

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3632027号
(P3632027)

(45) 発行日 平成17年3月23日(2005.3.23)

(24) 登録日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	
GO 1 N 33/576	GO 1 N 33/576	Z N A Z
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	N
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

請求項の数 2 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-136377 (P2003-136377)	(73) 特許権者	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、サンド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 弁理士 平木 祐輔
(65) 公開番号	特開2004-4075 (P2004-4075A)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(43) 公開日	平成16年1月8日(2004.1.8)	(74) 代理人	100099128 弁理士 早川 康
審査請求日	平成15年5月14日(2003.5.14)	(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
(31) 優先権主張番号	P 44 28 705:4		
(32) 優先日	平成6年8月12日(1994.8.12)		
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		

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) 【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、そして抗体の測定はスルフヒドリル試薬の存在下実施される方法。

【請求項2】

HCVに対する抗体が測定される、HCV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HCVに特異的な抗体と免疫学的に反応性である、NS3領域に由来する少なくとも1つのHCV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(HCV)の非構造タンパク質3(NS3)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】

10

20

【従来の技術】

非A非B型肝炎といわれる病気は、多くの場合C型肝炎ウイルス(HCV)により引き起こされる。HCV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(encapsulated)RNA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。HCVの非構造タンパク質3(NS3)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、NS3領域の第三アミノ末端(amino terminal third)に存在する。

【0003】

HCVの部分ヌクレオチド配列はヨーロッパ特許出願第318 216号明細書に開示されている。この出願はのためのHCV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。

10

【0004】

ヨーロッパ特許出願第450 931号明細書は、HCV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HCV抗原及び非構造ドメインNS3, NS4又はNS5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HCV抗原を含む合成HCV抗原の組み合わせが記載されている。ドメインNS3からの好適な抗原は、ヨーロッパ特許出願第450 931号明細書の第1図に示されるHCVゲノムのアミノ酸1192から1457を含むC33といわれる抗原である。

【0005】

国際特許出願第WO92/11370号は、HCV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6847で“ドイッチェ 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 GmbH, マッセルオーデル ベーク 1b, 38124 ブラウンシュバイク, BRD(DSM)”に、この出願に関連して寄託されたクローンNS-3は、HCVのNS3領域からの527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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

。本発明のポリペプチドは、ヨーロッパ特許出願（EP-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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【0017】

10

20

30

40

50

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WO92/11370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。

10

【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。

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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はマーカース基を保持する。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

50

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。

【0025】

この試験方法では、好適には、試料液を精製標識抗原 P 2 及び精製固相抗原 P 1 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に比較して、架橋試験方式は、I g M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 - I g G 結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 P 2 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ー基を有する。固相抗原 P 1 は、例えば二官能性のスペーサーを介して固体相に直接結合しうる。しかしながら、P 1 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結合体である。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 P 1 は好適にはビオチン結合体の形態にある。

10

【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 D T T (ジチオスレイトール) 又は D T E (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。

20

【0028】

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望ましくない信号 / 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 2 8 0 2 1 1 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 P 1 とともにマーカー基を有する P 1 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。

30

40

【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 P 1 及び P 2 を含んでおり、ここでポリペプチド P 1 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 P 2 はマーカー基を有する。ポリペプチド P 1 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 P 1 は、特に好ましくはビオチン結合形態で存在する。

50

【 0 0 3 0 】

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 P 1 とマーカー基を有する P 1 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。

【 0 0 3 1 】

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、リボ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。

10

【 0 0 3 2 】

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 NS 3 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。

20

【 0 0 3 3 】

H C V からの他の抗原性領域に対比して、NS 3 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 NS 3 タンパク質は安定であるが、生理学的緩衝状態、例えば免疫学的試験処理における NS 3 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。

30

【 0 0 3 4 】

驚くべきことに、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試験方式手段により、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。

【 0 0 3 5 】

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。

40

【 0 0 3 6 】

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。

【 0 0 3 7 】

配列番号 2 : 本発明の好適な核酸のアミノ酸配列を示す。

【 0 0 3 8 】

配列番号 3 : プライマー (1) のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 3 9 】

配列番号 4 : プライマー (2) のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 4 0 】

配列番号 5 : プライマー (3) のヌクレオチド配列を示す。

50

【 0 0 4 1 】

配列番号 6 : プライマー (4) のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 4 2 】

配列番号 7 : プライマー (5) のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 4 3 】

配列番号 8 : プライマー (6) のヌクレオチド配列を示す。

【 0 0 4 4 】

【 実施例 】

実施例 1

C 型肝炎ウイルスの NS 3 領域からのアミノ酸 1 2 0 7 から 1 4 8 8 を有するポリペプチドのクローニング及び発現 10

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 NS 3 (DSM 6 8 4 7) 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 1 9 番目のヌクレオチドで始まる。

【 0 0 4 5 】

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 pUC 8 ベクターにおいて使用された。生成したプラスミドは、pUC - D 2 6 と命名された。 20

【 0 0 4 6 】

プラスミド pUC - D 2 6 で形質転換された E . Coli 株 JM 1 0 9 (ヤーニッシ - ペーロンら , Gene 3 3 (1 9 8 5) , 1 0 3) を 1 0 0 ml 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 3 l のフラスコ内で 9 0 0 ml の L 培養液 (1 0 g トリプトン、1 0 g 酵母抽出物、5 g NaCl / l) / アンピシリンで 2 回希釈した。2 ml 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 1 8 5 rpm 及び 3 7 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。 30

【 0 0 4 7 】

2 個の 1 l の培養物からのバクテリアのペレットを 2 0 0 ml の 5 0 ミリモル / l Tris - HCl、pH 8 . 5、0 . 2 mg / 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 : 1 5 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 4 mg 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 3 7 で 4 5 40 分間インキュベートした。

【 0 0 4 8 】

その後、トリトン - X 1 0 0 (最終濃度 : 1 %) を添加し、磁気攪拌器で 3 0 分間攪拌した。- 2 0 において一晩凍結し、そして解凍した後で、3 7 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) 。3 7 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。

【 0 0 4 9 】

続いて、3 5 , 0 0 0 g 及び 4 で 2 0 分間遠心分離した。得られたペレットは 3 0 ml の 5 0 ミリモル / l Tris - HCl、pH 8 . 5、2 ミリモル / l DTE、1 5 50

0 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、Bio mol 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 35,000 g 及び 4 で 20 分間遠心した。

【0050】

このペレットを 100 ml 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。

10

【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。

【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。

20

【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。

【0056】

抗原は、SDS ポリアクリルアミドゲルにおいて約 41 kDa 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 10 mg の抗原であった。

30

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)

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。

40

【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。

50

【 0 0 5 8 】

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)。

【 0 0 5 9 】

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 34 kDa (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、48 kDa の帯が見い出された。

10

【 0 0 6 0 】

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。

【 0 0 6 1 】

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。

20

【 0 0 6 2 】

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。

実施例 3

HCV の NS3 領域からの種々の抗原の特異性及び感受性の検討

30

NS - 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 D26 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 C33 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出された。

【 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

C33	8	952
D26	2	958

40

さらに、証明された HCV 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 NS3 構築物の反応性が比較評価された。抗原 D27 の減少した感受性は、構築物 NS3 (アミノ酸 1007 から 1534)、C33、D26 及び D27 に匹敵する感受性であることが見い出された。

【 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
NS3	20	0
C33	20	0
D26	20	0
D27	19	1

実施例 4

HCVのNS3領域からの抗原の安定性についての検討

10

間接試験コンセプトを使用して、抗原NS3及びD26の安定性を比較評価した。抗原NS3は、本発明の抗原D26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出された。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。

【0065】

構 築 物	試料番号	信号回収
NS3	1	<20%
	2	<20%
D26	1	99%
	2	103%

20

実施例 5

還元剤の存在下又は非存在下でのHCV-NS3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DTTの存在時又は非存在時に生理的条件におかれたHCV-NS3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。

【0066】

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。

30

【0067】

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

【0068】

【表1】

血液採取日時	血液採取開始後の経過日数	DTT非存在時のNS3抗原の反応性(信号/カット)	DTT存在時のNS3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HCVに対する免疫学的試験方法により、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。

【0069】

【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

(ii) 出願の名称: C型肝炎ウイルスのNS3領域からの組換え抗原

(iii) 配列の数: 8

(iv) コンピュータ リーダブル 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: IBM PC コンパチブル

(C) 操作 システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン リリース #1.0、バージョン #1.25 (EPA)

(2) 配列番号1についての情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 885 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖フォーム: 両方

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: cDNA

(vi) 最初の起源:

(A) 微生物: C型肝炎ウイルス

10

20

30

40

50

(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 】

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC ATC ATG AAA TCC CCG GTG Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Arg Gly Ser Ile Met Lys Ser Pro Val 1 5 10 15	48	10
TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCG GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val 20 25 30	96	
GCT CAC CTG CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAG ACC ACC AAG GTC CCG Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro 35 40 45	144	
GCT GCA TAC GCA GCT CAG GGC TAC AAG GTG CTA GTG CTC AAC CCT TCT Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser 50 55 60	192	
GTT GCT GCA ACA TTG GGC TTT GGT GCC TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly 65 70 75 80	240	20
ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG ACA ACA ATT ACC ACT GGC AGC Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser 85 90 95	288	
CCC ATT ACG TAC TCC ACT TAC GGC AAG TTT CTT GCC GAC GGC GGG TGC Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys 100 105 110	336	
GCA GGG GGT GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG Ala Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr 115 120 125	384	
GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA GGA GAG Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Gly Glu 130 135 140	432	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	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	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	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	GTC 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	GTC Val	ATC Ile	CCG Pro	ACC Thr	AGC Ser	GGT Gly	GAT Asp	GTT Val	GTC Val	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	768
TCG Ser	GTC Val	ATA Ile	GAC Asp	TGC Cys	AAC Asn	ACG Thr	TGT Cys	GTC Val	ACT Thr	CAG Gln	ACA Thr	GTC Val	GAT Asp	TTC Phe	AGC Ser	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	864
GTC Val	TCC Ser	CGC Arg	ACT Thr	CAA Gln	CGA Arg	CGG Arg										885

【 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 】

10

20

30

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

【 0 0 7 3 】

(2) 配列番号 3 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 4 0 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 . 3 :

【 0 0 7 4 】

【 化 3 】

40

AAGGGATCCA TCATGAAATC CCCGGTGTTC ACGGATAACT

40

【 0 0 7 5 】

(2) 配列番号 4 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 3 9 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖フォーム : シングル

(D) トポロジ : 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 . 4

【 0 0 7 6 】

【 化 4 】

GGAAGCCTT AATTCTTACC GTCGTTGAGT GCGGGAGAC

39

【 0 0 7 7 】

(2) 配列番号 5 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 3 9 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖フォーム : シングル

(D) トポロジ : 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 . 5

【 0 0 7 8 】

【 化 5 】

GAGGGATCCA TCATGAAAGC GGTGGACTTT ATCCCTGTG

39

【 0 0 7 9 】

(2) 配列番号 6 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 : 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 . 6

【 0 0 8 0 】

【 化 6 】

GAGAAGCTTT TAACACGTGT TGCAGTCTAT CAC

33

【 0 0 8 1 】

(2) 配列番号 7 についての情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 3 9 塩基対

10

20

30

40

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

【 0 0 8 4 】

【 化 8 】

GAGAAGCTTT TAATACCAAG CACAGCCTGC GTC

33

20

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 パーバラ アップマイアー
ドイツ連邦共和国 ディー - 8 2 3 9 3 イッフェルドルフ, 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

審査官 田村 明照

- (56)参考文献 特開平 0 1 - 3 2 1 3 6 5 (J P , A)
特表平 0 6 - 5 0 5 1 6 4 (J P , A)
特表平 0 5 - 5 0 8 2 1 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)

C12N 15/00

BIOSIS/WPI (DIALOG)

PubMed

专利名称(译)	来自丙型肝炎病毒NS3区的重组抗原		
公开(公告)号	JP3632027B2	公开(公告)日	2005-03-23
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		
当前申请(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 ウルスト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 ウルストラ-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	P4428705:4 1994-08-12 DE		
其他公开文献	JP2004004075A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供样品液中抗丙型肝炎病毒抗原的免疫学测量方法和早期识别HCV大提琴转化的方法。解决方案：将样品液体与至少一种多肽一起温育，所述多肽包含来自丙型肝炎病毒NS3区域的序列区域，所述序列区域包含至少一个半胱氨酸残基，所述半胱氨酸残基被共价修饰或被另一氨基酸取代以检测抗体的结合。处于还原状态的多肽。 Z

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*