

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 515327

(P2003 - 515327A)

(43)公表日 平成15年5月7日(2003.5.7)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		39/395	D 4 B 0 2 4
39/00			N 4 B 0 6 3
39/395		45/00	4 B 0 6 4
		48/00	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全100数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 541034(P2001 - 541034)

(86)(22)出願日 平成12年11月20日(2000.11.20)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月29日(2002.5.29)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/11526

(87)国際公開番号 W001/040279

(87)国際公開日 平成13年6月7日(2001.6.7)

(31)優先権主張番号 99870252.6

(32)優先日 平成11年12月3日(1999.12.3)

(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 60/169,287

(32)優先日 平成11年12月7日(1999.12.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 イノジェネティックス・ナムローゼ・フェンノートシャップ
INNOGENETICS N.V.
ベルギー、ペー - 9052ヘント、テヒノロギーパルク6番

(72)発明者 リーフエン・スタイファー
ベルギー、ペー - 9552ヘルゼレ、ホレストラート8番

(72)発明者 カロリーヌ・ファン・ヘイト
ベルギー、ペー - 9000ヘント、コルフェニールスハング59番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H B V 配列

(57)【要約】

仮に遺伝子型 G と命名された新たなヒト B 型肝炎ウイルス遺伝子型の完全核酸配列を報告する。この遺伝子型は、H B V に慢性的に感染した患者において非常に流行しており、ヨーロッパおよび米国に存在することがわかった。さらに本発明は、該核酸によりコードされるポリペプチドならびに該ポリペプチドを認識する抗体に関する。また本発明は、H B V 診断、予防および治療における該核酸、ポリペプチドおよび抗体の使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 配列番号：1において定義される配列；または

(b) 配列番号：1において定義される配列に対して少なくとも90%、より好ましくは91%、最も好ましくは92%の同一性を有する配列；または

(c) (a) および (b) において定義された配列に対する遺伝学的コードの縮重の結果としての配列

により特徴づけられる、これまで未同定であったHBV遺伝子型にユニークであり、HBV遺伝子型A、B、C、D、EおよびFとは系統発生的に異なる単離および/または精製HBVポリ核酸。

【請求項2】 下記特徴：

(a) 3248塩基対の長さを有する；

(b) preCore領域のアミノ酸2および28における翻訳停止コドンコードする；

(c) Core領域のN末端部分に36ヌクレオチドの挿入を有する

(d) HBcAg ORFのC末端部分に6ヌクレオチドの欠失を有する

(e) preS1 ORFのN末端部分に3ヌクレオチドの欠失を有する

の少なくとも1つにおいてヌクレオチド配列がHBV遺伝子型A、B、C、D、EまたはFとは異なっていることをさらに特徴とする請求項1記載のHBVポリ核酸。

【請求項3】 下記配列：

配列番号：44、配列番号：45、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48、配列番号：49、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：54、配列番号：55、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：60

の少なくとも1つを含む請求項1または2のいずれか1項に記載のHBVポリ核酸。

【請求項4】 - これまで未同定であったHBV遺伝子型Gにユニークであり、既知のHBV遺伝子型A、B、C、D、EまたはFのヌクレオチドとは異なる少なくとも1のヌクレオチドまたはヌクレオチドの組み合わせを含むこと；あ

るいは

- 遺伝子型 A、B、C、D、E、F および G の核酸配列中に含まれる普遍的フラグメントであること

により特徴づけられる、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のポリ核酸のフラグメントまたはその相補物、ただし該フラグメントは配列番号：7 または配列番号：169 の pre C / C 配列あるいは配列番号：8 の pre S / S 配列とは等しくない。

【請求項 5】 生物学的試料中の請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のポリ核酸の存在を検出する方法。

【請求項 6】 下記工程：

(i) 可能には、生物学的試料中に存在する核酸を抽出すること；

(i i) 核酸を増幅すること；

(i i i) 増幅された核酸を検出すること

を含むことをさらに特徴とする請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 下記工程：

(i) 可能には、生物学的試料中に存在する核酸を抽出すること；

(i i) 核酸を増幅すること；

(i i i) 可能には、変性条件下、適当な条件下において 1 またはそれ以上のプローブに核酸をハイブリダイゼーションさせること、ここに該プローブは可能には固体基材に結合される；

(i v) 可能には、適当な条件下で洗浄すること；

(v) 生成したハイブリッドを検出すること

を含むことをさらに特徴とする請求項 5 または 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】 下記工程：

(i) 可能には、生物学的試料中に存在する核酸を抽出すること；

(i i) 核酸を増幅すること；

(i i i) 核酸の配列決定を行うこと

を含むことをさらに特徴とする請求項 5 または 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】 請求項 4 記載のフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプラ

イマーであって、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の核酸または核酸の部分の特異的に配列決定あるいは特異的に増幅するためのプライマーとして作用しうるオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項10】 請求項4記載のフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブであって、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の核酸または核酸の部分の特異的に検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして作用しうるオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項11】 配列番号：62から配列番号：154までの標的配列の1つを認識することをさらに特徴とする請求項9ないし10のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドプライマーまたはオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項12】 請求項9または11に記載の少なくとも1のプライマーおよび/または請求項10または11に記載の少なくとも1のプローブを使用することを特徴とする、請求項5ないし8のいずれか1項に記載のHBV遺伝子型決定方法。

【請求項13】 請求項9または11に記載の少なくとも1のプライマーおよび/または請求項10または11に記載の少なくとも1のプローブを含む、請求項5ないし8のいずれか1項および/または請求項12に記載の方法において使用される診断キット。

【請求項14】 下記成分：

(i) 適当な場合には、該試料中に存在する核酸を遊離、単離または濃縮するための手段；

(ii) プライマーセットまたはプライマーミックス；

(iii) 固体支持体に固定された、HBV遺伝子型Gに特徴的な核酸と特異的にハイブリダイゼーションする請求項10ないし11のいずれか1項に記載の少なくとも1のプローブ、あるいは固体支持体に固定された普遍的プローブ；

(iv) ハイブリダイゼーションバッファー、または該バッファーを製造するに必要な成分；

(v) 洗浄溶液、または該溶液を製造するに必要な成分；

(iv) 適当な場合には、上記ハイブリダイゼーションから得られるハイブリ

ッドを検出するための手段

を含む、請求項5ないし7のいずれか1項および/または請求項12に記載の方法において使用される診断キット。

【請求項15】 請求項1ないし4のいずれか1項に記載のポリ核酸によりコードされるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項16】 配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6の少なくとも1つを含む請求項15記載のポリペプチド。

【請求項17】 配列番号：155から配列番号：168までの配列の少なくとも1つを含む請求項15記載のポリペプチド。

【請求項18】 組み換え法により発現される請求項14ないし17のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項19】 原核、真核またはウイルスの転写および翻訳制御エレメントに作動可能に連結された請求項1ないし4のいずれか1項に記載のポリ核酸またはその部分を含む発現ベクター。

【請求項20】 請求項19記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項21】 下記工程：

(i) 請求項19記載の発現ベクターで適当な細胞宿主を形質転換すること；

(ii) 発現ベクター中に挿入されたポリ核酸の発現を可能にする条件下で該形質転換された細胞宿主を培養すること；次いで

(iii) 該ポリペプチドを集めること

を含む、請求項18記載の組み換えポリペプチドの製造方法。

【請求項22】 下記工程：

(i) 生物学的試料を、請求項15ないし18のいずれか1項に記載のポリペプチドと接触させること；

(ii) 該抗体と該ポリペプチドとの間に形成された免疫学的複合体を検出すること

を含む、生物学的試料中に存在する抗体を検出する方法。

【請求項23】 下記工程：

(i) 生物学的試料を、請求項15ないし18のいずれか1項に記載の少なくとも1のポリペプチドと接触させること；

(i i) 該生物学的試料中に存在する抗体と該ポリペプチドとの間に形成された免疫学的複合体を検出することを含む、生物学的試料のHBV遺伝子型決定方法。

【請求項24】 請求項22ないし23のいずれか1項に記載の方法において使用される診断キットであって、請求項15ないし18のいずれか1項に記載の少なくとも1のポリペプチドを含み、可能には、該ポリペプチドが固体支持体に結合されているものである診断キット。

【請求項25】 請求項15ないし18のいずれか1項に記載のポリペプチドに特異的に結合するリガンド。

【請求項26】 請求項15ないし18のいずれか1項に記載の少なくとも1のポリペプチドでの免疫により生成する抗体であって、該ポリペプチドのいずれかと特異的に反応する抗体。

【請求項27】 請求項15ないし18のいずれか1項に記載のポリペプチドを検出する方法であって、下記工程：

(i) 該ポリペプチドに特異的に結合する請求項25記載のリガンドに該ポリペプチドを接触させること；

(i i) 該ポリペプチドと該リガンドとの間に形成された免疫学的複合体を検出することを含む方法。

【請求項28】 請求項15ないし18のいずれか1項に記載のポリペプチドを検出する方法であって、下記工程：

(i) 該ポリペプチドに特異的に反応する請求項26記載の抗体に該ポリペプチドを接触させること；

(i i) 該ポリペプチドと該抗体との間に形成された免疫学的複合体を検出することを含む方法。

【請求項29】 請求項1記載のこれまで未同定であったHBV遺伝子型に

対して特異的なHBcAgまたはHBeAgの検出方法であって、下記工程：

(i) 該ポリペプチドに特異的に結合する請求項25記載のリガンドに該ポリペプチドを接触させること；

(ii) 該ポリペプチドと該リガンドとの間に形成された免疫学的複合体を検出することを含む方法。

【請求項30】 請求項1記載のこれまで未同定であったHBV遺伝子型に対して特異的なHBcAgまたはHBeAgの検出方法であって、下記工程：

(i) 該ポリペプチドに特異的に反応する請求項26記載の抗体に該ポリペプチドを接触させること；

(ii) 該ポリペプチドと該抗体との間に形成された免疫学的複合体を検出することを含む方法。

【請求項31】 生物学的試料中に存在するこれまで未同定であったHBV遺伝子型の検出に使用される診断キットであって、請求項25記載の少なくとも1のリガンドまたは請求項26記載の少なくとも1の抗体を含む診断キット。

【請求項32】 ワクチンまたは医薬中の活性物質として使用される請求項15ないし18のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項25記載のリガンドおよび/または請求項26記載の抗体。

【請求項33】 HBV感染の予防または治療のためのワクチンまたは医薬を製造するための請求項15ないし18のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項25記載のリガンドおよび/または請求項26記載の抗体の使用。

【請求項34】 請求項15ないし18のいずれか1項に記載の少なくとも1のポリペプチド、請求項25記載のリガンドおよび/または請求項26記載の抗体および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項35】 HBV感染を予防または治療する方法に使用される請求項34記載の医薬組成物。

【請求項36】 医薬上許容される担体中の請求項15ないし18のいずれか1項に記載の少なくとも1のポリペプチドを含む、HBV感染に対して哺乳動

物を免疫するためのワクチン。

【請求項37】 薬剤スクリーニングアッセイにおける請求項15ないし18のいずれか1項に記載のポリペプチドの使用。

【請求項38】 薬剤スクリーニングアッセイにおけるHBV遺伝子型G感染クローンの使用。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

発明の分野

本発明は、B型肝炎ウイルス(HBV)の診断および治療の分野に関する。本発明は、新たなHBV遺伝子型Gの配列ならびにHBV感染の診断、予防および治療のためのHBeAgモジュレーションに関する新たな機構を提供する。

【0002】

発明の背景

ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)はHepadnaviridae科のプロトタイプのメンバーであり、ほぼ3200ヌクレオチドの環状で部分的に2本鎖のDNAウイルスである(Magnius and Norder, 1995)。この非常にコンパクトなゲノムは、エンベロープ(preS1、preS2および表面抗原HBsAg)、コア(preCore前駆体蛋白、HBeAgおよびHBcAg)、ポリメラーゼ(HBpol)およびX(HBX)蛋白をそれぞれコードする4つの主要なオープンリーディングフレーム(ORFs)を含んでいる。

【0003】

HBsAgに対するサブタイプ特異的抗体を用いることにより、9種の異なる血清学的サブタイプが定義され、HBVの遺伝学的多様性を反映するものである。定義された決定要素のうち、1つのものはすべてのサブタイプに共通(決定要素)であるが、2ペアの互いに排他的な下位決定要素(dまたはy、wまたはr)が共通して見出された。疫学的研究においてこのツールを用いることにより、9種の血清学的サブタイプが同定された: ayw1、ayw2、ayw3、ayw4、ayr、adw2、adw4、adrq+およびadrq-(Swenson et al., 1991)。

【0004】

遺伝子型的には、HBVゲノムは6つの群に分類され、それらは完全ヌクレオチド配列中の8%またはそれ以上の群間多様性(intergroup divergence)に基づいてA~Fと命名されている(Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1992; Magnius and Norder, 1995)。これら6つの異なる遺伝子型は特徴的な地理的

分布を示す：遺伝子型Aは汎発性流行性であるが、北西ヨーロッパ、北米および中央アフリカに最も多く；遺伝子型Bはインドネシア、中国およびベトナムにおいて最も多く見られ；遺伝子型Cは東アジア、韓国、中国、日本、ポリネシアおよびベトナムにおいて見られ；遺伝子型Dもまた多かれ少なかれ汎発性流行性であるが、地中海地方および中東ないしインドにおいて優勢であり；遺伝子型Fはアメリカ土着民およびポリネシアにおいて見られる（Van Geyt et al., Magnius & Norder, 1995）。いくつかの研究は、HBVが流行している特定の集団において、より高いHBVの可変性が予想されうるということを示している（Bowyer et al., 1997; Carman et al., 1997）。フランスおよび米国において現在行われているHBV遺伝子型に関する研究において、ユニークな型認識ができなかったHBV株が確認された。

【0005】

発明の目的

これまで未同定であったHBV遺伝子型、すなわち遺伝子型Gにユニークな新たなHBVポリ核酸配列を提供することが、本発明の1の目的であり、該遺伝子型は、HBV遺伝子型A、B、C、D、EおよびFとは系統発生的に異なっている。

上記HBVポリ核酸のフラグメントを提供することが本発明のもう1つの目的であり、それはこれまで未同定であったHBV遺伝子型、すなわち遺伝子型Gにユニークであり、既知であるHBV遺伝子型A、B、C、D、EおよびFの配列、あるいは前記配列の相補配列とは異なる少なくとも1個のヌクレオチドまたはヌクレオチドの組み合わせを含む。

遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGに普遍的な上記HBVポリ核酸のフラグメントを提供することが本発明のもう1つの目的である。

生物学的試料中のHBV遺伝子型G特異的ポリ核酸の存在を検出するための方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

HBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGを検出するための普遍的方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

HBV遺伝子型Gに特徴的な核酸または核酸の一部を特異的に配列決定または

特異的に増幅するためのプライマーとして作用しうるオリゴヌクレオチドプライマーを提供することが本発明のもう1つの目的である。

H B V 遺伝子型 A、B、C、D、E、F および G 由来の核酸を配列決定または増幅するためのプライマーとして作用しうる普遍的プライマーを提供することが本発明のもう1つの目的である。

H B V 遺伝子型 G に特徴的な核酸または核酸の一部を特異的に検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして作用しうるオリゴヌクレオチドプローブを提供することが本発明のもう1つの目的である。

H B V 遺伝子型 A、B、C、D、E、F および G 由来の核酸の普遍的検出のためのハイブリダイゼーションプローブとして作用しうる普遍的プローブを提供することが本発明のもう1つの目的である。

H B V 遺伝子型決定のための方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

H B V 遺伝子型 G に特徴的な核酸または核酸の一部を検出するための診断キットを提供することが本発明のもう1つの目的である。

H B V 遺伝子型 A、B、C、D、E、F および G の普遍的検出のための診断キットを提供することが本発明のもう1つの目的である。

H B V 遺伝子型 G に特異的なポリペプチドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

遺伝子型 A、B、C、D、E、F および G に特徴的な普遍的ペプチドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のポリペプチドの製造のための方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のペプチドの発現を可能にする発現ベクターを提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供することが本発明のもう1つの目的である。

これまで未同定であった H B V 遺伝子型に特異的な抗体または H B V 遺伝子型 A、B、C、D、E、F および G を認識する抗体の検出方法を提供することが本

発明のもう1つの目的である。

これまで未同定であったHBV遺伝子型に特異的な抗体の検出またはHBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGを認識する抗体の検出のための診断キットを提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のペプチドの特異的に結合する抗体またはリガンドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

遺伝子型GのHBVポリメラーゼ、X蛋白、preCore、HBcAg、HBeAg、preS1、preS2またはHBsAg蛋白を特異的に認識する抗体またはリガンドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGのHBVポリメラーゼ、X蛋白、preCore、HBcAg、HBeAg、preS1、preS2またはHBsAg蛋白を認識する抗体またはリガンドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のポリペプチドの検出方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のポリペプチドの検出を可能にする診断キットを提供することが本発明のもう1つの目的である。

HBV感染を予防または治療するためのモノクローナル抗体を提供することが本発明のもう1つの目的である。

HBV感染の予防または治療のためのワクチンまたは医薬組成物を提供することが本発明のもう1つの目的である。

HBV感染の予防または治療に使用できる化合物または作用剤を同定する方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

薬剤スクリーニングアッセイにおいて使用するためのHBV遺伝子型G感染クローンを提供することが本発明のもう1つの目的である。

【0006】

【表1】

【表 2】

表 1. 増幅および配列決定用プライマー一覧

プライマー	プライマー配列 5'-3'	極性	ドメイン	位置	配列番号
HBPr 1	GGGTCACCATATCTTGGG	S	HBPol	2850-2868	21
HBPr 2	GAACAAGAGCTACAGCATGGG	S	HBPol/PreS1	2867-2888	22
HBPr 3	CCACTGCATGGCCTGAGGATG	AS	PreS1/S2/HBPol	3226-3246	23
HBPr 7	CTCCACAG(A/T)AGCTCCAAATTC	AS	Core	1958-1978	24
HBPr 14	TGGGGTGGAGCCCTCAG	S	PreS1/HBPol	3104-3120	25
HBPr 33	CTGAGGGCTCCACCCCA	AS	PreS1/HBPol	3104-3120	26
HBPr 75	CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTC	S	HBsAg	455-477	27
HBPr 86	ACATAAGAGGACTCTTGGAC	S	HBX	1652-1671	28
HBPr 87	TACTTCAAAGACTGTGTGTTA	S	HBX	1704-1723	29
HBPr 94	GGTA(A/T)AAAGGGACTCA(C/A)GATG	AS	HBPol/HBsAg	775-795	30
HBPr 108	TTTTTCACCTCTGCCTAATC	S	HBX/PreCore	1821-1840	31
HBPr 109	AAAAAGTTGCATGGTGCTGG	AS	HBX/PreCore	1806-1825	32
HBPr 110	CCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAAC	S	HBPol	1255-1279	33
HBPr 111	CTGCGAGGGGAGGGAGTTCTTCTTC	AS	Core/HBPol	2406-2430	34
HBPr 113	CCGGCAGATGAGAAGGCACAGACGG	AS	HBX/HBPol	1549-1574	35
HBPr 134	TGCTGCTATGCCTCATCTTC	S	HBPol/HBsAg	414-433	36

表1のつづき

プライマー	プライマー配列 5'-3'	極性	ドメイン	位置	配列番号
HBPr 135	CA(A/G)AGACAAAAGAAAATTGG	AS	HBPol/HBsAg	803-822	37
HBPr 303	CCCACCTTATGAGTCCAAGG	AS	HBPol	2493-2512	38
HBPr 374	GTTCCGCAGTATGGATCGGCAGAGG	AS	HBPol	1255-1279	39
HBPr 440	TATGGATGATGTGGTATTGGG	S	HBPol/HBsAg	738-758	40
HBPr 446	GGAGTGTGGATTCCCACTCC	S	Core	2303-2323	41
HBPr 448	CCCATGCTGTAGCTCTTGTTC	AS	HBPol PreS1	2868-2888	42

S = センセンスプライマー; A S = アンチセンスプライマー.

【0007】

【表3】

表2. HBVに感染した121個体から得られた遺伝子型決定のまとめ

遺伝子型	A	B	C	D	E	F	G	合計
フランス	18	0	2	16	1	0	2	39
米国ジョージア州	48	4	12	7	0	0	11	82
合計	66(54%)	4(3%)	14(12%)	23(19%)	1(1%)	0(0%)	13(11%)	121(100%)

【0008】

発明の詳細な説明

本発明は、これまで未同定であったHBV遺伝子型にユニークであり、HBV遺伝子型A、B、C、D、EおよびFとは系統発生的に異なるヌクレオチド配列を有する単離および/または精製HBVポリ核酸に関するものであり、該ポリ核酸は、

(a) 図1(配列番号:1)で定義された配列;または

(b) 図1で定義された配列に対して少なくとも90%、より好ましくは91%、最も好ましくは92%の同一性を有する配列;または

(c) (a)および(b)で定義された配列に対する遺伝学的コードの縮重の結果としての配列

により特徴づけられる。

【0009】

1のウイルス株が他のすべてのHBVゲノムと8%よりも多く異なる場合に、HBVの「個々の遺伝学的群」または「系統発生的に異なる遺伝子型」を定義することができる(Okamoto et al., 1988; Norder et al., 1994)。かくして、ゲノム全体に関して他の単離体とは8%よりも多く異なっているウイルス株(あり得る欠失または挿入に絞られない)は新たな遺伝子型として分類される。いくつかの疫学的研究から得られた結果(Blitz et al., 1998; Norder et al., 1994; Magnius and Norder, 1995; Telenta et al., 1997; Alvarado-Esquivel et

al., 1998) に基づいて、HBVの6つの主要な遺伝学的群(A、B、C、D、EおよびF)が認識された。これらの通常に見出される遺伝子型の検出とは別に、米国のアトランタ、フランスのリヨンからの慢性HBVキャリア由来の試料に関する流行の研究において、発明者らは、完全ゲノムにおいて少なくとも11.7% (遺伝子型Eに対する新たな遺伝子型)、多くとも15.3% (遺伝子型Fに対する新たな遺伝子型)の多様性を有する新たなウイルスHBV株を単離した。したがって、この新たなウイルスHBV株は新たなHBV遺伝子型Gとして分類された。驚くべきことに、米国におけるこのウイルスの流行はすべての感染の11%を超えるが、以前の分子疫学的研究のすべてにおいて同定されたわけではない。米国の試料におけるこの新たな遺伝子型Gウイルスの優勢な流行に加えて、それはフランスから得られた試料中にも見出された。

【0010】

用語「単離」は、天然環境において共存している成分を伴っていない物質をいう。しかしながら、本発明の単離核酸は異種細胞成分または標識等を含みうることは明らかなはずである。

【0011】

用語「核酸」または「ポリ核酸」は本明細書において混用され、1本鎖または2本鎖形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーをいい、天然に存在するヌクレオチドと類似の様式で核酸にハイブリダイゼーションする天然ヌクレオチドの既知アナログを包含しうる。該用語は特に、図1において定義されるDNA配列および配列番号：1により与えられるDNA配列またはそれらの相補鎖をいう。新たなHBV遺伝子型Gに属し、図1に示すヌクレオチド配列とは10%、より好ましくは9%、最も好ましくは8%またはそれ未満の相違がある、あるいは図1に示す配列に対して少なくとも90%、より好ましくは91%、最も好ましくは92%同一であるすべてのHBV核酸は本発明の範囲内である。

【0012】

「別の核酸配列とは10%、9%、8%またはそれ未満の相違がある」核酸は、その全ヌクレオチドのそれぞれ10%、9%、8%またはそれ未満が、それと

比較される核酸配列のヌクレオチドと異なる核酸である。

「別の核酸配列に対して少なくとも90%、91%、または92%同一である」核酸は、その全ヌクレオチドのそれぞれ少なくとも90%、91%、または92%が、それと比較される核酸配列のヌクレオチドと同一である核酸である。

【0013】

遺伝学的コードの縮重の結果として、図1に示す配列に対して90%未満、より好ましくは91%未満、最も好ましくは92%未満の同一性を示す核酸配列は、新たな遺伝子型Gに属するHBV株のヌクレオチド配列によりコードされる蛋白と同じ蛋白をコードしうる。それゆえ、遺伝学的コードの縮重の結果としてのこれらの核酸配列もまた本発明の範囲内にある。

【0014】

既知HBV遺伝子型とは対照的に、新たに同定された遺伝子型Gに属する本発明のHBV配列の完全ゲノムは3248bpの長さであることがわかった(図4)。そのpreCore領域は、コドン2(CAAのかわりにTAA)およびコドン28(TGGのかわりにTAG)に翻訳停止コドンを含む。そのCore領域は585ヌクレオチドの長さであり、195個のアミノ酸のCore蛋白をコードし、さらにそのpreCore領域は36bpのヌクレオチド挿入を含む。該挿入はCore翻訳開始点(位置1901のA)に続く5個のヌクレオチドの後に存在する。遺伝子型Aを除く他のすべての遺伝子型と同様に、遺伝子型Gに属するHBV配列は、HBcAg ORFのカルボキシ末端部分中に6個のヌクレオチドの欠失を示す(図4および5)。そのpreS1領域は354bp(118個のアミノ酸)を含み、そのpreS2領域は165bp(55個のアミノ酸)を含み、そのHBsAg領域は678bp(226個のアミノ酸)を含む(図6)。遺伝子型Eと同様に、遺伝子型Gに属するHBV配列はpreS1のアミノ末端部分中に3個のヌクレオチドの欠失(位置11における1個のアミノ酸;図6)を示す。

【0015】

したがって、本発明は、特に、下記の特徴の少なくとも1つにおいてHBV遺伝子型A、B、C、D、EまたはFとはヌクレオチド配列が異なっていることを

さらに特徴とする上記HBVポリ核酸に関する：

(a) 3248塩基対の長さを有する；

(b) preCore領域のアミノ酸2および28における翻訳停止コドン
をコードする；

(c) Core領域のN末端部分に36個のヌクレオチドのインサートを有す
る；

(d) HBcAg ORFのC末端部分に6個のヌクレオチドの欠失を有する

；

(e) preS1 ORFのN末端部分に3個のヌクレオチドの欠失を有する

。

かくして、この特別な具体例において、本発明のHBVポリ核酸配列は上記特
徴のうち1、2、3、4または5つを有する。

【0016】

より特別な具体例において、本発明は、下記配列(図7および8)のうち少な
くとも1つを含む上記HBVポリ核酸に関する：配列番号：44、配列番号：4
5、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48、配列番号：49、配列
番号：50、配列番号：51、配列番号：53、配列番号：54、配列番号：5
5、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：58、配列番号：59、配列
番号：60。

【0017】

さらに本発明は、これまで未同定であったHBV遺伝子型Gにユニークであり
、既知のHBV遺伝子型A、B、C、D、EまたはFとは異なるヌクレオチド少
なくとも1つのヌクレオチドまたはヌクレオチドの組み合わせを含むことを特徴
とする上記ポリ核酸のフラグメント、あるいは該フラグメントの相補物に関し、
ただし、該フラグメントは図2に示すpreC/C遺伝子配列(配列番号：7)
または図3に示すpreS/S遺伝子配列(配列番号：8)とは等しくない。

【0018】

Tran et al. (1991)は、本発明の株のpreS/SおよびpreC/C配列と
は、たまたま8%未満異なるHBV組み換え株のpreS/SおよびpreC/C

C配列を記載している。しかしながら、新たに同定された本発明のHBV遺伝子型Gとは対照的に、この非定型ウイルス株は、preS/SおよびpreC/C遺伝子の転位とともに、HBVの出現およびHBVによるテイクオーバー (take over) のイベントの文脈において記載された (Tran et al., 1991)。この非定型HBV株は決して新たな株としては認識されなかった。かかる組み換えイベント (Tran et al. 1991に記載されたような) に関して遺伝子型Gの配列を研究するために、本発明者らは、かかるイベントに関して完全FR1ゲノムをヌクレオチドレベルで調べ、さらに他の既知遺伝子型に関するコ-セグレーション (co-segregation) に関して系統発生的に調べた。組み換えの証拠は見出されなかった。新たに単離された株における組み換えイベントの不存在およびこの新たなウイルス変種の高い流行性は、それが新たなHBV遺伝子型に関するものであることを示す。Tran et al. (1991)により記載されたたまたま相同的であるHBV配列は組み換えイベントの結果生じたものに過ぎず、本発明から除かれる。したがって、図2に示すHBV preC/C遺伝子配列 (配列番号: 7; 受託番号M74501; Tran et al. 1991) および図3に示すpreS/S遺伝子配列 (配列番号: 8; 受託番号M74499; Tran et al. 1991) は本発明の部分を形成しない。同様に、図12に示すHBV preC/C遺伝子配列 (配列番号: Bhat et al. 1990) は本発明の部分を形成しない。Bhat et alによるHBV preC/C配列は、抗-HBcを欠くが過度に高レベルのHBV DNAを血清中に有する慢性キャリアの文脈において開示され議論された。Tran et al (1991) に関しては、新たな遺伝子型の存在との関連は決していない。

【0019】

また本発明は、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGの核酸配列中に含まれる普遍的なフラグメントであることを特徴とする、上記ポリ核酸のフラグメントにも関する。本発明は7種の遺伝子型の核酸アラインメント (alignment) を提供するので、本発明は、初めて、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGに特徴的な普遍的HBV核酸を記載するものである。

【0020】

本明細書の用語「普遍的」は、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、Fおよび

Gに存在する、対応する、あるいは特徴的であることを意味する。

【0021】

本発明のフラグメントは1本鎖または2本鎖であってよい。それは5ないし3247bpの長さである。より好ましくは、このフラグメントは5ないし2600bpの長さ、5ないし1300bpの長さ、5ないし700bpの長さ、5ないし500bpの長さ、5ないし300bpの長さであり、最も好ましくは、5ないし200bpの長さである。本発明のフラグメントをクローニングおよび発現に使用することができ、あるいは本発明のフラグメントをHBVタイピング法（typing method）におけるプライマーまたはプローブとして使用することができる。

【0022】

それゆえ本発明は上記フラグメントを含むオリゴヌクレオチドプライマーに関し、該プライマーはHBV遺伝子型G特異的プライマーであり、HBV遺伝子型Gに特徴的な核酸または核酸の部分を特異的に配列決定または特異的に増幅するためのプライマーとして作用しうる。また本発明は上記フラグメントを含むオリゴヌクレオチドプライマーに関し、該プライマーは普遍的プライマーであり、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびG由来の核酸の配列決定または増幅用のプライマーとして作用しうる。用語「プライマー」は、コピーされる核酸鎖に相補的なプライマー伸長生成物の合成のための開始点として作用しうる1本鎖オリゴヌクレオチド配列をいう。プライマーの長さおよび配列は、それらが伸長生成物の合成をプライムできるものでなくてはならない。好ましくは、プライマーの長さは約5ないし50ヌクレオチドである。より好ましくは、プライマーの長さは約20ないし25ヌクレオチドである。個々の長さおよび配列は、必要とされるDNAまたはRNA標的の複雑さならびにプライマーが使用される条件、例えば、温度およびイオン強度による。

【0023】

また本発明は上記フラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブに関し、該プローブはHBV遺伝子型G特異的プローブであり、HBV遺伝子型Gに特徴的な核酸または核酸の部分を特異的に検出するためのハイブリダイゼーションプロ

ープとして作用しうる。また本発明は上記フラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブにも関し、該プローブは普遍的プローブであり、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびG由来の核酸に対するハイブリダイゼーションプローブとして作用しうる。用語「プローブ」は、HBVゲノム中の標的配列に相補的な1本鎖の配列特異的オリゴヌクレオチドである。好ましくは、これらのプローブは約5ないし50ヌクレオチドの長さ、より好ましくは約10ないし25ヌクレオチドの長さである。プローブの特に好ましい長さは10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドである。本発明のプローブ中に使用されるヌクレオチドはリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドならびにイノシンのごとき修飾ヌクレオチド、あるいはそれらのハイブリダイゼーション特性を本質的に変化させない修飾された基を含むヌクレオチドであってよい。

【0024】

対応ヌクレオチド配列を含む組み換えプラスミドのクローニング、次いで、必要ならば、十分なヌクレアーゼを用いてクローニングしたプラスミドからプライマーおよび/またはプローブを切り出し、例えば分子量による分画によりプライマーおよび/またはプローブを回収することより本発明のプローブおよび/またはプライマーを製造することができる。本発明のプライマーおよび/またはプローブを、例えば、慣用的なホスホ-トリエステル法により化学合成してもよい。それらは分枝DNA捕捉または検出プローブ(Sanchez-Pescador et al., 1988; Urdea et al., 1991)の部分であってもよい。

【0025】

本発明のプライマーおよび/またはプローブを標識してもよい。当業者に知られた方法により標識を行ってもよい。標識の性質はアイソトープ(^{32}P 、 ^{35}S 等)または非アイソトープ(ビオチン、ジゴキシゲニン等)であってもよく、あるいは分枝DNAプローブ上にあってもよい。

プライマーおよび/またはプローブとして使用されるオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート(Matsukura et al., 1987)、アルキルホスホロチオエート(Miller et al., 1979)またはペプチド核酸(Nielsen et al., 1991; Nielsen

et al., 1993)のごときヌクレオチドアナログを含んでいてもよく、あるいはそれらからなってもよく、あるいはインターカーレーション剤 (Asseline et al., 1984) を含んでいてもよい。これらの修飾の導入は、オリゴヌクレオチド分子のハイブリダイゼーション動態、ハイブリッド形成の可逆性、生物学的安定性等のごとき特性に正の影響を及ぼすために有利でありうる。

【0026】

プライマーおよび/またはプローブの元のDNA配列中に導入される他の大部分の変化または修飾として、これらの変化は、オリゴヌクレオチドを用いて必要な特異性および感度を得るべき条件に関する適合が必要であろう。しかしながら、これらの修飾オリゴヌクレオチドのプライミングあるいはこれらとのハイブリダイゼーションの最終結果は未修飾オリゴヌクレオチドを用いて得られる結果と必然的に同一となるべきである。

【0027】

本発明の好ましい具体例において、プローブおよび/またはプライマーは図1に示す標的配列の1つを認識する。

【0028】

本発明の用語、プローブおよび/またはプライマーの「標的配列」は、新たに同定された遺伝子型Gのゲノム中の配列であって、該配列はそれら自体新たに同定された遺伝子型Gユニークな1またはそれ以上のヌクレオチドまたは組み合わせを含み、プローブまたはプライマーが相補的または部分的に相補的(すなわち、20%まで、より好ましくは15%まで、より好ましくは10%まで、あるいは最も好ましくは5%までのミスマッチ)である配列をいう。該標的配列はいくつかの場合において適切な標的配列でもあることを理解すべきである。核酸の標的配列に特異的にハイブリダイゼーションするように設計されたプローブは該標的配列に包含されてもよく、あるいは該標的配列と重複する長い鎖であってもよい(すなわち、該標的配列の外側ならびに内側のヌクレオチドと二本鎖を形成する)。

【0029】

本発明の非常に特異的な具体例において、標的配列は、HBV遺伝子型GのC

ore領域のN - 末端部分中の、下記の36ヌクレオチドのインサート中において選択される：

TAGAACAACCTTTGCCATATGGCCTTTTTGGCTTAGA (SEQ ID NO 61)

【0030】

より詳細には、本発明のプライマーおよび/またはプローブは1またはそれ以上の下記配列を認識する：

TAGAA (SEQ ID NO 62);

AGAAC (SEQ ID NO 63);

GAACA (SEQ ID NO 64);

AACAA (SEQ ID NO 65);

ACAAC (SEQ ID NO 66);

CAACT (SEQ ID NO 67);

AACTT (SEQ ID NO 68);

ACTTT (SEQ ID NO 69);

CTTTG (SEQ ID NO 70);

TTTGC (SEQ ID NO 71);

TTGCC (SEQ ID NO 72);

TGCCA (SEQ ID NO 73);

GCCAT (SEQ ID NO 74);

CCATA (SEQ ID NO 75);

CATAT (SEQ ID NO 76);

ATATG (SEQ ID NO 77);

TATGG (SEQ ID NO 78);

ATGGC (SEQ ID NO 79);

TGGCC (SEQ ID NO 80);

GGCCT (SEQ ID NO 81);

GCCTT (SEQ ID NO 82);

CCTTT (SEQ ID NO 83);

CTTTT (SEQ ID NO 84);

TTTTT (SEQ ID NO 85);
TTTTG (SEQ ID NO 86);
TTTGG (SEQ ID NO 87);
TTGGC (SEQ ID NO 88);
TGGCT (SEQ ID NO 89);
GGCTT (SEQ ID NO 90);
GCTTA (SEQ ID NO 91);
CTTAG (SEQ ID NO 92);
TTAGA (SEQ ID NO 93);
TAGAAC (SEQ ID NO 94);
AGAACA (SEQ ID NO 95);
GAACAA (SEQ ID NO 96);
AACAA (SEQ ID NO 97);
ACAAC (SEQ ID NO 98);
CAACTT (SEQ ID NO 99);
AACTTT (SEQ ID NO 100);
ACTTTG (SEQ ID NO 101);
CTTTGC (SEQ ID NO 102);
TTTGCC (SEQ ID NO 103);
TTGCCA (SEQ ID NO 104);
TGCCAT (SEQ ID NO 105);
GCCATA (SEQ ID NO 106);
CCATAT (SEQ ID NO 107);
CATATG (SEQ ID NO 108);
ATATGG (SEQ ID NO 109);
TATGGC (SEQ ID NO 110);
ATGGCC (SEQ ID NO 111);
TGGCCT (SEQ ID NO 112);
GGCCTT (SEQ ID NO 113);

GCCTTT (SEQ ID NO 114);
CCTTTT (SEQ ID NO 115);
CTTTTT (SEQ ID NO 116);
TTTTTG (SEQ ID NO 117);
TTTTGG (SEQ ID NO 118);
TTTGGC (SEQ ID NO 119);
TTGGCT (SEQ ID NO 120);
TGGCTT (SEQ ID NO 121);
GGCTTA (SEQ ID NO 122);
GCTTAG (SEQ ID NO 123);
CTTAGA (SEQ ID NO 124);
TAGAACA (SEQ ID NO 125);
AGAACAA (SEQ ID NO 126);
GAACAAC (SEQ ID NO 127);
AACAACT (SEQ ID NO 128);
ACAACCT (SEQ ID NO 129);
CAACTTT (SEQ ID NO 130);
AACTTTG (SEQ ID NO 131);
ACTTTGC (SEQ ID NO 132);
CTTTGCC (SEQ ID NO 133);
TTTGCCA (SEQ ID NO 134);
TTGCCAT (SEQ ID NO 135);
TGCCATA (SEQ ID NO 136);
GCCATAT (SEQ ID NO 137);
CCATATG (SEQ ID NO 138);
CATATGG (SEQ ID NO 139);
ATATGGC (SEQ ID NO 140);
TATGGCC (SEQ ID NO 141);
ATGGCCT (SEQ ID NO 142);

TGGCCTT (SEQ ID NO 143);
GGCCTTT (SEQ ID NO 144);
GCCTTTT (SEQ ID NO 145);
CCTTTTT (SEQ ID NO 146);
CTTTTTG (SEQ ID NO 147);
TTTTTGG (SEQ ID NO 148);
TTTTGGC (SEQ ID NO 149);
TTTGGCT (SEQ ID NO 150);
TTGGCTT (SEQ ID NO 151);
TGGCTTA (SEQ ID NO 152);
GGCTTAG (SEQ ID NO 153);
GCTTAGA (SEQ ID NO 154);

【0031】

また本発明は、生物学的試料中の新たなHBV遺伝子型Gの存在を検出するための方法における、本発明のHBV遺伝子型特異的プライマーおよび/またはプローブの使用に関する。

また本発明は、生物学的試料中のHBVの存在を検出するための普適的方法における、本発明の普適的プライマーおよび/またはプローブの使用に関する。

さらに本発明は、本発明は、下記工程を含むことをさらに特徴とする上記方法に関する：

- (i) 可能には、生物学的試料中に存在する核酸を抽出すること；
- (ii) HBV遺伝子型Gに特徴的な核酸を増幅すること；
- (iii) HBV遺伝子型Gに特徴的な増幅された核酸を検出すること。

【0032】

増幅に使用されるプライマーは一般的プライマーであってもよく、あるいは遺伝子型G特異的プライマーであってもよい。一般的プライマーは、遺伝子型Gに属する株に由来するDNAならびに他のHBV遺伝子型に属する他の株に由来するDNAの増幅を可能にする。対照的に、遺伝子型G特異的プライマーは遺伝子型Gに属する株に由来する核酸の増幅のみを可能にする。これらの遺伝子型G特

異的プライマーも本発明の範囲内にある。

【0033】

さらに本発明は、生物学的試料中のHBVの存在に関する普遍的検出方法に関する。

より詳細には、本発明は、下記工程を含むことをさらに特徴とする、上記普遍的方法に関する：

(i) 可能には、生物学的試料中に存在する核酸を抽出すること；

(ii) 核酸を増幅すること；

(iii) 増幅された核酸を検出すること。

該普遍的方法における増幅に使用されるプライマーは、すべての遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGに由来するDNAの増幅を可能にするものである。

【0034】

本発明の用語「生物学的試料」は、感染したヒトから直接採取された生物学的材料（組織または体液）、あるいはHBV核酸配列を含む生物を培養した後に得られた材料をいう。生物学的材料は、例えばいずれかの種類の吐出物、血液、皮膚組織、生検、精子、リンパ球血液培養材料、コロニー、液体培養物、糞試料、尿、肝細胞等であってよい。より詳細には、「生物学的試料」は、血清または血漿試料をいう。

【0035】

当該分野で知られたいずれかの方法により、生物学的試料から核酸が遊離、濃縮および/または単離される。現在では、血液試料からの核酸の単離にはQiagenのQIAamp Blood KitおよびHigh pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Belgium) のごとき種々の市販キットが利用できる。生物学的試料からのDNAまたはRNAの単離のための、他のよく知られた方法を用いてもよい (Sambrook et al., 1989)。

【0036】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR; Saiki et al., 1988)、リガーゼ連鎖反応 (LCR; Landgren et al., 1988; Wu and Wallace, 1989; Barany, 1991)、核酸配列に基づく増幅 (NASBA; Guatelli et al., 1990; Compton, 1991)、転写に基づ

く増幅系 (TAS; Kwoh et al., 1989)、鎖置換反応 (SDA; Duck, 1990) または Q レプリカーゼによる増幅 (Lomeli et al., 1989) により、あるいは当該分野において知られた他の適当な方法により本発明の核酸を増幅することができ、それらの方法は核酸分子の増幅を可能にするものである。また、TMA (Guatelli et al., 1990) または bDNA (Sanchez-Pescador et al., 1988; Urdea et al., 1991) 法を本発明方法に用いることもできる。

【0037】

次いで、この増幅工程の生成物を試料中に存在する核酸の存在の検出および/またはタイピングに使用することができる。これらの核酸の存在およびタイピングに関する分析を、PCR生成物の2本鎖分析 (Clay et al., 1994)、PCR生成物の1本鎖コンホメーション多型分析 (PCR-SSCP; Yoshida et al., 1992)、配列に基づくタイピング (SBT; Santamaria et al., 1992 and 1993)、PCR反応における配列特異的プライマーの使用 (PCR-SSP; Olerup and Zetterquist, 1991)、配列特異的オリゴヌクレオチドプロービングと組み合わせたPCRの使用 (PCR-SSOP; Saiki et al., 1986)、TMSまたはbDNA法のごとき当該分野で知られたいすれかの方法により行うことができる。Sanger et al (1977)の酵素ジデオキシ法またはMaxam and Gilbert (1977, 1980)の化学的方法のごときいすれかの既知の配列決定法により配列決定を行うことができる。サーマル-サイクル配列決定、固相配列決定および自動配列決定のためのキットおよび/または道具が市販されている。最近、5'および3'方向の同時配列決定法が出現した。自動配列決定のいくつかの例はMicroGene Clipper™ 2 Dye and the MicroGene Blaster™ from the OpenGene™ system (Visible Genetics Inc., Toronto, Ontario, Canada) および the ABI PRISM (登録商標) system (Perkin Elmer Inc., PE Biosystems, PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA)である。生物学的試料中の核酸とオリゴヌクレオチドプローブとの間のハイブリッド形成に依存するアッセイ方法としてはサザンプロット、ノーザンプロットまたはドットプロットフォーマット (Saiki et al., 1989)等があり、未標識の増幅された試料が膜に結合され、膜には少なくとも1種の標識プローブが含まれており、適当なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下で結合された

プローブがモニターされる。別法は「逆」フォーマットであり、増幅された配列が標識を含む。このフォーマットにおいて、選択されたプローブが固体支持体上の特定位置に固定化され、精製したハイブリッドの検出を可能にするために増幅されたポリ核酸が標識される。用語「固体支持体」は、オリゴヌクレオチドプローブがカップリングされる基材であるといえるが、ただし、ハイブリダイゼーションのバックグラウンドレベルは低いままである。通常には、固体支持体はマイクロタイタープレート（例えば、DEIA法に用いるもの）、膜（例えば、ナイロンまたはニトロセルロース）または微小球（ビーズ）またはチップであろう。膜への適用または固定の前に、核酸プローブを修飾して固定を容易にし、ハイブリダイゼーション効率を改善することが都合良いかもしれない。かかる修飾はホモポリマーテイリング、脂肪族基、NH₂基、SH基、カルボキシル基を包含しうるものであり、あるいはビオチン、ハプテンまたは蛋白とのカップリングを包含しうる。

【0038】

かくして本発明の好ましい具体例は、下記工程を含むことをさらに特徴とする上記方法に関する：

(i) 可能には、生物学的試料中に存在する核酸を抽出すること；

(ii) 核酸を増幅すること；

(iii) 可能には、変性条件下、適当な条件下において1またはそれ以上のプローブに核酸をハイブリダイゼーションさせること、ここに可能には該プローブは固体基材に結合される；

(iv) 可能には、適当な条件下で洗浄すること；

(v) 生成したハイブリッドを検出すること。

【0039】

迅速かつ簡単な結果を得るために、複数のプローブを用いる場合には、逆ハイブリダイゼーションフォーマットが都合良いかもしれない。この好ましい具体例において、選択されたプローブは固体支持体上の特定位置に固定化され、生成したハイブリッドの検出を可能にするために増幅された核酸が標識される。

【0040】

さらに本発明は、上記方法に使用される、下記成分を含む診断キットに関する：

(i) 適当な場合には、試料中に存在する核酸を遊離、単離または濃縮するための手段；

(i i) 可能には、本発明のプライマーセットまたはプライマーミックス；

(i i i) 試料中に存在する核酸の検出またはタイピングのための手段。

【0041】

本発明は特に上記診断キットに関するものであり、該キットは本発明の少なくとも1のプライマーおよび/または少なくとも1のプローブを含む。特別かつ非常にユーザーフレンドリーな診断キットは、下記成分を含むラインプローブアッセイ (Stuyver et al., 1996) である：

(i) 適当な場合には、該試料中に存在する核酸を遊離、単離または濃縮するための手段；

(i i) 可能には、本発明のプライマーセットまたはプライマーミックス；

(i i i) 固体支持体に固定された、HBV遺伝子型Gに特徴的な核酸と特異的にハイブリダイゼーションする少なくとも1のプローブ、または少なくとも1の普遍的プローブ；

(i v) ハイブリダイゼーションバッファー、または該バッファーを製造するに必要な成分；

(v) 洗浄溶液、または該溶液を製造するに必要な成分；

(i v) 適当な場合には、上記ハイブリダイゼーションから得られるハイブリッドを検出するための手段。

【0042】

この具体例において、選択されたプローブのセットは膜片に線状に固定化される。該プローブを確定した位置に個々に固定化してもよく、あるいは混合物として固定化してもよい。増幅されたHBVポリ核酸をビオチンで標識することができ、次いで、ビオチン-ストレプトアビジンカップリングによる非放射活性的発色システムを用いてハイブリッドを検出することができる。

【0043】

用語「ハイブリダイゼーションバッファー」は、適当なストリンジェンシー条件下において、プローブと、試料中に存在するポリ核酸または増幅生成物との間のハイブリダイゼーションを可能にするバッファーを意味する。

用語「洗浄溶液」は、適当なストリンジェンシー条件下で生成したハイブリッドの洗浄を可能にする溶液を意味する。

【0044】

また本発明は、本発明のポリ核酸によりコードされるアミノ酸配列を有するペプチドまたはポリペプチドに関する。用語「ペプチド」および「ポリペプチド」は本明細書において混用され、アミノ酸(a a)のポリマーをいい、特定の長さの生成物をいわない。かくして、オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチド、蛋白および前駆体はこの定義に含まれる。より詳細には、本発明のポリペプチドは、新たに同定された遺伝子型Gに属するHBV株のpreS1、preS2、表面抗原HBsAg、preCore前駆体蛋白、HBeAg、HBcAg、ポリメラーゼまたはX蛋白のごときHBV遺伝子型G特異的ポリペプチド、あるいはそのいずれかの部分、あるいはそれらの組み合わせであるが、ただし、該ポリペプチドは、遺伝子型A、B、C、D、EまたはFに属するHBV株に由来する既知ポリペプチドとはアミノ酸が少なくとも1個異なる。非常に特別な具体例において、本発明は、遺伝子型GのHBcAgまたはHBeAg、あるいはそのいずれかの部分に関する。12個の付加的なアミノ酸RTTLPYGLFGLD(配列番号:155)をコードするコア領域中のインサートは、HBcAgおよびHBeAgの新規発現機構の原因である可能性があり、ユニークな構造および免疫学的特性を有するコアおよびe抗原が存在する可能性がある。それゆえ、本発明は特に、下記配列の1つを含むHBV遺伝子型GのHBcAgまたはHBeAg由来のペプチドに関する:

RTTLPY (SEQ ID NO 156);

TTLPYG (SEQ ID NO 157);

TLPYGL (SEQ ID NO 158);

LPYGLF (SEQ ID NO 159);

PYGLFG (SEQ ID NO 160);

YGLFGL (SEQ ID NO 161);
GLFGLD (SEQ ID NO 162);
RTTLPYG (SEQ ID NO 163);
TTLPYGL (SEQ ID NO 164);
TLPYGLF (SEQ ID NO 165);
LPYGLFG (SEQ ID NO 166);
PYGLFGL (SEQ ID NO 167);
YGLFGLD (SEQ ID NO 168)

【0045】

さらに本発明は、HBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGのペプチド配列中に含まれることにより特徴付けられる普遍的ペプチドに関する。本発明は7つの遺伝子型のアミノ酸配列アラインメントを提供するので、本発明はHBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGに特徴的な普遍的HBVアミノ酸配列を初めて叙述することを可能にする。

【0046】

糖鎖付加、アセチル化、リン酸化、脂肪酸での修飾等のごとき翻訳後修飾も本発明に包含される。例えば、1またはそれ以上のアミノ酸アナログ（非天然アミノ酸を包含）を含むポリペプチド、置換された結合を有するポリペプチド、ポリペプチドの変異バージョンまたは天然の配列変種、システイン残基間にジスルフィド結合を含むポリペプチド、ビオチン化ポリペプチドならびに当該分野で知られた他の修飾体も定義に包含される。

【0047】

Houbenweyl(1974)およびAtherton and Shepard(1989)により記載された古典的な化学合成あるいはSambrook et al. (1989)により記載された組み換えDNA法のごとき当該分野で知られたいずれの方法によっても本発明のポリペプチドを製造することができる。

【0048】

したがって、本発明は組み換え法により発現された上記ポリペプチドにも関する。用語「組み換え発現」は、後で説明するように原核生物または下等もしくは

高等真核生物においてペプチドが組み換え発現法により製造されるという事実をいう。かくして本発明は、下記工程を含む本発明の組み換えポリペプチドの製造方法にも関する：

(i) 発現ベクターでの適当な細胞宿主の形質転換；

(i i) 発現ベクター中に挿入されたポリ核酸の発現を可能にする条件下で該形質転換された細胞宿主を培養すること；次いで

(i i i) 該ポリペプチドを集めること。

【0049】

それゆえ、原核、真核またはウイルス転写および翻訳制御エレメントに作動可能に連結されたポリ核酸またはその部分を含む発現ベクターも本発明の範囲内に含まれる。用語「発現ベクター」は、プラスミド、コスミド、ファージまたはウイルスDNAのタイプのベクター配列をいい、その中に本発明の核酸が挿入されており、宿主細胞による転写および本発明のポリペプチドの翻訳を促進するための必要なエレメントを含んでいる。

【0050】

本発明は上記発現ベクターで形質転換された宿主細胞にも関する。用語「宿主細胞」は、単細胞体として培養された微生物または高等真核細胞系であって、組み換えベクターのレシピエントとして使用されうる、あるいは使用されている細胞をいう。宿主細胞として使用される原核細胞は、*Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus* または *Streptomyces* のごとき細菌から選択される。好ましい下等真核宿主細胞は酵母であり、特に *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* (例えば *Pichia pastoris*), *Hansenula* (例えば *Hansenula polymorpha*), *Yarrowia*, *Schwanniomyces*, *Zygosaccharomyces* 等に含まれる種である。*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis* および *K. lactis* は最も通常に使用される酵母宿主である。真菌宿主細胞としては *Neurospora crassa* 等がある。高等真核生物由来の宿主細胞としては、哺乳動物、爬虫類、昆虫等のごとき高等動物由来の細胞がある。現在のところ、好ましい高等真核宿主細胞はチャイニーズハムスター (例えば、CHO)、サル (例えば、COS および Ver o 細胞)、乳児ハムス

ター腎臓 (B H K)、ブタ腎臓 (P K 1 5)、ウサギ腎臓 1 3 細胞 (R K 1 3)、ヒト骨肉種細胞系 1 4 3 B、ヒト細胞系 H e L a および H e p G 2 のときヒトヘパトーマ細胞系、ならびに昆虫細胞系 (例えば、Spodoptera frugiperda) である。宿主細胞はフラスコ培養物のような懸濁物、組織培養物、器官培養物等の形態で提供されうる。

【 0 0 5 1 】

組み換えペプチドに関して知られた精製方法のいずれかを用いて本発明の組み換えペプチドを製造することができる。

【 0 0 5 2 】

また本発明は、生物学的試料中に存在するこれまで未同定であった H B V 遺伝子型 G に特異的な抗体、好ましくはこれまで未同定であった H B V 遺伝子型 G の H B c A g および / または H B e A g に特異的な抗体を検出する方法における、本発明の H B V 遺伝子型 G 特異的ポリペプチドの使用に関する。

【 0 0 5 3 】

また本発明は、生物学的試料中に存在するこれまで未同定であった H B V 遺伝子型 G に特異的な抗体、好ましくはこれまで未同定であった H B V 遺伝子型 G の H B c A g および / または H B e A g に特異的な抗体を検出する方法に関し、該方法は下記工程を含む：

(i) 生物学的試料を本発明の H B V 遺伝子型 G 特異的ポリペプチドと接触させ；

(i i) 該抗体と該ポリペプチドとの間に形成された免疫学的複合体を検出する。

【 0 0 5 4 】

また本発明は、生物学的試料中に存在する遺伝子型 A、B、C、D、E、F および G に特異的な抗体を検出する普遍的方法に関し、該方法は下記工程を含む：

(i) 生物学的試料を本発明の普遍的ポリペプチドと接触させ；

(i i) 該抗体と該ポリペプチドとの間に形成された免疫学的複合体を検出する。

【 0 0 5 5 】

また本発明は、生物学的試料のHBV遺伝子型決定のための普遍的方法に関し、該方法は下記工程を含む：

(i) 生物学的試料を本発明の少なくとも1のポリペプチドと接触させ；

(i i) 該抗体と該ポリペプチドとの間に形成された免疫学的複合体を検出する。

【0056】

イムノアッセイの設計については当該分野で知られた多くの変法および多くのフォーマットがある。例えば、プロトコルは固体支持体を用いるものであってもよく、あるいは免疫沈降を用いるものであってもよい。大部分のアッセイは標識ポリペプチドの使用を含む。標識は、例えば、酵素、蛍光、化学発光、放射活性、あるいは色素分子であってもよい。免疫複合体からのシグナルを増幅するアッセイは、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、ならびにELISAのごとき酵素 - 標識および媒介イムノアッセイの使用を包含する。

【0057】

イムノアッセイは、限定するものではないが、均一 (homogeneous) または不均一 (heterogeneous) フォーマットにおけるものであってよく、標準的または競争的なタイプであってもよい。不均一フォーマットにおいて、典型的には、ポリペプチドは固体マトリックスまたは支持体に結合されて、インキュベーション後のポリペプチドからの試料の分離を容易なものとされる。使用されうる固体支持体の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)、塩化ポリビニル (例えば、シートまたはマイクロタイターウェルの形態)、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の形態)、フッ化ポリビニリデン (Immunolon™として知られる)、ジアゾ化濾紙、ナイロン膜、活性化ビーズ、ならびにプロテインAビーズである。例えば、Dynatech Immunolon™ 1 または Immunolon™ 2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) を不均一フォーマットに使用することができる。抗原ペプチドを含む固体支持体は、典型的には、それを生物学的試料から分離した後、結合抗体の検出前に洗浄される。標準的および競争的フォーマットはいずれも当該分野において知られている。

【0058】

均一フォーマットにおいて、溶液中で試験試料を抗原混合物とともにインキュベーションする。例えば、生成した抗原抗体を沈殿させる条件下であってもよい。これらのアッセイのための標準的および競争的フォーマットはいずれも当該分野において知られている。

【0059】

また本発明は、上記方法において使用される診断キットにも関し、該キットは本発明の少なくとも1のポリペプチドを含み、可能には該ポリペプチドは固体支持体に結合するものである。好ましい具体例において、該キットは一定範囲の該ポリペプチドを含んでいてもよく、該ポリペプチドは固体支持体上の特定位置に結合される。より好ましくは、該固体支持体は膜片であり、該ポリペプチドは平行線の形態で膜にカップリングされる。

【0060】

さらに本発明は、ワクチンまたは医薬中の活性物質として使用される本発明のポリペプチドに関する。あるいはまた、本発明の抗体に特異的に結合する抗-イディオタイプ抗体を免疫原として用いることもできる。

さらに本発明は、HBV感染の予防または治療のためのワクチンの製造のための、上記ポリペプチドまたは抗-イディオタイプ抗体の使用に関する。

【0061】

また本発明は、本発明のポリペプチドまたは抗-イディオタイプ抗体を活性物質として含むワクチン組成物であって、HBV感染に対抗するためにヒト（または非ヒト哺乳動物）に接種可能なワクチン組成物あるいはHBVを有するヒト（または非ヒト哺乳動物）に治療的に接種可能なワクチン組成物に関する。用語「ワクチン」または「ワクチン組成物」は、不完全または完全にHBVに対する防御を誘発しうる免疫学的組成物に関するものである。用語「活性物質として」は、HBVに対する防御を誘発するワクチン組成物の成分に関するものである。活性物質（すなわち、本発明のポリペプチド）をそのようなものとして、ビオチン化形態として使用でき（W093/18054において説明されているように）、そして/あるいは製造者（Molecular Probes Inc., Eugene, OR）の指示に従ってNeutral

ite Avidinと複合体化させることができる。「ワクチン」または「ワクチン組成物」が、活性物質のほかに、組成物を与えられる個体に有害な抗体の産生を誘発せず、防御も誘発しない適当な賦形剤、希釈剤、担体および/またはアジュバントを含むことにも注意すべきである。適当な担体は、典型的には、大型のゆっくりと代謝される高分子、例えば蛋白、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマーおよび不活性ウイルス粒子である。かかる担体は当業者によく知られている。組成物の有効性を増大させる好ましいアジュバントとしては、水酸化アルミニウム、WO 93/19780に記載されたような3-0-デアシル化モノホスホリルリピドAとの混合物となっているアルミニウム、WO 93/24148に記載されたようなリン酸アルミニウム、米国特許第4,606,918号に記載されたようなN-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミル-L-アアニン2(1'2'ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)エチルアミン および モノホスホリルリピドAを含有するRIB I (ImmunoChem Research Inc., Hamilton, MT)、無毒化エンドトキシン、トレハロース-6,6-ジミコレート、ならびに 2%スクアレン/Tween 80 エマルジョン中の細胞壁骨格 (MPL + TDM + CWS) があるが、これらに限らない。3つの成分MPL、TDMまたはCWSのいずれかを単独または2バイ2 (2 by 2) で組み合わせ合わせて用いてもよい。さらに、Stimulon (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) または SAF-1 (Syntex), RC259 (Coryxa), SBAS2, SBAS3, SBAS4, SBAS5, SBAS6, SBAS7, SBAS8 (Smith Kline Beecham, Rixensart, Belgium)のごときアジュバントを用いてもよい。さらにそのうえ、Complete Freund's Adjuvant (CFA) および Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)を非ヒト用途および研究目的に使用してもよい。「ワクチン組成物」は賦形剤および希釈剤をさらに含むであろう。該賦形剤および希釈剤はそれ自体無毒で治療的なものでなく、例えば、水、セイライン、グリセロール、エタノール、湿潤材または乳化剤、pHバッファ物質、保存料等がある。典型的には、ワクチン組成物は注射可能な液体溶液または懸濁液として調合される。注射前に液体担体中に溶解または懸濁するのに適した固体形態を調合してもよい。調合物はアジュバント効果を増強するために乳化

され、あるいはリポソーム中に封入されてもよい。ポリペプチドはサポニン、例えばQuil A (ISCOMS) とともに免疫刺激複合体中に含有されてもよい。ワクチン組成物は免疫学的に有効量の本発明のポリペプチドならびに他の上記成分のいずれかを含む。「免疫学的に有効量」は、予防または治療に効果的な1回分または一連の投与の部分としての個体への投与量を意味する。治療すべき個体の健康状態および身体的状態、治療すべき個体の分類学的グループ(例えば、非ヒト霊長類、霊長類等)、有効な免疫応答を生じる個体の免疫系のキャパシティー、望まれる防御の程度、ワクチンの処方、治療医の評価、感染HBV株、ならびに他の重要な因子によりこの量は変更される。その量は比較的広範囲であり、常套的な試行により決定されうると考えられる。通常には、その量は0.01ないし1000 μg /1回、より特別には0.1ないし100 μg /1回であろう。慣用的には、ワクチン組成物は非経口投与され、典型的には注射され、例えば、皮下注射または筋肉内注射される。他の投与方法に適したさらなる処方は経口処方および坐薬である。投与は1回投与スケジュールであってもよく、あるいは複数回投与スケジュールであってもよい。他の免疫調節剤とともにワクチンを投与してもよい。ワクチンは個体の治療にも有用でありうることに注意すべきであり、そのような場合、ワクチンは「治療ワクチン」と呼ばれる。

【0062】

また本発明は、HBV遺伝子型G特異的リガンドまたは本発明の少なくとも1のHBV遺伝子型G特異的ポリペプチドでの免疫により特異的に生成するHBV遺伝子型G特異的抗体に関し、該抗体は該ポリペプチドと特異的に反応し、HBV遺伝子型A、B、C、D、Eおよび/またはFに特徴的なペプチドとは反応しない。好ましい具体例において、抗体はHBV遺伝子型GのHBVポリメラーゼ、X蛋白、preCore、HBcAg、HBeAg、preS1、preS2またはHBsAgを特異的に認識する。

【0063】

また本発明は、普遍的リガンドまたは本発明の普遍的ポリペプチドでの免疫により特異的に生成する普遍的抗体に関し、該抗体は該普遍的ポリペプチドと反応する。好ましい具体例において、遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGのH

BVポリメラーゼ、X蛋白、preCore、HBcAg、HBeAg、preS1、preS2またはHBsAgを特異的に認識する。

【0064】

抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよい。Fab, F(ab)'₂, scFv (「1本鎖可変フラグメント」)のごときこれらのモノクローナル抗体に由来するフラグメントならびに抗体の可変領域を保持している他の抗体様構築物も本発明の範囲内にあり、本発明の方法に使用できる。ただし、それらは元の特性を保持しているものとする。通常には、例えば、パパイン、ペプシン、または他のプロテアーゼでの抗体の酵素消化によりかかるフラグメントが得られる。モノクローナル抗体、またはそのフラグメントを種々の用途のために修飾できることが当業者によく知られている。また、ミニ-抗体および2価抗体、3価抗体、4価抗体および5価抗体のごとき多価抗体を本発明の方法に使用することができる。これらのフラグメントおよび多価抗体の製造および使用は国際特許出願WO98/29442に十分に記載されている。本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体は、HおよびL鎖をコードするマウスおよび/またはヒトゲノムDNA配列から、あるいはHおよびL鎖をコードするcDNAクローンから組み換えDNA法の手段により作成されるマウスモノクローナル抗体のヒト化バージョンであってもよい。あるいはまた、本発明の方法に使用されるモノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体であってもよい。用語「ヒト化抗体」は、免疫グロブリンのフレームワーク領域の一部がヒト免疫グロブリン配列の由来することを意味する。本発明の方法に使用される抗体は、酵素、蛍光、または放射活性タイプの適当な標識により標識されていてもよい。

【0065】

さらに本発明は、生物学的試料中に存在する本発明のHBV遺伝子型G特異的ポリペプチドの検出、好ましくは、これまで未同定であったHBV遺伝子型GのHbcAgおよび/またはHBeAgの検出方法における本発明のHBV遺伝子型G特異的抗体またはリガンドの使用に関する。

【0066】

また本発明は、生物学的試料中に存在する本発明のHBV遺伝子型G特異的ポ

リペプチドの検出、好ましくは、これまで未同定であったHBV遺伝子型GのHbcAgおよび/またはHBeAgの検出方法に関し、該方法は下記工程を含む：

(i) 抗原 - 抗体または抗原 - リガンド複合体の生成に適した条件下で、該生物学的試料を、該HBV遺伝子型G特異的ポリペプチドを認識する本発明のHBV遺伝子型G特異的抗体またはリガンドと接触させ；次いで

(ii) 該抗体またはリガンドと該ポリペプチドとの免疫学的結合を検出する。

【0067】

さらに本発明は、生物学的試料中に存在する本発明の普遍的ポリペプチドの検出方法における、本発明の普遍的抗体またはリガンドの使用に関する。

【0068】

また本発明は、生物学的試料中に存在する本発明の普遍的ポリペプチドの検出方法に関し、該方法は下記工程を含む：

(i) 抗原 - 抗体または抗原 - リガンド複合体の生成に適した条件下で、該生物学的試料を、該普遍的ポリペプチドを認識する本発明の普遍的抗体またはリガンドと接触させ；次いで

(ii) 該抗体またはリガンドと該ポリペプチドとの免疫学的結合を検出する。

【0069】

本発明のポリペプチドと該ポリペプチドを認識する抗体とにより形成された該ポリペプチド - 抗体複合体を下記のものと一緒にすることにより、免疫学的結合の検出方法を行うことができる：

(i) ポリペプチド - 抗体複合体の特異的エピトープを認識するが、一次抗体のみを認識しない二次抗体（またはディテクター抗体）；

(ii) 該二次抗体に特異的にタグを付すため、あるいは該二次抗体に特異的にカップリングするマーカー、ここに該マーカーは当業者に知られたいずれかの可能なマーカーである；

(iii) 二次抗体とポリペプチド - 一次抗体複合体との間、および/または

結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適切なバッファー溶液。

【0070】

有利には、本発明に使用される抗体は適当な支持体上に固定化された状態である。二次抗体はそれ自体マーカーを有しているか、あるいはマーカーに直接または間接的にカップリングした基を有している。あるいはまた、当該分野で知られた他のいずれかのイムノアッセイフォーマットを用いることにより本発明の方法を実施してもよい。

【0071】

用語「エピトープ」は、抗体結合部位により特異的に結合されるポリペプチド-抗体複合体の部分を用いる。エピトープは当該分野で知られたいずれかの方法で決定することができ、あるいは当該分野で知られた種々のコンピューター予測により予測されうる。

本明細書における「認識」、「反応」、「免疫学的結合」または「ポリペプチド-抗体複合体を形成」なる表現は、本発明の抗体およびポリペプチドの免疫学的特性に関する条件下でポリペプチドと抗体との間の結合が生じることと解釈されるべきである。

抗体およびリガンドに関する本明細書の用語「特異的に認識」、「特異的に結合」、「特異的に反応」等は、抗体またはリガンドがこれまで未同定であったHBV遺伝子型Gに対してユニークである（HBV遺伝子型AからFまでのいずれかのポリペプチドに対してはユニークでない）ポリペプチドに結合すること、あるいは抗体またはリガンドがHBV遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGに対して普遍的であるが他のいずれのポリペプチドに対しても普遍的でないポリペプチドに結合することと解釈されるべきである。

【0072】

また本発明は、生物学的試料中に存在するこれまで未同定であったHBV遺伝子型Gの検出において使用される診断キットに関し、該キットは本発明の少なくとも1種のHBV遺伝子型G特異的抗体を含む。特別な具体例において、本発明は、生物学的試料中に存在するこれまで未同定であったHBV遺伝子型Gの検出

に使用される診断キットに関し、該キットは下記のものを含む：

(i) 少なくとも本発明のHBV遺伝子型G特異的ポリペプチドを認識する一次抗体（または捕捉抗体）；

(i i) 可能には、ポリペプチド - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成するが、一次抗体のみとは複合体を形成しない二次抗体（またはディテクター抗体）；

(i i i) 可能には、該二次抗に特異的にタグを付し、あるいは該二次抗体に特異的にカップリングするマーカー；

(i v) 可能には、本発明の一次抗体とポリペプチドとの間、二次抗体とポリペプチド - 一次抗体複合体との間、および/または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適当なバッファー溶液；

(v) 可能には、標準化目的で、キットの抗体により特異的に認識される精製または合成ペプチド。

【0073】

また本発明は、生物学的試料中に存在するHBVの普遍的検出に使用される診断キットに関し、該キットは少なくとも1の本発明の普遍的抗体を含む。

【0074】

特別な具体例において、本発明は、生物学的試料中に存在するHBVの普遍的検出に使用される診断キットに関し、該キットは下記のものを含む：

(i) 少なくとも本発明の普遍的ポリペプチドを認識する一次抗体（または捕捉抗体）；

(i i) 可能には、ポリペプチド - 一次抗体複合体のエピトープと免疫学的複合体を形成するが、一次抗体のみとは複合体を形成しない二次抗体（またはディテクター抗体）；

(i i i) 可能には、該二次抗に特異的にタグを付し、あるいは該二次抗体に特異的にカップリングするマーカー；

(i v) 可能には、本発明の一次抗体とポリペプチドとの間、二次抗体とポリペプチド - 一次抗体複合体との間、および/または結合二次抗体とマーカーとの間の免疫学的反応を行うための適当なバッファー溶液；

(v) 可能には、標準化目的で、キットの抗体により特異的に認識される精製または合成ペプチド。

【0075】

さらに本発明は、医薬として使用される本発明のポリペプチド、抗体またはリガンドに関する。

さらに本発明は、ヒトのHBV感染を予防し、あるいはヒトのHBV感染を治療するための医薬を製造するための、本発明のポリペプチド、抗体またはリガンドの使用に関する。

【0076】

また本発明は、HBV感染の治療に使用することのできる本発明のペプチド、抗体またはリガンドを活性物質として含む医薬組成物または医薬に関する。

【0077】

用語「医薬」または「組成物」（両方の用語は混用されうる）は、可能には、セイライン、リンゲル溶液、デキストロース溶液、ハンク溶液、不揮発性油、オレイン酸エチル、セイライン中5%デキストロースのごとき当業者に知られた適当な賦形剤の存在下における本発明の抗体、等張性および化学的安定性を改善する物質、バッファーならびに保存料を含む組成物をいう。「医薬」は当業者の技量の範囲内の適当な方法により投与されうる。好ましい投与経路は非経口経路である。非経口投与において、本発明の医薬は1回分の注射可能形態として、例えば、上記の医薬上許容される賦形剤と混合された溶液、懸濁液またはエマルジョンとして処方される。しかしながら、投与量およびモードは個体による。一般的には、抗体が $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ないし $10\text{mg}/\text{kg}$ 、より好ましくは $10\mu\text{g}$ ないし $5\text{mg}/\text{kg}$ 、最も好ましくは 0.1 ないし $2\text{mg}/\text{kg}$ の用量で与えられるように医薬が投与される。好ましくは、それをボラス投与として与える。連続輸液を用いてもよい。その場合、医薬を 5 ないし $20\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ 、より好ましくは 7 ないし $15\mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ の用量で輸液してもよい。経口投与に適した剤形は、錠剤、ピル、カプセル、カプレット、顆粒、粉末、エリキシル、シロップ、溶液および水性もしくは油性懸濁液を包含するが、これらに限らない。ヒトに投与される活性化合物の適当な1日の用量は、一般的には、約 1mg ないし

約5000mg、より通常には、約5mgないし約1000mgであり、1日に1回もしくは1ないしそれ以上の回数にわけて投与する。

【0078】

本発明の医薬組成物は本発明の抗体と機能的に同等な変種を含んでいてもよいことが明らかなはずである。該用語は本発明の抗体を含む分子であって、それにある種の修飾が施されており、その生物学的特性の全部または一部を保持しているものをいう。かかる修飾は多糖鎖の付加、特定の化学基の付加、脂質部分の付加、他のペプチドまたは蛋白との融合ならびに分子内架橋の形成を包含するが、これらに限らない。

【0079】

また本発明は、HBV感染により特徴づけられる（あるいはHBVに関連した）疾患の治療に使用されうる化合物または作用剤（本明細書において「試験化合物」という）を同定するための方法を提供する。これらの方法は、本明細書において「薬剤スクリーニングアッセイ」ともいわれる。

【0080】

1の具体例において、薬剤スクリーニングアッセイは、HBV遺伝子型G蛋白またはその機能的同等部分と相互作用（例えば、結合）する能力、HBV蛋白と標的分子との相互作用をモジュレートする能力に関して試験化合物をスクリーニングする工程を含む。典型的には、アッセイは下記工程を含む無細胞アッセイである：

(i) HBV遺伝子型G蛋白またはその一部分と試験化合物との相互作用（例えば、結合）を可能にする条件下で、本発明のHBV遺伝子型G蛋白またはその免疫原性フラグメントと試験化合物とを混合して複合体を形成させ；

(ii) 複合体の形成を検出する。

【0081】

試験化合物がHBV遺伝子型G蛋白またはその一部分と相互作用（例えば、結合）する能力は、複合体中の試験化合物の存在により示される。HBV遺伝子型G蛋白と試験化合物との間の複合体の形成は、例えば、標準的なイムノアッセイを用いて定量されうる。かかる試験に用いられるHBV遺伝子型G蛋白またはそ

の免疫原性フラグメントは溶液中で遊離の状態であってもよく、固体支持体に固定化されていてもよく、細胞表面上に担持されていてもよく、あるいは細胞内に存在していてもよい。

【0082】

もう1つの具体例において、本発明は、HBV遺伝子型G蛋白と下記のもの：

- 通常にはHBV遺伝子型G蛋白が相互作用する分子（標的分子）；または
- HBV遺伝子型G蛋白を特異的に認識する抗体

との間の相互作用（可能ならばHBV遺伝子型G蛋白の活性も）をモジュレート（例えば、刺激または阻害）する試験化合物を同定するスクリーニングアッセイを提供する。

【0083】

標的分子は、HBV遺伝子型G蛋白と同じシグナリング経路中の蛋白、例えば、HBV蛋白シグナリング経路の上流（活性の刺激剤および阻害剤の両方を包含）または下流で機能しうる蛋白（Zn-フィンガー、プロテアーゼ活性、システイン酸化還元状態のレギュレーター）を包含する。典型的には、アッセイは無細胞アッセイであり、下記工程を含む：

(i) HBV遺伝子型G蛋白またはその一部分と標的分子または抗体との相互作用（例えば、結合）を可能にする条件下で、HBV遺伝子型G蛋白またはその免疫原性フラグメント、HBV蛋白標的分子（例えば、HBV蛋白リガンド）または特異的抗体および試験化合物を混合し；

(ii) HBV遺伝子型G蛋白および標的分子または抗体を含む複合体の形成を検出、あるいはHBV遺伝子型G蛋白と標的分子または抗体との相互作用/反応を検出する。

【0084】

上記薬剤スクリーニングアッセイを行うために、HBV遺伝子型G蛋白またはその標的分子のいずれかを固定化して分離を容易化し、アッセイの自動化の便宜を図ることが可能である。複合体形成の検出は、例えばHBV遺伝子型G蛋白の誘導効果を測定することによる複合体の直接定量を包含しうる。試験化合物存在下におけるHBV遺伝子型G蛋白と標的分子との相互作用（例えば、HBV遺伝

子型G蛋白と標的分子との間の複合体形成)の低下(試験化合物不存在下で検出されるものと比較して)のごとき統計学的に有意な変化は、HBV遺伝子型G蛋白と標的分子との間の相互作用のモジュレーション(例えば、刺激または阻害)を示す。HBV遺伝子型G蛋白と標的分子との間の複合体形成のモジュレーションを、例えばイムノアッセイを用いて定量することができる。

HBV遺伝子型G蛋白と標的分子との間の相互作用のモジュレーターは、本明細書記載のいずれかの方法により同定された場合、本発明に包含されることは明らかにはずである。

【0085】

HBV遺伝子型G蛋白に対して適当な結合アフィニティーを有する化合物の高処理量スクリーニングを提供する、薬剤スクリーニングの1つの方法は、1984年9月13日に公開されたGeysen HNによる国際特許出願WO84/03564 "Determination of Amino Acid Sequence Antigenicity"において詳細に記載されており、参照により本明細書に一体化させる。要約すると、多数の異なる小型ペプチド試験化合物が、プラスチック製ピンまたはいくつかの他の表面上で合成される。蛋白試験化合物はHBV遺伝子型G蛋白のフラグメントと反応させられ、洗浄される。次いで、結合したHBV遺伝子型G蛋白は当該分野でよく知られた方法により検出される。

【0086】

また本発明は、HBV遺伝子型G蛋白に結合しうる中和抗体がHBV遺伝子型G蛋白との結合に関して試験化合物と競争する、競争的薬剤スクリーニングアッセイの使用も本発明に包含される。この様式において、1またはそれ以上の抗原決定基をHBV遺伝子型G蛋白と共有している蛋白の存在を検出するために抗体を使用することができる。

【0087】

さらにもう1つの具体例において、本発明は、HBV核酸発現および/またはHBV蛋白活性をモジュレートしうる化合物を同定する方法を提供する。HBV核酸の発現またはHBV遺伝子型G蛋白の活性をモジュレートする試験化合物の能力をアッセイする方法は、典型的には、細胞に基づくアッセイである。しかし

ながら、HBV遺伝子型Gに感染した動物もここで企図される。HBV遺伝子型G蛋白を含む経路を介してシグナルを伝達するHBV遺伝子型Gに感染またはトランスフェクションされた細胞を、試験化合物の存在下および不存在下においてHBV蛋白を過剰発現するように誘導することができる。これらのHBV遺伝子型G感染細胞もまた本発明の一部を形成する。該HBV遺伝子型G感染細胞および動物はさらにHBV遺伝子型G感染クローンともいう。

【0088】

本明細書および下記の請求の範囲の全体にわたり、特記しない限り、「含む (comprise, comprises, comprising)」は述べられた数または工程あるいは述べられた数または工程の群を意味するが、他の数または工程あるいは数または工程の群を排除するものではない。本明細書で引用された種々の特許出願、特許および/または刊行物、ならびにこれらの刊行物中で引用された文献の開示を、参照により本明細書に一体化させる。しかしながら、このことはこれらのすべての開示の内容が通常の一般的な知識の一部として見られることを意味するのではない。

【0089】

本願は、35 USC 119の規定により1999年12月7日出願の米国特許出願第60/169287号について優先権を主張している。さらに本願は、PCT8条の規定により1999年12月7日出願の米国特許出願第60/169287号および1999年12月3日出願のEP 99870252.6について優先権を主張している。

【0090】

実施例

実施例1：異なるHBV遺伝子型の流行

1.1 試料収集

合計121個のHBV陽性血漿試料を、フランス(n=39)および米国(n=82)から集めた。試料を小分けし、使用するまで-20で保存した。試料は慢性HBVキャリアから採取され、利用可能となったのでランダムに選択された。

【0091】

1.2 HBV DNA抽出および増幅

本質的には以前記載されたようにして (Stuyver et al., 1999)、High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Brussels, Belgium)を用いて100 µlの血清試料からHBV DNAを抽出した。プライマーHBPr1およびHBPr135 (アウター (outer) PCR)、次いでHBPr2およびHBPr94を用いる入れ子反応を用いることにより、preS1、preS2およびHBsAg領域をカバーするPCRフラグメントを得た (図4; 表1)。アウターPCRによりウイルスDNAを40サイクルにわたり増幅した。94 30秒変性、50 30秒アニーリング、次いで、72 30秒伸長とした。第1ラウンドのPCRにおいて陰性の試料を、入れ子PCRプライマーを用いて同じサーマルプロファイルでさらに35サイクル増幅した。

【0092】

1.3 HBV遺伝子型決定

HBV genotyping Line Probe Assay (LiPA) (Van Geyt et al., 1998)の研究用バージョンを用いることにより、121個の血清試料をさらに遺伝子型決定した。結果を表2にまとめた。非常に典型的であるが、これまで認識されていなかった反応性パターンが、ヨーロッパからの2つの試料および米国からの11個の試料に関して観察された。すなわち、プローブ140 (遺伝子型A用に特に設計)、プローブ148 (遺伝子型AおよびB用に設計)、プローブ80 (遺伝子型C DおよびE用に設計) およびプローブ239 (遺伝子型BおよびE用に設計) (Van Geyt et al. 1998) に対してハイブリダイゼーション反応が観察された。この混合ハイブリダイゼーションパターンはユニークなタイプ認識を可能にしなかったため、配列分析によるさらなる特徴づけを行った。

【0093】

実施例2: 混合ハイブリダイゼーションパターンを示した試料の特徴づけ

2.1 HBV DNA抽出および増幅

本質的には以前記載されたようにして (Stuyver et al., 1999)、High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Brussels, Belgium)を用

いて、HBV DNAを100 µlの血清試料から抽出した。Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics, Brussels, Belgium)を用いてHBVの完全ゲノムを増幅した。5 µlの抽出DNAに関して、プライマーHBPr108およびHBPr109(表1)を用いて増幅を行った。5 µl 10 x Expand High Fidelity PCR system buffer、2.6 U Expand High Fidelity PCR system enzyme mix、200 µM dNTPs、300 nMの各プライマーおよび滅菌H₂Oを含有する45 µlの反応混合物を得た。94 °Cで40秒変性、50秒で60 °Cにシフトさせた後、1分間アニーリング、15秒で72 °Cにシフトさせた後、4分間伸長させ、5秒/サイクルのインCREMENTで増幅を行った(Gunther et al., 1998)。2つの短いPCRフラグメントも得られた:(i)第1のアンプリコンはpreS1、preS2、およびHBsAg領域をカバーするものであり、プライマーHBPr1およびHBPr135(アウターPCR)、次いで、HBPr2およびHBPr94(表1)を用いる入れ子反応により増幅された;ならびに(ii)第2のアンプリコンはpreCore/Core領域をカバーするものであり、半入れ子セットのPCRプライマー(HBPr86およびHBPr303、次いでHBPr87およびHBPr303)を用いて増幅された。94 °Cで30秒変性、50 °Cで30秒アニーリング、次いで72 °Cで30秒伸長を40サイクル行うアウターPCRによりウイルスDNAが増幅された。第1ラウンドのPCRで陰性の試料を、入れ子PCRプライマーを用いて同じサーマルプロファイルで35サイクル増幅した。

【0094】

2.2 配列決定

蛍光標識ジデオキシヌクレオチド鎖ターミネーター(ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA polymerase FS; PE Applied Biosystems)を用いて、自動DNAシーケンサーABI 377(PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にて配列決定を行った。完全ゲノムを配列決定するために使用したプライマーを表1にまとめる。短いPCRフラグメントを配列決定するために使用したプライマーは増幅プライマーと同じものである。

全ゲノム配列決定用に1のヨーロッパのウイルス単離体(FR1)を選択し(図1;配列番号:1)、別の7つの試料からpreCore/CoreおよびpreS/S遺伝子を配列決定した(図7および8;配列番号:43-56)。

【0095】

2.3 他の遺伝子型との相同性パーセンテージ

FR1株の遺伝学的関連性を36個の他の完全HBVゲノムと比較するために、相同性パーセンテージを計算した。FR1株の配列は以下の相同性を示した: 遺伝子型A(5つの配列)とは87.1%(最小86.2%、最大87.7%); 遺伝子型B(4つの配列)とは86.6%(最小86.5%、最大86.6%); 遺伝子型C(14の配列)とは86.5%(最小86.0%、最大87.0%); 遺伝子型D(8つの配列)とは86.9%(最小86.3%、最大87.3%); 遺伝子型E(2つの配列)とは88.3%(最小88.2%、最大88.4%); 遺伝子型F(3つの配列)とは84.7%(最小84.5%、最大84.8%)。

【0096】

2.4 他の遺伝子型との系統発生的距離

FR1株の遺伝学的関連性を36個の他の完全HBVゲノムと比較するために、系統発生的距離を計算した。6つの認識されたHBV遺伝子型(36個の配列)間の系統発生的距離を互いに比較し、FR1株と比較した(図9)。系統発生的距離間(i)1の遺伝子型中(距離範囲0.01~0.06)および(ii)異なる遺伝子型間(距離範囲0.08~0.17)に明らかな相違が現れた。平均値および遺伝子型間の境界値としての距離0.08に関してt-検定を用いると、FR1は遺伝子型A~Fとは有意に異なることがわかった(0.11~0.17の範囲; $P < 0.019$)。

系統発生樹を作成し、DNADIST, Neighbor and Drawgram software programs of PHYLIP version 3.5c (Felsenstein, 1993)を用いる距離マトリックス比較により分析した。MedCalc Version 4.05-Windows 95 (Medcalc Software, Mariakerke, Belgium)を用いて統計学的分析(平均値に関するt-検定)を行った。0.05未満のP値を統計学的に有意であるとみなした。異なる遺伝子型を示す完

全ゲノム配列をGenBankから取った。それらの受託番号を図10に示す。完全ゲノム配列の系統発生樹(図10a)、ならびに個々のORF[表面領域(preS1、preS2、HBsAg)については図10b;他のORFsに関しては示さず]の系統発生樹を構築したところ、FR1が別個のブランチ上に実際に存在していることが示された。さらに図10bは、米国およびフランスからのHBV試料が互いに密接に関連していることを示す。これらの計算結果および系統発生樹により示されるところに基づいて、新たなHBV遺伝子型に属することが示されたFR1および他のウイルス株を遺伝子型Gと称する。

【0097】

実施例3: 遺伝子型Gに属するHBV株におけるゲノム構造およびオープンリーディングフレームの特徴づけ

FR1の完全ゲノム構造は既知のHBV遺伝子型に関して説明されているものと類似であったが、3248bpの長さであることがわかった(図4)。

配列決定された8つの単離体すべてはpreCore領域のコドン2(CAAのかわりにTAA)およびコドン28(TGGのかわりにTAG)において翻訳停止を有する。この二重停止コドンの存在に基づくと、一般的には、HBeAgの存在は予想されない。逆説的に、試料FR2は血漿中のHBeAgの存在を示した。Core領域は585ヌクレオチドの長さであり、195アミノ酸のCore蛋白をコードする(図5)。他の遺伝子型とは対照的に、Core領域は36bpのヌクレオチドインサートを有し、該インサートはCore翻訳開始点(位置1901のA)から5ヌクレオチド後に存在する。それゆえ、さらなる12個のアミノ酸RTTLPYGLFGLD(配列番号:155)をコードするcore領域中の該インサートはHBcAgおよびHBeAgの新規発現機構の原因である可能性があり、ユニークな構造および免疫学的特性を有するcoreおよびe抗原が存在する可能性がある。遺伝子型G、ならびに遺伝子型Aを除く他の遺伝子型は、HBcAg ORFのカルボキシ末端部分に6ヌクレオチドの欠失を示した(図4および5)。

preS1領域は354bp(118アミノ酸)、preS2領域は165bp(55アミノ酸)、そしてHBsAg領域は678bp(226アミノ酸)を

含む(図6)。遺伝子型Eと同様に、G株はpreS1のアミノ末端において3ヌクレオチドの欠失(位置11における1個のアミノ酸;図6)を示した。HBsAgの位置112のリジン(K)、位置160のリジン(K)および位置127のプロリン(P)の存在に基づいて、この遺伝子型Gの血清学的サブタイプはadw2であると推定された。

この遺伝子型のポリメラーゼ領域は2526bp(842アミノ酸)を含む。HBcAgのカルボキシ末端における欠失、ならびにpreS1のアミノ末端における欠失はポリメラーゼ蛋白の番号付けに影響する。ラミブジン治療の間に変化する傾向のあるメチオニン残基は、高度に保存されたYMDDMモチーフ(Bart holomeusz et al., 1998)中の位置549に存在する。図6は、他の遺伝子型におけるこのメチオニン残基に関する正確な番号付けを示す。

【0098】

実施例4：HBV遺伝子型Gの検出方法

4.1 HBV DNA抽出および増幅

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Brussels, Belgium)を用いてHBV DNAを血清試料から抽出した。入れ子セットのPCRプライマーを設計し、HBsAg領域の増幅を可能にし、341bpのフラグメントを得た(アウターセンスプライマーHBPr134;アウターアンチセンスプライマーHBPr135;入れ子センスプライマーHBPr75;入れ子アンチセンスプライマーHBPr94;表1)。すべてのプライマーの5'末端にピオチン基でタグを付した。40サイクル(95℃で30秒;45℃で30秒;72℃で30秒)のアウターPCRによりDNAを増幅した。第1ラウンドのPCRにおける陰性試料を、入れ子PCRプライマーを用いて同じサーマルプロファイルで35サイクル増幅した。

【0099】

4.2 HBV遺伝子型決定用のLiPAの設計

全部で20種の遺伝子型特異的プローブを設計した。遺伝子型A、B、C、D、EおよびFの同定用に設計されたプローブはVan Geyt et al. (1998)に記載されたものである。例えば、HBV遺伝子型G核酸配列の同定用に特別に選択され

たプローブは図1の標的Aまたは標的Bと表示された領域を認識する。ポリd (T) テイルの酵素付加後、選択されたオリゴヌクレオチドプローブをニトロセルロース膜上に水平線としてアプライする。ビオチン化されたDNAの1本の線を陽性対照として並べてアプライする。

【0100】

4.3 クローン化リファレンスパネルおよび典型的な臨床試料を用いるLiPAの試験

HCVラインプローブアッセイ (Stuyver et al., 1996) に関して説明されたのと本質的に同様にしてアッセイを行った。HBV遺伝子型決定LiPA上での異なるプローブの反応性を、クローン化されたリファレンスパネルおよび臨床試料を用いて評価した。図11は、LiPA上のプローブに対するPCR生成物のハイブリダイゼーション後のいくつかの典型的な試料に関する結果を示す。HBV株FR1由来のPCRフラグメントは普遍的プローブ140、148、80および239とハイブリダイゼーションし、さらに図1に表示した標的Aまたは標的Bを認識するように選択された遺伝子型G特異的プローブとハイブリダイゼーションする。

【0101】

文献

Alvarado-Esquivel C, Wyseur A, Herrera-Ortiz F, Ruiz-Maya L, Ruiz-Astorga R, Zarate-Aguilar A, Carrillo-Maravilla E, Herrera-Luna R, Moralers-Macedo M, Maertens G and Stuyver L (1998) Hepatitis B and C virus infections in Mexico: genotypes and geographical distribution in blood donors and patients with liver disease. In Therapies for Viral Hepatitis, pp. 35-41. Eds. RF Schinazi, J-P Sommadossi and HC Thomas. International Medical Press, London, UK.

Asseline U, Delarue M, Lancelot G, Toulme F and Thuong N (1984) Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity: intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. Proc Natl Acad Sci USA 81: 3297-3301.

Atherton and Shepard (1989) Solid phase peptide synthesis. IRL Press, Oxford, UK.

Barany F (1991) The ligase chain reaction in a PCR world. PCR Methods Appl 1: 5-16.

Bhat RA, Ulrich PP and Girish NV (1990) Molecular characterization of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man. Hepatology 11: 271-276.

Bowyer SM, van Staden L, Kew MC and Sim JGM (1997) A unique segment of the hepatitis B virus group A genotype identified in isolates from South Africa. J Gen Virol 78: 1719-1729.

Carman WF, Van Deursen FJ, Mimms LT, Hardie D, Coppola R, Decker R and Sanders R (1997) The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa, and Sardinia. Hepatology 25: 1658-1666.

Clay TM, Culpan D, Howell WM, Sage DA, Bradley BA and Bidwell JL (1994) UHG crossmatching. A comparison with PCR-SSO typing in the selection of HLA-DPB-compatible bone marrow donors. Transplantation 58: 200-207.

Compton J (1991) Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350: 91-92.

Duck P (1990) Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. Biotechniques 9: 142-147.

Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.

Guatelli J, Whitfield K, Kwoh D, Barringer K, Richman D and Gengeras T (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. Proc Natl Acad Sci USA 87: 1874-1878.

Guenther S, Sommer G, Von Breunig F, Iwanska A, Kalinina T, Sterneck M a

nd Will H (1998) Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations. *J Clin Microbiol* 36: 531-538.

Houbenweyl (1974) *Method of organic chemistry*. Vol. 15-I et II. Eds. E Wunck, Thieme, Stuttgart, Germany.

Kwoh D, Davis G, Whitfield K, Chappelle H, Dimichele L and Gingeras T (1989) Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1173-1177.

Landgren U, Kaiser R, Sanders J and Hood L (1988) A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241: 1077-1080.

Lomeli H, Tyagi S, Pritchard C, Lisardi P and Kramer F (1989) Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem* 35: 1826-1831.

Magnius LO and Norder H (1995) Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 38: 24-34.

Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen J and Broder S (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7706-7710.

Maxam AM and Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560-564.

Maxam AM and Gilbert W (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65: 499-559.

Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K and Ts'o P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18: 5134-5143.

Nielsen P, Egholm M, Berg R and Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254: 1497-1500.

Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic Acids Res* 21: 197-200.

Norder H, Courouce A-M and Magnius LO (1992) Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *J Gen Virol* 73: 3141-3145.

Norder H, Courouce A-M and Magnius LO (1994) Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the Hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 198: 489-503.

Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewinjo RI, Imai M, Miyakawa Y and Mayumi M (1988) Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: Comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 69: 2575-2583

Olerup O and Zetterquist H (1991) HLA-DRB1*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: a sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 37: 197-204.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn G, Mullis KB and Erlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH and Erlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6230-6234.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sanchez-Pescador R, Stempien MS, Urdea MS (1988) Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1 beta-lactamase-mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. *J Clin Microbiol* 26: 1934-1938.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.

Santamaria P, Boyce-Jacino MT, Lindstrom AL, Barbosa JJ, Faras AJ and Rich SS (1992) HLA class II "typing": direct sequencing of DRB, DQB and DQA genes. *Hum Immunol* 33: 69-81.

Santamaria P, Lindstrom AL, Boyce JM, Jacino MT, Myster SH, Barbosa JJ, Faras AJ and Rich SS (1993) HLA class I sequence-based typing. *Hum Immunol* 37: 39-50.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F and Maertens G (1996) A second generation line probe assay for hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 34: 2259-2266.

Stuyver L, De Gendt S, Cadranel JF, Van Geyt C, Van Reybrouck G, Dorent R, Gandjibachkc I, Rosenheim M, Opolon P, Huraux JM and Lunel F (1999) Three cases of severe subfulminant hepatitis in heart transplanted patients after nosocomial transmission of a mutant hepatitis B virus. *Hepatology* 29: 1876-1883.

Swenson PD, Riess JT and Krueger LE (1991) Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies. *J Virol Methods* 33: 27-28.

Telenta PFS, Poggio GP, Lopez JL, Gonzalez J, Lemberg A and Campos RH (1997) Increased prevalence of genotype F hepatitis B virus isolates in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 35: 1873-1875.

Tran A, Kremsdorf D, Capel F, Housset C, Dauguet C, Petit M-A and Brecho t C (1991) Emergence of and takeover by hepatitis B virus (HBV) with rearrangements in the pre-S/S and pre-C/C during chronic HBV infection. *J Virol* 65: 3566-3574.

Urdea MS, Horn T, Fultz TJ, Anderson M, Running JA, Hamren S, Ahle D, Chang CA (1991) Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp Ser* 24:197-200.

Van Geyt C, De Gendt S, Rombaut A, Wyseur A, Maertens G, Rossau R and Stuyver L (1998) A line probe assay for hepatitis B virus genotypes. In: *Therapies of viral hepatitis*. pp. 139-145. Eds. RF Schinazi, JP Sommadossi and H Thomas. International Medical Press, London, UK.

Wu D and Wallace B (1989) The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 4: 560-569.

Yoshida M, Kimura A, Numano F and Sasazuki T (1992) Polymerase-chain-reaction-based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum Immunol* 34: 257-266.

【図面の簡単な説明】

【図1】 4つの主要ORFsのアミノ酸翻訳を伴ったFR1の完全ヌクレオチド配列である。HBV遺伝子型G特異的プローブおよび/またはプライマーの標的配列を横線で示す。HBV遺伝子型Gにユニークなヌクレオチドおよびヌクレオチドの組み合わせをそれぞれ太字で示し、カギ付き下線を付した。

【図2】 Tran et al. (1991)により記載されたHBV preC/C遺伝子の完全コーディング配列である。

【図3】 Tran et al. (1991)により記載されたHBV preS/S遺伝子の完全コーディング配列である。

【図4】 HBV遺伝子型Gウイルスのゲノム構成およびオープンリーディ

ングフレームを、他の遺伝子型と比較して示す。各遺伝子型に関して、1の典型的なゲノムのみが含まれる（遺伝子型A：X70185；B：D00331；C：X01587；D：X72702；E：X75664；F：X75663；G：FR1）。広範な可変性が観察されるウイルスゲノム中の位置を黒いゾーンで示す。ヌクレオチドおよびアミノ酸の番号付けを示す。（1）：遺伝子型Gの大部分の単離体は翻訳停止コドンを含み、翻訳停止コドンはpreCore領域の長さに影響する。xxx：異なる遺伝子型の保存されたYMD motif中のM-残基に関するアミノ酸番号付けを示す。表1に示すプライマーの位置および方向を矢印で示す。

【図5】 異なるHBV遺伝子型のpreCoreおよびCore領域のアミノ酸配列アラインメントである。各遺伝子型に関して、1の典型的なゲノムのみが含まれる（遺伝子型A：X70185；B：D00331；C：X01587；D：X72702；E：X75664；F：X75663；G：FR1）。アミノ酸配列はヌクレオチド配列に由来するものである。X：翻訳停止。

【図6】 異なるHBV遺伝子型のpreS1、preS2およびHBsAgのオープンリーディングフレームのアミノ酸配列アラインメントである。各遺伝子型に関して、1の典型的なゲノムのみが含まれる（遺伝子型A：X70185；B：D00331；C：X01587；D：X72702；E：X75664；F：X75663；G：FR1）。上：preS1；中：preS2；下：HBsAg。アミノ酸配列はヌクレオチド配列に由来する。

【図7】 HBV遺伝子型A株（HBVXCPS）および新たに同定された遺伝子型Gに属する7つのHBV株（RF1、FR2、US1、US3、US5、US6、US7、US10）のpreCore/Core配列のアラインメントを示す。Nはこの位置にヌクレオチドがないことを示す。

【図8】 HBV遺伝子型A株（HBVXCPS）および新たに同定された遺伝子型Gに属する7つのHBV株（RF1、FR2、US1、US3、US5、US6、US7、US10）のpreS1/preS2/HBsAg配列のアラインメントを示す。Nはこの位置にヌクレオチドがないことを示す。

【図9】 異なるHBV遺伝子型間の、プログラムDNADISTにより得

られた系統発生的距離である。36種の完全ゲノム（受託番号は図10に示される）をFR1（遺伝子型G）配列と比較した。各群の平均を示し（A：；B：；C：；D：X；E：*；F：；G：+）、平均の標準偏差も示す。標準偏差はこれらの距離の95%信頼性区間を与える。

【図10】 HBV遺伝子型の系統発生樹である。ウイルス単離体をそれらのGenBankの受託番号により示す。（a）完全ゲノム。（b）表面遺伝子のオープンリーディングフレーム（preS1/preS2/HBsAgを含む）。

【図11】 実施例4にて設計された遺伝子型決定LiPAへのPCR生成物のハイブリダイゼーション後の、遺伝子型A、B、C、D、E、FおよびGのいくつかの典型的な試料に関して得られた結果である。片G：FR1のPCRフラグメントとともにインキュベーションされた。右の片は適用されたすべてのプローブの位置を示す。プローブの番号付けはVan Geyt et al. (1998)に記載されている。

Conj.contr：抱合体対照；Amp1.contr：増幅対照（すべての遺伝子型と反応するプローブ、保存的領域に存在）。「標的A」および「標的B」と表示したプローブ線は、図1に示す標的Aおよび標的B領域を認識するプローブを含む。プローブ193および77は遺伝子型Aのみを認識する。プローブ78は遺伝子型Bのみを認識する。プローブ153、154および204は遺伝子型Cのみを認識する。プローブ165および208は遺伝子型Dのみを認識する。プローブ172、177および213は遺伝子型Eのみを認識する。プローブ186、216および219は遺伝子型Fのみを認識する。プローブ140は遺伝子型AおよびGを認識する。プローブ148は遺伝子型A、BおよびGを認識する。プローブ80は遺伝子型C、D、EおよびGを認識する。プローブ239は遺伝子型B、EおよびGを認識する。

【図12】 Bhat et al. (1990)により記載されたHBV preC/C遺伝子の完全コーディング配列である。

Figure 1 - cont'd 4

2850
 : : : : :
 TAGCGCTTCATTTTGTGGGTCCACCATATACTTGGGAACAAGATCTACAGCATGGGGCTTT
 S A S F C G S P Y T W E Q D L Q H G A F
 M G L
 HBPol
 pres1

2900 : : : : : 2950
 : : : : :
 CTTGGACGGTCCCTCTCGAGTGGGGAAGAACCCTTCCGCCAGCAATCCTCTAGGATTC
 L D G P S R V G K E P F R Q Q S S R I P
 S W T V P L E W G K N L S A S N P L G F
 HBPol
 pres1

3000 : : : : :
 : : : : :
 TTCCCGATCACCAGTTGGACCCAGCATTTCAGAGCAATAACCAATCCAGATTGGGACT
 S R S P V G P S I Q S K Y Q Q S R L G L
 L P D H Q L D P A F R A N T N N P D W D
 HBPol
 pres1

3050 : : : : :
 : : : : :
 TCAATCCCAAAAGGACCCTTGGCCAGAGCCCAACAAGGTAGGATTGGAGCCATATGGAC
 Q S Q K G P L A R G Q Q G R S W S L W T
 F N P K K D P W P E A N K V G V G A Y G
 HBPol
 pres1

Figure 1 - cont'd 8

```

550      :                               :                               :                               :
      : ACTCTATGTATCCCTCATGTTGCTGTACAAAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTC      : 600
HBPol  L Y V S L M L L Y K T F G R K L H L Y S
HBS    N S M Y P S C C C T K P S D G N C T C I

      :                               :                               :                               :
      : CCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGAGTGGCCCTCAGTCCGTTTCT      : 650
HBPol  H P I I L G F R K I P M G V G L S P F L
HBS    P I P S S W A F A K Y L W E W A S V R F

      :                               :                               :                               :
      : CTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCTCCCACTGTCT      : 700
HBPol  L A Q F T S A I C S V V R R A F P H C L
HBS    S W L S L L V P F V Q W F V G L S P T V

      :                               :                               :                               :
      : GGC T T C A G C T A T A T G G A T G T G T A T T G G G G C C A A A T C T G T A C A A C A T C T T G A G T C
      : A F S Y M D D V V L G A K S V Q H L E S
      : W L S A I W M M W Y W G P N L Y N I L S
      : 750

```


Figure 1 - cont'd 11

1350
 : : : : :
 TGGGACTGACAATTCTGTCTGTCCTTTCTCGGAAATATACATCCTTTCCATGGCTGCTAGG
 M A A R
 HBX G T D N S V V L S R K Y T S F P W L L G
 HBPol

1400
 : : : : :
 CTGTGCTGCCAACTGGATCCTTCGGGGACGTCCTTTGTTACGTCCCGTCAGCGCTGAA
 L C C Q L D P S R D V L C L R P V S A E
 HBX C A A N W I L R G T S F V Y V P S A L N
 HBPol

1450 1500
 : : : : :
 TCCAGCGGACGACCCCTCCCGGGCCGTTTGGGGCTCTGTCCGCCCTTCTCCGTCGTGCC
 S S G R P L P G P F G A L S P P S P S A
 HBX P A D D P S R G R L G L C R P L L R L P
 HBPol

1550
 : : : : :
 GTTCCCTGCCGACACGGGGCCACCTCTCTTTACGGGTCTCCCGTCTGTTCCTTCTCA
 V P A D H G A H L S L R G L P V C S F S
 HBX F L P T T G R T S L Y A V S P S V P S H
 HBPol

【図2】

```
ATGCAACTTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCTTGTTTCAT
GTCCTACTGT TCAAGCCTCC AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT
TTAGGGCATG GATAGAACAA CTTTGCCATA TGGCCTTTT
GGCTTAGACA TTGACCCTTA TAAAGAATTT GGAGCTACTG
TGGAGTTGCT CTCGTTTTTG CCTTCTGACT TTTTCCCGTC
TGTTTCGTGAT CTTCTCGACA CCGCTTCAGC TTTGTACCGG
GAATCCTTAG AGTCCTCTGA TCATTGTTTCG CCTCACCATA
CAGCACTCAG GCAAGCAATT CTGTGCTGGG GTGAGTTGAT
GACTCTAGCT ACCTGGGTGG GTAATAATTT GGAAGATCCA
GCATCCAGAG ATTTGGTGGT CAATTATGTT AATACTAATA
TGGGTTTAAA AATCAGGCAA CTATTGTGGT TTCACATTTT
CTGTCTTACT TTTGGGAGAG AAACCGTTCT TGAGTATTTG
GTGTCTTTTG GAGTGTGGAT TCGCACTCCT CCTGCTTATA
GACCACAAA TGCCCCTATC CTATCAACAC TTCCGGAGAC
TACTGTTGTT AGACGAAGAG GCAGGTCCCC TCGAAGAAGA
ACTCCCTCGC CTCGCAGACG AAGATCTCAA TCGCCGCGTC
GCAGAAGATC TGCATCTCCA GCTTCCCAAT GTTAG
(SEQ ID NO 7)
```

Figure 2

【図3】

```

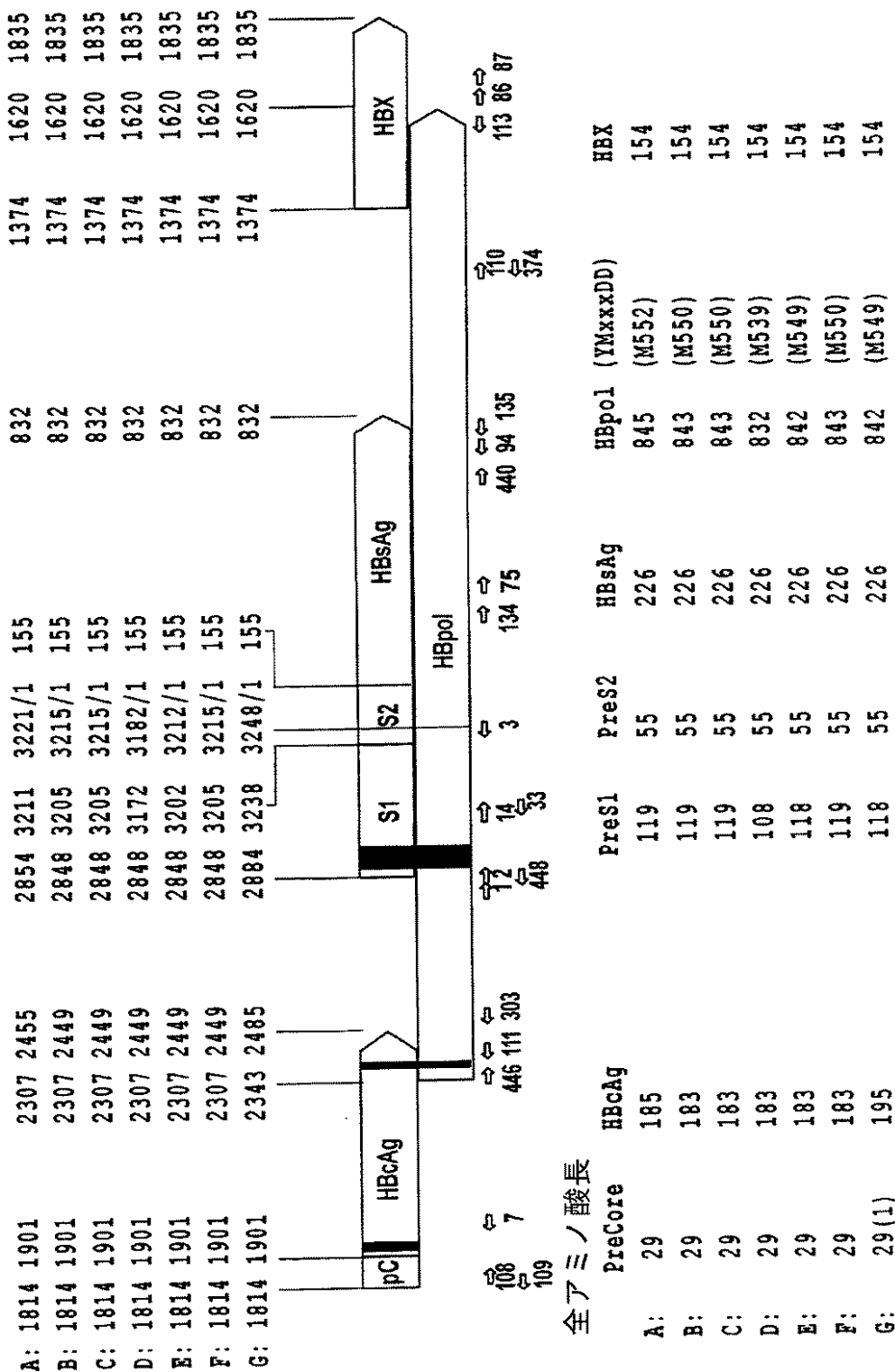
ATGGGGCTTT CTTGGACGGT CCCTCTCGAG TGNNGGGGAA
AGAACCTTTC CACCAGCAAT CCTCTAGGAT TCCTTCCCGA
TCACCAGTTG GACCCAGCAT TCAGAGCAAA TACCAACAAT
CCAGATTGGG ACTTCAATCC CAAAAAGGAC CCTTGGCCAG
NAGCGAACAA GGTAGGAGTT GGAGCCTATG GACCCGGGTT
CACCCCTCCA CACGGAGGCC TTTTGGGGTG GAGCCCTCAG
TCTCAGGGCA CACTAACAAAC TTTGCCAGCA GATCCGCCTC
CTGCCTCCAC CAATCGTCAG TCAGGGAGGC AGCCTACTCC
CATCTCTCCA CCACTAAGAG ACAGTCATCC TCAGGCCATG
CAGTGGAACT CTACAGCATT CCACCAAGCT CTACAAAATC
CCAAAGTCAG GGGCCTGTAT TTTCTGTCTG GTGGCTCCAG
TTCAGGGATA GTGAACCCTG TTCCGACTAT TGCCTCTCAC
ATCTCGTCAA TCTTCTCCAG GATTGGGGAC CCTGCACCGA
ACATGGAGAA CATCACATCA GGATTCCTAG GACCCCTGCT
CGTGTACAG GCGGGGTTTT TCTTGTTGAC AAGAATCCTC
ACAATACCGC AGAGTCTAGA CTCGTGGTGG ACTTCTCTCA
ATTTTCTAGG GGGAGTGCCC GTGTGTCTCTG GCCTAAATTC
GCAGTCCCCA ACCTCCAATC ACTCACCAAT CTCCTGTCTT
CCAACCTGTC CTGGCTATCG CTGGATGTGT CTGCGGCGTT
TTATCATATT CCTCTTCATC CTGCTGCTAT GCCTCATCTT
CTTGTTGGTT CTTCTGGACT ATCAAGGTAT GTTGCCCGTT
TGTCCTCTGA TTCCAGGATC CTCGACCACC AGTACGGGAC
CCTGCAAAAC CTGCACGACT CCTGCTCAAG GCAACTCTAT
GTATCCCTCA TGTTGCTGTA CAAAACCTTC GGACGGAAAT
TGCACCTGTA TTCCCATCCC ATCGACTTGG GCTTTCGCAA
AATACCTATG GGAGTGGGCC TCAGTCCGTT TCTCTTGGCT
CAGTTTACTA GTGCCATTTG TTCAGTGGTT CGTAGGGCTT
TCCCCACTG TCTGGCTTTC AGCTATATGG ATGATGTGGT
ACTGGGGGCC AAGTCTGTAC AACATCTTGA GTCCCTTTAT
ACCGCTGTTA CCAATTTTCT TTTGTCTTAG GGTATACATT
TAA (SEQ ID NO 8)

```

Figure 3

【図4】

ヌクレオチド位置



全アミノ酸長

Figure 4

US5 GGAGCTACTGTGGAGTTGCTCTCGTTTTTGGCCCTTCTGACTTTTTTCCGGTCTGTTCCGTGATCTTCTCGACACCCGCT
 US6 GGAGCTACTGTGGAGTTGCTCTCGTTTTTGGCCCTTCTGACTTTTTTCCGGTCTGTTCCGTGATCTTCTCGACACCCGCT
 US7 GGAGCTACTGTGGAGTTGCTCTCGTTTTTGGCCCTTCTGACTTTTTTCCGGTCTGTTCCGTGATCTTCTCGACACCCGCT
 US10 GGAGCTACTGTGGAGTTGCTCTCGTTTTTGGCCCTTCTGACTTTTTTCCGGTCTGTTCCGTGATCTTCTCGACACCCGCT

226

HBVXCPS TCAGCTCTGTATCGAGAAGCCTTAGAGTCTCCTGAGCATTGCTCACCTCACCATACACTGCACCTCAGGCAAGCCCAATT
 FR1 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTCTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC
 FR2 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTCTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC
 US1 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTCTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC
 US3 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTCTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC
 US5 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTTTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC
 US6 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTCTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC
 US7 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTCTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC
 US10 TCAGCTTTGTACCCGGGAATCCTTAGAGTCCCTCTGATCATTTGTTGGCCCTCACCATACAGCACTCAGGCAAGCAATC

301

HBVXCPS CTCTGCTGGGTGGAATTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGGGATCTA
 FR1 CTGTGCTGGGTGAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG
 FR2 CTGTGCTGGGTGAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG
 US1 CTGTGCTGGGTGAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG
 US3 CTGTGCTGGGTGAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG
 US5 CTGTGCTGGGTTRAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG
 US6 CTGTGCTGGGTGAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG
 US7 CTGTGCTGGGTGAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG
 US10 CTGTGCTGGGTGAGTTGATGACTCTAGCTACCTGGGTGGGTAATAATTTGGAAGATCCAGCATCCAGAGATTTG

Figure 7 - cont'd 1

376
 HBVXCPS GTAGTCAATTAATGTTAAATACTAAACAATGGGTTTAAAGATCAGGCAACTAATGTGGTTTCATAATATCTTGCCTTACT
 FR1 GTGGTCAATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCAACTAATGTGGTTTCACATTTCCGTCTTACT
 FR2 GTGGTCAATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCAACTAATGTGGTTTCACATTTCCGTCTTACT
 US1 GTGGTCAATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCAACTAATGTGGTTTCACATTTCCGTCTTACT
 US3 GTGGTCAATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCAACTAATGTGGTTTCACATTTCCGTCTTACT
 US5 GTGGTCRATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCARCGAATGTGGWTTTCAATCTCCGTCTTACT
 US6 GTGGTCAATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCAACTAATGTGGTTTCACATTTCCGTCTTACT
 US7 GTGGTCAATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCAACTAATGTGGTTTCACATTTCCGTCTTACT
 US10 GTGGTCAATTAATGTTAAATACTAAATAATGGGTTTAAATAATCAGGCAACTAATGTGGTTTCACATTTCCGTCTTACT

451
 HBVXCPS TTTGGAGAGAGACTGTGCTTGAATATTTGGTCTCTTTCCGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCAGCCTATAGACCA
 FR1 TTTGGAGAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCTGCTTATAGACCA
 FR2 TTTGGAGAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCTGCTTATAGACCA
 US1 TTTGGAGAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCTGCTTATAGACCA
 US3 TTTGGAGAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCTGCTTATAGACCA
 US5 WTWGGASAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCMTGCTTATAGACCA
 US6 TTTGGAGAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCTGCTTATAGACCA
 US7 TTTGGAGAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCTGCTTATAGACCA
 US10 TTTGGAGAGAAACCGTCTTTGAGTATTTGGTGTCTTTTGGAGTGTGGATTCCCACTCCTCCTGCTTATAGACCA

526
 HBVXCPS CCAAAATGCCCTATCTTATCAACAACCTCCGGAACTACTGTTGTAGACGACGGGACCGGAGGCGAGGTCCTCCCTAGA
 FR1 CCAAAATGCCCTATCTTATCAACAACCTCCGGAGACTACTGTTGTAGACGAAAGNNNNNAGGCGAGGTCCTCCCTCGA
 FR2 CCAAAATGCCCTATCTTATCAACAACCTCCGGAGACTACTGTTGTAGACGAAAGNNNNNAGGCGAGGTCCTCCCTCGA
 US1 CCAAAATGCCCTATCTTATCAACAACCTCCGGAGACTACTGTTGTAGACGAAAGNNNNNAGGCGAGGTCCTCCCTCGA

Figure 7 - cont'd 2

【 図 7 - 3 】

US3 CCAAATGCCCTATCCTATCAACAACCTTCCGGAGACTACTGTTGTAGACGAAAGNNNNNAGGCAGGTCCCCTCGA
 US5 CCAAATGCCCWATCCYATCAACAACCTTCCGGAGRCTRCTGTTGTAGRCGAAGNNNNNAGGCAGGTCCCCTCGA
 US6 CCAAATGCCCTATCCTATCAACAACCTTCCGGAGACTACTGTTGTAGACGAAAGNNNNNAGGCAGGTCCCCTCGA
 US7 CCAAATGCCCTATCCTATCAACAACCTTCCGGAGACTACTGTTGTAGACGAAAGNNNNNAGGCAGGTCCCCTCGA
 US10 CCAAATGCCCTATCCTATCAACAACCTTCCGGAGACTACTGTTGTAGACGAAAGNNNNNAGGCAGGTCCCCTCGA

601
 HBVXCPS AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGATCTCAATCTCGGGAATCTCAA
 FR1 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGATCTGCATCTCCAGCTTCCC
 FR2 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGAT (SEQ ID NO 45)
 US1 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGAT (SEQ ID NO 46)
 US3 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGAT (SEQ ID NO 47)
 US5 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGAT (SEQ ID NO 48)
 US6 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGATATGCATCTC
 US7 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGAT (SEQ ID NO 50)
 US10 AGAAGAACTCCCTCGCCTCGCAGACGAAAGATCTCAATCGCCGGTCCGAGAGAT (SEQ ID NO 51)

676
 HBVXCPS TGTTAG (SEQ ID NO 43)
 FR1 TGTTAG (SEQ ID NO 44)
 US6 (SEQ ID NO 49)

Figure 7 - cont'd 3

【 8 】

```

1
HBVXCPS ATGGGAGGTGGTTCATCAAAAACCTCGAAAGGCATGGGGACGAATCTTTCTGTTCCTCCAAACCCCTCTGGGATTC'TTT
FR1 -----GCT--CT-GGA-GGTC-----T-G-GNNNTG--A-A--C-----C-CCAG--T-----A-----C--
FR2 T--CT-GGA-GGTC-----T-G-GNNNTG--A-A--C-----CACCAG--T-----A-----C--
US1 GTC-----T-G-GNNNTG--A-A--C-----CACCAG--T-----A-----C--
US3 CGTC-----T-G-GNNNTG--A-A--C-----CACCAG--T-----A-----C--
US6 C-----T-G-GNNNTG--A-G--C-----CACCAG--T-----A-----C--
US7 C-----T-G-GNNNTG--A-A--C-----CACCAG--T-----A-----C--
US9 G-GNNNTG--A-A--C-----CACCAG--T-----A-----C--
US10 T-GGCGG--CTCTG-GNNNTG--A-A--C-----CACCAG--T-----A-----C--

```

```

76
HBVXCPS CCCGATCATCAGTTGGACCTGTGCAATTCGGAGCCAACTCAAACAATCCAGATTGGGACTTCAACCCCATCAAGGAC
FR1 -----C-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----
FR2 -----C-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----
US1 -----C-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----
US3 -----C-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----
US6 -----C--A--T-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----
US7 -----C-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----
US9 -----C-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----
US10 -----C-----A-----A--TA-C-----T-----AA-----

```

```

151
HBVXCPS CACTGGCCAGCAGCCACCAGGTAGGAGTGGAGCAATTCGGGCCAAGGCTCACCCCTCCACACGGCGGTATTTTG
FR1 -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----
FR2 -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----

```

Figure 8

【 図 8 - 1 】

```

US1  -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----
US3  -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----
US6  -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----
US7  -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----
US9  -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----
US10 -CT-----AG-----A-----T-----C-AT--A--CG--T-----A--CC-----

226
HBVXCPS GGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGCATATTGACCACACAGTGTCAACAATTCTCTCCTGCCCTCCACCAATCGGCAG
FR1  -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----
FR2  -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----
US1  -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----
US3  -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----
US6  -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----
US7  -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----
US9  -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----
US10 -----T-----C-C-A--A--TT--C--G--GA--G-----T-----

301
HBVXCPS TCAGGAAGCAGCCTACTCCCATCTCTCCACCTTAAGAGACAGTCAATCCTCAGGCCATGCAGTGAATTCCTACT
FR1  -----G-----A-----A-----C--T--A
FR2  -----G-----A-----A-----K-----Y-----C--T--A
US1  -----G-----A-----A-----A-----C--T--A
US3  -----G-----A-----A-----A-----C--T--A
US6  -----G-----A-----A-----A-----C--T--A

```

Figure 8 - cont'd 1

【図8-2】

```

US7      -----G-----A-----C--T--A
US9      -----G-----A-----C--T--A
US10     -----G-----A-----C--T--A

```

```

376
HBVXCPS  GCCTTCCACC AAGCTCTGCAGGATCCCAAAGTCAGGGTCTGTATCTTCCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACA
FR1      -----A--AA-----C-----T-----G-T-
FR2      -----A--AA-----C-----T-----G-T-
US1      -----A--AA-----C-----T-----G-T-
US3      -----A--AA-----C-----T-----A-G-T-
US6      -----A--AA-----C-----T-----G-T-
US7      -----A--AA-----C-----T-----G-T-
US9      -----A--AA-----C-----T-----G-T-
US10     -----A--AA-----GCCNNNNNNNNNN-----G-T-

```

```

451
HBVXCPS  GTA AACCCCTGCTCCGAAATATTGCCTCTCACATCTCGTCAATCTCCGCGAGGACTGGGGACCCTGTGACGAACATG
FR1      -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----
FR2      -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----
US1      -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----
US3      -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----
US6      -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----
US7      -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----
US9      -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----
US10     -----T-----C-----T-T-C-----T-----CAC-----

```

Figure 8 - cont'd 2

【 8 ' 3 】

526
 HBVXCPS GAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTC
 FR1 -----
 FR2 -----
 US1 -----
 US3 -----T-----
 US6 -----
 US7 -----
 US9 -----
 US10 -----

601
 HBVXCPS ACAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGGTCACCCCTGTGTCTTGGCCAA
 FR1 -----AGTG-----C-----T-----
 FR2 -----AGTG-----C-----T-----
 US1 -----AAGTG-----C-----TT-----
 US3 -----AGTG-----C-----T-----
 US6 -----AGTG-----C-----T-----
 US7 -----AGTG-----C-----T-----
 US9 -----AGTG-----C-----T-----
 US10 -----AGTG-----C-----T-----

676
 HBVXCPS AATTGCGAGTCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTGTCTCCAATTTGTCTCGTTATCGCTGGATGTGT
 FR1 -----T-----C-----C-----
 FR2 -----T-----C-----C-----

Figure 8 - cont'd 3

【 8 - 4 】

```

US1      -----T-----C-----C-----
US3      -----T-----C-----C-----
US6      -----T-----C-----C-----
US7      -----T-----C-----C-----
US9      -----T-----C-----C-----
US10     -----T-----C-----C-----

```

```

751
HBVXCPS  CTGGGCGTTTTATCATATTCCTCTTCAATCCTGCTGCTATGCCTCACTTCTTGTGGTTCTTCTGGATTATCAA
FR1      -----C-----C-----C-----
FR2      -----C-----C-----C-----
US1      -----C-----C-----C-----
US3      -----C-----C-----C-----
US6      T-----C-----C-----C-----
US7      -----C-----C-----C-----
US9      -----C-----C-----C-----
US10     -----C-----C-----C-----

```

```

826
HBVXCPS  GGTATGTTGCCCGTTTGTCCCTCTAATTCAGGATCAACAACAACCAGTACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACT
FR1      -----G-----CT-G-C-----C-----
FR2      -----G-----CT-G-C-----C-----
US1      -----G-----CT-G-C-----C-----
US3      -----G-----CT-G-C-----C-----
US6      -----G-----CT-G-C-----C-----

```

Figure 8 - cont'd 4

【 8 - 5 】

```

US7      -----G-----CT-G-C-----C-----
US9      -----G-----CT-G-C-----C-----
US10     -----G-----CT-G-C-----C-----

```

```

901
HBVXCPS  CCTGCTCAAGGCAACTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGAATGGAAATGACACCTGTATTCCC
FR1      -----A-----T-----C-----
FR2      -----A-----T-----C-----
US1      -----A-----T-----C-----
US3      -----A-----T-----C-----
US6      -----A-----T-----C-----
US7      -----A-----T-----C-----
US9      -----A-----T-----C-----
US10     -----A-----T-----C-----

```

```

976
HBVXCPS  ATCCCATCGTCCTGGGCTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGCCCTCAGTCCGTTTCTCTTGGCTCAGTTTACTA
FR1      -----A-T-----
FR2      -----A-T-----
US1      -----A-T-----
US3      -----A-T-----
US6      -----A-T-----
US7      -----A-T-----
US9      -----A-T-----
US10     -----A-T-----

```

Figure 8 - cont'd 5

1051

```

HBVXCPS GTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGCTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGCTATATGGATGATGGTATTGG
FR1 -----C-----
FR2 -----C-----
US1 -----C----- (SEQ ID NO 55)
US3 -----C----- (SEQ ID NO 56)
US6 -----C-----
US7 -----M----- (SEQ ID NO 58)
US9 -----C-----
US10 -----G-T-CGAGG-C-TT-C (SEQ ID NO 60)

```

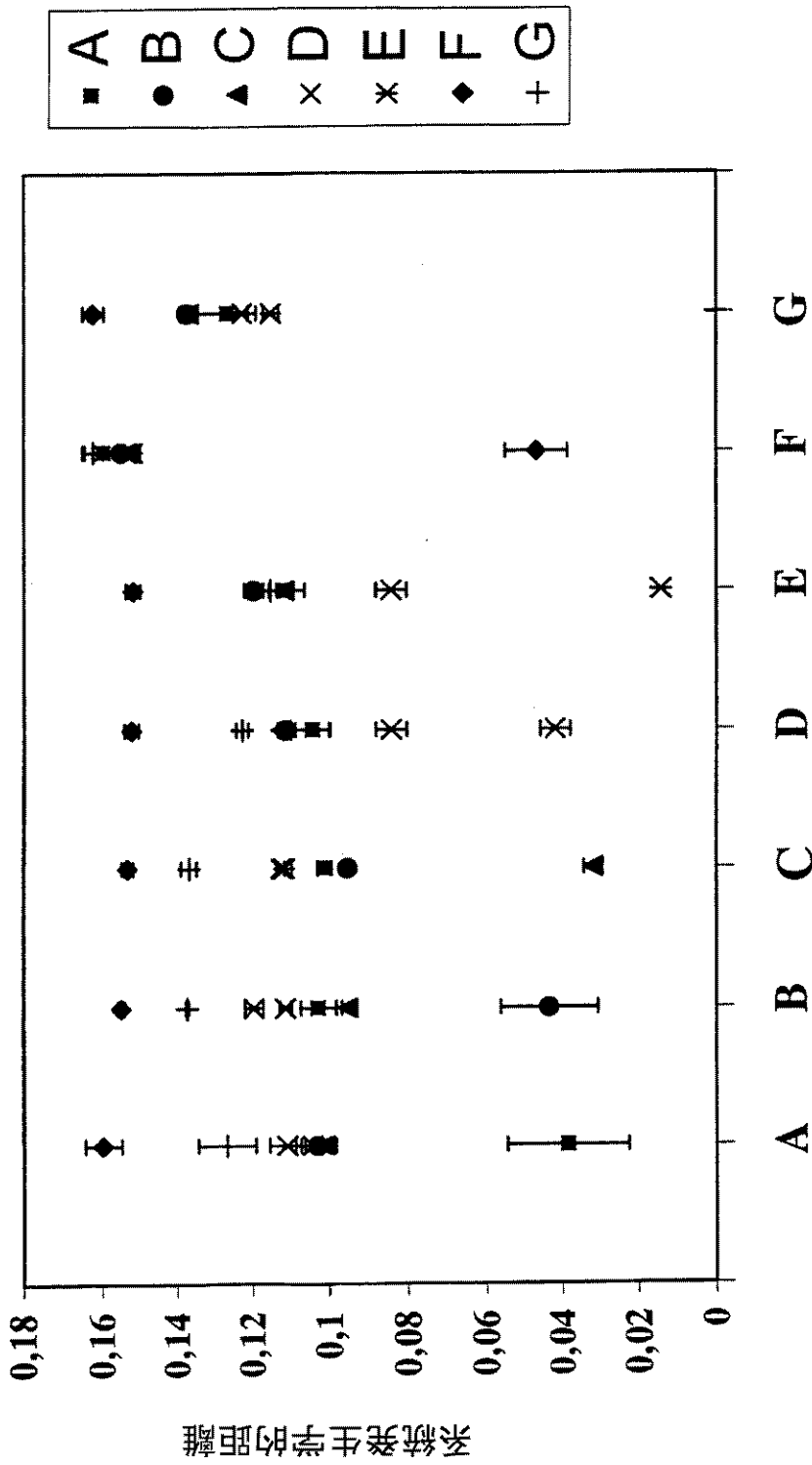
```

1126
HBVXCPS GGGCCAA (SEQ ID NO 52)
FR1 ----- (SEQ ID NO 53)
FR2 ----- (SEQ ID NO 54)
US6 -- (SEQ ID NO 57)
US9 (SEQ ID NO 59)

```

Figure 8 - cont'd 6

【図9】



比較される遺伝子型

Figure 9

【図10a】

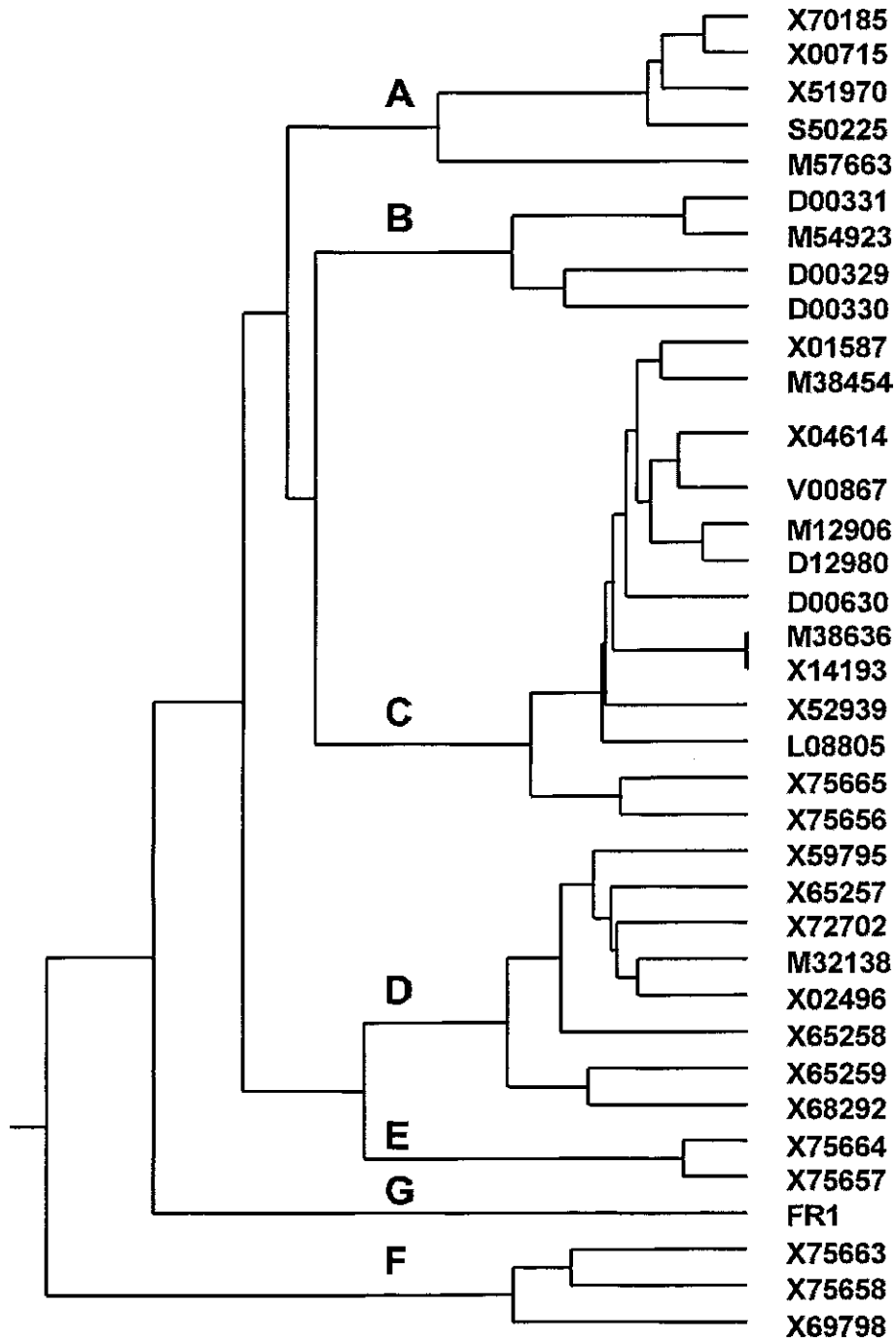


Figure 10a

【図10b】

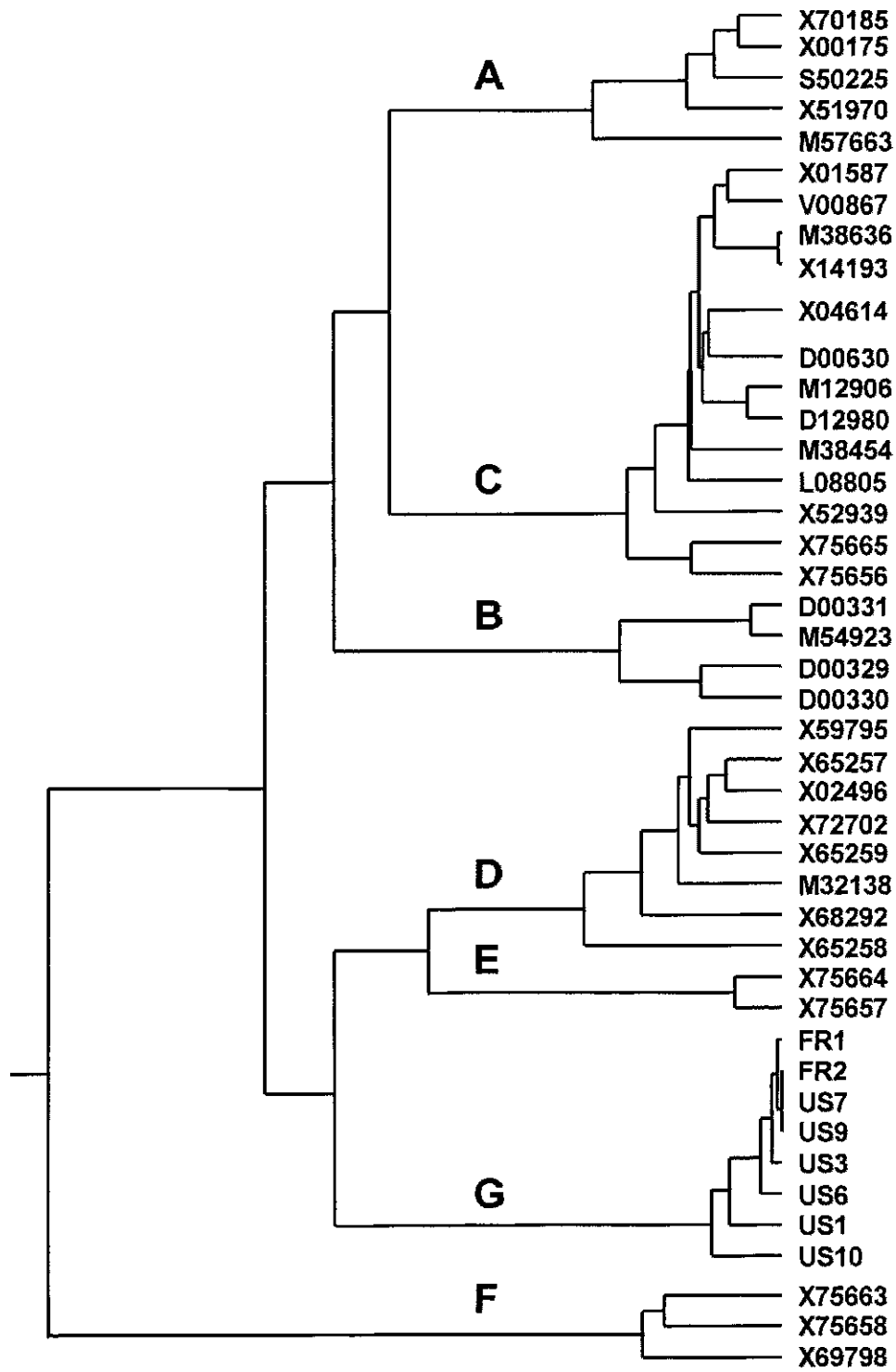


Figure 10 b

【図11】

遺伝子型

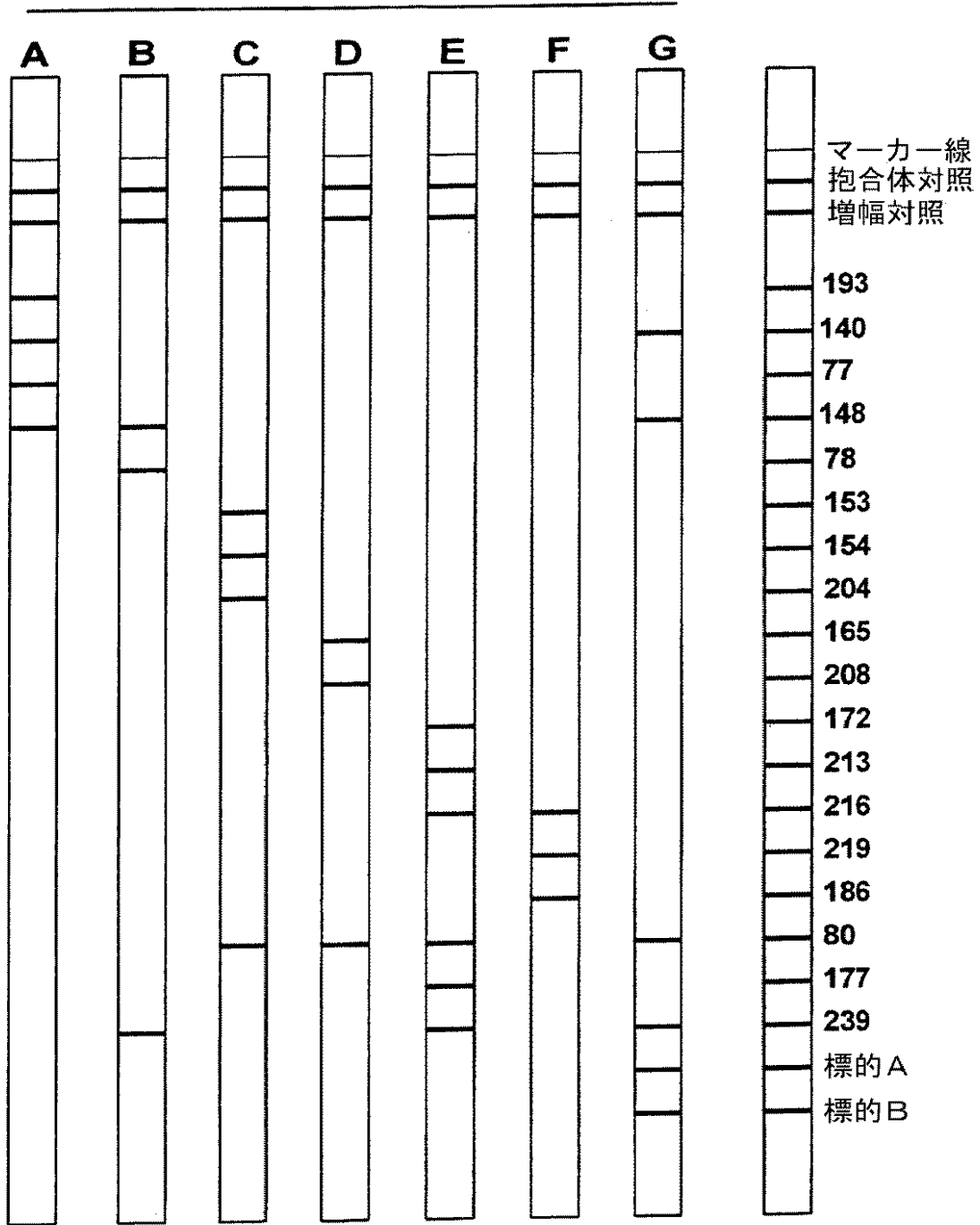


Figure 11

【図12】

```
ATGTAAC TTT TTCACCTCTG CCTAATCATC TCTTGTTTTCAT
GTCCTACTGT TCAAGCCTCC AAGCTGTGCC TTGGGTGGCT
TTAGGGCATG GATAGAACAA CTTTGCCATA TGGCCTTTTT
GGCTTAGACA TTGACCCTTA TAAAGAATTT GGAGCTACTG
TGGAGTTACT CTCGTTTTTG CCTTCTGACT TTTTCCCGTC
TGTTTCGTGAT CTTCTCGACA CCGCTTCAGC TTTGTACCGG
GAATCCTTAG AGTCCTCTGA TCATTGTTTCG CCTCACCATA
CAGCACTCAG GCAAGCAATC CTGTGCTGGG TGGAGTTGAT
GACTCTAGCT ACCTGGGTGG GTAATAATTT GGAAGATCCA
GCATCCAGAG ATTTGGTGGT CAATTATGTT AATACTAATA
TGGGTTTAAA AATCAGGCAA CTATTGTGGT TTCACATTTT
CTGTCTTACT TTTGGAAGAG AAACCGTTCT TGAGTATTTG
GTGTCTTTTG GAGTGFGGAT TCGCACTCCT CCTGCTTATA
GACCACAAA TGCCCCTATC CTATCAACAC TTCCGGAGAC
TACTGTTGTT AGACGAAGAG GCAGGTCCCC TAGAAGAAGA
ACTCCCTCGC CTCGCAGACG CAGATCTCCA TCGCCGCGTC
GCAGAAGATC TCAATCTCGG GAATCTCAAT GTTAG
(SEQ ID NO 169)
```

Figure 12

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		In national Application No PLT/EP 00/11526
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/36 C07K14/02 C12Q1/70 C12Q1/68 A61K39/29 G01N33/569 A61P31/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N A61K G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, CHEM ABS Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. TRAN ET AL.: "Emergence of and takeover by hepatitis B virus (HBV) with rearrangements in the PreS/S and PreC/C genes during chronic HBV infection" J. VIROL., vol. 65, no. 7, 1991, pages 3566-3574, XP000914642 cited in the application figures 1,2	4,6
X	BHAT ET AL.: "Molecular characterisation of a new variant of hepatitis B virus in a persistently infected homosexual man" HEPATOLOGY, vol. 11, no. 2, 1990, pages 271-276, XP000014788 figure 3	4,6
--- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 September 2001	Date of mailing of the international search report 24/09/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentsaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Skelly, J	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/11526

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 736 334 A (SPIES) 7 April 1998 (1998-04-07) SEQ. ID. Nos. 21, 22, 23, 24, 25 column 11, line 33 - line 47 ---	4,5
X	EP 0 569 237 A (GEN-PROBE INC.) 10 November 1993 (1993-11-10) page 2, line 30 -page 3, line 29 ---	4,5
X	H. OHNUMA ET AL.: "Synthetic oligopeptides bearing a common or subtypic determinant of heaptits B surface antigen" J. IMMUNOL., vol. 145, no. 7, 1990, pages 2265-2271, XP002044688 see especially the discussion ---	6-10
X,P	L. STUYVER AT AL.: "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness" J. GEN VIROL., vol. 81, no. 1, 2000, pages 67-74, XP002177227 the whole document ---	1-36

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 37, 38

Present claims 37 and 38 relate to an extremely large number of possible screening assays. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not present. The claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search is impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/11526

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5736334 A	07-04-1998	AU 7326494 A	13-02-1995
		CA 2167056 A	26-01-1995
		EP 0785996 A	30-07-1997
		JP 9501829 T	25-02-1997
		WO 9502690 A	26-01-1995
EP 569237 A	10-11-1993	AU 683414 B	13-11-1997
		AU 4368693 A	29-11-1993
		CA 2135074 A	11-11-1993
		JP 7506254 T	13-07-1995
		WO 9322460 A	11-11-1993
		US 5780219 A	14-07-1998

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA13 BB03 CA25
CA26 CB01 CB03 CB04 CB09
CB14 CB21 DA12 DA13 DA14
DA36 FB02 FB03 FB04 FB07
4B024 AA01 AA11 BA33 CA04 CA09
DA02 DA05 DA06 DA11 DA12
EA02 EA04 GA11 HA12
4B063 QA13 QA19 QA20 QQ08 QQ43
QR08 QR42 QR56 QR62 QS25
QS34 QX02
4B064 AG33 CA02 CA05 CA06 CA10
CA19 CC24 DA01 DA15
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X
AA96Y AB01 BA02 CA24
CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13
BA01 BA02 CA53 NA14 ZA752
ZB332
4C085 AA13 AA14 BB11 CC21 DD62
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA02 DA75 DA86 EA29 EA51
FA72 FA74

专利名称(译)	HBV序列		
公开(公告)号	JP2003515327A	公开(公告)日	2003-05-07
申请号	JP2001541034	申请日	2000-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司南玫瑰汾笔记本闭嘴基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司, Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	リーフェンスタイファー カロリーヌファンヘイト セイアデヘント		
发明人	リーフェンスタイファー カロリーヌファンヘイト セイアデヘント		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/20 C07K14/02 C07K16/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/576 G01N37/00		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/20 C07K14/005 C12N2730/10122		
FI分类号	A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P31/20 C07K14/02 C07K16/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/576.B G01N37/00.102 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB09 2G045/CB14 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA33 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG33 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA752 4C084/ZB332 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA02 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	1999870252 1999-12-03 EP 60/169287 1999-12-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

我们报告了一种新的人类乙型肝炎病毒基因型的完整核酸序列，暂定名为基因型G。该基因型在慢性感染HBV的患者中非常普遍，并发现存在于欧洲和美国。此外，本发明涉及由核酸编码的多肽和识别该多肽的抗体。本发明还涉及所述核酸，多肽和抗体在HBV诊断，预防和治疗中的用途。

表 1. 増殖および配列決定用プライマー一覧

プライマー	プライマー配列 (5'→3')	宿主性	トラン	位置	配列番号
HBp1	GGGTCACCAATCTCTGGG	S	HBp1	285-388	21
HBp2	GAACAGACCAAGCATGGG	S	HBp1/PhS1	286-388	22
HBp3	CCACTGATGGCTGAGGATG	AS	PhS1/S/HRp1	328-536	23
HBp7	CTCCACAGATACCTCCAAATTC	AS	Core	198-198	24
HBp14	TGGGGTGAGCCCTCAG	S	PhS1/HRp1	3194-320	25
HBp33	CTGAGGCTCCAACTCA	AS	PhS1/HRp1	3194-320	26
HBp75	CAAGTTAGTTCCTCCCTTCTCC	S	HBpAg	45-47	27
HBp66	ACTAAGAGGACTCTGGAC	S	HBX	102-107	28
HBp67	TACTTCAAGACGGCGCTTAA	S	HBX	104-123	29
HBp94	GCTATATAGGGACTCAGCAGATC	AS	HBp1/HRpAg	75-78	30
HBp108	TTTTCACTCCCTCAATC	S	HBV7p/Core	181-180	31
HBp109	AAAAAGTTCATGTGTCTGG	AS	HBV7p/Core	186-185	32
HBp110	CTCTCCGATCCATCTCGGAC	S	HRp1	125-129	33
HBp111	CTCCGCGCGGCGGCTTCTTC	AS	Core/HRp1	246-249	34
HBp113	CCCGCATGATGAGCGACAGCCG	AS	HBV/HRp1	158-154	35
HBp134	TCTCTCATCTCCATCTTC	S	HRp1/HRpAg	414-43	36