

(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2010-48830

(P2010-48830A)

(43) 公開日 平成22年3月4日(2010.3.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 L	
GO 1 N 33/577 (2006.01)	GO 1 N 33/577 B	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2009-275000 (P2009-275000)	(71) 出願人	591076811 ノバルティス バクシンズ アンド ダイ アグノスティックス、インコーポレーテ ド アメリカ合衆国、カリフォルニア 946 08、エミリービル、ホートン ストリ ート 4560
(22) 出願日	平成21年12月2日 (2009.12.2)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(62) 分割の表示	特願2001-514569 (P2001-514569) の分割	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
原出願日	平成12年7月25日 (2000.7.25)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/146,079		
(32) 優先日	平成11年7月28日 (1999.7.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

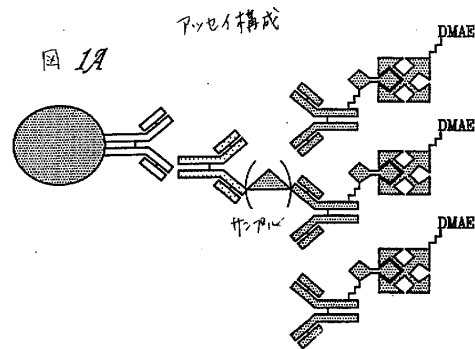
(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルス抗原免疫アッセイ検出システム

(57) 【要約】

【課題】生物学的サンプルにおいてHCVを検出するための有意な改善を提供する。

【解決手段】生物学的サンプルにおいて、C型肝炎ウイルスタンパク質ならびにC型肝炎ウイルスタンパク質と抗体との間の免疫複合体を検出するための免疫アッセイ、C型肝炎ウイルスについて血液製剤をスクリーニングする方法、およびそのために使用されるキットが提供される。このC型肝炎ウイルスを検出するための方法は、生物学的なサンプルを、抗ヒト抗体および少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体と接触させる工程、ならびにこの抗体およびエンベロープタンパク質の免疫複合体の存在を検出する工程、を包含する。

【選択図】 図1A



【特許請求の範囲】

【請求項1】

明細書中に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般的に、C型肝炎ウイルスを検出するための免疫アッセイ、および詳細には、生物学的サンプルにおけるC型肝炎ウイルスを検出する方法、C型肝炎ウイルスについて血液製剤をスクリーニングする方法、およびそのためのキットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

C型肝炎ウイルス(HCV)が、Houghtonらにより、最初に同定され、そして輸血後非A、非B型肝炎(NANBH)の主な原因として特徴付けられた。HCVに関する実質的な情報を提供するのに加えて、Houghtonらおよび彼らの協力者は、多数の一般的かつ特異的な、免疫学的試薬および方法を開示した。例えば、Houghtonら、欧州公開番号318,216号;Houghtonら、欧州公開番号388,232;Chooら、Science,1989,244,359-362;Kuoら、Science,1989,244,362-364;Takeuchiら、J.Gen.Virol.,1990,71,3027-3033;Takeuchiら、Gene,1990,91,287-291;Takeuchiら、Nucl.Acids Res.,1990,18,4626;Miyamuraら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1990,87,983-987;Saitoら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1990,87,6547-6549;Chooら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1991,88,2451-2455;Hanら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88,1711-1715;Houghtonら、Hepatology,1991,14,381-388;およびWeinerら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1992,89,3468-3472を参照のこと。これらの刊行物は、一般的に、HCVに関する広い背景技術、ならびにHCVポリペプチド免疫学的試薬の製造および使用を提供する。従って、略して、これらの刊行物の開示は詳細に、本明細書中にその全体が参考として援用される。

20

30

【0003】

他者が、Houghtonらの研究を、容易に応用しかつ広げた。例えば、Highfieldら、英国特許出願2,239,245(The Wellcome Foundation Ltd.);Wang,欧州公開番号442,394(United Biomedical Inc.);Leungら、欧州公開番号445,423(Abbott Laboratories);Habitsら、欧州公開番号451,891(Akzo N.V.);Reyesら、PCT公開番号WO 91/15516(Genelabs Inc.);Makiら、欧州公開番号468,657(Tonen Corp.);およびKamadaら、欧州公開番号469,348(Shionogi Seiyaku

40

K.K.)を参照のこと。また、Matsuuraら、J.Virology,1992,66,1425;Katoら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1990,87,9524-9528;Takamizawaら、J.Virol.,1991,65,1105-1113;Chibaら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1991,88,4641-4645;Haradaら、J.Virol.,1990,65,3015-3021;Hijikataら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1991,88,5547-5551;Okamotoら、Jpn.J.Exp.Med.,1990,60,167-177;Yuasaら、J.G

50

en. Virol., 1991, 72, 2021 - 2024; および Watanabeら, Int. J. Cancer, 1991, 48, 340 - 343を参照のこと。

【0004】

HCVのキャリアおよびHCVに汚染された血液または血液製剤をスクリーニングし、そして同定し、ならびに処置を受けている患者をモニターするための、感度の高い、特定の方法は、医学において重要な進歩である。輸血後肝炎(PTH)は、輸血を受けた約10%の患者に生じ、そしてHCVが、これらの場合の90%までの割合を占めた。この疾患における主な問題は、他の肝炎(例えば、B型肝炎)と比較して、慢性的な肝臓損傷への頻繁な進行(25~55%)である。

【0005】

患者の世話ならびに血液および血液製剤によるか、または近接したヒトとの接触によるHCVの伝染の予防は、信頼できる診断手段および予後手段(例えば、HCV感染に関連するタンパク質を検出するためのHCV抗体など)を必要とする。このような抗体はまた、HCVを有する患者の処置レジメンをモニターするための薬剤として有用である。HCVは、比較的新しい因子なので、疾患の臨床過程および集団におけるHCVの疫学の研究をさらに可能にするさらなる免疫学的試薬を規定するための継続した必要性が存在する。

【0006】

HCVを検出するための現在の方法論は、HCV特異的抗体を検出することに注目する。例えば、Hadaら, Acta Med. Okayama, 1992, 46, 365 - 70; Miyamuraら, 欧州公開番号0537626; Lokら, Hepatology, 1993, 18, 497 - 502; Wangら, Vox Sang, 1992, 62, 21 - 4; Kleinmanら, Transfusion, 1992, 32, 805 - 813; Leonら, Vox Sang, 1996, 70, 213 - 16; Lesniowskiら, J. Med. Virol., 1995, 45, 415 - 22; および Inoueら, J. Gen. Virol., 1992, 73, 2151 - 54を参照のこと。HCVと反応する抗体を検出する主な不都合は、セロコンバージョンがすでに生じ、そして患者がすでに十分に確立されたウイルス感染を有し得ることである。あるいは、個体がHCV抗体反応性であることを決定される場合、個体が過去にときどきHCVに曝露されて、そして現在は感染していないかもしれないことを簡単に意味し得る。

【0007】

HCVを検出するための他の方法は、PCRを使用することを含む。例えば、非特許文献1を参照のこと。HCVエンベロープタンパク質はまた、慢性的な肝臓疾患を有する患者における肝細胞の免疫組織化学的分析により検出されている。しかし、これらのアッセイは、容易には、臨床的な設定に役立たない(非特許文献2)。

【0008】

他の方法はまた、HCVコアタンパク質を検出することに指向される。例えば、非特許文献3および非特許文献4を参照のこと。これらの方法としては、組換えHCVコアタンパク質と反応性のモノクローナル抗体を使用した、タンパク質捕捉蛍光酵素免疫アッセイ(FEIA)、伝統的なサンドウィッチELISAアッセイ、を含む。この方法は、捕捉抗体として固相上にコートされる1つのモノクローナル抗体および抗原検出シグナル抗体として - D - ガラクトシダーゼ結合体化モノクローナル抗体を使用することからなる。しかし、これらのアッセイは、とても手間のかかる(tedious)サンプル調製手順(例えば、ポリエチレングリコール沈降、NaOH変性、中性pHへのサンプルのレトリトレーション(retriteration)およびアッセイ開始の前のサンプル調製物へのTriton X-100の添加を含む)を必要とする。このようなアッセイは、臨床的設定において好都合でない。事実、必要とするものは、HCVの抗原の検出のための、容易で、迅速な免疫アッセイである。

【0009】

出願人は、手間のかかるサンプル調製手順なしに、HCVエンベロープ抗原(E1およびE2)を検出し得る免疫アッセイ系を開発した。出願人の発明は、セロコンバージョン

10

20

30

40

50

、急性感染後の抗原消失、および/またはインターフェロン治療の前に、遊離HCV抗原を検出する手段を提供し、そして従って、診断の手段として、ならびに血液スクリーニングのためおよび薬物処置の効力を評価するために有用である。従って、出願人の発明は、生物学的サンプルにおいてHCVを検出するための有意な改善である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Francoisら, J. Clin. Microbiol., 1993, 31, 1189-93

【非特許文献2】Hiramatsuら, Hepatology, 1992, 16, 306-311 10

【非特許文献3】Oritoら, Gut, 1996, 39, 876-80

【非特許文献4】Kashiwakumara, J. Immunol. Methods, 1996, 190, 79-89

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、サンプルを、抗ヒト抗体および少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質抗体と、抗体とサンプルとの間の免疫学的反応を可能にする条件下で接触させること、およびこの抗体およびこのエンベロプタンパク質の免疫複合体の存在を検出することを包含する、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルスを検出するための方法に指向される。 20

【0012】

本発明はまた、固相に結合された抗ヒト抗体を、ポリクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質抗体と接触させること、ポリクローナル抗体にサンプルを接触させること、サンプルを、少なくとも1つの検出可能に標識されるモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質抗体と、この抗体とこのサンプルとの間で免疫学的反応を可能にする条件下で接触させること、そしてこの抗体およびこのエンベロプタンパク質の免疫複合体の存在ならびに/または遊離エンベロプタンパク質の存在を検出することを包含する、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルスを検出するための方法に指向される。 30

【0013】

本発明はまた、潜在的なドナー由来の身体成分を、抗ヒト抗体および少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質抗体と、この抗体とこの身体成分との間で免疫学的反応を可能にする条件下で反応させること、この抗体とC型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質との間で形成される免疫複合体の存在を検出すること、およびその複合体が検出される場合、ドナーからいずれの血液または血液成分も廃棄することを含む、血液製剤を調製するためのこのような血液または血液成分の使用の前に、C型肝炎ウイルスについて血液成分または血液をスクリーニングする方法に指向される。 40

【0014】

本発明はまた、抗ヒト抗体、少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質抗体、コントロール標準、およびキット成分の使用のための説明書を備える、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルスを検出するためのキットに指向される。

【0015】

本発明はまた、以下の項目を提供する。

(項目1) 生物学的なサンプルにおけるC型肝炎ウイルスを検出するための方法であって、上記方法は、以下の工程：

上記サンプルを、抗ヒト抗体および少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質抗体と、上記抗体と上記サンプルとの間で免疫学的反応を可能

にする条件下で、接触させる工程；ならびに

上記抗体および上記エンベロープタンパク質の免疫複合体の存在を検出する工程、を包含する、方法。

(項目2) 上記抗ヒト抗体が、固相に結合される、項目1に記載の方法。

(項目3) 上記固相が、マイクロタイタプレート、常磁性粒子、および常磁性ビーズからなる群より選択される、項目2に記載の方法。

(項目4) 上記モノクローナル抗体が、e2コンフォメーションエピトープ、e2線形エピトープ、e2線形中和エピトープ、e1コンフォメーションエピトープ、e1線形エピトープ、およびe1線形中和エピトープからなる群より選択されるエピトープと反応する、項目1に記載の方法。

(項目5) 上記少なくとも1つのモノクローナル抗体が、e2コンフォメーションエピトープ、e2線形エピトープ、e2線形中和エピトープ、e1コンフォメーションエピトープ、e1線形エピトープ、e1線形中和エピトープ、またはそれらの組み合わせと反応する、項目1に記載の方法。

(項目6) 上記モノクローナル抗体が、検出可能に標識される、項目1に記載の方法。

(項目7) 上記抗ヒト抗体が、生物学的サンプルとの接触の前に、ポリクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体と接触する、項目1に記載の方法。

(項目8) 生物学的サンプルにおけるC型肝炎ウイルスを検出するための方法であって、以下：

固相に結合される抗ヒト抗体を、ポリクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体と接触させる工程；

上記サンプルを、上記ポリクローナル抗体に接触させる工程；

上記サンプルを、少なくとも1つの検出可能に標識された、モノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体と、上記抗体と上記サンプルとの間で免疫学的反応を可能にする条件下で、接触させる工程；および

上記抗体および上記エンベロープタンパク質の免疫複合体の存在を検出する工程、を包含する、方法。

(項目9) 血液製剤を調製するための血液または血液成分の使用の前に、C型肝炎ウイルスについてこのような血液成分または血液をスクリーニングする方法であって、以下：

潜在的なドナー由来の身体成分を、抗ヒト抗体および少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体と、上記抗体と上記身体成分との間の免疫学的反応を可能にする条件下で反応させる工程；

上記抗体とC型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質との間に形成される免疫複合体の存在を検出する工程；ならびに

上記複合体が検出される場合、上記ドナー由来のいずれの血液または血液成分も廃棄する工程、を包含する、方法。

(項目10) 生物学的サンプルにおけるC型肝炎ウイルスを検出するためのキットであって、以下：

抗ヒト抗体；

少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体；

コントロール標準；および

上記キットの成分の使用のための説明書、を備える、キット。

(項目11) ポリクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体をさらに備える、項目10に記載のキット。

(項目12) 上記抗ヒト抗体が固相に結合される、項目10に記載のキット。

(項目13) 上記モノクローナル抗体が、e2コンフォメーションエピトープ、e

10

20

30

40

50

2線形エピトープ、e2線形中和エピトープ、e1コンフォメーションエピトープ、e1線形エピトープ、およびe1線形中和エピトープからなる群より選択されるエピトープと反応する、項目10に記載のキット。

(項目14) e2コンフォメーションエピトープ、e2線形エピトープ、e2線形中和エピトープ、e1コンフォメーションエピトープ、e1線形エピトープ、e1線形中和エピトープ、またはそれらの組み合わせと反応する、複数のモノクローナル抗体を備える、項目10に記載のキット。

(項目15) 上記モノクローナル抗体が検出可能に標識される、項目10に記載のキット。

【図面の簡単な説明】

10

【0016】

【図1A】図1A、1B、1Cは、本発明の好ましいアッセイ構成を示す。図1Dは、図1A、1B、および1Cにおける好ましい成分を示す。

【図1B】図1A、1B、1Cは、本発明の好ましいアッセイ構成を示す。図1Dは、図1A、1B、および1Cにおける好ましい成分を示す。

【図1C】図1A、1B、1Cは、本発明の好ましいアッセイ構成を示す。図1Dは、図1A、1B、および1Cにおける好ましい成分を示す。

【図1D】図1A、1B、1Cは、本発明の好ましいアッセイ構成を示す。図1Dは、図1A、1B、および1Cにおける好ましい成分を示す。

【図2】図2は、HCVを有する患者の処置レジメンを示すグラフである。

20

【発明を実施するための形態】

【0017】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明の実施には、他に示されなければ、当該分野内での、ウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学、および組換えDNA技術の従来の方法を使用する。このような技術は、これらの文献中に完全に説明される。例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、第2版、1989；DNA Cloning: A Practical Approach, IおよびII巻、D. Glover編；*Methods In Enzymology*、S. ColowickおよびN. Kaplan編、Academic Press, Inc.；*Handbook of Experimental Immunology*、I~IV巻、D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、Blackwell Scientific Publications；および*Fundamental Virology*、第2版、IおよびII巻、B. N. FieldsおよびD. M. Knipe、編を参照のこと(これらの各々が、本明細書中で、その全体が参考として援用される)。さらに、抗体は、例えば以下に示される標準的な公開されたプロトコールに従って、調製される：HarlowおよびLane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (これはその全体が参考として本明細書中に援用される)。

30

40

【0018】

「HCVエンベロープタンパク質」は、少なくとも1つのHCVエピトープを、エンベロープタンパク質内に規定している、アミノ酸配列(および/またはアミノ酸アナログ)を含むポリペプチドまたはポリペプチドアナログ(例えば、ミミトープ(mimitope))をいう。代表的には、エピトープを規定する配列が、HCVタンパク質のアミノ酸配列に、(同一か、またはエピトープを破壊しないネイティブなアミノ酸残基のアナログの置換を介してのいずれかで)対応する。一般に、エピトープ規定配列は、長さが5個以上のアミノ酸、より代表的には長さが8個以上のアミノ酸、およびさらにより代表的には長さが10個以上のアミノ酸である。

【0019】

50

「線形 (linear) エピトープ」は、1 連の連続アミノ酸を含むエンベロープタンパク質の 1 部をいう。抗体結合タンパク質は、好ましくは、5 個以上の連続アミノ酸、より代表的には 8 個以上の連続アミノ酸、およびさらにより代表的には 10 個以上の連続アミノ酸により規定されるエピトープと、相互作用する。

【0020】

「線形中和抗体」は、抗体がエピトープと結合される場合、その抗体が、標的細胞のウイルス感染をブロックするような線形エピトープをいう。エンベロープタンパク質内のこれらのエピトープと反応性の抗体は、標的細胞のウイルス感染を阻害または排除し得る。

【0021】

「コンフォメーション (conformation) エピトープ」とは、抗原の 3 次元形状 (例えば、折り畳み) によって形成されるエピトープをいう。配列を規定するエピトープの長さは、広範なバリエーションに供され得る。従って、エピトープを規定するアミノ酸は、比較的少ない数であるが、分子の長さに沿って (またはダイマーの場合は異なる分子に対してでさえ) 広範に広がり、これにより、折り畳みを介して正確なエピトープコンフォメーションをもらし得る。エピトープを規定する残基間の抗原の部分は、このエピトープのコンフォメーション構造に重要でないかもしれない。例えば、これらの介在配列の欠失または置換は、コンフォメーションエピトープに影響を与えないかもしれない (ただし、エピトープコンフォメーションに重要な配列 (例えば、ジスルフィド結合に關与するシステイン、グリコシル化部位など) は維持される)。

10

【0022】

本明細書中に使用される場合「E1」は、HCVポリタンパク質の最初の 400 アミノ酸内で発現されるタンパク質またはポリペプチドをいい、これはときどき、Eタンパク質またはSタンパク質といわれる。その天然形態において、E1は、膜との強い結合において見出される 35 kD の糖タンパク質である。最も天然の HCV 系統において、E1 タンパク質は、C (コア) タンパク質の次ぎに続くウイルスポリタンパク質においてコードされる。E1 タンパク質は、全長ポリタンパク質がアミノ酸 (aa) 約 192 ~ aa 約 383 に及ぶ。本明細書中に使用される場合、用語「E1」はまた、天然の E1 と免疫学的に交差反応性である、アナログおよび短縮形態を含む。

20

【0023】

本明細書中に使用される場合「E2」は、HCVポリタンパク質の最初の 900 アミノ酸内で発現されるタンパク質またはポリペプチドをいい、これはときどき、NS1タンパク質といわれる。その天然形態において、E2は、膜との強い結合において見出される 72 kD の糖タンパク質である。最も天然の HCV 系統において、E2 タンパク質は、E1 タンパク質の次に続くウイルスポリタンパク質においてコードされる。E2 タンパク質は、aa 約 384 ~ aa 約 820 に及ぶ。本明細書中に使用される場合、用語「E2」はまた、天然の E2 と免疫学的に交差反応性である、アナログおよび短縮形態を含む。

30

【0024】

本明細書中に使用される場合、用語「凝集体」とは、1 つより多くの E1 モノマーまたは E2 モノマーを含む、E1 および / または E2 の複合体をいう。E1 : E1 ダイマー、E2 : E2 ダイマー、および E1 : E2 ヘテロダイマーは、全て、この定義の範囲内の「凝集体」である。凝集体はまた、より大きな形態を含み得、そして、800 kD を超える分子量を有し得る。

40

【0025】

句「生物学的サンプル」とは、抗体またはウイルス粒子を通常含む哺乳動物 (例えば、類人猿、ヒト) の体液または組織をいう。このような化合物は、当該分野で公知であり、そしてこれらとしては、血液、血漿、血清、髄液、リンパ液、呼吸の分泌物、腸管または尿生殖器の管、涙、唾液、乳汁、白血球および骨髄腫が挙げられるが、これらに限定されない。生物学的サンプルはまた、生物学的な液体を含む。用語「生物学的な液体」とは、生物から得られる液体をいう。いくつかの生物学的な液体は、他の生成物、例えば、凝固因子 (例えば、第 VII I I I : C 因子)、血清アルブミン、増殖ホルモンなどの供給源とし

50

て使用される。そのような場合、生物学的な液体の供給源は、HCVのようなウイルスによって汚染されていないことが、重要である。生物学的サンプルはまた、「体の成分」といわれる。

【0026】

句「固相」とは、抗ヒト抗体が、共有結合されるかまたは非共有結合的な手段（例えば、疎水性吸着）によって結合される、固形物をいう。この固相は、サンプルを、インキュベーションの後に抗体から分離することを容易にする。使用され得る固相の好ましい例は、ニトロセルロース（例えば、膜またはマイクロタイターウェルの形態で）、ポリ塩化ビニル（例えば、シートまたはマイクロタイターの形態で）、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、ポリフッ化ビニリデン（Immunlon™として公知））、ジアゾ化ペーパー、ナイロン膜、活性化ビーズ、Protein Aビーズ、磁気ラテックス粒子（MLP）、常磁性粒子（PMP）、および常磁性ビーズである。例えば、Dynatech Immunlon™1もしくはImmunlon™2のマイクロタイタープレートまたは0.25インチのポリスチレンビーズ（precision Plastic Ball）が、使用され得る。

10

【0027】

本発明の1つの局面は、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルスを検出するための方法にむく。多数の免疫アッセイ形式が、本発明に従って使用され得る。しかし、この免疫アッセイ形式は、成分（すなわち、生物学的サンプル中に存在し得る抗体およびタンパク質）の間の相互作用を考慮しなければならない。好ましい免疫アッセイ形式は、以下により詳細に記載されるELISA抗原捕捉アッセイである。しかし、等価な免疫アッセイ形式が、当業者に公知であり、そして本発明の範囲内に含まれる。

20

【0028】

本発明の好ましい実施形態において、患者中のC型肝炎ウイルスと抗体との免疫複合体を検出する方法は、生物学的サンプルを、抗ヒト抗体および少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体と、この抗体とこのサンプルとの間の免疫学的反応を可能にする条件下で接触させる工程、およびこの生物学的サンプル中に存在し得る抗体およびエンベロープタンパク質の免疫複合体の存在を検出する工程を包含する。このようなアッセイ構成（configuration）の好ましい実施形態は、図1Bに示される。このアッセイ構成は、生物学的サンプル中に存在するE1および/またはE2タンパク質に結合したヒト抗HCV抗体を含む免疫複合体を検出し得る。

30

【0029】

本発明の別の好ましい実施形態において、ポリクローナル抗C型肝炎エンベロープタンパク質抗体は、生物学的サンプルと接触させる前に、抗ヒト抗体とこのポリクローナル抗C型肝炎エンベロープ抗体との間の免疫学的反応を可能にする条件下で抗ヒト抗体に接触させる。このようなアッセイ構成の好ましい実施形態は、図1Aおよび1Cに示される。このアッセイ構成は、遊離のエンベロープ抗原（図1A）ならびにE1タンパク質および/またはE2タンパク質に結合したヒト抗HCV抗体を含む免疫複合体（図1C）を検出し得る。

40

【0030】

抗ヒト抗体は、例えば、Boehringer Mannheimを含むいくつかの供給元から商業的に得られ得る。任意の抗ヒト抗体が、本発明に使用され得、そして、任意の動物から誘導され得るかまたは合成的に調製され得る。好ましい抗体は、Walpoleから得られるマウス抗ヒトIgG Fcである。このような抗体はまた、例えば、霊長類ポリクローナル抗C型肝炎エンベロープタンパク質抗体のような霊長類抗体に結合し得る。好ましくは、抗ヒト抗体は、当業者に公知の標準的な技術によって固相に結合される。好ましくは、固相は、マイクロタイタープレート、常磁性粒子または常磁性ビーズである。好ましくは、抗ヒト抗体は、最適な濃度にPBS（pH 7.4）中で希釈され、そしてPMP上にコートされる。

【0031】

50

ポリクローナル抗C型肝炎エンベロープタンパク質抗体は、当業者に周知の標準的な抗体生成技術を用いて作製され得る。これらのポリクローナル抗体は、好ましくは、抗ヒト抗体によって認識される。従って、ポリクローナル抗体は、好ましくは、例えば、チンパンジーのような霊長類を用いて作製される。好ましくは、以下により詳細に記載されるように、霊長類は、e1/e2ヘテロダイマーを用いて免疫される。

【0032】

固相に結合された抗ヒト抗体/霊長類ポリクローナル抗HCV抗体の複合体は、好ましくは、生物学的サンプル中に存在する場合、ポリクローナル抗HCV抗体と遊離のE1タンパク質および/もしくはE2タンパク質またはE1免疫複合体またはE2免疫複合体との間の免疫学的反応を可能にする条件下で、生物学的サンプルと接触させる。このような条件は、好ましくは生理学的な温度、pHおよびイオン強度下であり、そして、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)のような培地中で起こり得る。好ましくは、サンプル希釈物において0倍~1000倍に希釈され得る生物学的サンプルは、約20分間~約1時間、37℃で、PMP結合抗ヒト抗体とインキュベートされ、次いで、磁気供給源による保持と共に洗浄緩衝液で洗浄される。

10

【0033】

生物学的サンプルを抗ヒト抗体(図1B)またはポリクローナル抗HCVエンベロープタンパク質抗体(図1Aまたは図1C)のいずれかと接触させた後、生物学的サンプルをさらに、生物学的サンプル中に存在する場合、モノクローナル抗E1/E2抗体とE1タンパク質および/もしくはE2タンパク質の間の免疫学的反応を可能にする条件下で、E1/E2のいずれかのエピトープと反応する少なくとも1つのモノクローナル抗体と接触させる。このような条件は、好ましくは、生理学的な温度、pHおよびイオン強度下であり、そして、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)のような培地中で起こり得る。好ましくは、このエピトープとしては、e2コンフォメーションエピトープ、e2線形エピトープ、e2中和エピトープ、e1コンフォメーションエピトープ、e1線形エピトープ、またはe1中和エピトープが挙げられる。この中和エピトープは、線形またはコンフォメーションのいずれかであり得る。本発明の好ましい実施形態において、生物学的サンプルは、これらのエピトープと反応性の異なるモノクローナル抗体の組み合わせで接触される。モノクローナル抗体の組み合わせは、上記のエピトープの可能な組み合わせの全てを含み得る。上記のエピトープと反応性のモノクローナル抗体は、標準的な抗体産生技術を用いて当業者によって調製され得る。結合された生物学的サンプルとモノクローナル抗体との混合物は、好ましくは、約20分~約1時間、37℃でインキュベートされ、次いで、磁気供給源による保持と共に洗浄緩衝液で洗浄される。

20

30

【0034】

E1およびE2に対するモノクローナル抗体を調製するために、エンベロープ抗原が調製される。E1ドメイン(これは、ウイルスエンベロープタンパク質に対応すると考えられている)は、HCVポリタンパク質のアミノ酸192~383にわたると現在見積もられている(PCIT公開番号WO91/15771(これは、本明細書中にその全体が参考として援用される))。CHO系における発現(グリコシル化)の際、SDS-PAGEを介して決定されたように、35Kdのおおよその分子量を有すると考えられている。E2タンパク質(以前はNS1と呼ばれていた)は、ポリタンパク質のアミノ酸384~800にわたり、そしてまたエンベロープタンパク質であると考えられている。CHO系における発現(グリコシル化)の際、約72Kdの明らかなゲル分子量を有すると考えられている。これらのタンパク質の終点が近似である(例えば、E2のカルボキシ末端は、750~820アミノ酸領域のいずれかに存在し得る)ことが理解される。上記のPCIT出願において原型単離体のHCV1配列が、例示目的のためのみに引用され、そして任意のHCV単離体(例えば、「背景」の節に引用される参考文献を参照のこと)が、本発明の実施に対するE1配列および/またはE2配列の適切な供給源であることもまた、理解される。

40

【0035】

50

抗体産生を誘発するための本発明に使用される E 1 タンパク質および E 2 タンパク質は、全長ウイルスタンパク質、その実質的に全長のバージョン、またはその機能的フラグメント（例えば、コンフォメーションエピトープの形成または保持に必須である配列を欠いていないフラグメント）であり得る。本発明の H C V タンパク質は、目的のエピトープを提供する任意の簡便な方法によって作製され得る。例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞における組換え発現は、「ネイティブな」コンフォメーションで分泌グリコシル化 E 1 抗原および/または分泌グリコシル化 E 2 抗原を提供する、好ましい方法である。しかし、タンパク質に関して公知であるように、他の組換え宿主中で抗原を発現させることおよび回収後にタンパク質を還元することがまた、可能であり得る。化学合成がまた、「ネイティブな」抗原のコンフォメーション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 (m i m i t o p e) を提供し得ることもまた、理解される。

10

【 0 0 3 6 】

1 つより多くの E 1 モノマーまたは E 2 モノマーを含む E 1 および/または E 2 の複合体（凝集体とも呼ばれる）がまた、好ましい抗原である。E 1 : E 1 ダイマー、E 2 : E 2 ダイマー、および E 1 : E 2 ヘテロダイマーは、全て本発明の範囲内の抗原である。凝集体はまた、より大きな形態を含み得、そして、800 k D を超える分子量を有し得る。

【 0 0 3 7 】

H C V 抗原がアミノ酸の単一連続鎖（この鎖は、天然には生じない）の一部であるポリペプチドを含む融合ポリペプチドがまた、モノクローナル抗体を調製するために使用され得る。H C V 抗原は、ペプチド結合によって互いに直接結合され得るか、または介在アミノ酸配列によって分けられ得る。融合ポリペプチドはまた、H C V に対して外因性のアミノ酸配列を含み得る。

20

【 0 0 3 8 】

E 1 抗原および E 2 抗原を調製するための方法（ネイティブなコンフォメーションを用いる方法を含む）は、S p a e t e r、V i r o l o g y、1992、188、819 - 830、ならびに W O 9 2 / 0 8 7 3 4 および米国シリアル番号 0 7 / 7 5 8、880（これらは、本明細書中にその全体が参考として援用される）に記載される。一般的に、発現されるエンベロープタンパク質内のネイティブなコンフォメーションエピトープの形成を可能にする宿主細胞が選択され；これらの宿主細胞としては、例えば、動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞などが挙げられ得る。

30

【 0 0 3 9 】

発現に関して宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該分野で公知であり、そしてこれらとしては、A m e r i c a n t y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) から利用可能な多くの不死化細胞株（H e L a 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、新生児ハムスター腎臓 (B H K) 細胞、および多数の他の細胞株を含む）が挙げられる。哺乳動物細胞に適切なプロモーターはまた、当該分野で公知であり、そして、これらとしては、シミアンウイルス 4 0 (S V 4 0) (F i e r s , N a t u r e , 1978, 273, 113)、ラウス肉腫ウイルス (R S V)、アデノウイルス (A D V)、およびウシパピローマウイルス (B P V) のようなウイルスプロモーターが挙げられる。哺乳動物細胞はまた、終結配列およびポリ A 付加配列を必要とし得；発現を増強するエンハンサー配列がまた含まれ得、そして遺伝子の増幅をもたらす配列がまた、所望され得る。これらの配列は、当該分野で公知である。

40

【 0 0 4 0 】

哺乳動物細胞における複製に適切なベクターは、当該分野で公知であり、そしてこれらとしては、ウイルスレプリコン、または N A N B V エピトープをコードする適切な配列の宿主ゲノムへの組み込みを確実にする配列が挙げられ得る。

【 0 0 4 1 】

外来 D N A を発現するために使用されるベクター（そしてこれは、ワクチン調製において使用され得る）は、ワクシニアウイルスである。この場合、異種 D N A は、ワクシニアゲノムに挿入される。外来 D N A をワクシニアウイルスゲノムに挿入するための技術は、

50

当該分野で公知であり、そして、例えば、相同組換えを用いる。異種DNAの挿入は、一般的に、全く非必須でない遺伝子（例えば、チミジンキナーゼ遺伝子（tk））中へであり、これは、選択可能なマーカーもまた提供する。組換えウイルスの構築を非常に容易にするプラスミドベクターが、記載されている（例えば、Mackettら、*J. Virol.*、1984、49、857、Chakrabartiら、*Mol. Cell Biol.*、1985、5、3403；およびMoss、*GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS*、MillerおよびCalos編、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.、1987、10頁）。次いで、HCVポリペプチドの発現は、生きた組換えワクシニアウイルスで免疫された細胞または個体中で生じる。

10

【0042】

所望の配列をコードするHCV cDNAのセグメントは、ワクシニアベクターに挿入される。ポリペプチドコード化配列は、リーダー配列に結合され得る。リーダー配列は、組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）に対するもの、または別の供給源（例えば、-グロブリンに対するもの）であり得る。異種ポリヌクレオチドは、ワクシニアベクター（これは、クローニング部位を含むポリリンカー配列の付加に起因する、改変バージョンのpSC11である）中に挿入され得る。

【0043】

HCVポリペプチドがこのワクシニアベクターから発現されるか否かを検出するために、BSC 1細胞が、組換えベクターで感染され得、そして発現を可能にする条件下において顕微鏡スライド上で増殖され得る。次いで、この細胞は、アセトン固定され、そして、血清（組換え発現ベクター中のHCVセグメントが誘導されるHCVゲノムの領域にコードされるポリペプチドに対する抗HCV抗体を含むことが公知である）を用いて、免疫蛍光アッセイが実施され得る。

20

【0044】

E1およびE2の発現のための他の系としては、昆虫細胞およびこれらの細胞における使用に適したベクターが挙げられる。これらの系は、当該分野で公知であり、そしてこれには、例えば、バキュロウイルス *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) 由来の、昆虫発現移入ベクターが挙げられ、これは、ヘルパー独立、ウイルス発現ベクターである。この系由来の発現ベクターは、通常、異種遺伝子の発現を駆動するために、強力なウイルスのポリヘドリン遺伝子プロモーターを使用する。現在、外来遺伝子をAcNPVに導入するための最も一般的に使用される移入ベクターは、pAc373である。当業者に公知である多くの他のベクターがまた、改善された発現のために設計されている。これらには、例えば、pVL985（これは、ポリヘドリンの開始コドンにATGからATTに変更し、そしてこれは、このATTから32塩基対下流にBamHIクローニング部位を導入する；LuckowおよびSummers、*Virology*、1989、17、31を参照のこと）が挙げられる。融合されていない外来タンパク質の良好な発現は、通常、外来遺伝子（これは、ATG開始シグナルに先行する適切な翻訳開始シグナルを含む、短いリーダー配列を申し分なく有する）を必要とする。このプラスミドはまた、*E. coli*における選択および増殖のための、ポリヘドリンポリアデニル化シグナルおよびアンピシリン耐性（amp）遺伝子、および複製起点を含む。

30

40

【0045】

異種DNAをバキュロウイルス中の所望の部位に導入するための方法は、当該分野で公知である。（SummerおよびSmith、*Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* 第1555番；Jurá（1987）；Smithら、*Mol. & Cell Biol.*、1983、3、2156-2165；およびLuckowおよびSummers、*Virology*、1989、17、31を参照のこと）。例えば、挿入は、相同組換えによるポリヘドリン遺伝子のような遺伝子の中へであり得；挿入はまた、所望のバキュロウイルス遺伝子に操作された制限

50

酵素部位の中へであり得る。挿入された配列は、このポリタンパク質の全てもしくは種々のセグメントをコードする配列であり得るか、またはウイルスポリペプチドをコードする他のORFであり得る。翻訳後修飾（例えば、シグナルペプチド切断、タンパク質分解性切断、およびリン酸化）のためのシグナルは、昆虫細胞によって認識されるようである。分泌および核蓄積に必要とされるシグナルはまた、無脊椎動物細胞と脊椎動物細胞との間で保存されているようである。無脊椎動物細胞において有効な脊椎動物細胞由来のシグナル配列の例は、当該分野で公知であり、例えば、細胞の外への輸送のためのシグナルであるヒトインターロイキン2シグナル（IL2_s）は、昆虫細胞において認識され、そして適切に取り除かれる。

【0046】

例えば、上記のような方法によって、一旦E1タンパク質およびE2タンパク質が調製されると、コンフォメーションエピトープおよび線形エピトープに対するモノクローナル抗体が、標準的なモノクローナル抗体技術を用いて調製され得る。E1およびE2のコンフォメーションエピトープを指向するモノクローナル抗体は、インタクトなネイティブのE1タンパク質およびE2タンパク質を用いて調製される。E1およびE2の線形エピトープを指向するモノクローナル抗体は、変性されたE1タンパク質およびE2タンパク質を用いて調製される。コンフォメーションエピトープの存在または非存在は、抗体を用いたE1タンパク質およびE2タンパク質をスクリーニングすること、ならびにその反応性を、線形エピトープのみを、存在する場合、保持する抗原の変性バージョンの反応性と比較すること、を介して容易に決定され得る。ポリクローナル抗体を用いるこのようなスクリーニングにおいて、ポリクローナル血清をまず変性E1タンパク質もしくはE2タンパク質と吸着させ、そしてこのポリクローナル血清がE1タンパク質もしくはE2タンパク質に対する抗体を保持するか否かを確認することが、有利であり得る。好ましくは、このモノクローナル抗体調製物は、所望の抗体が、組成物中の総タンパク質成分のうち少なくとも35%を含む、組成物である。所望の抗体は、好ましくは、総タンパク質成分のうち、少なくとも40%、より好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、さらにより好ましくは少なくとも約70%、なおより好ましくは少なくとも約80%、さらにより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%を含む。この組成物は、本明細書中に使用される純度の割合の決定に影響を与えることなく、炭水化物、塩、脂質、溶媒などのような他の成分を含み得る。

【0047】

コンフォメーションエピトープに対する好ましいモノクローナル抗体としては、Bio-Chillieから入手可能な5E5/H7（HeLa細胞においてe1/e2のアミノ酸1~967から調製されたIgG1抗HCV e2）、2A3/B12（HeLa細胞においてe1/e2のアミノ酸1~967から調製された抗HCV e2）、5E9/D10（HeLa細胞においてe1/e2のアミノ酸1~967から調製された抗HCV e2）、3F5/H6（HeLa細胞においてe1/e2のアミノ酸1~967から調製された抗HCV e2）、および291/A2（CHO細胞においてe2のアミノ酸384~715から調製された抗HCV e2）、ならびにMimotopeから入手可能な、472.2.5（e2HVペプチドから調製された抗HCV e2）、ならびにBiocineから入手可能な6A1（CHO細胞においてe1/e2のアミノ酸1~967から調製されたIgG1抗HCV e2；MOLT4レセプターへの結合をブロックする）および6A21（IgG1；MOLT4レセプターに対する結合をブロックする）が挙げられるが、これらに限定されない。線形エピトープに対する好ましいモノクローナル抗体としては、Bio-Chillieから入手可能な、3D5/C3（HeLa細胞においてe1/e2のアミノ酸1~967から調製されたIgG1抗HCV e1）および3E5-1および3E5-2（昆虫細胞においてe2のアミノ酸404~661から調製されたIgG1抗HCV e2）が挙げられるが、これらに限定されない。さらなるモノクローナル抗体が、本明細書中に記載されるように当業者に周知の方法を用いて調製され得る。

10

20

30

40

50

【0048】

生物学的サンプル中のエンベロプタンパク質とモノクローナル抗体との間の免疫複合体の存在は、当業者に周知の任意の多数の手段を使用して検出される。例えば、検出可能に標識された二次抗体は、モノクローナル抗体と反応するサンプル混合物に添加され得る。好ましくは、モノクローナル抗肝炎エンベロプタンパク質抗体は、検出可能に標識される。その標識は、例えば、酵素分子、蛍光分子、化学発光分子、放射活性分子、または色素分子であり得る。免疫複合体からのシグナルを増幅するアッセイもまた公知であり、これらの例には、ビオチンおよびアビジンを使用するアッセイ、ならびに酵素標識および酵素媒介免疫アッセイ（例えば、ELISAアッセイ）が挙げられる。

【0049】

本発明の好ましい実施形態において、ビオチン-ストレプトアビジンは、免疫複合体を検出するために使用される。好ましくは、マウスモノクローナル抗体は、ビオチン標識される。DMAEに結合体化されたストレプトアビジンは、ビオチン標識したモノクローナル抗体を検出するために、生物学的サンプル混合物に添加される。本発明の他の好ましい実施形態において、検出システムの感度は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に結合体化したストレプトアビジンを添加し、そして引き続いてHRPに指向され、そしてDMAEに結合体化された二次抗体を添加することによって増大され得る。好ましい二次抗体は、DMAEに結合体化されたヤギ抗HRPである。他の適切な検出可能な標識は、当業者に公知であるように、DMAEと置換され得る。

【0050】

本発明の別の局面は、血液製剤を調製するために、血液または血液成分を使用する前に、C型肝炎ウイルスについてそのような血液成分または血液をスクリーニングするための方法に関する。本発明の好ましい実施形態において、その方法は、潜在的なドナーからの身体成分を、抗ヒト抗体および少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質抗体と、その抗体とその身体成分との間で、免疫学的反応が起こる条件下で反応させる工程と、抗体とC型肝炎ウイルスエンベロプタンパク質との間に形成された免疫複合体の存在を検出する工程とを包含する。好ましくは、そのドナーからの任意の血液または血液成分は、その複合体が検出されたら、捨てられる。血液または血液製剤をスクリーニングする方法は、本質的に、生物学的サンプル内で、HCVの存在を検出するための方法と同じである。

【0051】

HCV抗原に対して陽性の反応性の場合、擬陽性の可能性を減少させるためにその免疫アッセイを反復することが好ましい。例えば、血液製剤（例えば、輸血、血漿、第V因子、免疫グロブリンなど）の生産のための血液の大規模スクリーニングにおいて、「スクリーニング」試験は、代表的には、特異性の代償として、感度を増大させるようにフォーマットされる；すなわち、擬陽性率が増大する。したがって、「反復して反応性」である（すなわち、提供されたサンプルについての2回以上の免疫アッセイにおいて陽性である）ドナーのみをさらなる試験にゆだねることは典型的である。

【0052】

本発明はまた、HCVに感染した個体の処置をモニターするために、本明細書に記載されるHCV e1および/またはe2検出システムとの関連において、本発明の抗体を使用することに関する。HCVを有する個体は、例えば、従来の治療、すなわち、インターフェロン処置を受けることができる。このような個体は、処置の経過のある時点で、例えば、その個体の身体からのインターフェロンまたはその他の薬物のクリアランスのために、HCVの再発を経験することが予想される。当業者は、上記の方法によって個体においてHCV e1またはe2タンパク質の量をモニターし得、そしていつこのような再発が生じ得るかを、抗体検出に焦点を当てたHCVの検出のために現在利用可能な技術を使用して可能なよりも迅速に予測し得る。したがって、当業者は、薬物治療の第2ラウンドをより早い日程で開始し得る。

【0053】

本発明はまた、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルスを検出するためのキットに関する。このキットは、好ましくは、抗ヒト抗体、少なくとも1つのモノクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体、および抗体コントロール標準を含む。その他のキット成分、例えば、キットの成分の使用についての説明書もまた、含められ得る。好ましくは、キットは、必要に応じて、ポリクローナル抗C型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質抗体を含む。好ましくは、抗ヒト抗体は、固相に結合される。好ましいキットにおいて、モノクローナル抗体は、e2コンフォメーションエピトープ、e2線形エピトープ、e2中和エピトープ、e1コンフォメーションエピトープ、e1線形エピトープ、およびe1中和エピトープからなる群から選択されるエピトープと反応する。その他の好ましいキットは、e2コンフォメーションエピトープ、e2線形エピトープ、e2中和エピトープ、e1コンフォメーションエピトープ、e1線形エピトープ、e1中和エピトープ、またはこれらの組み合わせと反応する複数のモノクローナル抗体を含む。好ましくは、モノクローナル抗体は、上記のように検出可能に標識される。

10

【0054】

以下の実施例は、本発明を例示することを意図され、そして本発明をいかなる様式においても限定することを意図されない。

【実施例】

【0055】

(実施例1：PSC59ポリの構築)

E1およびE2の産生のために使用されるHCV配列を、プラスミドpC5P-1から、StuI部分/BglIIフラグメントとして単離した。このフラグメントは、HCV-1ポリタンパク質の第1のメチオニンから、966位のアスパラギン酸まで延びる。含まれるドメインには、ヌクレオカプシド、C、推定エンベロープ糖タンパク質であるE1およびE2の両方、ならびにNS2の短縮形態のそれぞれである。さらに、そのフラグメントはまた、HCVゲノムの5'非翻訳領域のその部分に対応する約60bpを含む。当業者はまた、所望のE1およびE2の部分を含むその他のフラグメントを調製し得る。

20

【0056】

そのフラグメントを、Klenowポリメラーゼで処理し、平滑末端を作製し、次いで、ワクシニアベクターPSC59(National Institutes of Health, Bethesda, MdのB. Moss博士から入手した)のStuI部位にクローニングした；しかし、他のベクターが使用され得る。そのベクターのポリリンカー配列への連結の結果として、NS2領域のC'末端は、更なるPro-Tyr配列を含む。

30

【0057】

(実施例2：E1およびE2を含むHCVポリタンパク質フラグメントをコードするワクシニアウイルスのストックの調製)

組換えワクシニアウイルスのスクリーニングは、本質的に、Mackettら、DNA Cloning, Vol. II (D. M. Glover 編, IRL Press, Oxford, England, 1985, 191-211頁)によって記載されるように行われた。より詳細には、アフリカミドリザル腎臓細胞であるBSC40のコンフルエントな単層(6cmのディッシュ)を、0.05の感染多重度(MOI)で野生型ワクシニアウイルス(WR株)に感染させた。37度で2時間インキュベートした後、その細胞を、リン酸カルシウム法を使用して、25μgのPSC59ポリDNAでトランスフェクトした。4時間のインキュベーションの後、その培地を正常な培地に変更し、そしてその細胞を、さらに48時間37度でインキュベートした。その細胞を、そのディッシュから掻き取ることによって回収し、そしてそのウイルスを、3サイクルの凍結解凍によって放出し、そして細胞溶解物中の放出されたウイルスを、-80度で保存した。

40

【0058】

組換えウイルスについてスクリーニングするために、ヒト143TK⁻細胞のコンフルエントな単層を、10倍連続希釈の細胞溶解物を使用して、2時間、感染させた。接種材

50

料を除去した後、 $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の5-プロモデオキシウリジンを含む血清培地中の1%アガロースを添加し、そしてその細胞を、72時間37°Cでインキュベートした。その細胞層を、1%のアガロース+0.01%中性レッドに重層することによってプラークを可視化し、そしてその細胞を37°Cで一晩インキュベートした。次いで、そのアガロース重層を、注意深く除去し、そしてその細胞層を、マスターニトロセルロースフィルター(S&S、BA85、 $0.45 \mu\text{m}$)でプロットした。マスターフィルターのレプリカプレートを作製し、そして ^{32}P 標識したハイブリダイゼーションプローブでHCV配列に対してプローブした。陽性プラークをマスターフィルターから単離し、 0.5ml の無血清培地中に置き、そして30秒間2回超音波処理した。スクリーニングプロセスを2回反復し、そのウイルスをプラーク精製した。

10

【0059】

組換えワクシニアウイルスを増殖させるために、BSC40細胞の10個のディッシュ(150cm^2)をウイルスストックに0.5のMOIで感染させた。その感染を、2時間37°Cで行い、そしてウイルスストックを新鮮な培地に配置した。72時間の後、その細胞を回収し、 10mM のTrisHCl(pH9.0)中で懸濁し、そしてWheaton dounce組織グライNDERにおいてホモジナイズした。細胞細片を遠心分離により除去し、その上清をトリプシン処理し、超音波処理し、そしてそのウイルス懸濁物のアリコートをして -80°C で保存した。

【0060】

(実施例3: E1/E2抗原の産生)

1リットルのHelas3スピナー細胞を、スピナーフラスコ中で、 1ml あたり 10^6 細胞の密度まで褐色であった。その細胞を、HCVポリタンパク質フラグメントをコードする組換えワクシニアウイルスで、1.0のMOIを使用して感染させ、一晩インキュベートし、回収し、そして細胞ペレットとして -80°C で保存した。

20

【0061】

E1/E2発現産物を、その細胞を、低浸透圧性の緩衝液中で溶解し、次いで非イオン性界面活性剤を含む緩衝液中で抽出することによって精製した。細胞抽出物を、レクチン(GNA)アガロースカラムを通してクロマトグラフィーにかけた。所望のタンパク質を、メチル-D-マンノピラノシド(Sigma Corp.)を使用してカラムから溶出した。その溶出した画分を、ウエスタンブロットによって、E1またはE2に対して惹起した特異的な抗血清を使用して、E1およびE2についてモニターした。抗原を含む画分をプールし、そしてS-セファロースカラム(Pharmacia)上で濃縮した。その最終産物の純度は、約70%であった。

30

【0062】

E1(130aa)およびE2(251aa)タンパク質もまた、酵母*S. cerevisiae*内の内部抗原として、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)とのC末端融合物として、Kuora, Science, 1989, 244, 362-364、およびCousensら、Gene, 1987, 61, 265-272(これらの各々が、本明細書において、その全体が参考として援用される)によって以前に記載された方法を使用して、発現され得る。細胞破壊および遠心分離の後、不溶性SOD融合ポリペプチドを細胞ペレットから5M尿素または1%SDSのいずれかを使用して抽出し、そしてゲル濾過、またはイオン交換クロマトグラフィー(Q-およびS-sepharose)とゲル濾過クロマトグラフィー(Sephacryl S-300HR)との組み合わせのいずれかを使用して精製した。

40

【0063】

HCVのネイティブなE1およびE2抗原もまた、全長HCV E1およびE2遺伝子を含む組換えワクシニアウイルス(rvv)感染細胞の小胞体から精製され得る。精製を、アフィニティークロマトグラフィー、続いて、例えば、W092/08734および米国特許出願番号07/758,880(これらの各々が、本明細書中で参考としてその全体が援用される)において記載される非変性条件下でのイオン交換クロマトグラフィー

50

ーによって達成され得る。

【0064】

ネイティブなHCV E2抗原、CHO-e2はまた、本質的に、Spaeteら、Virology、1992、188、819-830（これは、その全体が本明細書中で参考として援用される）に従って、調製され得る。より詳細には、CHO-e2抗原を産生する哺乳動物CHO細胞株は、Ala383からGlu661をコードするHCV-1配列を含有するプラスミドから構築される。次いで、そのプラスミドは、CHO細胞中にトランスフェクトされ、全長e2（e2/ns1とも呼ばれる）抗原を発現する安定な株を生成する。高発現を示すクローンを選択し、そして10%透析化ウシ胎仔血清およびその通常の補充物+1.6μMのメトトレキサートを有するDME/H21中での増殖によってローラーボトル中で拡大した。その培養培地補充物を回収し、そしてCHO-e2抗原の精製のために使用した。その精製スキームには、非変性条件下でのアフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーが含まれる。

10

【0065】

ネイティブなe2推定コンフォメーションエピトープを妨害するために、変性CHO-e2をDL-ジチオスレイトール（DTT）を最終濃度10mM、0.2%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）にまで添加し、100で5分間ボイルすることによって調製した。全ての精製した組換えHCV抗原は、SDSポリアクリルアミドゲル分析およびクマシーブルーでの染色によって、少なくとも90%純粋である。

【0066】

20

（実施例4：組換えCHO-e2抗原についての検出アッセイ）

好ましい検出アッセイの感度を、組換えCHO-e2抗原を使用して測定した。簡単には、ポリクローナルチンパンジー抗HCV e1/e2抗体/マウス抗ヒトIgG/PM P複合体を、上記のようにCHO細胞中で産生した組換えHCV e2と接触させた。複数のモノクローナル抗体抗HCVエンベロプタンパク質抗体（291/A2、抗e2コンフォメーション；1G2A7、抗e2中和および3E5-2、抗e2線形）をアッセイあたり100ngで、その複合体と接触させた。そのモノクローナル抗体を、ビオチンで標識し、そしてストレプトアビジンシステムを使用して結合を測定した。代表的な結果を、表1に示す。このデータは、そのアッセイがCHO e2抗原を1.95ng/ml程度の低い濃度で検出し得ることを示す。

30

【0067】

【表 1】

表 1

ng/ml CHO e2	s (RLU)	s/n
500	1,048,879	374.2
250	528,574	188.6
125	298,991	106.7
62.5	147,963	52.8
31.3	80,558	28.8
15.6	43,166	15.4
7.81	23,254	8.3
3.91	14,060	5.0
1.95	8,870	3.2
0	2,803	1

10

20

s / n は、平均陰性値 (0 ng / ml の e 2 での s) で割った相対的光単位 (R L U) での感度である。

【 0 0 6 8 】

(実施例 5 : 臨床的生物学的サンプルでの H C V についての検出アッセイ)

H C V e 2 を検出する好ましい検出アッセイは、抗 H C V 抗体を検出する検出アッセイと比較された。生物学的サンプル (連続採血) を二人の患者から、いくつかの時点で (例えば、 4 / 1 7 (I - 1) 、 5 / 1 0 (I - 2) 、 5 / 2 4 (I - 3) 、 5 / 2 4 (I - 3) 、 6 / 8 (I - 4) 、 6 / 2 8 (I - 5) 、 7 / 1 9 (I - 6) 、 および 1 2 / 2 8 (I - 7) において)、得た。患者 I は、セロコンバージョンしていない個体であった。患者 Y は、すでにセロコンバージョンしていた。各サンプルを、H C V e 2 タンパク質 (タンパク質アッセイ) の存在について、または抗 H C V 抗体 (抗体アッセイ) の存在について、試験した。抗体アッセイについて、固相に結合させた C H O e 2 タンパク質を使用して、生物学的サンプル中に存在するヒト抗 H C V 抗体を捕捉した。ビオチン標識したモノクローナル抗ヒト I g G / ストレプトアビジンシステムを使用して、ヒト抗 H C V 抗体の存在を検出した。タンパク質アッセイのために、上記のように、ポリクローナル抗 e 1 e 2 抗体に結合させた抗ヒト I g G に結合させた固相を、生物学的サンプルに接触させた。そのシステムは遊離の H C V 抗原ならびに H C V 抗原 / ヒト I g 免疫複合体を検出し得る。ビオチン標識した抗 e 2 抗体 (例えば、 3 E 5 - 2 および 2 9 1 / A 2 の組み合わせ) を、ストレプトアビジンとともに、H C V e 2 タンパク質の存在を検出するために使用した。代表的な結果を、表 2 (抗体アッセイ) 、表 3 (タンパク質アッセイ) 、および表 4 (標準コントロール) に示す。

30

40

【 0 0 6 9 】

【表 2】

(表 2 抗体下位)

抗体/サロニル	s (RLU)	s/n
I-1	3865	1.29
I-2	4666	1.56
I-3	6884	2.29
I-4	5159	1.72
I-5	4297	1.43
I-6	8131	2.71
I-7	19589	6.53
Y-1	10842	3.61
Y-2	32094	10.7
Y-3	84715	28.24
Y-4	93047	31.02
Y-5	97343	32.45
Y-6	75029	25.01
Y-7	77524	25.84

10

20

【 0 0 7 0 】

【表 3】

(表 3 サロニル抗体下位)

抗体/サロニル	s (RLU)	s/n
I-1	3619	1.17
I-2	2926	0.95
I-3	3111	1.01
I-4	2372	0.77
I-5	2710	0.88
I-6	108647	35.1
I-7	7962	2.57
Y-1	3265	1.05
Y-2	3758	1.21
Y-3	3496	1.13
Y-4	3080	1.00
Y-5	3034	0.98
Y-6	3496	1.13
Y-7	4805	1.55

30

40

【 0 0 7 1 】

50

【表 4】

(表4 標準コントロール)

CHO e2 (ng/ml)	s (RLU)	s/n
500	729082	235.6
250	354724	114.6
125	179610	58.0
62.5	102241	33.0
31.3	55640	18.0
15.6	30246	9.8
7.81	17125	5.5
3.91	10872	3.5
1.95	7623	2.5
0	3095	1.0
SAC	40471	13.1
NHS	5960	1.9

10

20

s / n は、平均陰性値 (e 2 の 0 n g / m l での s) で割った相対的光単位 (R L U) における感度 (s) である。

S A C は、H C V に感染したことが知られている患者由来の生物学的サンプルであり、陽性コントロールとして機能する。

N H S は、正常ヒト血清であり、陰性コントロールとして機能する。

【 0 0 7 2 】

表 2 および 3 からわかるように、上記の H C V エンベロープタンパク質検出システムを使用する当業者は、H C V e 2 タンパク質を、ヒト抗 H C V 抗体 (採血 7) の検出よりも早期に (採血 6) 検出し得る。

【 0 0 7 3 】

図 2 は、上記の患者 I についての処置レジメンを表すグラフである。血液サンプルをまた、A S T および A L T (肝臓の損傷の存在を示す肝臓酵素) の存在を検出するために採取した。生物学的サンプル (採血) を、H C V タンパク質 (破線) およびヒト抗 H C V 抗体 (実線) の存在について検査した。図 2 にまた示されているのは、インターフェロンおよびインターフェロンでの処置のタイミングである。御覧のように、肝臓の損傷が A S T および A L T のレベルをモニターすることによって検出されるとすぐに、患者は、インターフェロン (3 0 0 I U を 1 日 2 回) を示される期間受けた。しかし、その患者が、もはやインターフェロン処置を受けない場合、A L T および A S T のレベルの上昇の存在、ならびに H C V エンベロープタンパク質の検出の劇的な増大により示されるように H C V の再感染が起こった。対照的に、ヒト抗 H C V 抗体のレベルの増大は劇的に遅れた。H C V エンベロープタンパク質の検出に際して、その患者は、即座にインターフェロンで処置され、これにより、H C V 感染が鎮静した。したがって、図 2 に示される結果は、H C V エンベロープタンパク質の検出が、生物学的中のヒト抗 H C V 抗体の検出に対して劇的に改善し、そしてまた従来 H C V 処置をモニターする検出システムの衝撃を示す。

30

40

【 0 0 7 4 】

(実施例 6 : 免疫複合体 H C V についての検出アッセイ)

本明細書に記載される検出システムはまた、免疫複合体化 H C V エンベロープ抗原を検出するために使用され得る。好ましい検出アッセイを、いくつかの生物学的サンプル中の種々の量の免疫複合体化 H C V エンベロープ抗原の量を検出するために行った。生物学的

50

サンプルには、I - 6（実施例 5 から；免疫複合体なし）、SAC（実施例 5 から；軽い程度の免疫複合体）、Y - 7（実施例 5 から；中程度の免疫複合体）、およびJP（高セロコンバージョンの患者由来のサンプル；重程度の免疫複合体）が含まれていた。各サンプルを、上記実施例 5 のように HCV e 2 タンパク質（タンパク質アッセイ）の存在について、または上記実施例 5 に記載のように抗 HCV 抗体（抗体アッセイ）の存在について検査した。代表的な結果を表 5 に示す。

【 0 0 7 5 】

【表 5】

表 5

10

生化学的検出	抗体アッセイ		タンパク質アッセイ	
	s (RLU)	s/n	s (RLU)	s/n
I-6	8131	2.78	108647	51.8
SAC	19000	6.49	40471	19.3
Y-7	73524	25.13	8963	4.3
JP	108770	37.17	1817	0.9

20

s / n は、平均陰性値（e 2 の 0 ng / ml での s）で割った相対的光単位（RLU）における感度（s）である。

【 0 0 7 6 】

（実施例 7：HCV エンベロープタンパク質についての増幅検出アッセイ）

本明細書に記載したその検出システムのアッセイ感度は、シグナルの増幅を、現在のアッセイフォーマットに適用することによって増幅され得る。例えば、超常磁性ラテックス粒子（Estapor）に結合させた HCV e 2 タンパク質（5 E 5 / H & 吸収された）に対するマウスモノクローナル抗体は、種々の量の CHO e 2 タンパク質を捕捉するために使用された。HCV e 1 e 2 に対するビオチン標識ポリクローナル抗体を使用して、CHO e 2 タンパク質を検出した。ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ（hrp）複合体を使用して、HCV e 1 e 2 に対するビオチン標識ポリクローナル抗体に結合させた。さらに、DMAE 結合体化抗 hrp 抗体（種々の動物由来）を使用して、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ（hrp）複合体を検出し、斯くしてシグナルを増幅した。代表的な結果を表 6 に示す。

30

【 0 0 7 7 】

【表 6】

表 6

CHO e2 (ng/ml)	ヤギ抗 -hrp		ウサギ抗 -hrp		マウス抗 -hrp		ラット抗 -hrp	
	s (RLU)	s/n	s (RLU)	s/n	s (RLU)	s/n	s (RLU)	s/n
500	766335	178.34	259952	116.41	3650	1.90	164487	52.87
250	415785	96.76	165889	74.29	4204	2.18	117810	37.87
125	317810	73.96	122430	54.83	3496	1.82	54162	17.41
62.5	127774	29.74	57242	25.63	1956	1.02	39747	12.78
31.3	70825	16.48	37961	17.00	2510	1.30	24224	7.79
15.6	48833	11.36	15169	6.79	2079	1.08	10657	3.43
7.81	24532	5.71	9317	4.17	3819	1.98	9440	3.03
3.91	8177	1.90	6699	3.00	3557	1.85	5606	1.80
1.95	5652	1.32	4481	2.01	3450	1.79	5159	1.66
0	4297	1.00	2233	1.00	1925	1.00	3111	1.00

10

20

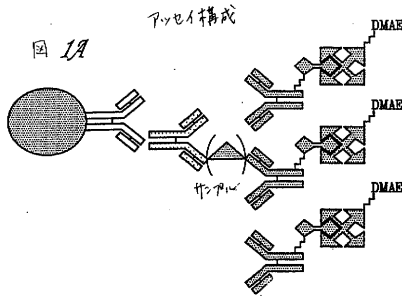
s / n は、平均陰性値 (e 2 の 0 n g / m l での s) で割った相対的光単位 (R L U) に
おける感度である。

【 0 0 7 8 】

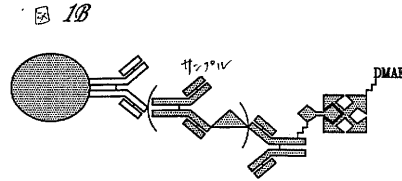
その感度は、磁性ラテックス粒子 (M L P) の代わりに常磁性粒子 (P M P) を、およ
びより高親和性の抗 h r p 二次抗体結合体 (D M A E) を使用することによってさらに増
大され得る。

30

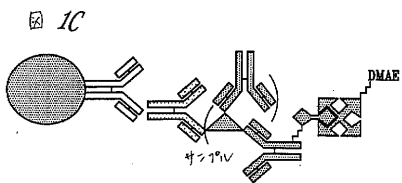
【図1A】



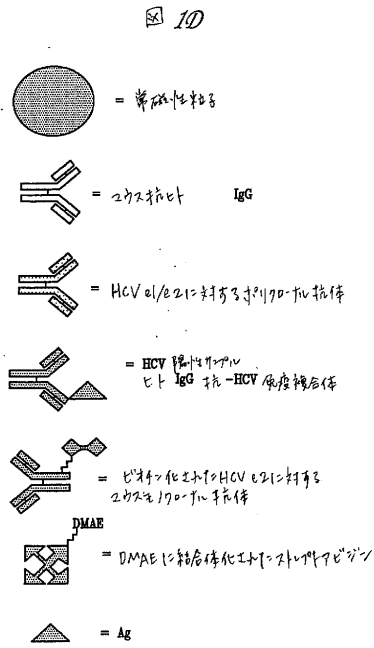
【図1B】



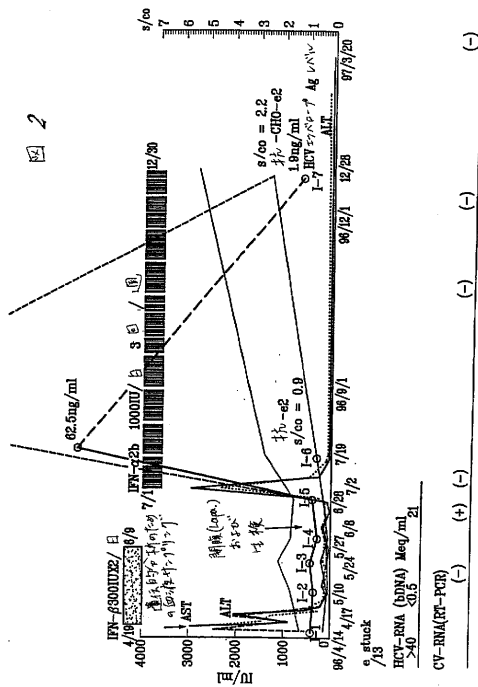
【図1C】



【図1D】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 デイビッド ワイ . チエン

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

(72)発明者 フィリップ アーカンジェル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94704, バークレイ, リージェント ストリート 2
541, アpartment 303

专利名称(译)	丙型肝炎病毒抗原免疫检测系统		
公开(公告)号	JP2010048830A	公开(公告)日	2010-03-04
申请号	JP2009275000	申请日	2009-12-02
[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	デイビッドワイチエン フィリップアーカンジェル		
发明人	デイビッドワイ.チエン フィリップアーカンジェル		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/53 A61K35/14 A61P7/00 A61P31/20 G01N33/576		
CPC分类号	A61P7/00 A61P31/20 G01N33/5767 G01N2333/18 G01N2469/10		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/577.B G01N33/543.501.A G01N33/543.541.A		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/146079 1999-07-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为检测生物样品中的HCV提供显著改进。用于检测丙型肝炎病毒蛋白和丙型肝炎病毒蛋白之间的免疫复合物和生物样品中的抗体的免疫测定法，用于筛选丙型肝炎病毒的血液制品的方法，并且提供了用于其的套件。检测丙型肝炎病毒的方法包括以下步骤：使生物样品与抗人抗体和至少一种单克隆抗丙型肝炎病毒包膜蛋白抗体接触，并免疫复合抗体和包膜蛋白检测身体的存在。背景技术

