

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4097191号
(P4097191)

(45) 発行日 平成20年6月11日 (2008. 6. 11)

(24) 登録日 平成20年3月21日 (2008. 3. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/18 (2006. 01)

C O 7 K 14/18 Z N A

C O 7 K 17/02 (2006. 01)

C O 7 K 17/02

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 D

G O 1 N 33/576 (2006. 01)

G O 1 N 33/576 Z

請求項の数 7 (全 71 頁)

(21) 出願番号 特願2002-330252 (P2002-330252)
 (22) 出願日 平成14年11月14日 (2002. 11. 14)
 (62) 分割の表示 特願平3-315178の分割
 原出願日 平成3年11月5日 (1991. 11. 5)
 (65) 公開番号 特開2003-192697 (P2003-192697A)
 (43) 公開日 平成15年7月9日 (2003. 7. 9)
 審査請求日 平成14年11月14日 (2002. 11. 14)
 審査番号 不服2004-16995 (P2004-16995/J1)
 審査請求日 平成16年8月16日 (2004. 8. 16)
 (31) 優先権主張番号 P4034982. 9
 (32) 優先日 平成2年11月3日 (1990. 11. 3)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (31) 優先権主張番号 P4112743. 9
 (32) 優先日 平成3年4月19日 (1991. 4. 19)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 398032751
 デイド・ベーリング・マルブルク・ゲゼル
 シヤフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ
 フツング
 ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (番地なし)
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (74) 代理人 100080355
 弁理士 西村 公佑
 (72) 発明者 ウード・クルプカ
 ドイツ連邦共和国デー 3 5 5 0 マルブルク・オーペラーアイヒヴェーク 2 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H C V - 特異的ペプチドおよびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H C V に対する抗体と特異的に反応し、そしてそのアミノ酸配列が下記のアミノ酸配列であるペプチド:

【化 1】

8 26
 QRKTKRNTNRRPQDVKFPG

SP 23

【請求項 2】

請求項 1 に記載のペプチドを含む H C V 抗体の検出および / または測定のためのペプチド混合物。

【請求項 3】

ペプチド化学により合成された請求項 1 または 2 に記載のペプチドまたはペプチド混合物。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のペプチドまたはペプチド混合物を用いる H C V に対する抗体の検出および / または測定のための免疫化学的方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のペプチドが固定されている一以上の担体を含む、H C V に対する抗体

10

20

の検出および／または測定のための免疫学的テストキット。

【請求項 6】

担体がポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミドおよびその他の合成ポリマー、天然ポリマーおよび誘導体化された天然ポリマー、およびガラスより成る群より選ばれる請求項 5 に記載のテストキット。

【請求項 7】

担体がポリスチレンである請求項 6 に記載のテストキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は HCV 特異的抗体および HCV 抗原の免疫化学的測定のためのポリペプチドおよびこの方法に適した剤およびその使用に関する。

10

【0002】

さらに、本発明はそれぞれについて単一のテストにより、それぞれ異なる病原体に対する複数の異なる抗体特異性を同時に検出するおよび／または同時に測定するための免疫化学的方法に関する。

【0003】

非 A / 非 B 肝炎 (NANBH) は、伝搬性疾患または臨床像群として、ウイルス関連であり、また様々な肝炎ウイルス例えば肝炎 A ウイルス (HAV)、肝炎 B ウイルス (HBV)、肝炎 D ウイルス (HDV) および肝炎 E (HEV) などによる他のウイルス誘導臨床像からは区別できるものとされている。最後に、サイトメガロウイルス (CMV) または

20

【0004】

疫学的研究に基づいて、伝搬経路に従い少なくとも 2 タイプの非 A / 非 B 肝炎を定義することができる：水および食物により伝搬される流行性肝炎ウイルス (経腸的に伝搬される NANBV)、および血液、針刺しまたは同様の経路により伝搬される輸出後肝炎ウイルス (血液により伝搬される NANBV)。これらの感染経路のほかに、特発的に発生する NANBV (“市中感染 NANBV (community acquired NANBV)”) として、前述の 2 タイプとは明白な関連がない伝搬の存在も知られている。NANBH の原因となる作用体またはウイルスの正確な数は分っていないが最近、いわゆる肝炎 C ウイルス (HCV) がこの病気の一原因病原体として確認された (WO 89/04 669)。

30

【0005】

最近に至るまで、臨床診断は主として、抗原の血清学的測定および／またはそれらに対する抗体に基づいており、それらテストは HAV、HBV、HDV、HEV、CMV または EBV という肝炎病原体群からのパラメータに対して特異的である。このいわゆる排除法においては NANBH はすべての前記測定が陰性のときだけ診断された。

【0006】

このほか、いわゆる代用マーカー例えば GPT (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、ALT すなわちアラニンアミノ基転移酵素とも呼ばれる) または抗 HBc (肝炎 B コア特異的抗体) も用いられている。しかしながら、これらの助剤は信頼性ありとするほど感度、特異性いずれも十分でない。従って、輸血患者の約 10% に発生する輸血後肝炎症例のほんのわずかな一部を供血者検査によって回避することはできる。特異的テスト導入が緊要のことであることは NANBV が輸血後肝炎症例の約 90% にあたるとされていることから強調される。この疾病にともなう主たる問題は、25 ~ 55% の感染者が慢性肝傷害にかかるということである。

40

【0007】

HCV の発見により、HCV または HCV 特異的抗体の特異的検出の基礎が提供された。HCV および、HCV ゲノム部分の相当する cDNA 複製物の単離および確認は WO 89/04 669 の主題となっており、そこでは HCV はフラビ (flavi) 様ウイルスのファミリーに属するとされている。さらにそこには、HCV 抗原を HCV - 特異的抗体検出に用いること、および患者血中抗原の診断測定のために抗体を産生させる (raise) することも記載

50

されている。

【0008】

しかしながら、遺伝子工学タンパク質、特に転写読枠 (open reading frame, ORF) からのいわゆる非構造タンパク質 (NSP) が用いられるが、それらは免疫化学的検出方法における反応剤として使用される。

【0009】

免疫化学的検出とは、本発明における意味あいにおいては、均一 (溶液中) または不均一 (固相使用) イン・ビトロ法として、体液、例えば血清、血漿、唾液、脳脊髄液または尿中の免疫グロブリンクラス A、D、E、G または M (Ig A、Ig D、Ig E、Ig G または Ig M) の抗原および/または抗体の測定を可能にするあらゆる方法を包含する。イムノアッセイとも呼ばれるこれらの方法の例は、酵素イムノアッセイ (ELISA または EIA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、イムノフルオレセンスアッセイ (IFA)、ラジオイムノプレシピテーション (RIPA)、寒天ゲル拡散などである。

10

【0010】

例えば、WO 89/04 669 は、HCV 特異的抗体 (抗-HCV) の検出のために、ELISA 法にそこに記載されている抗原 C-100-3 を用いている。NSP 3/4 領域からの構築物 (コンストラクト) C-100-3 (これは酵母細胞中で遺伝子工学により発現される) は 363 アミノ酸より成り、その配列は図 1 に示されているが、図中のナンバリングシステムは前記特許のそれに対応している。

【0011】

しかしながら、ヒト起源の検体中の抗-HCV を測定するための ELISA 法で達成し得る最高感度は、慢性 NANB 患者の場合で約 80% そして急性 NANB 患者の場合で約 30% と推定される。患者 (ヒト) からの血液についてのこれらの知見は NANB V 感染チンパンジーについての対応する研究によって支持されている。

20

【0012】

それらの研究において、C-100-3 構築物に基づく抗-HCV の陽性検出は、ALT 増加が生じてから約 6 ~ 18 週間までは成功せず、そしてその後、NANB V 接種してから 3 ~ 10 週間後に病気の徴候として認めることができる。すなわち、チンパンジーが感染してから 9 ~ 26 週間が、C-100-3 構築物を用いた従来のイムノアッセイにより HCV 特異的抗体を検出できるまでの総時間であることがわかる。

30

【0013】

WO 90/11 089 に更に、抗-HCV 検出に使用できる HCV アミノ酸配列を記載している。しかしながら、特定のタンパクセクションの診断上の関連については全く記述がなく、また免疫優性 (immunodominant) エピトープの例も存在しない。

【0014】

文献に開示された方法で抗-HCV を検出する上での基本的問題は誤って陽性および誤って陰性に反応する検体がなおも存在することである。誤って陽性となる検体は健康供血者群の 40% にも到ることがある (WEINER A., et al. Lancet 1990, Vol. 336, p. 695)。従って、特異的かつ鋭敏な HCV テストがないということは、誤って反応するわずかとはいえない割合の検体が献血センターにおいて間違っ捨てられていること、そして同時に実際には抗-HCV - 陽性である患者がなおも信頼性をもって確認されないということを意味している。

40

【0015】

これらの欠点を除くために、他のグループは C-100-3 の ORF 領域 (WO 89/04 669 より。図 1) の特定配列を選びそしてそれらをイムノアッセイに用いている (ペプチド SP 42、117、67 および 65。図 2)。NANB 感染チンパンジーの研究の際には、診断上の価値を向上させることはできなかった。逆にそこでなされた所見からは、記載ペプチドはいずれも信頼性ある Ig G または Ig M 測定の基礎として役立てるには不適切であるという結論となる。何故ならば感度が不十分であり、また抗体検出までに少なくとも 7 ~ 17 週間という診断ギャップは従来の検出方法と比較しても時間短縮が無いことを意

50

味しているからである。さらにまた、特に S P 42 は 20 ~ 40 週間にわたる診断ギャップがあり診断テストに適していないことが分った (SAFFORD J., et al. Int. Symp. on Viral Hepatitis and Liver Disease 1990 Houston, USA)。

【 0 0 1 6 】

しかしながら、S P 67 と称されるポリペプチドは、このペプチドについてはわずか抗 H C V - 陽性検体の 86 % の確認しか可能でなかったが免疫優性であるとされている。(DAWSON, G.J., et al. Int. Congress of Virology 1990, Berlin, FRG)。

【 0 0 1 7 】

合成的に製造されたコアペプチドを用いて改良できたとされている (OKAMOTO H., et al. Japan. J. Exp. Med. 1990, Vol 60, No. 4, p. 223 ~ 233)。これは H O P P および W O O D (Proc. Nat. Acad. Sci. 1981, Vol. 78, p. 3824 ~ 3828) により特定された物理化学的予想基準を用いてコアアミノ酸配列 1 ~ 120 の全部で 3 つの潜在的抗体結合部位からある配列を選択することより成る (OKAMOTO, H. et al., Japan. J. Exp. Med. 1990, Vol. 60, No. 3, p. 167 ~ 177)。このペプチドは図 3 に示されているが No. 39 から No. 74 までの番号の 36 アミノ酸より成っている。

【 0 0 1 8 】

抗 - C - 100 テストとは対照的に、このコアペプチドに基づく E L I S A を用いて一部の抗 - H C V - 陽性血清中の H C V 抗体を検出することができた。この知見は、H C V R N A 検出にポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を用いた比較研究によって確認された。

【 0 0 1 9 】

606 名の供血者に対する検査で認められた 26 の抗 - コア H C V - 陽性検体 (4.3 %) から、まさにわずか 10 例 (1.65 %) しか P C R によっては確認し得ないことが明白となっている。逆に 16 名の供血者 (2.15 %) はこのペプチドに対し誤って陽性に反応した。すなわち、前記コアペプチドは場合によっては抗 - C - 100 テストよりも抗 - H C V 検出法に適しているとされているが、従来のコアペプチドは一般に相当な干渉されやすさを伴う。

【 0 0 2 0 】

従って、本発明は H I V 感染症をなるべく早くかつ高い特異性をもって検出できるテストを開発するという目的に基づいたものである。

【 0 0 2 1 】

今般、驚くべきことに、C - 100 - 3 の O R F 領域および / または H C V コア領域のアミノ末端領域の区域からのある種のポリペプチドが H C V - 特異的抗体の検出に特に適していること、そして従来のペプチドに比べて感度が顕著に増大すると共に望ましくない誤った陽性反応による干渉の受けやすさが著しく低下することを見出した。

【 0 0 2 2 】

さらにまた、本発明によるペプチドを用いた免疫化学的検出方法においては、高い抗原濃度、従って高いエピトープ密度、が達成されることを見出した。これは特に、干渉する異物が存在しないために、高度に濃縮された患者検体の検査が可能な場合に可能である。

【 0 0 2 3 】

さらに、本発明によるペプチドが初期および後期 H C V 抗体の免疫優性エピトープを有し、従って縦断的検査 (longitudinal investigation) の特に有利に用いることができるということも全く驚くべきことであった。

【 0 0 2 4 】

従って、本発明は H C V 感染に対する抗体と特異的に反応するペプチドまたはペプチド混合物、C - 100 - 3 の O R F 領域および / またはアミノ - 末端 H C V コア領域の一部を含むそれらのアミノ酸配列に関する。

【 0 0 2 5 】

ペプチドおよびポリペプチドという用語は、本発明の範囲において、約 80 A A 以上のペプチドに等しいものとして用いられる。

【 0 0 2 6 】

本発明によるペプチドは好ましくは、C - 1 0 0 - 3として記されるH C VゲノムセクションのA A 1 2 1 ~ A A 1 7 5 (式I)およびA A 3 3 7 ~ A A 3 6 3 (式II)のアミノ酸配列より成り、以下の配列を有している：

【 0 0 2 7 】

【 化 3 】

121 175
SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEECSQLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQTASRQA I

337 363
HVGPGEGAVQWMNRLIAFASRGNHVSP II

10

【 0 0 2 8 】

好ましいペプチドは次のとおりである：

【 化 4 】

4083:

121

175

SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEEC SQHLPYIEQGMMMLAEQFKQKALGLLQTASRQA

4074:

121

160

SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEEC SQHLPYIEQGMMMLAEQF

4073:

128

160

PDREVLRYREFDEMEEC SQHLPYIEQGMMMLAEQF

4072:

136

160

EFDMEEC SQHLPYIEQGMMMLAEQF

4071:

144

160

SQHLPYIEQGMMMLAEQF

4081:

161

175

KQKALGLLQTASRQA

4082:

144

175

SQHLPYIEQGMMMLAEQFKQKALGLLQTASRQA

4090:

135

164

REFDEMEEC SQHLPYIEQGMMMLAEQFKQKA

4056:

121

135

SGKPAIIPDREVLRY

4055:

129

143

DREVLRYREFDEMEEC

【 0 0 2 9 】

【 化 5 】

10

20

30

40

4054:

137 151
FDEMEEC SQHLPYIE

4053:

145 159
QHLPYIEQGMMLAEQ

4052:

153 167
GMMLAEQFKQKALGL

10

4091:

345 359
VQWMNRLIAFASRG

【 0 0 3 0 】

20

特に式 I のカルボキシル - およびアミノ - 末端領域からの配列は、H C V 感染の後期抗体検出に有益であることがわかった（例えばペプチド 4 0 8 1、4 0 5 6、4 0 5 5 および次の 4 0 6 0 ）：

【 0 0 3 1 】

【 化 6 】

4060:

121 139
SGKPAIIPDREVLYREFDE

30

驚くべきことに、式 II のアミノ酸またはその一部を含む、C - 1 0 0 - 3 の O R F 領域のカルボキシル - 末端領域（例えば 4 0 9 1 ）は、後期抗体の検出に特に適していることが分った。

【 0 0 3 2 】

さらにまた、式 I の中央領域は抗 - H C V の初期確認に関係している。この関連で好ましいのは前記ポリペプチド 4 0 7 1 および 4 0 7 2、およびペプチド 4 0 5 4、4 0 5 3 および 4 0 5 2 である。

【 0 0 3 3 】

さらにまた、三つのエピトープが式 I のペプチドにおいてつきとめられたが、そのうちの一つ（S）は後期抗体を認識し、そして他方（F 1 および F 2）は初期抗体を認識する。好ましいペプチドの例は以下のアミノ酸配列のうちの一つを有している：

40

A A_{a1} - D R E V L Y R - B A_{b1} （ S ）A A_{a2} - Q H L P Y I E - B A_{b2} （ F 1 ）A A_{a3} - K Q K A L G L - B A_{b3} （ F 2 ）

式中 A A および B A は任意の所望のアミノ酸であり、また a 1 ~ a 3 および b 1 ~ b 3 は、各々相互にの独立的に、0 より大きい、または 0 に等しい整数である。

【 0 0 3 4 】

アミノ - 末端配列を式 I のカルボキシル - 末端アミノ酸配列および式 II の配列と共に選ぶのが有利である。約 1 3 0 ~ 1 6 0 の式 I の中央アミノ酸配列はそれらとは別個に用いることができる。

50

【 0 0 3 5 】

さらに、本発明によるペプチドは、アミノ - 末端 H C V コア領域の一部、好ましくはコアとして記される H C V ゲノムセクションの A A 1 ~ A A 3 5 のアミノ酸配列より成り、次の配列を有する：

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVY I I I

【 0 0 3 6 】

【 化 7 】

1	30		
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQI	SP 10		10
8	26		
QRKTKRNTNRRPQDVKFPG	SP 23		
10	26		
KTKRNTNRRPQDVKFPG	SP 30		
12	26		
KRNTNRRPQDVKFPG	SP 30 D		20
14	26		
NTNRRPQDVKFPG	SP 30 C		
16	26		
NRRPQDVKFPG	SP 30 B		
18	26		
RPQDVKFPG	SP 30 A		30
8	24		
QRKTKRNTNRRPQDVKF	SP 31		
8	22		
QRKTKRNTNRRPQDV	SP 32		

【 0 0 3 7 】

ペプチド S P 1 0 および S P 2 3 が特に好ましい。

【 0 0 3 8 】

コア領域の本発明ペプチドを用いれば、感染の急性期からの初期抗体と後期抗体との両者を確認することができるが、これによってこれらペプチドに基づく検出感度は従来技術に比べ相当向上する。もう一つの利点はペプチドの高特異性であり、これによって一般に、誤った陽性反応を示す検体数は少くなる。

【 0 0 3 9 】

一般的に、初期および後期 H C V 抗体に特異的なペプチド、連結ペプチドまたはペプチド混合物を用いるのが有利である。何故ならば、両タイプの結合部位があるので感染初期からの検体と感染後期からの検体との両者を確認できるからである。さらにまた、H C V -

40

50

特異的 I g G および / または I g M 抗体による血清転化を信頼性よく確認でき、また一般に陽性および陰性検体を、極めて高い正確さをもって弁別することができる。さらに、一般的に、遺伝子工学によるタンパク質調製に必要な発現系、あるいはウイルス増殖のためには不可避である他の宿主細胞汚染による干渉もない。さらに一般に、ヒト起源の血清、クエン酸加、ヘパリン加または E D T A 血漿中の H C V - 特異的抗体の信頼し得る測定が保証され、また検体を約 5 6 で約 6 0 分間不活性化すれば一般に誤った陽性結果を与えることはない。最後に、本発明によるこれらペプチドを用いて調製された特異的抗体を用いれば、細胞不含患者血中の対応抗原の免疫化学的測定によって診断ギャップをさらにうめることができる。

【 0 0 4 0 】

10

本発明の主題によれば、好ましくは、回復期のまた慢性感染患者からの H C V - 特異的抗体および / または感染急性期からの H C V 抗体を確認する一連の新規ペプチドが記載され、また無差別ではあるが極めて鋭敏にかつ干渉をほとんど受けることなく抗 - H C V 抗体を検出するためのスクリーニングテストの基礎として適当なポリペプチドおよびポリペプチド混合物が記載されている。

【 0 0 4 1 】

さらに、本発明は、C - 1 0 0 - 3 の O R F 領域またはコア領域の前述のペプチドの少くとも一つに対してバイオスペシフィック (biospecific) アフィニティを有する抗体に関する。

【 0 0 4 2 】

20

細胞不含患者血中の対応抗原を本発明による抗体で免疫化学的に測定することにより内生抗体が出現する前であっても H C V の存在を確認することができる。

【 0 0 4 3 】

さらに本発明は、本発明によるペプチドを抗原として用いた H C V 抗体を検出および / または測定するための免疫化学的方法に関する。

【 0 0 4 4 】

さらに本発明は、各場合について、初期抗体に対して特異的に反応する一以上のペプチドと後期抗体に対して特異的に反応する一以上のペプチドとを別々の混合物として検体と反応させることより成る、感染初期と後期の鑑別診断方法に関する。

【 0 0 4 5 】

30

さらに本発明は、前記ペプチドを哺乳動物、特にヒト、において産生させるのに用いることに関する。

【 0 0 4 6 】

さらに本発明は、前述の抗体を診断および治療目的に用いることに関する。

【 0 0 4 7 】

従って本発明は、本発明の抗体またはペプチドの少くとも一つを単独でまたは他のペプチドまたは抗体と共に含む剤に関する。

【 0 0 4 8 】

前記免疫反応性ペプチドは合成または遺伝子工学により、好ましくは当業者に知られた方法による合成により製造できる。ペプチドの化学合成は例えば B A R A N I , G . および M E R R I F I E L D , R . B . が " The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology " , Vol. 2, Academic Press 1980, ed. Erhard Gross, Johannes Meyenhofer に記載しているとおり、特にポリペプチドとして、またはオーバーラップまたは非オーバーラップアミノ酸配列を有するいくつかの小ペプチドの混合物として行うことができる。

40

【 0 0 4 9 】

遺伝子工学により製造されたポリペプチドはその融合部分が後で除去されてしまう融合タンパク質を含む。さらに、適切な場合には例えばグリコシル化、アセチル化またはホスホリル化により修飾されたポリペプチドが包含される。

【 0 0 5 0 】

これらのアミノ酸配列はポリペプチドとしておよびオーバーラップまたは非オーバーラッ

50

プアミノ酸配列を有するいくつかの小ペプチドの混合物として合成することができる。

【0051】

さらにまた、個々のペプチドの混合物の方が、前記構造の単一ペプチドよりも、免疫化学的抗-HCV検出にとって良い診断特性を有することがあることも見出した。C-100-3のORF領域およびコア領域のペプチドの混合物を用いるのが特に有利である。

【0052】

従って本発明は、さらに、本発明ペプチドの一以上を含むペプチドの混合物に関する。

【0053】

別の態様においては、二以上の前記ペプチド、好ましくは2~10、特に2~4個のペプチドをブリッジを用いまたは用いずに連結する。それらペプチドの長さは好ましくは6~15個のアミノ酸である。二以上のペプチドのポリマー体を当業者に知られた方法により製造しそして担体例えばタンパク質またはラテックス粒子に結合することさえもできる。すなわち、担体またはブリッジとして特に適しているのは例えばヒト血清アルブミンおよび/またはポリリジンである。それらペプチドを1~40、好ましくは1~20、特に1~10個のアミノ酸で延長することにより修飾することも同じく可能である。付加的領域および構造は、ペプチド全体の物理化学的挙動に対し有益な効果をもつことがあるが、ペプチドまたはその部分の免疫反応性は維持されるべきである。

【0054】

従って本発明はさらにブリッジを用いてまたは用いないで相互に連結され、あるいは担体に結合され得るペプチドに関する。

【0055】

このタイプの修飾は、一般的に、固相への受動吸着または共有結合特性を有益に変え、カプリング方法に有利な効果を有し、あるいは該ペプチドに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を産生させる場合に抗原としてより強力に働く。

【0056】

すなわち例えば本発明はさらに次式



(式中A AおよびB Aは任意の所望のアミノ酸であり、そしてnおよびmは各々相互に独立的に0~約60、特に1~40の整数である)で示されるペプチドに関する。

【0057】

しばしば、様々な方法で、例えばペプチドを相互にまたは担体に連結させるために一以上のアミノ酸、好ましくはシステインをアミノ-末端またはカルボキシル-末端に結合することにより、チオグリコール酸アミド化により、例えばアンモニウムまたはメチルアミンなどでカルボキシル-末端アミド化することにより、ペプチドを誘導体化するのが有利である。このタイプの修飾はポリペプチド上の正味荷電を変えそしてペプチドの物理化学的特性を改善しあるいは固体担体、担体タンパク質または別のペプチドへのペプチドの共有結合を容易にすることがある。さらに当業者は、本発明ペプチドがそれら自体の間であるいはそれら自体を用いて遺伝子工学または合成により複数の免疫関連エピトープが一つのペプチド上に局在するように調製され得ることも知っている。

【0058】

すなわち、本発明はさらに一以上のアミノ酸の置換、付加または欠失により修飾された本発明によるアミノ酸配列を有するペプチドに関する。

【0059】

一般に、このタイプの修飾はペプチドの免疫反応性を直接変化させることはないが、ペプチドの免疫学的性質を向上させることは完全に可能である。すなわち、例えば、メチオニンは自然酸化しやすいが、これはノルロイシン置換によりポリペプチドの抗原特性を本質的に変えることなく防ぐことができる。

【0060】

当業者は、所与のアミノ酸配列を様々な利点を伴い得る広範にわたる様々な改変例えば欠失、挿入または置換に付すことができることを知っている。このタイプの修飾は例えばG

10

20

30

40

50

ly、Ala; Val、Ile、Leu; Asp、Glu; Asn、Gln; Ser、Thr; Lys、Arg; Phe、Tyr; Ala、Ser; Ala、Thr; Ala、Val; Ala、Pro; Ala、Glu; Leu、Gln; Gly、Phe; Ile、Ser および Ile、Met などの組合せに関する。

【0061】

同じく、ポリペプチドの吸着特性を約2～20個の疎水性アミノ酸より成る疎水性配列、例えばPhe Ala Phe Ala Pheなどの付加の形で向上させることも有利なことがある。

【0062】

さらに本発明は、本発明ペプチドの少なくとも一つをコードするDNA配列に関する。

10

【0063】

さらに本発明は、その特異的部分において本発明によるDNA配列の少なくとも一つと相補的である少なくとも一つの核酸プローブが用いられるハイブリダイゼーション反応を特異的段階として用いるHCVの検出および/または測定のための分析方法に関する。免疫化学的検出は一般に均一（溶液中）または不均一（固相使用）方法として抗原および/または抗体の測定を可能にする方法を含む。イムノアッセイとも称されるこれらの例は酵素イムノアッセイ（ELISAまたはEIA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、イムノフルオレセンスアッセイ（IFA）、ラジオイムノプレシピテーションアッセイ（RIPA）または寒天ゲル拡散アッセイなどである。

【0064】

20

これら数多くの極めて多様な方法は、特定の態様ごとに、検出に用いたマーカーまたは測定原理（例えば光度測定、放射性測定、視認、または凝集、散乱光またはプレシピテーション挙動）、および固相について相違している。当業者は結合および遊離検体抗体または抗原の分離は広く用いられてはいるが例えばいわゆる均一アッセイでは絶対必要というわけではないことを知っている。不均一イムノアッセイ、特に不均一ELISA法が好ましい。

【0065】

同じく当業者は、“確認テスト(confirmatory test)”という用語が、ドット(dot)法と称されるテストが名前により抗原の固定の仕方を説明しているにすぎないのと同様、イムノアッセイの使用を説明しているにすぎないことを知っている。

30

【0066】

抗体検出においては、検体を記載のペプチド配列とある時点で接触させて特定の方法の特定の段階で抗原-抗体複合体を形成しあるいは競合および阻害テストにあっては適当な標識試薬の添加によりその形成を防ぐことが免疫化学的検出方法の前提要件である。

【0067】

直接法では、抗体を固相に結合したペプチドと、あるいは標識されたペプチドと、あるいは両者と接触させることができ、基本となる方法が、1-、2-または多-段階法として、同一のまたは異なるペプチド（またはペプチド混合物）を固相上におよび検出用液状試薬としておよび特異的ないわゆる捕獲抗体（例えば抗IgM）またはアフィニティー試薬（例えばプロテインA）との組合せで用いた免疫測定テストデザイン（二重抗原サンドイッチ）または第二抗体テストの原理に基づくかどうかは重要でない。

40

【0068】

ペプチドは固相に対して、共有結合的に、吸着により、または特異的抗体または同様のアフィニティー法を用いて、例えばビオチン/アビジン複合体を介して、しかし好ましくは吸着により結合させることができる。

【0069】

固相担体材料として適しているのはプラスチック例えばポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミドおよびその他の合成ポリマー、天然ポリマー例えばセルロースおよび誘導体化された天然ポリマー例えばセルロースアセテートおよびニトロセルロース、およびガラス（特にガラス繊維など）などである。ポリスチレンが担体材料として適している。

50

【0070】

担体はビーズ、ロッド、チューブおよびマイクロタイター(microtiter)プレートの形態、あるいは懸濁液例えばラテックス粒子の形態とすることができる。シート様構造物、例えば紙片、小プレートおよび膜も同じく適している。担体表面は水性溶液に対して透過性があるもの、ないものいずれであってもよい。

【0071】

好ましい担体はビーズ、チューブ、ウエル、微粒子、紙片および膜である。特に好ましい担体はマイクロタイタープレート、ラテックス粒子、ポリスチレンビーズまたは磁力に従いやすい粒子である。

【0072】

担体をコーティングするためのペプチド濃度は一般に約 $0.01 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $0.01 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 、特に好ましくは $2 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ である。その高純度および強度の抗原性により、例えば $0.01 \sim 2.0 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ という少量の使用を可能にする合成により製造されたポリペプチドを用いるのが特に有利である。担体の結合能は、特にポリスチレンを用いる場合、一般的に飽和してしまうことはないので通常、複数の異なるポリペプチド、殊に $2 \sim 5$ 種、特に $3 \sim 4$ 種の異なるポリペプチドでコートすることができるが、このことは特に有利である。

【0073】

ペプチドを検出のための標識誘導体として用いる場合には、適切なカップリング法は当業者に知られたすべてのものである。さらにまた、多段階法例えば、抗体が標識を有している予め形成されたペプチド-抗体複合体、高アフィニティー系例えばビオチン/アビジン(これらの反応剤の一方の標識)などをアレンジすることもできる。

【0074】

使用できるマーカー例は放射性同位元素、蛍光または化学発光色素である。さらに、例えば発色原、発光原または蛍光原基質系により、または第1酵素により活性化される第2酵素を用いたその後の増幅系により検出される酵素をマーカーとして用いることもできる。

【0075】

マーカーとして好ましく用いられるのは酵素、特にアルカリ性ホスファターゼおよび/または西洋ワサビペルオキシダーゼまたは化学発光原例えばアクリジニウムエステルである。

【0076】

標識は、前記マーカーについて従来技術に記載されている方法により行われる。

【0077】

抗体をペルオキシダーゼで標識する場合はNAKANE et al., 1974, J. Histochem. Cytochem. 22, 1084~1090の過沃素酸塩法を用いることができ、またはパートナーをヘテロ二官能性試薬により連結するISHIKAWA et al. 1983, J. Immunoassay 4, 209~327の方法を用いることができる。

【0078】

これらの方法のほかに、ペプチドを、ペプチド-特異的抗体により誘発された物理化学的变化例えば沈殿、凝集または光散乱などを自動的にまたは視覚的に測定するために、適当な表面例えばラテックスまたは赤血球の感作に用いることもできる。さらにペプチドを誘導体化することなく前述の方法と同様これら測定原理の阻害に用いることも知られている。

【0079】

本発明によるペプチドまたはそれらの誘導体を用いて調製されたポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いる免疫診断法を抗原検出に用いることができる。この検出法に適した態様は当業者に知られていて、特定の段階で抗体-抗原複合体を形成するか、または競合法において標識抗原の添加により複合体形成を阻害することより成る。

【0080】

抗原テストを確立するための固相、マーカーまたは測定プリンスiplとして適しているの

10

20

30

40

50

は相当する抗体測定について記載されているすべての可能性であるが、競合原理および二重抗体サンドイッチ法が免疫化学的方法として特に好ましい。この脈絡においては、方法が1 -、2 - または3 - 段階法として設計されるかどうかは重要でない。すなわち多段階法は、未標識検出抗体であってそれらに対する適切に標識された別の抗体を用いて測定されるものを使用して行うことができる。例えば血清アルブミンまたはスカシガイヘモシアニンにカップリングさせることによって可能であるが (B. S. Schaffhausen, Hybridoma Technologie, the Biosciences and Medicine, ed. T. A. Springer, Plenum Press NY, London, 1985)、ペプチドをそれらの免疫原性が改善されるように修飾しておくことは抗体の産生(raising)に有利である。

【0081】

最後に、本発明はさらに固相および乾燥状態で一部あるいは全部の必要試薬を含む免疫診断要素を用いる場合にも適用でき、そしてこの場合にも本発明の新規ペプチドは固相側または検出試薬中またはその両方に含まれそして抗体測定、抗原検出またはその他の被分析物質(analyte)との組合せが行われる。

【0082】

本発明の新規ペプチドの予想外の利点の一つは、それらによってHCV抗体の信頼性ある測定が可能となる点である。さらにこれらのペプチドを用いれば急性感染期からの初期抗体も確認されるが、これによりこれらペプチドに基づく検出感度が従来技術に比べ相当に向上し、さらにはこれら抗体タイプ(初期または後期抗体)に対する適宜の結合部位を有するペプチドを二つの異なるテスト方法に相互に別々に用いれば一方における急性期と他方における慢性または回復期との間の鑑別が可能となる。最後に、本発明によって得られるもう一つの利点は本発明のペプチドの特異性が高い点であり、これによって誤って陽性反応を示す検体数は最小に抑えられることになる。

【0083】

一方においては献血センターにおけるウイルス安全対策上、そして他方においてはコスト上の理由から、いわゆる組合せテストが開発されそして1989年来利用可能となっているが、これにより抗-HIV 1および/または抗-HIV 2の同時非鑑別検出ができる(K. Koerner et al., Lab. Med. 14, 159~161, 1990)この開発が可能となったのは、それら二つのHIVサブタイプが相互に大きな類似性を示しさらにそれらが同じウイルスクラスに属するためである。すなわち、かかる抗-HIV 1/2組合せテストにおける抗-HIV 1測定も抗-HIV 1とHIV 2抗原との交叉反応に基づいている(M. Busch et al., Transfusion 30/2, 184~187, 1990)が、同じくやはり逆に抗-HIV 2検出は抗-HIV 2およびHIV 1抗原の間で生じる反応によって高められる。これに基づいて、二つの抗体特異性を有する組合せ検出の確立は、関連のあるまたは構造類似の抗原を用いる場合には相対的に簡単であることがわかる。非A非B肝炎の病原体、いわゆる肝炎Cウイルス(HCV)の検出は本発明による抗-HCV測定の確立のための必要条件であった。それに伴ってスクリーニングテストの性能面では改良されるが、最新の抗-HCVテストについても、一方において抗-HIV組合せテストおよび他方において抗-HCV個別テストによる個々の供血者の検査には相当な努力と相当な付加コストが伴うという問題が生じる。

【0084】

抗-HCV測定についての今日までのすべての商業ベースの態様および大部分の抗-HIV組合せテストは遺伝子工学によるHCVまたはHIVポリペプチドに基づいている。しかしながら、やはり今日にいたるも、HCV(フラボウイルス)およびHIV(レトロウイルス)の場合のように異なるウイルスクラス関係が存在することから、類似抗原を使用できないときは複数の異なる抗原を含む唯一のテスト混合物中の複数の異なる抗体特異性を一回の免疫化学的検出で同時に測定することには成功を収めていない。本発明の意味において、異なる抗体特異性とは、相互の交叉反応性が極めて低いか全くない抗体を意味する。複数のウイルス抗原に対する全部で三つの抗体特異性を検出するためのこのタイプのテストは、感度の点でもまた相互に干渉しあう相互作用の結果干渉の受けやすさ(特異性

10

20

30

40

50

)の点でも、特定の個別のテストの対応特性よりも劣る傾向にあるとされていた。

【0085】

今般驚くべきことに、それぞれ異なる病原体の異なるエピトープを担体に固定すればそれぞれ異なる病原体に対する複数の異なる抗体または異なる抗体特異性を単一テストで免疫化学的に検出できることも見出された。

【0086】

さらにまた、本発明方法により認められる感度は少なくとも個別テストの感度には相当する。すなわち、例えば、本発明方法の場合に抗-HIV 1/2および抗-HCVについて測定される感度特徴は少なくとも個別テストのそれらに相当する。

【0087】

従って、望ましくない誤った陽性反応による干渉の受けやすさが本発明方法により低下するということも全く驚くべきことであった。すなわち、例えば本発明による抗-HIV / 抗-HCVの特異性をテストしたところ、得られた特異性は二つの個別テストの全体によって与えられるものよりも高かった。その結果、間違っ捨てられる供血数は全体として減少させることができる。

【0088】

従って本発明はさらに、特定の病原体の二以上のエピトープを担体に固定しそして該病原体の検出および / または測定を単一のテストで行うことより成る、それぞれ異なる病原体に対する複数の異なる抗体特異性を検出および / または測定するための免疫化学的方法にも関する。

【0089】

ある種の課題、例えば縦断的検査のためには、異なる病原体の非鑑別同時測定を行うのが望ましいことがある。これは、様々な抗体間の区別をすることなくイエスの応答またはノーの応答(すべての抗体特異性について陰性)だけが得られることを意味する。

【0090】

さらに、適切な場合には同時抗体検出の鑑別測定も望ましい。これは、本発明の範囲内において、例えば免疫測定テストにあっては、異なるウイルス特異的標識を有する抗原、例えばペルオキシダーゼを有するHIV 1抗原、アルカリ性ホスファターゼを有するHIV 2抗原およびβ-ガラクトシダーゼを有するHCV抗原を用いることにより、直接可能である。次に、同時結合した抗体特異性を順次または同時に測定することは、異なる酵素基質を用いることにより可能である。

【0091】

別の形の鑑別法は、一つの抗体特異性に対応抗原を特異的に検体に添加することにより阻害することである。

【0092】

すなわち本発明はさらに、検出および / または測定が鑑別的または非鑑別的に、好ましくは非鑑別的に、行われる、異なる抗体特異性を同時検出および / または同時測定するための免疫化学的方法に関する。

【0093】

本発明による異なる病原体は、異なる特異性を有する抗体および一般に極めて低いまたはゼロの交叉反応性の対象となっている病原体を意味する。これらの例は、HIV 1 + 2、HCV、HTLV I + II、HBVまたはトレポネーマ・パリダム(*Treponema pallidum*)、好ましくはHIVおよびHCVである。

【0094】

対応抗体に対する高密度または高濃度の結合部位(エピトープ)を有する前記病原体の、特にHIV 1、HIV 2およびHCVの、抗原を担体に固定するのが特に有利である。このようにすれば、例えば、血清転化を確認でき、一般に高い正確さをもって陽性および陰性検体を弁別でき、遺伝子工学によるタンパク質調製に必要な発現系による干渉は一般に起こり得ず、ウイルス増殖上不可避である他の宿主細胞汚染は一般には存在せず、ヒト起源の血清、クエン酸加、ヘパリン加およびEDTA血漿における異なる特異性を有する

10

20

30

40

50

H I V - および H C V - 特異的抗体の一般に信頼し得る測定が保証され、また 5 6 で 6 0 分間検体を不活性化させれば誤った陽性結果を生じることはない。

【 0 0 9 5 】

好ましいものとして用いられるのは（特に H I V 1 および / または H I V 2 および H C V の）ポリペプチド（それらは高感度抗 H I V / 抗 - H C V 検出に適している）、そしてさらに、組合せ抗体検出のスクリーニングテストの基礎として適したポリペプチド混合物より成る単一エピトープおよび / またはそれらの組合せである。

【 0 0 9 6 】

すなわち、本発明は H I V 1 および / または H I V 2 および H C V のポリペプチド混合物にも関する。

【 0 0 9 7 】

以下のポリペプチドが特に好ましい：

1 . HIV 1 (Ratner et al., Nature 1985, 313, 277 ~ 284のナンバリングシステム)：

IV トランスメンブレンタンパク質(gp 41)：AA 580 - AA 630

V エンベロープタンパク質 (gp 120)：AA 490 - AA 540

VI コアタンパク質 (p 24)：AA 240 - AA 390

2 . HIV 2 (Gyader et al., Nature 1987, 326, 662 ~ 669のナンバリングシステム)：

VII トランスメンブレンタンパク質(gp 36)：AA 570 - AA 620

VIII エンベロープタンパク質 (gp 110)：AA 480 - AA 530

IX コアタンパク質 (p 26)：AA 230 - AA 380

3 . HCV(WO 89/04669およびWO 90/11089のナンバリングシステム)：

X 非構造タンパク質 4 (NSP 4)：AA 121 - AA 175

XI 非構造タンパク質 3 (NSP 3)：AA 1 - AA 265

XII 構造タンパク質 (コア)：AA 1 - AA 80

【 0 0 9 8 】

（特に非鑑別抗 - H I V / 抗 - H C V スクリーニングテストにとって）特に好ましいのは前記ポリペプチドの混合物であり、その一部を例示として記すが、考えられる可能性をそれらに限定するものではない：

10

20

XIII gp 41 HIV 1
gp 36 HIV 2
NSP 3 HCV

XIV gp 41 HIV 1
gp 36 HIV 2
NSP 4 HCV
コア HCV

10

XV gp 41 HIV 1
gp 36 HIV 2
NSP 3 HCV
NSP 4 HCV
コア HCV

XVI gp 41 HIV 1
p 24 HIV 1
gp 36 HIV 2
NSP 3 HCV
コア HCV

20

または

XVII gp 41 HIV 1
p 24 HIV 1
gp 36 HIV 2
p 24 HIV 2
NSP 3 HCV
NSP 4 HCV
コア

30

【 0 0 9 9 】

一般に前記ペプチド混合物を用いれば診断用途に対するよりよい免疫学的性質が得られる。

40

【 0 1 0 0 】

H I V 1、H I V 2およびH C Vの以下のペプチドは特に適していることが判明した：

【 化 8 】

XVIII SPH 9 (HIV 1, gp 41) :

586 620
RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

XIX SPH 20 (HIV 2, gp 36) :

578 613
RVTATIEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVND

XX SP 4083 (HCV, NSP 4) :

121 175
SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEECSQLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQTASRQA

10

またはそれらの部分、例えば

XXI SP 4060 および SP 4082(HCV, NSP 4)の混合物 :

121 139
SGKPAIIPDREVLRYREFDE SP 4060

20

144 175
SQLPYIEQGMMLAEQFKQKALGLLQTASRQA SP 4082

XXII SP 10 (HCV, コア) :

1 30
MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGGQI

30

および／または

XXIII SP 31 (HCV, コア) :

8 24
QRKTKRNTNRRPQDVKF-NH₂

【 0 1 0 1 】

同様に、HIV 1、HIV 2またはHCVの異なるタンパク質領域からのさらなるペプチドも、これらのポリペプチドに免疫関連がある限り、一体化することができる。逆に、例えばHIV 1およびHCVペプチドの混合物を用いて抗-HIV 1 / 抗-HCVだけを同時測定するが例えば抗-HBV / 抗-HIV 1 / 抗-HCVは測定しないために、対応ペプチドを省くことにより非鑑別検出において特定の抗体を排除することも、例えば疫学的課題の上からは、有利なこともある。さらに、HCVとは同一でないペプチド、例えばまさにHIVを、HCVペプチドについて前述した方法を同様にして誘導体化と修飾することもできる。

40

【 0 1 0 2 】

本発明方法の大きな利点の一つは、異なる病原体に対する複数の抗体を単一のテストで検出ができ、しかもなお個別テストで達成し得るのと同じ高さの特異性または感度が達成される点である。

50

【 0 1 0 3 】

下記の実施例は本発明の諸態様を記載したものであるが、本発明をそれらに限定するものではない。

【 0 1 0 4 】

実施例 1

ペプチド溶液の調製、およびこれらペプチドまたはペプチド混合物によるマイクロタイタープレートのコーティング

1 ~ 10 mg/ml のペプチドを含む蒸留水中の 50 % 酢酸中の本発明ペプチド貯蔵溶液から 0.10 M 重炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中の連続 2 倍希釈液を調製した、すなわちペプチド濃度が 50、20、12.5、6.25、3.12、1.56、0.78、0.39、0.2、0.1、0.05 および 0.01 µg/ml である一連の希釈液を得た。個別ペプチドの混合物についても手順は同様とし、0.1 M 重炭酸ナトリウムに希釈することにより、前述の通りの全体的最終濃度ではあるがいくつかのペプチドの混合物の場合にあってはそれらを等濃度で (1 : 1 混合物の場合) または相互に対し様々な割合で含むものを得るために、前記貯蔵溶液を付加的に例えば 10 : 1 または 1 : 4 というように様々な割合で混合した。

10

【 0 1 0 5 】

それぞれについて、100 µl の希釈液をマイクロタイタープレート、タイプ B (Nunc . Roskilde、デンマーク、により供給されたもの) の 16 ウエルに入れた。希釈液を入れたテストプレートを 20 で 18 時間放置し、次いでウエル内の溶液を吸引により除去し、そしてそれらウエルをリン酸緩衝生理学的食塩水 (PBS、pH 7.4) 中の 10 g / リットル牛血清アルブミンの溶液 300 µl を用いて充填および吸引除去により 3 ~ 4 回洗浄し、そしてそれらテストプレートを次いでシリカゲル上、20 で乾燥した。

20

【 0 1 0 6 】

実施例 2

IgG クラスのヒト免疫グロブリン (h - IgG) に対するペルオキシダーゼ標識抗体、および検出用 TMB 基質の調製

KOEHLER および MILSTEIN のモノクローナル抗体調製法 (Nature 256, 495, 1975) により h - IgG に対する抗体を調製し、同じ抗原特異性を有する異なるモノクローナル抗体を STAEBLI et al. (J. of Immunological Methods 32, 297 ~ 304, 1980) により記載された方法により確認した。ゲルクロマトグラフィーおよびリン酸緩衝食塩水 (PBS、pH 7.4) に対する透析による精製後、モノクローナル抗体画分含有プール (タンパク質 4 mg/ml) を次いで TANAMORI et al. (J. Immunol. Meth. 62, 123 ~ 131, 1983) により記載されている方法により N - ガンマ - マレイミドブチリルオキシスクシンイミド (GMB S) (Behring Diagnostics 社より入手) と反応させた。

30

【 0 1 0 7 】

塩酸 2 - イミノチオラン (Sigma 社により供給された。カタログ番号 I 6256) を KING et al. (Biochem. 17, 1499 ~ 1506, 1978) により記載された方法により、西洋ワサビペルオキシダーゼ (POD) (Boehringer Mannheim 社より入手。カタログ番号 413470) と反応させた。IgG - POD 接合体は GMB S - IgG 接合体とイミノチオラン - POD 接合体から TANAMORI et al. (supra) により記載された方法により調製した。

40

【 0 1 0 8 】

得られた IgG - POD 接合体溶液のタンパク質含量は 360 µg/ml であった。POD 対 IgG 比は 2.8 として測定された。その溶液を次に、50 ml / リットル牛胎児血清 (FCS)、5 g / リットルポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (^RTween 20) の PBS 溶液を用いて 500 ng/ml IgG - POD まで希釈しそして抗 - IgG / POD 接合体と呼んだ。ELISA に用いるために、次に 0.5 % ^RTween 20 を含有する tris 緩衝液 (pH 7.4) への希釈を (1 : 100 ~ 1 : 20,000 希釈範囲で) 様々に行って、0.1 M 2 - アミノ - 2 - (ヒドロキシメチル) - 1,3 - プロパンジオール (tris)、0.1 M 塩化ナトリウム (NaCl) および 0.1 % ^RTween (pH 8.4)

50

を含む接合体緩衝液中で均一に 1 : 2 6 最終希釈液を調製した。従来技術に従って調製されたウサギポリクローナル抗体は使用の為に同じく 1 + 2 5 の希釈液が得られるように調節した。

【 0 1 0 9 】

抗 - I g G / P O D 接合体の検出には、二つの貯蔵溶液から調製された過酸化水素およびテトラメチルベンチジン (T M B) を含む基質調製物または基質系を用いた。

【 0 1 1 0 】

貯蔵溶液 1 : 二塩酸 T M B を攪拌しながら、5 g / リットル、すなわち 1 6 mmol / リットル濃度で二重蒸留水に溶解しそして 5 規定塩酸で pH 1 . 5 に調節した。ペニシリン G をこの溶液に攪拌しながら 2 0 0 mg / リットル、すなわち 0 . 5 6 mmol / リットルの最終濃度として添加した。

10

【 0 1 1 1 】

貯蔵溶液 2 : 1 . 4 ml の氷酢酸、1 . 5 ml の 1 規定 N a O H および、2 5 0 mg すなわち 3 mmol の H₂O₂ (尿素 / 過酸化水素アダクトとして) を 9 0 0 ml の二重蒸留水に添加した。溶解完了後、その混合物を二重蒸留水で 1 リットルとした。

【 0 1 1 2 】

T M B 基質調製物 : 1 容量部の貯蔵溶液 1 と 1 0 容量部の貯蔵溶液 2 とを混合した。

【 0 1 1 3 】

実施例 3

従来技術

20

例として用いたのは市販の E L I S A テストキット (H P 1) であるが、このキットでは W O 8 9 / 0 4 6 6 9 に記載されそして遺伝子工学により酵母で調製される C - 1 0 0 - 3 構築物が抗原として用いられている。ヒトの血清および血漿を検査するための手順は製造元の包装への差し込みに示されたものとした。例えば検体希釈は 1 : 1 1 とし、血清のインキュベーションは 1 時間行い、抗ヒト I g G / P O D 接合体のインキュベーションは 1 時間行い、そして O - フェニレンジアミン (O P D) を基質とする酵素基質系を用い、4 9 2 nm で光度測定を行い、そして限界を設定した (0 . 4 0 E の閾値を陰性コントロールの平均値に加える) 。

【 0 1 1 4 】

C - 1 0 0 構築物のほかにコア領域および N S P 3 領域 (C 3 3 C) からの付加的エピトープを含むもう一つの市販の E L I S A (H P 2) に対して全く同様の手順を用いた。すなわち、ヒトの検体の検査にオリジナルテストキットを前述の如く製造元により説明された手順に関するすべての説明を順守して用いた。

30

【 0 1 1 5 】

これに対し、前記二種類の市販品を用いてチンパンジーの血清または血漿中の H C V - 特異的抗体を測定するための手順ではヒト I g G に対するウサギで調製されたポリクローナル抗体を検出に用いた。このために、ウサギ抗血清の I g G 画分を実施例 2 に記載のとおり精製し、透析しそしてペルオキシターゼ (P O D) で標識した。予備テストで確認されたヒト I g G に対する抗体の交叉反応をチンパンジー I g G に信頼性よく適応させる (fashion over) ために、その最終濃度をモノクローナル抗 - I g G / P O D 接合体濃度の 4 倍に調節した。

40

【 0 1 1 6 】

すべてのチンパンジーの初期値が高い値を示したので表 1 4 ~ 1 6 に記載の如く限界設定を改める必要があった (表 1 4 ~ 1 6 参照) 。

【 0 1 1 7 】

H I V 1 および H I V 2 抗体の非鑑別測定のための比較用抗 - H I V 1 + 2 組合せテストは、合成的に調製された H I V 1 および H I V 2 のペプチドに基づく市販品 (H P 3) である。このテストの手順も製造元の包装への差し込みのそれとしたところ、例えば検体希釈は 1 : 2 とし、血清のインキュベーションは 3 0 分間とし、接合体 (抗 - ヒト I g G / P O D) のインキュベーションは 3 0 分間とし、そしてテトラメチルベンチジン

50

(TMB)を基質とする酵素基質系を用い、450nmで光度測定を行い、そして限界を設定した(0.250の閾値を陰性コントロールの平均値に加えた)。

【0118】

実施例4

本発明によるペプチドを用いたELISAによるHCVに対する免疫グロブリンクラスGのヒト抗体の測定

ペプチドまたはペプチド混合物を用いて前述の如くコーティングされたマイクロタイタープレートのウエル中、0.3M tris、0.3M NaCl、20%ボビセリンおよび0.1% ^RTween20を含む検体緩衝液50μlに50μlの血清または血漿を添加した。37で30分間インキュベーション後、ウエル内容物を吸引除去し、そしてそれらウェルをPBS中に1g/リットル ^RTween20を含有する洗浄用緩衝液で5回洗浄した。次に最終希釈液中の接合体100μlを、好ましくはtris、0.5%Tween20中の1:3000の予備的希釈液、および接合体緩衝液中の1:26の最終希釈液を用いて、ウェルに添加した。37で30分間インキュベーション後、ウエル内容物を吸引除去しそして再び5回洗浄した。次に100μlのTMB基質調製物を各ウェルに加え、20~22で30分間インキュベートし、そしてインキュベーションを100μlの1規定硫酸の添加により止めた。着色溶液の吸光度をPBSブランクを基準として用いて450nmの波長で測定した(E_{450})。

10

【0119】

0.10より高い E_{450} を生じた検体は抗-HCV陽性として分類し、 E_{450} が0.05~0.10の範囲であった検体は抗-HCV境界(マージナル)として分類し、そして0.05より低い E_{450} を生じた検体は抗-HCV陰性として分類した。

20

【0120】

表1は本発明ペプチド4083、および式Iで示されるより小さな配列の混合物を用いたヒトの検体についての実施例1、2および4に記載された測定から得られた結果をまとめたものである。表2のデータも同様にして本発明ペプチドSP10を用いて得られたものであり、両方のELISAの結果をHP1(実施例3)のそれと比較してある。

【0121】

表1

ペプチド4083を含むELISA、および固相上のより小さなペプチドの混合物を用いてヒトの検体の抗-HCVを測定した結果

30

【0122】

【表1】

表 1

ペプチドELISAによる陽性

		(2 μ g 4083/ml)	(2 μ g 4060/ml および 2 μ g 4082/ml)	
		初 回 陽性	再テスト 陽性	再テスト 陽性
抗-HCV陽性検体				
フランスより	n=15	15	15	15
オーストリアより	n=17	17	17	17
ドイツより	n=20	20	20	20
米国より	n=49	49	49	49
合 計	n=101	101 ¹⁾	101 ¹⁾	101 ²⁾
健常供血者よりの血清／血漿対				
n=259 血清		2	1	n. d.
n=259 血漿		1	0	n. d.

10

20

【 0 1 2 3 】

1) n = 97 検体は 0.10 E の限界において > 2.5 の割合となる 2.5 E の吸光度を示した。

【 0 1 2 4 】

2) n = 94 検体は > 2.5 E の吸光度を示した。それぞれわずか 4 および 7 検体の反応は比較的弱かったが、E₄₅₀値は 0.8 ~ 2.5 (0.10 E の限界) であり依然としてど

30

【 0 1 2 5 】

表 2

固相上に新規ペプチド S P 10 を含む ELISA を用いてヒトの検体の抗 - H C V を測定した結果

【 0 1 2 6 】

【 表 2 】

表 2

		ペプチドE L I S Aによる陽性 (2 μ g SP 10 /ml)	
抗-H C V 陽性検体		初 回 陽性	再テスト 陽性
フランスより	n = 35	35	35
オーストリアより	n = 26	26	26
ドイツより	n = 29	29	29
米国より	n = 53	53	53
合 計	143	143 ¹⁾	143 ¹⁾
血清／血漿対（第2図の健常供血者の分布プロット参照）			
n = 500 血清		0	0
n = 500 血漿		0	0

10

20

【 0 1 2 7 】

1) n = 1 4 2 検体は 0 . 1 E の限界において 2 5 の割合となる > 2 . 5 E の吸光度を示した；唯一の検体は 1 . 2 E という値で比較的弱く反応したがそれでも市販 E L I S A (H P 1) よりも相当に強い反応であった。

【 0 1 2 8 】

市販テスト (H P 1) で抗 - H C V 陽性として分類されたすべての供試ヒト検体は同じく本発明ペプチドに基づくすべての E L I S A により陽性であることが認められた。市販テスト (H P 1) の結果と極めてよく一致するほか、ペプチド E L I S A における極めて強度の信号形成も注目すべきである。同時に、健常供血者の縦断的検査結果からテストの干渉の受けやすさが極めて低いことが明らかとなっている。すなわち、血清および血漿の健常供血者をテストしたところ、本発明ペプチドに対する非特異的結合は極微にすぎなかった、換言すれば誤った陽性結果はほんのわずかにすぎなかった。

30

【 0 1 2 9 】

表 3 は、実施例 1、2 および 4 による式 (I) で示されるより小さな (1 5 アミノ酸) の使用に基づく E L I S A を用いてヒトの検体をテストした際に得られたさらなる結果を示す。それらペプチドが H C V 抗体のエピトープ規定に適していること、そしていくつかのペプチドの混合物 (好ましくは 3 ~ 6 種のペプチドを含有) としても抗 - H C V 測定に適していることは明らかである。

【 0 1 3 0 】

表 3

実施例 1 による、マイクロタイタープレート表面上における 1 5 アミノ酸より成るより小さなペプチドとヒト抗 - H C V 陽性検体との E L I S A での反応性；結果は 4 5 0 nm における吸光度 (E ₄₅₀) として報告する (- = 0 . 1 0 E より低い陰性値)

40

【 0 1 3 1 】

【 表 3 】

表 3

検体番号	4056	4055	4053	4052	4081	4091	混合物	
							4056	
							4055	
							4053	
							4052	
							4081	
							4091	10
							各0.5	
$\mu\text{g}/\text{ml}$	2	2	2	2	2	2		
BC90-89	>2.50	0.20	—	—	—	—	1.40	
252	—	—	0.20	—	>2.50	—	2.10	
90	0.80	—	—	—	1.60	—	2.00	
268	>2.50	—	0.20	—	>2.50	>2.50	>2.50	
84	—	1.20	1.60	—	1.70	>2.50	>2.50	
225	>2.50	>2.50	—	—	>2.50	>2.50	>2.50	20
270	2.00	1.70	—	—	2.20	>2.50	>2.50	
229	0.20	—	—	1.10	1.00	—	1.50	
288	>2.50	>2.50	—	0.50	>2.50	>2.50	>2.50	
290	>2.50	>2.50	—	0.20	>2.50	>2.50	>2.50	
242	—	0.50	—	—	1.20	1.40	>2.50	
137	—	—	—	—	0.40	0.35	0.70	
286	—	—	0.60	0.15	0.45	0.15	0.90	30
192	0.20	>2.50	—	1.00	—	—	>2.50	
235	0.15	—	0.40	—	0.20	—	0.30	
85	—	—	—	0.75	—	—	0.40	

【 0 1 3 2 】

本発明ペプチドの混合物を用いて得られた反応性が示されている。このペプチドE L I S Aにより極めて強力な信号が形成されることから陽性および陰性結果が信頼性をもって弁別されることは明らかである。本発明による以下のペプチドまたはペプチド混合物を用いても同様の結果が得られた。

【 0 1 3 3 】

4 0 7 4 / 4 0 8 1 (各 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

4 0 7 4 / 4 0 8 2 (0.5 および 0.1 2 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

4 0 6 0 / 4 0 7 1 / 4 0 8 1 (各 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、約 1 5 A A より成るより小さなペプチドの混合物が十分適していることがわかった：

4 0 5 6 / 4 0 5 5 および 4 0 5 2 (各 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

【 0 1 3 4 】

本発明ペプチドのすべてについてテストした結果いずれの場合にも、検体反応性の地理的起源への依存性は認められなかった。

【 0 1 3 5 】

10

20

30

40

50

実施例 5

E L I S A 測定に至適化

様々に変えた E L I S A 測定の可変パラメータは主に、コーティングに用いたペプチド濃度、またはペプチド混合物の場合にあってはそれらの全濃度および相互比であり、接合体濃度は 1 : 3 0 0 0 および 1 : 2 6 希釈比で一定とした。さらにコーティング濃度は一定として接合体の予備的希釈率を変えた。いずれの可変変数も供血者の血清および血漿のテストによる特異性について、および陽性群における抗 - H C V 測定による感度について確認した。さらにまた限界感度を抗 - H C V - 陽性検体の連続希釈（抗 - H C V - 陰性血清中で 1 : 2、1 : 4 など）による分析感度の形で測定しそして文献記載ペプチドを用いて得られた結果に対すると全く同様にして市販テストのデータと比較した。ヒトの検体について得られた結果を表 4、5 に例としてまとめる。

10

【 0 1 3 6 】

表 4、5

ペプチド E L I S A (4 0 8 3) および市販テストによる抗 - H C V 陽性血清および血漿の力価測定比較。比は特定信号を限界値で割った商として報告されており、また 1 よりも大きな値は陽性結果を示し、そして 1 より小さな値は陰性結果を示す。

【 0 1 3 7 】

【表 4】

表 4

陰性血清中の 血清希釈比		ペプチド ELISA (4083) 2 μ g/ml 4083 限界値 0.10 E	市販テスト (HP1) 限界値 0.454 E	
HC 90-84	1 : 1	> 25	> 6	10
	1 : 2	> 25	> 6	
	1 : 4	> 25	> 6	
	1 : 8	> 25	> 6	
	1 : 16	24	> 6	
	1 : 32	10.7	4.1	
	1 : 64	6.1	2.0	
	1 : 128	2.5	<u>0.8</u> neg.	
	1 : 256	1.5	<u>0.5</u>	
	1 : 512	1.1	0.5	
	1 : 1024	<u>0.6</u> neg.	0.2	
HC 90-90	1 : 1	> 25	> 6	20
	1 : 2	> 25	> 6	
	1 : 4	> 25	> 6	
	1 : 8	> 25	> 6	
	1 : 16	> 25	> 6	
	1 : 32	11.8	5.4	
	1 : 64	5.9	3.7	
	1 : 128	3.3	1.4	
	1 : 256	1.8	<u>0.9</u> neg.	
	1 : 512	1.08	<u>0.4</u>	
	1 : 1024	<u>0.5</u> neg.	0.3	
HC 90-252	1 : 1	> 25	> 6	30
	1 : 2	> 25	> 6	
	1 : 4	> 25	4.5	
	1 : 8	20	3.2	
	1 : 16	12.2	2.7	
	1 : 32	6.5	1.2	
	1 : 64	4.2	<u>0.8</u> neg.	
	1 : 128	2.4	<u>0.5</u>	
	1 : 256	<u>0.97</u> marg. ¹⁾		

1) marg. =境界 (マージナル)

【 0 1 3 8 】

【 表 5 】

表5

陰性血清中の 血清希釈比		ペプチド ELISA (4083) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 4083 限界値 0.10 E	市販テスト (HP1) 限界値 0.454 E
HC 90-296	1 : 1	> 25	> 6
	1 : 2	> 25	> 6
	1 : 4	20	> 6
	1 : 8	8.5	5.0
	1 : 16	3.7	2.9
	1 : 32	2.9	0.7 <u>neg.</u>
	1 : 64	1.4	0.5
	1 : 128	0.8 <u>neg.</u>	0.4
	1 : 256	0.3	0.2
HC 90-83	1 : 1	> 25	> 6
	1 : 10	20	2.1
	1 : 100	6.5	0.4 <u>neg.</u>
HC 90-240	1 : 1	> 25	> 6
	1 : 10	8	1.5
	1 : 100	1.4	0.3 <u>neg.</u>
HC 90-239	1 : 1	> 25	> 6
	1 : 10	7.8	2.0
	1 : 100	1.4	0.1 <u>neg.</u>
HC 90-89	1 : 1	> 25	> 6
	1 : 10	> 25	> 6
	1 : 100	9	3.5
HC 90-137	1 : 1	> 25	> 6
	1 : 10	21	4.2
	1 : 100	4	1.4

【0139】

表4、5の結果から、血清力価測定限界感度によって測定される本発明ペプチドに基づくELISAの感度が比較のために同じ血清希釈比を用いてテストされた市販テストと少なくとも同程度に良いことは明らかである。実際、多くの場合において、市販テスト(HP1)においてすでに何回も陰性反応を与えていた希釈検体はこのペプチドELISAによればなおも有意に陽性であると測定された。従って全体としては、本発明ペプチドを用いることによりHCV抗体の検出限界が向上するという結果が得られた。同じく新規ペプチドのその他のペプチド濃度、ペプチド配列または混合物を用いても同様の結果が得られた；例えば

4083 (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

4074 / 4081 (各0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

4074 / 4082 (各0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

4074 / 4082 (0.5および0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

4060 / 4082 (各2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

【0140】

10

20

30

40

50

限界感度の測定のほか、至適系の場合には、非 - H C V - 特異的抗体およびその他の潜在的干渉要因によって特異性についても検討した。その結果、本発明ペプチドを用いた抗 - H C V 測定は H C V に対して特異的であり、かついずれの既知の干渉、例えば他の抗体との交叉反応、熱失活による干渉などを受けないことが明らかとなった。さらにこのことは相対応して、感度を上げるべく均一に高血清濃度（検体緩衝液中 1 : 2 希釈比）を用いた記載の他の新規ペプチドまたはペプチド混合物についてもあてはまるが、それが可能であったのはペプチドの純度および固相上の高い抗原密度によるものである。

【 0 1 4 1 】

本発明のもう一つのコアペプチドである S P 1 0 と H P 1 の比較を表 6、7 にまとめるが、これからも本発明ペプチドが従来技術に比べ、この場合は限界感度の向上すなわち分析感度の増大、を含む利点を有していることは明らかである。表 6、7 中の四つの力価測定は公表されているペプチドよりも 2 ~ 4 倍も高い感度で測定され、また市販テスト（H P 1）と比較した場合の倍率は 8 ~ 3 2 にものぼった。

10

【 0 1 4 2 】

表 6、7

コアペプチド（S P 1 0 , 2 μ g / ml）に基づく E L I S A の分析感度の従来技術との比較。このために、陰性ヒト血清中の抗 - H C V - 陽性ヒト血清の連続希釈液を調製し、そして本発明ペプチド（S P 1 0）に基づく E L I S A によるテスト結果を市販 H C V E L I S A（H P 1）および文献（OKAMOTO et al）の図 2 により免疫関連ありと記載されているペプチドと比較した。すべてのデータは吸光度（E_{450nm}）を表わし、反応性ありとされる結果には下線を施してある。

20

【 0 1 4 3 】

【表 6】

表 6

血清No.	希釈比	本発明によるペプチド SP40		文献(OKAMOTO)に開示された ペプチド AA 39-74		市販の抗-HCV ELISA (HP1)
		AA 1-30 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
HC 90-85	1:1	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500
1: 32		> 2.500	> 2.500	1.008	0.878	0.908
1: 64		1.586	0.742	0.548	0.477	0.342
1: 128		1.032	0.783	0.250	0.183	0.153
1: 256		0.601	0.519	0.101	0.098	—
1: 512		0.328	0.232	0.060	0.051	—
1: 1024		0.188	0.122			
1: 2048		0.080	0.034			
HC 90-225	1:1	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500
1: 16		> 2.500	> 2.500	> 2.500	2.366	> 2.500
1: 32		> 2.500	2.065	2.020	1.619	> 2.500
1: 64		1.669	1.520	0.655	0.883	1.759
1: 128		0.971	0.790	0.414	0.544	0.909
1: 256		0.561	0.374	0.281	0.215	0.380
1: 512		0.486	0.191	0.146	0.157	0.122
1: 1024		0.295	0.141	0.080	0.115	—

【 0 1 4 4 】
【 表 7 】

10

20

30

40

表 7

血清No.	希釈比	本発明によるペプチド SP40		文献(OKAMOTO)に開示された ペプチド AA 39-74		市販の抗-HCV ELISA (HP1)
		AA 1-30 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
HC 90-270	1 : 1	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500
1 : 8		> 2.500	> 2.500	> 2.500	2.222	1.902
1 : 16		> 2.500	2.500	1.478	1.016	0.980
1 : 32		1.512	1.408	0.743	0.478	0.501
1 : 64		0.898	0.802	0.322	0.216	0.259
1 : 128		0.536	0.483	0.121	0.096	0.179
1 : 256		0.312	0.275	0.050	0.041	
HC 90-354	1 : 1	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500
1 : 32		> 2.500	> 2.500	1.917	0.786	0.496
1 : 64		> 2.500	1.833	1.282	0.527	0.352
1 : 128		1.703	0.873	0.685	0.249	0.200
1 : 256		0.918	0.410	0.367	0.082	
1 : 512		0.582	0.310	0.145		
1 : 1024		0.326	0.178	0.072		
1 : 2048		0.159	0.084			

【 0 1 4 5 】

本発明によるもう一つのコアペプチド (S P 2 3) の評価も同様の結果を与えた。表 8 に示された比較結果から、感度に関し S P 2 3 が S P 1 0 と等価であること、および両方ペプチドが文献記載のペプチドよりも優れていることは明らかである。

【 0 1 4 6 】

文献類似のペプチド S P 1 2 (A A 4 7 - 7 5) は OKAMOTO et al. により記載されたペプチドとは厳密には対応しないが、中間配列 (S P 1 1、A 2 4 - 5 3、表 8) についての結果から、次の配列領域 (A A 3 9 - 4 7) には免疫関連エピートープは存在しな

10

20

30

40

50

いことは明らかであり、そしてSP 11の極めて弱い反応性（なおも検出可能ではある）はそこに含まれるカルボキシ末端領域（図3に示されたオーバーラップ領域AA 24 - 30）によるものとすることができる。

【0147】

表8

本発明による2種類のペプチドおよび公表された配列（AA 39 - 75, OKAMOTO et al .）と新規構造物の間に位置するアミノ酸配列（SP 11, AA 24 - 53, 図3も参照されたし）のELISAにおける免疫反応性の比較。すべてのデータは吸光度（ E_{450nm} ）を表わす。

【0148】

【表8】

表8

検 体	SP 23 AA 8-26 2 μ g/ml	SP 10 AA 1-30 2 μ g/ml	SP 11 AA 24-53 2 μ g/ml
陽性コントロール	>2.500	>2.500	0.405
陰性コントロール	0.0051	0.0049	0.030
希釈比			
HC-90-225			
1: 16	2.203	>2.500	0.428
1: 64	1.329	1.367	<u>0.164</u>
1: 256	0.454	0.386	0.024
1: 1024	<u>0.195</u>	<u>0.142</u>	
HC-90-354			
1: 16	>2.500	>2.500	<u>0.164</u>
1: 64	1.413	2.156	0.059
1: 256	0.418	0.496	
1: 1024	<u>0.124</u>	<u>0.162</u>	
抗-HCV-陽性検体 (市販テストHP1)			
HC 90-371	<u>2.200</u>	<u>2.086</u>	<u>0.224</u>
HC 90-336	> <u>2.500</u>	> <u>2.500</u>	<u>0.335</u>
HC 90-453	> <u>2.500</u>	> <u>2.500</u>	0.058
HC 90-570	<u>1.877</u>	<u>2.277</u>	0.088

【0149】

感度に関するこの驚くべき利点は未希釈検体のテストの際に特に明らかとなる。すなわち、表9に示された11抗-HCV-陽性検体のうち11すべての検体が本発明ペプチドと反応することがわかった。これに対し文献記載のペプチドの場合にはわずか6検体しか陽性とならず、また市販テスト（HP 1）で陽性反応示した例は全くなかった。両ペプチドと陽性反応する検体に関し、本発明ペプチドの方が同じテスト条件下において有意により強く反応することが顕著であるが、このことは、特に陽性/陰性弁別に対し相当な利点

を与える。

【 0 1 5 0 】

表 9

ペプチド E L I S A (S P 1 0 2 μ g / ml) の感度と従来技術との比較。このために、選ばれた 1 1 個の自然の (native) ヒト抗 - H C V - 陽性検体を本発明ペプチドに基づく E L I S A でテストし、市販テスト (H P 1) と、および文献 (OKAMOTO et al.) において図 3 により免疫関連ありとして記載されているペプチドと比較した。すべてのデータは吸光度 (E_{450nm}) を表わす。抗 - H C V - 陽性検体 H C 9 0 - 4 9 5 もコントロールとしてテストした。

【 0 1 5 1 】

【表 9】

表 9

血清No.	本発明ペプチド		文献(OKAMOTO)記載のペプチド		市販 HCV ELISA (HP1) カットオフ: 0.454 E
	SP10 2 μ g/ml カットオフ: 0.100 E	SP12 2 μ g/ml カットオフ: 0.100 E			
HC 90-224	1.952	2.005	0.114 Neg.		
HC 90-284	2.417	0.451	0.095 Neg.		
HC 90-289	> 2.500	1.220	0.278 Neg.		
HC 90-300	> 2.500	0.288 marg.	0.208 Neg.		
HC 90-323	> 2.500	> 2.500	0.313 Neg.		
HC 90-493	> 2.500	0.051 Neg.	0.088 Neg.		
HC 90-509	> 2.500	0.081 Neg.	0.083 Neg.		
HC 90-512	> 2.500	0.049 Neg.	0.110 Neg.		
HC 90-531	2.208	0.257 marg.	0.081 Neg.		
HC 90-536	2.500	0.234 marg.	0.069 Neg.		
HC 90-494	1.279	n. d.	0.114 Neg.		
HC 90-495	> 2.500	> 2.500	> 2.500 Pos.		

【 0 1 5 2 】

コアペプチドを用いた力価測定 (表 6、7) および予め選ばれた自然血清から導かれたこれらの結果 (表 9) は市販血清パネル (ロット番号 P H V 1 0 1 およびロット番号 P H V 2 0 1, Boston Biomedica, 米国) に対するテスト結果により確認された。

【 0 1 5 3 】

特に、いわゆる低力価抗 - H C V パネルの結果は表 1 0、1 1 にまとめ、そして混合力価抗 - H C V パネルの結果は表 1 2、1 3 にまとめる。本発明によるコアペプチドを用いて得られたデータ結果を従来技術としての市販テストを用いて得られたデータと比較する。

【 0 1 5 4 】

表 1 0、1 1

10

20

30

40

50

表10、11は15個の低力価で十分確認された抗-HCV-陽性検体より成るパネルPHV101の自然抗-HCV-陽性検体について、ペプチドELISA (SP10, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の感度を従来技術と比較したものである (材料および比較テスト結果は Boston Biomedica (米国) により上市されたもの)。すべてのELISAデータは比の値、すなわち検体吸光度のカットオフに対する比のである。 < 1.0の値は陰性とし、また > 1.0は陽性とする。

【0155】

【表10】

メンバー I.D. 番号	比較結果		本発明ペプチドによるELISA (SP10/2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) S/CO	
	HCV EIA S/CO	HCV ELISA S/CO	結果	
PHV101-01	3.717	0.964	18 +	
PHV101-02	0.167	0.268	0.25 -	
PHV101-03	1.880	1.323	0.90 -	
PHV101-04	1.757	3.076	> 25	
PHV101-05	3.404	2.169	4.0	
PHV101-06	1.640	1.642	> 25	
PHV101-07	2.281	1.624	> 25	
PHV101-08	3.009	1.588	> 25	
PHV101-09	1.855	1.119	> 25	
PHV101-10	3.649	3.098	> 25	
PHV101-11	0.662	1.820	> 25	
PHV101-12	3.018	2.205	> 25	
PHV101-13	2.805	2.770	> 25	
PHV101-14	1.912	0.846	> 25	
PHV101-15	3.686	3.240	> 25	

【0156】

【表11】

10

20

30

40

表 11

メンバー I. D. 番 号	確認データ					結果*	ALT**	抗-HBc*	HBsAg*	抗-HIV*	抗-HTLV*
	5-1-1	C-100-3	RIBA 2.0	C33C	C22-C						
PHV101-01	1	+/-	+/-	+/-	2	POS	L	N	N	N	N
PHV101-02	-	-	-	-	-	N	L	N	N	N	N
PHV101-03	+/-	+/-	+/-	+/-	-	N	L	N	N	N	N
PHV101-04	+/-	+/-	+/-	4	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV101-05	-	+/-	+/-	-	+/-	N	L	N	N	N	N
PHV101-06	+/-	-	-	1	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV101-07	-	+/-	+/-	1	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV101-08	+/-	-	-	1	4	POS	G	POS	N	N	N
PHV101-09	-	-	-	1	4	POS	L	N	N	N	N
PHV101-10	1	-	-	2	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV101-11	1	+/-	+/-	1	1	POS	L	N	N	N	N
PHV101-12	2	-	-	4	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV101-13	+/-	+/-	+/-	4	3	POS	L	POS	N	N	N
PHV101-14	+/-	-	-	1	3	POS	L	POS	N	N	N
PHV101-15	1	-	-	3	4	POS	L	POS	N	N	N

* POS=陽性、N=陰性、NA=不適用

** L =正常の上限の2倍より小さい、G=正常の上限の2倍より大きい。

ALT結果は滅菌濾過とバイアリング (vialing) の後に読んだもので、献血時の供血者のALT状態を反映していないかもしれない。

【 0 1 5 7 】

表 10、11 より、一つの例外 (P H V 0 1 - 0 3) はあるが、すべての抗 - H C V - 陽性検体が新規ペプチドに対し正しい陽性反応を与えることは明らかである。市販テストとの比較により、検体信号：カットオフ比により表わされる信号強度は比較のためにテストされるアッセイよりも本発明ペプチドを用いた場合の方が著しく強いことが顕著であるが、このことは新規ペプチド E L I S A の信頼性が著しく向上したことを示している。

【 0 1 5 8 】

これらのデータ (> 2.5 の比、これは > 2.5 の吸光度に相当する) によれば、従来技術の定義により検体は低力価にすぎず、驚くべきことに新規ペプチドとは強い反応性を示す

10

20

30

40

50

ことがわかる。

【 0 1 5 9 】

前記の一つの例外（検体 0 3）は本検体中にはコア特異的抗体が存在しないことを実証する確認テストにおける比較結果のデータによって説明される（C 2 2 c は遺伝子工学により大腸菌において調製されるコアタンパク質である）。このテストによれば、検体 0 3 は実際陰性として分類されるべきである。

【 0 1 6 0 】

表 1 2、1 3 にまとめられた第 2 パネルについてのテストからも同様の所見が得られた：全部で 2 2 抗 - H C V - 陽性検体のうちの 1 9 検体は、驚くべきことに、吸光度が 2 . 5 よりも大きく（> 2 5 の比に相当する）極めて強い陽性であることがわかる。パネルに含まれる 3 つの抗 - H C V - 陰性血清は正しく陰性（< 1 . 0 の比）として分類される。最後に、検体 N o . P H V 2 0 1 - 0 8、- 1 0 および - 2 0 も問題の範囲内で正しいことがわかる。何故ならば、これら検体は確認テストによりコア特異的抗体を全く（- 0 8 および - 1 0）またはほとんど（- 2 0）を示さないからである。

10

【 0 1 6 1 】

表 1 2、1 3 は、様々な抗 - H C V 力価を有する十分確認された抗 - H C V - 陽性検体より成るパネル P H V 2 0 1 の自然抗 - H C V - 陽性検体についてペプチド E L I S A（S P 1 0, 2 μ g / ml）の感度を従来技術と比較したものである。（材料および比較テスト結果は Boston Biomedica により上市されたものである）。すべての E L I S A データは検体吸光度をカットオフ値で割った商である比として与えられる。< 1 . 0 の値は陰性結果を表わし、そして > 1 . 0 の値は陽性結果を表わす。

20

【 0 1 6 2 】

【表 1 2】

【 0 1 6 3 】

【 表 1 3 】

表 1 2

メンバー I. D. 番号	比較結果		結果*	本発明ペプチドを用いたELISA (SPI0/2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) S/CO
	HCV EIA	HCV ELISA		
PHV201-01	3.689	1.475	POS	> 25
PHV201-02	3.668	5.660	POS	> 25
PHV201-03	3.793	3.946	POS	> 25
PHV201-04	0.271	0.176	N	0.10 -
PHV201-05	3.417	2.591	POS	> 25
PHV201-06	3.711	4.805	POS	> 25
PHV201-07	0.260	0.108	N	0.25 -
PHV201-08	1.515	1.244	POS	0.75 -
PHV201-09	2.530	1.274	POS	> 25
PHV201-10	2.174	2.745	POS	0.25 -
PHV201-11	2.883	2.169	POS	> 25
PHV201-12	3.641	4.769	POS	> 25
PHV201-13	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-14	2.669	4.300	POS	> 25
PHV201-15	4.115	5.660	POS	> 25
PHV201-16	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-17	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-18	3.538	3.943	POS	> 25
PHV201-19	0.498	1.528	N	0.25 -
PHV201-20	2.611	2.377	POS	> 25
PHV201-21	3.430	2.666	POS	> 25
PHV201-22	1.721	1.690	POS	> 25
PHV201-23	4.115	5.662	POS	> 25
PHV201-24	2.500	2.631	POS	> 25
PHV201-25	4.115	5.660	POS	> 25

10

20

30

表 1 3

確認データ										
メンバー I.D. 番号	RIBA 2.0									
	5-1-1	C-100-3	C33C	C22-C	結果*	ALT**	抗-HBc*	HBsAg*	抗-HIV*	抗-HTLV*
PHV201-01	+/-	-	2	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-02	1	2	4	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV201-03	-	1	-	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-04	-	-	-	-	N	L	N	N	N	N
PHV201-05	2	+/-	+/-	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-06	2	1	4	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-07	-	-	-	-	N	L	N	N	N	N
PHV201-08	-	+/-	3	-	I	G	POS	N	N	N
PHV201-09	1	-	4	4	POS	G	POS	N	N	N
PHV201-10	+/-	+/-	2	-	I	L	N	N	N	N
PHV201-11	2	+/-	3	3	POS	L	N	N	N	N
PHV201-12	2	2	2	3	POS	L	N	N	N	N
PHV201-13	4	4	4	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-14	2	+/-	4	4	POS	L	POS	N	N	POS
PHV201-15	2	+/-	4	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-16	4	4	4	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-17	4	4	4	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV201-18	+/-	2	4	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV201-19	-	+/-	-	3	N	L	N	N	N	N
PHV201-20	1	1	1	+/-	POS	L	N	N	N	N
PHV201-21	1	+/-	3	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV201-22	+/-	-	4	4	POS	L	N	N	N	N
PHV201-23	4	3	4	4	POS	L	POS	N	N	N
PHV201-24	2	4	4	4	POS	G	POS	POS	N	POS
PHV201-25	4	1	4	4	POS	L	N	N	N	N

* POS=陽性、N=陰性、I=不確定、NA=不適用

** L=正常の上限の2倍より小さい、G=正常の上限の2倍より大きい。ALT結果は滅菌濾過とバイアリングの後に読んだもので、献血時の供血者のALT状態を反映していないかもしれない。

【 0 1 6 4 】

実施例 6

本発明ペプチドを用いた E L I S A によるチンパンジー血清中の抗 - H C V の測定
 マイクロタイタープレートのウェルに吸着させた様々なペプチドおよびペプチド混合物を
 様々な感染量の N A N B V に感染したチンパンジーからの血清を用いて試験した。接種後
 2 週間ごとに採取した一連の検体を市販テストを用いて G O T だけでなく G P T について
 も測定し、またすべての検体を並行的にかつ本発明ペプチドを用いた E L I S A により測
 定した。実施例 3 の市販テスト (H P 1) と同様に、ペプチド E L I S A には P O D で

10

20

30

40

50

標識されたポリクローナルウサギ抗体を4倍濃縮して検出に用い、また酵素基質TMBを用いて450nmで光度測定を行った。テスト手順は前述のヒト抗-HCV測定に対応するものとし、0.1Eを固定限界としまた表14、15、16の結果は特定の吸光度のこのカットオフ値に対する割合(比)として示したものである。

【0165】

表14、15、16

市販テスト(HP1)およびNSP4領域からの本発明ペプチドまたはペプチド混合物を用いたELISAによるチンパンジー検体の抗-HCV測定。最初の3回値のデータは限界の設定に用いる吸光度であり、以後はそれをもとに特定信号と限界の比を求めた。

【0166】

【表14】

表 1 4

動物 No. 123*

経過時間 (単位: 週)	ALT	市販テスト (HP1)	4083 2 μ g/ml	4083 0.5 μ g/ml	4060 4081 各 2 μ g/ml
0=接種	25	0.500 E ₄₉₂	0.032 E ₄₅₀	0.041 E ₄₅₀	0.026 E ₄₅₀
2	23	0.600 E	0.027 E	0.024 E	0.014 E
4	23	0.450 E	0.013 E	0.025 E	0.019 E
吸光度 (E)					
限界値の規定:		0.7 E	0.10 E	0.10 E	0.10 E
比 (r) :					
6	29	r 0.6	r 0.01	r 0.03	r 0.03
8	30	r 0.4	r 0.02	r 0.03	r 0.03
10	50	r 0.7	r 0.01	r 0.02	r 0.02
12	55	r 0.4	r 0.02	r 0.03	r 0.03
14	50	r 0.5	r 0.01	r 0.03	r 0.03
16	140	r 0.6	r 0.03	r 0.03	r 0.03
18	>170	r 0.7	r 5.3 <u>pos.</u>	r 1.5 <u>pos.</u>	r 0.6
20	30	r 0.6	r 7.4 <u>pos.</u>	r 1.8 <u>pos.</u>	r 0.7
22	23	r 0.5	r 5.7 <u>pos.</u>	r 1.1 <u>pos.</u>	r 0.5
24	23	r 0.6	r 2.7 <u>pos.</u>	r 0.7	r 0.3
26	30	r 0.6	r 1.5 <u>pos.</u>	r 0.4	r 0.3

*) 肝生検標本の電頭検査によりNANB感染していることが確認された。

表 15

動物 No. 048

経過時間

(単位: 週)

ALT	市販デスト (HP1)	4083 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4083 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4060, 4081 各 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4073 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	4090 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
0=接種	20	0.5 E ₄₉₂	0.018 E ₄₅₀	0.027 E ₄₅₀	0.036 E ₄₅₀	0.028 E ₄₅₀
2	25	0.5 E	0.041 E	0.070 E	0.041 E	0.050 E
4	23	0.5 E	0.026 E	0.050 E	0.039 E	0.037 E

吸光度 (E)

限界値の規定:

比 (r) :

10	32	r 0.6	r 0.3	r 0.5	r 0.2	r 0.6	r 0.6
12	100	r 0.4	r 1.0 marg. ¹⁾	r 1.0 marg. ¹⁾	r 0.1	r 0.95 marg. ¹⁾	r 2.0 pos.
14	112	r 0.7	r 1.7 pos.	r 4.9 pos.	r 0.1	r 6.9 pos.	r 16.2 pos.
16	30	r 1.0	r 7.4 pos.	r 3.8 pos.	r 0.2	r 12.2 pos.	r 23.2 pos.
18	25	r 0.7	r 7.2 pos.	r 2.8 pos.	r 0.2	r 7.8 pos.	r 18.9 pos.
20	30	r 0.8	r 8.6 pos.	r 4.7 pos.	r 0.1	r 12.8 pos.	r 16.4 pos.
22	25	r 0.8	r 8.4 pos.	r 5.4 pos.	r 0.1	r 11.7 pos.	r 22.3 pos.
24	23	r 0.8	r 9.8 pos.	r 7.2 pos.	r 0.2	r 15.5 pos.	r 20.0 pos.
26	20	r 0.8	r 10.8 pos.	r 6.0 pos.	r 0.2	r 13.0 pos.	r 17.4 pos.
28	20	r 0.8	r 9.8 pos.	r 5.4 pos.	r 0.2	r 11.7 pos.	r 8.9 pos.
30	20	r 1.0 marg. ¹⁾	r 7.6 pos.	r 6.3 pos.	r 0.2	r 11.5 pos.	r 12.9 pos.
32	25	r 1.3 pos.	r 16.2 pos.	r 17.4 pos.	r 1.3 pos.	r 24.5 pos.	r 23.3 pos.
34	25	r 2.0 pos.	r 18.4 pos.	r 22.5 pos.	r 2.0 pos.	r >25 pos.	r >25 pos.
36	28	r 2.4 pos.	r 16.1 pos.	r 22.0 pos.	r 2.0 pos.	r >25 pos.	r >25 pos.
38	28	r 2.1 pos.	r 17.9 pos.	r >25 pos.	r 2.1 pos.	r >25 pos.	r >25 pos.
40	26	r 2.9 pos.	r >25 pos.	r >25 pos.	r 2.5 pos.	r >25 pos.	r >25 pos.

1) marg. =境界陽性

【 0 1 6 8 】

【 表 1 6 】

表 16

動物 No. 147	市販テスト	4083	4083	4060, 4081	4074, 4081
経過時間 (単位: 週)	ALT	2 μ g/ml	0.5 μ g/ml	各 2 μ g/ml	各 2 μ g/ml
0=接種	30	0.60 E ₄₉₂	0.068 E ₄₅₀	0.008 E ₄₅₀	0.027 E ₄₅₀
2	25	0.50 E	0.043 E	0.012 E	0.032 E
4	30	0.45 E	0.066 E	0.015 E	0.023 E
吸光度 (E)					
限界値の規定:		0.10 E	0.10 E	0.10 E	0.10 E
比 (r) :					
16	52	r 0.5	r 0.2	r 0.1	r 0.3
18	75	r 0.5	r 1.1 pos.	r 0.1	r 0.2
20	110	r 0.8	r 6.5 pos.	r 0.2	r 0.3
22	40	r 0.6	r 11.8 pos.	r 0.2	r 0.5
24	75	r 0.6	r 7.6 pos.	r 0.1	r 1.0 marg. ¹⁾
26	70	r 0.4	r 12.5 pos.	r 0.1	r 2.2 pos.
28	55	r 0.5	r 10.9 pos.	r 0.2	r 2.1 pos.
30	52	r 0.6	r 8.9 pos.	r 0.4	r 3.5 pos.
32	42	r 0.7	r 11.3 pos.	r 0.9	r 3.4 pos.
34	48	r 0.8	r 13.3 pos.	r 1.6 pos.	r 7.6 pos.
36	48	r 0.8	r 19.9 pos.	r 2.8 pos.	r 9.5 pos.
38	35	r 1.3 pos.	r 20.8 pos.	r 2.5 pos.	r 11.0 pos.
40	45	r 1.3 pos.	r > 25 pos.	r 3.4 pos.	r 15.0 pos.

1) marg. = 境界陽性

【 0 1 6 9 】

表 14、15、16 に示された結果は、特に ALT 経過 (course) および市販テスト (HP 1) からの相当する結果との比較において、本発明ペプチドの利点を際立たせている。

【 0 1 7 0 】

すなわち、例えば、動物 No. 123 は肝生検標本の電顕検査では N A N B H が検出され

10

20

30

40

50

たのに市販テスト（H P 1）では全く抗体 - 陽性とされていない。これに対し、4083に基づくE L I S Aを用いれば信頼性あるH C V抗体検出がA L T増加とほぼ同時に可能である。

【0171】

特に、動物N o . 048においては前述のすべてのペプチドまたはペプチド混合物を用いることにより陽性 / 陰性が鋭敏に弁別されるという意味において、極めて信頼性ある抗 - H C V検出がA L T増大とほぼ同時にまた市販テスト（H P 1）の平均18週間前に行われることから、ペプチドE L I S A結果がA L Tレベル増大と時間的に一致することは明らかである。ペプチド間を比較すると、4060と4081（アミノ - およびカルボキシル - 末端配列）および中央構造を構成する4090の比較から明らかなように、中央アミノ酸配列が式Iの完全ペプチド（4083）による初期H C V抗体認識に相当寄与していることが特に明白である。

10

【0172】

A L Tとほぼ同時の同様のH C V抗体の初期確認結果は動物N o . 147の実験によっても得られ、その場合にはA L T増大とほぼ同時に、この場合にも市販テスト（H P 1）を用いた場合よりも約16 ~ 18週間早く信頼性ある抗体検出が可能である。

【0173】

表17および表18

H C V感染した2匹のチンパンジーからの血清検体中の抗 - H C V測定。市販テスト（H P 1）による結果を合成的に製造された本発明によるコアペプチド（S P 10, 2 μ g / ml）と対比して示す。それら結果は特定信号と限界の比として示す。

20

【0174】

【表17】

表 1 7

動物 No. 048

経過時間 (単位 : 週)	ALT	市 販 HCV ELISA(HP1)	SP 10-ELISA 2 μ g/ml	
0=接種	20	0.5 E ₄₉₂	0.09 E ₄₅₀	
	25	0.5 E	0.21 E	
	23	0.5 E	0.13 E	10
吸光度 (E) 限界値の規定 比 (r)		0.70 E	0.10 E	
8	34	r 0.4	0.50	
10	32	r 0.6	r >20.0 <u>pos.</u>	
12	100	r 0.4	r >20.0 <u>pos.</u>	
14	112	r 0.7	r >20.0 <u>pos.</u>	20
16	30	r 1.0	r >20.0 <u>pos.</u>	
18	25	r 0.7	r >20.0 <u>pos.</u>	
20	30	r 0.8	r >20.0 <u>pos.</u>	
22	25	r 0.8	r 19.0 <u>pos.</u>	
24	23	r 0.8	r 20.0 <u>pos.</u>	
26	20	r 0.8	r 18.5 <u>pos.</u>	
28	20	r 0.8	r 10.4 <u>pos.</u>	
30	20	r 1.0 <u>marg.</u> ¹⁾	r 14.2 <u>pos.</u>	30
32	25	r 1.3 <u>pos.</u>	r 17.6 <u>pos.</u>	
34	25	r 2.0 <u>pos.</u>	r 15.4 <u>pos.</u>	
36	28	r 2.4 <u>pos.</u>	r >20.0 <u>pos.</u>	
38	28	r 2.1 <u>pos.</u>	r >20.0 <u>pos.</u>	
40	26	r 2.9 <u>pos.</u>	r >20.0 <u>pos.</u>	

1) marg. =境界陽性

表 18

動物 No. 147

経過時間 (単位: 週)	ALT	市 販 HCV ELISA(HP1)	SP 10-ELISA 2 μ g/ml	
0=接種	30	0.60 E ₄₉₂	0.011 E ₄₅₀	
	25	0.50 E	0.032	
	30	0.45 E	0.029	10
吸光度 (E) 限界値の規定 比 (r)		0.70 E	0.10 E	
16	52	r 0.5	r 0.2	
18	75	r 0.5	r 0.1	
20	110	r 0.8	r 0.2	
22	40	r 0.6	r 0.4	
24	75	r 0.6	r 0.3	20
26	70	r 0.4	r 0.2	
28	55	r 0.5	r 0.3	
30	52	r 0.6	r 0.2	
32	42	r 0.7	r 0.4	
34	48	r 0.8	r >20.0 <u>pos.</u>	
36	48	r 0.8	テストせず	
38	35	r <u>1.3</u> <u>pos.</u>	テストせず	
40	45	r <u>1.3</u> <u>pos.</u>	r >20.0 <u>pos.</u>	30

1) marg. =境界陽性

【0176】

新規コアペプチドについて表 17 および 18 に示された結果は、特に ALT 経過および市販 ELISA (HP 1) の対応結果と比較することにより、本発明ペプチドの利点を強調している。

【0177】

特に、動物 No. 048 においては陽性/陰性が鋭敏に弁別されるという意味において極めて信頼性ある抗-HCV 検出が ALT 増大とほぼ同時にまた市販テスト (HP 1) の平均 20 週間前に行われることから、コアペプチド ELISA 結果が ALT 増大と時間的に一致することは明らかである。

【0178】

ALT とほぼ同時の同様の HCV 抗体初期確認結果は動物 No. 147 の試験によっても得られ、その場合、市販テスト (HP 1) よりも約 4 週間早く信頼性ある HCV 抗体検出が可能である。

【0179】

全体として、本発明によるペプチドおよび免疫化学的検出方法へのそれらの使用は、遺伝子工学により製造されたタンパク質および従来技術の他の合成ペプチドに基づくこれまでに記載されたすべての方法よりも相当に高感度であることがわかる。感染後期における感

40

50

度向上の故に、新規ペプチドは付加的に、初期 H C V 抗体を信頼性をもって測定することができる、従って現存している診断ギャップが著しく低下するという相当な利点を提供する。さらにまた、本発明によるペプチドは非特異的結合に対して感度が相当に低い、これは動物の検体および人間起源の検体のいずれについても、市販テスト (H P 1) に比べバックグラウンドが激減する (市販テスト (H P 1) の場合最大 $0.4 E_{492}$ であるのに対し最大 $0.10 E_{450}$) ことによって少なからず表わされ、従って相当鋭敏な陰性 / 陽性弁別が可能となる。最後に、記述すべき有利な点は、全体的測定時間が短縮されることおよび検体量が $50 \mu l$ で比較的正確にペピットととることができるので、正確度が増すことである。

【 0 1 8 0 】

10

実施例 7

N S P 4 ペプチド 4 0 8 3 およびコアペプチド S P 1 0 の混合物を調製するためのペプチド溶液の調製、およびこのペプチド混合物によるマイクロタイタープレートのコーティング

各々 6 mg/ml のペプチドを含む蒸留水中の 50% 酢酸中のペプチド S P 1 0 および 4 0 8 3 の貯蔵溶液から 0.10 M 重炭酸ナトリウム ($\text{pH } 9.6$) 中の連続 2 倍希釈液を調製した。すなわち、ペプチド濃度が 50 、 25 、 12.5 、 6.25 、 3.12 、 1.56 、 0.78 、 0.39 、 0.2 、 0.1 、 0.05 および $0.01 \mu \text{g/ml}$ である一連の希釈液を得た。個別ペプチドの混合物についても手順は同様とし、 0.1 M 重炭酸ナトリウムに希釈することにより、前述の通りの全体的最終濃度であるがいくつかのペプチドの混合物の場合にあってはそれを等濃度で ($1:1$ 混合物の場合) または相互に対し様々な割合で含むものを得るために、前記貯蔵液を付加的に例えば $10:1$ または $1:4$ というように様々な割合で混合した。

20

【 0 1 8 1 】

それぞれについて、 $100 \mu l$ の希釈液をマイクロタイタープレート、タイプ B (Nunc, Roskilde, デンマークにより供給されたもの) の 16 ウエルに入れた。希釈液を入れたテストプレートを 20°C で 18 時間放置し、次いでウエル内の溶液を吸引により除去し、そしてそれらウエルをリン酸緩衝生理学的食塩水 (P B S, $\text{pH } 7.4$) 中の 10 g/l リットル牛血清アルブミンの溶液 $300 \mu l$ を用いて充填および吸引除去により $3 \sim 4$ 回洗浄し、そしてそれらテストプレートを次いでシリカゲル上、 20°C で乾燥した。

30

【 0 1 8 2 】

$1 \mu \text{g/ml}$ の 4 0 8 3 および $1 \mu \text{g/ml}$ の S P 1 0 濃度がペプチド混合物のコーティングに適していることがわかったが、これは表 1 9 ~ 2 1 にまとめられそして実施例 4 および 5 に記載の如く行って得られた結果の基礎をなすものである。従来技術とのこれまでの比較とは対照的に、これからの比較はすべて実施例 3 に記載の如き市販の第 2 世代の抗 - H C V E L I S A (H P 2) に関連したものとなる。

【 0 1 8 3 】

表 1 9 および 2 0 :

本発明による E L I S A および市販の H P 2 に基づくデータは、いわゆる終点力価 (end point titer) であり、これをもって抗 - H C V - 陰性血清中の血清の最高予備希釈率 (40

40

所与のテストにおいて再現性よく陽性であることが認められたもの) が規定される。

【 0 1 8 4 】

【 表 1 9 】

表 19

BBI 低力価抗-HCVパネル PHV 101

メンバー I. D. 番 号	本発明によるELISA SP 4083/SP 10 各 1 μ g/ml	市販抗-HCVテスト (HP2)	
PHV101-01	1 : 16	1 : 2	
PHV101-02	陰 性	陰 性	10
PHV101-03	1 : 4	1 : 1	
PHV101-04	1 : 512	1 : 64	
PHV101-05	1 : 2	1 : 1	
PHV101-06	1 : 128	1 : 32	
PHV101-07	1 : 128	1 : 128	
PHV101-08	1 : 64	1 : 16	20
PHV101-09	1 : 64	1 : 16	
PHV101-10	1 : 256	1 : 128	
PHV101-11	1 : 32	1 : 16	
PHV101-12	1 : 512	1 : 128	
PHV101-13	1 : 16	1 : 64	
PHV101-14	1 : 64	1 : 32	
PHV101-15	1 : 128	1 : 64	30

【 0 1 8 5 】

【 表 2 0 】

表 2 0

BBI 混合力価抗-HCVパネル PHV 201

メンバー I. D. 番 号	本発明によるELISA SP 4083/SP 10 各 1 μ g/ml	市販抗-HCVテスト (HP2)	
PHV201-01	1 : 1000	1 : 128	
PHV201-02	1 : 1000	1 : 500	10
PHV201-03	1 : 128	1 : 32	
PHV201-04	陰 性	陰 性	
PHV201-05	1 : 64	1 : 64	
PHV201-06	1 : 64	1 : 256	
PHV201-07	陰 性	陰 性	
PHV201-08	1 : 4	1 : 16	
PHV201-09	1 : 1000	1 : 512	
PHV201-10	1 : 4	1 : 16	20
PHV201-11	1 : 512	1 : 128	
PHV201-12	1 : 32	1 : 16	
PHV201-13	1 : 256	1 : 256	
PHV201-14	1 : 64	1 : 64	
PHV201-15	1 : 512	1 : 1000	
PHV201-16	1 : 512	1 : 512	
PHV201-17	1 : 128	1 : 256	30
PHV201-18	1 : 16	1 : 128	
PHV201-19	陰 性	陰 性	
PHV201-20	1 : 4	1 : 4	
PHV201-21	1 : 500	1 : 256	
PHV201-22	1 : 16	1 : 256	
PHV201-23	1 : 256	1 : 512	
PHV201-24	1 : 256	1 : 512	40
PHV201-25	1 : 1000	1 : 512	

【 0 1 8 6 】

表 2 1

血清および血漿を同時に得た 9 3 0 名の健常供血者に対するテスト結果

【 表 2 1 】

表 2 1

	初回テスト後の特異性 (単位：%)	反復後の特異性 (単位：%)
n=930 血清	99.5	99.7
n=930 血漿	99.6	99.7

【 0 1 8 7 】

10

実施例 8

式XVIII、XIX、XXおよびXXIIで示されるペプチドを用いて式XIVによる混合物を調製するためのペプチド溶液の調製、およびこれらペプチド混合物によるマイクロタイタープレートのコーティング

ポリペプチドSPH 9 (式XVIII)、SPH 20 (式XIX)、4083 (式XX) およびSP 10 (式XXII) を50%酢酸(v/v)に6mg/ml濃度となるように溶解した。

【 0 1 8 8 】

これら4種類の貯蔵溶液を実施例4に記載の如く様々な容量基準比で混合しそしてポリペプチド総濃度が0.2~8μg/mlとなるように0.10M重炭酸ナトリウム(pH9.6)に希釈した。

20

【 0 1 8 9 】

それぞれについて、100μlの各希釈溶液をマイクロタイター、タイプB(Nunc, Roskilde, デンマークにより供給されたもの)の16ウエルに入れた。充填されたテストプレートを20℃で18時間インキュベートした。次にそれら溶液を吸引により除去し、そしてそれらウエルをリン酸緩衝生理学的食塩水(PBS, pH7.4)中の10g/リットル牛血清アルブミンの溶液300μlを用いて3~4回洗浄しそしてそれらテストプレートを次いでシリカゲル上、20℃で乾燥した。

【 0 1 9 0 】

実施例 9

コーティング混合物のためのHIV 1、HIV 2およびHVCペプチド濃度の至適化、およびELISA測定および評価基準の至適化

30

実施例8に記載の4種類の貯蔵溶液について1:1:1:1比(v/v)から開始してコーティング溶液中のHIV 1、HIV 2およびHVCの各ペプチド最終濃度(単位: μg/ml)となるように、各場合の他の3ペプチドを一定に保ちつつ4種類すべての可変含量を相互に独立的に変化させた。すなわち

ペプチド	ペプチド	ペプチド	ペプチド
XVIII	XIX	XX	XXII
2	2	2	2
1	2	2	2
0.5	2	2	2
0.2	2	2	2
0.1	2	2	2
0.05	2	2	2

10

ペプチド	ペプチド	ペプチド	ペプチド
XVIII	XIX	XX	XXII
2	1	2	2
2	0.5	2	2
2	0.2	2	2
2	0.1	2	2
2	0.05	2	2
2	2	1	2

20

・・・

などから

0.05 0.05 0.05 0.05

まで。

【0191】

30

これら混合物を実施例8に記載の如くマイクロタイタープレートに固定しそして実施例4および5に記載の如くELISAで評価し、同じくペルオキシダーゼ標識抗体濃度もヒト免疫グロブリンGに対して至適化した。

【0192】

対応する陽性ヒト血清の陰性ヒト血清中の連続希釈液により調製された低力価抗-HIV1、抗-HIV2および抗-HCV検体より成る検体を用いて至適化の評価を行った。さらに同じく、バックグランド反応(すなわち所与の被覆されたマイクロタイタープレートへの非特異的結合)を規定できるようにいくつかの抗-HIVおよび抗-HCV-陰性検体についてもテストした。

【0193】

40

選択基準として設定したのは、力価測定の為の一連のヒト抗-HIV-および抗-HCV-陽性検体の測定における最大の特異性を有する信号、すなわち高い限界感度、と同時に、抗-HIV-および抗-HCV-陰性検体に対するテストにおける低いバックグランドである。

【0194】

通常好ましいコーティング混合物をこれら基準に基づいて見出し、それより次の混合物を選んだ：

XXI	SPH	9	0.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	SPH	20	0.250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	SP	4083	0.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
	SP	10	0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$

【0195】

1 : 3000 という実施例 2 の接合体濃度（および 1 : 26 という均一な付加的最終希釈率）が好ましいことがわかり、そしてテストは実施例 4 におけると同様に行った。これまでの限界設定とは対照的に、これらの条件下では、陰性コントロール平均値と 0.250 O.D. の和よりも大きい 450 nm における吸光度を有する検体を抗 - HIV - および / または抗 - HCV - 陽性として分類した（新しい限界設定）。

10

【0196】

これらの設定を以下の実施例 10 ~ 15 に対し均一かつ不変に適用した。

【0197】

実施例 10

ELISA による HIV 1、HIV 2 および HCV に対する免疫グロブリン G クラスのヒト抗体の測定

【0198】

式 XIV のペプチド混合物を用いて実施例 9 の至適化条件下で表 22 ~ 24 に示された検体を実施例 4 に記載の如くテストした。抗 - HIV 1 または 2 については、本発明方法の反応性を抗 - HIV 1 / 2 組合せテスト（Enzygnost^R 抗 - HIV 1 / 2。Behringwerke AG 社により供給されたもの。HP 3）。Du Pont 社により供給された市販のウエスタンブロット（抗 - HIV 1 および抗 - HIV 2）をコントロールに用いた。2 種類の異なる ELISA 方法（HP 1 および HP 2）を用いて HCV を検出した。

20

【0199】

表 22 ~ 24 のデータから明らかなように、本発明方法を用いれば、ヒト起源の検体中の抗 - HIV 1 および抗 - HIV 2 および抗 - HCV が安全にかつ信頼性をもって検出される。

【0200】

30

表 22

抗 - HIV 1 / 2 組合せテスト（Enzygnost^R 抗 - HIV 1 / 2 , HP 3）と比較された本発明方法による抗 - HIV 1 の測定

強反応性とは光度測定評価において吸光度が > 2.5 であることを意味する；すべての抗 - HIV 1 - 陽性検体は HCV - 陰性である。

【0201】

【表 22】

表 2 2

検体数	検体の出所	本発明方法	市販の抗-HIV 1/2 組合せテスト
n=12 (抗-HIV 1 陽性)	欧 州	n=12 強反応性	n=12 強反応性
n=57 (抗-HIV 1 陽性)	西アフリカ	n=57 強反応性	n=57 強反応性
n=7 (HIV 1/HIV 2 同時感染)	西アフリカ	n=7 強反応性	n=7 強反応性
n=76		n=76 陽性	n=76 陽性

10

20

【 0 2 0 2 】

表 2 3

抗 - H I V 1 / 2 組合せテスト (Enzygnost^R 抗 - H I V 1 / 2 , H P 3) と比較され
た本発明方法による抗 - H I V 2 の測定

強反応性とは光度測定評価において吸光度が > 2.5 であることを意味する ; すべての 2
8 抗 - H I V 2 - 陽性検体は H C V 陰性である。

【 0 2 0 3 】

【 表 2 3 】

表 2 3

検体数	検体の出所	本発明方法	市販の抗-HIV 1/2 組合せテスト
n=21 (抗-HIV 2 陽性)	西アフリカ	n=21 強反応性	n=21 強反応性
n=7 (HIV 1/HIV 2 同時感染)	西アフリカ	n=7 強反応性	n=7 強反応性
n=28		n=28 陽性	n=28 陽性

30

40

【 0 2 0 4 】

表 2 4

本発明による E L I S A 法による抗 - H C V の検出

吸光度が > 2.500 に達した検体を強反応性とした。穏やかな強さの反応性を示す検体
についてはいわゆる比を記すが、これは所与の E L I S A のカットオフ値で検体吸光度を
割った商を意味する。1.0 より低い値は合意により (by agreement) 陰性とする。1.0

50

より高い値は陽性とされ、また得られる比が大きいほど反応性は強くなる；すべての抗 - H C V - 陽性検体は H I V - 陰性である。

【 0 2 0 5 】

【表 2 4】

表 2 4

検体数	検体の出所	本発明方法	市販の抗-HCV ELISA		
			HP 1	HP 2	
n = 61	欧 州	n = 57	n = 57	n = 57	10
抗HCV陽性		強反応性	強反応性	強反応性	
	欧 州	n = 4			
HC 90-346		>9.0 ++	2.7(+)	>5.0 ++	
-351		6.4 +	陰 性	3.9 +	
-516		6.8 +	陰 性	5.0 +	
-570		6.9 +	1.9(+)	>5.0 +	
n = 53	米 国	n = 51	n = 51	n = 51	20
抗HCV陽性		強反応性	強反応性	強反応性	
	米 国	n = 2			
HC 90-511		4.2 +	1.2(+)	3.99 +	
-566		4.6 +	陰 性	>5.00 +	
n = 114		n = 114	n = 111	n = 114	
		陽性	陽性	陽性	

【 0 2 0 6 】

実施例 1 1

従来技術と比較された抗 - H I V および抗 - H C V に対する本発明による E L I S A の分析感度の測定 30

本発明による E L I S A の分析感度の評価モデルとして、陽性検体の力価測定を用意しそして実施例 9 に記載の E L I S A でテストした。全体として、抗 - H I V - および抗 - H C V - 陰性血清中で抗 - H I V 1 および抗 - H I V 2 - 陽性ヒト血清の各々について 3 つの希釈液を調製し、そして限界感度は、新しい限界値（陰性コントロール平均値と 0 . 2 5 0 閾値の和）を用いて、特定のテスト系における依然として反応性を示す最後の予備希釈液として規定した。

【 0 2 0 7 】

これら限界感度テストの結果を表 2 5（抗 - H I V 1）、表 2 6（抗 - H I V 2）および表 2 7（抗 - H C V）に吸光度としてまとめる。 40

【 0 2 0 8 】

表 2 5

抗 - H I V 1/2 組合せテスト（Enzygnost^R 抗 - H I V 1/2）と比較された抗 - H I V 1 に対する本発明による E L I S A の限界感度の測定

3 種類の抗 - H I V 1 - 陽性検体をヒト抗 - H I V 1 - および抗 - H C V - 陰性血清を用いて予備的な連続 2 倍希釈液を行い、そしてこれら希釈液を実施例 3 と同様にして、あるいは比較テストの製造元の包装体差し込みに従ってテストした。すべてのデータは吸光度（E₄₅₀）である。すべての抗 - H I V - 陽性検体は H P 2 において陰性反応を示した。

【 0 2 0 9 】

【表 2 5】

表 2 5				
		本発明によるELISA における吸光度 カットオフ=0.282	抗-HIV 1/2 組合せテス ト(HP3) における吸光度 カットオフ=0.268	
検 体	予備的 希釈液	O. D.	O. D.	
8803/26	未希釈	> 2.500 +	> 2.500 +	10
	1 : 128	> 2.500 +	> 2.500 +	
抗HIV 1-陽性	256	2.334 +	2.185 +	20
	512	1.408 +	1.412 +	
	1024	0.825 +	0.837 +	
	2048	<u>0.467</u> +	<u>0.457</u> +	
	4096	0.240 -	0.216 -	
	8000	0.137 -	0.135 -	
8611/144	未希釈	> 2.500 +	> 2.500 +	30
	1 : 128	2.162 +	2.014 +	
抗HIV 1-陽性	256	1.366 +	1.028 +	
	512	0.806 +	0.648 +	
	1024	<u>0.496</u> +	<u>0.454</u> +	
	2048	0.280 -	0.258 -	
	4096	0.153 -	0.136 -	
	8000	0.088 -	0.076 -	
8803/24				
抗HIV 1-陽性	1 : 400	<u>1.632</u> +	<u>1.585</u> +	
22281				
抗HCV-陽性	1 : 256	<u>2.219</u> +	0.014 (陰性)	40

【 0 2 1 0 】

表 2 6

抗 - H I V 1/2組合せテスト (Enzygnost^R 抗 - H I V 1/2) で比較された抗 - H I V 2
に対する本発明による E L I S A の限界感度の測定

3種類の抗 - H I V 2 - 陽性検体をヒト抗 - H I V 1 - および抗 - H C V - 陰性血清を
用いて予備的な連続2倍希釈液を行い、そしてこれら希釈液を実施例3と同様にして、あ
るいは比較テストの製造元の包装体差し込みに従ってテストした。すべてのデータは吸光
度 (E₄₅₀) である。すべての抗 - H I V - 陽性検体は H P 2 において陰性反応を示した

。【 0 2 1 1 】
【 表 2 6 】

表 2 6

検 体	予備的 希釈液	本発明によるELISA における吸光度 カットオフ=0.282	抗-HIV 1/2 組合せテス ト(HP3) における吸光度 カットオフ=0.268	
		O. D.	O. D.	
8804/103	未希釈	> 2.500 +	> 2.500 +	10
	1 : 128	> 2.500 +	2.500 +	
抗HIV 2-陽性	256	2.420 +	2.045 +	20
	512	1.488 +	1.339 +	
	1024	0.737 +	0.705 +	
	2048	<u>0.365</u> +	<u>0.385</u> +	
	4000	0.196 -	0.190 -	
8804/117	未希釈	> 2.500 +	> 2.500 +	
	1 : 128	> 2.500 +	> 2.500 +	
抗HIV 2-陽性	256	1.860 +	1.902 +	30
	512	1.233 +	1.100 +	
	1024	0.656 +	0.667 +	
	2048	<u>0.320</u> +	<u>0.302</u> -	
	4000	0.166 -	0.172 -	
8804/116				
抗HIV 2-陽性	1 : 400	<u>1.045</u> +	<u>1.020</u> +	
22281				
抗HCV-陽性	1 : 256	<u>2.219</u> +	0.014	40
			(陰性)	

【 0 2 1 2 】
表 2 7
抗 - H C V に対する本発明による E L I S A の限界感度の測定
ヒト抗 - H I V - および抗 - H C V - 陰性血清を用いて 4 種類の確認された抗 - H C V -
陽性検体を予備的に連続 2 倍希釈し、そしてこれら希釈液を実施例 3 と同様にしてテスト
した。すべてのデータは吸光度 (E _{450nm}) である。
【 0 2 1 3 】
【 表 2 7 】

表 2 7

検 体	予備的 希釈液	本発明によるELISA における吸光度 カットオフ=0.270	市販の抗-HCV ELISA (HP2) カットオフ=0.481
HC 90-85	未希釈	> 2.500 +	> 2.500 +
	1 : 16	> 2.500 +	> 2.500 +
抗HCV-陽性	1 : 32	2.299 +	> 2.500 +
	1 : 64	1.858 +	> 2.500 +
	1 : 128	1.515 +	> 2.500 +
	1 : 256	1.045 +	1.707 +
	1 : 512	0.648 +	0.871 +
	1 : 1024	<u>0.322</u> +	<u>0.492</u> +
	1 : 2048	0.207 -	0.255 -
HC 90-225	未希釈	> 2.500 +	> 2.500 +
	1 : 16	> 2.500 +	> 2.500 +
抗HCV-陽性	1 : 32	2.214 +	> 2.500 +
	1 : 64	1.816 +	> 2.500 +
	1 : 128	1.488 +	2.008 +
	1 : 256	0.689 +	1.120 +
	1 : 512	0.580 +	<u>0.501</u> +
	1 : 1024	<u>0.286</u> +	0.375 -
	1 : 2048	0.148 -	0.111 -
抗-HCV 陽性			
HC 90-270	1 : 256	<u>0.999</u> +	<u>1.544</u> +
HC 90-354	1 : 128	<u>0.971</u> +	<u>0.761</u> +
抗HIV 1-陽性			
8803/26	未希釈	> 2.500 +	0.110 -
8811/144	未希釈	> 2.500 +	0.098 -
8803/24	未希釈	> 2.500	0.068 -
			(陰性)
抗HIV 2-陽性			
8804/103	未希釈	> 2.500 +	0.075 -
8804/117	未希釈	> 2.500 +	0.081 -
8804/116	未希釈	> 2.500 +	0.099 -
			(陰性)

【 0 2 1 4 】

抗 - H C V に対しても手順は同様とし、4 種類の抗 - H C V - 陽性検体の連続希釈液を表 2 7 に記載の如く調製し、抗 - H I V と同様にテストおよび評価し、そして第 2 世代の市販抗 - H C V E L I S A (H P 2) を用いた結果と比較した。

【 0 2 1 5 】

さらに、各供血の反応性の特異性についても、抗 - H C V テストでは未希釈の抗 - H I V 1 - および抗 - H I V 2 - 陽性検体を、そして逆に抗 - H I V 1/2 組合せテスト (Enzygnost^R 抗 - H I V 1/2) では抗 - H C V - 陽性検体を検査することにより個別テストと

10

20

30

40

50

してテストした。

【0216】

表25～27にまとめた結果から、抗-HIV 1および抗-HIV 2のいずれについても本発明によるELISAの限界感度が抗-HIV 1/2組合せテストの限界感度に相当することが明らかである。さらに本発明によるELISAのHCV限界感度も市販の抗-HCV ELISA (HP 2)の限界感度に相当した。しかしながら、従来技術に従ってこれら3種類の抗体特異性を検出しようとするれば全部で少なくとも2種類のテスト(抗-HIV 1/2組合せテストと少なくとも一つの抗-HCVテスト)が必要であるのに対し、本発明方法によればたった一つのテスト混合物を用いるだけで全く同じ信頼性をもってまた同等の感度をもってこの検出が可能となる。

10

【0217】

さらに表25～27のデータから、この新しいELISAにおける抗-HIV - および抗-HCV - 陽性検体の強反応性が特に有利であることが明らかである。何故ならば抗-HIV検体は特異的抗-HCVテストで陰性に反応し、また抗-HCV - 陽性検体は特異的抗-HIVテストで陰性に反応したからである。

【0218】

実施例12

本発明ELISAによる感染初期からの抗-HIV 1 - 陽性検体(血清転化)の測定
合計3名の患者からHIV 1感染の極く初期の間の規定の時点でもり返し採取された連続血液検体についてテストを行った。これらの血清パネルは市販されている(Boston Bio
medica Inc., 米国)。本発明ELISAにより得られた結果と抗-HIV 1/2組合せテ
ストとの比較を表28に示した。

20

【0219】

表28

すべてのデータは吸光度(E_{450nm})であり、そして特定の限界値を超える値を陽性とする
ことができる。

【0220】

【表28】

表 2 8

検体コード	本発明による ELISA	市販の抗-HIV 1/2 ELISA	市販の抗-HCV ELISA (HP2)	
1 A	0.023	0.066	陰 性	
2 A	0.020	0.055	〃	
3 A	0.055	0.193	〃	
4 A	1.163 +	> 2.500 +	〃	
5 A	> 2.500 +	> 2.500 +	〃	
6 A	> 2.500 +	> 2.500 +	〃	10
7 A	> 2.500 +	> 2.500 +	〃	
8 A	> 2.500 +	> 2.500 +	〃	
9 A	> 2.500 +	> 2.500 +	〃	
1 C	0.014	0.022	陰 性	
2 C	0.015	0.054	〃	
3 C	0.054	0.145	〃	
4 C	0.500 +	1.138 +	〃	
5 C	0.630 +	1.707 +	〃	
6 C	0.889 +	> 2.500 +	〃	
7 C	0.942 +	〃	〃	20
8 C	1.010 +	〃	〃	
9 C	1.081 +	〃	〃	
10 C	1.564 +	〃	〃	
11 C	> 2.500 +	〃	〃	
12 C	〃	〃	〃	
13 C	〃	〃	〃	
14 C	〃	〃	〃	
15 C	〃	〃	〃	
16 C	〃	〃	〃	
17 C	〃	〃	〃	
18 C	〃	〃	〃	30
G BBI				
80	0.012	0.056	陰 性	
81	0.013	0.053	〃	
82	0.018	0.059	〃	
83	0.478 +	1.112 +	〃	
84	0.733 +	> 2.500 +	〃	
85	0.612 +	> 2.500 +	〃	
86	0.763 +	> 2.500 +	〃	
87	1.296 +	> 2.500 +	〃	
88	1.309 +	> 2.500 +	〃	40
89	1.544 +	> 2.500 +	〃	
カットオフ	0.281	0.285	0.481	

【 0 2 2 1 】

表 2 8 の結果から明らかなように、本発明による E L I S A は低力価抗 - H I V 1 - 陽性検体を抗 - H I V 1/2 組合せテスト (Enzygnost^R 抗 - H I V 1/2) と全く同じ信頼性をもって検出する。同様に表 2 8 のデータと比較することにより、本発明の新規ペプチド E L I S A により H I V 1 - 特異的抗体の最初の検出が可能となる最も早い時点も、従来技術としての特異的個別抗 - H I V 1 テストと少なくとも同じ早さとしてすることができ

ることが明らかである。

【 0 2 2 2 】

実施例 1 3

本発明 E L I S A による低力価抗 - H I V 1 - 陽性検体の測定

表 2 9 は本発明の新規 H I V / H C V ペプチド E L I S A を用いた市販の抗 - H I V 低力価パネルについてのテストで得られた結果を抗 - H I V 1/2 組合せテスト (Enzygnost^R 抗 - H I V 1/2) と比較したものをまとめて示したものである。

【 0 2 2 3 】

Boston Biomedica, Inc. 社 (米国) により供給された検体パネルは、抗 - H I V 1 測定法により低力価抗 - H I V 1 - 陽性として分類された合計 1 5 の検体より成る。

10

【 0 2 2 4 】

表 2 9

Boston Biomedica Inc. 社 (米国) により供給された低力価抗 - H I V 1 パネルについてのテスト結果

すべてのデータは 4 5 0 nm の波長における吸光度である。記載の限界値を超える値が陽性である。

【 0 2 2 5 】

【表 2 9】

表 2 9

20

ID No.	本発明による ELISA	市販の抗-HIV 1/2 ELISA HCV	市販の抗-HCV ELISA
BO 1-01	> 2.500	1.872	> 2.500 +
02	1.979	1.575	2.023 +
03	2.056	2.280	陰 性
04	1.751	1.960	"
05	1.781	2.044	"
06	1.428	1.728	"
07	1.183	1.564	"
08	0.641	1.152	"
09	0.984	1.499	"
10	0.682	0.940	"
11	1.302	1.650	"
12	2.032	0.540	1.833 +
13	1.017	1.854	陰 性
14	1.079	1.484	"
15	> 2.500	2.090	> 2.500 +
カットオフ	0.279	0.265	0.479

30

40

【 0 2 2 6 】

50

表 29 の結果から、抗 - H I V 1/2 組合せテスト (Enzygnost^R 抗 - H I V 1/2) に比べ、本発明による H I V / H C V ペプチド E L I S A を用いるときはすべての検体が比較的強い反応性を示すことが明らかである。

【 0 2 2 7 】

実際、パネルの 4 つの検体は本発明の新規ペプチド E L I S A によれば抗 - H I V 1/2 組合せテスト (Enzygnost^R 抗 - H I V 1/2) よりも強い反応性を示すが、このことは興味深いことである (N o . 1、2、12 および 15)。これらの検体についての付加的テストから H C V 検体の同時存在が明らかとなったがこのことから本発明方法による抗 - H I V 1 / - H I V 2 および - H C V の非鑑別検出の信頼性が確認される。

【 0 2 2 8 】

10

実施例 14

本発明 E L I S A による低力価抗 - H C V - 陽性検体の測定

表 30 に含まれる結果は、本発明の新規 H I V 1 / H I V 2 および H C V ペプチド E L I S A、および Boston Biomedica Inc. 社 (米国) により供給された低力価抗 - H C V パネルを用いて得られたものである。さらにこの表 30 は最新式の抗 - H C V E L I S A (H P 2) を用いて同一パネルについて得られたデータである。

【 0 2 2 9 】

本発明によるおよび市販の E L I S A についてのデータはいわゆる終点力価でありこれをもって、所与のテストにおいて再現性よく陽性であると認められた最高の予備的希釈率が規定される。

20

【 0 2 3 0 】

【表 30】

表 3 0

BBI 低力価抗-HCVパネル PHV 101

メンバー I. D. 番 号	本発明によるELISA	市販の抗-HCVテスト (HP2)	
PHV101-01	1 : 16	1 : 2	
PHV101-02	陰 性	陰 性	10
PHV101-03	1 : 4	1 : 1	
PHV101-04	1 : 512	1 : 64	
PHV101-05	1 : 2	1 : 1	
PHV101-06	1 : 128	1 : 32	
PHV101-07	1 : 128	1 : 128	
PHV101-08	1 : 64	1 : 16	20
PHV101-09	1 : 64	1 : 16	
PHV101-10	1 : 256	1 : 128	
PHV101-11	1 : 32	1 : 16	
PHV101-12	1 : 512	1 : 128	
PHV101-13	1 : 16	1 : 64	
PHV101-14	1 : 64	1 : 32	
PHV101-15	1 : 128	1 : 64	30

【 0 2 3 1 】

表 3 0 の結果から、14 個すべての陽性検体が本発明 E L I S A により信頼性をもってかつ明白に陽性とされたことが明らかである。これに関し、信号強度が極めて高いことに注目すべきであるが、これは高い反応性によるものとすることができる。

【 0 2 3 2 】

この高い特異性は表 3 0 に示された限界感度にも反映されている。これらの検出限界は、自然ヒト検体を抗 - H C V - 陰性血清中で予備的に連続 2 倍希釈し次いで実施例 4 と同様にテストすることにより規定されたが、その場合、依然として反応性が認められる最後の予備的希釈段階がいわゆる最終力価となる。

【 0 2 3 3 】

これに基づいて、表 3 0 のデータから、本発明による新規 H I V 1 / H I V 2 / H C V ペプチド E L I S A が、事実、P V C 1 0 1 パネルにおいて抗 - H C V に対して従来技術よりも良い検出限界を有していることが明らかである。

【 0 2 3 4 】

実施例 1 5

一群の健常供血者における新規ペプチドの非特異的反応率の測定

E L I S A における誤った陽性結果につながる非特異的反応頻度を測定するために全部で $n = 512$ の健常供血者を用いた。さらに当該方法への凝固系の可能性としての干渉をも検査できるように、これらの供血者から血清と血漿を同時に採取した。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 5 】

これら 3 種類のテスト（本発明による E L I S A、抗 - H C V E L I S A H P 2 および抗 - H C V 1/2 H P 3）（いわゆる初回テスト）のうちの一つで反応性のあった検体に同じテスト（いわゆる再テスト）をくり返し、そしてその反応性に再現性がある場合には、比較のための方法としての抗 - H I V 1 ウエスタンブロットおよび抗 - H C V E L I S A C H P 1）で検査した。

【 0 2 3 6 】

この確認法によっては、このスクリーニングにおいて前記 3 種類の E L I S A のうちの一つで反応性を示した反応性検体のいずれも抗 - H I V 1 - または抗 - H C V - 陽性であると確認することはできなかった。すなわち、スクリーニングで拒絶されたすべての検体は特定の方法において終始誤った陽性として分類された。

10

【 0 2 3 7 】

表 3 1 :

5 1 2 個の血清および 5 1 2 個のいわゆる対合である血漿を同時採取した n = 5 1 2 名の健常供血者のスクリーニング。初回テスト後の結果を示す；再テストの結果については表 3 2 を参照されたい。

【 0 2 3 8 】

【表 3 1】

表 3 1

検体コード	本発明による方法				抗-HIV 1/2		抗-HCV (HP 2)	
	数	比	血清／血漿	反応性血清／血漿	数	比	数	比
	3/2			0/0			0/0	
9104-PE-1		2.1/1.3				neg.		neg.
2		1.0/1.2				neg.		neg.
3		1.1/0.9	—			neg.		neg.
	0/0			1/1				
9104-HIV-1		neg.				1.8/1.6		neg.
	0/0			0/0			5/4	
9104-HCV-1		neg.				neg.		>4.0 /3.5
2		neg.				neg.		2.5 /3.0
3		neg.				neg.		1.4 /1.2
4		neg.				neg.		1.3 /1.5
5		neg.				neg.		0.8- /1.1

【 0 2 3 9 】

【 表 3 2 】

10

20

30

40

表 3 2

表 3 1 よりの 9 個の反応性血清についての反復テスト後の特異性結果

n = 512 血清 および n = 512 対合血漿 (全 512 名の健常供血者より)	新規ペプチド 血清/血漿	抗-HIV 1/2 (HP 3) 血清/血漿	抗-HCV (HP 2) 血清/血漿
初回テストにおける誤った 陽性結果数	3/2	1/1	5/4
初回時特異性 (%)	99.41/99.60	99.80/99.80	99.02/99.22
反復後における誤った 陽性結果数	2/2	1/1	4/4
再テスト時特異性 (%)	99.60/99.60	99.80/99.80	99.22/99.22

【 0 2 4 0 】

最初の一連のテストの結果（初回時結果）は表 3 1 にまとめられている。3 個の血清（および 2 個の対合血漿）が本発明方法において反応性を示したのに対し、抗 - H I V 1/2 E L I S A では 1 個の血清（および 1 個の相当する血漿）が反応性を示し、また抗 - H C V E L I S A では 5 個の血清（および 4 つの相当する血漿）が反応性を示した。特定の E L I S A で反応性を示した供血者は同一でなかった。

【 0 2 4 1 】

これら 9 個の反応性血清についてテストをくり返したところ表 3 2 に示される像が得られ、2 個の血清（2 個の対合血漿）は本発明によるペプチド E L I S A で再テスト反応性を示し、1 個の血清（1 個の対合血漿）は抗 - H I V 1/2 E L I S A で反応性を示しそして 4 個の血清（4 個の対合血漿）は抗 - H C V E L I S A で反応性を示した。

【0242】

これら検体のいずれについても抗 - H I V - および抗 - H C V - 陽性であるとして確認することができなかったことから、表32に示した特異性データは、検査されたE L I S Aの各々および血清および血漿について、(全512個の血清および512個の血漿のうち)正しく陰性と認められた検体の率(%)を計算することにより測定されたものである。

【0243】

表32のデータに基づくと、各供血時に義務付けられている従来の抗 - H I V および抗 - H C V テストによるときは、全部で5名の供血者が排除されねばならなかったであろう。すなわち、1名の供血者は抗 - H I V 1/2テストにおいてくり返し誤った陽性を示しそして4名の供血者は抗 - H C V テストにおいてくり返し誤った陽性を示した。これに対し本発明によるE L I S Aによるときは、ひょっとして誤った反応を示す供血者数は2名に過ぎない。

10

【0244】

要約すると、抗 - H I V 1、抗 - H I V 2 および抗 - H C V の同時非鑑別検出のための本発明の新規ペプチドE L I S Aは、現在有効な感度基準からして、一方において抗 - H I V 1/2および他方において抗 - H C V の個別テストの各々至適の性能に少なくとも相当するといえることができる。すなわちパネル、すなわち抗 - H I V 1 および / または抗 - H I V 2 および / または抗 - H C V を含む自然検体からのデータは、低力価抗 - H I V 1 または抗 - H I V 2 または抗 - H C V 検体の限界感度および最先認識時点についてのテストと全く同様に同等の効率を示している。従来技術によるときはこのようにして3種類の異なるテスト、あるいは抗 - H I V 1/2組合せテストに徴すれば2種類の異なるテストを用いて初めてこれら3種類の抗体特異性が可能であるのに対して、本発明によるE L I S Aには効率は同じであるのに1種類のテストしか必要でないという利点がある。特に、抗 - H I V 1、抗 - H I V 2 および抗 - H C V のテストの実施が義務付けられている血液銀行にとって、本発明の新規ペプチドE L I S Aは、抗 - H I V 1、抗 - H I V 2 および抗 - H C V の測定において、少なくとも同じ信頼性および安定性をもって、相当な労力および費用の軽減となる。

20

【0245】

さらに、この新規テストの干渉の受けやすさを測定したところ、全く驚くべきことに、特異性が極めて良好である、すなわち誤った陽性結果数がほんのわずかであるため、抗 - H I V 1/2テストとそれとは別に抗 - H C V テストを有する従来のスクリーニング手順に比べ、より少ない再テストおよびより少ない確認テストで済み、また拒絶されねばならない供血も少なく済むことがわかった。このことは本発明方法による方法が式IV~XIIおよびXIII~XVIIで示されるH I V およびH C V ペプチドの他の群によっても提供される経済的および化学的利点を有していることを意味している。

30

【0246】

本発明による方法は限界感度の最大至適化が最も重要となっている他の課題にも極めて適している。すなわち、他のテスト条件下で、あるいは例えば実施例10~14における計算により、幾分好ましさに欠ける特異性データ(とはいえ依然として従来技術水準には相当する)でよしとするのであれば、従来技術よりも著しく向上した感度特徴を本発明方法により得ることが完全に可能であることを示すことができる。

40

【0247】

例えば、限界値(実施例9)が0.1吸光度まで低下したとすれば、抗 - H I V 1、抗 - H I V 2 および抗 - H C V に対するすべての限界感度は相当に(少なくとも2倍)改善されることになる。健康供血者のスクリーニングにおいて非特異的、すなわち誤った陽性、反応を示す検体率として全部で5名の供血者(くり返し反応性を示した)が得られる(実施例15)。これは2種類の個別テストの結果に完全に相当するが、抗体検出感度は相当に向上した。

【0248】

【配列表】

50

配列番号：1

HCVアミノ酸配列

121

175

SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQFKQKALGLLQTASRQA

配列番号：2

HCVアミノ酸配列

121

160

10

SGKPAIIPDREVLRYREFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQF

配列番号：3

HCVアミノ酸配列

128

160

PDREVLRYREFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQF

配列番号：4

HCVアミノ酸配列

20

136

160

EFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQF

配列番号：5

HCVアミノ酸配列

144

160

SQHPYIEQGMLAEQF

配列番号：6

30

HCVアミノ酸配列

161

175

KQKALGLLQTASRQA

配列番号：7

HCVアミノ酸配列

144

175

SQHPYIEQGMLAEQFKQKALGLLQTASRQA

40

配列番号：8

HCVアミノ酸配列

135 164

REFDEMEECSQHLPYIEQGMLAEQFKQKA

配列番号：9

HCVアミノ酸配列

121 135

SGKPAIIPDREVLIR

10

配列番号：10

HCVアミノ酸配列

129 143

DREVLIREFDEMEEC

配列番号：11

HCVアミノ酸配列

137 151

FDEMEECSQHLPYIE

20

配列番号：12

HCVアミノ酸配列

145 159

QHLPYIEQGMLAEQ

配列番号：13

HCVアミノ酸配列

153 167

GMMLAEQFKQKALGL

30

配列番号：14

HCVアミノ酸配列

345 359

VQWMNRLIAFASRGN

40

配列番号：15

HCVアミノ酸配列

121 139

SGKPAIIPDREVLRYEFDE

配列番号 : 16

HCVアミノ酸配列

HVGPGGEAVQWMNRLIAFASRGNHVSP

配列番号 : 17

HCVアミノ酸配列

10

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGQIVGGVY I

配列番号 : 18

HCVアミノ酸配列

1 30

MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGQI SP 10

配列番号 : 19

HCVアミノ酸配列

20

8 26

QRKTKRNTNRRPQDVKFPG SP 23

配列番号 : 20

HCVアミノ酸配列

10 26

KTKRNTNRRPQDVKFPG SP 30

配列番号 : 21

HCVアミノ酸配列

30

12 26

KRNTNRRPQDVKFPG SP 30 D

配列番号 : 22

HCVアミノ酸配列

14 26

NTNRRPQDVKFPG SP 30 C

40

配列番号 : 23

H C V アミノ酸配列

16 26

NRRPQDVKFPG

SP 30 B

配列番号 : 24

H C V アミノ酸配列

18 26

RPQDVKFPG

SP 30 A

10

配列番号 : 25

H C V アミノ酸配列

8 24

QRKTKRNTNRRPQDVKF

SP 31

配列番号 : 26

H C V アミノ酸配列

8 22

QRKTKRNTNRRPQDV

SP 32

20

配列番号 : 27

H C V アミノ酸配列

-DVEVLYR-

配列番号 : 28

H C V アミノ酸配列

-QHLPYIE-

30

配列番号 : 29

H C V アミノ酸配列

-KQKALGL-

配列番号 : 30

H C V アミノ酸配列

-QRKTKRNTNRRPQDVK-

配列番号 : 31

40

H I V アミノ酸配列

586

620

RILAVERYLEDQQLLGIWGCSGKLICTTAVPWNAS

配列番号 : 32

H I V アミノ酸配列

578

613

RVTAI EKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVND S

10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 C - 100 - 3 の O R F 領域のアミノ酸の一次配列 (W O / 89 / 04669 より)。

【図 2】 式 I および式 II の本発明による配列と C - 100 - 3 の O R F 領域からの既知ペプチドとの比較。

【図 3】 H C V コアタンパク質の本発明による配列と既知ペプチドとの比較。

【図 1】

C-100-3 の ORF-領域のアミノ酸配列

aa 1

DAHF	LSQT	KQSG	ENLP	YLV	A	20
YQAT	VCAR	AQAP	PPSW	DQM	W	40
KCL	IRL	KPTL	HGPT	PLLY	RL	60
GAV	QNE	ITLT	HPVT	KYIM	TC	80
MSA	DLE	VVT	STW	VLV	GGV	100

ALA	AYCL	STGC	VVIV	GRV	VL	120
SGK	PAII	PDRE	VLYR	EFD	EM	140
ECS	QHLP	YIEQ	GHML	A	EQF	160
KQK	ALGL	LQTAS	RQA	EVI	AP	180
AVQ	TNWQ	KLETF	WAKH	MWN	F	200

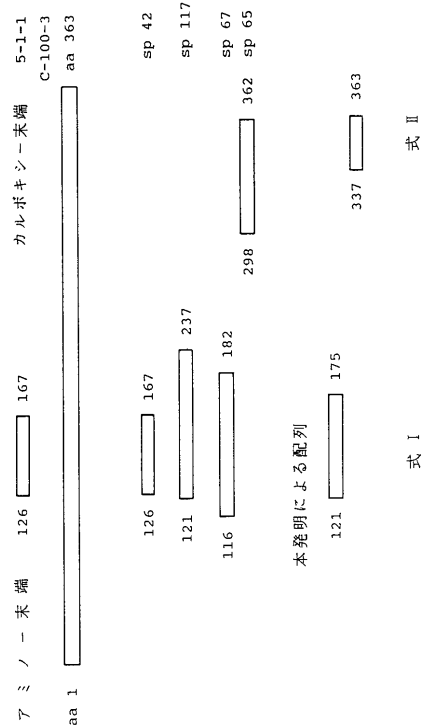
ISGI	QYLA	GLST	LPGN	PAIA	220
SLMA	FTAA	VTSPL	TTSQ	TLL	240
FNIL	GGWV	AAQL	AAPG	AATA	260
FVGA	GLAG	AAIG	SVGL	GKVL	280
IDIL	LAGY	GAGV	AGAL	VAFKI	300

MSG	EVPS	TEDL	VNLL	PAI	LS	320
PGAL	LVVG	VCA	AILR	RHV	GP	340
GE	GA	VQWM	NRLI	AFA	SRGNH	360
VSP						

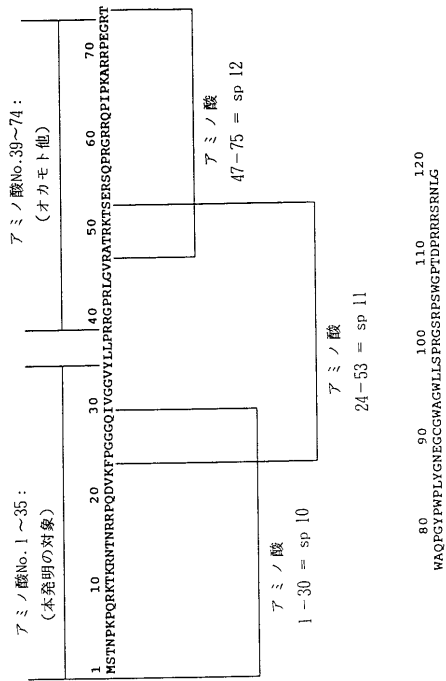
aa 363

【図 2】

式 I および式 II によるアミノ酸配列と C-100-3 の ORF-領域からのペプチドとの比較



本発明によるアミノ酸配列と既知ペプチドとの比較



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 P4120281.3

(32)優先日 平成3年6月19日(1991.6.19)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(31)優先権主張番号 P4121431.5

(32)優先日 平成3年6月28日(1991.6.28)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(72)発明者 ヴエルナー・シュテューバー

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 5 1 ラーンタール・ツエルバーヴェーク 2

(72)発明者 マンフレート・ゲルケン

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 5 0 マルブルク・ヴァンコプフシュトラッセ 1 2

(72)発明者 シュテファン・ブルスト

ドイツ連邦共和国デー - 3 5 5 0 マルブルク・アム・ヴァル 3 2

合議体

審判長 種村 慈樹

審判官 小暮 道明

審判官 光本 美奈子

(56)参考文献 特開平 5 - 9 1 8 8 4 (J P , A)

特開平 4 - 9 9 7 9 9 (J P , A)

特開平 4 - 1 5 9 2 9 8 (J P , A)

特表平 6 - 5 0 0 9 2 5 (J P , A)

国際公開第 9 2 / 9 6 3 4 (W O , A 1)

特表平 5 - 5 0 3 7 2 2 (J P , A)

特表平 6 - 5 0 6 6 6 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

C07K1/00-19/00

PUBMED

Biosis

WPIDS

专利名称(译)	HCV特异性肽及其用途		
公开(公告)号	JP4097191B2	公开(公告)日	2008-06-11
申请号	JP2002330252	申请日	2002-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	日徳白令maru堡ゲゼルシャフトミットベシユレンクテルハフツング		
申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡，Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	德灵公司马尔堡，Gezerushiyafuto-Mitsuto-Beshiyurenkuteru-有限公司		
[标]发明人	ウードクल्पカ ヴェルナー・シュテューバー マンフレート・ゲルケン シュテファン・ブルスト		
发明人	ウード・クल्पカ ヴェルナー・シュテューバー マンフレート・ゲルケン シュテファン・ブルスト		
IPC分类号	C07K14/18 C07K17/02 G01N33/53 G01N33/576 A61K39/00 A61K39/12 C07K1/00 C07K7/08 C07K14/16 C07K16/00 C07K16/10 C07K19/00 C12N15/51		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/00 C07K16/109 C12N2740/16122 C12N2770/24222		
FI分类号	C07K14/18.ZNA C07K17/02 G01N33/53.D G01N33/576.Z G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA10		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	4034982 1990-11-03 DE 4112743 1991-04-19 DE 4120281 1991-06-19 DE 4121431 1991-06-28 DE		
其他公开文献	JP2003192697A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于HCV特异性抗体和HCV抗原的免疫化学测量的多肽，适合于其测量和使用的试剂，进一步提供用于同时检测和/或同时测量多种不同的免疫化学方法对不同种类病原体的抗体特异性。解决方案：多肽与HCV抗体特异性反应，并且至少在氨基末端HCV核心区域包含氨基酸序列。Ž

表 3							
検体番号	4056	4055	4053	4052	4081	4091	混合物 4056 4055 4053 4052 4081 4091 各0.5
μg/ml	2	2	2	2	2	2	
BC90-89	>2.50	0.20	—	—	—	—	1.40
252	—	—	0.20	—	>2.50	—	2.10
90	0.80	—	—	—	1.60	—	2.00
268	>2.50	—	0.20	—	>2.50	>2.50	>2.50
84	—	1.20	1.60	—	1.70	>2.50	>2.50
225	>2.50	>2.50	—	—	>2.50	>2.50	>2.50
270	2.00	1.70	—	—	2.20	>2.50	>2.50
229	0.20	—	—	1.10	1.00	—	1.50
288	>2.50	>2.50	—	0.50	>2.50	>2.50	>2.50
290	>2.50	>2.50	—	0.20	>2.50	>2.50	>2.50
242	—	0.50	—	—	1.20	1.40	>2.50
137	—	—	—	—	0.40	0.35	0.70
286	—	—	0.60	0.15	0.45	0.15	0.90
192	0.20	>2.50	—	1.00	—	—	>2.50
235	0.15	—	0.40	—	0.20	—	0.30
85	—	—	—	0.75	—	—	0.40

【 0 1 3 2 】
本表は、各々の混合物を用いて測定された反応性を示している。この各々の反応性は、

