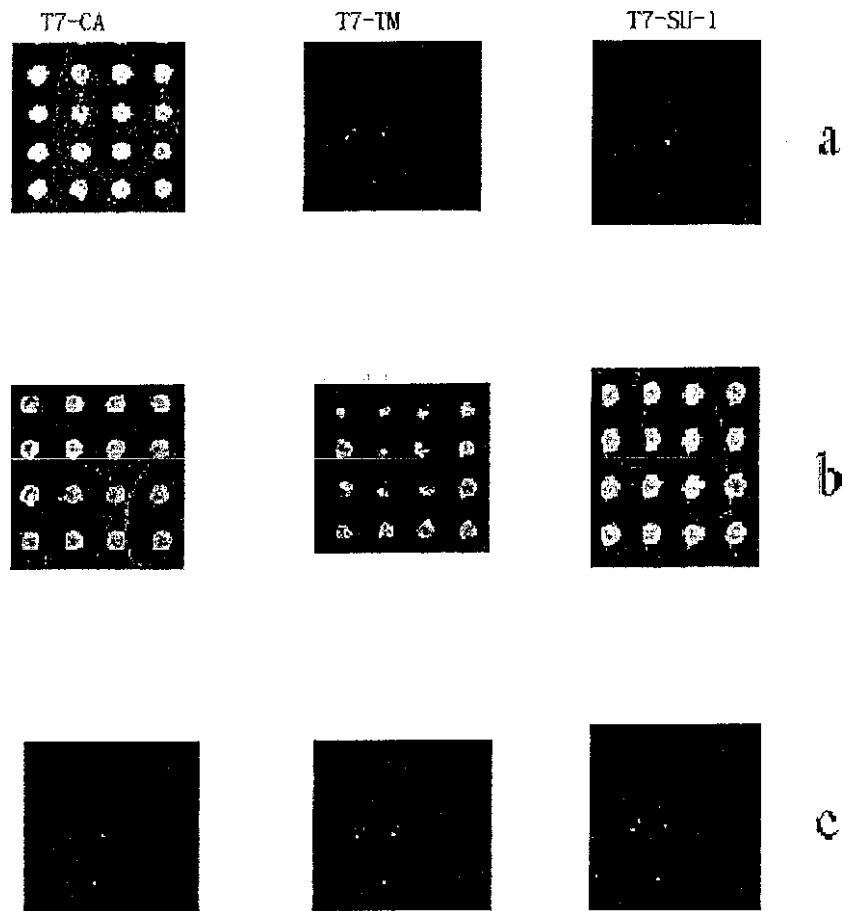
【図 7 b】



【図 7 c】



【図 8】



 フロントページの続き

(72)発明者 パク・オンジン
 大韓民国150 - 044ソウル、ヨンドンボ
 ク、ダンサンドン 4 ガ30 - 1 番、ダンサ
 ン・ヒュンデ・ 5 アパートメント502 -
 802

(72)発明者 ナ・ヨンソン
 大韓民国122 - 020ソウル、オンピョン
 ク、ノクボンドン118 - 3 番

(72)発明者 ユ・ソンシン
 大韓民国138 - 151ソウル、ソンパク、オ
 リュンドン、オリンピック・ソンスチョ
 ン・アパートメント123 - 103

(56)参考文献 Hum Gene Ther, Vo
 1 . 9 , No . 8 (1998) p . 1165 -
 1172

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)

G01N 33/53

C12Q 1/70

BIOSIS (D I A L O G)

W P I (D I A L O G)

专利名称(译)	检测接受基因治疗的患者血清中是否存在针对鼠白血病病毒的抗体的方法		
公开(公告)号	JP3445984B2	公开(公告)日	2003-09-16
申请号	JP2001538565	申请日	2000-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	DIACHIP		
申请(专利权)人(译)	迪亚芯片有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Bairomeddo有限公司		
[标]发明人	キムスンヨン パクオンジン ナヨンソン ユソンシン		
发明人	キム・スンヨン パク・オンジン ナ・ヨンソン ユ・ソンシン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/10 C12N15/09 C12Q1/70 G01N33/569		
CPC分类号	C07K16/1036		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/569.H C12N15/00.A		
优先权	1019990050510 1999-11-15 KR		
其他公开文献	JP2003515113A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种从经历过基因治疗的患者血清中检测复制能力病毒 (RCV) 的方法，该方法包括使用特异性抗原在血清中检测抗逆转录病毒抗体的步骤。包括。 尽管本发明的抗原基因在用于基因治疗的病毒载体中不存在，但是它存在于衍生病毒载体的病毒基因组中，并且它是鼠白血病病毒 (MLV) 的Gag蛋白的一部分和Env蛋白之一。 它优选地选自自由零件组成的组。 本发明还提供了具有SEQ ID NO：2或SEQ ID NO：6的氨基酸序列的抗原，就特异性和敏感性而言，其对于检测免疫应答基础的RCR非常有用。

9 (5) 10

に示す。

【表1】

標的遺伝子	方向	制限酵素	配列番号
CA	5'プライマー	EcoR I	7
		BamH I	8
	3'プライマー	Sal I	9
TM	5'プライマー	EcoR I	10
		BamH I	11
	3'プライマー	Sal I	12
SU-1	5'プライマー	BamH I	13
	3'プライマー	BamH I	14