

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-258128

(P2009-258128A)

(43) 公開日 平成21年11月5日(2009.11.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/576 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/576 Z	4 B O 2 4
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 N	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2009-180971 (P2009-180971)	(71) 出願人	591076811
(22) 出願日	平成21年8月3日 (2009.8.3)		ノバルティス バクシンズ アンド ダイ
(62) 分割の表示	特願2004-534744 (P2004-534744)		アグノスティックス、インコーポレーテッ
原出願日	平成15年9月8日 (2003.9.8)		ド
(31) 優先権主張番号	60/409,515		アメリカ合衆国、カリフォルニア 946
(32) 優先日	平成14年9月9日 (2002.9.9)		08, エミリービル, ホートン ストリー
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCVアッセイ

(57) 【要約】

【課題】適切な患者のケアを提供するためならびに血液および血液産物によるHCVの伝播、あるいは近密な個人的接触によるHCVの伝播予防にとって、感度の良い正確な診断ツールおよび予後診断ツールを提供すること。

【解決手段】HCV抗原/抗体/抗原アッセイが提供される。このアッセイは、HCVポリタンパク質のある領域から単離した第1の抗原と、HCV複数エピトープ融合抗原を使用する。HCV複数エピトープ融合抗原は、第1の抗原としてポリタンパク質の同じ領域からのエピトープを含む。第1の抗原および複数エピトープ融合抗原はHCV感染サンプルに存在する抗体に結合する。本発明は、HCVポリタンパク質に由来する最初の抗原のHCVポリタンパク質の同じ領域からのエピトープを最初の抗原として含む複数エピトープ融合抗原と組み合わせた使用がHCVの検出にとって感度が高くかつ信頼度の高い方法を提供するという所見に部分的に基づく。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

本明細書中に記載の発明。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、一般にウイルスの診断に属する。特に本発明は、C型肝炎ウイルスポリタンパク質の領域に由来する最初に単離された抗原およびHCVポリタンパク質からの複数のエピトープを含有する複数エピトープ融合抗原を利用する抗原/抗体/抗原サンドウィッチアッセイに関連し、本複合エピトープは、C型肝炎ウイルス感染を正確に診断するために、複合タンパク質の同領域からの最初の抗原として1以上のエピトープを含有する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

## (発明の背景)

C型肝炎ウイルス(HCV)は、主に輸血および性的接触を通じて伝染する非経口感染の非A、非B肝炎(NANBH)の主要原因である。本ウイルスは、血液提供者中の0.4~2.0%に存在する。感染の約50%については慢性肝炎を発症し、そのうちの感染個体の約20%については時々肝細胞癌をもたらす肝硬変を発症する。したがって、本疾患の研究および管理は、医学的に重要である。

## 【0003】

HCVは、Houghtenらによって初めてNANBHの原因として同定され、特徴づけられた。HCVのウイルスゲノム配列は公知である。例えば、国際公開番号WO89/04669;WO90/11089;およびWO90/14436を参照。HCVは、9.5kbのポジティブ-センス一本鎖RNAゲノムを有し、ウイルスのFlaviridae科の一員である。系統発生論解析に基づき、少なくとも6つの、異なるが関連する遺伝子型の、HCVが同定された(Simmondsら, J. Gen. Virol. (1993) 74:2391-2399)。本ウイルスは、3000を超えるアミノ酸残基を有する一つのポリタンパク質をコードする(Chooら, Science (1989) 244:359-362; Chooら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455; Hanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711-1715)。ポリタンパク質は、転写に伴ってかあるいは転写後に、構造タンパク質および非構造タンパク質(NS)の両方にプロセスされる。

20

30

## 【0004】

特に、図1で示されるように、いくつかのタンパク質が、HCVゲノムによってコードされる。HCVポリタンパク質の切断生成物の順序および命名は以下の通りである: NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。ポリタンパク質の最初の切断は、N末端ヌクレオカプシドタンパク質(「コア」と呼ばれる)および2つのエンベロープ糖タンパク質であるAE1( Eとしてもまた公知である)およびAE2( E2/NS1としてもまた公知である)の3つの構造タンパク質、ならびにウイルス酵素を含む非構造(NS)タンパク質を遊離する、宿主のプロテアーゼにより触媒される。NS領域は、NS2、NS3、NS4およびNS5と名づけられている。NS2は、タンパク質分解活性を有する内在性膜タンパク質であり、そして、NS3と結合して、NS2-NS3 *sis*le結合を切断し(言い換えると、NS3のN末端を生じ)、さらにセリンプロテアーゼ活性およびRNAヘリカーゼ活性の両方を含む大きなポリタンパク質を遊離する。NS3プロテアーゼは、残存するポリタンパク質をプロセスするために役立つ。これらの反応において、NS3はNS3補助因子(NS4a)、2つのタンパク質(NS4bおよびNS5a)、およびRNA-依存性RNAポリメラーゼ(NS5b)を遊離する。ポリタンパク質成熟の完了は、NS3-NS4a接合点において自動触媒的に切断されることにより開始され、NS3セリンプロテアーゼ

40

50

により触媒される。

【0005】

HCVポリタンパク質に由来する、HCVのための免疫学的および診断的な試薬として有用な多くの一般的なポリペプチドおよび特異的なポリペプチドが記載されている。例えば、Houghtonら, 欧州特許公報第318, 216号および同第388, 232号; Chooら, Science (1989) 244: 359 - 362; Kuoら, Science (1989) 244: 362 - 364; Houghtonら, Hepatology (1991) 14: 381 - 388; Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011 - 10015; Chienら, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33 - 39; Chienら, 国際公開番号WO93/00365; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778を参照。これらの公報および公開は、一般的にHCVについて、ならびにHCVポリペプチドの免疫学的な試薬の製造および使用について、広範な背景を提供する。

10

【0006】

HCV保有者およびHCV汚染血液あるいはHCV汚染血液産物をスクリーニングおよび同定するための感度の良く特異性の高い方法は、医薬品に対して重要な進歩を提供する。輸血後肝炎(PTH)は、約10%の輸血された患者で発症し、そしてHCVは、これらの症例の90%にのぼる原因である。患者のケアならびに血液および血液産物によるHCVの伝播、または近密な個人的接触によるHCVの伝播予防にとって、信頼度の高い診断および予後診断のツールが必要である。従って、いくつかのアッセイがHCV感染の血清診断のために開発されている。例えば、Chooら, Science (1989) 244: 359 - 362; Kuoら, Science (1989) 244: 362 - 364; Chooら, Br. Med. Bull. (1990) 46: 423 - 441; Ebelingら, Lancet (1990) 335: 982 - 983; van der Poelら, Lancet (1990) 335: 558 - 560; van der Poelら, Lancet (1991) 337: 317 - 319; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778; Valenzuelaら, 国際公開番号WO97/44469; およびKashiwakumaraら, 米国特許第5, 871, 904号を参照。

20

血清ベースのいくつかのアッセイで遭遇する重大な問題は、本ウイルスの感染と検出との間に、しばしば80日を越える顕著な間隙があることである。このアッセイ間隙は、輸血レシピエントに対して多大な危険を引き起こし得る。この問題を克服するために、ウイルスRNAを直接的に検出する核酸ベースの検査(NAT)、および抗体反応の代わりにウイルスの抗原をアッセイするHCVコア抗原検査が開発されている。例えば、Kashiwakumaraら, 米国特許第5, 871, 904号(特許文献1); Beldら, Transfusion (2000) 40: 575 - 579(非特許文献1)を参照。

30

しかしながら、適切な患者のケアを提供するためならびに血液および血液産物によるHCVの伝播、あるいは近密な個人的接触によるHCVの伝播予防にとって、感度の良い正確な診断ツールおよび予後診断ツールの必要性が残されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0007】

【特許文献1】米国特許第5, 871, 904号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Beldら, Transfusion (2000) 40: 575 - 579

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

50

本発明は、H C Vポリタンパク質に由来する最初の抗原の、H C Vポリタンパク質の同じ領域からのエピトープを最初の抗原として含む複数エピトープ融合抗原と組み合わせた使用が、H C Vの検出にとって感度が高くかつ信頼度の高い方法を提供するという所見に、部分的に基づく。本明細書中に記載される本アッセイは、H C Vの6つの公知の遺伝子型のいずれかにより引き起こされるH C V感染を検出し得る。本発明の代表的な実施形態の1つにおいて、第1の抗原は、N S 3 / 4 aコンフォメーションエピトープを含み、そして第2の抗原は、N S 3 / 4 a領域からの1つ以上のエピトープを含む複数エピトープ融合抗原である。複合エピトープ融合タンパク質の使用は、基質の単位領域上の非常に多数のエピトープの提供および選択性の改善により、マスキング ( m a s k i n g ) の問題を減少させ、感度を改善し、抗体を検出する。さらに、本明細書中に記載されるアッセイは迅速に行われ得、かつ、より多くのサンプル容量がバックグラウンド効果なしに使用され得る。

10

#### 【0010】

したがって、1つの実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルス ( H C V ) 感染を検出する方法に関連する。本方法は、以下：

( a ) イムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、この固体支持体は、この固体支持体に結合するH C V抗原を含み、ここでこのH C V抗原は、H C Vポリタンパク質の最初の領域からの1つ以上の単離された抗原からなる、工程；

( b ) 生物学的サンプル中に存在する場合、H C V抗体を1つ以上のH C V抗原に結合させる条件下で、生物学的サンプルと上記固体支持体を結合させる工程；

20

( c ) 複合体形成条件下において、検出可能に標識化されたH C Vの複数エピトープ融合抗原 ( M E F A ) を、工程 ( b ) からの上記固体支持体に加える工程であって、ここで、この標識されたM E F Aは、1つ以上の単離された抗原として、H C Vポリタンパク質の同じ領域からの少なくとも1つのエピトープを含み、ここで、このM E F Aは、結合H C V抗体に結合する、工程；

( d ) H C V抗体と、H C Vポリタンパク質の第1の領域からの1つ以上の抗原および上記M E F Aとの間で形成される複合体が存在する場合、これを、生物学的サンプル中でH C V感染の指標として検出する工程；

を包含する。

#### 【0011】

別の実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中でH C V感染を検出する方法に属する。本方法は、以下：

( a ) イムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、この固体支持体は、この固体支持体に結合するH C V抗原を含み、このH C V抗原は、1つ以上の複数エピトープ融合抗原 ( M E F A ) からなる、工程；

( b ) 生物学的サンプル中に存在する場合、H C V抗体を1つ以上のM E F Aに結合させる条件下で、生物学的サンプルを上記固体支持体と結合させる工程；

( c ) 複合体形成条件下において、1つ以上のM E F Aに存在するH C Vポリタンパク質の領域からの検出可能に標識化された単離されたH C V抗原を、工程 ( b ) からの上記固体支持体に加える工程であって、ここで、この単離された抗原は、結合H C V抗体に結合する、工程；

40

( d ) H C V抗体と、単離されたH C V抗原および上記M E F Aとの間で形成される複合体が存在する場合、これを、生物学的サンプル中でH C V感染の指標として検出する工程；

を包含する。

#### 【0012】

なおさらなる実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中でH C V感染を検出する方法に属する。本方法は、以下：

( a ) イムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、この固体支持体は、この固体支持体に結合するH C V抗原を含み、このH C V抗原は、1つ以上の単離されたH C V

50

NS3/4 a コンフォメーションナルエピトープからなる工程；

(b) 生物学的サンプル中に存在する場合、HCV抗体が1つ以上のNS3/4 a エピトープに結合することが可能である条件下で、生物学的サンプルを上記固体支持体と結合させる工程；

(c) 複合体形成条件下において、検出可能に標識化されたHCV複数エピトープ融合抗原(MEFA)を、工程(b)からの上記固体支持体に加える工程であって、ここで、この標識されたMEFAは、HCV NS3/4 a領域からの少なくとも1つのエピトープを含み、ここで、このMEFAは、結合HCV抗体に結合する、工程；

(d) HCV抗体と、上記NS3/4 a コンフォメーションナルエピトープおよび上記MEFAとの間で形成される複合体が存在する場合、これを、生物学的サンプル中でHCV感染の指標として検出する工程；  
を包含する。

10

#### 【0013】

別の実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中でHCV感染を検出する方法に属する。本方法は、以下：

(a) イムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、この固体支持体は、この固体支持体に結合するHCV抗原を含み、ここで、このHCV抗原は、1つ以上の複数エピトープ融合抗原(MEFA)からなり、ここで、1つ以上のMEFAは、HCV NS3/4 a領域からの少なくとも1つのエピトープを含む、工程；

(b) 生物学的サンプル中に存在する場合、HCV抗体が1つ以上のMEFAに結合することが可能である条件下で、生物学的サンプルを上記固体支持と結合させる工程；

20

(c) 複合体形成条件下において、検出可能に標識化されたHCV NS3/4 a コンフォメーションナルエピトープを、工程(b)からの上記固体支持体に加える工程であって、ここで、このNS3/4 a コンフォメーションナルエピトープは、結合HCV抗体に結合する、工程；

(d) HCV抗体および上記NS3/4 a コンフォメーションナルエピトープおよび上記MEFAとの間で形成される複合体が存在する場合、これを、生物学的サンプル中でHCV感染の指標として検出する工程；  
を包含する。

#### 【0014】

30

上述の方法において、NS3/4 a コンフォメーションナルエピトープおよび/またはMEFAは、HCVポリタンパク質のNS3/4 a プロテアーゼ領域からの1つのエピトープ、および/またはHCVポリタンパク質のNS3/4 a ヘリカーゼ領域からの1つのエピトープを含む。特定の実施形態において、NS3/4 a コンフォメーションナルエピトープは、図3A～図3D(配列番号1および配列番号2)に示されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0015】

さらなる実施形態において、MEFAは、HCV-1の配列に対して番号付けされたアミノ酸1193～1657を含む。なお、さらなる実施形態において、MEFAは、HCV-1に対して番号付けされたアミノ酸1211～1457および/またはアミノ酸1192～1457のような、HCVポリタンパク質のc33c領域からの1つのエピトープを含む。

40

#### 【0016】

さらなる実施形態において、MEFAは、HCV-1に対して番号付けされたアミノ酸1689～1735のようなHCVポリタンパク質の5-1-1領域からの1つのエピトープを含む。

#### 【0017】

特定の実施形態において、MEFAは、図6A～図6F(配列番号3および配列番号4)に示されたアミノ酸配列または図8A～図8F(配列番号5および配列番号6)に示されたアミノ酸配列を含む。

本発明はまた、以下の項目を提供する。

50

(項目1)

生物学的サンプルにおけるC型肝炎ウイルス(HCV)感染を検出する方法であって、該方法は、以下の(a)~(d)：

(a) 結合したHCV抗原を備えるイムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、ここで、該HCV抗原は、HCVポリタンパク質の第1の領域から単離した1以上の抗原からなる、イムノアッセイ固体支持体を提供する工程；

(b) 生物学的サンプルを、(該生物学的サンプル中に存在する場合に)HCV抗体が該1以上のHCV抗原に結合することを可能にする条件下で該固体支持体と組み合わせる工程；

(c) 検出可能であるように標識されたHCV複数エピトープ融合抗原(MEFA)を、複合体形成条件下で、工程(b)の固体支持体へと添加する工程であって、ここで、該標識されたMEFAが、該1以上の単離された抗原と同じHCVポリタンパク質領域からの少なくとも1つのエピトープを含み、ここで、該MEFAが該結合したHCV抗体に結合する、工程；

(d) 該生物学的サンプル中のHCV感染の指標として、該HCV抗体と、該HCVポリタンパク質の第1の領域からの1以上の抗原と、該MEFAとの間で形成された複合体が存在する場合に、該複合体を検出する工程を包含する、方法。

(項目2)

項目1に記載の方法であって、前記HCVポリタンパク質の第1の領域から単離した1以上の抗原が、1以上の単離されたNS3/4aコンフォメーションエピトープであり、かつ、該MEFAが、該NS3/4a領域からの少なくとも1つのエピトープを含む、方法。

(項目3)

項目2に記載の方法であって、前記NS3/4aコンフォメーションエピトープが、前記HCVポリタンパク質のNS3/4aプロテアーゼ領域からのエピトープを含む、方法。

(項目4)

項目2に記載の方法であって、前記NS3/4aコンフォメーションエピトープが、前記HCVポリタンパク質のNS3/4aヘリカーゼ領域からのエピトープを含む、方法。

(項目5)

項目2に記載の方法であって、前記NS3/4aコンフォメーションエピトープが、図3A~3Dに記載のアミノ酸配列(配列番号2)を含む、方法。

(項目6)

項目1~5のいずれか1項に記載の方法であって、前記MEFAが、前記HCVポリタンパク質のNS3/4aプロテアーゼ領域からのエピトープを含む、方法。

(項目7)

項目1~5のいずれか1項に記載の方法であって、前記MEFAが、前記HCVポリタンパク質のNS3/4aヘリカーゼ領域からのエピトープを含む、方法。

(項目8)

項目7に記載の方法であって、前記MEFAが、前記HCV-1配列と比較して番号付けされた、アミノ酸1193~1657を含む、方法。

(項目9)

項目1~5のいずれか1項に記載の方法であって、前記MEFAが、前記HCVポリタンパク質のc33c領域からのエピトープを含む、方法。

(項目10)

項目9に記載の方法であって、前記MEFAが、HCV-1配列と比較して番号付けされた、アミノ酸1211~1457を含む、方法。

(項目11)

項目9に記載の方法であって、前記前記MEFAが、HCV-1配列と比較して番号付け

10

20

30

40

50

された、アミノ酸 1192 ~ 1457 を含む、方法。

(項目 12)

項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、ここで、前記 M E F A が、前記 H C V ポリタンパク質の 5 - 1 - 1 領域からのエピトープを含む、方法。

(項目 13)

項目 12 に記載の方法であって、前記 M E F A が、H C V - 1 と比較して番号付けされた、アミノ酸 1689 ~ 1735 を含む、方法。

(項目 14)

項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記 M E F A が、図 6 A ~ 6 F に示されるアミノ酸配列 (配列番号 4) を含む、方法。

(項目 15)

項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記 M E F A が、前記図 8 A ~ 8 F に示されるアミノ酸配列 (配列番号 6) を含む、方法。

(項目 16)

生物学的サンプルにおける C 型肝炎ウイルス (H C V) 感染を検出する方法であって、該方法は、以下の (a) ~ (d) :

(a) 結合した H C V 抗原を備えるイムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、ここで、該 H C V 抗原は、1 以上の複数エピトープ融合抗原 (M E F A) からなる、イムノアッセイ固体支持体を提供する工程 ;

(b) 生物学的サンプルを、(該生物学的サンプル中に存在する場合に) H C V 抗体が該 1 以上の M E F A に結合することを可能する条件下で、該固体支持体に組み合わせる工程 ;

(c) 前記 1 以上の M E F A に存在する該 H C V ポリタンパク質の領域から単離した検出可能に標識された H C V 抗原を、複合体形成条件下で、工程 (b) の固体支持体へと添加する工程であって、ここで、該単離した抗原は、該結合した H C V 抗体に結合する、工程 ;

(d) 該生物学的サンプル中の H C V 感染の指標として、存在する場合に、該 H C V 抗体と該単離した H C V 抗原と該 M E F A との間で形成された複合体を検出する工程を包含する、方法。

(項目 17)

項目 16 に記載の方法であって、前記単離された H C V 抗原が、単離された N S 3 / 4 a コンフォメーションエピトープであり、かつ、前記 M E F A が、前記 N S 3 / 4 a 領域からの少なくとも 1 つのエピトープを含む、方法。

(項目 18)

項目 17 に記載の方法であって、前記 N S 3 / 4 a コンフォメーションエピトープが、前記 H C V ポリタンパク質の N S 3 / 4 a プロテアーゼ領域からのエピトープを含む、方法。

(項目 19)

項目 17 に記載の方法であって、前記 N S 3 / 4 a コンフォメーションエピトープが、前記 H C V ポリタンパク質の N S 3 / 4 a ヘリカーゼ領域からのエピトープを含む、方法

。

(項目 20)

項目 17 に記載の方法であって、前記 N S 3 / 4 a コンフォメーションエピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列 (配列番号 2) を含む、方法。

(項目 21)

項目 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記 M E F A が、前記 H C V ポリタンパク質の N S 3 / 4 a プロテアーゼ領域からのエピトープを含む、方法。

(項目 22)

項目 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記 M E F A が、前記 H C V ポリタンパク質の N S 3 / 4 a ヘリカーゼ領域からのエピトープを含む、方法。

10

20

30

40

50

(項目23)

項目22に記載の方法であって、前記MEFAが、前記HCV-1配列と比較して番号付けされた、アミノ酸1193~1657を含む、方法。

(項目24)

項目16~20のいずれか1項に記載の方法であって、前記MEFAが、前記HCVポリタンパク質のc33c領域からのエピトープを含む、方法。

(項目25)

項目24に記載の方法であって、前記MEFAが、HCV-1と比較して番号付けされた、アミノ酸1211~1457を含む、方法。

(項目26)

項目24に記載の方法であって、前記MEFAが、HCV-1と比較して番号付けされた、アミノ酸1192~1457を含む、方法。

(項目27)

項目16~20のいずれか1項に記載の方法であって、前記MEFAが、前記HCVポリタンパク質の5-1-1領域からのエピトープを含む、方法。

(項目28)

項目27に記載の方法であって、前記MEFAが、HCV-1と比較して番号付けされた、アミノ酸1689~1735を含む、方法。

(項目29)

項目16~20のいずれか1項に記載の方法であって、ここで、前記MEFAが、図6A~6Fに示されたアミノ酸配列(配列番号4)を含む、方法。

(項目30)

項目16~20のいずれか1項に記載の方法であって、ここで、前記MEFAが、図8A~8Fにおいて示されるアミノ酸配列(配列番号6)を含む、方法。

(項目31)

項目1~15のいずれか1項に記載の生物学的サンプルにおけるHCV感染を検出する方法における、結合したHCV抗原を備えるイムノアッセイ支持体および検出可能に標識されたHCV MEFAの使用であって、ここで、該HCV抗原は、HCVポリタンパク質の第1の領域から単離した1以上の抗原からなり、そして、該標識されたMEFAは、該1以上の単離された抗原と同じHCVポリタンパク質領域からの少なくとも1つのエピトープを含む、使用。

(項目32)

項目16~30のいずれか1項に記載の生物学的サンプルにおけるHCV感染を検出する方法における、結合したHCV抗原を備えるイムノアッセイ支持体および検出可能に標識された単離されたHCV抗原の使用であって、ここで、該HCV抗原は、1以上のMEFAからなり、そして、該標識され単離されたHCVは、該1以上のMEFAにおいて存在するHCVポリタンパク質の領域に由来する、使用。

これらのおよび他の本発明の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照して明らかになる。加えて、より詳細な特定の手順または組成で記載する種々の参考文献を、ここに示す。

**【図面の簡単な説明】****【0018】**

**【図1】**図1は、本発明のアッセイ試薬(タンパク質および抗体)に由来するポリタンパク質の種々の領域を示す、HCVゲノムの図解表現である。

**【図2】**図2は、本発明に基づく、MEFA12を用いた代表的な抗原/抗体/抗原サンドウィッチアッセイの概略図である。

**【図3A】**図3A~3D(配列番号1および配列番号2)は、本アッセイで使用するための代表的なNS3/4aコンフォメーション抗原のDNAおよび対応するアミノ酸配列を図示する。図3Aから図3Dの403位および404位におけるアミノ酸は、HCV-1のネイティブアミノ酸配列のProのThrへの置換およびIleのSerへの置換を表

10

20

30

40

50

す。

【図 3 B】図 3 A ~ 3 D (配列番号 1 および配列番号 2) は、本アッセイで使用するための代表的な NS 3 / 4 a コンフォメーション抗原の DNA および対応するアミノ酸配列を  
図示する。図 3 A から図 3 D の 4 0 3 位および 4 0 4 位におけるアミノ酸は、H C V - 1  
のネイティブアミノ酸配列の P r o の T h r への置換および I l e の S e r への置換を表  
す。

【図 3 C】図 3 A ~ 3 D (配列番号 1 および配列番号 2) は、本アッセイで使用するための代表的な NS 3 / 4 a コンフォメーション抗原の DNA および対応するアミノ酸配列を  
図示する。図 3 A から図 3 D の 4 0 3 位および 4 0 4 位におけるアミノ酸は、H C V - 1  
のネイティブアミノ酸配列の P r o の T h r への置換および I l e の S e r への置換を表  
す。

【図 3 D】図 3 A ~ 3 D (配列番号 1 および配列番号 2) は、本アッセイで使用するための代表的な NS 3 / 4 a コンフォメーション抗原の DNA および対応するアミノ酸配列を  
図示する。図 3 A から図 3 D の 4 0 3 位および 4 0 4 位におけるアミノ酸は、H C V - 1  
のネイティブアミノ酸配列の P r o の T h r への置換および I l e の S e r への置換を表  
す。

【図 4】図 4 は、p d . H C V 1 a . n s 3 n s 4 a P I の構造の図表である。

【図 5】図 5 は、M E F A 1 2 の概略図である。

【図 6 A】図 6 A ~ 図 6 F (配列番号 3 および配列番号 4) は、M E F A 1 2 の DNA お  
よび対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 6 B】図 6 A ~ 図 6 F (配列番号 3 および配列番号 4) は、M E F A 1 2 の DNA お  
よび対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 6 C】図 6 A ~ 図 6 F (配列番号 3 および配列番号 4) は、M E F A 1 2 の DNA お  
よび対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 6 D】図 6 A ~ 図 6 F (配列番号 3 および配列番号 4) は、M E F A 1 2 の DNA お  
よび対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 6 E】図 6 A ~ 図 6 F (配列番号 3 および配列番号 4) は、M E F A 1 2 の DNA お  
よび対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 6 F】図 6 A ~ 図 6 F (配列番号 3 および配列番号 4) は、M E F A 1 2 の DNA お  
よび対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 7】図 7 は、M E F A 7 . 1 の概略図である。

【図 8 A】図 8 A ~ 図 8 F (配列番号 5 および配列番号 6) は、M E F A 7 . 1 の DNA  
および対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 8 B】図 8 A ~ 図 8 F (配列番号 5 および配列番号 6) は、M E F A 7 . 1 の DNA  
および対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 8 C】図 8 A ~ 図 8 F (配列番号 5 および配列番号 6) は、M E F A 7 . 1 の DNA  
および対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 8 D】図 8 A ~ 図 8 F (配列番号 5 および配列番号 6) は、M E F A 7 . 1 の DNA  
および対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 8 E】図 8 A ~ 図 8 F (配列番号 5 および配列番号 6) は、M E F A 7 . 1 の DNA  
および対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 8 F】図 8 A ~ 図 8 F (配列番号 5 および配列番号 6) は、M E F A 7 . 1 の DNA  
および対応するアミノ酸配列を図示する。

【図 9】図 9 A ~ 図 9 C は、本発明のイムノアッセイを用いた使用のための代表的な M E  
F A を示す。図 9 A は、M E F A 3 の概略図である。図 9 B は、M E F A 5 の概略図であ  
る。図 9 C は、M E F A 6 の概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 9】

( 発明の詳細な説明 )

他で示さない限り、本発明の実施は、当該技術分野の範囲内の、化学、生化学、組換え

10

20

30

40

50

DNA技術および免疫学の従来方法を使用する。このような技術は、文献で十分に説明される。例えば、Fundamental Virology, 第2版, vol. I & II (B. N. FieldsおよびD. M. Knipe編); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I - IV (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編, Blackwell Scientific Publications); T. E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989); Methods In Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan編, Academic Press, Inc.)を参照。

10

## 【0020】

本明細書中および添付の特許請求の範囲で使用される場合、文脈が明らかに他を述べていない限り、単数形である「a」、「an」および「the」は複数の対象を含むことを留意しなければならない。従って、例えば、「1つの抗原(an antigen)」の言及は、2以上の抗原などの混合物を含む。

## 【0021】

以下のアミノ酸の略語は本明細書を通じて用いられる。

20

アラニン: Ala (A)	アルギニン: Arg (R)
アスパラギン: Asn (N)	アスパラギン酸: Asp (D)
システイン: Cys (C)	グルタミン: Gln (Q)
グルタミン酸: Glu (E)	グリシン: Gly (G)
ヒスチジン: His (H)	イソロイシン: Ile (I)
ロイシン: Leu (L)	リジン: Lys (K)
メチオニン: Met (M)	フェニルアラニン: Phe (F)
プロリン: Pro (P)	セリン: Ser (S)
スレオニン: Thr (T)	トリプトファン: Trp (W)
チロシン: Tyr (Y)	バリン: Val (V)

30

(I. 定義)

本発明の記述において、以下の用語が使用され、そして以下に示されるように定義されることを意図される。

## 【0022】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを言い、そして、生成物の最小の長さには限定されない。従って、ペプチド、オリゴペプチド、2量体、多量体などが、定義内に含まれる。全長タンパク質およびそのフラグメントは、共に定義に含まれる。この用語は、また、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含む。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、ネイティブの配列に対する欠失、付加および(天然で一般に保存的な)置換のような修飾を含むタンパク質をいう。これらの修飾は、部位特異的突然変異を介するように意図的であっても、または、タンパク質を生成する宿主の突然変異もしくはPCR増幅による誤りを介するように偶発的であってもよい。

40

## 【0023】

HCVポリペプチドは、上記で定義されたように、HCVポリタンパク質に由来するポリペプチドである。ポリペプチドは、物理的にHCVに由来する必要はなく、合成的または組換え的に産生され得る。さらに、ポリペプチドは、様々なHCV株および単離株(例えば、HCVの1株、2株、3株、4株、5株または6株からのいずれかの単離株であるが、これらに限定されない)のいずれかに由来し得る。多くの保存領域および可変領域はこれらの株の間で既知であり、そして、一般的に、2つの配列が並べられた場合、これら

50

の領域に由来するエピトープのアミノ酸配列は、高度の配列相同性、例えば、30%、好ましくは40%を超えるアミノ酸配列相同性を有する。従って、例えば、用語「NS3/4a」ポリペプチドは、さらに以下に定義されるように、種々のHCV株、ならびに、NS3/4aアナログ、ムテインおよび免疫原性フラグメントのいずれかに由来するネイティブNS3/4aをいう。これらの株の多くの完全な遺伝子型は公知である。例えば、米国特許第6,150,087号およびGenBank登録番号AJ238800号およびAJ238799号を参照。

#### 【0024】

用語「アナログ」および「ムテイン」は、関連分子の生物学的に活性な誘導体、または、所望の活性（例えば、本明細書中で記載されるアッセイにおける免疫反応性）を保持するような誘導体のフラグメントを言う。一般に、用語「アナログ」は、ネイティブのポリペプチド配列を有する化合物、および、修飾が免疫原性活性を破壊しない限り、ネイティブ分子に関連して1つ以上のアミノ酸の付加、（天然で一般に保存的な）置換および/または欠失を有する構造を有する化合物を言う。用語「ムテイン」は、国際公開番号WO91/04282で記載されたような1つ以上のペプチド模倣体（「ペプトイド」）を有するペプチドを言う。好ましくは、アナログまたはムテインは、少なくともネイティブ分子と同じ免疫活性を有する。ポリペプチドアナログおよびムテインを作製する方法は、当該分野で公知であり、さらに、以下に記載される。

#### 【0025】

特に好ましいアナログは、天然で保存的な置換、すなわち、関連した側鎖のアミノ酸のファミリー内において行われる置換を含む。具体的に、アミノ酸は一般的に4つのファミリーに分類される：（1）酸性 - アスパラギン酸塩およびグルタミン酸塩；（2）塩基性 - リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；ならびに（4）非電荷極性 - グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは時々芳香族アミノ酸として分類される。例えば、イソロイシンもしくはバリンによるロイシンの単独置換、グルタミン酸塩によるアスパラギン酸塩の単独置換、セリンによるスレオニンの単独置換、または、構造的に関連したアミノ酸によるアミノ酸の類似した保存的置換が、生物学的活性に対して大きな影響を有さないことは、理論的に予測可能である。例えば、分子の所望の機能がインタクトのままである限り、目的のポリペプチドは、約5~10までの保存的もしくは非保存的アミノ酸置換、または、約15~25まで、または、5~25の間の任意の整数の保存的もしくは非保存的アミノ酸置換をすら含む可能性がある。当業者は、当該分野で周知であるHopp/WoodsおよびKyte-Doolittleプロットに関連し、変化に耐え得る、目的の分子の領域を容易に決定し得る。

#### 【0026】

「フラグメント」により、インタクトの全長ポリペプチド配列および構造の一部のみからなるポリペプチドが意図される。フラグメントは、ネイティブポリペプチドのC末端欠失および/またはN末端欠失を含み得る。目的のフラグメントが明細書中に記載されるアッセイにおいて免疫反応性を保持する場合、特定のHCVタンパク質の「免疫原性フラグメント」は、一般に、全長分子の少なくとも約5~10の連続したアミノ酸残基、好ましくは全長分子の少なくとも約15~25の連続したアミノ酸残基、そして、最も好ましくは、全長分子の少なくとも約20~50またはそれ以上の連続したアミノ酸残基（これはエピトープを規定する）、または5アミノ酸と全長配列との間の任意の整数を含む。例えば、MEFAでの使用のための好ましい免疫原性フラグメントとしては、例えば、ポリタンパク質のアミノ酸10~45、10~53、67~88および120~130、エピトープ5-1-1（ウイルスゲノムのNS3領域中）、ならびに、HCVポリタンパク質のE1領域、E2領域、c33c（NS3）領域、c100（NS4）領域、NS3/4a領域およびNS5領域に由来する規定のエピトープ、ならびに、HCVポリタンパク質から同定された他の種々のエピトープのいずれかを含む、HCVコアのフラグメントが挙げ

10

20

30

40

50

られるが、これらに限定されない。例えば、Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chienら, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chienら, 国際公開番号WO93/00365; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778; 米国特許第6,150,087号および同第6,121,020号を参照。

【0027】

本明細書中で用いられる場合、用語「エピトープ」は、少なくとも約3~5、好ましくは、約5から10または15、および約1,000を超えない(またはその間の全ての整数)のアミノ酸であって、それ自身またはより大きい配列の一部として、そのような配列に関連して産生された抗体に結合する配列を定義する配列をいう。フラグメントの長さに対する重要な上限はなく、フラグメントは、タンパク質配列のほぼ全長を含み得るか、または、HCVポリタンパク質からの2以上のエピトープを含む融合プロテインさえ含む。本発明で使用されるエピトープは、由来する親タンパク質の一部の正確な配列を有するポリペプチドに限定されない。実際、ウイルスゲノムは一定のフラックスの状態であり、そして、単離物間で比較的高度の可変性を示すいくつかの可変ドメインを含む。従って、用語「エピトープ」は、ネイティブ配列に対して同一の配列、ならびに、欠失、付加および(天然で一般に保存的な)置換のようなネイティブ配列に対する修飾を含む。

【0028】

エピトープを含む所定のポリペプチドの領域は、当該分野で周知の任意の数のエピトープマッピング技術の使用により同定され得る。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris 編, 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey を参照。例えば、直線状のエピトープは、例えば、固体支持体上の多数のペプチド(タンパク質分子の一部に対応するペプチド)を同時に合成し、ペプチドがまだ支持体に結合している間に、ペプチドを抗体と反応させることにより、決定され得る。このような技術は当該分野で公知であり、そして、例えば、米国特許第4,708,871号; Geysenら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysenら(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182; Geysenら(1986) Molec. Immunol. 23:709-715に記載されている。このような技術を使用することにより、HCVの多数のエピトープが同定されている。例えば、Chienら, Viral Hepatitis and Liver Disease (1994) pp. 320-324、そしてさらに以下に記載されている。同様に、コンフォメーションエピトープは、例えば、X線結晶回折および2次元核磁気共鳴によるような、アミノ酸の空間的なコンフォメーションを決定することにより容易に同定される。例えば、Epitope Mapping Protocols、前出を参照。タンパク質の抗原領域は、また、抗原性標準および例えばOxford Molecular Groupから利用可能なOmigaバージョン1.0ソフトウェアプログラムを使用して計算されたようなヒドロパシープロットを使用することにより同定され得る。このコンピュータプログラムは、抗原性のプロフィールを決定するためにHopp/Woods法(Hoppら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828)を使用し、そして、ヒドロパシープロットのためにKyte-Doolittle技術(Kyteら, J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132)を使用する。

【0029】

種々のHCVエピトープの記載については、例えば、Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chienら, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chienら, 国際公開番号WO93/00365; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778; および米国特許第6,280,927号および同第6,150,08

10

20

30

40

50

7号を参照。

【0030】

本明細書中で使用される場合、用語「コンフォメーションナルエピトープ」は、全長天然タンパク質内のエピトープをコードしているアミノ酸配列に対してネイティブ構造的特徴を有する全長タンパク質の一部、または、そのアナログもしくはムテインをいう。ネイティブ構造特徴としては、グリコシル化および3次元構造が挙げられるが、これらに限定されない。エピトープ規定配列の長さは、広範なバリエーションに供され得る。それは、これらのエピトープが抗原の3次元形状（例えば折りたたみ）により形成されると考えられるからである。従って、エピトープを規定するアミノ酸は、比較的少数であり得るが、分子の長さに沿って（または2量体などの場合、異なる分子上でさえ）幅広く分散され得、折りたたみを経て正確なエピトープコンフォメーションをもたらし得る。エピトープを規定する残基間の抗原の一部は、エピトープのコンフォメーション構造に対して重要でなくてもよい。例えば、エピトープコンフォメーションにとって重要な配列が維持される（例えば、ジスルフィド結合に関わるシステイン、グリコシル化部位など）場合、これらの干渉配列の欠失または置換は、コンフォメーションナルエピトープに影響を与えなくてもよい。

10

【0031】

例えばNS3/4a領域中に存在するコンフォメーションナルエピトープは、上記で議論された方法を使用して容易に同定される。さらに、所定のポリペプチド中のコンフォメーションナルエピトープの存在または非存在は、抗体（ポリクローナル血清またはコンフォメーションナルエピトープに対するモノクローナル血清）を用いた目的の抗原のスクリーニング、および直線的なエピトープのみを保有する抗原の変性バージョンの反応性と反応性を比較することを通じて、容易に決定され得る。ポリクローナル抗体を使用したこのようなスクリーニングにおいて、変性抗原を用いて最初にポリクローナル抗体血清を吸収すること、および、それが、目的の抗原に対する抗体を保持しているか否かを見ることは、有利であり得る。加えて、NS3/4aの場合、ネイティブコンフォメーションを保存する分子もまた、プロテアーゼ酵素アッセイを有し、さらに、必要に応じて、ヘリカーゼ酵素活性を有する。このような活性は、以下にさらに記載されるように、酵素アッセイを使用して検出され得る。

20

【0032】

好ましくは、コンフォメーションナルエピトープは組換え的に産生され、そして、所望の構造特徴を保存する（例えば、エピトープの変性なしの）条件で抽出可能な細胞内で発現される。このような細胞としては、バクテリア、酵母、昆虫および哺乳類の細胞が挙げられる。発現およびHCVポリタンパク質からの組換え型コンフォメーションナルエピトープの単離は、例えば、国際公開番号WO96/04301、WO94/01778、WO95/33053、WO92/08734で記載される。あるいは、抗原を発現することおよび、さらに回収後タンパク質を還元することが可能である。また、化学合成が、「ネイティブ」抗原のコンフォメーションナルエピトープと交差反応するコンフォメーション抗原ミミトープ（mimitope）を提供し得ることもまた理解される。

30

【0033】

本明細書中で使用されるような用語「複数エピトープ融合抗原」または「MEFA」は、多数のHCV抗原が、自然に存在しない1つの連続したアミノ酸鎖の一部であるポリペプチドを意図する。HCV抗原は、ペプチド結合により互いに直接的に結合し得るか、または干渉するアミノ酸配列により分離され得る。融合抗原はまた、HCVポリタンパク質に対して外因性の配列を含み得る。さらに、HCV配列は、多数の遺伝子型および/またはHCVの単離株由来で存在し得る。本発明のイムノアッセイでの使用のための特別なMEFAの例は、例えば、国際公開番号WO01/96875、同WO01/09609、同WO97/44469ならびに米国特許第6,514,731号および同第6,428,792号で詳述されている。

40

【0034】

50

「抗体」は、化学的または生理学的手段を通じて、特異的に目的のポリペプチドに結合する分子を意図する。従って、HCV NS3/4a抗体は、HCV NS3/4aタンパク質のエピトープに特異的に結合する分子である。本明細書中で使用される用語「抗体」は、ポリクローナル調製物およびモノクローナル調製物の両方から得られる抗体、ならびに、以下：ハイブリッド（キメラ）抗体分子（例えば、Winterら（1991）Nature 349:293-299および米国特許第4,816,567を参照）；F(ab')<sub>2</sub>およびF(ab)フラグメント；Fv分子（非共有結合性ヘテロ2量体、例えば、Inbarら（1972）Proc Natl Acad Sci USA 69:2659-2662およびEhrlichら（1980）Biochem 19:4091-4096を参照）；1本鎖Fv分子（sFv）（例えば、Houstonら（1988）Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-5883を参照）；2量体および3量体抗体フラグメント構造物；ミニボディ（minibodies）（例えば、Packら（1992）Biochem 31:1579-1584；Cumberら（1992）J Immunology 149B:120-126を参照）；ヒト化抗体分子（例えば、Riechmannら（1988）Nature 332:323-327；Verhoevenら（1988）Science 239:1534-1536；および英国特許第GB 2,276,169号，1994年9月21日発行を参照）および、このような分子から得られるすべての機能性フラグメントを含み、このようなフラグメントは、親抗体分子の免疫学的な結合特性を保持する。

10

20

## 【0035】

「組換え」タンパク質は、所望の活性を保持するタンパク質および本明細書中で記載されているような組換えDNA技術により調製されたタンパク質である。一般に、以下でさらに記載されるように、目的の遺伝子はクローン化され、そしてその後形質転換した生物体中で発現される。宿主生物体は、発現条件下で、タンパク質を産生する外来遺伝子を発現する。

## 【0036】

ポリペプチドをいう場合、「単離された」により、示した分子が、この分子が天然で見出される生物体全体から分離しており、独立しているか、または、同じタイプの他の生物学的巨大分子の実質的非存在下で存在することが、意味される。ポリヌクレオチドに関して、用語「単離された」は、全体的もしくは部分的に、通常天然に関連する配列を有さない核酸分子、もしくは天然に存在するが、それらと関連する異種配列を有する配列、または染色体から分離される分子である。

30

## 【0037】

「等価抗原決定因子」により、HCVの株1、株2、株3などに由来するようなHCVの異なる亜種または株からの抗原決定因子が、意味される。より具体的には、5-1-1のようなエピトープは、公知であり、そして、このようなエピトープは、株1、株2および株3の間で変動する。従って、3つの異なる株からの5-1-1エピトープは、等価抗原決定因子であり、そして、従って、それらの配列が同一でなくても、「コピー」である。一般的に、2つの配列が並べられた場合、等価抗原決定因子のアミノ酸配列は、高度の配列相同性（例えば30%を超えるアミノ酸配列相同性、好ましくは、40%を超えるアミノ酸配列相同性）を有する。

40

## 【0038】

「相同性」は、2つのポリヌクレオチド間の、または2つのポリペプチド部分間の、百分率類似性をいう。配列が、分子の規定された長さにならなくても、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80~85%、好ましくは少なくとも約90%、そして、最も好ましくは少なくとも約95~98%の配列類似性を示す場合、2つのDNA配列、または2つのポリペプチド配列は、互いに「実質的に相同」である。また、本明細書中で使用される場合、実質的に相同は、特定のDNAまたはポリペプチド配列に対して完全な同一性を示す配列についてもいう。

## 【0039】

50

一般に、「同一性」は、それぞれ2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の、正確なヌクレオチド - ヌクレオチドの一致またはアミノ酸 - アミノ酸の一致について言及する。百分率同一性は、配列を並べること、2つの並べられた配列間のマッチの正確な数を計数すること、より短い配列の長さで割ること、そしてその結果に100を掛けることによって、2つの分子間の配列情報の直接的な比較により決定され得る。

#### 【0040】

SmithおよびWaterman *Advances in Appl. Math.* 2: 482 - 489, 1981の局所的相同性アルゴリズムを適用するALIGN, Dayhoff, M.O. in *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 *Suppl.* 3: 353 - 358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DCのような容易に利用できるコンピュータプログラムをペプチド解析のために使用して、類似性および同一性の解析を補助し得る。ヌクレオチド配列類似性および同一性を決定するためのプログラムが、Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group, Madison, WIから利用可能である) (例えば、SmithおよびWatermanのアルゴリズムによるBESTFIT, FASTAおよびGAPプログラム)で利用可能である。これらのプログラムは、製造者によって推奨されるデフォルトパラメータを用いて容易に利用され、そして、上記のWisconsin Sequence Analysis Packageに記載される。例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列の百分率類似性は、デフォルトのスコア表および6つのヌクレオチド位置のギャップペナルティーを用いたSmithおよびWatermanの相同性アルゴリズムを使用して決定され得る。

#### 【0041】

本発明に関連して百分率類似性を確立するもう一つの方法は、University of Edinburghが著作権を有し、John F. CollinsおよびShane S. Sturrokにより開発され、さらに、IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA)により配布されたプログラムのMPSRCHパッケージを使用することである。この一揃いのパッケージから、デフォルトパラメータがスコア表について使用される(例えば、ギャップオープンペナルティーが12、ギャップ拡張ペナルティーが1、そしてギャップが6) Smith-Watermanアルゴリズムが使用され得る。得られたデータからの「マッチ」の値は、「配列類似性」を反映する。配列間の百分率同一性または類似性を計算するための他の好適なプログラムは本分野で一般に公知であり、例えば、別の配列プログラムはBLASTであり、デフォルトパラメータを用いて使用される。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、以下のデフォルトパラメータを用いて使用され得る: genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスで見出され得る: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。

#### 【0042】

あるいは、相同領域間で安定な二本鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続く、一本鎖特異的なヌクレアーゼを用いた消化、および消化されたフラグメントのサイズ決定により、相同性が決定され得る。実質的に相同なDNA配列は、例えば、厳しい条件下(その特定のシステムのために規定される)でのサザンハイブリダイゼーション実験で同定され得る。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、本分野の技術内である。例えば、Sambrookら(前出); DNA Cloni

10

20

30

40

50

ng (前出); Nucleic Acid Hybridization (前出) を参照。

【0043】

「一般の固体支持体」は、本発明のイムノアッセイで使用される HCV ポリペプチドが、疎水性吸着のような共有結合するかまたは非共有結合的な手段により結合する、1つの固体支持体を意図する。

【0044】

「免疫学的に反応性」は、問題の抗原が HCV 感染個体からの生物学的なサンプル中に存在する抗 HCV 抗体と特異的に反応することを意味する。

【0045】

抗体が抗原上のエピトープに結合する場合、「免疫複合体」は、形成される組み合わせを意図する。

【0046】

本明細書中で使用される場合、「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織または体液のサンプルをいい、例えば、血液、血漿、血清、糞便、尿、骨髄、胆液、脊髄液、リンパ液、皮膚サンプル、皮膚、呼吸管、腸管および尿生殖器の外分泌液、涙、唾液、乳、血球、器官、生検材料、ならびにインビトロ細胞培養物構成成分のサンプル（培養培地中の細胞および組織の増殖により生じた調整培地（例えば、組換え細胞および細胞構成成分）が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0047】

本明細書中で使用される場合、用語「標識」および「検出可能な標識」は、検出可能な分子をいい、放射性同位体、蛍光剤、化学発光剤 (chemiluminescer)、発色団、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素インヒビター、発色団、染料、金属イオン、金属コロイド溶液、リガンド（例えば、ビオチン、ストレプトアビジン (streptavidin) またはハプテン）などが挙げられるが、これらに限定されない。用語「蛍光剤」は、検出範囲で蛍光を示し得る基質またはその一部分をいう。本発明の下で使用され得る標識の特定の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、フルオレセイン、FITC、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン (umbelliferone)、ジメチルアクリジニウムエステル (DMAE)、テキサスレッド、ルミノール、NADPH および - - ガラクトシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【0048】

(II. 発明を実行する方法)

本発明を詳細に説明する前に、本発明が特定の処方またはプロセスパラメータ（無論変動し得る）に制限されないということが理解される。本明細書中で使用される用語が本発明の特定の実施形態を説明する目的のみのものであり、そして、限定を意図されないこともまた、理解される。

【0049】

本明細書中で記載された組成物および方法と類似または等価の多くの組成物および方法が、本発明の実施において使用され得るが、好ましい材料および方法は、本明細書中以下に記載される。

【0050】

上述のように、本発明は、HCV 感染を正確に検出するための新規の抗原 / 抗体 / 抗原サンドウィッチ診断方法の発見に基づく。本方法は、迅速かつ効率的に実施され得、そして、大容量のサンプルの使用から生じ得るバックグラウンド効果を除去し得る。本方法は、好ましくは、HCV 血清変換の初期段階の間に存在する高い免疫原性 HCV 抗原を利用し、それにより、検出の正確性を向上させ、そして誤った結果の発生を減少させる。

【0051】

特に、本明細書中で記載されるイムノアッセイは、2つの基本的な HCV 抗原（1つは固相中に存在し、1つは液相中に存在する）を利用する。両抗原が、感染個体からの生物

10

20

30

40

50

学的サンプル中に存在するHCV抗体に結合し得る。本発明のアッセイで使用される1つの抗原は、HCVポリタンパク質の領域から単離された抗原である。使用される2番目の抗原は、同一または異なるHCV遺伝子型および単離物のいずれか由来の種々のHCVポリペプチドを含む複数エピトープ融合抗原(「MEFA」)である。MEFAは、単離されたHCV抗原としてHCVポリタンパク質の同領域に由来する少なくとも1またはそれ以上のエピトープを含む。

#### 【0052】

特に好ましい実施形態において、本発明のアッセイで使用される抗原の1つは、HCVポリタンパク質のNS3/4a領域に由来する高度に免疫原性のコンフォメーションルエピトープである。これらの実施形態において、さらに以下に記載されるように、使用される2番目の抗原は、NS3/4a領域(直線的または立体構造的のいずれか)由来の1以上のエピトープを含むMEFAである。従って、MEFAは、1以上のHCV単離物からのNS3/4a領域に由来する複数の免疫優性エピトープを含み得る。多数のNS3/4aエピトープが多数のエピトープ融合で使用される場合、それらは、同一または異なるエピトープであり得る。あるいは、融合抗原は、NS3/4a領域に由来する1以上のエピトープ、ならびに、他のHCV領域(例えば、非限定で、HCVコア配列、E1配列、E2配列、P7配列、NS4b配列、NS5a配列およびNS5b配列)からの主要な直線のエピトープを含み得る。

#### 【0053】

本方法は、単数のアッセイで、以下に記載される幾つかのアッセイ様式のいずれかを用いて都合良く実施され得、これらのアッセイ様式としては、例えば、NS3/4aコンフォメーションルエピトープのような単離されたHCV抗原またはMEFAのどちらかが結合した固体支持体を利用するアッセイ様式であるが、これらに限定されない。従って、MEFAは溶液相または固相のいずれかで提供され得る。溶液で提供される場合、単離されたHCV抗原は、固相上に存在する。

#### 【0054】

例えば、本発明の1つの代表的な方法において、アッセイは、HCVポリタンパク質のNS3/4a領域に由来する1以上のコンフォメーションルエピトープを含む1以上のポリペプチドが結合している固体支持体上で行われる。この実施形態において、MEFAは溶液相中に提供される。代替の実施形態において、アッセイは1以上のMEFAが結合した固体支持体上で行われる。この実施形態において、コンフォメーションNS3/4aエピトープを含むポリペプチドが、溶液相中に提供される。従って、コンフォメーションNS3/4aエピトープが固相上に存在する場合、MEFAは溶液相中に存在し、そして逆もまた然りである。

#### 【0055】

本発明のさらなる理解のために、本発明の方法における使用のための種々のHCVポリペプチド抗原およびMEFA、ならびに、タンパク質の産生およびタンパク質を使用する方法に関して、より詳細な考察が以下に提供される。

#### 【0056】

(HCV抗原およびMEFA)

HCV株のゲノムは、約9,000~12,000ヌクレオチドの1つのオープンリーディングフレーム(ポリタンパク質に転写される)を含む。図1および表1で示されているように、切断の際、HCVポリタンパク質は、NH<sub>2</sub>-Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOHの順序で、少なくとも10の異なる産物を生成する。コアポリペプチドは、HCV-1に関連して番号付けされた1位~191位で生じる(HCV-1ゲノムに対しては、Chooら(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:2451-2455を参照)。このポリペプチドは、さらにプロセスされて、およそアミノ酸1~173を有するHCVポリペプチドを産生する。エンベロープポリペプチドE1およびE2は、それぞれ約192位~383位および384位~746位で生じる。P7ドメインは、約747位~80

10

20

30

40

50

9位で見出される。NS2は、タンパク質分解活性を有する内在性膜タンパク質であり、ポリタンパク質の約810位～1026位で見出される。NS2は、NS3（約1027位～1657位で見出される）と組み合わせて、NS2-NS3 *sisle* 結合を切断し（言い換えるとこれはNS3のN末端を生じ）、そしてセリンプロテアーゼ活性とRNAヘリカーゼ活性との両方を含む大きなポリタンパク質を遊離する。約1027位～1207位で見出されるNS3プロテアーゼは、残存するポリタンパク質をプロセスすることに役立つ。ヘリカーゼ活性は、約1193位～1657位で見出される。NS3は、NS3補助因子（NS4a、約1658位～1711位で見出される）、2つのタンパク質（約1712位～1972位で見出されるNS4b、および約1973位～2420位で見出されるNS5a）、そしてRNA依存性RNAポリメラーゼ（約2421位～3011位で見出されるNS5b）を遊離する。ポリタンパク質成熟の完了は、NS3-NS4a接合点での自動触媒的切断により開始され、NS3セリンプロテアーゼにより触媒される。

【0057】

【表 1】

表 1	
ドメイン	隣接境界*
C(コア)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

10

20

30

40

【 0 0 5 8 】

\* HCV - 1に関連して番号付けされた。Chooら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455を参照。

50

## 【0059】

本方法の1つの構成要素は、上で記載されるようなHCVポリタンパク質の種々の領域のいずれか由来の単離された抗原である。多くのHCV株および単離株の核酸配列およびアミノ酸配列(上述された種々の領域の核酸配列およびアミノ酸配列を含む)が決定されている。例えば、単離株HCV J1.1が、Kubora(1989)Japan.Nucl.Acids Res.17:10367-10372;Takeuchiら(1990)Gene 91:287-291;Takeuchiら(1990)J.Gen.Virol.71:3027-3033およびTakeuchiら(1990)Nucl.Acids Res.18:4626に記載される。2つの独立した単離株HCV-JおよびBKの完全なコード配列が、Katoら(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:9524-9528およびTakamizawara(1991)J.Virol.65:1105-1113によりそれぞれ記載される。

10

## 【0060】

HCV-1単離株を記載する刊行物としては、Chooら(1990)Brit.Med.Bull.46:423-441;Chooら(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:2451-2455およびHanら(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:1711-1715が挙げられる。HCV単離株HC-J1およびHC-J4が、Okamotoら(1991)Japan J.Exp.Med.60:167-177中で記載される。HCV単離株HCT18、HCT23、Th、HCT27、EC1およびEC10は、Weinerら(1991)Virol.180:842-848中で記載される。HCV単離物Pt-1、HCV-K1およびHCV-K2が、Enomotoら(1990)Biochem.Biophys.Res.Commun.170:1021-1025中で記載される。HCV単離株A、C、DおよびEは、Tsukiyama-Koharaら(1991)Virus Genes 5:243-254中で記載される。

20

## 【0061】

従って、例えば、単離されたHCV抗原は、これらのHCV単離株のいずれかのコア領域に由来し得る。この領域は、HCV-1に対して番号を付されたHCVポリタンパク質のアミノ酸1位-191位に存在する。全長タンパク質のフラグメント、例えば、アミノ酸1-150、例えばアミノ酸1-130、1-120、例えば、アミノ酸1-121、1-122、1-123など、または、全長タンパク質のエピトープを含むより小さいフラグメントのいずれか、例えば、アミノ酸10-53、アミノ酸10-45、アミノ酸67-88、アミノ酸120-130の間で見出されるエピトープ、または、例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号;Chienら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1992)89:10011-10015;Chienら、J.Gastroent.Hepatol.(1993)8:S33-39;Chienら、国際公開番号WO93/00365;Chien,D.Y.,国際公開番号WO94/01778および米国特許第6,280,927号および同第6,150,087号で同定されたコアエピトープのうちいずれかが、本方法で使用され得る。さらに、国際公開番号WO99/63941に記載されるようなポリタンパク質のコア領域中のフレームシフトから生じるタンパク質が使用され得る。

30

40

## 【0062】

同様に、HCV E1領域および/またはE2領域からのポリペプチドが、単離されたHCV抗原として本発明の方法で使用され得る。E2は、多数の種(Spaeteら、Virol.(1992)188:819-830;Selbyら、J.Virol.(1996)70:5177-5182;Grakouiraら、J.Virol.(1993)67:1385-1395;Tomeiraら、J.Virol.(1993)67:4017-4026)として存在し、そしてクリッピングおよびタンパク質分解は、E2ポリペプチドのNBおよびE2ポリペプチドのC末端で起こり得る。従って、本明細書中での使用のためのE2ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に対して番号を付された

50

HCVポリタンパク質のアミノ酸405-661、例えば、400、401、402...から661まで、例えば、383または384-661、383または384-715、383または384-746、383または384-749あるいは383または384-809、あるいは383または384から661-809の間の任意のC末端までを含み得る。同様に、本明細書中で使用するためのE1ポリペプチドは、HCVポリタンパク質の、アミノ酸192-326、192-330、192-333、192-360、192-363、192-383、または192から326-383の間の任意のC末端までを含み得る。

#### 【0063】

エピトープを含むE1および/またはE2の免疫原性フラグメントが、本方法で使用され得る。例えば、E1ポリペプチドのフラグメントは、その分子の約5個からほぼ全長、例えば、E1ポリペプチドの6、10、25、50、75、100、125、150、175、185個以上のアミノ酸、または記載した数字の間の任意の整数個を含み得る。同様に、E2ポリペプチドのフラグメントは、E2ポリペプチドの6、10、25、50、75、100、150、200、250、300、もしくは350アミノ酸、または記載した数字の間の任意の整数個を含み得る。

10

#### 【0064】

例えば、アミノ酸384-410または390-410にわたる領域のような、例えばE2の超可変領域に由来するエピトープが、融合物中に含まれ得る。E2ポリペプチド配列に組み込むために特に有効なE2エピトープは、HCV1型ゲノムのアミノ酸390-410のためのコンセンサス配列を表すコンセンサス配列Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn(配列番号7)のような、この領域に由来するコンセンサス配列を含むものである。E1およびE2のさらなるエピトープは公知であり、例えば、Chienら、国際公開番号WO93/00365に記載される。

20

#### 【0065】

さらに、E1ポリペプチドおよび/またはE2ポリペプチドは、膜貫通ドメインのすべてまたは部分を欠き得る。E1で、一般的に、ほぼアミノ酸370位およびより大きいアミノ酸位置(HCV-1 E1の番号付けに基づく)で終わるポリペプチドは、ERにより保持され、よって増殖培地中に分泌されない。E2で、ほぼアミノ酸731位およびより大きいアミノ酸位置(これもまたHCV-1 E2配列の番号付けに基づく)で終わるポリペプチドは、ERによって保持され、そして分泌されない(例えば、国際公開番号WO96/04301, 1996年2月15日公開を参照)。これらのアミノ酸位置は絶対的ではなく、そして、ある程度変動し得ることが留意されるべきである。従って、本発明は、膜貫通結合ドメインを保持するE1ポリペプチドおよび/またはE2ポリペプチド、ならびに、膜貫通結合ドメインの全部または一部を欠くポリペプチド(ほぼアミノ酸369以下で終わるE1ポリペプチド、およびほぼアミノ酸730以下で終わるE2ポリペプチドを含む)の使用を企図する。さらに、C末端切断物は、膜貫通ドメインを越えてN末端の方へと広がり得る。従って、例えば360位以下で起こるE1切断、および例えば715位以下で起こるE2切断もまた、本発明により包含される。必要であるすべてのことは、切断されたE1ポリペプチドおよびE2ポリペプチドが、意図された目的にとって機能的なままであるということである。しかしながら、特に好ましい切断されたE1構造物は、ほぼアミノ酸300を越えて広がらないものである。最も好ましいものは、360位で終わるものである。好ましい切断されたE2構造物は、ほぼアミノ酸715位を越えて広がらないC末端切断を含むものである。特に好ましいE2切断は、アミノ酸715-730のうちのいずれか(例えば、725)の後で切断された分子である。

30

40

#### 【0066】

さらに、NS3領域、NS4領域、NS5a領域またはNS5b領域からのエピトープが、単離されたHCV抗原として使用され得る。特に好ましいのは、NS3/4a領域か

50

らのエピトープの使用である。HCVポリタンパク質のNS3/4a領域が記載され、そしてアミノ酸配列およびタンパク質の全体構造が、例えば、Yaoら, *Structure* (1999年11月) 7: 1353 - 1363; Saliら, *Biochem.* (1998) 37: 3392 - 3401およびBartenschlager, R., *J. Viral Hepat.* (1999) 6: 165 - 181で開示される。また、Dasmahapatraら, 米国特許第5, 843, 752号を参照。本イムノアッセイは、天然に存在するHCV粒子またはその感染産物で見出されるようなコンフォメーションで存在するNS3/4a領域に由来する少なくとも1つのコンフォメーションルエピトープを利用し得、このコンフォメーションは、NS3/4a遺伝子産物および/またはHCV感染被験体由来の生物学的サンプル中の抗体との抗原の免疫反応性、そして抗原の変性によるエピトープの免疫反応性の損失により通常示されるプロテアーゼ酵素活性の保存、および必要に応じてヘリカーゼ酵素活性の保存により明らかにされる。例えば、コンフォメーションルエピトープは、加熱、極度な酸性もしくは塩基性へとpHを変化することにより、または、公知の有機変性剤（例えば、ジチオスレイトール(DTT)）もしくは適当な界面活性剤の添加により破壊され得る。例えば、*Protein Purification Methods, a practical approach* (E. L. V. HarrisおよびS. Angal編, IRL Press) および上記のように処理されない産物と比較される変性した産物を参照のこと。

10

## 【0067】

プロテアーゼ活性およびヘリカーゼ活性は、当該分野で周知の標準的酵素アッセイを使用して決定され得る。例えば、プロテアーゼ活性は、当該分野で周知のアッセイを使用して決定され得る。例えば、Takeshitaら, *Anal. Biochem.* (1997) 247: 242 - 246; Kakiuchiら, *J. Biochem.* (1997) 122: 749 - 755; Saliら, *Biochemistry* (1998) 37: 3392 - 3401; Choら, *J. Virol. Meth.* (1998) 72: 109 - 115; Cerretaniら, *Anal. Biochem.* (1999) 266: 192 - 197; Zhangら, *Anal. Biochem.* (1999) 270: 268 - 275; Kakiuchiら, *J. Virol. Meth.* (1999) 80: 77 - 84; Fowlerら, *J. Biomol. Screen.* (2000) 5: 153 - 158およびKimら, *Anal. Biochem.* (2000) 284: 42 - 48を参照。プロテアーゼ活性を試験するための特に便利なアッセイが、以下の実施例で示される。

20

30

## 【0068】

同様に、ヘリカーゼ活性アッセイが当該分野で周知であり、そしてNS3/4aエピトープのヘリカーゼ活性が、例えばHsuら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998) 253: 594 - 599で記載されるようなELISAアッセイ、Kyonoら, *Anal. Biochem.* (1998) 257: 120 - 126で記載されるようなシンチレーション近接アッセイ系、例えばHichamら, *Anti viral Res.* (2000) 46: 181 - 193およびKwongら, *Methods Mol. Med.* (2000) 24: 97 - 116で記載されるようなハイスループットスクリーニングアッセイを使用して、ならびに当該分野で公知の他のアッセイ方法によって決定され得る。例えば、Khuら, *J. Virol.* (2001) 75: 205 - 214; Utamaら, *Virology* (2000) 273: 316 - 324; Paolinira, *J. Gen. Virol.* (2000) 81: 1335 - 1345; Preugschatra, *Biochemistry* (2000) 39: 5174 - 5183; Preugschatra, *Methods Mol. Med.* (1998) 19: 353 - 364およびHessonら, *Biochemistry* (2000) 39: 2619 - 2625を参照のこと。

40

## 【0069】

コンフォメーションNS3/4aエピトープが使用される場合、抗原の長さは、免疫反応性コンフォメーションルエピトープを維持するために十分である。しばしば使用される

50

抗原を含むポリペプチドは、ほとんど全長であるが、このポリペプチドは、また、例えば溶解性を向上させるために、または分泌を改善させるために、切断され得る。一般的に、NS3/4aで見出されるコンフォメーションエピトープは、細胞中の組み換え型ポリペプチドとして発現され、そして、このポリペプチドは、以下で詳細に記載されるように、望ましい形態で上記エピトープを提供する。

**【0070】**

NS3/4aポリペプチドについての代表的なアミノ酸配列が図3Aから図3D(配列番号1および配列番号2)で示される。図3Aから図3Dの2位~686位に示されるアミノ酸配列は、HCV-1のアミノ酸1027位~1711位に対応する。Metをコードする開始コドン(ATG)が1位として示される。さらに、HCV-1の1428位(図3のアミノ酸403位)に通常存在するThrは、Proに変異されており、そして、HCV-1の1429位(図3のアミノ酸404位)に通常存在するSerは、Ileに変異されている。しかしながら、N末端Metを持つもしくは持たないネイティブ配列、N末端Metを持つもしくは持たない記載されたアナログ、または、他のアナログおよびフラグメントのいずれかが、当該アッセイで使用され得、それは、上記エピトープが、プロテアーゼ活性、および必要に応じてヘリカーゼ活性が保持されるようなネイティブコンフォメーションを保持、または、回復させる方法を使用して産生される限り使用され得る。Dasmahapatraら、米国特許第5,843,752号およびZhangら、米国特許第5,990,276号は、ともにNS3/4aのアナログを記載する。

**【0071】**

NS3/4aのNS3プロテアーゼは、HCV-1に対して番号を付されたほぼ1027位~1207位、図3の2位~182位で見出される。NS3プロテアーゼの構造および活性部位の構造は公知である。例えば、De Francescoら、Antivir Ther.(1998)3:99-109; Kochら、Biochemistry(2001)40:631-640を参照のこと。通常許容されるネイティブ配列への変化は、この分子の活性部位の外側での変化である。特に、保存的置換をほとんど含まないかまたは保存的置換しか含まない、図3のアミノ酸1位~155位または2位~155位を維持することが望ましい。155位を越えて存在するアミノ酸は、より大きな変化を許容する。さらに、NS3/4a配列のフラグメントが使用される場合、これらのフラグメントは、一般的に、N末端Metありまたは無しで、少なくともアミノ酸1位~155位または2位~155位、好ましくはアミノ酸1位~175位または2位~175位、そして最も好ましくはアミノ酸1位~182位または2位~182位を含む。ヘリカーゼドメインは、HCV-1のほぼ1193位~1657位(図3の207位~632位)で見出される。従って、ヘリカーゼ活性が望まれる場合、上記分子のこの部分は、保存的な変化をほとんど含まずにか、または保存的变化しか含まずに、維持される。当業者は、NS3/4aの公知構造に基づく変化を許容する他の領域を容易に決定し得る。

**【0072】**

NS3/4aに由来するエピトープを含む多くの抗原(c33c領域、c200領域、c100領域および5-1-1領域に由来する抗原、ならびにNS3エピトープを含む融合タンパク質(例えば、c25)が挙げられるが、これらに限定されない)が公知である。

**【0073】**

他のHCV領域からのこれらのHCVエピトープおよび種々の他のHCVエピトープの記載については、例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号; Chienら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1992)89:1001-10015; Chienら、J.Gastroent.Hepatol.(1993)8:S33-39; Chienら、国際公開番号WO93/00365; Chien, D.Y., 国際公開番号WO94/01778および米国特許第6,280,927号および同第6,150,087号を参照のこと。

**【0074】**

本明細書で記載されるイムノアッセイもまた、エピトープ融合抗原（「M E F A」と呼ばれる）を利用し、例えば、国際公開番号W O 0 1 / 9 6 8 7 5および同W O 0 1 / 0 9 6 0 9および同W O 9 7 / 4 4 4 6 9および米国特許第6, 5 1 4, 7 3 1号および同第6, 4 2 8, 7 9 2号で記載される。当該アッセイでの使用のためのM E F Aは、図1および表1で示される種々のウイルス領域および上記のような種々のウイルス領域のいずれかに由来する複数のエピトープを含む。

【0075】

複数のH C V抗原は、天然には存在しない単一のアミノ酸連続鎖の一部である。従って、上記エピトープの直線順序は、それらが存在するゲノム中の直線順序とは異なる。本明細書中での使用のためのM E F Aの配列の直線順序は、最適な抗原性のために好ましく整列される。好ましくは、上記エピトープは、1つより多くのH C V株由来であり、従って、単一のアッセイにおいてH C Vの複数の株を検出する追加能力を提供する。従って、本明細書中での使用のためのM E F Aは、上記のポリタンパク質に由来する種々の免疫原性領域を含み得る。

10

【0076】

上述のように、特に好ましい実施形態では、N S 3 / 4 aエピトープは単離されたH C V抗原として使用される。この実施形態では、上記M E F Aは、N S 3 / 4 a領域に由来する少なくとも1つ以上のエピトープ（直線的またはコンフォメーションのいずれか）を含む。それゆえ、上記M E F Aは、1つ以上のH C V単離株からのN S 3 / 4 a領域に由来する複数の免疫優性エピトープを含み得る。複数のN S 3 / 4 aエピトープが、複数のエピトープ融合で使用される場合、それらは、同じエピトープであっても異なるエピトープであってもよい。あるいは、融合抗原は、N S 3 / 4 a領域に由来する1つ以上のエピトープ、ならびに、他のH C V領域からの主要な直線的エピトープ（例えば、H C Vコア配列、E 1配列、E 2配列、P 7配列、N S 4 b配列、N S 5 a配列およびN S 5 b配列であるが、これらに限定されない）を含み得る。

20

【0077】

N S 3 / 4 a領域に由来するエピトープを含むポリペプチドは、N S 3領域、N S 4 a領域およびN S 3 / 4 a領域の全部または一部を含むポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。これらの領域由来の多くのエピトープが公知であり、c 3 3 c領域、c 2 0 0領域およびc 1 0 0領域に由来する抗原、ならびに、N S 3エピトープを含む融合タンパク質（例えば、c 2 5）が挙げられるが、これらに限定されない。これらのN S 3エピトープおよび他のN S 3エピトープは当該アッセイで有用であり、そして、当該分野で公知であり、そして、例えば、H o u g h t o nら、米国特許第5, 3 5 0, 6 7 1号；C h i e nら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A ( 1 9 9 2 ) 8 9 : 1 0 0 1 1 - 1 0 0 1 5 ; C h i e nら、J . G a s t r o e n t . H e p a t o l . ( 1 9 9 3 ) 8 : S 3 3 - 3 9 ; C h i e nら、国際公開番号W O 9 3 / 0 0 3 6 5 ; C h i e n , D . Y . , 国際公開番号W O 9 4 / 0 1 7 7 8および米国特許第6, 3 4 6, 3 7 5号および同第6, 1 5 0, 0 8 7号で記載される。

30

【0078】

さらに、5 - 1 - 1として公知である抗原決定基は、部分的にN S 4 a領域（図1参照）内にあり、そして、当該アッセイでの使用のためのM E F Aで特に有用である。この抗原決定基は、H C Vの3つの異なるウイルス株上において3つの異なる形態で存在する。従って、本発明の好ましい実施形態では、5 - 1 - 1の3つすべての形態は、当該イムノアッセイで使用されるマルチエピトープ融合抗原上に存在する。

40

【0079】

M E F Aでの使用のためのさらなるH C Vエピトープとしては、上記された種々のエピトープのいずれか（例えば、E 2の超可変領域（例えば、アミノ酸3 8 4 - 4 1 0もしくは3 9 0 - 4 1 0にわたる領域）に由来するエピトープ、または、上記のようなこの領域由来のコンセンサス配列（G l y - S e r - A l a - A l a - A r g - T h r - T h r - S e r - G l y - P h e - V a l - S e r - L e u - P h e - A l a - P r o - G l y -

50

A l a - L y s - G l n - A s n ) ( 配列番号 7 ) ( H C V 1 型ゲノムのアミノ酸 3 9 0 - 4 1 0 のコンセンサ配列を表す ) が挙げられる。本発明の M E F A に存在する代表的な E 2 エピトープは、アミノ酸 3 9 0 - 4 4 4 にわたるハイブリッドエピトープを含み得る。このようなハイブリッド E 2 エピトープは、H C V E 2 のアミノ酸 4 1 1 - 4 4 4 のためのネイティブアミノ酸配列に融合しているアミノ酸 3 9 0 ~ 4 1 0 を表すコンセンサ配列を包含し得る。

#### 【 0 0 8 0 】

上述のように、上記抗原は、種々の H C V 株に由来し得る。H C V の複数のウイルス株が公知であり、そしてこれらの株のいずれかに由来するエピトープが、融合タンパク質で使用され得る。任意の所定の種の生物が、1つの個別の生物と別の生物とで変動することは周知であり、そしてさらに、ウイルスのような所定の生物が、多くの異なる株を持ち得ることも周知である。例えば、上述のように、H C V は、少なくとも 6 つの遺伝子型を包含する。これらの遺伝子型の各々は、等価な抗原決定基を含む。さらに具体的には、各々の株は、上記ウイルスのすべての株上に存在するがあるウイルスの株と別のウイルスの株とでわずかに異なる、多くの抗原決定基を含む。同様に、異なる H C V 株のコア領域からの等価な抗原決定基もまた存在し得る。一般的に、等価な抗原決定基は、アミノ酸配列に関して高い程度の相同性を有し、整列された場合にその相同性の程度は一般的に 3 0 % 以上、好ましくは 4 0 % 以上である。本発明の多コピーエピトープもまた、同じエピトープの正確なコピーである複数のコピーを含む。

10

#### 【 0 0 8 1 】

当該アッセイとともに使用するための代表的な M E F A が、図 5、図 7 および図 9 A ~ 図 9 C において示され、そして、国際公開番号 W O 0 1 / 9 6 8 7 5 , W O 0 1 / 0 9 6 0 9 , W O 9 7 / 4 4 4 6 9 および米国特許第 6 , 5 1 4 , 7 3 1 号および同第 6 , 4 2 8 , 7 9 2 号において記載される。本明細書中での使用のための代表的な M E F A としては、M E F A 3 , M E F A 5 , M E F A 6 , M E F A 7 . 1 , M E F A 1 2 , M E F A 1 3 および M E F A 1 3 . 1 と呼ばれる M E F A が挙げられる。これらの M E F A は単に代表的なものに過ぎず、そして、H C V ゲノムに由来する他のエピトープもまた当該アッセイとの使用が見出され、そしてこれらの M E F A または別の M E F A に組み込まれ得るということが理解されるべきである。

20

#### 【 0 0 8 2 】

M E F A 1 2 の D N A 配列および対応するアミノ酸配列が図 6 A から図 6 F ( 配列番号 3 および配列番号 4 ) において示される。M E F A 1 2 に関する一般的な構造式が図 5 で示され、それは以下の通りである：h S O D - E 1 ( 1 型 ) - E 2 H V R コンセンサス ( 1 a 型 ) - E 2 H V R コンセンサス ( 1 型および 2 型 ) - c 3 3 c ショート ( 1 型 ) - 5 - 1 - 1 ( 1 型 ) - 5 - 1 - 1 ( 3 型 ) - 5 - 1 - 1 ( 2 型 ) - c 1 0 0 ( 1 型 ) - N S 5 ( 1 型 ) - N S 5 ( 1 型 ) - コア ( 1 型 + 2 型 ) - コア ( 1 型 + 2 型 ) 。この多コピーエピトープとしては、H C V - 1 に対して番号を付された以下のアミノ酸配列 ( 以下で示されるアミノ酸の番号付けは、C h o o r a ( 1 9 9 1 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 2 4 5 1 - 2 4 5 5 で提供される番号付け指定に従い、ここで、アミノ酸番号 1 が、コア領域のコード配列によりコードされている最初のメチオニンである ) が挙げられる。スーパーオキシドジスムターゼのアミノ酸 1 位 - 6 9 位 ( タンパク質の組換え発現を高めるために使われる、切断された S O D ) ; E 1 領域からのポリタンパク質アミノ酸 3 0 3 位から 3 2 0 位 ; H C V - 1 a E 2 の超可変領域のコンセンサス配列を表す、上記ポリタンパク質のアミノ酸 3 9 0 位 - 4 1 0 位 ; H C V - 1 および H C V - 2 の E 2 超可変領域のコンセンサス配列を表す、領域 E 2 からのポリタンパク質のアミノ酸 3 8 4 位から 4 1 4 位 ; ヘリカーゼを規定する、H C V - 1 ポリタンパク質のアミノ酸 1 2 1 1 位 - 1 4 5 7 位 ; 5 - 1 - 1 からのエピトープのアミノ酸 1 6 8 9 位 - 1 7 3 5 位の 3 つのコピー ( H C V - 1 からのコピー、H C V - 3 からのコピー、そして H C V - 2 からのコピーであり、これらのコピーは、H C V の 3 つの異なるウイルス株からの等価な抗原決定基である ) ; H C V - 1 の H C V ポリペプチド c 1 0 0 、ポリタンパク

30

40

50

質のアミノ酸1901位 - 1936位 ; HCV - 1のNS5領域からのエピトープの2つの正確なコピー (各々は、HCVポリタンパク質のアミノ酸2278位から2313位を有する) ; そして、コア領域からの3つのエピトープの2つのコピー (HCV - 1からの2つのコピーおよびHCV - 2からの1つのコピーであり、これらのコピーは、HCV - 1のアミノ酸9位から53位およびのアミノ酸64位 - 88位およびHCV - 2のアミノ酸67位 - 84位により表される等価な抗原決定基である)。

【0083】

表2は、本明細書中の図6Aから図6F (配列番号3および配列番号4) に関してMEFA12中の種々のエピトープのアミノ酸位置を示す。表中の番号付けは、HCV - 1に関連する。Chooら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 2451 - 2455を参照。MEFA13およびMEFA13.1もまた、それぞれ、表3および表4で指示されたような改変を含んで、MEFA12について上で特定された一般式を共有する。

10

【0084】

【表 2】

表 2 MEFA 12				
mefa アミノ酸番号	5' 末端部位	エピトープ	hcv アミノ酸番号	株
1-69	<i>Nco</i> I	切断された hSOD		
72-89	<i>Mlu</i> I	E1	303-320	1
92-112	<i>Hind</i> III	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
113-143		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1, 2
146-392	<i>Spe</i> I	C33C ショート	1211-1457	1
395-441	<i>Sph</i> I	5-1-1	1689-1735	1
444-490	<i>Nru</i> I	5-1-1	1689-1735	3
493-539	<i>Cla</i> I	5-1-1	1689-1735	2
542-577	<i>Ava</i> I	C100	1901-1936	1
580-615	<i>Xba</i> I	NS5	2278-2313	1
618-653	<i>Bgl</i> II	NS5	2278-2313	1
654-741	<i>Nco</i> I	コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
742-829	<i>Bal</i> I	コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

10

20

30

【 0 0 8 5 】

【表 3】

表 3 MEFA 13				
mefa アミノ酸番号	5' 末端部位	エピトープ	hcv アミノ酸番号	株
1-156	<i>Nco</i> I	変異型 hSOD (アミノ酸 70-72, ALA)		
161-178	<i>Mlu</i> I	E1	303-320	1
181-201	<i>Hind</i> III	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
202-232		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1, 2
235-451		C33C ショート	1211-1457	1
454-500	<i>Hind</i> III	5-1-1 PImut*	1689-1735	1
503-549	<i>Nru</i> I	5-1-1 PImut*	1689-1735	3
552-598	<i>Cla</i> I	5-1-1 PImut*	1689-1735	2
601-636	<i>Ava</i> I	C100	1901-1936	1
639-674	<i>Xba</i> I	NS5	2278-2313	1
677-712	<i>Bgl</i> II	NS5	2278-2313	1
713-800		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
801-888		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

【 0 0 8 6 】

\* 5 - 1 - 1 エピトープは、NS 3 / 4 a 組み換えタンパク質により標的とされる、可能な切断部位 (CS または CA) を除去することにより改変される。CS または CA の代わりに、この配列は PI に変えられている。

【 0 0 8 7 】

10

20

30

40

【表4】

表4 MEFA 13.1				
mefaアミノ酸番号	5'末端部位	エピトープ	hcvアミノ酸番号	株
1-86	<i>NcoI</i>	変異型 hSOD (アミノ酸 70-72, ALA)		
89-106	<i>MluI</i>	E1	303-320	1
109-129	<i>HindIII</i>	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
130-160		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1, 2
163-379		C33C ショート	1211-1457	1
382-428	<i>HindIII</i>	5-1-1 PImut*	1689-1735	1
431-477	<i>NruI</i>	5-1-1 PImut*	1689-1735	3
480-526	<i>ClaI</i>	5-1-1 PImut*	1689-1735	2
529-564	<i>AvaI</i>	C100	1901-1936	1
567-602	<i>XbaI</i>	NS5	2278-2313	1
605-640	<i>BglIII</i>	NS5	2278-2313	1
641-728		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
729-816		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

## 【0088】

\* 5-1-1 エピトープは、NS3/4a 組み換えタンパク質により標的とされる、可能な切断部位 (CS または CA) を除去することにより改変される。CS または CA の代わりに、配列は PI に変えられている。

## 【0089】

別の代表的な多エピトープ融合抗原である、MEFA7.1 の DNA 配列および対応するアミノ酸配列が、図8A から図8F (配列番号5 および配列番号6) において示されている。MEFA7.1 についての一般的な構造式が図7で示され、そしてそれは、以下の通りである: hSOD - E1 (1型) - E2 HVR コンセンサス (1a型) - E2 HVR コンセンサス (1型および2型) - ヘリカーゼ (1型) - 5-1-1 (1型) - 5-1-1 (3型) - 5-1-1 (2型) - c100 (1型) - NS5 (1型) - NS5 (1

10

20

30

40

50

型) - コア ( 1 型 + 2 型 ) - コア ( 1 型 + 2 型 )。この多コピーエピトープは、HCV - 1 に関連して番号を付された、Chooら ( 1991 ) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 88 : 2451 - 2455 で提供されている番号付け指定に従い、以下に示されるアミノ酸の番号付けは、アミノ酸番号 1 が、コア領域のコード配列によりコードされている最初のメチオニンである、以下のアミノ酸配列を含む：スーパーオキシドジスムターゼ ( 上記タンパク質の組み換え体発現を高めるために使われる、SOD ) のアミノ酸 1 - 156 ; E1 領域からのポリタンパク質のアミノ酸 303 から 320 ; HCV - 1 a E2 の超可変領域のコンセンサス配列を表す、ポリタンパク質のアミノ酸 390 - 410 ; HCV - 1 および HCV - 2 の E2 の超可変領域のコンセンサス配列を表す領域 E2 からのポリタンパク質のアミノ酸 384 から 414 ; ヘリカーゼを規定する、HCV - 1 ポリタンパク質のアミノ酸 1193 - 1658 ; 5 - 1 - 1 のアミノ酸 1689 - 1735 からのエピトープの 3 つのコピー ( HCV - 1 からのもの、HCV - 3 からのもの、そして HCV - 2 からのものであり、それらのコピーは HCV の 3 つの異なるウイルス株からの等価な抗原決定基である ) ; HCV - 1 の HCV ポリペプチド C100、ポリタンパク質のアミノ酸 1901 - 1936 ; HCV - 1 の NS5 領域からのエピトープの 2 つの正確なコピー ( 各々が HCV ポリタンパク質のアミノ酸 2278 から 2313 を有する ) ; ならびに、コア領域からのエピトープの 2 つのコピー ( HCV - 1 からの 1 つおよび HCV - 2 からの 1 つ )、それらのコピーは HCV - 1 のアミノ酸 9 - 32、39 - 42 およびアミノ酸 64 - 88 および HCV - 2 のアミノ酸 67 - 84 により表される等価な抗原決定基である。

10

20

【 0090 】

表 5 は、本明細書中図 8 A から図 8 F ( 配列番号 5 および配列番号 6 ) に関する種々のエピトープのアミノ酸位置を示す。

【 0091 】

【表5】

表5 MEFA 7.1				
mefaアミノ酸番号	5'末端部位	エピトープ	hcvアミノ酸番号	株
1-156	<i>Nco1</i>	hSOD		
159-176	<i>EcoR1</i>	E1	303-320	1
179-199	<i>Hind111</i>	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
200-230		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1+2
231-696	<i>Sal1</i>	ヘリカーゼ	1193-1658	1
699-745	<i>Sph1</i>	5-1-1	1689-1735	1
748-794	<i>Nru1</i>	5-1-1	1689-1735	3
797-843	<i>Cla1</i>	5-1-1	1689-1735	2
846-881	<i>Ava1</i>	C100	1901-1936	1
884-919	<i>Xba1</i>	NS5	2278-2313	1
922-957	<i>Bgl11</i>	NS5	2278-2313	1
958-1028	<i>Nco1</i>	コア エピトープ	9-32, 39-42 64-88 67-84	1 1 2
1029-1099	<i>Bal1</i>	コア エピトープ	9-32, 39-42, 64-88 67-84	1 1 2

## 【0092】

あるアッセイ形式において、上記サンプルは、以下でさらに記載されるように、固体支持体と合わされる。この固体支持体は、単離されたHCV抗原（例えば、1以上のNS3/4aコンフォメーションナルエピトープ）、または、上記のようなMEFA（このMEFAは、HCV抗原と同じ上記ポリタンパク質の領域に由来する（例えば、NS3/4a領域由来）1以上のエピトープを含む）のいずれかを含む。上述のように、このようなエピトープを含む多くの抗原が公知であり、この抗原としては、c33c領域に由来する抗原およびc100領域に由来する抗原、ならびに、NS3エピトープ（例えば、c25）、およびNS4領域内に部分的に存在する5-1-1として公知である抗原決定基を含む融合タンパク質（図1を参照）が挙げられるが、これらに限定されない。これらのNS3/4aエピトープおよび他のNS3/4aエピトープは、本アッセイで有用であり、そして、当該分野で公知であり、例えば、Houghtonら，米国特許第5,350,671号；Chienら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:

10

20

30

40

50

10011-10015; Chienら, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33-39; Chienら, 国際公開番号WO93/00365; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778ならびに米国特許第6,346,375号および同第6,150,087号において記載される。

【0093】

サンプルがHCVに感染している場合、固体支持体上に存在するエピトープに対するHCV抗体は、固体支持体構成部分に結合する。生物学的サンプルに由来する捕捉されたHCV抗体とも反応する検出可能に標識された抗原もまた、液相中に添加される。例えば、固体支持体に結合している抗原が、NS3/4aコンフォメーションナルエピトープである場合、液相中で使用される検出可能に標識された抗原は、NS3/4aエピトープを含むMEFAである。固体支持体に結合している抗原が、NS3/4aエピトープを含むMEFAである場合、液相中で使用される検出可能に標識された抗原は、コンフォメーションNS3/4aエピトープを含む。

10

【0094】

本発明下での代表的なアッセイが、図2において示される。この図で示されるように、上記固体支持体は、コンフォメーションNS3/4aエピトープを含む。上記生物学的サンプルは、固体支持体に添加される。サンプル中に存在する上記NS3/4aエピトープに対するHCV抗体は、固体支持体上のNS3/4aコンフォメーションナルエピトープに結合する。その後、セイヨウワサビエルオキシダーゼ(HRP)標識化MEFA12(サンプル抗体が結合するエピトープを含む)が、添加される。MEFA12は、NS3/4aコンフォメーションナルエピトープによっても結合される抗体に結合する。未結合の成分は洗い流され、そして上記標識の検出は、HCV感染の存在を示す。

20

【0095】

上述の抗原/抗体/抗原サンドウィッチアッセイは、サンプル抗体に結合する2つの抗原の使用が大量のサンプルの使用を可能にするので有利である。さらに、当該アッセイは迅速に完了され得る。

【0096】

(HCVイムノアッセイでの使用のための抗原の産生)

上述のように、本発明の分子は、一般的に組み換えにより産生される。従って、本発明との使用のためのHCV抗原をコードするポリヌクレオチドは、分子生物学の標準技術を使用して生成され得る。例えば、上記分子をコードするポリヌクレオチド配列は、組換え方法を使用して(例えば、遺伝子を発現する細胞からcDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、または、上記を含むことが公知であるベクターから遺伝子を得ることにより)得られ得る。さらに、望ましい遺伝子は、当該分野で記載される技術(例えば、Houghtonら, 米国特許第5,350,671号)を使用してウイルス核酸分子から直接単離され得る。目的の遺伝子はまた、クローニングよりもむしろ合成により産生され得る。当該分子は、特定の配列についての適切なコドンを用いて設計され得る。その後、完全な配列が、標準的な方法により調製されたオーバーラップしているオリゴヌクレオチドから組み立てられ、そして完全なコード配列へと組み立てられる。例えば、Edge(1981)Nature 292:756; Nambairら(1984)Science 223:1299; およびJayら(1984)J. Biol. Chem. 259:6311を参照のこと。

30

40

【0097】

従って、特定のヌクレオチド配列が、望ましい配列を保有するベクターから得られ得るか、または、当該分野で公知である種々のオリゴヌクレオチド合成技術(例えば、適切な場合は、部位特異的変異およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術)を完全、または部分的に使用して合成され得る。例えば、Sambrook(前出)を参照。特に、望ましい配列をコードするヌクレオチド配列を得る1つの方法は、通常の自動化されたポリヌクレオチド合成装置で産生されるオーバーラップした合成オリゴヌクレオチドの相補対をアニーリングし、その後、適切なDNAリガーゼを用いる連結、および、(PVR)を介す

50

る連結されたヌクレオチド配列の増幅を行うことにより、得られる。例えば、Jayaramanら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088を参照のこと。さらに、オリゴヌクレオチド特異的合成(Jonesら(1986) Nature 54:75-82)、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド特異的変異誘発(Riechmannら(1988) Nature 332:323-327およびVerhoeyenら(1988) Science 239:1534-1536)および $T_4$  DNAポリメラーゼを使用するギャップを有するオリゴヌクレオチドの酵素的充填(Queenら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033)が、本発明下で使用されて、改変した抗原結合能力もしくは増強した抗原結合能力、および/または減少した免疫原性を有する分子が提供され得る。

10

## 【0098】

一旦、コード配列が調製または単離されれば、このような配列は、適切な任意のベクターまたはレプリコンにクローニングされ得る。多数のクローニングベクターが、当業者に公知であり、そして、適切なクローニングベクターの選択は、選択事項である。適切なベクターとしては、適切な制御エレメントと結合した場合に複製可能である、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、またはウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0099】

次にコード配列は、発現のために使用される系に依存して、適当な制御エレメントの制御下に、配列される。従って、コード配列は、目的のDNA配列が適当な形質転換体によりRNAに転写されるように、プロモーター、リボソーム結合部位(細菌発現のため)および、必要に応じて、オペレーターの制御下に、配列され得る。コード配列は、翻訳後のプロセッシングで宿主により後ほど除去され得る、シグナルペプチドもしくはリーダー配列を含んでも含まなくてもよい。例えば、米国特許第4,431,739号;同第4,425,437号;同第4,338,397号を参照。

20

## 【0100】

制御配列に加え、宿主細胞の成長に関連して配列の発現の調節を可能にする調節配列を加えることが望ましいかもしれない。調節配列は、当業者に公知であり、そして、例としては、調節化合物の存在を含む化学的刺激もしくは生理学的刺激に反応してオンもしくはオフになる遺伝子の発現を引き起こす配列が挙げられる。他のタイプの調節エレメントもまた、ベクター中に存在し得る。例えば、エンハンサーエレメントは、本明細書では、構築物の発現レベルを増加させるために使用され得る。例としては、SV40早期遺伝子エンハンサー(Dijkemaら(1985)EMBO J. 4:761)、ラウス肉腫ウイルスのLTRに由来するエンハンサー/プロモーター(Gormanら(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777)、そして、CMVイントロンA配列中に含まれるエレメント(米国特許第5,688,688号)のようなヒトCMVに由来するエレメント(Boshartら(1985)Cell 41:521)が挙げられる。発現カセットは、さらに、適当な宿主細胞中での自律的な複製のための複製起点、1またはそれ以上の選択マーカー、1またはそれ以上の制限部位、高コピー数のための能力および強いプロモーターを含み得る。

30

40

## 【0101】

発現ベクターは、特定のコード配列が、適当な調節配列とともにベクター中に配置され、そしてコード配列が制御配列の「制御」下で転写されるように(すなわち、制御配列でDNA分子に結合するRNAポリメラーゼがコード配列を転写する)、コード配列が制御配列に対して位置決めおよび配向されるように構築される。目的の分子をコードする配列の修飾は、この目的を達成するために望ましいかもしれない。例えば、いくつかのケースでは、適当な配向で制御配列に結合し得るような配列を修飾すること;すなわち、リーディングフレームを維持することが必要になり得る。制御配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入の前にコード配列に連結され得る。あるいは、コード配列は、すでに制御配

50

列および適当な制御部位を含む発現ベクター内に直接的にクローン化され得る。

【0102】

上述のように、目的の抗原の変異体またはアナログを産生することもまた望ましいかもしれない。これは、特にNS3/4aの場合に当てはまる。そのようにする方法が、例えば、Dasmahapatraら、米国特許第5,843,752号およびZhangら、米国特許第5,990,276号に記載される。本アッセイでの使用のためのこのHCVタンパク質および他のHCVタンパク質の変異体またはアナログが、目的のポリペプチドをコードする配列の一部の欠失により、および配列の挿入により、および/または配列内の1以上のヌクレオチドの置換により調製され得る。ヌクレオチド配列を修飾する技術（例えば、部位特異的な突然変異導入など）が、当業者に周知である。例えば、Sambrookら、前出；Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448；Geisselsoderら(1987) BioTechniques 5:786；ZollerおよびSmith(1983) Methods Enzymol. 100:468；Dalbie-McFarlandら(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409を参照のこと。

10

【0103】

その分子は、昆虫、哺乳類、細菌、ウイルスおよび酵母発現系を含む広範囲の系で発現され得、すべて当該分野で周知である。

【0104】

例えば、バキュロウイルス系のような昆虫細胞発現系が、当業者に公知であり、例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)で記載される。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料および方法は、特に、Invitrogen, San Diego CA (「MaxBac」kit)からのキット形態で市販されている。同様に、細菌および哺乳類細胞発現系が当該分野で周知であり、例えば、Sambrookら(前出)で記載されている。酵母発現系もまた、当該分野で公知であり、例えば、Yeast Genetic Engineering (Barrら編集, 1989) Butterworths, Londonに記載される。

20

【0105】

上記の系での使用のための多くの適当な宿主細胞もまた、公知である。例えば、哺乳類細胞株が当該分野で公知であり、そして、American Type Culture Collection (ATCC)から入手可能である不死化細胞株（例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト胚性腎細胞、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、Madin-Darbyウシ腎臓(「MDBK」)細胞、ならびにその他の細胞であるが、これらに限定されない)が挙げられる。同様に、E. coli、Bacillus subtilisおよびStreptococcus spp.のような細菌宿主が、本発現構築物で使用され得る。本発明において有用な酵母宿主としては、特に、Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans, Candida maltosa, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Pichia guillierimondii, Pichia pastoris, Schizosaccharomyces pombeおよびYarrowia lipolyticaが挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターでの使用のための昆虫細胞としては、特に、Aedes aegypti, Autographa californica, Bombyx mori, Drosophila melanogaster, Spodoptera frugiperdaおよびTrichoplusia niが挙げられる。

30

40

【0106】

50

目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、宿主細胞ゲノム中に安定に組み込まれ得るか、または本分野で周知の種々の遺伝子送達技術を使用する適当な宿主細胞中の安定なエピソームエレメント上で維持され得る。例えば、米国特許第5,399,346号を参照。

#### 【0107】

発現系および選択される宿主に依存して、本分子は、タンパク質が発現される条件下、上記の発現ベクターにより変換される宿主細胞の成長により産生される。発現したタンパク質はその後宿主細胞から単離および精製される。もし、発現系が、増殖培地液中にタンパク質を分泌するならば、産生物は培地液から直接精製され得る。もし、分泌されないならば、産生物は、細胞溶解物から単離され得る。適当な増殖条件および回収方法の選択は、当業者の技術内である。

10

#### 【0108】

様々なHCV抗原の組み換え型生産が記載されている。例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号；Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33-39；Chienら、国際公開番号WO93/00365；Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778を参照。

#### 【0109】

(免疫診断アッセイ)

ひとたび産生されれば、上記HCV抗原は、本イムノアッセイで使用される適当な固体支持体上に配置される。この発明のために、固体支持体は不溶性マトリックスである任意の材料であり得、そして、剛体表面または半剛体表面を持ち得る。例示的な固体支持体としては、ニトロセルロース(例えば、メンブレンまたはマイクロタイターウェルの形態において)；ポリビニルクロライド(例えば、シートまたはマイクロタイターウェル)；ポリスチレンラテックス(例えば、ビーズまたはマイクロタイタープレート)；ポリビニリデンフルオライド(polyvinylidene fluoride)；ジアゾ化された紙；ナイロンメンブレン；活性化されたビーズ、磁気反応性ビーズなどのような基材が挙げられるが、これらには限定されない。特定の支持体としては、プレート、ペレット、ディスク、キャピラリー、中空ファイバー、針、ピン、固体ファイバー、セルロースビーズ、孔の開いたガラスビーズ、シリカゲル、必要に応じてジビニルベンゼンと架橋されたポリスチレンビーズ、移植された共重合ビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、必要に応じてN-N'-ビス-アクリロイルエチレンジアミンと架橋したジメチルアクリルアミドビーズ、および疎水性ポリマーでコーティングされたガラス粒子が挙げられる。

20

30

#### 【0110】

望まれる場合、固体支持体に添加され得る分子は、スチレンまたはアクリレート部分を生成するために容易に官能性を持つことができ、従って、ポリスチレン、ポリアクリレート、または、ポリイミド、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリビニル、ポリジアセチレン、ポリフェニレン-ビニレン、ポリペプチド、ポリサッカライド、ポリスルホン、ポリピロール、ポリイミダゾール、ポリチオフエン、ポリエーテル、エポキシ、石英ガラス、シリカゲル、シロキサン、ポリリン酸、ハイドロゲル、アガロース、セルロースなどのような他のポリマーへの分子の取り込みを可能にする。

40

#### 【0111】

1つの文脈において、固体支持体は、分子が十分に支持体に固定されるような適当な結合条件化、単離されるHCV抗原もしくはMEFA(ここでは「固相構成要素」と呼ばれる)のいずれかと、最初に反応する。時々、支持体に対する固定は、より良い固相結合特性で最初にタンパク質に抗原をカップリングさせることにより増強され得る。適当なカップリングタンパク質としては、ウシ血清アルブミン(BSA)を含む血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、卵白アルブミン、および当業者にとって周知である他のタンパク質のような巨大分子が挙げられるが、これらに限定されない。分子を支持体に結合させるために使用され得る他の試薬は、ポリ

50

サッカライド、ポリ酢酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどが挙げられる。このような分子およびこれらの分子を抗原にカップリングさせるこのような方法は、当業者にとって周知である。例えば、Brinkley, M. A. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 2-13; Hashidaら (1984) *J. Appl. Biochem.* 6: 56-63; ならびに Anjaneyulu および Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30: 117-124 を参照。

【0112】

固体支持体を固相構成要素と反応させた後、固定化されない任意の固相構成要素は、洗浄により支持体から除去され、そして、支持体に結合した構成要素は、その後、適切な結合条件下、HCV抗体（本明細書において「リガンド分子」と呼ばれる）を含むと疑われる生物学的サンプルと接触する。任意の非結合リガンド分子を除去するために洗浄した後、2番目のHCV抗原（固体支持体に結合する抗原に依存して、単離されたHCV抗原またはMEFAのいずれか）が適切な結合条件下で添加される。この2番目の抗原は、本明細書では「液相構成要素」と呼ばれる。添加される抗原は、上述のように検出可能なラベルを含み、そして、支持体に結合する抗原と反応したリガンド分子と結合する。従って、リガンド分子は、両方の固相構成要素、ならびに液相構成要素に結合する。非結合のリガンド分子および液相構成要素は、洗浄により除去される。ラベルの存在は、それゆえに、生物学的サンプル中のHCV抗体の存在を示す。

10

【0113】

より具体的には、マイクロタイタープレートのウェルが固相構成要素でコーティングされるELISA法が、使用され得る。リガンド分子を含むまたは含むことが疑わしい生物学的サンプルは、その後コーティングされたウェルに添加される。リガンド分子が固定された固相構成要素に結合することを可能にするのに十分なインキュベーションの期間の後、プレートは、非結合部分を除去するために洗浄され得、そして、検出可能なラベル化された液相構成要素が添加される。これらの分子は、捕捉されるサンプル抗体のいずれかと反応することを可能にされ、プレートは洗浄され、そしてラベルの存在が当該分野において周知の方法を使用することで検出される。

20

【0114】

上述のようなイムノアッセイを行うために、結合した抗原を有するイムノアッセイ固体支持体を含む上述のアッセイ試薬、ならびに捕捉されたサンプルと反応する抗原が、適当な使用説明書および他の必要な試薬を備えるキットにおいて提供され得る。本キットはまた、使用される特定のイムノアッセイに依存して、適当なラベルおよび他の包装された試薬および材料（すなわち、洗浄緩衝液など）を含み得る。上述のような標準的なイムノアッセイは、これらのキットを使用することで実施され得る。

30

【0115】

（III. 実験）

以下が、本発明を実施するための具体的な実施形態の実施例である。実施例は、例示の目的のためだけに提供され、そして、どの点においても、本発明の範囲を制限することを意図しない。

40

【0116】

使用される数字（例えば、量、温度など）に関して、正確さを確実にするために努力がなされているが、もちろん、いくつかの実験誤差および偏差は認められるべきである。

【実施例】

【0117】

（実施例1）

（ThrのProへの置換およびSerのIleへの置換を用いたNS3/4aコンフォメーションエピトープの産生）

NS3/4aのコンフォメーションエピトープは、以下のようにして得られた。このエピトープは図3Aから図3D（配列番号1および配列番号2）で特定される配列を持ち

50

、そして、403位(HCV-1全長配列のアミノ酸1428)および404位(HCV-1全長配列のアミノ酸1429)で、天然型配列と異なる。具体的には、天然型配列の1428位で通常生じるThrは、Proに突然変異し、そして、天然型配列の1429位で生じるSerは、Ileに突然変異する。

【0118】

具体的には、使用される酵母発現ベクターは、pBS24.1であった。この酵母発現ベクターは、酵母内での自律複製のための2μ配列およびインバーテッドリピート(IR)、転写終結を確実にする因子ターミネーター、および選択のための酵母leu2-dおよびURA3を含む。ColE1複製起点および-ラクタマーゼ遺伝子もまた、E.coli中での増殖および選択のために存在する(Pichuanterら(1996)「Expression of Heterologous Gene Product in Yeast」Protein Engineering: A Guide to Design and Production, Chapter 5. J.L. ClellandおよびC. Craik編集, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. pp. 129-161)。

10

【0119】

本イムノアッセイで使用される代表的なNS3/4aエピトープをコードするプラスミドpd.hcv1a.ns3ns4aPIは、以下のように産生された。2工程の手順が使用された。最初に、以下のDNA片が一緒に連結された:(a)5' HindIIIクロニング部位、引き続いて配列ACAAAACA(A配列番号8)、イニシエーターATG、およびアミノ酸1027で始まり、そしてアミノ酸1046でBglI部位に続くHCV1aのためのコドンを提供する合成オリゴヌクレオチド;(b)pAcHLTns3ns4aPIからの683bp BglI-Clal制限フラグメント(アミノ酸1046-1274をコードする);および(c)脱リン酸化され、そしてゲル精製されたHindIIIおよびClalで消化されたpSP72ベクター(Promega, Madison, WI, GenBank/EMBLアクセッションナンバーX65332)。プラスミドpAcHLTns3ns4aPIは、pAcHLTという、BD Pharmingen(San Diego, CA)から市販されているバキュロウイルス発現ベクターに由来する。具体的には、pAcHLT EcoRI-PstIベクター、ならびに以下のフラグメントが調製された:HCV-1ゲノムのアミノ酸1027-1336に対応するEcoRI-AlwNI, 935bp; HCV-1ゲノムのアミノ酸1336-1419に対応するAlwNI-SacII, 247bp; HCV-1ゲノムのアミノ酸配列1449-1509に対応するHinfI-BglI, 175bp; HCV-1ゲノムのアミノ酸1510-1711に対応するBglI-PstI, 619bp、および転写終結コドン。HCV-1ゲノムのアミノ酸1420-1448に対応し、そして、PI突然変異(Proに突然変異したThr-1428、Ileに突然変異したSer-1429)を含む91bpのフラグメントを合成的に生じるSacII-HinfIは、175bpのHinfI-BglIフラグメントおよび上述の619bpのBglI-PstIフラグメントと連結され、そして、SacIIおよびPstIで消化されるpGEM-5Zf(+)ベクター中にサブクロニングされた。pGEM-5Zf(+)は、市販のE.coliベクター(Promega, Madison, WI, GenBank/EMBLアクセッションナンバーX65308)である。コンピテントHB101細胞の形質転換、個々のクローンのミニスクリーンアッセイおよび配列検証の後、pGEM5.PIクローン2からの885bpのSacII-PstIフラグメントは、ゲル精製された。このフラグメントは、上述のEcoRI-AlwNIの935bpフラグメント、AlwNI-SacIIの247bpフラグメントおよびpAcHLT EcoRI-PstIベクターと連結された。結果としての構造物は、pAcHLTns3ns4aPIと命名された。

20

30

40

【0120】

上記の連結混合物は、HB-101コンピテント細胞中に形質転換され、そして100

50

$\mu$  / ml アンピシリンを含むルリア寒天プレート上で培養された。個々のクローンの Mini prep 解析は、陽性であると推定され、それらの2つが増幅された。pSP72-1aHC、クローン#1およびクローン#2のためのプラスミドDNAは、Qiagen Maxi prep キットを用いて調製され、そして配列が決定された。

#### 【0121】

次に、以下のフラグメントが、ともに連結された：(a) pSP72-1aHC #1からの761bpのHindIII - ClaIフラグメント (pSP72-1aHCは以下のと共に連結されることにより生成された：HindIIIおよびClaIで消化されたpSP72、5' HindIIIクローニング部位、引き続き配列ACAAAACA (配列番号8)、開始コドンATG、そして、アミノ酸1027で始まり、アミノ酸1046でBglI部位が続くHCV1aのためのコドン、そしてpACHLTns3ns4aPIからの683bpのBglII - ClaI制限フラグメント (アミノ酸1046 - 1274をコードする) を与える合成オリゴヌクレオチド)；(b) 酵母ハイブリッドプロモーターADH2 / GAPDHのための1353bpのBamHI - HindIIIフラグメント；(c) pACHLTns3ns4aPIからの1320bpのClaI - SalIフラグメント (Proに突然変異したThr1428およびIleに突然変異したSer1429をもつHCV1aアミノ酸1046 - 1711をコードする)；ならびに(d) BamHIおよびSalIで消化され、脱リン酸化され、そしてゲル精製されたpBS24-1酵母発現ベクター。連結混合物は、コンピテントなHB101中に形質転換され、そして100  $\mu$  / ml アンピシリンを含むルリア寒天プレート上で培養された。個々のコロニーのMini prep 解析によって、ADH2 / GAPDHプロモーター、開始コドンATG、およびProに変異したThr1428 (図3A - 図3Dのアミノ酸403位) およびIleに突然変異したSer1429 (図3A - 図3Dのアミノ酸404位) を持つアミノ酸1027 - 1711 (図3A - 図3Dのアミノ酸1 - 686として示される) からのHCV1a NS3 / 4aが含まれた、予想される3446bp BamHI - SalI挿入を持つクローンを同定した。構築物は、pd.HCV1a.n3ns4aPIと命名された (図4を参照)。

10

20

#### 【0122】

S. cerevisiae 株AD3は、pd.HCV1a.n3ns4aPIを用いて形質転換され、そして1つの形質転換体は、培地中のグルコースの枯渇の後、発現のために確認された。クマシーブルーにより検出され、そしてNS3のヘリカーゼドメインに対するポリクローナル抗体を使用するイムノプロット解析により確認されるように、組み換え型タンパク質は、酵母中で高レベルで発現された。

30

#### 【0123】

(実施例2)

(NS3 / 4aコンフォメーションナルエピトープの精製)

NS3 / 4aコンフォメーションナルエピトープは以下のように精製された。NS3 / 4aエピトープを発現する上記からのS. cerevisiae 細胞は、上述のように採取された。その細胞は、溶解緩衝液 (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1  $\mu$  M ペプスタチン, 1  $\mu$  M ロイペプチン) 中で懸濁され、そして、細胞：緩衝液：0.5 mm ガラスビーズが1 : 1 : 1の割合で、Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland) またはガラスビーズを使用する等価な装置で溶解された。

40

#### 【0124】

溶解物は、4 で30分間30100 x gで遠心分離され、そして不溶性タンパク質画分を含むペレットが、緩衝液を洗浄するために添加され (6 ml / g 細胞ペレットの開始重量)、そして室温で15分間揺すり動かされた。洗浄緩衝液は、50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 8.0, 0.3 M NaCl, 5 mM -メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.05% オクチルグルコシド, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1  $\mu$  M ペプスタチン, 1  $\mu$  M ロイペプチンからなる。細胞破片は、4 で30分

50

間 30100 × g で遠心分離することにより除去された。上清は捨てられ、そしてペレットは確保された。

【0125】

タンパク質は、以下のようにペレットから抽出された。6 ml / g 抽出緩衝液が添加され、そして室温で15分間揺すり動かされた。抽出緩衝液は、50 mM Tris pH 8.0, 0.1 M NaCl, 5 mM -メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 μM ペプスタチン, 1 μM ロイペプチンからなる。これは、4 で30分間30100 × g で遠心分離された。上清が保持され、そして、硫酸アンモニウムが、以下の式を使用して、17.5%にまで添加された：  
 上清の容量 (ml) 掛ける x% 硫酸アンモニウム (1 - x% 硫酸アンモニウム) = 上清に添加する 4.1 M 飽和硫酸アンモニウムの ml。  
 氷上で攪拌しながら、硫酸アンモニウムを添加し、そして、溶液を、10分間氷上で攪拌した。溶液は、4 で30分間17700 × g で遠心分離され、そして、ペレットが確保され、48時間まで2 から8 で保存された。

10

【0126】

ペレットは、以下のように4 で再懸濁され、そしてPoly Uカラム (Poly U Sepharose 4B, Amersham Pharmacia) に通された。ペレットは、ペレット重量1グラムにつき6 ml のPoly U平衡バッファーで再懸濁された。平衡バッファーは、25 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM DTT (新たに添加される), 10% グリセロール, 1.2 オクチルグルコシドからなる。溶液は、15分間4 で揺すり動かされ、そして、4 で30分間31000 × g で遠心分離された。

20

【0127】

Poly Uカラム (ペレットの開始重量1グラムにつき1 ml の樹脂) が調製された。直線的流量速度は、60 cm / hr であり、そして、パッキング流量速度は、60 cm / hr の133%であった。カラムは、平衡緩衝液で平衡化され、そして再懸濁された硫酸アンモニウムペレットの上清が平衡カラム上にロードされた。カラムは、平衡緩衝液でベースラインまで洗浄され、そしてタンパク質は以下のPoly U溶離緩衝液で、段階的溶出により溶出された：25 mM HEPES pH 8.0, 1 M NaCl, 5 mM DTT (新たに添加される), 10% グリセロール, 1.2 オクチルグルコシド。カラム溶出液は、SDS-PAGEに通され (クマシー染色され)、そして、アリコートをして-80 で凍結し、保管した。NS3/4a エピトープの存在は、NS3 プロテアーゼドメインに対して指向されたポリクローナル抗体および5-1-1 エピトープ (HCV 4a) に対するモノクローナル抗体を使用することで、ウェスタンブロットにより確認された。

30

【0128】

さらに、プロテアーゼ酵素活性は、以下のように精製の間、モニタリングされた。NS4A ペプチド (KKGSVVIVGRIVLSGKPAIIPKK) (配列番号9)、および、NS3/4a コンフォメーションエピトープを含むサンプルは、90 μl の反応緩衝液 (25 mM Tris, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% グリセロール, 0.05 n-ドデシル B-D-マルトシド, 5 mM DTT) で希釈され、そして室温で30分間混合された。90 μl の混合物が、マイクロタイタープレート (Costar, Inc., Corning, NY) に添加され、そして10 μl のHCV基質 (AnaSpec, Inc., San Jose CA) が添加された。そのプレートは、混合され、そしてFluostar プレートリーダー上で読まれた。結果は、1分毎の相対的蛍光発光単位 (RFU) として表示された。

40

【0129】

これらの方法を使用することで、1 M NaCl 抽出の産物は、3.7 RFU / 分の活性を含み、硫酸アンモニウム沈殿は、7.5 RFU / 分の活性を有し、そしてPoly U 精製の産物は、18.5 RFU / 分の活性を有した。

【0130】

50

(実施例3)

(NS3/4aコンフォメーションナルエピトープ 対 変性NS3/4aの免疫反応性)

上述のように産生されるNS3/4aコンフォメーションナルエピトープの免疫反応性は、NS3/4aコンフォメーションナルエピトープ調整液に2%の最終濃度になるようにSDSを添加することにより変性されるNS3/4aと比較された。変性したNS3/4aおよびコンフォメーションナルNS3/4aは、上述のようにマイクロタイタープレート上に、コーティングされた。c200抗原(Hepatology(1992)15:19-25, ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jerseyで入手可能)もまた、マイクロタイタープレート上にコーティングされた。c200抗原は、処方物中の還元剤(DTT)および界面活性剤(SDS)の存在のため、非コンフォメーションであることが推定される比較として使用された。

10

【0131】

免疫反応性は、2つの初期HCVセロコンバージョンパネルPHV904およびPHV914(Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MAから市販のヒト血液サンプル)に対して試験された。結果が表6に示される。データは、NS3/4a(ならびにc200)の変性した形態または直鎖状の形態が、NS3/4aコンフォメーションナルエピトープほど早く初期セロコンバージョンパネルを検出しないということを示唆する。

20

【0132】

【表 6】

表 6							
NS3/4a 対 変性 NS3/4a							
* NS3/4aのストックに、2% SDSを添加							
		NS3/4a	dNS3/4a*	c200	NS3/4a	dNS3/4a*	c200
		OD	OD	OD	s/co	s/co	s/co
HCV	PHV 904-1	0.012	0.012	0.009	0.02	0.02	0.01
セロコンバージョン	PHV 904-2	0.011	0.009	0.008	0.02	0.01	0.01
	PHV 904-3	1.124	0.071	0.045	1.80	0.11	0.07
	PHV 904-4	2.401	0.273	0.129	3.85	0.44	0.21
	PHV 904-5	3.022	0.793	0.347	4.85	1.28	0.57
	PHV 904-6	2.711	1.472	0.774	4.35	2.37	1.28
	PHV 904-7	3.294	1.860	0.943	5.28	2.99	1.55
	PHV 914-1	0.006	0.004	0.001	0.01	0.01	0.00
	PHV 914-2	0.005	0.004	0.002	0.01	0.01	0.00
	PHV 914-3	0.098	0.003	0.001	0.16	0.00	0.00
	PHV 914-4	1.118	0.006	0.004	1.79	0.01	0.01
	PHV 914-5	2.035	0.044	0.022	3.26	0.07	0.04
	PHV 914-6	2.092	0.074	0.025	3.35	0.12	0.04
	PHV 914-7	2.519	0.281	0.132	4.04	0.45	0.22
	PHV 914-8	2.746	0.907	0.500	4.40	1.46	0.82
	PHV 914-9	3.084	1.730	0.931	4.94	2.78	1.53
HCV 3.0	陰性対照	0.023	0.024	0.008			
対照	陰性対照	0.027	0.024	0.007			
	陰性対照	0.021	0.017	0.005			
	平均	0.024	0.022	0.007			
	カットオフ	0.624	0.622	0.607			
	陽性対照	1.239	0.903	0.575	1.99	1.45	0.95
	陽性対照	1.445	0.916	0.614	2.32	1.47	1.01

10

20

30

## 【 0 1 3 3 】

コンフォメーションエピトープの免疫反応性もまた、標準的な手順を使用して作製される NS3/4a に対するモノクローナル抗体を使用することで試験された。これらのモノクローナル抗体は、その後、NS3/4a および変性した NS3/4a および c200 抗原に対して ELISA 形式で試験された。データは、抗 NS3/4a モノクローナル抗体が、表 7 で示されるセロコンバージョンパネルに類似する様式で、NS3/4a および変性した NS3/4a に反応することを示す。反応性において初期 c33c セロコンバージョンパネルに類似するモノクローナル抗体が作製され得るので、この結果もまた、NS3/4a が天然でコンフォメーションであるというさらなる証拠を提供する。

## 【 0 1 3 4 】

40

【表 7】

表 7				
プレート				
		NS3/4a	dNS3/4a	c200
モノクローナル抗体		OD	OD	OD
4B9/E3	1:100	1.820	0.616	0.369
	1:1000	1.397	0.380	0.246
	1:10000	0.864	0.173	0.070
	1:20000	0.607	0.116	0.085
5B7/D7	1:100	2.885	0.898	0.436
	1:1000	2.866	0.541	0.267
	1:10000	1.672	0.215	0.086
	1:20000	1.053	0.124	0.059
1A8/H2	1:100	1.020	0.169	0.080
	1:1000	0.921	0.101	0.043
	1:10000	0.653	0.037	0.013
	1:20000	0.337	0.027	0.011

## 【 0 1 3 5 】

( 実施例 4 )

( H C V 抗原を用いた固体支持体のコーティング )

H C V NS 3 / 4 a コンフォメーションエピトープまたは M E F A 抗原は、以下のようにプレート上にコーティングされる。H C V コーティング緩衝液 ( 5 0 m M Na P O <sub>4</sub> p H 7 . 0 , 2 m M E D T A および 0 . 1 % クロロアセトアミド ) は、0 . 2 2 μ 濾過ユニットを通じて濾過される。以下の試薬は、その後逐次的に H C V コーティング緩衝液に添加され、そして、各々の添加後、攪拌される : 1 0 m g / m l 溶液 ( B a y e r C o r p . P e n t e x , K a n k a k e e , I l l i n o i s ) からの 2 μ g / m

10

20

30

40

50

1 BSA - スルフヒドリル修飾 ; 1 M 溶液 (Sigma, St. Louis, MO) からの 5 mM DTT ; 0.45 µg/ml NS3/4a (0.3 mg/ml のタンパク質濃度) ; または 0.375 µg/ml MEFA 7.1 (1 mg/ml のタンパク質濃度) 。最終溶液は、室温で 15 分間攪拌される。

【0136】

200 µl の上記溶液は、Costar 高結合、平底プレート (Corning Inc., Corning, New York) の各々のウェルに添加され、そして、プレートは、高湿室で一晩インキュベートされる。プレートは、その後、洗浄緩衝液 (1 × PBS、0.1% TWEEN-20) で洗浄され、軽くたたかれ、乾燥され、そして 285 µl の Ortho Post-Coat Buffer (1 × PBS, pH 7.4, 1% BSA, 3% スクロース) が添加される。プレートは少なくとも 1 時間インキュベートされ、軽くたたかれ、そして 28 で一晩乾燥される。プレートは、少なくとも 1 時間インキュベートされ、軽く叩かれ、そして、2 ~ 8 で一晩乾燥される。

10

【0137】

(実施例 5)

(イムノアッセイ)

HCV 感染を検出するための本発明のイムノアッセイの能力を試験するために、市販の HCV 感染したヒト血液サンプルのパネルが使用される。このようなパネルは、Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI) ; Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP) および North American Biologics, Inc., Boca Raton, FL (NABI) から市販される。

20

【0138】

アッセイは、以下のように実施される。200 µ 検体希釈緩衝液 (1 g/l カゼイン, 100 mg/l 組み換えヒト SOD, 1 g/l クロロアセトアミド, 10 g/l BSA, 500 mg/l 酵母抽出物, 0.366 g/l EDTA, 1.162 g/l KPO<sub>4</sub>, 5 ml/l Tween-20, 29.22 g/l NaCl, 1.627 g/l NaPO<sub>4</sub>, 1% SDS) がコーティングされたプレートに添加される。次に、20 µl のサンプルを添加する。これは、37 で、30 ~ 60 分間インキュベーションされる。プレートを洗浄緩衝液 (1 × PBS、pH 7.4、0.1% Tween-20) で洗浄する。。

30

【0139】

Enhanced SAve bulk 結合体希釈液 (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) を用いる ORTHO HCV3.0 ELISA Test System 中で 1 : 22, 000 に希釈された、200 µl の標識された液相構成要素 (固体支持体に結合する抗原に依存して、HRP で標識された MEFA、または HRP で標識された NS3/4a コンフォメーションエピトープのいずれか) が添加され、そして 37 で 30 ~ 60 分間インキュベートされる。

【0140】

これは、上のように洗浄され、そして 200 µl 基質溶液 (1 OPD 錠 / 10 ml) が添加される。OPD 錠は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ反応色顕色のために、o-フェニレンジアミン 2 塩酸塩および過酸化水素を含む。これは、暗がり中室温で 30 分間インキュベートされる。反応は、50 µl の 4 N 硫酸の添加により止められ、そして対照としての 690 nm での吸収と比較するため、プレートは 492 nm で読まれる。

40

【0141】

従って、新規 HCV 検出アッセイが開示された。上述の記載から、本発明の特定の実施形態が例示の目的のために本明細書において記載されたが、種々の修飾が、本明細書における開示の趣旨および範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。

【 3 A 】

1 M A P I T A Y A Q 10  
 ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG

20 T R G L L G C I I T S L T G R  
 ACA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CCG

30 D K N Q V E G E V Q I V S T A 40  
 GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT

50 A Q T F L A T C I N G V C W T  
 GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

60 V Y H G A G T R T I A S P K G 70  
 GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

80 P V I Q M Y T N V D Q D L V G  
 CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

90 W P A P Q G S R S L T P C T C 100  
 TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC

110 G S S D L Y L V T R H A D V I  
 GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

120 P V R R R G G D S R G S L L S P 130  
 CCC GTG CCG CCG GGT GAT GGC AGC GGC AGC CTG CTG TCG CCC

140 R P I S Y L K G S S G G P L L  
 CCG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG GGT CCG CTG TTG

150 C P A G H A A V G I F R A A V C 160  
 TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC

170 T R G V A K A V D F I P V E N  
 ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

180 L E T T M R S P V F T D N S S  
 CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT

FIG. 3A

【 3 B 】

200 P P V V P Q S F Q V A H L H A  
 CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT

210 P T G S G K S T K V P A A Y A 220  
 CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA

230 A Q G Y K V L V L N P S V A A  
 GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

240 T L G F G A Y M S K A H G I D 250  
 ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT

260 P N I R T G V R T I T T G S P  
 CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC

270 I T Y S T Y G K F L A D G G C 280  
 ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC

290 S G G A Y D I I I C D E C H S  
 TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

300 T D A T S I L G I G T V L D Q 310  
 ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA

320 A E T A G A R L V V L A T A T  
 GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC CCC

330 P P G S V T V P H P N I E E V 340  
 CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT

350 A L S T T G E I P F Y G K A I  
 GCT CTG TCC ACC ACC GAA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

360 P L E V I K G G R H L I F C H 370  
 CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT

380 S K K K C D E L A A K L V A L  
 TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG

FIG. 3B

【 3 C 】

390 G I N A V A Y Y R G L D V S V 400  
 GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CCG GGT CTT GAC GTG TCC GTC

410 I P P I G D V V V V A T D A L  
 ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC

420 M T G Y T G D F D S V I D C N 430  
 ATG ACC GGC TAT ACG GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT

440 T C V T Q T V D F S L D P T F  
 ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC

450 T I E T I T L P Q D A V S R T 460  
 ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT

470 Q R R G R T G R G K P G I Y R  
 CAA CGT CCG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA

480 F V A P G E R P S G M F D S S 490  
 TTT GTG GCA CCG GGG GAG CCG CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC

500 V L C E C Y D A G C A W Y E L  
 GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC

510 T P A E T T V R L R A Y M N T 520  
 ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC AAG AAC ACC

530 P G L P V C Q D H L E F W E G  
 CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC

540 V F T G L T H I D A H F L S Q 550  
 GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG

560 T K Q S G E N L P Y L V A Y Q  
 ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA

570 A T V C A R A Q A P P P S H D 580  
 GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC

FIG. 3C

【 3 D 】

590 Q M W K C L I R L K P T L H G  
 CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG

600 P T P L L Y R L G A V Q N E I 610  
 CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC

620 T L T H P V T K Y I M T C M S  
 ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG

630 A D L E V V T S T W V L V G G 640  
 GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTC GTT GGC GGC

650 V L A A L A A Y C L S T G C V  
 GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG

660 V I V G R V V L S G K P A I I 670  
 GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

680 P D R E V L Y R E F D E M E E  
 CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

686  
 C  
 TGC

FIG. 3D

【 6 A 】

1 M A T K A V C V L K G D G P V 10  
 ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT 45

20 Q G I I N F E Q K E S N G P V 30  
 CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG 90

40 K V W G S I K G L T E G L H G  
 AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA 135

50 F H V H E F G D N T A G C T S 60  
 TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT 180

70 A G P H F N P L S T R G C N C  
 GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC ACG CGT GGT TGC AAT TGC 225

80 S I Y P G H I T G H R M A W K 90  
 TCT ATC TAT CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG 270

100 L G S A A R T T S G F V S L F  
 CTT GGT TCC GCC ACC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC 315

110 A P G A K Q N E T H V T G G A 120  
 GCC CCA GGT GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA 360

130 A A R T T S G L T S L F S P G  
 GCC GCC CGA ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT 405

FIG. 6A

【 6 B 】

140 A S Q N I Q L I T S T D N S S  
 GCC AGC CAA AAC ATT CAA TTG ATT ACT AGT ACG GAT AAC TCC TCT 450

160 P P V V P Q S F Q V A H L H A  
 CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT 495

170 P T G S G K S T K V P A A Y A 180  
 CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA 540

190 A Q G Y K V L V L N P S V A A  
 GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA 585

200 T L G F G A Y M S K A H G I D 210  
 ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT 630

220 P N I R T G V R T I T T G S P  
 CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC 675

230 I T Y S T Y G K F L A D G G C 240  
 ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC 720

250 S G G A Y D I I I C D E C H S  
 TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC 765

260 T D A T S I L G I G T V L D Q 270  
 ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA 810

280 A E T A G A R L V V L A T A T  
 GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC 855

290 P P G S V T V P H P N I E E V 300  
 CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT 900

FIG. 6B

【 6 C 】

310 A L S T T G E I P F Y G K A I  
 GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC 945

320 P L E V I K G G R H L I F C H 330  
 CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT 990

340 S K K K C D E L A A K L V A L  
 TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG 1035

350 G I N A V A Y Y R G L D V S V 360  
 GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC 1080

370 I P T S G D V V V V A T D A L  
 ATC CCG ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC 1125

380 M T G Y T G D F D S V I D C N 390  
 ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT 1170

400 T C A C S G K P A I I P D R E  
 ACG TGT GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA 1215

410 V L Y R E F D E M E E C S Q H 420  
 GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TCT CAG CAC 1260

430 L P Y I E G Q G M M L A E Q F K  
 TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC GAG CAG TTC AAG 1305

440 Q K A L G L S R G G K P A I V 450  
 CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG CCG GCA ATC GTT 1350

460 P D K E V L Y Q Q Y D E M E E  
 CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT GAG ATG GAA GAG 1395

FIG. 6C

【 6 D 】

470 C S Q A A P Y I E Q A Q V I A 480  
 TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT CAG GTA ATA GCT 1440

490 H Q F K E K V L G L I D N D Q  
 CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC GAT AAT GAT CAA 1485

500 V V V T P D K E I L Y E A F D 510  
 GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT GAG GCC TTT GAT 1530

520 E M E E C A S K A A L I E E G  
 GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC ATT GAG GAA GGG 1575

530 Q R M A E M L K S K I Q G L L 540  
 CAG CCG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA CAA GGC CTC CTC 1620

550 G I L R R H V G P G E G A V Q  
 GGG ATA CTG CGC CAG CAC GTT GGT CCT GGC GAG GGG GCA GTG CAG 1665

560 W M N R L I A F A S R G N H V 570  
 TGG ATG AAC CCG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA GGG AAC CAT GTT 1710

580 S P T H Y V P S R S R R F A Q  
 TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CCG AGA TTC GCC CAG 1755

590 A L P V W A R P D Y N P P L V 600  
 GCC CTG CCC GTT TGG GCG CCG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG 1800

610 E T W K K P D Y E P P V V H G  
 GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAC GGC 1845

620 R S S R R F A Q A L P V W A R 630  
 AGA TCT TCT CCG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CCG 1890

FIG. 6D

【 6 E 】

640  
P D Y N P P L V E T W K K P D  
CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC 1935

650  
Y E P P V V H G R K T K R N T  
TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC 1980

670  
N R R P Q D V K F P G G G Q I  
AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC 2025

680  
V G G V Y L L P R R G P R L G  
GTT GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT 2070

700  
V L A T R K T S P I P K A R R  
GTG CTC GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG 2115

710  
P E G R T W A Q P G Y P W P L  
CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC 2160

730  
Y G N K D R R S T G K S W G K  
TAT GGC AAT AAG GAC AGA CCG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG 2205

740  
P G Y P W P R K T K R N T N R  
CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC AAC CGG 2250

760  
R P Q D V K F P G G G Q I V G  
CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC GTT GGT 2295

770  
G V Y L L P R R G P R L G V L  
GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT GTG CTC 2340

790  
A T R K T S P I P K A R R P E  
GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG 2385

FIG. 6E

【 6 F 】

800  
G R T W A Q P G Y P W P L Y G  
GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC 2430

820  
N K D R R S T G K S W G K P G  
AAT AAG GAC AGA CCG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG 2475

829  
Y P W P OC  
TAC CCT TGG OCC TAA TGAGTCGAC

FIG. 6F

【 8 A 】

1  
M A T K A V C V L K G D G P V  
ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT

20  
Q G I I N F E Q K E S N G P V  
CAA GGT AAT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AAT GGA CCA GTG

40  
K V W G S I K G L T E G L H G  
AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA

50  
F H V H E F G D N T A G C T S  
TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT

70  
A G P H F N P L S R K H G G P  
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA

80  
K D E E R H V G D L G N V T A  
AAG GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT

100  
D K D G V A D V S I E D S V I  
GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC

110  
S L S G D H C I I G R T L V V  
TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CTG GTG GTC

130  
H E K A D D L G K G N E E S  
CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT

140  
T K T G N A G S R L T A C G V I  
ACA AAG ACA GGA AAC GCT GGA AGT CBT TTG GCT TGT GGT GTA ATT

160  
G I A Q N L N S G C N C S I Y  
GGG ATC GCC CAG AAT TTG AAT TCT GTG TGC AAT TGC TCT ATC TAT

170  
P G H I T G H R M A W K L G S  
CCC GGC CAT ATA AGS GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG CTT GGT TCC

190  
A A R T T S G F V S L F A P G  
GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC GCC CCA GGT

FIG. 8A

【 8 B 】

200  
A K Q N E T H V T G G A A A R  
GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA GCC GCC CAA

220  
T T S G L T S L F S P G A S Q  
ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT GCC AGC CAA

230  
N I Q L I V D F I P V E N L E  
AAC ATT CAA TTG ATT GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG

250  
T T M R S P V F T D N S S P P  
ACA ACC ATG CGA TCT CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA

260  
V V P Q S F Q V A H L H A P T  
GPA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA

280  
G S G K S T K V P A A Y A A Q  
GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG

290  
G Y K V L V L N P S V A A T L  
GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG

310  
G F G A Y M S K A H G I D P N  
GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC

320  
I R T G V R T I T T G S P I T  
ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG

340  
Y S T Y G K F L A D G G C S G  
TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG

350  
G A Y D I I I C D B C H S T D  
GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT

370  
A T S I L G I G T V L D Q A E  
GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA CCA GAG

380  
T A G A R L V V L A T A T P P  
ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG

400  
G S V T V P H P N I E E V A L  
GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG

FIG. 8B

【 8 C 】

S T T G E I F F Y G K A I P L  
TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC

430  
E V I K G G G R H L I F C H S K  
GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG

440 450  
K K C D E L A A K L V A L G I  
AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC

460  
N A V A Y Y R G L D V S V I P  
AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG

470 480  
T S G D V V V A T D A L M T  
ACC AGC GGC GAT GAT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC

490  
G Y T G D F D S V T D C N T C  
GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT

500 510  
V T Q T V D F S L D P T F T I  
GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT

520  
E T I T L P O D A V S R T Q R  
GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT

530 540  
R G R T G R G K P G I Y R F V  
CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG

550  
A P G E R P S G M F D S S V L  
GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC

560 570  
C E C Y D A G C G T A W Y E L T P  
TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC CTA GGT TAT GAG CTC ACG CCC

580  
A E T T V R L R A Y M H T P G  
GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG

590 600  
L P V C Q D H L E F W E G V F  
CIT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT

610  
T G L T H I D A H F L S Q T K  
ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG

620 630  
Q S G E M L P Y L V A Y Q A T

FIG. 8C

【 8 E 】

Q G L L G I L R R H V G P G E  
CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG

860 870  
G A V Q W M N R L I A F A S R  
GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CCG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA

880  
G N H V S P T H Y V P S R S R  
GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG

890 900  
R F A Q A L P V W A R P D Y N  
AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CCG CCG GAC TAT AAC

910  
P P L V E T W K K P D Y E P P  
CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT

920 930  
V V H G R S S R R P A Q A L P  
GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CCG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC

940  
V W A R P D Y N P P L V E T W  
GTT TGG GCG CCG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG

950 960  
K K P D Y E P P V V H G R K T  
AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC

970  
K R N T N R R P Q D V K F P G  
AAA CGT AAC ACC AAC CCG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT

980 990  
G G Q I V G R R G P P I P K A  
GGC GGT CAG ATC GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT

1000  
R R P E G R T W A Q P G Y P W  
CGT CCG CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG

1010 1020  
P L Y G N K D R R S T G K S W  
CCC CTC TAT GGC AAT AAG GAC AGA CCG TCT ACA GGT AAG TCC TGG

1030  
G K P G Y P W P R K T K R N T  
GGT AAG CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC

1040 1050  
N R R P Q D V K F P G G G Q I  
AAC CGA CCG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC

FIG. 8E

【 8 D 】

CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC

640  
V C A R A Q A P P P S W D Q M  
GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG

650 660  
W K C L I R L K P T L H G F T  
TGG AAG TGT TTG ATT CSC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACR

670  
P L L Y R L G A V Q N E I T L  
CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG

680 690  
T H P V T K Y I M T C M S A D  
ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC

700  
L E V V T S A C S G K P A I I  
CTG GAG GTC GTC ACG AGC GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

710 720  
P D R E V L Y R E F D E M E E  
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

730  
C S Q H L P Y I E Q G M M L A  
TGC TCT CAG CAC TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC

740 750  
E Q F K Q K A L G L S R G G K  
GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG

760  
P A I V P D K E V L Y Q Q Y D  
CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT

770 780  
E M E E C S Q A A P Y I E Q A  
GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT

790  
Q V I A H Q P K E K V L G L I  
CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC

800 810  
D N D Q V V V T P D K E I L Y  
GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT

820  
E A F D E M E E E C A S K A A L  
GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC

830 840  
I E E G O R M A E M L K S K I  
ATT GAG GAA GGG CAG CGG ATG GCG GAG ATG CAG AAG TCT AAG ATA

FIG. 8D

【 8 F 】

V G R R G P P I P K A R R P E  
GTT GGT CCG AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG

1060 1080  
G R T N A Q P G Y P W P L Y G  
GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC

1090  
N K D R R S T G K S W G K P G  
AAT AAG GAC AGA CCG TCT ACC GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG

1099  
Y P W P  
TAT CCT TGG CCC

FIG. 8F

【 図 1 】

HCVゲノムおよび組換えタンパク質

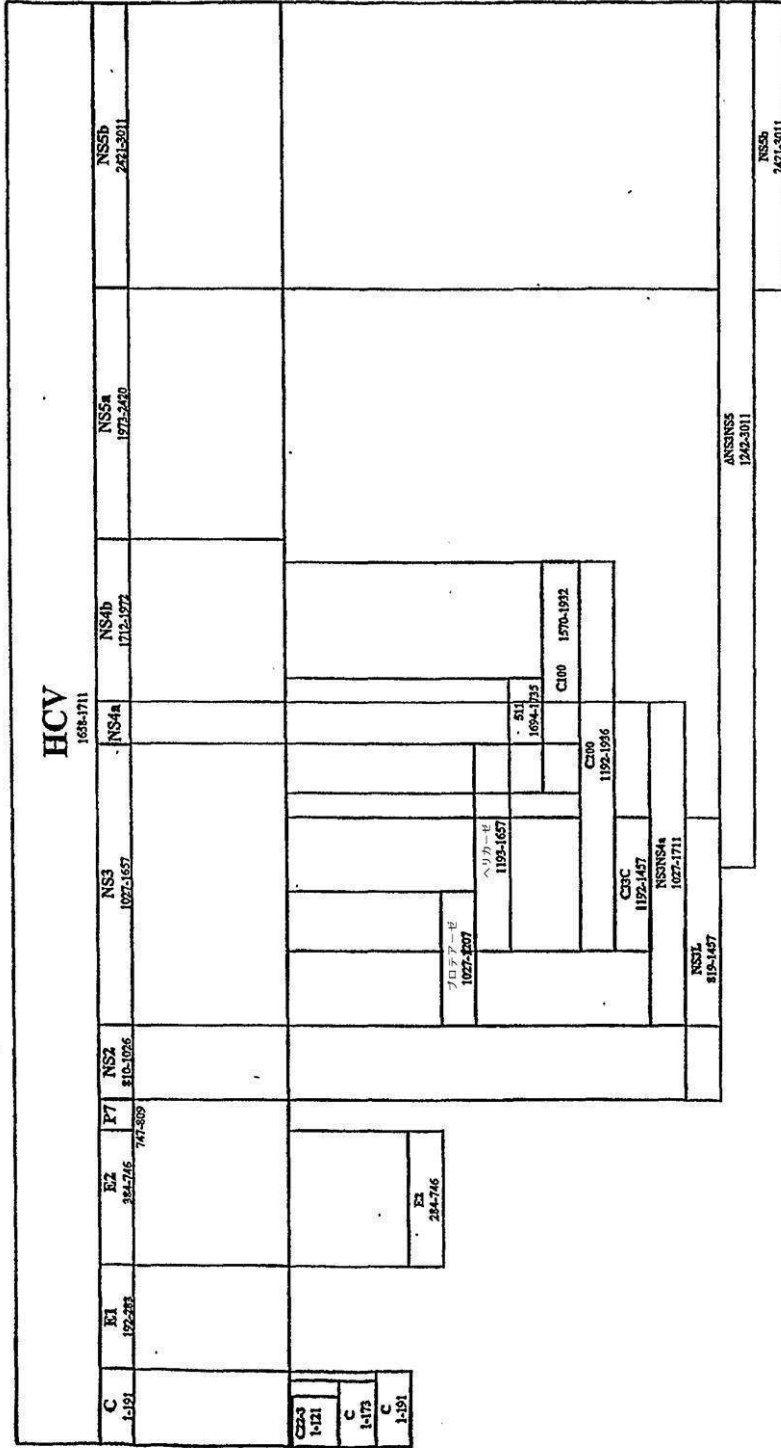


FIG. 1

【 図 2 】

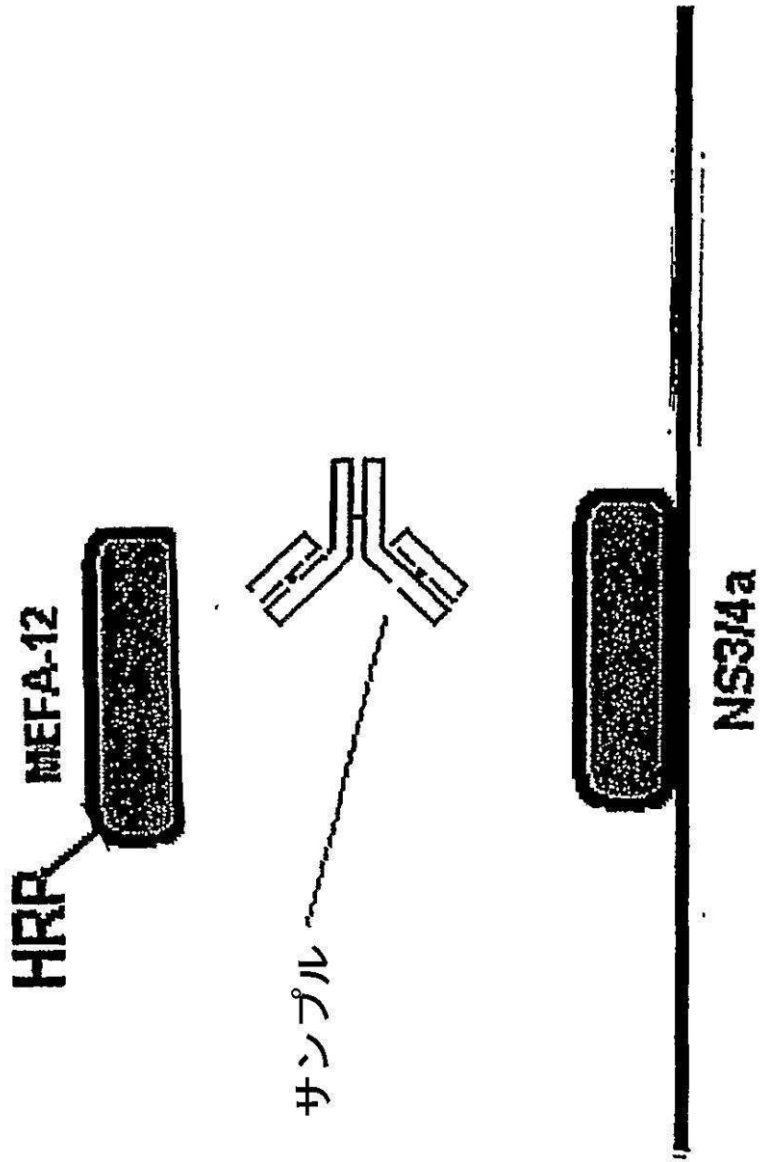


FIG. 2

【 図 4 】

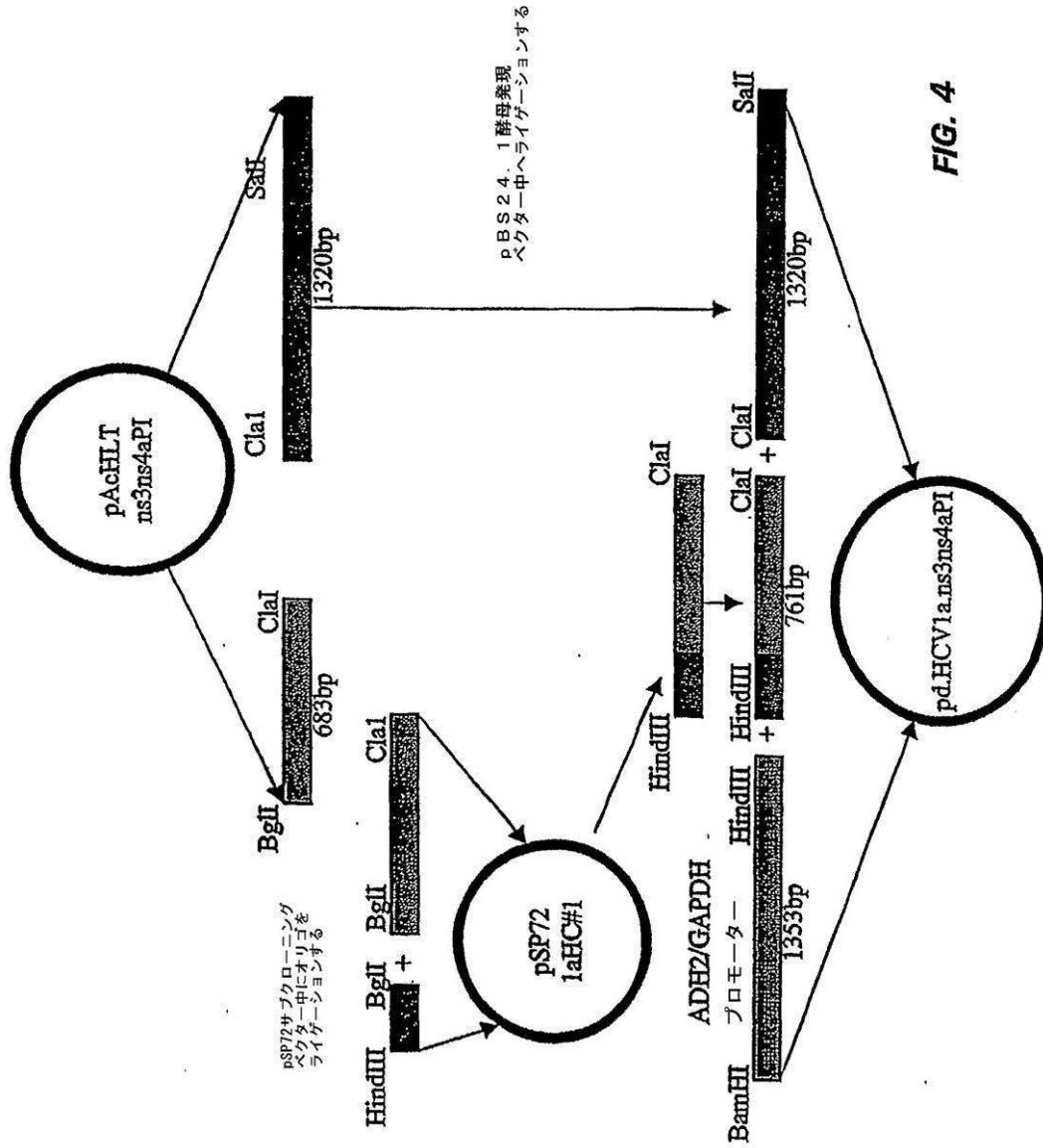


FIG. 4

【 図 5 】

# MEFA 12 抗原構築物

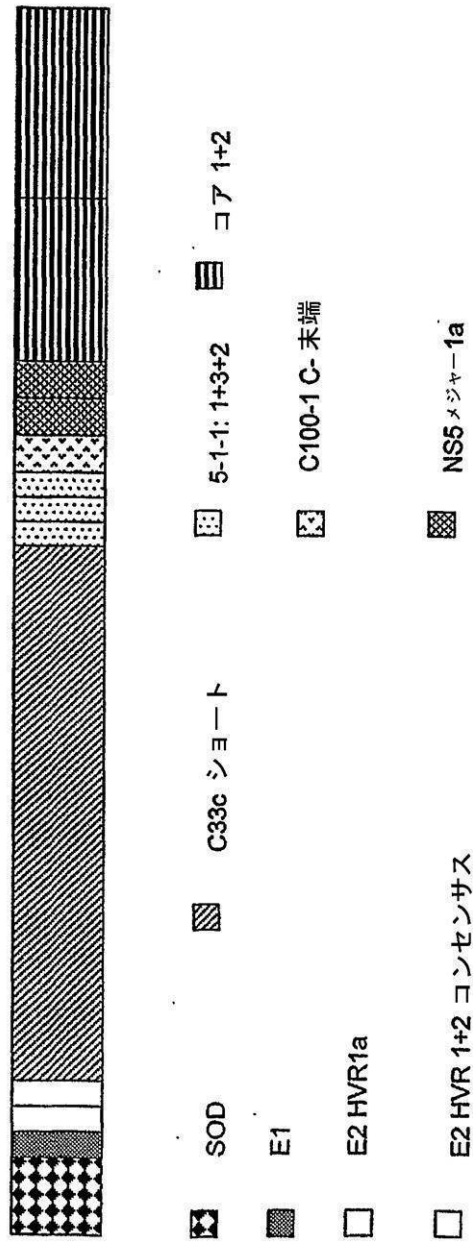


FIG. 5

【 図 7 】

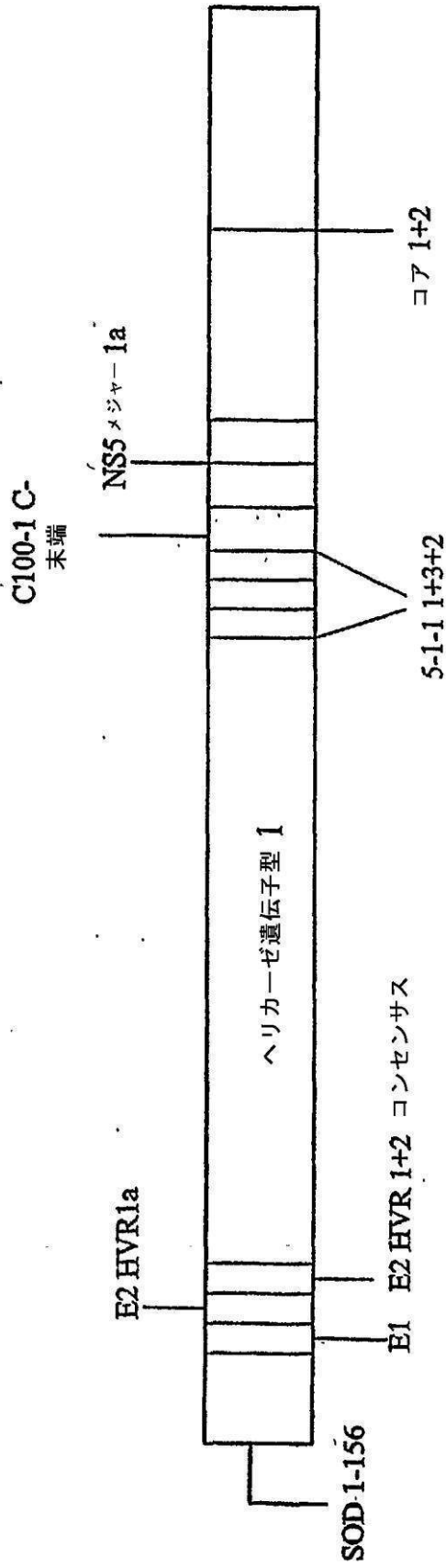


FIG. 7

MEFA-3 抗原

hSOD-(1-154)	コア	コア	C33c	5-1-1 1型	5-1-1 3型	5-1-1 2型	C-100	C-100	NS5	.NS5
アミノ酸	10	10	1192	1694	1694	1694	1901	1940	2278	2310
	53	53	1457	1735	1735	1735	1940	1940	2278	2310

A

MEFA-5 抗原

hSOD-(1-154)	コア	コア	E1	E2	C33c	5-1-1 1型	5-1-1 3型	5-1-1 2型	C-100	NS5
アミノ酸	10	10	303	405	1192	1689	1689	1689	1901	2278
	53	53	320	444	1457	1735	1735	1735	1940	2313

B

MEFA-6 抗原

hSOD-(1-154)	E1	E2	C33c	5-1-1 1型	5-1-1 3型	5-1-1 2型	C-100	NS5	NS5	コア
アミノ酸	303	405	1192	1689	1689	1689	1901	2278	2278	10
	320	444	1457	1735	1735	1735	1940	2313	2313	53

C

FIG. 9

---

フロントページの続き

(72)発明者 フィリップ アーキャンジェル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94611, オークランド, オークランド アヴェニュー  
567, アpartment 310

(72)発明者 デービッド チェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94507, アラモ, ダグラス コート 1121

Fターム(参考) 4B024 AA14 BA33 CA04 DA12 EA04 FA02 FA07 GA11 HA03

专利名称(译)	HCV检测		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009258128A</a>	公开(公告)日	2009-11-05
申请号	JP2009180971	申请日	2009-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	诺华巴库小腿和诊断公司		
申请(专利权)人(译)	诺华Bakushinzu和诊断公司		
[标]发明人	フィリップアーキャンジェル デービッドチェン		
发明人	フィリップ アーキャンジェル デービッド チェン		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/53 C12N15/09 A61B C07K14/18 C12Q1/70 G01N33/549		
CPC分类号	G01N33/5767		
FI分类号	G01N33/576.Z G01N33/53.N C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/BA33 4B024/CA04 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/GA11 4B024/HA03		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/409515 2002-09-09 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种灵敏，准确的诊断工具和预后工具，以提供适当的患者护理，并防止血液和血液制品传播HCV或密切人身传播HCV。那个提供了HCV抗原/抗体/抗原测定。该测定法使用从HCV多蛋白区域分离的第一抗原和HCV多表位融合抗原。HCV多表位融合抗原包含来自多蛋白与第一抗原相同区域的表位。第一抗原和多表位融合抗原与HCV感染的样品中存在的抗体结合。本发明表明，将源自HCV多蛋白的第一抗原与包含来自与第一抗原相同的HCV多蛋白相同区域的表位的多表位融合抗原组合使用对于HCV的检测是敏感和可靠的。部分基于其提供了一种方法的发现。[选择图]无

ドメイン	隣接境界*
C(コア)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011