

(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2004-4075

(P2004-4075A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/576	GO 1 N 33/576 Z N A Z	4 B O 2 4
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 N	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-136377 (P2003-136377)	(71) 出願人	591215177
(22) 出願日	平成15年5月14日 (2003.5.14)		ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムペーハー
(62) 分割の表示	特願2001-127276 (P2001-127276) の分割		ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム、サントホファーシュトラッセ 116
原出願日	平成7年8月14日 (1995.8.14)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	P 44 28 705:		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成6年8月12日 (1994.8.12)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 石井 貞次
(特許庁注: 以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100099128
フロッピー			弁理士 早川 康
		(72) 発明者	クリストフ サイデル
			ドイツ連邦共和国 ディー-82362
			ヴァイルハイム、アメルシュトラッセ 3
			9番地
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルスのNS3領域からの組換え抗原

## (57) 【要約】

【課題】 試料液中のC型肝炎ウイルスに対する抗体の免疫学的測定法ならびにHCVセロコンバージョンの早期認識のための方法の提供。

【解決手段】 少なくとも1個のシステイン残基を含み、かつシステイン残基が共有結合的に修飾されているかあるいは他のアミノ酸で置換されている、C型肝炎ウイルスのNS3領域からの配列領域を含む少なくとも1個のポリペプチドとともに試料液をインキュベートして、抗体のポリペプチドへの結合を還元状態で検出する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料液が C 型肝炎ウイルスからの配列領域、特に C 型肝炎ウイルスの NS 3 領域からの配列領域を含む少なくとも 1 個のポリペプチドとともにインキュベートされ、そして抗体が該ポリペプチドへの結合により検出される、試料液中の C 型肝炎ウイルスに対する抗体の免疫学的測定方法において、ポリペプチドが少なくとも 1 個のシステイン残基を含む領域から使用され、そして ( a ) 抗体の測定は還元状態で実施され、( b ) 1 又は数個のシステイン残基は共有結合的に修飾され又は / 及び ( c ) 1 又は数個のシステイン残基が他のアミノ酸で置換されている方法。

## 【請求項 2】

H C V に対する抗体が測定される、H C V セロコンバージョンの早期認識のための方法であって、該 H C V に特異的な抗体と免疫学的に反応性である、NS 3 領域に由来する少なくとも 1 つの H C V ポリペプチドと被検体から採取した試料をインキュベートし、還元状態で該抗体の該ポリペプチドへの結合を測定して、該検体中のセロコンバージョンを認識することを含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、C 型肝炎ウイルス ( H C V ) の非構造タンパク質 3 ( NS 3 ) 領域からのポリペプチド、かかるペプチドをコードする核酸並びに免疫学的試験方法における抗原として又はヘリカーゼタンパク質としてのこのポリペプチドの使用に関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

非 A 非 B 肝炎といわれる病気は、多くの場合 C 型肝炎ウイルス ( H C V ) により引き起こされる。H C V はそのゲノムが約 9 から 10 , 000 個の塩基から成る一本鎖被包性の ( e n c a p s u l a t e d ) R N A ウイルスである。このゲノムは、構造タンパク質 ( コア及びエンベロープタンパク質 ) 並びに非構造タンパク質をコードする。H C V の非構造タンパク質 3 ( NS 3 ) 領域は、プロテアーゼ及びヘリカーゼを含む。プロテアーゼ活性は、NS 3 領域の第三アミノ末端 ( a m i n o t e r m i n a l t h i r d ) に存在する。

## 【0003】

H C V の部分ヌクレオチド配列はヨーロッパ特許出願第 3 1 8 2 1 6 号明細書に開示されている。この出願はのための H C V からの核酸フラグメント又はポリペプチドフラグメントの診断試験及び治療処置への使用を特許請求している。

## 【0004】

ヨーロッパ特許出願第 4 5 0 9 3 1 号明細書は、H C V の完全なヌクレオチド及びアミノ酸配列を開示している。さらに、C ドメインからの第 1 の H C V 抗原及び非構造ドメイン NS 3 , NS 4 又は NS 5 及びエンベロープドメイン S の 1 つからの少なくとも 1 個の他の H C V 抗原を含む合成 H C V 抗原の組み合わせが記載されている。ドメイン NS 3 からの好適な抗原は、ヨーロッパ特許出願第 4 5 0 9 3 1 号明細書の第 1 図に示される H C V ゲノムのアミノ酸 1 1 9 2 から 1 4 5 7 を含む C 3 3 といわれる抗原である。

## 【0005】

国際特許出願第 W O 9 2 / 1 1 3 7 0 号は、H C V ゲノムからの種々のポリペプチドのクローニング及び配列決定並びに試験キットにおける外来タンパク質部分のないこれらのポリペプチドの使用及びワクチンとしてのこれらのポリペプチドの使用に関する。寄託番号 6 8 4 7 で “ ドイツェ ザムルング フューア ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルツレーン G m b H , マッシュェルオーデル ベーク 1 b , 3 8 1 2 4 ブラウンシュバイク , B R D ( D S M ) ” に、この出願に関連して寄託されたクローン NS - 3 は、H C V の NS 3 領域からの 5 2 7 個のアミノ酸のポリペプチドに関する遺伝子情報を含んでいる。

10

20

30

40

50

## 【0006】

森らは(日本, J. Cancer Res. 83 (1992), 264-268)、抗原としてウイルスタンパク質を使用して血中におけるウイルス抗体を検出することによるHCV感染の診断学的検出を記載している。これらのHCVタンパク質は、-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として大腸菌内で発現される。HCVゲノムの第1295番目から1541番目のアミノ酸を含むNS3領域からのタンパク質は、高い感受性を示した。しかしながら、この融合タンパク質の欠点は、融合タンパク質部分との交差反応が生じ、これが試験反応の特異性を減少させることである。

## 【0007】

血中におけるHCV試験は、試験における高度の特異性及び感受性を必要とする。さらに、試験で使用される抗原は高収率で発現可能であり、かつ安定でなければならない。HCVゲノムからの既知の抗原は、上述の要件の1つ又は幾つかを満足しないという欠点を有する。

10

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

このため、本発明の目的は、上記の公知技術の欠点が少なくとも部分的に除かれ、特に既知の抗原に比較して、一層高い特異性及び感受性を有し、高収率で発現可能でありかつ安定である、HCVゲノムからのポリペプチドを提供することである。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

この目的は、C型肝炎ウイルスのアミノ酸1207±10から1488±10から成り、20未満の、好ましくは15未満の外来アミノ酸を有するポリペプチドにより達成される。本発明のポリペプチドは、ヨーロッパ特許出願(E P - A)第450 931号明細書の第1図で言及されている番号付与において、好適には1207±5から1488±5、特に好適には1207±2から、1488±2、そして最も好適には1207から1488のC型肝炎ウイルスのアミノ酸を含有する。

20

## 【0010】

## 【発明の実施の形態】

本発明のポリペプチドは、任意のHCV単離物、例えばヨーロッパ特許出願第450 931号明細書に記載されているようなヌクレオチド配列を有するHCV単離物に由来することができる。しかしながら、好適にはポリペプチドは、寄託番号DSM 6847で“ドイッチェ ザムルング フォン ミクロオルガニズメン ウントツェルクルツレーン GmbH”(DSM), マッセルオーデル ベーク 1b, 38124 ブラウンシュバイクに寄託され国際出願WO92/11370にクローンNS3と記載されているHCV単離物に由来する。本発明のポリペプチドは、特に好ましくは、ベクターpUC-D26の組換え発現により得ることができる。

30

## 【0011】

配列番号1は本発明のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。アミノ酸1~13は外来アミノ酸である。アミノ酸14~295はHCV起源である。本発明のポリペプチドは、特に好ましくは配列番号1及び2に示されているアミノ酸配列のアミノ酸14~295又は少なくとも90%がこれに相同であるアミノ酸配列を含む。

40

## 【0012】

本発明は、また、少なくとも1個のマーカース基を含む先に定義したポリペプチドに関する。試験システムで検出できるすべての既知のマーカース基、例えば直接又は間接的に検出するマーカース基が、マーカース基として考慮される。これに関連して、直接に検出するマーカース基とは、直接に検出する信号、即ち放射性基、酵素基、発光基、金属複合体等を生成する基として理解される。一方、マーカース基は、順番に信号発生基を有する適当な結合パートナー(ストレプトアビジン、アビジン又は抗-ハプテン抗体)と反応して検出する、間接的に検出できる基、例えばビオチン又はハプテン基であってもよい。マーカース基は、既知の態様で例えば二官能性スペーサーにより抗原に結合できる。マーカース基をペ

50

プチド抗原に結合させるためのかかる方法は、免疫学の領域における当業者に知られており、ここで詳細に記載する必要はない。

【0013】

本発明のポリペプチドは好ましくは1から12、特に好ましくは3から7個のマーカース基を有する。

【0014】

加えて、本発明はシステイン残基から派生する1又は数個のスルフヒドリル基が共有結合的に修飾された形態で存在する上述のポリペプチドに関する。適当な共有結合的に修飾する基の例は、マレイミドジオキサオクチルアミン(MADDO)、N-メチル-マレイニミド(NMM)、ヨード酢酸及びヨードアセトアミドである。共有結合のシステイン修飾は、特に高度に特異的な免疫反応性を生ずる。

10

【0015】

直接的に又は間接的に検出可能なマーカース基は、特に好適にはポリペプチドのスルフヒドリル基に共有結合している。スルフヒドリル基にカップリングするためのSH-反応性二官能性リンカーの例は、マレイミドプロピルアミン(MP)、マレイミドエチルアミン(MEA)及びマレイミドジオキサオクチルアミン(MADDO)である。

【0016】

さらに、一又は数個のシステイン残基が他の天然の又は人工のアミノ酸で置換された本発明のポリペプチドを使用することが好ましいかもしれない。システイン残基は好適には構造的に類縁の-アミノ酸、例えばセリン又は-アミノ酪酸により置換される。システイン置換は特に高い安定性をもたらす。

20

【0017】

本発明のポリペプチドは、既知のポリペプチドに対して驚くべき利点を有する。ヨーロッパ特許出願第450931号明細書に記載されているHCV配列のアミノ酸残基1192から1457を含む抗原C33と比較して、本発明のポリペプチドは実質的に一層高い特異性を示し、ネガティブ血清において誤ったポジティブは、統計的に有意な一層低い値を示す。国際出願第W092/11370号に記載されているHCV配列のアミノ酸第1007から1534番の領域を含む抗原NS3に比べると、本発明のポリペプチドは試験状態においてかなり高い安定性を有する。HCVのNS3領域からのアミノ酸1227から1528を有するポリペプチドと比較して、本発明のポリペプチドは改善された発現効率及び一層高い感受性という利点を有している。これらの利点の故に、本発明のポリペプチドはNS3領域からの全ての既知のHCV抗原よりも実質的にすぐれている。

30

【0018】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸に関する。かかる核酸の好適な例は、ベクターpUC-D26に外来性DNAを挿入したものである。

【0019】

配列番号1は、また、配列番号1及び2のポリペプチドをコードする本発明の核酸のヌクレオチド配列を示す。ヌクレオチド40~885は、HCVに由来するポリペプチドの領域をコードする。本発明の核酸は好適には(a)配列番号1で示されるヌクレオチド配列のヌクレオチド40-885又は(b)遺伝子コードの縮重の範囲内の(a)の配列に相当するヌクレオチド配列を含む。

40

【0020】

本発明は、また、本発明の核酸の少なくとも1個のコピーを含むベクターに関する。本発明のベクターは、好適には原核ベクター、即ち、原核宿主細胞内での増殖に適当なベクターである。かかるベクターの例は、サムブルックらの“モリキュラー クローニング・ラボラトリー マニュアル、第2版、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー プレス(1989)”、殊にその第1~4章及び17章に示されている。本発明のベクターは特に好適には環状プラスミドである。本発明の核酸は、好適には本発明のポリペプチドの発現を可能とするプロモーター配列の制御下にあるベクター上に存在する。本発明のベクターの好適な例は、pUC-D26である。

50

## 【0021】

さらに本発明は、少なくとも1個の本発明の核酸のコピー又は本発明のベクターで形質転換された細胞に関する。この細胞は好適には原核細胞、特に好適にはグラム-陰性の原核細胞、そして最も好適には大腸菌細胞である。

## 【0022】

本発明のポリペプチドは、好ましくは免疫学的試験方法における抗原として使用される。一方、ポリペプチドはまた、しかしながら、ヘリカーゼタンパク質として、さらに、そのすぐれた抗原作用のゆえにHCV感染に対するワクチン製造のために使用できる。

## 【0023】

本発明は、さらに試料液中のC型肝炎ウイルスに対する抗体を免疫学的に決定する方法に関し、この方法は、試料液を少なくとも一種の本発明のポリペプチドとインキュベートし、上記抗体をポリペプチドへの結合を介して検出することによって特徴づけられる。この検出方法は、いずれかの既知の試験方式を使用して、例えば単一の反応相を有する均一のイムノアッセイ又は1以上の反応相を有する不均一イムノアッセイで実施され得る。不均一試験方式は、好適には抗体の存在が反応性固相の存在時に検出される場合に使用される。

10

## 【0024】

この試験方式の1つの態様は、いわゆる二重抗原架橋試験概念である。この方法において、試料液は本発明の少なくとも2個のポリペプチド P1 及び P2 とともにインキュベートされ、その際、ポリペプチド P1 は (a) 固相に結合するか又は (b) 固相に結合しうる形態で存在し、ポリペプチド P2 はマーカ-基を保持する。試料液中の抗体は、固定された複合体、即ち、固相に結合している複合体により、固相又は / 及び液相において、好適には固相において標識を測定することにより検出される。

20

## 【0025】

この試験方法では、好適には、試料液を精製標識抗原 P2 及び精製固相抗原 P1 と混合して標識抗原、抗体及び固相-結合抗原より成る標識された不動化複合体を得る。抗体を検出するための他の試験方式と比較して、架橋試験方式は、IgMのような付加的な免疫グロブリンのクラスが検出されること、及び特異性の改善、即ち、抗-IgG 複合体との非特異的反応性が減少して、その感受性が改善される。

## 【0026】

標識抗原 P2 は、前述のように直接的に又は間接的に検出可能なマーカ-基を有する。固相抗原 P1 は、例えば二官能性のスパーサーを介して固体相に直接結合しうる。しかしながら、P1 は好適には、本発明のポリペプチドの及び特異的結合システムの反応パートナーの固相中に存在する複合体である。特異的結合システムの他の反応パートナーは、固相に結合して存在する。かかる特異的結合システムの例は、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、ビオチン/アンチビオチン、ハプテン/アンチハプテン、多糖体/レクチン及び抗体又は抗体フラグメント及びこの抗体又は抗体フラグメントに対する抗体である。抗体 P1 は好適にはビオチン複合体の形態にある。

30

## 【0027】

かかる二重抗原架橋試験において、本発明のポリペプチド抗原は、ブランクにおける増大及び抗原の集合による望ましくない信号/ノイズ比を回避するために可溶形態で使用される。この目的のために、抗原は適当な発現システム内で可溶性形態ですでに発現されているか、又は可溶性形態での発現の後で、既知の方法でインビトロにて再生される。さらに、共有結合で架橋結合された分子の凝集物の形成を回避するために、免疫試験は穏和な還元状態〔穏和な還元試薬、好適にはスルフヒドリル試薬、好ましくはDTT(ジチオスレイトール)又はDTE(ジチオ-エリスリトール)を1ミリモル/lから25ミリモル/lの濃度範囲で添加する〕で実施することができ又は / 及び好適には共有結合で修飾されたスルフヒドリル基を有する抗原又は / 及び少なくとも部分的に置換されたシステイン残基を有する抗原が使用される。

40

## 【0028】

50

本発明のポリペプチド抗原は、ブランクにおける増大及び抗原の凝集による好ましくない信号/ノイズ比を回避するために、二重抗原架橋試験のように可溶性形態で使用される。架橋試験方式の詳細は、ヨーロッパ特許出願第280 211号明細書に記載されている。本明細書では、この開示を参考とする。本発明のポリペプチドは、しかしながら、他の試験方式でも使用しうる。この例は、固定された特異抗原に結合させて特異的イノムグロブリンを認識すること及び第2の抗体との結合体を介して間接的に検出することによる間接イムノアッセイである。本発明の方法のこの態様において、試料液は(a)固体相に結合している又は(b)固相に結合することのできる形態で存在しているポリペプチドP1とともにマーカ-基を有するP1に対しての他の抗体とともにインキュベートされる。測定される抗体は固相中で又は/及び液相中で、好適には固相中で標識を測定することにより、間接的に検出される。この方法においては、標識された抗体と固相に結合された抗原の固定された複合体により固相上で生成される信号は、試料液中で測定されるべき抗体の濃度に間接的に比例する。

10

**【0029】**

本発明は、さらに、少なくとも1つの本発明のポリペプチドを含むC型肝炎ウイルスに対して向けられた抗体を免疫的に測定するための試薬に関する。試薬が二重抗原架橋試験で使用される場合は、試薬は好適には少なくとも2個のポリペプチドP1及びP2を含んでおり、ここでポリペプチドP1は(a)固体相に結合しているか又は(b)固相に結合可能な形態で存在するものであり、ポリペプチドP2はマーカ-基を有する。ポリペプチドP1の固相への結合は、直接結合により又は特異的な結合対手段、好ましくはストレプトアビジン/アビジン及びビオチンのいずれかにより達成できる。ポリペプチドP1は、特に好ましくはビオチン結合形態で存在する。

20

**【0030】**

もし間接的免疫試験において使用される場合には、本発明の試薬は好ましくは(a)固相に結合した又は(b)固相に結合しうる形態で存在するポリペプチドP1とマーカ-基を有するP1に対しての抗体を含む。本発明のポリペプチドに対する抗体の製造は、既知の方法、即ち、実験動物を相応の抗体で免疫させ、この実験動物からポリクローナル抗血清を分離することにより実施される。代わりに、抗原に対するモノクローナル抗体は、ケラー及びミルスタインの方法又はこの方法の改良法により製造することができる。抗体フラグメント又は抗体誘導体は、また、完全抗体に代えて使用できる。

30

**【0031】**

本発明のポリペプチドの応用の他の領域は、ワクチンの製造である。このために、本発明のポリペプチドは好適には精製された形態で製造され、次いでポリペプチド溶液又は懸濁液のいずれかであってもよい注射可能な液体の形態とされる。ポリペプチドはまた、リポゾーム内にとり込ませることもできる。これらのワクチンの他の構成成分は、例えば水、塩溶液、グルコース又はグリセロールである。加えて、このワクチンは乳化剤、緩衝物質のような少量の補助物質、及び所望により免疫応答を増大するアジュバントを含む。ワクチンは通常、注射、好ましくは皮下投与又は筋肉内投与により、非経口的に投与される。

**【0032】**

本発明のその他の目的は、試料液中のC型肝炎ウイルスに向けられた抗体の免疫学的測定のための方法であり、ここで試料液はC型肝炎ウイルスからの配列領域、特にC型肝炎ウイルスのNS3領域からの配列領域を有する少なくとも1個のポリペプチドとともにインキュベートされ、そして抗体はポリペプチドへの結合により検出される。その際に、少なくとも1個のシステイン残基を有する領域からのポリペプチドを使用し、(a)抗体は還元状態下で測定され、(b)1又は数個のシステイン残基は共有結合的に修飾され又は/及び(c)1又は数個のシステイン残基が他のアミノ酸で置換されていることを特徴とするものである。

40

**【0033】**

HCVからの他の抗原性領域に対比して、NS3領域は特別に多くのシステイン残基の蓄積を有する。ウイルス複製の過程の間に合成されたNS3タンパク質は安定であるが、生

50

理学的緩衝状態、例えば免疫学的試験処理におけるNS3抗原の使用は極めて問題であることが判明した、というのは、システイン残基の遊離のスルフヒドリル基はこれらの条件下で容易に酸化するからである。これは抗原の分子内並びに分子間の架橋をもたらし、その免疫反応性を有意に減少させる。

【0034】

驚くべきことに、修飾されたシステイン残基をもつ又はノ及び置換したシステイン残基をもつ1又は複数のNS3抗原が使用されるか、又は例えばスルフヒドリル試薬を添加することにより緩和な還元状態が存在する試験方式手段により、これらのNS3抗原の免疫反応を有意に改善することが可能であった。こうして、セロコンバージョンの早期認識が達成され、かつ、測定シグナルの有意な増幅が達成される。

10

【0035】

本発明は、さらに、以下の実施例及び配列プロトコールにより記載される。

【0036】

配列番号1：本発明の好適なポリペプチドのヌクレオチド配列を示す。

【0037】

配列番号2：本発明の好適な核酸のアミノ酸配列を示す。

【0038】

配列番号3：プライマー(1)のヌクレオチド配列を示す。

【0039】

配列番号4：プライマー(2)のヌクレオチド配列を示す。

20

【0040】

配列番号5：プライマー(3)のヌクレオチド配列を示す。

【0041】

配列番号6：プライマー(4)のヌクレオチド配列を示す。

【0042】

配列番号7：プライマー(5)のヌクレオチド配列を示す。

【0043】

配列番号8：プライマー(6)のヌクレオチド配列を示す。

【0044】

【実施例】

30

#### 実施例1

C型肝炎ウイルスのNS3領域からのアミノ酸1207から1488を有するポリペプチドのクローニング及び発現

配列番号3及び配列番号4で示されるヌクレオチド配列をもつプライマー(1)及び(2)を使用し、クローンNS3(DSM 6847)により開始するPCR手段により、DNAフラグメントを増幅させた。クローニングのための配列(BamHI, BspHI, EcoRI制限開裂部位)並びに発現増大のためのATGコドン及びAAA(Lys)コドンは、このDNAフラグメントの5'末端に存在している。HindIII及びEcoRIの制限部位並びに停止コドン(TTA)は3'末端に存在している。プライマー(1)及び(2)において、HCVに相同の領域は第19番目のヌクレオチドで始まる。

40

【0045】

こうして得られたDNAフラグメントが、BamHI及びHindIIIで切断されたpUC8ベクターにおいて使用された。生成したプラスミドは、pUC-D26と命名された。

【0046】

プラスミドpUC-D26で形質転換されたE. coli株JM109(ヤーニッシンペーロンら, Gene 33(1985), 103)を100mlの媒地(L培養液/アンピシリン)中で1晩インキュベートした。翌朝、この培養物は3lのフラスコ内で900mlのL培養液(10gトリプトン、10g酵母抽出物、5g Na

50

C1/1) / アンピシリンで2回希釈した。2mlのグリセロール及び1~2滴のシリコンの消泡用エマルジョン(Serva社)を添加した後で、培養物を約185rpm及び37で2時間振盪させた。誘導及び抗原製造は、2ミリモル/lの誘導物質であるイソプロピルチオ-D-ガラクトシド(IPTG)を添加し、3から4時間さらに振盪することにより達成される。次いで、バクテリアを遠心分離によりペレット状にし、さらに処理する。

**【0047】**

2個の1lの培養物からのバクテリアのペレットを200mlの50ミリモル/l Tris-HCl、pH 8.5、0.2mg/ml リソチーム及び2ミリモル/lのジチオエリスリトール(DTE)中に再懸濁させた。続いて、EDTA(最終濃度:15ミリモル/l)、フェニルメチルスルホニルフルオリド(最終濃度:1ミリモル/l)と4mgのDNアーゼを添加した。懸濁物は磁気攪拌器で数分間混合し、水浴中37で45分間インキュベートした。

10

**【0048】**

その後、トリトン-X100(最終濃度:1%)を添加し、磁気攪拌器で30分間攪拌した。-20において一晩凍結し、そして解凍した後で、37で細胞を少なくとも1時間攪拌し、必要ならば音波処理した(sonified)。37でのインキュベーション及び/又は超音波処理は、溶解した細胞の懸濁液の粘度が有意に減少する迄、続けられた。

**【0049】**

続いて、35,000g及び4で20分間遠心分離した。得られたペレットは30mlの50ミリモル/l Tris-HCl、pH 8.5、2ミリモル/l DTE、150ミリモル/l EDTA及び1.5% OGP(オクスチル-D-グルコピラノシド、Biomol社)中で再懸濁した。この懸濁物を室温で磁気攪拌器にて少なくとも3時間激しく攪拌し、続いて35,000g及び4で20分間遠心した。

20

**【0050】**

このペレットを100mlの8モル/l 尿素、20ミリモル/l Tris-HCl、pH 8.5、2ミリモル/l DTE中に溶解し、攪拌した。ここで溶解した抗原は、次に処理する迄-20で凍結できる。

**【0051】**

タンパク質は、室温で実施された以下に記載するクロマトグラフィー工程で精製された。抗原は各クロマトグラフィー工程の間は-20で保存された。

30

**【0052】**

最初のクロマトグラフィー工程は、20ミリモル/l Tris-HCl pH 8.5、8モル/l 尿素、2ミリモル/l DTE緩衝液を有するQ-セファロースファーストフローカラム(ファルマシア)で実施された。これは、NaCl勾配(0から0.7モル/l)で溶出させた。空(void)容積及び分画物は、SDS PAGE手段により試験した。本発明のポリペプチドは最初のメインピークに存在する。ポジティブの分画物はプールされ、10倍容量の4モル/l 尿素、2ミリモル/l DTE、20ミリモル/l Tris-HCl pH 7.3に対して1晩透析した。

40

**【0053】**

2番目のクロマトグラフ工程において、同じカラムが使用された。カラム緩衝液は、最初のクロマトグラフ工程の後で使用された透析用緩衝液であった。これをNaCl勾配(0から0.5モル/l)、次いで1モル/l NaCl、NaOH pH 13、4モル/l 尿素を使用して溶出した。

**【0054】**

ポジティブな分画物をプールし、上述の同一の緩衝液に対して1晩透析した。

**【0055】**

最後に、S-セファロースファーストフローカラム(ファルマシア)でクロマトグラフを行った。緩衝液及び溶出条件は先のクロマトグラフ工程のものと同一であった。

50

## 【0056】

抗原は、SDSポリアクリルアミドゲルにおいて約41kDaの大きさを有している。収率は、培養媒地リットル当たり約10mgの抗原であった。

## 実施例2

HCV NS3領域からの他の抗原と比較した本発明の抗原の発現

以下の抗原を発現させた：

- a) 本発明の抗原D26 (アミノ酸1207から1488)
- b) 抗原C33 (ヨーロッパ特許出願第450 391号のアミノ酸1192から1457)
- c) 抗原D27 (アミノ酸1227から1528)
- d) 抗原NS3 (アミノ酸1007から1534)

10

寄託されたクローンNS-3 (DSM 6847) を使用して、抗原NS3を発現させた。抗原C33及びD27のクローニング及び発現は、実施例1に記載された方法に従って実施された。C33に対するアミノ酸1192から1457及びD27に対するアミノ酸1227から1528のコード領域は、クローンNS-3からのプラスミドpUC-N3で開始するPCRを使用する標準方法により増幅させた。

## 【0057】

プライマー(3)及び(4)が、配列番号5及び配列番号6に示されているヌクレオチド配列を有するC33のために使用された。配列番号7及び配列番号8に示されているヌクレオチド配列を有するD27に対してプライマー(5)及び(6)が使用された。HCVに相同の領域は、プライマー(3)及び(5)においてはヌクレオチド番号19で始まり、プライマー(4)及び(6)においてはヌクレオチド番号13で始まる。

20

## 【0058】

制限酵素BamHI及びHindIIIで処理し、次いでアガロースゲル電気泳動で精製した後で、増幅したDNAフラグメントをBamHI及びHindIIIで開裂したベクターpUC8に挿入した。pUCベクターで発現された抗原は両方とも、N末端に13個の非HCV-コード化外来アミノ酸の領域を有している(Met-Thr-Met-Ile-Thr-Asn-Ser-Arg-Gly-Ser-Ile-Met-Lys)。

30

## 【0059】

その後、このプラスミドでE. coli JM109を形質転換させた。C33抗原をコードするDNAフラグメントを受け入れたクローンは、約34kDa (SDS-PAGE)の分子量をもつ抗原を発現する。抗原D27をコードするDNAフラグメントを有するクローンにおいては、48kDaの帯が見い出された。

## 【0060】

C33の場合には、全タンパク質中のそのパーセントは約10%であり、本発明のポリペプチドD26とほぼ同じ程度である。5%又はそれ以下の範囲のかなり少量の発現がD27について見られる。

## 【0061】

D26、D27及びC33を発現するクローンの溶解物がSDSゲルにおいて同時に分離され、ニトロセルロース上に移された。種々のHCV-ポジティブ血清と1:100の希釈度で1晩インキュベートした後、結合抗体は抗ヒトIgG抗体-パーオキシダーゼ接合体及び3,3'-ジアミノベンジジンテトラクロリド(DAB)/過酸化水素との呈色反応により検出された。

40

## 【0062】

強力にポジティブである血清を有するすべてのHCV抗原セグメントにおいて、良好な反応性が見い出された。ポジティブ度が弱いNS3-HCV血清の場合には、C33抗原は本発明の抗原に比較してある場合には同程度であり、他の場合には僅かに弱い反応性を示す。しかしながら、D27の場合には、弱いNS3-ポジティブ血清とかなり弱まった呈色反応が見い出された。

50

実施例 3

H C V の N S 3 領域からの種々の抗原の特異性及び感受性の検討

N S - 3 領域から得られる種々の抗原の反応性を、間接試験コンセプトを使用して、全部で 960 個のネガティブ血清において比較して評価した。この評価において、本発明の抗原 D 2 6 は、それ自体有意に減少した数の誤ったポジティブ結果を示す参照抗原 C 3 3 に比較して、有意にすぐれた特異性を有していることが見いだされた。

【 0 0 6 3 】

構 築 物 誤りのポジティブ分類		正しいネガティブ分類
C 3 3	8	9 5 2
D 2 6	2	9 5 8

10

さらに、証明された H C V 状態の 20 個の血清における間接試験コンセプトを使用して、種々の N S 3 構築物の反応性が比較評価された。抗原 D 2 7 の減少した感受性は、構築物 N S 3 (アミノ酸 1007 から 1534)、C 3 3、D 2 6 及び D 2 7 に匹敵する感受性であることが見いだされた。

【 0 0 6 4 】

構 築 物 正しいポジティブ分類		誤りのネガティブ分類
N S 3	2 0	0
C 3 3	2 0	0
D 2 6	2 0	0
D 2 7	1 9	1

20

実施例 4

H C V の N S 3 領域からの抗原の安定性についての検討

間接試験コンセプトを使用して、抗原 N S 3 及び D 2 6 の安定性を比較評価した。抗原 N S 3 は、本発明の抗原 D 2 6 に比較して有意に劣った安定性しか有しないことが見いだされた。抗原の安定性は、37 で 72 時間インキュベートした後で調査した。

30

【 0 0 6 5 】

構 築 物	試料番号	信号回収
N S 3	1	< 20%
	2	< 20%
D 2 6	1	99%
	2	103%

実施例 5

還元剤の存在下又は非存在下での H C V - N S 3 ヘリカーゼ抗原の反応性の検討

セロコンバージョン時間は、20 ミリモル / l の D T T の存在時又は非存在時に生理的条件におかれた H C V - N S 3 ヘリカーゼ抗原で異なる時間ごとに回収された血清試料の反応性に基づいて試験した。

【 0 0 6 6 】

試験コンセプトは、すべてのイムノグロブリンのクラス - 非依存性認識のための二重抗原架橋試験であり、この場合電気化学的マーカー基 (ルテニウム金属複合体) を有する抗原及び固体相に結合可能な抗原 (ビオチン化抗原) が使用された。

【 0 0 6 7 】

この試験の結果は、次表に示される。20 ミリモル / l の D T T の存在下では、38 日

40

50

以前にセロコンバージョンを認識することが可能であったことが判明した。加えて、改善された信号強度が D T T の存在下で見られた。

【 0 0 6 8 】

【 表 1 】

血液採取日時	血液採取開始後の経過日数	D T T 非存在時の NS 3 抗原の反応性 (信号/カット)	D T T 存在時の NS 3 抗原の反応性 (信号/カット)
28. 07. 1988	0	0.1	0.1
01. 08. 1988	4	0.1	0.1
08. 08. 1988	11	0.1	0.1
11. 08. 1988	14	0.1	0.1
15. 08. 1988	18	0.1	0.1
25. 08. 1988	28	0.1	0.1
29. 08. 1988	32	0.1	1.6*
14. 09. 1988	48	0.1	6.5*
05. 10. 1988	69	1.3*	4.8*
19. 10. 1988	83	2.1*	6.8*

\* ポジティブ信号

【 発明の 効果 】

修飾されたシステイン残基をもつ又は / 及び置換したシステイン残基をもつ 1 又は複数の NS 3 抗原が使用されるか、又は例えばスルフヒドリル試薬を添加することにより緩和な還元状態が存在する H C V に対する免疫学的試験方法により、これらの NS 3 抗原の免疫反応を有意に改善することが可能である。また、かかる方法により、セロコンバージョンの早期認識が達成され、かつ、測定シグナルの有意な増幅が達成される。

【 0 0 6 9 】

【 配列表 】

( 1 ) 一般情報 :

( i ) 出願人 :

( A ) 名称 : ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー

( i i ) 出願の名称 : C 型肝炎ウイルスの NS 3 領域からの組換え抗原

( i i i ) 配列の数 : 8

( i v ) コンピュータ リーダーブル フォーム

( A ) データキャリア : フロッピーディスク

( B ) コンピュータ : I B M P C コンパチブル

( C ) 操作 システム : P C - D O S / M S - D O S

( D ) ソフトウェア : パテントイン リリース # 1 . 0 、  
バージョン # 1 . 2 5 ( E P A )

( 2 ) 配列番号 1 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 8 8 5 塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖フォーム : 両方

( D ) トポロジ- : 線状  
 ( i i ) 分子の型 : c D N A  
 ( v i ) 最初の起源 :  
 ( A ) 微生物 : C 型肝炎ウイルス  
 ( v i i i ) ゲノム内の位置  
 ( A ) 染色体 / セグメント : N S 3  
 ( i x ) 特徴 :  
 ( A ) 名称 / キー : C D S  
 ( B ) ロケーション : 1 . . 8 8 5  
 ( x i ) 配列の記述 : 配列 I D N O . 1 :  
 【 0 0 7 0 】  
 【 化 1 】

10

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC ATC ATG AAA TCC CCG GTG	48
Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Arg Gly Ser Ile Met Lys Ser Pro Val	
1 5 10 15	
TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCG GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG	96
Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val	
20 25 30	
GCT CAC CTG CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAG AGC ACC AAG GTC CCG	144
Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro	
35 40 45	
GCT GCA TAC GCA GCT CAG GGC TAC AAG GTG CTA GTG CTC AAC CCT TCT	192
Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser	
50 55 60	
GTT GCT GCA ACA TTG GGC TTT GGT GCC TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG	240
Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly	
65 70 75 80	
ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC	288
Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser	
85 90 95	
CCC ATT ACG TAC TCC ACT TAC GGC AAG TTT CTT GCC GAC GGC GGG TGC	336
Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys	
100 105 110	
GCA GGG GGT GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG	384
Ala Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr	
115 120 125	
GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA GGA GAG	432
Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Gly Glu	
130 135 140	

20

30

ACT Thr 145	GCG Ala	GGG Gly	GCG Ala	AAA Lys	TTG Leu	GTT Val	GTG Val	TTC Phe	GCC Ala	ACC Thr	GCC Ala	ACC Thr	CCT Pro	CCG Pro	GGC Gly 160	480
TCC Ser	GTC Val	ACT Thr	GTG Val	CCC Pro	CAT His	CCC Pro	AAC Asn	ATT Ile	GAG Glu	GAG Glu	GTT Val	GCT Ala	CTA Leu	TCC Ser	ACC Thr 175	528
ACC Thr	GGA Gly	GAG Glu	ATC Ile	CCT Pro	TTT Phe	TAC Tyr	GGC Gly	AAG Lys	GCT Ala	ATC Ile	CCC Pro	CTT Leu	GAG Glu	GTA Val	ATC Ile 190	576
AAG Lys	GGG Gly	GGG Gly	AGA Arg	CAT His	CTC Leu	ATC Ile	TTC Phe	TGT Cys	CAT His	TCA Ser	AAG Lys	AGG Arg	A L	TGC Cys	GAT Asp	624
GAG Glu	CTC Leu	GCC Ala	ACA Thr	AAG Lys	CTG Leu	GTG Val	GCA Ala	ATG Met	GGC Gly	ATC Ile	AAT Asn	GCC Ala	G Val	GCC Ala	TAC Tyr	672
TAC Tyr	CGC Arg	GCT Gly	CTT Leu	GAC Asp	GTG Val	TCC Ser	GTG Val	ATC Ile	CCG Pro	ACC Thr	AGC Ser	GGT Gly	GAT Asp	GTT Val	GTC Val 240	720
GTC Val	GTG Val	GCA Ala	ACC Thr	GAC Asp	GCC Ala	CTC Leu	ATG Met	ACC Thr	GGC Gly	TAT Tyr	ACC Thr	GGC Gly	GAC Asp	TTC Phe	GAC Asp 255	768
TCG Ser	GTG Val	ATA Ile	GAC Asp	TGC Cys	AAC Asn	ACG Thr	TGT Cys	GTG Val	ACT Thr	CAG Gln	ACA Thr	GTC Val	GAT Asp	TTC Phe	AGC Ser 270	816
CTT Leu	GAC Asp	CCT Pro	ACC Thr	TTC Phe	ACC Thr	ATT Ile	GAG Glu	ACG Thr	ACC Thr	ACA Thr	CTT Leu	CCC Pro	CAG Gln	GAT Asp	GCT Ala 285	864
GTC Val	TCC Ser	CGC Arg	ACT Thr	CAA Gln	CGA Arg	CGG Arg										885

10

20

30

## 【 0 0 7 1 】

( 2 ) 配列番号 2 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 2 9 5 アミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( D ) トポロジー : 線状

( i i ) 分子の型 : タンパク質

( x i ) 配列の記述 : 配列 I D N O . 2 :

## 【 0 0 7 2 】

【 化 2 】

Met	Thr	Met	Ile	Thr	Asn	Ser	Arg	Gly	Ser	Ile	Met	Lys	Ser	Pro	Val
1				5					10					15	
Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Gln	Val
			20					25					30		
Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro
		35					40					45			
Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser
	50					55					60				
Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly
65					70					75					80
Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly	Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser
			85						90					95	
Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Cys
			100					105					110		
Ala	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Thr
		115					120					125			
Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Gly	Glu
	130					135					140				
Thr	Ala	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Val	Phe	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly
145					150					155					160
Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr
				165					170					175	
Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Val	Ile
			180					185					190		
Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser	Lys	Arg	Lys	Cys	Asp
		195					200					205			
Glu	Leu	Ala	Thr	Lys	Leu	Val	Ala	Met	Gly	Ile	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr
	210					215					220				
Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Val
225					230					235					240
Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	Thr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp
				245					250					255	
Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Thr	Gln	Thr	Val	Asp	Phe	Ser
			260					265					270		
Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu	Thr	Thr	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala
		275					280					285			
Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg									
	290					295									

10

20

30

【0073】

(2) 配列番号3 についての情報:

40

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 40 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖フォーム: シングル

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: cDNA

(xi) 配列の記述: 配列 I D NO. 3:

【0074】

【化3】

**AAGGGATCCA TCATGAAATC CCCGGTGTTT ACGGATAACT****40**

【0075】

(2) 配列番号4についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 39 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖フォーム: シングル

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: cDNA

(xi) 配列の記述: 配列ID NO. 4

【0076】

【化4】

10

**GGGAAGCCTT AATTCCTACC GTCGTTGAGT GCGGGAGAC****39**

【0077】

(2) 配列番号5についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 39 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖フォーム: シングル

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: cDNA

(xi) 配列の記述: 配列ID NO. 5

【0078】

【化5】

20

**GAGGGATCCA TCATGAAAGC GGTGGACTTT ATCCCTGTG****39**

30

【0079】

(2) 配列番号6についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 33 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖フォーム: シングル

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: cDNA

(xi) 配列の記述: 配列ID NO. 6

【0080】

【化6】

40

**GAGAAGCTTT TAACACGTGT TGCAGTCTAT CAC****33**

【0081】

(2) 配列番号7についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 39 塩基対

50

- ( B ) 型 : 核酸
- ( C ) 鎖フォーム : シングル
- ( D ) トポロジー : 線状
- ( i i ) 分子の型 : c D N A
- ( x i ) 配列の記述 : 配列 I D N O . 7 :

【 0 0 8 2 】

【 化 7 】

**GAGGGATCCA TCATGAAACA CCTGCATGCT CCCACCGGC**

**39**

10

【 0 0 8 3 】

( 2 ) 配列番号 8 についての情報 :

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 3 3 塩基対

( B ) 型 : 核酸

( C ) 鎖フォーム : シングル

( D ) トポロジー : 線状

( i i ) 分子の型 : c D N A

( x i ) 配列の記述 : 配列 I D N O . 8

20

【 0 0 8 4 】

【 化 8 】

**GAGAAGCTTT TAATACCAAG CACAGCCGCG GTC**

**33**

## フロントページの続き

- (72)発明者 ウルスラ - ヘンリケ ヴィーンヒュス  
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 1 5 2 クライリング, ブルクフリーデンシュトラッセ 8 番地
- (72)発明者 ウルバン シュミット  
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 8 6 オーベルハオセン, ヴァルドシュトラッセ 3 6 番地
- (72)発明者 マンフレッド モッツ  
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 1 5 4 3 ミュンヘン, シレンシュトラッセ 1 6 番地
- (72)発明者 ミッシェル ヴィードマン  
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 7 7 ペンツバーク, イン デル アオ 1 1 番地
- (72)発明者 バーバラ アップマイアー  
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 9 3 イッフエルドルフ, エーゲルランダーシュトラッセ 1  
2 シー 番地
- (72)発明者 エルヴィン ソウトシェック  
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 3 5 バーク, エンツィアンヴェーグ 4 9 番地
- Fターム(参考) 4B024 AA11 BA32 CA01 DA06 EA04 FA04 GA19 HA01 HA03

专利名称(译)	丙型肝炎病毒ns3区的重组抗原		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004004075A</a>	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2003136377	申请日	2003-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	罗氏诊断公司		
申请(专利权)人(译)	罗氏诊断有限公司		
[标]发明人	クリストフサイデル ウルスラヘンリケヴィーンヒュス ウルバンシュミット マンフレッドモッツ ミッシェルヴィードマン バーバラアップマイアー エルヴィンソウトシェック		
发明人	クリストフ サイデル ウルスラ-ヘンリケ ヴィーンヒュス ウルバン シュミット マンフレッド モッツ ミッシェル ヴィードマン バーバラ アップマイアー エルヴィン ソウトシェック		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/29 A61P1/16 A61P31/12 A61P31/14 C07H21/04 C07K14/02 C07K14/10 C07K14/18 C07K16/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/40 C12N15/51 C12P21/02 C12P21/04 C12R1/19 G01N33/532 G01N33/537 G01N33/569 G01N33/576 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/16 C07K14/005 C12N2770/24222 G01N33/56983 G01N33/5767 Y10S436/82		
FI分类号	G01N33/576.ZNA.Z G01N33/53.N C12N15/00.A G01N33/576.ZZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA04 4B024/GA19 4B024/HA01 4B024/HA03		
代理人(译)	早川 康		
优先权	P 44 28 705:4 1994-08-12 DE		
其他公开文献	JP3632027B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种针对样品溶液中抗丙型肝炎病毒的抗体的免疫学测定方法，以及一种早期识别HCV血清转化的方法。来自丙型肝炎病毒NS3区的序列区，包含至少一个半胱氨酸残基，该半胱氨酸残基被共价修饰或替换为另一个氨基酸。将样品溶液与至少一种多肽一起孵育以检测抗体与多肽在还原状态下的结合。 [选择图]无

血液採取日時	血液採取開始後の経過日数	D T T 非存在時の NS 3 抗原の反応性 (信号/カット)	D T T 存在時の NS 3 抗原の反応性 (信号/カット)
28. 07. 1988	0	0.1	0.1
01. 08. 1988	4	0.1	0.1
08. 08. 1988	11	0.1	0.1
11. 08. 1988	14	0.1	0.1
15. 08. 1988	18	0.1	0.1
25. 08. 1988	28	0.1	0.1
29. 08. 1988	32	0.1	1.6*
14. 09. 1988	48	0.1	6.5*
05. 10. 1988	69	1.3*	4.8*
19. 10. 1988	83	2.1*	6.8*