

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-501151

(P2006-501151A)

(43) 公表日 平成18年1月12日(2006.1.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7K 14/18 (2006.01)</b>	CO7K 14/18 ZNA	4HO45
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 N	
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 5O1D	
<b>GO1N 33/569 (2006.01)</b>	GO1N 33/569 H	
<b>GO1N 33/576 (2006.01)</b>	GO1N 33/569 L	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-503914 (P2004-503914)	(71) 出願人	502056400 バイオラド パストゥール フランス国, エフ-92430 マルヌ ラ コケット, プールパール ライモン ポワンカーレ, 3
(86) (22) 出願日	平成15年5月9日(2003.5.9)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(85) 翻訳文提出日	平成16年12月16日(2004.12.16)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/001429	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(87) 国際公開番号	W02003/095968	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(87) 国際公開日	平成15年11月20日(2003.11.20)	(74) 代理人	100117019 弁理士 渡辺 陽一
(31) 優先権主張番号	02/05808		
(32) 優先日	平成14年5月10日(2002.5.10)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染性微生物の抗原及び抗体を同時に検出するための方法

## (57) 【要約】

本発明は、生物試料中、微生物、例えば、C型肝炎ウイルスが介在した感染症を、当該微生物及び当該抗原に対して向けられた抗体を同時検出することによって、in vitro検出ための方法、並びに当該方法を行うための試薬及びキットに関連する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物試料において、微生物による感染症を *in vitro* で検出するための方法であって、ここで当該方法は、当該生物試料中に存在する、当該微生物の少なくとも 1 つの抗原及び当該微生物に対して向けられた抗体を同時検出することを含んで成り、当該方法は：

a) 当該生物試料を、当該微生物に対して向けられた捕獲抗体、及び当該微生物に由来する捕獲抗原と接触せしめ；

b) この混合物を、抗原 - 抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし；

c) 形成された当該抗原 - 抗体複合体を露出させ、それは任意に、捕獲されている前記微生物の抗原、に対して結合できる標識された検出抗体及び / 又は任意に、捕獲されている前記微生物に対して向けられた抗体、に対して結合できる標識された検出抗原をも使用する、

10

ことを含んで成り；

そして、ここで前記微生物の当該捕獲抗原及び / 又は当該標識された検出抗原は、当該微生物の、少なくとも 1 つのエピトープが無効にされている抗原性断片を含んで成り；

そして、当該捕獲及び / 又は検出抗体が、捕獲されている前記抗原の完全であるエピトープ認識する、

方法。

## 【請求項 2】

前記微生物が、ウイルス、細菌及び寄生微生物からなる群から選択されている、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

前記微生物が、C型肝炎ウイルス (HCV) である、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記捕獲抗原が、HCV のカプシドタンパク質の抗原性断片を含んで成り、ここで少なくとも 1 つのエピトープ部位が無効にされている、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記捕獲抗原が、HCV の非構造性タンパク質 NS3 又は NS4 の抗原性断片を含んで成る、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記微生物がヒト免疫欠損ウイルス (HIV) である、請求項 2 に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記 HIV が HIV-1 及び / 又は HIV-2 である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記捕獲抗原が、HIV の gag タンパク質の抗原性断片を含んで成り、ここで少なくとも 1 つのエピトープが無効にされている、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記捕獲抗原が HIV のエンベロープタンパク質の抗原性断片を含んで成る、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記捕獲抗原が無効にしてある少なくとも 2 つの異なるエピトープ部位を含む、請求項 3 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

前記捕獲抗原が、少なくとも 1 つのアミノ酸の置換、欠失又は挿入によって無効にしたエピトープ部位を含む、請求項 3 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記捕獲抗体及び前記捕獲抗原を固相上に固定化している、請求項 3 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記検出抗体を前記混合物に対して、抗原 - 抗体複合体を形成させた後に加えている、

50

請求項 3 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記検出抗体及び/又は検出抗原を、前記捕獲抗体及び前記捕獲抗原と同時に生物試料に対して接触せしめている、請求項 3 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

a) 前記生物試料を、固相に対して結合させた HCV 捕獲抗体及び HCV 捕獲抗原と接触せしめ

;

b) この混合物を、抗原 - 抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし;

c) 固相と液相を分離し;

d) 当該固相を、第 1 番目に、捕獲されている HIV 抗原を結合できる標識された検出抗体に、そして第 2 番目に、捕獲されている抗 HIV 抗体を結合できる、標識された抗免疫グロブリンもしくは抗イソ型抗体、もしくは標識された検出抗原に接触せしめる、

10

ことを含んで成り、そして、前記抗 HCV 抗体を捕獲するための抗原及び検出するための抗原は、2 つのエピトープが無効にされている、HCV のカプシドタンパク質の抗原性断片を含んで成り、

そして前記捕獲及び検出抗体は、当該捕獲されているカプシド抗原の、完全である、前記エピトープの 1 つ、を各々が認識する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 16】

前記捕獲抗体及び検出抗体が各々、以下の配列：<sup>44</sup>LGVR<sup>47</sup> (配列番号 19)、<sup>30</sup>IVGGVY<sup>20</sup> L<sup>36</sup> (配列番号 20) 及び<sup>29</sup>QIVGGV<sup>34</sup> (配列番号 21) を有するエピトープの群から選択されたエピトープを認識する、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

a) 前記試料を、固相に対して結合させた HIV 捕獲抗体及び HIV 捕獲抗原と接触せしめ;

b) この混合物を、抗原 - 抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし;

c) 固相と液相を分離し;

d) 当該固相を、捕獲されている HIV 抗原を結合できる標識された検出抗体と、そして捕獲されている抗 HIV 抗体を結合できる、1 又は複数の標識された抗免疫グロブリンもしくは抗イソ型抗体と接触せしめる、

ことを含んで成り、そして、

30

前記抗 HIV 抗体を捕獲するための抗原は、少なくともエピトープが無効にされている、HIV の gag タンパク質の抗原性断片を含んで成り、

そして前記捕獲及び検出抗体は、当該捕獲されているカプシド抗原の、完全である、前記エピトープの 1 つ、を各々が認識する、請求項 6 又は 7 に記載の検出方法。

【請求項 18】

前記捕獲抗体及び検出抗体が各々、配列 QASQEVKNWMTETLL (配列番号 24) のエピトープを認識する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 19】

前記試料を、固相に対して結合させた前記捕獲抗体及び前記捕獲抗原に対して、少なくとも 1 種の非イオン型のデタージェントの存在下で接触せしめる、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 20】

前記非イオン性デタージェントが NP40 である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

生物試料において、微生物による感染症を検出するために使用するキットであって:

- 微生物のタンパク質の抗原性断片を含んで成る捕獲又は検出抗原であって、当該断片は、少なくとも 1 つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも同時に当該生物試料中に存在する可能性がある、微生物に対して向けられた抗体に対して結合する能力を保存している、捕獲又は検出抗原;

50

- 前記微生物のタンパク質の、完全である、前記エピトープに対して向けられた抗体、を含んで成るキット。

【請求項 2 2】

前記微生物がC型肝炎ウイルス(HCV)である、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記抗体が、前記生物試料中に存在するHCV抗原を捕獲するための抗体である、請求項 2 2 に記載のキット。

【請求項 2 4】

前記抗体が、以下の配列：<sup>44</sup>LGVR<sup>47</sup> (配列番号 1 9)、<sup>30</sup>IVGGVYL<sup>36</sup> (配列番号 2 0)、<sup>29</sup>QIVGGV<sup>34</sup> (配列番号 2 1) を有するエピトープの群から選択されたエピトープを認識する、請求項 2 2 又は 2 3 に記載のキット。 10

【請求項 2 5】

前記微生物がヒト免疫欠損ウイルス(HIV)である、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 6】

前記HIVがHIV-1及び/又はHIV-2である、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 2 7】

前記抗体が前記生物試料中に存在するHIV抗原を捕獲するための抗体である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 8】

前記抗体が、配列QASQEVKNWMTETLL (配列番号 2 4) のエピトープを認識する、請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載のキット。 20

【請求項 2 9】

前記捕獲抗原に加えて、前記生物試料中に存在する前記抗HCV抗体を検出しそして前記捕獲抗原と複合体を形成させる手段をも含んで成る、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 0】

前記捕獲抗原に加えて、前記生物試料中に存在する前記抗HIV抗体を検出しそして前記捕獲抗原と複合体を形成する手段をも含んで成る、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 1】

前記検出の手段が、標識された抗免疫グロブリン又は抗イソ型抗体である、請求項 2 8 又は 2 9 に記載のキット。 30

【請求項 3 2】

前記捕獲抗体及び前記捕獲抗原が固相上に固定化された形態で存在する、請求項 2 3、2 4、2 9 又は 3 1 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 3】

a) HCVタンパク質の抗原性断片を含んで成る捕獲抗原であって、当該断片が少なくとも 2 つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも同時に、前記生物試料中に存在する可能性がある抗HCV抗体に対して結合する能力を保存している、捕獲抗原；

b) 前記HCVタンパク質の完全であるエピトープの 1 つに対して向けられた捕獲抗体；を含んで成り； 40

前記捕獲抗原及び前記捕獲抗体は固相上に固定化されており；そして

c<sub>1</sub>) HCVタンパク質の完全である他のエピトープの対して向けられた標識された検出抗体；及び/又は

c<sub>2</sub>) 任意に、HCVのタンパク質の抗原性断片である標識された検出抗原であって、当該断片は少なくとも 1 つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも当該同時に、当該生物試料中に存在する可能性がある抗HCV抗体に対して結合する能力を保存している、検出抗原、

を含んで成る、請求項 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記標識された検出抗原は、HCVのカプシドタンパク質の断片であり、ここでこの断片の少なくとも1つのエピトープ部位が無効にされている、請求項33に記載のキット。

【請求項35】

前記捕獲抗原が、少なくとも1つのエピトープ部位が無効にされている断片HCVのカプシドタンパク質の断片を含んで成り、そして前記抗体が、当該カプシドタンパク質の完全であるエピトープ部位を認識する、請求項22～24、29又は31～33のいずれか1項に記載のキット。

【請求項36】

a) HIVのタンパク質の抗原性断片を含んで成る捕獲抗原であって、当該断片が少なくとも1つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも同時に、前記生物試料中に存在する可能性がある抗HIV抗体に対して結合する能力を保存している捕獲抗原；

b) 前記HIVタンパク質の完全であるエピトープの1つに対して向けられた捕獲抗体；を含んで成り；

前記捕獲抗原及び前記捕獲抗体は固相上に固定化されており；

c<sub>1</sub>) HIVタンパク質の完全である他のエピトープの対して向けられた標識された検出抗体；

c<sub>2</sub>) 及び/又は任意に、HIVタンパク質の抗原性断片である標識された検出抗原であって、当該断片が少なくとも1つの無効されたエピトープを含んで成り、しかも同時に当該生物試料中に存在する可能性がある抗HIV抗体に対して結合する能力を保存している、標識された検出抗原、

を含んで成る、請求項31に記載のキット。

【請求項37】

前記捕獲抗原が、HIVのgagタンパク質の抗原性断片を含んで成り、ここで少なくとも1つのエピトープ部位が無効にされている、請求項36に記載のキット。

【請求項38】

前記捕獲抗原が、HIVのgagタンパク質の断片を含んで成り、ここで当該断片の少なくとも1つのエピトープ部位が無効にされており、そして前記抗体が、当該gagタンパク質の完全であるエピトープ部位を認識する、請求項25～28、30～32又は36のいずれか1項に記載のキット。

【請求項39】

非イオン型のデタージェントを少なくとも1種含んで成る、請求項23～38のいずれか1項に記載のキット。

【請求項40】

前記非イオン型のデタージェントがNP40である、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

HCVのカプシドタンパク質に由来するペプチド又はポリペプチドであって、少なくとも1つの完全なエピトープ部位及び少なくとも1つの無効にされたエピトープ部位を維持し、従って、当該無効にされたエピトープ部位は抗カプシド抗体によって認識不能にされている、ペプチド又はポリペプチド。

【請求項42】

配列番号4～18のいずれか1つの配列を含んで成る、請求項41に記載のペプチド又はポリペプチド。

【請求項43】

HIVのgagタンパク質に由来するペプチド又はポリペプチドであって、少なくとも1つの完全なエピトープ部位及び少なくとも1つの無効にされたエピトープ部位を維持し、従って、当該無効にされたエピトープ部位は抗gagタンパク質抗体によって認識不能にされている、ペプチド又はポリペプチド。

【請求項44】

配列番号22の配列を含んで成る、請求項43に記載のペプチド又はポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、感染体の、特にウイルス、微生物による感染症の *in vitro* 検出に関連し、詳細には、C型肝炎ウイルス (HCV) による感染症の *in vitro* 検出に関連する。更に正確には、本発明は、感染体の、特にウイルス、微生物の抗原、及び当該感染性微生物に対して向けられた抗体を同時検出するための方法に関連し、並びにそれを行うための試薬とキットにも関連する。更に詳細には、本発明は、HCV抗原及び抗HCV抗体を同時に検出するための方法に関連し、そしてそれを行うための試薬とキットに関連する。

## 【背景技術】

## 【0002】

最初是非A、非B型肝炎に言及された肝炎の形態である、C型肝炎ウイルスによる感染症は、長期に渡り、特に輸血において、確認されてきた関心事となる健康問題であった。

## 【0003】

1989年5月31日に刊行された特許出願EP318 261には、ヒトのC型肝炎の原因となる、HCVとよばれる、ウイルスのcDNAの断片のクローニングが記載されている。それにはまた、前記ウイルスの非構造的タンパク質 (NS1~NS5) をコードする5つの遺伝子の配列 (HCVの総ゲノムのおよそ78%)、C100-3抗原 (NS3-NS4領域の363アミノ酸を含み、そしてスーパーオキシドジスムターゼに対して融合する) が記載されており、そして当該C100-3抗原を使用して抗HCV抗体を検出する方法も記載されている。抗HCV抗体を検出するためのこの「第一生成」方法は、とりわけ、HCVが、現在は世界中でC型肝炎とよばれている非A、非B型肝炎の主たる原因であることを確証可能にする。しかしこの方法では、ウイルスに感染した血清の検出を70~80%超可能にはしない。このような感度の欠如によりいずれの感染症の早期検出が可能にならない。

## 【0004】

Okamotoら (1990a) 及び1990年9月19日に刊行された特許出願は、HCVウイルスのゲノムの5'末端の配列を記載しており、それは即ち、C型肝炎の原因となるウイルスの構造タンパク質 (カプシド、マトリクス、エンベロープ) をコードする遺伝子の配列である。

## 【0005】

Okamotoら (1990b) は、抗HCV抗体のERISAによる検出のための標的としてHCVカプシドのアミノ酸39~74の配列の使用を公にしている。

## 【0006】

Hoseinらの記事 (1991) には、構造的 (カプシド: 領域AA1~120における) 及び非構造的 (NS3~NS4: 領域AA1200~1800における) 合成ペプチド抗原の使用に基づいて、抗HCV抗体を検出するための免疫アッセイが記載されている。それは、抗HCV抗体の検出における合成ペプチドの利点、及び構造的及び非構造的抗原の組み合わせの利点: 組み合わせにより感度が高まりそして早期検出が可能になる、ことを実証している。ここに記載されたアッセイにより、抗体を4~10週、より早期に検出することが可能になる。記事は、AIDSウイルスなどの場合のような、主要な免疫優先性エピトープがないことをも示す。

## 【0007】

Nasoffら (1991) は、カプシドの最も優先的な免疫反応性エピトープはN末端領域 (AA1~40) に位置しており、そしてこれらのエピトープに対して向けられた抗体は、感染後間もなく出現することに気付いた。

## 【0008】

抗HCV抗体を検出するための「第二生成」アッセイ (即ち、構造的及び非構造的キャプチャー抗原の同時使用に基づく) は、前記第一生成アッセイに対して有意な進展を構築する。しかし、それらは依然として感度を欠き: 特にHCVで汚染された患者から採取した血清のせいぜい95~98%を検出する。結果として、この検出は依然として十分に速くはなく且つ輸血において感染血液が気付かれぬまま通過することに寄与する。実際に、輸血後のリスクを減らすため、抗体が出現する前にウイルス自身を検出することが必須であり、そして汚染後にはできる限り速く検出することが必須である。このような汚染とセロコ

10

20

30

40

50

ンバージョン（即ち、抗体の出現）との間の時間は、「血清学的な空白時間」に言及されている。

【0009】

様々なチーム（Garsonら（1991）；Shiehら（1991））が、上記方法の感度及び速さの問題を解決するために、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）によってウィルスRNAの検出をすることを提案してきた。実際にこの方法により、HCVによる感染を非常に高感度且つ速く、即ち、ウィルスに対して曝露したわずか数日後、即ち、抗ウィルス抗体の循環が増加する4～8日前に、検出が可能になる。それは現在、生物流体中でウィルスを検出するために参照となる方法を構成する。

【0010】

しかし、前記HCVに対して適用されたPCR法は様々な問題に直面するようになった。第一に、それは、RNAを抽出、精製そしてRNAをcDNAへ逆転写する予備段階を行うことを伴い、そしてウィルス物質の部分がこれら予備段階過程で失われる。第二に、それには特異的且つ高価な増幅装置が必要となる。加えて、それは、多数の試料を同時に処理することが不可能であり且つ往々にして汚染が生じる。

【0011】

HCVによる感染の早期検出を目的とする他の方法は、循環するウィルス抗原（カプシド）を検出することからなる。この抗原は、血清抗HCV抗体の出現の数週間前に現れる。Takahashiら（1992）は、抗体のペアを使用してカプシド抗原を検出するELISA技術を記載している。

【0012】

しかし、この抗原の検出は多くの場合設定が困難で、その理由は、血液中の検出可能抗原の低力価及び入手可能な免疫試薬の質にある。

【0013】

Hajime Tokitaら（2000）らは、非常に高い検出感度を与える、「Immuchek F HCV Ag Core Kokusai」として市販されている、モノクローナル抗体のペア（5F11及び5E3）を使用するサンドウィッチ型の免疫アッセイを記載する。この記事の著者は、カプシドタンパク質における突然変異、Thr49Proがアッセイの感度を下げることがを強調する。そしてまたカプシド抗原の早期段階での検出を求め、Petersonら（2000）が、試料の前処理を伴わず、HCVのカプシド抗原を検出するための抗カプシドモノクローナル抗体を使用するERISA技術を開示する。この記事は、三つの独立するアッセイ（PCRによるHCV RNAの検出、及び抗HCV抗体の検出及びELISAによるカプシド抗原の検出）を比較することによって、循環するカプシド抗原が、感染の早期血清反応陰性期の間（即ち、RNAの検出のおよそ1日後）に採取した血液バッグ中で有用に検出されうることを示す。

【0014】

感染症の期間全体を通してのセロコンバージョンの続く抗体反応の検出の可能性と組み合わせたC型肝炎ウィルスによる感染症の検出の早さは、現在の目標、最も詳細には輸血における目的を維持する。

【0015】

最初に、血清学的空白時間の期間中のHCV抗原、次いでセロコンバージョン後の患者の血清学的展開を検出するために簡単に実行でき且つマスキングの観点から自動化されて良いシンプル、感受性、特異的、再現的で、安価な方法の観点から、抗HCV抗体の検出とHCV抗原の検出を組み合わせることが最も望ましい。

【0016】

しかし、このことはHCV抗原をアッセイすることに関する干渉の主要な問題；血清中に存在する抗HCV抗体と標識した抗HCV抗体との間での干渉、を有する。従って、ある抗体を検出する目的のために、標的抗原（抗原の同時サンドイッチ検出のために使用される標識された1又は複数の抗体によって認識される抗原と同じエピトープを有するだろう）を固相へ導入することは、固相に対して修復不可能なまで標識された1又は複数の抗体が結合することにつながり、それにより陽性反応を欠くアッセイになる。

10

20

30

40

50

## 【0017】

このことは、同じ固相上で、抗HCVカプシド抗体及びHCVカプシド抗原を同時に検出するためのシステムに特に当てはまる。従って、抗カプシド抗体を検出する目的で、カプシド抗原（カプシド抗原を検出する目的のために使用される標識された1又は複数の抗HCVカプシド抗体によって認識される抗原と同じエピトープを有するだろうカプシド抗原）を固相へ導入することは、固相に対して標識された1又は複数の抗体が結合することにつながり、それにより陽性反応を欠くアッセイになる。

## 【0018】

このような干渉のリスクを回避するために、Chiron.Corpらは、カプシド抗原及び患者の抗NS3/NS4抗体のみを検出するアッセイを行った。このことに関して、Chironは、第1番目に、固相に対して結合させたNS3/4a抗原を使用し、試験される試料の抗HCV抗体を捕獲し、そして第2番目に、結合した抗HCVカプシド抗体（c11-3及びc11-7）を捕獲した。捕獲された抗体を、ペルオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体の存在下でSOD（スーパーオキシドジスムターゼ）と融合させた抗原を使用して検出し、しかも、捕獲された抗原をペルオキシダーゼで標識された他のモノクローナル抗体（VII European Congress of the International Society of blood Transfusion - Paris, July 15~18, 2001）を使用して検出した。

## 【0019】

干渉問題に直面して、出願EP1020727（Advanced Life Science Institute）は、HCVカプシド抗原と抗HCVカプシド抗体を同時に測定するための方法（"コンボ"型アッセイ）を供し、ここで抗原は、抗カプシド抗体を捕獲及び発見又は検出するために同時に使用されるカプシドエピトープとは異なるカプシドエピトープに対して向けられた抗体によって捕獲及び標識されている。サンドイッチによって抗原を検出するため及び間接アッセイによって抗体を検出するための同時アッセイにおける代表的な例が与えられており、用途は、HCVカプシドのアミノ酸（AA）100~アミノ酸130の配列のエピトープに対して向けられた第一抗体（捕獲抗体）、及び配列AA40~50のエピトープに対して向けられた第二抗体（検出抗体）の抗原を検出するために作られており、当該抗体を検出するために、使用される捕獲抗原は、それ自身、配列AA1~42及びAA66~80を含む。

## 【0020】

しかしながら、この方法は欠点がないわけではなく、詳細には、それが、比較的互いに離れているエピトープであり、そして実際には、マイナーな、比較的免疫原性がないエピトープに対して向けられた抗体の使用を必要とする。それはまた、配列A43~65の不在により、この最後の配列に対して向けられた抗体を検出せず、それ故感度を欠くという欠点をも有する。

## 【0021】

加えて、それはカプシド抗原を捕獲し、そして本発明とは異なり、明らかに異なる、即ち、重なり合っていないカプシドタンパク質の2つの領域（抗体を検出するためにAA1~42及びAA66~80並びに抗原を検出するためにAA100~130）を介して抗カプシド抗体を捕獲する。

## 【0022】

特許出願W001/96875 A2（Chiron）は、とりわけて、デタージェントとしてN-ラウリルサルコジニンを使用する、カプシド及び抗NS3及び抗NS4抗体を同時に検出する方法（「不完全コンボ」、図2）を記載する。他方、それは、図8及び33ページで非常にまとめて、「完全コンボ」アッセイ、即ち、カプシド抗原（サンドイッチによって）と抗HCVカプシド及び抗HCV非構造的タンパク質抗体（二重抗原サンドイッチによって）を同時に検出するためのアッセイを記載する。抗原を捕獲するために、HCVカプシドの巨大N末端部分（AA10~53）を認識することが知られている、2つの抗体、c11-3及びc11-7を使用し、そして検出するために、HCVカプシドのC末端部分（AA120~130）を認識することが知られている第三の抗体、c11-14を使用している。抗体を検出するために、使用された捕獲抗原は、複数のエピトープを有する融合抗原（「MEFA12」、出願W001/96875の表2を参照のこと

10

20

30

40

50

)であり、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)との融合として、NS3、NS4及びNS5抗原及び数個のHCV系統：突然変異体R47L、AA64～68及びAA67～84を担持するAA9～53の一連のカプシド配列を含む。配列AA54～63及びAA54～66はこれら2つの一連の配列に欠ける。

【0023】

しかし、特許出願W001/96875A2の「完全コンボ」アッセイの実施は記載されていない。従って、当業者が、図8のコンボアッセイは、提起された問題を満足する、即ち、HCVによる感染をできる限り速く検出するために機能するかどうかを明らか且つ疑いなく確認することは不可能である。いずれにせよ、最良の場合のシナリオにおいても、特許出願W001/96875A2のコンボは、ミッシング配列AA54～63及びAA54～56に対して向けられた全抗体の検出を必然的に失うだろう。感度の損失のリスクが結果として生じるだろう。

10

【0024】

特許出願EP1251353A2(Ortho-Clinical Diagnostics)は、カプシドを検出するために同じ抗体を使用する「完全コンボ」アッセイを記載する。しかし、それらの起源又はそれらのエピトープ特異性を特定してはいない。加えて、使用されるデータジェントがBRIJ又はMYRJ型に特定されており、それは見掛け上、Ortho Clinical Diagnosticsによって市販されているカプシド抗原検出キット(例3を参照のこと)のN-ラウリルサルコシンが好適である。抗カプシド抗体は、改変(突然変異誘発によって)されているカプシド抗原：C22KSN 47、48(アミノ酸47及び48を欠いたカプシド配列AA10～99を含んで成る、SODとの融合によるタンパク質)又はC22KSR47L(47位でアルギニンをロイシンに置換した、カプシド配列AA10～99を含んで成る、SODとの融合によるタンパク質)を使用することで検

20

【0025】

特許出願W003/002749A2(Abbott)はHCVカプシド抗原を検出するための多くの抗原及びアッセイを記載している。「リアルコンボ」に言及される「完全コンボ」アッセイ(図1及び59ページ)のみが、抗カプシド抗体を検出するために、固相中に固定化された、カプシドのアミノ酸11～28に対応するビオチニル化されたペプチドを利用する。カプシドを検出するために、固相におけるAdvanced Life Science Institute t C11～14(カプシド配列AA45～50を認識する)の抗体とアクリジンで標識されたC11～10(カプシド配列AA32～36を認識する)の組み合わせを使用する。従って、出願W003/002749A2は、本発明とは異なり、カプシド抗原の捕獲及び抗カプシド抗体の2つの明らかに異なる、即ち、重なり合っていないカプシドサイト(抗体を検出するためにAA11～28及び抗原を検出するためにAA45～50)を介する捕獲を行う。

30

【0026】

本発明者は、従って、提起された問題を解決するために、代替方法を開発することに尽力した。

【0027】

HCV抗原及びこの抗原に対して向けられた患者の抗体を同時に検出するための方法は、干渉の問題を回避し、且つPCRに近い検出感度のレベル及び早期の検出を達成し、しかも同時に、患者のセロコンバージョン後の血清学的な展開を追跡可能とすることが発見されている。

40

【0028】

本発明者は、この問題を、人工的に異なる抗体を捕獲するために使用される標的抗原の所定のエピトープを構造的修飾することによって解決する。このようにして修飾されたエピトープは、次いで無効される。同時に、抗原を捕獲及び/又は検出するために使用される抗体は、それら自身、患者の抗原上に存在する未修飾エピトープを正確に認識するように選択され、従って、それらはもはやこれら同じエピトープを示さない修飾された抗原に対しては結合できない。エピトープはもはや同一ではないので、HCV抗原を捕獲及び/又は検出するために使用された抗体と患者の抗体との間で何ら競合がない。従来技術の所定の数の技術とは対照的に、カプシド抗原の捕獲及び抗カプシド抗体の捕獲はカプシドの単一且つ同じタンパク質領域で生じ、後にあるように、そして所定数の抗カプシド抗体

50

の検出口スを回避するだろう。

【0029】

複数のエピトープがカプシドのN末端部分で同定されているので、このタンパク質領域は、カプシド抗原の、そして抗カプシド抗体の両方の非常に高感度な検出を達成するために最も適している。

【0030】

本発明によって、抗体及び抗原、最も免疫反応性の配列を同時に検出することが可能であり、従って、検出の感度を高めることが可能である。

【0031】

いうまでもないが、本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）による感染症を検出することのみには限定されない。それはまた、以下に記載したように、任意の感染性微生物（例えば、ウイルスのA、B、C、D又はE型の様々な型の肝炎の原因のウイルス、レトロウイルス、特にヒトのエイズ（HIV-1、HIV-1グループ0、HIV-2）又はサルのエイズの原因のレトロウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、フラビウイルス、例えば、デングウイルス、及び細菌、微生物、寄生微生物など）が理由の感染症を検出、及び/又は感染症のモニタリングする方法、試薬及びキットの一般化をすることも包含し、抗原及び抗体の検出を刺激することが所望されている。本明細書中、C型肝炎ウイルス（HCV）について更に詳細に記載された発明は、非常に当業者が容易に理解できる一般的な範囲内である。

10

【0032】

定義

用語「C型肝炎ウイルス」又は「HCV」とは、本明細書中、C型肝炎の原因となるウイルスの全ての系統及び全てのタイプ、サブタイプ及びジェノタイプを意味する。本発明の方法は、実際に、その起源及びそのジェノタイプが何であれ、HCVによる全ての感染症を検出することを目的とする。これは特に、ヨーロッパ、米国、及び日本で循環するウイルスの周知のタイプ及びサブタイプ（即ち、6つの主要なジェノタイプ：1、2、3、4、5、及び6並びにそれらのサブタイプ1a、1b、3aなど）を含んで成る。Stuyverら（1994）；Bukh（1995）を参照のこと。

20

【0033】

用語「ヒト免疫欠損ウイルス」又は「HIV」とは、ヒトのAIDSの原因となるレトロウイルスの全ての系統及び全てのタイプ、サブタイプ、集団及びジェノタイプを意味する。用語HIVとは詳細にHIV-1（HIV-1グループM、HIV-1グループ0）、及びHIV-2及びそれらの変異体を意味する。

30

【0034】

本発明の背景において、「生物試料」は、好適に生物流体、例えば、血液、血しょう、血清、尿、脳脊髄流体、唾液などからなる。

【0035】

用語「抗体」とは、任意の全抗体又は抗体が抗原性化合物の少なくとも1つの抗原決定基に対して結合することを可能にする少なくとも1つの抗原性組み合わせ部位を含んで成るかあるいはそれらからなる抗体の機能的断片を意味する。例えば、抗体断片としては、Fab、Fab'、及びF(ab')<sub>2</sub>断片及びscFv（単鎖可変断片）鎖、dsFv（二重鎖可変断片）鎖などを述べるができる。これらの機能的断片は特に遺伝子操作によって獲得できる。

40

【0036】

本発明の背景において使用されるモノクローナル抗体又はモノ特異的ポリクローナル血清の生産物は、常用の技術の結果物であり、その詳細はあとに与えられている。

【0037】

用語「捕獲抗体」とは、抗体、又は抗体の部分の意味し、好適には、固相に対して結合させられており、生物試料中に存在する微生物の抗原、例えば、HCV又はHIVの抗原を親和性結合によって維持することができる。

【0038】

50

生物試料中の抗体及び抗原の存在は、「検出手段」によって明らかになる。抗原の検出に関して、本発明は、詳細に少なくとも1つの「検出抗体」を使用する検出を供する。標識されている検出抗体は、捕獲抗体によって認識されるのとは異なるエピトープ部位を認識すること又はカプシド中にリピートモチーフが存在する理由で同一である部位を認識することにより、親和性結合することによって、捕獲された抗原に対して結合できる。抗体の検出に関して、使用は、特に標識された抗免疫グロブリン又は抗イソタイプ抗体、例えば、抗免疫グロブリンGからなる。

**【0039】**

用語「標識」とは、直接標識化（酵素、放射性同位体、蛍光色素、発光化合物などを介する）及び間接標識（例えば、直接標識された抗体又は標識された「親和性ペア」、例えば、限定はされないが標識されたアビジン - ビオチンなどからなる試薬を使用することで）の両方を意味する。

10

**【0040】**

用語「抗原断片」とは、感染した患者中又は免疫化された動物中で、抗体合成を誘導できる、感染性微生物の例えば、C型肝炎ウイルス又はHIVの天然又は組み換えタンパク質の全部又は一部を意味する。それは、詳細に、カプシドタンパク質の全部もしくは一部、又はHCVの非構造的タンパク質、特にNS3及びNS4の全部もしくは一部を意味し、それらが遺伝子操作によって獲得されるかあるいは獲得されないにかかわらない。それはまた、HIVのgag遺伝子によってコードされるタンパク質、詳細には、P25（HIV-1）又はP26（HIV-2）の全部もしくは一部、又はエンベロープ遺伝子によってコードされるタンパク質、詳細

20

**【0041】**

用語「捕獲抗原」とは、単離された抗原性断片を意味し、好適には固相に対して結合させられており、微生物に対して向けられた抗体、例えば、抗HCV又は抗HIV抗体によって認識され、そして後者との親和性結合を可能にする。

**【0042】**

用語「検出抗原」とは、捕獲抗原などの標識され且つ修飾された抗原（即ち、それは、無効されているエピトープ部位又はエピトープを1以上含む）を意味する。それは、競合によって捕獲された抗原を検出すること又は、「二重抗原サンドイッチ」法（Maioliniら（1978））とも呼ばれる常用の抗原 - 抗体 - 抗原サンドイッチ法によって抗体を検出することのいずれかを可能にする。

30

**【0043】**

本発明によれば、捕獲抗原、及び/又は、特に抗原 - 抗体 - 抗原サンドイッチによる抗体検出において任意に使用される検出抗原は、無効されているエピトープ部位又はエピトープを1以上含む。「エピトープ部位」又は「エピトープ」とは、抗体によって認識されそしてそれらの特異的結合を可能にするアミノ酸の配列である。

**【0044】**

HCVタンパク質に関して、カプシドタンパク質のいくつかのエピトープが同定されている。アミノ酸16～アミノ酸40、及びアミノ酸44～アミノ酸47に位置するエピトープが特に知られている。例えば、Okomotoら（1990）；Nasoffら（1991）；Leathyら（1991）；Takahashiら（1992）；Sallbergら（1992）；及びIshida（1993）を参照のこと。

40

**【0045】**

HCVの非構造的タンパク質の多くのエピトープも当業界で公知である。NS3タンパク質上、アミノ酸1188～アミノ酸1493（Yangら（1995））、及びアミノ酸1175～アミノ酸1334（Yangら、（1999））に位置するエピトープ、及びアミノ酸1460～アミノ酸1532に位置するエピトープ（Clayesら（1995））が知られている。

**【0046】**

最も広く知られているNS4エピトープの1つ、エピトープ5-1-1（AA1689～1760）がCeri noら（1991）中で述べられている。

**【0047】**

50

HIVに関して、いくつかのエピトープも従来技術において記載されている。それらは、詳細に、アミノ酸293～350に位置する、HIV-1(グループM)P25タンパク質のエピトープ、そしてまたGnannら(1987)によって記載されたgp41の免疫優占性エピトープ又はその配列の変異体であり;これは再度、詳細に、例えば、上記HIV-1P25のエピトープに配列が相同的なP26タンパク質のエピトープ、又はHIV-2gp36のエピトープ、詳細に、Gnannら(1987)によって記載されたgp36の免疫優占性エピトープ、もしくはこの配列の変異体である。

#### 【0048】

「無効されている」発現エピトープ部位又はエピトープとは、前記エピトープ部位又はエピトープがその構造(一次、二次、三次及び/又は四次)内で修飾されていることを意味し、その修飾により、この無効されたエピトープを含んで成る捕獲抗原又は検出抗原は、同時に、検出される抗原に対して向けられた捕獲抗体、及び/又は検出抗体に対して結合せず、しかも同時に、生物試料中に存在する可能性がある、微生物に対して向けられた抗体の例えば抗HCV又は抗HIV抗体が、完全な状態を維持する他のエピトープ部位を認識することによって、結合する能力は保存している。従って、捕獲及び/又は検出抗体は、生物試料中に存在する抗原上、「完全形態」、即ち、「無効にされていない」又は「天然」形態にある件のエピトープを特異的に認識するように選択される。本発明の背景において、完全形態にあるエピトープを、無効されたエピトープに対して「相同的」なエピトープともよぶ。

10

#### 【0049】

用語「特異的に」とは、それが抗原に対する抗体の特異的認識又は結合に言及される場合、抗体が、他の抗原との実質的な相互作用を何ら伴わずに所定の抗原と相互作用することを意味し、又はもしそれがあるエピトープによる「特異的」認識か疑問であれば、実質上このエピトープの認識を排除することによる。会合定数は $10^8$  L/mol超が好適である。

20

#### 【0050】

##### 捕獲及び検出抗体

本発明中で使用されている抗体は、抗原に対して特異的な抗体であり、そしてこの理由に関して、モノクローナル抗体又モノ特異的ポリクローナル抗体、即ち、たった1つのエピトープのみを特異的に認識する抗体である。

#### 【0051】

ポリクローナル抗体は、Kohler及びMilsten(1975)によって記載されたリンパ球融合及びハイブリドーマ培養により獲得できうる。ポリクローナル抗体を調製するための他の方法も公知である(Harlowら(1988))。モノクローナル抗体は、動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、又はヒトなど)を免疫化すること及びハイブリドーマをもたらすリンパ球融合技術(Kohler及びMilsten(1975))を使用することで調製されて良い。

30

#### 【0052】

この通常の方法に代わる技術が存在する。例えば、ハイブリドーマを使用することでクローン化された核酸の発現によって、モノクローナル抗体を生産することが可能である。抗体cDNAをベクター(それは典型的に線状ファージ(例えば、大腸菌(E. Coli)に対するFUSE5、Scottら、(1990))である)中へと組み込むことによる、ファージディスプレイ技術を使用することで抗体を生産することも可能である。後者は、ライブラリーを構成し、そしてそれらの表層でscFv断片を呈示する。これら抗体ライブラリーを構築するためのプロトコールはMarksら(1991)に記載されている。

40

#### 【0053】

ポリクローナル抗体は、通常の手順により、天然のペプチドである抗原に対して免疫化させた動物の血清から獲得できうる。

#### 【0054】

一般に、ポリペプチド、詳細には組み換えポリペプチド、又はオリゴペプチドが、免疫源として使用されて良い。常用のプロトコールによれば、ウサギは、Benoitら(1982)によって記載された手順に従い、1mg当量のペプチド免疫源で免疫化させる。4週間隔で、

50

動物には200 µgの抗原を与え、そして10～14日後に出血させた。第3回目の注射の後、クロラミンT法によって調製した、ヨウ素により放射性同位体標識されている、抗原性ペプチドに対して結合する抗血清の能力が評価を評価する。次いで、カルボキシメチルセルロース(CMC)からなるイオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製される。次いで、溶離によって回収された抗体分子を当業者に周知の方法、例えば、IgG画分を獲得するためのDEAE Sephadexを使用することによって所望の濃度に調整する。

## 【0055】

ポリクローナル血清の特異性を高めるために、抗体は、免疫化のために使用され且つ固相に対して固定化されたペプチド(例えば、限定ではないが、HCVのカプシドペプチドAA16～44及びAA39～74)を使用する免疫親和性クロマトグラフィー(又は免疫吸着クロマトグラフィー)によって精製されて良い。抗血清を、固相中に固定化されているペプチドと、当該ペプチドと抗体分子が当該固相中で免疫複合体を形成するために十分な時間に渡り接触せしめる。

10

## 【0056】

従って、本発明者は、更に詳細に、下の表1に示した特異的抗HCV抗体を使用した。

## 【0057】

## 【表1】

表1

20

モノクローナル抗体	クラス	認識される天然のエピトープ
mAb 1	IgG2a	<sup>44</sup> LGVR <sup>47</sup> (配列番号19)
mAb 2	IgG2a	<sup>30</sup> IVGGVYL <sup>36</sup> (配列番号20)
mAb 3	IgG1	<sup>29</sup> QIVGGV <sup>34</sup> (配列番号21)
mAb 4	IgG1	<sup>29</sup> QIVGGV <sup>34</sup> (配列番号21)
mAb 5	IgG1	<sup>30</sup> IVGGVYL <sup>36</sup> (配列番号20)
mAb 6	IgG1	<sup>30</sup> IVGGVYL <sup>36</sup> (配列番号20)

30

## 【0058】

HIVを検出するためのコンボアッセイに関して、使用される抗体は、好適に以下のペプチド配列の1つ、又は変異体HIV系統の対応する配列、を認識するモノクローナル抗体である。

40

- 配列308QASQEVKNWMTETLL322(配列番号24)のHIV-1グループMのP25タンパク質のエピトープ;

- P26タンパク質のエピトープ、詳細には、配列同定体(配列番号24)によって描かれたHIV-1 P25のエピトープの配列と相同的な配列のエピトープ、例えば、配列QTDPVKNWMTQTL(配列番号25)を含むエピトープ(HIV-2単離体:ROD)

## 【0059】

いうまでもなく、上記抗体に関する記載に対して類似又は同一なエピトープ特異性のモノクローナル抗体を生産MA又は獲得することは、当業者の範囲内であり、それらは本発明を実行するために適している。

50

## 【0060】

捕獲及び／又は検出抗原

本発明において使用される検出抗原は、無効されているエピトープ部位を1以上含む。捕獲抗原と、そして／又は検出抗原と干渉する両方のリスクがある2つの異なる交代が使用される場合、当該抗原上の少なくとも2つの部位を無効することが必須でありうる。この場合、例えば、サンドイッチ型の免疫アッセイのために、捕獲抗原と同じ表層上に固定化されている捕獲抗体を、そして検出抗体を使用する。次いで、捕獲抗体は、それが特異的に、捕獲抗原上の2つの無効されたエピトープのうちの1つに対して相同的な、患者の天然抗原上のエピトープを認識するように選択され、しかも検出抗体は、それが特異的に、捕獲抗原上の2つの無効されたエピトープの他の方に対して相同的な患者の天然抗原上でエピトープを認識する様に選択される。 10

## 【0061】

前記捕獲抗原及び／又は検出抗原は、微生物、詳細には、HCV又はHIVの抗原性タンパク質に由来するエピトープの全部又は一部を真似たペプチドを含んで成る又はから成る。

## 【0062】

好適に、それはカプシドタンパク質のペプチドであり、特に、抗原が殆ど確認されない慢性肝炎の場合に抗カプシド抗体の検出が特に有利であり、そして更に確認される抗カプシド抗体が循環する場合に有利である。それはまた1もしくは複数の非構造性タンパク質、例えばNS3及び／もしくはNS4であっても良い。様々な捕獲又は検出抗原も一緒に組み合わせられて良い。いくつかの異なる捕獲及び／又は検出抗原を使用するこのような実施態様は、例えば、抗カプシド抗体及びHCVの非構造性タンパク質NS3及び／又はNS4に対する抗体を検出可能にする。抗カプシド抗体と抗NS3抗体の同時検出が特に好適である。本発明は、カプシド抗原、抗カプシド抗体、E1及び／もしくはE2エンベロープ構造タンパク質に対する抗体、E1及び／もしくはE2エンベロープ抗原、及び／又はHCVの非構造性タンパク質NS3及び／又はNS4に対する抗体の同時検出をも含んで成る。具体化されている他の組み合わせも本発明の一部である。 20

## 【0063】

同様に、gag抗原、gagに対する抗体及び／又はAIDSウィルス(HIV-1、HIV-2など)のエンベロープに対する抗体(その配列は、Wain-Hobsonら(1985); Ratnerら(1985); Sanchez-Pescadorら(1985); Guyderら(1987)の記事に刊行されている)の同時検出も本発明の一部である。好適に、検出されるgag抗原は、HIV-1P25タンパク質又はHIV-2P26タンパク質であり、そして求められている抗gag抗体はコレラのタンパク質に対して向けられている。尚好適に、HIV-1及びHIV-2のエンベロープに対する抗体を検出するためのエンベロープ抗原は、HIV-1gp41及びHIV-2gp36である。 30

## 【0064】

類似して、Alconら(2002)によって記載されたNS1抗原の、NS1に対する抗体の検出、又は更にデングウィルスのNS2、NS3及び／もしくはS4に対する抗体の検出との同時検出も本発明の一部である。

## 【0065】

適用するための技術は当業者に周知である。 40

## 【0066】

好適に、捕獲及び／又は検出抗原は、一層実用的であるので、当業者に周知の方法によって生産された合成ペプチドである。例として、Merrifield型の合成が、純度、抗原特異性及び不都合な副産物がないこと、及びその使用の簡便さの理由から挙げることができる(Merrifield(1963); R.C.Shepperd(1971); Athertonら(1989))。自動合成器として、Milliporeの「9050 Plus Pep Synthesizer」、Perseptiveの「Pioneer」合成装置、ABI(Applied Biosystems Inc.)の「433A」合成装置又はRaininの「Symphony」合成装置などが使用されて良い。ペプチドは、均一相合成によっても獲得できうる。

## 【0067】

これらの捕獲及び／又は検出抗原上のエピトープを無効にすることは、様々な方法で行 50

われて良い。エピトープ部位をこのように修飾するために必要な唯一の条件とは、当該捕獲抗原及び/もしくは検出抗原が捕獲抗体及び/もしくは検出抗体に対して結合する可能性はないが、同時に、微生物に対して向けられた抗体、詳細には、生物試料中に存在する可能性のある、抗HCV又は抗HIV抗体に対して結合する能力を保存することである。

【0068】

標的となる各エピトープ部位において少なくとも1つのアミノ酸、好適には2つのアミノ酸を修飾することは、修飾されないほうのエピトープを不安定化することなく、エピトープを無効するのに十分である。かかる修飾は好適に、例えば、アミノ酸の置換によって、例えば、グリシンではない残基をグリシンもしくはアラニン残基により置換することによって、又はあるクラスのアミノ酸を他のクラスのアミノ酸で置換することによって獲得されうる。極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン又はチロシン）を非極性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン又はシステイン）で置換すること、及びその逆が可能である。塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン又はヒスチジン）を酸性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸又はグルタミン酸）で置換すること、及びその逆が可能であるかあるいは、他に側鎖が環を有するアミノ酸（例えば、チロシン又はフェニルアラニン）を、直線側鎖を有するアミノ酸で置換すること、又はその逆も可能である。1もしくは数個のアミノ酸の欠失、又は1もしくは数個のアミノ酸の挿入は、エピトープにおける、特に非天然アミノ酸において、エピトープを無効することを可能にする。アミノ酸の官能基の修飾、即ち、特に、基OH、NH<sub>2</sub>又はSHにおける修飾も可能である。

10

20

【0069】

本発明の背景において使用するペプチドの中で、抗原及び抗体の同時検出が望ましい全種類の感染性微生物（例えば、ウイルスであり、様々なタイプの肝炎の原因となるウイルス、AIDS（HIV-1、HIV-2など）の原因となるレトロウイルス、CMVウイルス、デングウイルスなどのウイルス、そしてまた細菌、寄生微生物など）に由来するペプチドを想像することが可能である。

【0070】

詳細に、且つ包括的な説明により、HCVカプシドペプチド、詳細には、アミノ酸1～75、6～68及び1～53のものが挙げられる。ジェノタイプ1のコンセンサス配列に対応するこれらの配列（サブタイプ1a、1b、1c）が添付の配列リストに与えられており、そしてそれぞれ、配列番号1、2、及び3で記されている。

30

【0071】

## 【化1】

## 配列番号 1

<sub>1</sub>MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV<sub>31</sub>GGV<sub>34</sub>YL<sub>36</sub>LPRRGPRL<sub>44</sub>GV  
R<sub>47</sub>ATKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS<sub>75</sub>

## 配列番号 2

10

<sub>6</sub>KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV<sub>31</sub>GGV<sub>34</sub>YL<sub>36</sub>LPRRGPRL<sub>44</sub>GVR<sub>47</sub>ATR  
KTSERSQPRGRRQPIPKA<sub>68</sub>

## 配列番号 3

<sub>1</sub>MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV<sub>31</sub>GGV<sub>34</sub>YL<sub>36</sub>LPRRGPRL<sub>44</sub>GV  
R<sub>47</sub>ATR<sub>53</sub>

20

## 【0072】

同様に、本発明の背景において使用するペプチド又はポリペプチドは、HIVのgagポリペプチド又はエンベロープポリペプチドである。

## 【0073】

特に、それはHIV-1P25タンパク質のコンセンサス配列に対応するペプチドであり、その配列は、添付の配列リストで、配列同定体配列番号23によって規定されている。

## 【0074】

30

## 【化2】

## 配列番号 23

<sub>293</sub>FRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKILKALGPAATL  
EEMMTAC<sub>350</sub>

40

## 【0075】

それはまたHIV-1のgp41のエピトープを含んで成るペプチドであって良く、特に配列番号26～配列番号31のペプチドであって良い。

## 【0076】

## 【化3】

配列番号 26 : LGLWGCSGKLIC,  
 配列番号 27 : LGIWGCSGKLIC,  
 配列番号 28 : LGLWGCSGKHIC,  
 配列番号 29 : LGMWGCSGKHIC  
 配列番号 30 : RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLIC  
 配列番号 31 : RILAVERYLKDQQLLGIWGSGKLICTTAVPWNAS.

10

## 【0077】

捕獲及び/又は検出抗原としてのHIV-2のgagポリペプチド又はエンベロープポリペプチドの使用も本発明の一部である。それは特に、下の配列番号32又は配列番号33の配列のgp36のポリペプチドである。

## 【0078】

## 【化4】

20

配列番号 32 : LNSWGCAFRQVC,  
 配列番号 33 : RVTAIKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVWVNS.

## 【0079】

それはHIV-2のP26タンパク質のポリペプチドでもあっても良く、例えば、配列同定体配列番号23によって描かれたP25タンパク質のポリペプチドに対して配列が相同的なポリペプチドである。

30

## 【0080】

修飾されたペプチド又はポリペプチドであって、捕獲及び/又は検出抗原として使用されるペプチド又はポリペプチドも本発明の一部である。それらは詳細に、修飾されたエピトープ部位を1以上有するカプシドペプチド断片でありうる。従って、本発明の対象は、HCVカプシドタンパク質に由来するペプチド又はポリペプチドであり、少なくとも1つの完全なエピトープ部位及び少なくとも1つの無効されたエピトープ部位を有し、従って、前記無効されたエピトープ部位は、抗カプシド抗体によって認識されることができないように作られている。好適なペプチドは、2、3又は4個のアミノ酸の置換を、特に、アミノ酸20~40からなる部分でそしてアミノ酸44~47からなる部分で示す。以下の突然変異は特に有利且つ好適である。

40

## 【0081】

アミノ酸34、44、及び47のグリシン残基での置換(配列番号4、「Cap1~75(G34-G44-G47)に規定されたペプチド」):

配列番号4 : Cap1~75(G34-G44-G47)

## 【化5】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPRG}_{44}\text{GVG}_{47}\text{ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

## 【0082】

アミノ酸31、44、及び47のグリシン残基での置換（配列番号5、「Cap1～75（G34-G44-G47）に規定されたペプチド」）：

配列番号5：Cap1～75（G31-G44-G47）

10

## 【化6】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG}_{31}\text{GGV}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPRG}_{44}\text{GVG}_{47}\text{ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

## 【0083】

アミノ酸36、44、及び47のグリシン残基での置換（配列番号6、「Cap1～75（G36-G44-G47）に規定されたペプチド」）：

配列番号6：Cap1～75（G36-G44-G47）

20

## 【化7】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGV}_{34}\text{YG}_{36}\text{LPRRGPRG}_{44}\text{GVG}_{47}\text{ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

## 【0084】

アミノ酸34、44、及び47のグリシン残基での置換（配列番号7、「Cap6～68（G34-G44-G47）に規定されたペプチド」）：

配列番号7：Cap6～68（G34-G44-G47）

30

## 【化8】

${}^6\text{KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPRG}_{44}\text{GVG}_{47}\text{ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKA}_{68}$

40

## 【0085】

アミノ酸31、44、及び47のグリシン残基での置換（配列番号8、「Cap6～68（G31-G44-G47）に規定されたペプチド」）：

配列番号8：Cap6～68（G31-G44-G47）

## 【化 9】

<sub>6</sub>KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG<sub>31</sub>GGV<sub>34</sub>YL<sub>36</sub>LPRRGPRG<sub>44</sub>GVG<sub>47</sub>AT  
RKTSEERSQPRGRRQPIPKA<sub>68</sub>

## 【0086】

アミノ酸 36、44、及び 47 のグリシン残基での置換（配列番号 9、「Cap 6 ~ 68  
3 (G36-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 9 : Cap 6 ~ 68 (G36-G44-G47)

## 【化 10】

<sub>6</sub>KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV<sub>31</sub>GGV<sub>34</sub>YG<sub>36</sub>LPRRGPRG<sub>44</sub>GVG<sub>47</sub>AT  
RKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS<sub>75</sub>

## 【0087】

アミノ酸 34、44、及び 47 のグリシン残基での置換（配列番号 10、「Cap 1 ~ 5  
3 (G34-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 10 : Cap 1 ~ 53 (G34-G44-G47)

## 【化 11】

<sub>1</sub>MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV<sub>31</sub>GGG<sub>34</sub>YL<sub>36</sub>LPRRGPRG<sub>44</sub>G  
VG<sub>47</sub>ATRKTS<sub>53</sub>

## 【0088】

アミノ酸 31、44、及び 47 のグリシン残基での置換（配列番号 11、「Cap 1 ~ 5  
3 (G31-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 11 : Cap 1 ~ 53 (G31-G44-G47)

## 【化 12】

<sub>1</sub>MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG<sub>31</sub>GGV<sub>34</sub>YL<sub>36</sub>LPRRGPRG<sub>44</sub>G  
VG<sub>47</sub>ATRKTS<sub>53</sub>

## 【0089】

アミノ酸 36、44、及び 47 のグリシン残基での置換（配列番号 12、「Cap 1 ~ 5  
3 (G36-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 12 : Cap 1 ~ 53 (G36-G44-G47)

10

20

30

40

## 【化 1 3】

$_1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGV}_{34}\text{YG}_{36}\text{LPRRGPRG}_{44}\text{GVG}_{47}\text{ATRKTS}_{53}$

## 【0090】

アミノ酸 4 5 及び 4 6 の欠失：

配列番号 1 3 : Cap 1 ~ 7 5 ( G34-del ( 45-46 ) )

10

## 【化 1 4】

$_1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPRL}_{44}\text{R}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIKARRPEGRS}_{75}$

## 【0091】

骨格長の修飾：

配列番号 1 4 : Cap 1 ~ 7 5 ( G34- A45 )

20

## 【化 1 5】

$_1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPRL}_{44}\beta\text{A}_{45}\text{VR}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIKARRPEGRS}_{75}$

式中、 Aは アラニンを示す。

## 【0092】

アミノ酸挿入及び突然変異による骨格長の修飾：

配列番号 1 5 : Cap 1 ~ 7 5 ( G34-G46-G46' )

30

## 【化 1 6】

$_1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPRL}_{44}\text{G}_{45}\text{G}_{46}\text{G}_{46'}\text{R}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIKARRPEGRS}_{75}$

## 【0093】

極性の逆転：

配列番号 1 6 : Cap 1 ~ 7 5 ( nL29-G30-G44-G47 )

40

## 【化 1 7】

$_1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGnL}_{29}\text{G}_{30}\text{V}_{31}\text{GGV}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPRG}_{44}\text{GVG}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIKARRPEGRS}_{75}$

式中、 nLはノルロイシンを示す。

## 【0094】

50

アミノ酸置換：

配列番号 17：Cap1～75 (G34-F35-G44-G47)

【化18】

<sup>1</sup>MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV<sub>31</sub>GGG<sub>34</sub>F<sub>35</sub>L<sub>36</sub>LPRRGPRG<sub>44</sub>  
GVG<sub>47</sub>ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS<sub>75</sub>

【0095】

アミノ酸置換：

配列番号 18：Cap1～75 (G34-hS35-G44-G47)

【化19】

<sup>1</sup>MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV<sub>31</sub>GGG<sub>34</sub>hS<sub>35</sub>L<sub>36</sub>LPRRGPRG<sub>44</sub>  
GVG<sub>47</sub>ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS<sub>75</sub>

10

式中、hSはホモセリンを示す。

20

【0096】

本発明は、HIVタンパク質のgagタンパク質に由来するペプチド又はポリペプチドであって、少なくとも1つの完全なエピトープ部位及び少なくとも1つの無効されたエピトープ部位を有し、従って、この無効にされたエピトープ部位は同gagタンパク質に対して向けられた抗体によって認識されないようにつくられている、ペプチド又はポリペプチドにも関連する。更に詳細には、前記ポリペプチドは、HIV-1P25タンパク質のコンセンサス配列を含んで成り、そして1、2、3、4又は5個のアミノ酸の置換、詳細にはアミノ酸293～322から成る部分での置換を示しうる。好適に、前記修飾されたポリペプチドは、HIV-1(M)P25タンパク質のコンセンサス配列を有し、ここで、アミノ酸295、298、310及び312はグリシン残基で置換されており、そしてアミノ酸316はフェニルアラニン残基で置換されている。

30

【0097】

【化20】

<sup>293</sup>FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGVKNFMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATL  
EEMMTAC<sub>350</sub> (配列番号22)

【0098】

これらのペプチド配列が使用される場合、N末端部位において、アミノ酸をより簡単に結合させ、支持する又は任意の注目の分子を結合させることができるようにするために、アミノ酸C-G-G- (即ち、Cys-Gly-Gly-) を付加することが有利でありうる。ペプチドC-G-G-Cap1～75 (G34-G44-G47) は、このことに関して特に有利でありうる。

40

【発明の開示】

【0099】

検出の方法

本発明は、一般に、in vitroで、生物試料において微生物による感染症を検出するための方法であって、当該方法は、生物試料中に存在する、当該微生物の抗原及び当該微生物に対して向けられた抗体を同時検出することを含んで成り、当該方法は：

50

a)生物試料を、前記微生物に対して向けられた捕獲抗体、及び当該微生物に由来する捕獲抗原と接触せしめ；

b)この混合物を、抗原 - 抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし；

c)形成された当該抗原 - 抗体複合体を露出させ、それは任意に、捕獲されている前記微生物の抗原に対して結合できる少なくとも1つの標識された検出抗体及び/又は任意に、捕獲されている前記微生物に対して向けられた抗体に対して結合できる標識された検出抗原を使用する、

ことを含んで成り；

そして、ここで前記微生物の当該捕獲抗原は、前記微生物の少なくとも1つのエピトープが無効されている抗原性断片であるかあるいはそれを含んで成り；

10

そして、前記捕獲及び/又は検出抗体は、当該捕獲されている抗原の、完全である、エピトープを認識する。

#### 【0100】

本発明の方法は、単一の抗体 / 抗原ペアの使用に限定されてはいないと解される。それは、いくつかの異なる捕獲抗体及びいくつかのことなる捕獲抗原を使用することで行われて良い。

#### 【0101】

詳細に、従って、本発明は、*in vitro*で、生物試料においてC型肝炎ウイルス(HCV)による感染症を検出するための方法であって、当該生物試料中に存在する、HCVの抗原及び当該HCVの抗原に対して向けられた抗HCV抗体を同時検出することを含んで成り、当該方法は；

20

a)生物試料を、抗HCV捕獲抗体及びHCV捕獲抗原と接触せしめ；

b)この混合物を、抗原 - 抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし；

c)形成された当該抗原 - 抗体複合体を露出させ、それは任意に、捕獲されているHCV抗原に対して結合できる標識された検出抗体及び/又は任意に、捕獲されている抗HCV抗体に対して結合できる標識された検出抗原を使用する、

ことを含んで成り、

そして、ここで当該HCV捕獲抗原は、少なくとも1つのエピトープが無効されているHCVの抗原性断片であるかそれを含んで成り；

そして、前記捕獲及び/又は検出抗体は、前記捕獲されている抗原の、完全である、エピトープを認識する。

30

#### 【0102】

本発明は、*in vitro*で、生物試料においてヒト免疫欠損ウイルス(HIV)による感染症を検出するための方法であって、当該生物試料中に存在する、HIVの抗原及び当該HIVの抗原に対して向けられた抗HIV抗体を同時検出することを含んで成り、当該方法は；

a)生物試料を、抗HIV捕獲抗体及びHIV捕獲抗原と接触せしめ；

b)この混合物を、抗原 - 抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし；

c)形成された当該抗原 - 抗体複合体を露出させ、それは任意に、捕獲されているHIV抗原に対して結合できる標識された検出抗体及び/又は任意に、捕獲されている抗HCV抗体に対して結合できる標識された検出抗原を使用する、

40

ことを含んで成り、

そして、ここで当該捕獲抗原は、少なくとも1つのエピトープが無効されているHIVの抗原性断片であるかそれを含んで成り；

そして、前記捕獲及び/又は検出抗体は、前記捕獲されている抗原の、完全である、エピトープを認識する。

#### 【0103】

好適に、前記方法により、HIV-1の検出、HIV-2の検出、又はHIV-1とHIV-2両方の検出が可能になる。その結果、別な考えによれば、使用されて良いHIV捕獲抗原は、それぞれ、HIV-1捕獲抗原、HIV-2捕獲抗原、並びにHIV-1及びHIV-2捕獲抗原又はHIV-1捕獲抗原の組み合わせ、及びHIV-2捕獲抗原組み合わせであるか、それらを含んで成る。

50

## 【0104】

生物試料は、任意に前段階で処理されて良いかあるいは捕獲抗原及び捕獲抗体と、検出されるべき抗原の露出を促すような条件下で接触させられる。有利に、前記試料は、変性剤で、検出前に、そして好適にはそれが、使用される抗体と接触させられる前に、処理される。HCVのカプシド、又はHIVのgagタンパク質の検出の場合、この変性剤は特に、非イオン型の1又は複数のデタージェントからなり、それは例えば、Nonidet P-40 (NP40) (tert-オクチルフェノキシポリ(オキシエチレン)エタノール、IGEPAL CA630ともよばれる)、又は酸溶液である。

## 【0105】

この組み合わせ免疫アッセイは、限定ではない、当業者に周知の様々な形態：固相又は均一相において；1段階又は2段階で；二重サンドイッチ法（2つの抗原及び抗体検出のための重ね合わせ）；又はサンドイッチ法（抗原検出のために）と組み合わせた間接法（抗体検出のために）で行われる。 10

## 【0106】

好適な実施態様によれば、前記捕獲抗体及び捕獲抗原は固相上に固定化されている。固相は、限定ではないが、例えば、マイクロプレート、詳細には、ポリスチレンマイクロプレート、例えば、Company Nunc、Denmarkによって市販されているものが使用されて良い。固体粒子又はビーズ；常磁性ビーズ、例えば、DynaI又はMerck-Eurolab（商用名Estapor（登録商標））によって市販されているもの、又は他にポリスチレンもしくはポリプロピレンでできているものなども使用されて良い。 20

## 【0107】

2つの抗体（捕獲抗体及び検出抗体）間でのサンドイッチ型の免疫アッセイ形態は、生物試料中に存在する抗原を検出するために特に有利であり、従って、抗体は、当該抗体に対して結合する捕獲抗原及び標識された接合体、例えば、標識されたタンパク質Aもしくは標識された免疫グロブリンもしくは抗イソ型抗体を使用することで露出されて良い（通常「間接形態」に言及される形態により）。抗体は、当該抗体に対して結合する捕獲抗原及び標識された抗原を使用することでも有利に検出されて良い（「抗原-抗体-抗原サンドイッチ」又は「二重抗原サンドイッチ」に言及される形態による）。

## 【0108】

競合によって抗原を検出するための免疫アッセイ形態も可能である。免疫アッセイの他の態様も予想され、そしてそれらは当業者に周知である。 30

## 【0109】

一般に、本発明によれば、捕獲抗体及び検出抗体（特にサンドイッチの場合に使用される）は、それらが、生物試料中に存在する検出されるべき天然の標的抗原（それはエピトープについて完全であり、捕獲抗原上の無効にされたエピトープに対して相通的である）を認識するように、そしてそれらが捕獲抗原上の無効されたエピトープを認識しないように、選択される。

## 【0110】

本発明による、微生物の抗原及び当該微生物に対して向けられた抗体の同時検出であって、詳細には、HCV抗原及び及び抗HCV抗体の同時検出、又は他にHIV抗原及び及び抗HIV抗体の同時検出は、一段階、即ち、生物試料を同時に検出手段に至らしめること、例えば、詳細には、検出抗体又は抗体と、1又は複数の捕獲抗体及び1又は複数の捕獲抗原に同時に接触せしめることによって行われて良い。この場合、抗原を検出するための免疫アッセイ及び抗体を検出するための免疫アッセイは両方とも好適にサンドイッチによって行われている。代わりに、検出手段、例えば、詳細には、1又は複数の検出抗体は、第二段階で、即ち、第一抗原-抗体複合体が形成された後に、この混合物に対して加えられて良い。次いで、これは二段階アッセイとして記載されている。 40

## 【0111】

上記のように、捕獲抗原は、詳細に、少なくとも1つのエピトープ部位が無効されているHCVカプシドタンパク質の抗原性断片であって良い。捕獲抗原は、HCVの非構造的タンパ 50

ク質、詳細には、限定ではないが、NS3又はNS4の抗原性断片からなっても良く、ここでも少なくとも1つのエピトープ部位が無効されている。最後に、捕獲抗原は、少なくとも1つのエピトープ部位が無効されている、カプシドタンパク質の抗原性断片の組み合わせ及び少なくとも1つのエピトープ部位も無効されている、及びHCVの非構造性タンパク質、NS3又はNS4の抗原性断片の組み合わせからなりうる。当業者によって予測されうる全ての変異体は本発明の一部である。

【0112】

本発明の好適な実施態様によれば、生物試料においてC型肝炎ウイルス(HCV)による感染症を検出するための方法は：

a)生物試料を、固相に対して結合させられたHCV捕獲抗体及びHCV捕獲抗原と接触せしめ 10  
；

b)この混合物を、抗原-抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし；

c)固相と液相を分離し；

d)当該固層を、捕獲されているHCV抗原を結合できる標識された検出抗体、及び、捕獲されている抗HCV抗体を結合できる1もしくは複数の標識された抗免疫グロブリンもしくは抗イソ型抗体に接触せしめる、  
ことを含んで成り、

抗HCV抗体を捕獲するための抗原は、2つのエピトープが無効にされているHCVのカプシドタンパク質の抗原性断片であるかそれを含んで成り、

そして、捕獲されているカプシド抗原の、完全である、エピトープのうちの1つを認識 20  
する前記捕獲及び検出抗体、  
を含んで成る。

【0113】

他の実施態様によれば、本発明は、HIV、例えば、HIV-1又はHIV-2による感染症の検出を可能にする。好適に、当該方法は、HIV-1に由来する捕獲抗原及びHIV-2に由来する捕獲抗原の両方を、抗HIV-1抗体と抗HIV-2抗体の両方を検出できるようにするために含んで成る。従って、この好適な態様によれば、本発明の方法は、平等に、HIV-1及び/又はHIV-2による感染を検出するために使用できうる。

【0114】

捕獲抗原は、HIVのgagタンパク質、例えば、HIV-1 P25タンパク質又はHIV-2 P26タンパク質の抗原性断片を含んで成り、ここで少なくとも1つのエピトープ部位は無効にされている。捕獲抗原は、HIVのエンベロープタンパク質、詳細には、限定ではないが、HIV-1 gp41タンパク質の又はHIV-2 gp36の抗原性断片を含んで成る。最後に、捕獲抗原は、HIV-1及びHIV-2のgagタンパク質の抗原性断片の組み合わせ、追加として、ここで適宜、HIV-1エンベロープタンパク質及びHIV-2エンベロープタンパク質の抗原性断片の組み合わせからなりうる。 30

【0115】

本発明の好適な実施態様によれば、生物試料においてヒト免疫欠損ウイルス(HIV)による感染症を検出するための方法は：

a)生物試料を、固相に対して結合させられたHIV捕獲抗体及びHIV捕獲抗原と接触せしめ 40  
；

b)この混合物を、抗原-抗体複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし；

c)固相と液相を分離し；

d)当該固層を、捕獲されているHIV抗原を結合できる標識された検出抗体、及び捕獲されている抗HIV抗体を結合できる1もしくは複数の標識された抗免疫グロブリンもしくは抗イソ型抗体に接触せしめる、  
ことを含んで成り、

抗HIV抗体を捕獲するための抗原は、2つのエピトープが無効にされているHIVのカプシドタンパク質の抗原性断片であるかそれを含んで成り、

そして、捕獲されているgag抗原の、完全である、エピトープのうちの1つを認識する 50

前記捕獲及び検出抗体、  
を含んで成る。

【0116】

好適に、本発明の方法は、HIV-1もしくはHIV-2による感染症、又はHIV-1及びHIV-2による感染症の検出に向けられている。後者の代替によれば、抗HIV抗体を捕獲するための抗原は、HIV-1のgagタンパク質の断片及びHIV-2のgagタンパク質の断片の組み合わせである。

【0117】

ELISAアッセイ、ラジオイムノアッセイ、又は任意の他の検出技術が、形成された抗原-抗体複合体の存在を明らかにするために使用されて良い。同じ型又は複数の型の標識が、第一番目に、感染性微生物抗原、詳細には、HCV又はHIV抗原を、そして第二番目には、感染性微生物に対して向けられた抗体、詳細には、抗HCV又は抗HIV抗体を検出するために使用されて良い。

【0118】

生物試料における抗原又は抗体の存在の検出は、定量的に完了されて良い。それは例えば、当業者に周知の標準的な技術による、標識により放射されたシグナル（色、蛍光、放射性）を検出することによる。

【0119】

キット

本発明の方法に従って、生物試料における、微生物、例えば、C型肝炎ウイルス（HCV）又はヒト免疫欠損ウイルス（HIV）による感染症を検出するために使用するキット及び試薬は、本発明が簡単に実施でき且つ多くの生物学的試料に対して適用できるように提供されて良い。

【0120】

従って、本発明の対象は、生物試料における、微生物による感染症を検出するためのキットであり、当該キットは：

- 微生物のタンパク質の抗原性断片であるかあるいはそれを含んで成る、捕獲又は検出抗原であって、当該断片は、少なくとも1つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも同時に当該生物試料中に存在する可能性がある微生物に対して向けられた抗体に対して結合する能力を保存している、捕獲又は検出抗原；

- 前記微生物のタンパク質の完全であるエピトープに対して向けられた抗体、  
を含んで成る。

【0121】

従って、本発明の他の特定の対象は、生物試料において、C型肝炎ウイルス（HCV）による感染症を検出するためのキットであり、当該キットは：

- HCVのタンパク質の抗原性断片であるかあるいはそれを含んで成る、捕獲又は検出抗原であって、当該断片は少なくとも1つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも同時に当該生物試料中に存在する可能性がある抗HCV抗体に対して結合する能力を保存している、捕獲又は検出抗体；

- HCVのタンパク質の完全であるエピトープに対して向けられた抗体であって、好適に、当該生物試料中に存在する前記HCV抗原を捕獲するための抗体、  
を含んで成る。

【0122】

従って、本発明の他の対象は、生物試料における、ヒト免疫欠損ウイルス（HIV）による感染症を検出するためのキットであり、当該キットは：

- 捕獲又は検出抗原であって、少なくとも1つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも当該生物試料中に存在する可能性がある抗HIV抗体に対して結合する能力を保存する、HIVのタンパク質の抗原性断片であるかあるいはそれを含んで成る、捕獲又は検出抗原；

- HIVのタンパク質の完全であるエピトープに対して向けられた抗体であって、好適に

10

20

30

40

50

、当該生物試料中に存在する前記HIV抗原を捕獲するための抗体、  
を含んで成る。

【0123】

有利に、このキットは、いくつかの捕獲抗原及びいくつかの捕獲抗体を含みうる。

【0124】

上記のように、前記捕獲抗体及び前記捕獲抗原は有利に、固相、例えば、マイクロプレート上に固定化された形態で提供されて良い。

【0125】

好適なキットは：

a)捕獲抗原であって、少なくとも2つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも  
同時当該生物試料中に存在する可能性がある抗HCV抗体に対して結合する能力を保存する  
、HCVのタンパク質の抗原性断片であるかあるいはそれを含んで成る、捕獲抗原；

b)HCVのタンパク質の、完全である、エピトープのうちの1つに対して向けられた抗体、  
c<sub>1</sub>)HCVのタンパク質の、完全である、他のエピトープの対して向けられた標識された検  
出抗体；

c<sub>2</sub>)及び/又は任意に、標識された検出抗原であって、少なくとも2つの無効にされた  
エピトープを含んで成り、しかも同時に当該生物試料中に存在する可能性がある抗HCV抗  
体に対して結合する能力を保存する、HCVのタンパク質の抗原性断片であるかあるいはそ  
れを含んで成る、検出抗原、

を含んで成り、

ここで、前記捕獲抗原及び前記捕獲抗体は固相上に固定化されている。

【0126】

そしてまた好適に、本発明のキットは：

a)捕獲抗原であって、少なくとも1つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも  
同時に当該生物試料中に存在する可能性がある抗HIV抗体に対して結合する能力を保存す  
る、HIVのタンパク質の抗原性断片であるかあるいはそれを含んで成る、捕獲抗原；

b)HIVのタンパク質の、完全である、エピトープのうちの1つに対して向けられた抗体、  
c<sub>1</sub>)HIVのタンパク質の、完全である、他のエピトープの対して向けられた標識された検  
出抗体；

c<sub>2</sub>)任意に、標識された検出抗原であって、少なくとも1つの無効にされたエピトープ  
を含んで成り、しかも同時に当該生物試料中に存在する可能性がある抗HIV抗体に対して  
結合する能力を保存する、HIVのタンパク質の抗原性断片であるかあるいはそれを含んで  
成る、検出抗原、

を含んで成り、

ここで、前記捕獲抗原及び前記捕獲抗体は固相上に固定化されている。

【0127】

キットは、生物試料中に存在する抗体を検出し、そして捕獲抗原、例えば、標識された  
抗免疫グロブリンもしくは抗イソ型抗体もしくは他に検出抗原との複合体を形成する手段  
を含んで成りうる。検出抗原は好適に抗原断片、例えば、HCVの又はHIVの抗原断片であり  
、それは少なくとも1つの無効にされたエピトープを含んで成り、しかも試料中に存在す  
る可能性がある抗体（抗HCV又は抗HIV抗体）に対して結合する能力を保存する。

【0128】

キットは、デタージェントをも含んで成って良く、一層詳細には、非イオン性デタージ  
ェント、例えばNP40（Sigma）、又は当業者に周知の任意の同等の非イオン性デタージ  
ェントを含んで成る。

【0129】

上記のように、検出抗原などの捕獲抗原は、特に、HCVのカプシドタンパク質の断片で  
あって良く、ここで当該断片は少なくとも1つのエピトープ部位が無効にされており、そ  
して次いで捕獲及び/又は検出抗体は、カプシドタンパク質の完全であるピトープ部位を  
認識するように選択されている。

10

20

30

40

50

## 【0130】

詳細に、本発明の対象は、2つ以上の異なるエピトープ部位で突然変異しているHCVのカプシドペプチド、例えば、ペプチド1～75(G34-G44-G47)、及び当該ペプチド1～75(G34-G44-G47)を認識できないが対応する天然のHCV配列を認識する抗体のペアを含んで成るかあるいはそれからなる試薬の一組のセットである。

## 【0131】

検出される微生物がHIVである場合、検出抗原などの捕獲抗原は、特に、HIVのgagタンパク質の断片であって良く、ここで当該断片は少なくとも1つのエピトープ部位が無効にされており、そして次いで捕獲及び/又は検出抗体は、gagタンパク質の完全であるエピトープ部位を認識するように選択されている。

10

## 【0132】

詳細に、本発明の対象は、1つ以上の異なるエピトープ部位で突然変異しているP25タンパク質のペプチド、例えば、配列番号22のペプチド、及び配列番号22のペプチドを認識できないが天然のHIV-1P25タンパク質の配列を認識する抗体のペアを含んで成るかあるいはそれからなる試薬の一組のセットである。

## 【実施例】

## 【0133】

下の図及び例は本発明の範囲を限定することなく説明する。

## 【0134】

例：C型肝炎ウイルスによる感染症の検出

20

プロトコール1a及び1bのための材料

抗カプシドモノクローナル抗体ペルオキシダーゼ(「mAb-POD」)接合体：ペルオキシダーゼで標識した抗カプシドモノクローナル抗体、mAb2(表1)を、特許出願EP0752102に記載の方法で調製する。このペルオキシダーゼ標識したmAb2抗体接合体を、第1段階の希釈剤(下に記載した)中で希釈し、当業者に周知の条件下で、高光密度(例えば1.5ユニット超)の十分にドキュメント化された(well-documented)陽性試料を最大限獲得可能なようにする。

## 【0135】

他の抗カプシドモノクローナル抗体、mAb1(表1を参照のこと)も使用され、固相上に固定化されている(下を参照のこと)。

30

## 【0136】

プロトコール1cのための材料

抗カプシドモノクローナル抗体ペルオキシダーゼ(「mAb-POD」)接合体：ペルオキシダーゼで標識した抗カプシドモノクローナル抗体、mAb1(表1)を、特許出願EP0752102に記載の方法で調製する。このペルオキシダーゼ標識したmAb2抗体接合体を、第1段階の希釈剤(下に記載した)中で希釈し、当業者に周知の条件下で、高光密度(例えば1.5ユニット超)の十分にドキュメント化された陽性試料を最大限獲得可能なようにする。

## 【0137】

他の抗カプシドモノクローナル抗体、抗カプシドモノクローナル抗体mAb3(表1を参照のこと)も使用され、固相上に固定化されている(下を参照のこと)。

40

## 【0138】

プロトコール1dのための材料

1)抗カプシドモノクローナル抗体ビオチン接合体：ビオチンで標識した抗カプシドモノクローナル抗体、mAb5(表1を参照のこと)を、1966年のGreg.T.Hermansonによる記載のプロトコールに従い調製する。このビオチン標識したmAb5抗体を、第1段階の希釈剤(下に記載した)中で希釈し、当業者に周知の条件下で、高光密度(例えば1.5ユニット超)の十分にドキュメント化された陽性試料を最大限獲得可能なようにする。

## 【0139】

他の抗カプシドモノクローナル抗体、抗カプシドモノクローナル抗体mAb1(表1を参照のこと)も使用され、固相上に固定化されている(下を参照のこと)。

50

## 【0140】

2)ペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン接合体：1966年のGreg.T.Hermansonによる記載のプロトコールに従い調製したペルオキシダーゼで標識したストレプトアビジンの接合体。プロトコール1dを使用する間、このペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン接合体を、第2段階の希釈剤（下に記載した）中で希釈し、当業者に周知の条件下で、高光密度（例えば1.5ユニット超）の十分にドキュメント化された陽性試料を最大限獲得可能なようにする。

## 【0141】

プロトコール1a、1b、1c及び1dのための共通の材料

1) 選択された固相：Maxisorpマイクロプレート、Nunc (Denmark)。

10

## 【0142】

2) 本発明のプロトコールの第1及び第2段階の希釈剤：

第1段階の希釈剤：トリスNaClバッファー、0.05M、pH6.7、0.25%のNP40 (tert-オクチルフェノキシポリ(オキシエチレン)エタノール - IGEPAL CA 630、Sigma) を補った。

第2段階の希釈剤：クエン酸塩バッファー（50mM、pH6.7、20%のグリセロールを含み、そしてペルオキシダーゼ標識した抗ヒトIgG (Fc) マウスポリクローナル抗体接合体 (Jackson Immunoresearch Laboratories、USA) を含み、当業者に周知の条件下で、高光密度（例えば1.5ユニット超）の十分にドキュメント化された陽性試料を最大限獲得可能なように希釈する）。

20

## 【0143】

3) 露出溶液：この露出溶液は：

3a) 基質バッファー：クエン酸（0.075M）と酢酸ナトリウム（0.1M）の溶液（pH4.0、0.015%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及び4%のジメチルスルホキシド（DMSO）（PROLABO）を含む）、及び

3b) 発色試薬：テトラメチルベンジジン（TMV、Sigma）（基質バッファー中0.7mMの最終濃度）からなっている。

## 【0144】

4) 停止溶液：1NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

30

## 【0145】

方法：

プロトコール1a：試料（血清又は血しょう）中のC型肝炎ウィルスのカプシド抗原及びそれに対する抗体（抗カプシド及び抗NS-3、NS-4）を同時に検出するためのプロトコール  
このアッセイの原理は、抗原を検出するためのサンドイッチ型、及び抗体を検出するための間接型の免疫酵素学的方法に基づく。

## 【0146】

それは、以下の段階に基づいており：

最初にコーティング溶液を：

HCV抗原の混合物：配列番号4を含んで成る突然変異させたペプチドC-G-G-Cap1 ~ 75 (G34-G44-G47) (カプシド) 及び非構造的領域NS3 (クローンNS3.1: AA1192~1492) 及びNS4 (クローン5-1-1: AA1694~1735) において選択されたクローンに由来する、大腸菌 (Escherichia coli) によって生産された2つの組み換えタンパク質、並びに  
0.5Mトリスバッファー、pH7.4中の抗カプシドモノクローナル抗体 (mAb1) で調製する。

40

## 【0147】

次いで、マイクロタイタープレート (Nunc、Maxisorp) の杯状体を上記溶液により110µl/杯状体の割合でコーティングする。

## 【0148】

このマイクロタイタープレートを一晩周囲温度 (18~24 ) でインキュベートする

50

。

## 【0149】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7.4)を使用して洗浄し、そして5%のスクロース、25%のスキムミルク(Candida(登録商標)、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク)及び10mMのEDTAを含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7.4)を加えることによって飽和させる。

## 【0150】

ペルオキシダーゼで標識した抗カプシドモノクローナル抗体mAb2を含む第1段階の希釈物100 $\mu$ lを、そして50 $\mu$ lの試料(血清又は血しょう)を連続して各杯状体に分配する。

10

## 【0151】

反応媒質を37 $^{\circ}$ Cで1.5時間に渡りインキュベートする。存在する可能性があるHCVカプシド抗原は、固相のモノクローナル抗体mAb1に対して、そしてペルオキシダーゼで標識された抗カプシドモノクローナル抗体mAb2に対して結合し、従ってこれら2つの抗体とサンドイッチが形成される。類似して、もし抗HCV抗体が存在すれば、それらは固相に対して結合している抗原に対して結合する。

## 【0152】

次いで、プレートを、洗浄液(トリスNaClバッファー、0.01M、pH7.4、0.1% Tween20を補った)を使用して洗浄(3回)する。

20

## 【0153】

ペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgG抗体を含む第2段階の希釈物100 $\mu$ lを各杯状体に分配する。反応媒質を周囲温度(18~24 $^{\circ}$ C)で30分に渡りインキュベートする。標識した抗ヒトIgG抗体が順に固相上に維持されている特異的抗体に対して結合する。

## 【0154】

次いで、プレートを、洗浄液(トリスNaClバッファー、0.01M、pH7.4、0.1% Tween20を補った)を使用して洗浄(5回)する。従って、結合しなかった抗ヒトIgG接合体は、取り除かれる。

## 【0155】

100 $\mu$ lの露出溶液を各杯状体に加える。この反応を、暗中、周囲温度(18~24 $^{\circ}$ C)で30分に渡り展開させる。

30

## 【0156】

次いで、100 $\mu$ lの停止溶液を各杯状体に分配する。

## 【0157】

反応が停止した後、光密度を分光光度計により450/620nmで読む。

## 【0158】

閾値の定義:

閾値を、ROC(Receiver Operating Characteristic)曲線(Berck及びSchultz(1986))を使用することでの特異性及び感度の統計解析の後に決定した。

## 【0159】

特異性研究は健常な個体に由来する1000の試料に関連し、そして及び感度研究は、市販され入手できるパネル:BBI(Boston Biomedica Company、USA)、Impath(USA)、Serochemicals(USA)、Nabi(USA)、ProMedDx(USA)の200のHCV陽性試料(詳細には、セロコンバージョンの始まり)に関連する。

40

## 【0160】

閾値を各プレートに関して、前記試験に対して特異的な定数Xで割ることによって、ポジティブコントロールに対して獲得したシグナルから計算する。それは、この例ではおよそ0.2800D(optical density)である。

## 【0161】

このプロトコールに示すことができるように、従来技術の方法とは異なり、本発明では

50

、カプシド抗原及び抗カプシド抗体の捕獲を、当該カプシドの単一且つ同じタンパク領域：抗原特異性の領域（AA44～47）（固定化された抗カプシド抗体（mab1）はそれを介してカプシドタンパク質を捕獲する）を明らかに伴う抗カプシド抗体（AA1～75）を捕獲する抗原性領域、で行う。従って、本発明によれば、所定数の抗カプシド抗体の検出のロスが最小へと減らされ、従って感度が向上する。

【0162】

プロトコール1b：試料（血清又は血しょう）中のC型肝炎ウィルスのカプシド抗原及びそれに対する抗体（抗NS-3、NS-4）を同時に検出するためのプロトコール

このアッセイの原理は、抗原を検出するためのサンドイッチ型、及び抗体を検出するための間接型の免疫酵素学的方法に基づく。

10

【0163】

それは以下の段階に基づいており：

最初にコーティング溶液を：

HCV抗原の混合物：非構造的領域NS3（クローンNS3.1：AA1192～1492）及びNS4（クローン5-1-1：AA1694～1735）において選択されたクローンに由来する、大腸菌（*Escherichia coli*）によって生産された2つの組み換えタンパク質、並びに

0.5Mトリスバッファー、pH7.4中の抗カプシドモノクローナル抗体（mAb1）で調製する。

【0164】

次いで、マイクロタイタープレート（Nunc、Maxisorp）の杯状体を上記溶液により110µl/杯状体の割合でコーティングする。

20

【0165】

以下の段階は、プロトコール1aと同じである。

【0166】

プロトコール1c：試料（血清又は血しょう）中のC型肝炎ウィルスのカプシド抗原及びそれに対する抗体（抗カプシド及び抗NS-3、NS-4）を同時に検出するためのプロトコール

このアッセイの原理は、抗原を検出するためのサンドイッチ型、及び抗体を検出するための間接型の免疫酵素学的方法に基づく。

【0167】

以下の段階に基づいている：

最初にコーティング溶液を：

HCV抗原の混合物：配列番号5を含んで成る突然変異させたペプチドC-G-G-Cap1～75（G31-G44-G47）（カプシド）もしくは配列番号11を含んで成る突然変異させたペプチドC-G-G-Cap1～53（G31-G44-G47）もしくは配列番号8を含んで成る突然変異させたペプチドC-G-G-Cap6～68（G31-G44-G47）（カプシド）並びに非構造的領域NS3（クローンNS3.1：AA1192～1492）及びNS4（クローン5-1-1：AA1694～1735）において選択されたクローンに由来する大腸菌によって生産された2つの組み換えタンパク質、及び

0.5Mトリスバッファー、pH7.4中の抗カプシドモノクローナル抗体（mAb1）で調製する。

40

【0168】

次いで、マイクロタイタープレート（Nunc、Maxisorp）の杯状体を上記溶液により110µl/杯状体の割合でコーティングする。

【0169】

このマイクロタイタープレートを一晩周囲温度（18～24℃）でインキュベートする。

【0170】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファー（0.01M、pH7.4）を使用して洗浄し、そして5%のスクロース、25%のスキムミルク（Candida（登録商標）、France、又は他の同等な市販されており入手可能な

50

スキムミルク)及び10 mMのEDTAを含むリン酸塩バッファー(0.01 M、pH7.4)を加えることによって飽和させる。

【0171】

ペルオキシダーゼで標識した抗カプシドモノクローナル抗体mAb1を含む第1段階希釈物100 µlを、そして50 µlの試料(血清又は血しょう)を連続して各杯状体に分配する。

【0172】

反応媒質を37 で1.5時間に渡りインキュベートする。

【0173】

存在する可能性があるHCVカプシド抗原は、固相のモノクローナル抗体mAb3に対して、そしてペルオキシダーゼで標識された抗カプシドモノクローナル抗体mAb1に対して結合し、従ってこれら2つの抗体とサンドイッチが形成される。類似して、もし抗HCV抗体が存在すれば、それらは固相に対して結合している抗原に対して結合する。

10

【0174】

これに続く段階は、プロトコール1aと同じである。

【0175】

ここでも類似して留意できるように、本発明では、カプシド抗原及び抗カプシド抗体の捕獲を、カプシドの単一且つ同じタンパク領域：抗原特異性の領域(AA29~34)(固定化された抗カプシド抗体(mab3)はそれを介してカプシド抗原を捕獲する)を明らかに伴う抗カプシド抗体(AA1~75)を捕獲する抗原性領域、で行う。従って、本発明によれば、所定数の抗カプシド抗体の検出のロスが最小へと減らされ、従って感度が向上する。

20

【0176】

プロトコール1d：試料(血清又は血しょう)中のC型肝炎ウィルスのカプシド抗原及びそれに対する抗体(抗カプシド及び抗NS-3、NS-4)を同時に検出するためのプロトコールこのアッセイの原理は、抗原を検出するためのサンドイッチ型、及び抗体を検出するための間接型の方法に基づく。

【0177】

それは以下の段階に基づく：

最初にコーティング溶液を：

HCV抗原の混合物：配列番号4を含んで成る突然変異させたペプチドC-G-G-Cap1~75(G31-G44-G47)(カプシド)もしくは配列番号15を含んで成る突然変異させたペプチドC-G-G-Cap1~75(G31-G44-G47)もしくは配列番号14を含んで成る突然変異させたペプチドC-G-G-Cap1~75(G34-A45)並びに非構造的領域NS3(クローンNS3.1：AA1192~1492)及びNS4(クローン5-1-1：AA1694~1735)において選択されたクローンに由来する、大腸菌によって生産された2つの組み換えタンパク質、並びに

30

0.5 Mトリスバッファー、pH7.4中の抗カプシドモノクローナル抗体(mAb1)で調製する。

【0178】

次いで、マイクロタイタープレート(Nunc、Maxisorp)の杯状体を上記溶液により110 µl/杯状体の割合でコーティングする。

40

【0179】

このマイクロタイタープレートを一晩周囲温度(18~24)でインキュベートする。

【0180】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファー(0.01 M、pH7.4)を使用して洗浄し、そして5%のスクロース、25%のスキムミルク(Candida(登録商標)、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク)及び10 mMのEDTAを含むリン酸塩バッファー(0.01 M、pH7.4)を加えることによって飽和させる。

【0181】

50

ビオチンで標識した抗カプシドモノクローナル抗体mAb5を含む第1段階希釈物100 $\mu$ lを、そして50 $\mu$ lの試料(血清又は血しょう)を連続して各杯状体に入れる。

【0182】

反応媒質を37で1.5時間に渡りインキュベートする。

【0183】

存在する可能性があるHCVカプシド抗原は、固相のモノクローナル抗体mAb1に対して、そしてペルオキシダーゼで標識された抗カプシドモノクローナル抗体mAb5に対して結合し、従ってこれら2つの抗体とサンドイッチが形成される。

【0184】

類似して、もし抗HCV抗体が存在すれば、それらは固相に対して結合させた抗原に対して結合する。

【0185】

プレートを、洗浄液(トリスNaClバッファー、0.01M、pH7.4、0.1%Tween20を補った)を使用して洗浄(3回)する。

【0186】

抗ヒトIgG抗体で標識したペルオキシダーゼ及びストレプトアビジンで標識した抗体を含む第2段階希釈物100 $\mu$ lを各杯状体に分配する。

【0187】

反応媒質を周囲温度(18~24)で30分に渡りインキュベートする。標識した抗ヒトIgG抗体が順に固相上に維持されている特異的抗体に対して結合し、そしてペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンが、同固相上に維持されたビオチニル化された抗体mAb5に対して結合する。

【0188】

これに続く段階は、プロトコール1aと同じである。

【0189】

ここでも類似して留意できるように、本発明では、カプシド抗原のそして抗カプシド抗体の捕獲を、当該カプシドの単一且つ同じタンパク領域：抗原特異性の領域(AA44~47)(固定化された抗カプシド抗体(mab1)はそれを介してカプシドタンパク質を捕獲する)を明らかに伴う抗カプシド抗体(AA1~75)を捕獲する抗原性領域、で行う。従って、本発明によれば、所定数の抗カプシド抗体の検出のロスが最小へと減らされ、従って感度が向上する。

【0190】

実施例1：血清学的空白時間の間での、試料(血清又は血しょう)中のHCVカプシド抗原の検出

抗体検出では陰性で且つ核酸検出(PCR)では陽性の、HCVで汚染された患者から採取して市販されて入手可能なパネル(Impath、USA)において一緒にグループ分けした、血清又は血しょう試料を本発明のプロトコール1aに記載した方法で試験した。

【0191】

表2に与えた結果は、PCRによって得られた結果との比較である。

【0192】

10

20

30

40

## 【表 2】

表 2 :

インパス試料	光密度	解釈	抗体試験	PCR 試験
1866	0.616	陽性	陰性	陽性
1883 (1/2) *	0.661	陽性	陰性	陽性
1889 (1/2) *	0.671	陽性	陰性	陽性
1999 (1/2) *	0.596	陽性	陰性	陽性
2028 (1/2) *	0.520	陽性	陰性	陽性
2144 (1/2) *	0.674	陽性	陰性	陽性
2145 (1/2) *	0.808	陽性	陰性	陽性
2159	0.547	陽性	陰性	陽性
1959	0.512	陽性	陰性	陽性

\* : 希釈

## 【0193】

本発明の方法を使用することで獲得した結果は、PCRによって獲得した結果と直接的に一致する。従って、記載の発明は、抗体がまだ存在していなくともカプシド抗原を検出することが可能であり、即ち、血清学的空白時間にあるうちに採取した試料でも検出可能である。

## 【0194】

実施例 2 : HCV抗原に対して陰性な試料（血清又は血しょう）中の抗カプシド抗体の検出

血清又は血しょう試料であって、HCVで汚染された患者から採取され、そして市販されて入手可能なパネルで内在的に一緒にグループ分け（grouped together in internal）された、抗体（カプシド）に関して陽性及び抗原（カプシド）に関して陰性な試料を、プロトコール 1 a及びプロトコール 1bに記載の方法で試験した。

## 【0195】

固相上にペプチド 1 ~ 7 5（G34-G44-G47）（配列番号 4 を含んで成る）が不在の場合（プロトコール 1b）、試験した試料（カプシドに対して特異的）が検出されずその一方、プロトコール 1a及び常用の抗体試験ではそれらは陽性であると確認される（表 3 を参照のこと）。

## 【0196】

10

20

30

40

## 【表 3】

表 3 :

試料	光密度		解釈		抗体試験
	1a	1b	1a	1b	
16	0.942	0.092	陽性	陰性	陽性
38	0.409	0.041	陽性	陰性	陽性
49	3.246	0.080	陽性	陰性	陽性
KJ9-1102-0025	0.916	0.054	陽性	陰性	陽性

10

## 【0197】

従って、本発明により、HCVで汚染された患者において、抗カプシド抗体に対して陽性であり且つカプシド抗原に対して陰性である試料を検出することが可能である。

20

## 【0198】

実施例 3 : 試料 (血清又は血しょう) 中のカプシド抗原及び抗HCV抗体の同時検出

BBI (Boston Biomedica Company, USA) によって市販されているセロコンバージョン PHV907及びPHV917 (即ち、HCVに感染した又はセロコンバージョンの間の2人の患者から採取した2組の血清又は血しょう) の試料の2つのパネルをプロトコール 1aにより試験した (表4及び5を参照のこと)。

## 【0199】

【表 4】

表 4 :

試料 BBI	試料を採取 した日	光密度	解釈	抗体試験	PCR 試験
907-1	0	0.482	陽性	陰性	陽性
907-2	+4	0.344	陽性	陰性	陽性
907-3	+7	0.325	陽性	陰性	陽性
907-4	+13	0.318	陽性	陰性	陽性
907-5	+18	0.395	陽性	陰性	陽性
907-6	+21	0.855	陽性	陽性	陽性
907-7	+164	2.991	陽性	陽性	陽性

10

20

【 0 2 0 0 】

【表 5】

表 5 :

試料 BBI	試料を採取 した日	光密度	解釈	抗体試験	PCR 試験
917-1	0	0.045	陰性	陰性	陰性
917-2	13	0.803	陽性	陰性	陽性
917-3	20	0.324	陽性	陰性	陽性
917-4	22	0.448	陽性	陰性	陽性
917-5	85	2.652	陽性	陽性	陰性
917-6	131	2.582	陽性	陽性	陰性
917-7	135	2.720	陽性	陽性	陽性
917-8	138	2.736	陽性	陽性	陰性
917-9	146	3.023	陽性	陽性	陰性
917-10	152	3.033	陽性	陽性	陰性

10

20

## 【0201】

30

表 4 及び表 5 において、本発明のプロトコール 1a により、ウィルス RNA の存在に対応する態様（PCR 試験）において、抗原に陽性なシグナルが確認され；同様に、セロコンバージョン試料において、抗体及び / 又は抗原に対して陽性の、陽性反応が獲得された。このことは、2 検出（カプシド抗原及び抗カプシド抗体）が、同時に同じアッセイにおいて干渉することなく機能できることを示す。

## 【0202】

加えて、本発明は、PCR に関連する診断的観点から最も特に価値があり、その理由は、PCR によっては陰性であり、そして抗体に対しては陽性である試料の検出を可能にするからだ。

## 【0203】

40

実施例 4：抗カプシド抗体の検出に関する様々な突然変異させたペプチドの性能の比較  
血清又は血しょう試料であって、HCV で汚染された患者から採取され、そして市販されて入手可能なパネルにおいて内在的に一緒にグループ分けされている、抗体（カプシド）に関して陽性及び抗原（カプシド）に関して陰性な試料を、プロトコール 1c 及びプロトコール 1d に記載の方法より試験した（表 6 及び 7 を参照のこと）。

## 【0204】

## 【表 6】

表 6 : プロトコール 1c

試料	配列番号 5		配列番号11		配列番号 8	
	OD	解釈	OD	解釈	OD	解釈
16 (1/2) *	0.434	陽性	0.534	陽性	0.413	陽性
21 (1/2) *	0.520	陽性	0.568	陽性	0.481	陽性
49 (1/20) *	0.405	陽性	0.538	陽性	0.384	陽性
07	0.312	陽性	0.340	陽性	0.285	陽性

\* : 希釈

## 【 0 2 0 5 】

## 【表 7】

表 7 : プロトコール 1d

試料	配列番号 4		配列番号15		配列番号14	
	OD	解釈	OD	解釈	OD	解釈
16 (1/2) *	0.438	陽性	0.362	陽性	0.327	陽性
21 (1/4) *	0.257	陽性	0.218	陰性	0.197	陰性
38 (1/2) *	0.310	陽性	0.221	陽性	0.206	陰性
49 (1/40) *	0.308	陽性	0.228	陽性	0.201	陰性
BCP 453 (1/4) *	0.363	陽性	0.208	陰性	0.175	陰性
KJ9-0025 (1/40) *	0.263	陽性	0.237	陽性	0.212	陰性

\* : 希釈

## 【 0 2 0 6 】

表 6 で比較した突然変異ペプチドは、試験した試料に対して非常に類似する性能をしめす。

## 【 0 2 0 7 】

他方、ペプチド間での反応の違いを一層印をつけて表 7 に示している。ペプチド配列番号 15 及び配列番号 14 は、所定の希釈された抗カプシド試料を検出可能にせず、同試料

は、純粹に試験された場合認識された。

【0208】

実施例5：カプシド抗原及び抗HCV抗体の同時検出の、診断及び血清学的空白時間の減少に対する影響

8つの市販され入手できるセロコンバージョンパネル（BBI、Boston Biomedica、US）（Impath、US）を本発明（コンボアッセイに言及される）のプロトコール1a（配列番号4を含むペプチドC-G-G-Cap1～75（G34-G44-G47）による）、1c（配列番号5を含むペプチドC-G-G-Cap1～75（G31-G44-G47）による）及び1d（配列番号4を含むペプチドC-G-G-Cap1～75（G34-G44-G47））により試験した。

【0209】

表8には、抗原（Elisaアッセイ）又RNA（PCR）の検出によって、そして抗体の検出によって、そしてコンボ（形式1a、1c及び1d）によって、これら様々なセロコンバージョン体上で獲得した結果を与える。8つのセロコンバージョン体のうち4つについて、プロトコール1a、1c及び1dにより、PCRによって検出されるウィルスRNAの出現と矛盾なく、第一陽性試料を検出することが可能になる。抗原の検出と血清学的空白時間の低下に対応する抗体の検出との間の平均日数は、2つのプロトコール1a、1c及び1dについて、33日である。

【0210】

【表8】

表8：

IMPAT/BBI パネル	HCV RNA検出の第1日目に対しての遅れ（日）					コンボ試験での血清学的空白時間の減少日
	HCV Ag	HCV Ab	コンボ HCV 1a	コンボ HCV 1c	コンボ HCV 1d	
6211 (NS3)	0	46	10	10	NT	36
6225 (NS3)	0	33	2	2	2	31
6227 (CAP-NS3-NS4)	0	32	4	4	4	28
6229 (NS3)	0	24	0	0	0	24
9041 (NS3)	0	38	3	3	3	35
907 (CAP)	0	13	0	0	0	13
6222 (CAP-NS3)	0	23	0	0	0	23
917 (CAP-NS3)	0	72	0	0	0	72

平均 = 33日

NT=試験ナシ

【0211】

実施例6：性能の比較及びセロコンバージョン血清に対する様々な技術の分類

異なる特異性を示す、市販されて入手可能なセロコンバージョンパネル（BBI、Boston Biomedica Company、USA；Impaht、USA）を本発明のプロトコール 1 a 及び 1 c で、そして 2002 年 2 月に米国において MDA（Medical Devices Agency）によって生み出されたクラス分けに従う最良な中の 1 つである 1 組の市販され入手可能な試験で試験した。この比較は、RNA の検出（PCR 試験）に対する検出における日数上の遅延を考慮している。従って、全体平均が最小を示すキットが、早期検出の観点から最も有効である（表 9）。

【 0 2 1 2 】

【表 9】

表 9 :

インパス/ BB1パネル	PCR検出に対する遅れを日数で表した結果							標的抗原
	本発明の プロトコル 1a	本発明の プロトコル 1c	本発明の プロトコル 1d	Vitros Eci 抗-HCV	Axsym HCV version3	"Ortho HCV 3.0 short incubati on"	Access HCV Ab Plus	
907	0	0	0	13	18	18	13	CAP
909	0	0	0	28	33	28	28	CAP
912	4	4	4	7	7	7	7	CAP
913	0	0	0	2	12	7	7	CAP
914	0	0	0	16	16	16	16	CAP
6215	0	0	0	20	20	20	20	CAP
小計	4	4	4	86	106	96	91	

904	9	9	9	9	9	9	18	NS3
915	12	12	12	12	5	14	17	NS3
6212	23	23	23	12	12	12	23	NS3
6224	19	19	19	19	19	19	19	NS3
9041	3	3	3	62	62	62	62	NS3
9044	0	0	0	25	21	25	25	NS3
9047	0	0	0	28	28	28	28	NS3
小計	66	66	66	167	156	169	192	

905	11	11	11	14	14	14	21	NS3/CAP
908	19	19	19	13	11	19	19	NS3/NS4
910	5	5	0	8	8	8	8	CAP/NS4
911	0	0	0	14	14	14	14	CAP/NS3- NS4
917	0	0	0	72	72	72	72	NS3/CAP
6213	32	26	26	26	26	32	32	CAP/NS3- NS4
6214	30	30	30	30	25	30	30	NS3/NS4
6222	0	0	0	21	21	21	21	CAP/NS3
小計	97	91	86	198	191	210	217	
全体 平均	7.9	7.7	7.4	21.5	21.6	22.6	23.8	



検出されなかった最後の試料：＝適宜3日を加えた

## 【0213】

本発明のプロトコル1a、1c及び1dにより生じた結果は、抗体が出現する前の、HCV感染のより早い検出を可能にする(プロトコル1aについて、PCRに対する日数的遅延はたった8日、プロトコル1cについては7.7日、そしてプロトコル1dについては7

10

20

30

40

50

、4日)である。

【0214】

従って、本発明に従い記載された試験は、このクラス分けを最初行い、これは抗体と突然変異させたペプチド(それらは異なる)のペアを使用する3つのプロトコール(1a、1c及び1d)による。

【0215】

結論として、本発明のプロトコール1a、1c及び1dにより獲得した結果は、後者によりHCVによる感染症を非常に早く、PCRと非常に近い感度で、有効に検出することが可能になり、しかも同時に、患者のセロコンバージョン後の血清学的な展開を追跡することも可能になる。

10

【0216】

実施例7：3つのコンボプロトコール、1a、1c及び1dの特異性の研究

特異性の研究を血液供与体由来する血清(Etablissement Francais du Sang、Rungis、France)により行った。様々なプロトコール1a、1c及び1dについて獲得された結果をそれぞれ、表10、11及び12に与えている。

【0217】

【表10】

表10：プロトコール 1a

20

陰性であると分かった血清の数	968
確認された反応性血清	1
確認された反応性血清(%)	99.9
陰性の平均、割合で(OD試料/閾値)	0.23
標準偏差	0.77
閾値に対する標準偏差の数	10

30

【0218】

【表 1 1】

表11：プロトコール 1c

陰性であると分かった血清の数	2475
確認された反応性血清	6
確認された反応性血清 (%)	99.8
陰性の平均、割合で (OD試料/閾値)	0.14
標準偏差	0.063
閾値に対する標準偏差の数	13.9

10

【0 2 1 9】

20

【表 1 2】

表12：プロトコール 1d

陰性であると分かった血清の数	2475
確認された反応性血清	4
確認された反応性血清 (%)	99.8
陰性の平均、割合で (OD試料/閾値)	0.18
標準偏差	0.055
閾値に対する標準偏差の数	14.8

30

【0 2 2 0】

40

どのプロトコール (1 a、1 c又は1 d) を使用しても、特異性の観点から良好な性能が確認された。

【0 2 2 1】

この記載全体に渡り記されて良いように、本発明のHCVコンボ試験は、カプシド抗原及び抗カプシド抗体の、カプシドの単一及び同じタンパク質領域に対する、捕獲の長所により、PCRに非常に近く且つ所定の従来技術よりもより良い感度を供することができる。

【0 2 2 2】

この結果は驚異的であり、その理由は、標的カプシドペプチドを修飾する際に、本発明者は、所定の有意な数の抗体の検出がロスされることのリスクを考慮したことにある。

【0 2 2 3】

50

実施例 8 : ヒト免疫欠損ウイルス (HIV-1) による感染症の検出

本発明中に記載の方法は、抗原と抗体の同時検出が所望されている、任意の種類 of 感染性微生物が理由の感染症 (例えば、ウイルス、様々なタイプの肝炎の原因となるウイルス、ヒトのエイズ (HIV-1、グループ O、HIV-2 など) 又はサルのエイズの原因となるレトロウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、デングウイルスなどのフラビウイルス、そしてまた細菌、寄生微生物など) の検出に対して適用される。

【0224】

例 8 は、ヒト免疫欠損ウイルス (HIV-1) の P25 ウイルス抗原 (gag) と抗 P25 抗体の同時検出に対する本発明の適用を示す。

【0225】

プロトコール a、b 及び c のための共通の材料 :

1) 選定の固相 : Maxisorp マイクロプレート、Nunc (Denmark)。

【0226】

2) 第 1 段階の希釈剤 : トリス NaCl バッファー、0.05 M、pH 6.7、0.25% の NP40 (IGEPAL CA 630、Sigma) を補った。

【0227】

3) 第 2 段階の希釈剤 : トリス NaCl バッファー、0.01 M、pH 7.4、0.1% の Tween 20 を補った。

【0228】

4) 露出溶液 : この露出溶液は以下のものからなる。

【0229】

4a) 基質バッファー : クエン酸 (0.075 M) と酢酸ナトリウム (0.1 M) の溶液 (pH 4.0、0.015% の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及び 4% のジメチルスルホキシド (DMSO) (PROLABO) を含む)、及び

【0230】

4b) 発色試薬 : テトラメチルベンジジン (TMB、Sigma) (基質バッファー中 0.7 mM の最終濃度)。

【0231】

5) 停止溶液 : 1 N の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

【0232】

プロトコール a : 抗 HIV-1 P25 抗体の検出の材料

以下の配列 :

【化 2 1】

配列番号 22

<sup>293</sup>FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGVKNFMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATL  
EEMMTAC<sub>350</sub>

に対応し、そして HIV-1M の P25 タンパク質のコンセンサス配列

10

20

30

40

【化 2 2】

## 配列番号 23

<sup>293</sup>FRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATL  
EEMMTAC<sub>350</sub>

と比較した場合突然変異 (G295-G298-G310-G321-F3216) を含んで成る突然変異した合成ペプチド。 10

【0 2 3 3】

ペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgG (H+L) ヒツジポリクローナル抗体接合体 (Bio-Rad)。この接合体を、第2段階の希釈 (上記) で使用する前に希釈し、当業者に周知の条件下、最大限に十分ドキュメント化されたある陽性試料を高光密で獲得するようにした。

【0 2 3 4】

プロトコールb: HIV-1P25抗原の検出のための材料

下のHIV-1MP25タンパク質の配列:

【化 2 3】

20

<sup>308</sup>QASQEVKNWMTETLL<sub>322</sub> (配列番号24)

を認識する抗P25モノクローナル抗体Pm25。

【0 2 3 5】

ペルオキシダーゼで標識した上記モノクローナル抗体Pm25の接合体。この接合体を、第2段階の希釈 (上記) で使用する前に希釈し、当業者に周知の条件下、十分ドキュメント化された陽性試料を高光密で獲得するようにした。 30

【0 2 3 6】

プロトコールc: 抗P25抗体とHIV-1P25抗原の同時 (「コンボ」) 検出のための材料

下の配列:

【化 2 4】

## 配列番号 22

<sup>293</sup>FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGVKNFMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATL  
EEMMTAC<sub>350</sub>

40

に対応する突然変異させた合成ペプチド。

【0 2 3 7】

下のHIV-1MP25タンパク質の配列:

【化 2 5】

308 QASQEVKNWMTETLL<sub>322</sub> (配列番号24)

を認識するモノクローナル抗体 Pm25。

【0 2 3 8】

ペルオキシダーゼで標識した抗ヒト IgG (H+L) ヒツジモノクローナル抗体接合体 (Bio-Rad)。

10

【0 2 3 9】

ペルオキシダーゼで標識した上記モノクローナル抗体 Pm25 の接合体。

【0 2 4 0】

上記 2 つの免疫ペルオキシダーゼ接合体を、第 2 段階の希釈 (上記) で使用する前に、希釈し、当業者に周知の条件下、十分にドキュメント化された陽性試料を高光密で獲得するようにした。

【0 2 4 1】

方法:

プロトコール a: 抗 HIV-1P25 抗体の検出

このアッセイの原理は、抗 HIV-1P25 抗体を検出するための間接型の免疫酵素学的方法に

20

基づく。

【0 2 4 2】

それは以下の段階に基づく:

最初にコーティング溶液をカルボン酸塩バッファー、pH 9.6 中、: 配列番号 22 を含んで成る突然変異させたペプチド配列番号 22 (G295-G298-G310-G312-F316) で調製する。

【0 2 4 3】

次いで、マイクロタイタープレート (Nunc、Maxisorp) の杯状体を上記溶液により 1:100 μl / 杯状体の割合でコーティングする。

【0 2 4 4】

このマイクロタイタープレートを一晩周囲温度 (18 ~ 24 °C) でインキュベートする。

30

【0 2 4 5】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1% の Tween20 を含むリン酸塩バッファー (0.01 M、pH 7.4) を使用して洗浄し、そして 5% のスクロース及び 2.5% のスキムミルク (Candida (登録商標)、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク) を含むリン酸塩バッファー (0.01 M、pH 7.4) を加えることによって飽和させる。

【0 2 4 6】

80 μl の第 1 希釈物をそして 20 μl の試料 (血清又は血しょう) を連続して各杯状体に分配する。

40

【0 2 4 7】

反応媒質を 37 °C で 1 時間に渡りインキュベートする。もし HCV 抗 HIV-1P25 抗体が存在すれば、それらは固相に対して結合したペプチドに対して結合する。

【0 2 4 8】

次いで、プレートを、洗浄液 (トリス NaCl バッファー、0.01 M、pH 7.4、0.1% Tween20 を補った) を使用して洗浄 (3 回) する。

【0 2 4 9】

ペルオキシダーゼで標識した抗ヒト IgG 抗体 (H+L) を含む第 2 段階希釈物 100 μl を各杯状体に入れる。反応媒質を周囲温度 (18 ~ 24 °C) で 30 分に渡りインキュベート

50

する。標識した抗ヒトIgG (H+L) 抗体が順に、固相上に維持されている特異的抗体に対して結合する。

【0250】

次いで、プレートを、洗浄液(トリスNaClバッファー、0.01M、pH7.4、0.1% Tween20を補った)を使用して洗浄(5回)する。従って、結合しなかった抗ヒトIgG接合体は取り除かれる。

【0251】

100µlの露出溶液を各杯状体に加える。この反応を、暗中、周囲温度(18~24)で30分に渡り展開させる。

【0252】

次いで、100µlの停止溶液を各杯状体に加える。

【0253】

反応が停止した後、光密度を分光光度計により450/620nmで読む。

【0254】

プロトコールb: HIV-1P25抗原の検出

このアッセイの原理は、HIV-1P25抗原を検出するためのサンドイッチ型の方法に基づく。それは以下の段階に基づいている。

【0255】

最初にコーティング溶液を：炭酸塩バッファー、pH9.6中の抗HIV-1P25モノクローナル抗体(Pm25)で調製する。

【0256】

次いで、マイクロタイタープレート(Nunc、Maxisorp)の杯状体を上記溶液により110µl/杯状体の割合でコーティングする。

【0257】

以下の段階は、第2段階までプロトコールaと同じである。

【0258】

第2段階について、ペルオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体Pm25を含む第2段階の希釈液100µlを分配する。反応媒質を周囲温度(18~24)で30分に渡りインキュベートする。次いで、標識したモノクローナル抗体Pm25が、存在する場合は、固相上に維持されているP25抗原に対して結合する。

【0259】

最終段階は、プロトコールaと同じである。

【0260】

プロトコールc: 試料(血清又は血しょう)中のHIV-1P25抗原及び抗HIV-1P25抗体の同時(「コンボ」)検出

このアッセイの原理は、抗原を検出するためのサンドイッチ型、及び抗体を検出するための間接型の方法に基づく。

【0261】

それは以下の段階に基づく：

最初にコーティング溶液を：

突然変異させたペプチド配列番号22(G295-G298-G310-G312-F316)及び炭酸塩バッファー、pH9.6中の抗P25モノクローナル抗体(Pm25)

で調製する。

【0262】

次いで、マイクロタイタープレート(Nunc、Maxisorp)の杯状体を上記溶液により110µl/杯状体の割合でコーティングする。

【0263】

このマイクロタイタープレートを一晩周囲温度(18~24)でインキュベートする。

【0264】

10

20

30

40

50

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファ（0.01M、pH7.4）を使用して洗浄し、そして5%のスクロース及び25%のスキムミルク（Candida（登録商標）、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク）を含むリン酸塩バッファ（0.01M、pH7）を加えることによって飽和させる。

【0265】

80  $\mu$ lの第1希釈物を、そして20  $\mu$ lの試料（血清又は血しょう）を連続して各杯状体に入れる。

【0266】

反応媒質を37 で1時間に渡りインキュベートする。存在する可能性のあるP25抗原が固相のモノクローナル抗体に対して結合する。類似して、もし抗P25抗体が存在すれば、それらは固相に対して結合した抗原性ペプチドに対して結合する。

10

【0267】

以下の段階は、第2段階まで、プロトコール1aと同じである。

【0268】

第2段階について、ペルオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体Pm25及びペルオキシダーゼで標識した抗ヒトIgG（H+L）抗体を含む第2段階の希釈物100  $\mu$ lを分配する。反応媒質を周囲温度（18～24）で30分に渡りインキュベートする。次いで、標識したモノクローナル抗体Pm25が固相上に維持されているP25抗原に対して結合する。類似して、標識された抗ヒトIgG（H+L）抗体が、順番に、固相上に維持されている特異的抗体に対して結合する。

20

【0269】

最終段階はプロトコールaと同じである。

【0270】

【表 1 3】

結果：

試料	プロトコール a (O.D.)	プロトコール b (O.D.)	プロトコール c (O.D.)
抗P25 抗体に対して陽性			
試料 1	0.138	-	0.316
試料 2	0.513	-	0.946
P25 抗原に対して陽性			
No. 1	-	1.104	1.151
No. 2	-	0.587	0.695
抗P25 抗体及びP25 抗原に対して陰性			
試料 3	0.045	0.051	0.125
試料 4	0.025	0.049	0.179

10

20

## 【0 2 7 1】

30

ここでも類似して留意できるように、本発明では、HIV-1P25抗原及び抗HIV-1P25抗体の捕獲を、カプシドの単一且つ同じタンパク領域：抗原特異性の領域（AA308～322）（固定化された抗P25抗体（Pm25）がそれを介してP25抗原を捕獲する）を明らかに伴う抗P25抗体（AA293～350）を捕獲する抗原性領域、で行う。

## 【0 2 7 2】

当業者にはいうまでもなく、例えば、基礎として本発明の例 8 を使用することで、HIV-1P25 (gag) 抗原、抗HIV-1P25抗体及びHIV-1のgp41糖タンパク質（エンベロープ）に対して向けられた抗体を同時に検出するための免疫アッセイも容易に行われて良い。抗HIV-1gp41抗体を検出するために、限定ではない例として、それら自身公知である、天然又は組み換えgp41又はJW. Grannらの刊行物（1987）によって記載されたような、gp41の免疫優

40

## 【0 2 7 3】

HIV-2P26 (gag) 抗原、抗HIV-2P26抗体及びHIV-2のgp36糖タンパク質（エンベロープ）に対して向けられた抗体を同時に検出するための免疫アッセイも本発明の範囲内である。当業者は、P26抗原を検出するために、公知である抗P26抗体を、そして抗P26抗体を検出するために、例えば、Guyaderらによって公表されたHIV-2配列（1987）に由来しうるP26の抗原性ペプチドを使用しても良い。抗gp36抗体を検出するために、当業者は、限定ではないとして、公知である、天然又は組み換えgp36、又はJW.Gnannらの刊行物（1987）によって記載されたようなgp36の免疫優先的エピトープを含むペプチド、のいずれか全部を使用しても良い。

50

## 【 0 2 7 4 】

当業者は容易に、HIV-1P25抗原、HIV-2P26抗原、抗HIV-1P25抗体、抗HIV-2P26抗体、抗HIV-1gp41抗体及び抗HIV-2gp36抗体の検出を同時に組み合わせる「HIV-1+HIV-2コンボ」免疫アッセイをも行うことができ、それも本発明の範囲内である。

## 【 0 2 7 5 】

## 【表 1 4】

## 参考文献情報

- Alcon et al., J. of Clin. Microbiol., 2002, vol. 40(2), pp. 376-381
- Atherton et al. (1989) "solid phase peptide synthesis, a practical approach", IRL Press, Oxford University Press, pp. 25-34
- Benoit et al. (1982) PNAS USA, 79, pp. 917-921
- Berck et Schultz, (1986), Arch. Pathol. Lab. Med., 10, pp. 13-20
- Bukh, Semin. Liver Dis. (1995) 15 : 41-63
- Cerino et al., (1991), J. Immunology, Vol. 147(8), pp. 2692-2696 10
- Clayes et al. (1995), J. of Medical Virology, 45, pp. 273-281
- Garson et al., (1990) Lancet, 336, pp. 878-879
- Gnann, JW., et al. (1987) Science, 237 : pp. 1346-1349
- Guyader et al. (1987) Nature 326, pp. 662-669
- Hajime Tokita et al. (2000) J. Clin. Microbiol., Vol. 38, pp. 3450-3452
- Harlow et al. (1988) ed., "Antibodies : a laboratory manual"
- Hermanson Greg T., (1996) Bioconjugate techniques, Academic Press, New York, pp. 373-380 et pp. 580-583
- Hoseini et al. (1991) PNAS Vol. 88, May, pp. 3647 - 3651
- Icardi et al. (2001) J. Clin. Microbiol., 39, pp. 3110-3114 20
- Ishida, (1993), J. Clin. Microbiol., Vol. 31, No. 4, pp. 936-940
- Köhler et Milstein, (1975) Nature, 256, pp. 495-497
- Leahy et al. (1991) Third International Symposium on HCV, Strasbourg, poster B35
- Maiolini et al., (1978) Journal of Immunological Methods, 20, pp. 25-34
- Marks et al. (1991) J. Mol. Biol, 222, pp. 581-597
- Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc, 85, pp. 2149-2154
- Nasoff et al. (1991) PNAS Vol. 88, No. 12, pp. 5462 - 5466
- Okamoto et al. (1990a) Japan J. Exp. Med., vol. 60(3), pp. 167-177
- Okamoto et al. (1990b) Japan J. Exp. Med., vol. 60(4), pp. 223-233 30
- Peterson et al. (2000) Vox sanguinis, Vol. 78, pp. 80-85
- Ratner et al. (1985) Nature, 313, pp. 277-284
- Sällberg et al. (1992) J. Clin. Microbiology, Vol. 30(8), pp. 1989-1994
- Sanchez-Pescador et al. (1985) Science, 227, pp.484-492
- Scott et al. (1990), Science, 249, pp. 386-390
- Sheppard, in « Peptides 1971 », Nesvadba H (ed.) North Holland, Amsterdam, p. 111
- Shieh et al. (1991) Laboratory Investigation Vol. 65, No. 4, pp. 408 - 411
- Simmonds, (1995), Hepatology, 21, pp. 570-583
- Stuyver et al. (1994), P.N.A.S. USA, 91, pp. 10134-10138 40
- Takahashi et al. (1992) J. Gen. Virol., Vol. 73(3), London, pp. 667-672
- Wain-Hobson et al. (1985) Cell, 40, pp. 9-17
- Yang et al. (1995) Clin. Exp Immunol., 101, pp. 272-277
- Yang et al. (1999), J. of Medical Virology, 57, pp. 345-350

## 【図面の簡単な説明】

【 0 2 7 6 】

【図 1】本発明以前に使用されていた、固相に対して結合させた捕獲抗体及び未修飾捕獲抗原によるタイプの検出の方法を案図示している。この図案は、患者の抗体と検出抗体の 50

、捕獲抗原に対する結合に関する競合を示している。

【図2】比較として、本発明の実施態様を示す図である。捕獲抗原が突然変異しているの  
で、検出抗体によって認識されることはもはやない。従って、抗体の検出と抗原の検出と  
の間で干渉が生じることはない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BIORAD PASTEUR

<120> Procédé de détection simultanée d'un antigène et d'un anticorps d  
microorganisme infectieux

<130> BET 03P0457

<150> FR 0205808

<151> 2002-05-10

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 75

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1                   5                   10                   15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
                 20                   25                   30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala  
                 35                   40                   45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
                 50                   55                   60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65                   70                   75

<210> 2

<211> 63

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp  
1                   5                   10                   15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu  
                 20                   25                   30

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser  
                 35                   40                   45

10

20

30

40

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala  
50 55 60

<210> 3  
<211> 53  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 3

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

10

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala  
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser  
50

<210> 4  
<211> 75  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

20

<400> 4

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
50 55 60

30

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65 70 75

<210> 5  
<211> 75  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 5

40

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
 1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Gly Gly  
 20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
 50 55 60

10

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
 65 70 75

<210> 6  
 <211> 75  
 <212> PRT  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 6

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
 1 5 10 15

20

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
 20 25 30

Gly Val Tyr Gly Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
 35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
 50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
 65 70 75

30

<210> 7  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 7

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp  
 1 5 10 15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Gly Tyr Leu Leu  
 20 25 30

40

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala Thr Arg Lys Thr Ser  
35 40 45

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala  
50 55 60

<210> 8  
<211> 63  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 8

10

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp  
1 5 10 15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Gly Gly Gly Val Tyr Leu Leu  
20 25 30

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala Thr Arg Lys Thr Ser  
35 40 45

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala  
50 55 60

20

<210> 9  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 9

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp  
1 5 10 15

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Gly Leu  
20 25 30

30

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala Thr Arg Lys Thr Ser  
35 40 45

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg  
50 55 60

Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65 70

<210> 10

40

<211> 53  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 10

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
35 40 45

10

Thr Arg Lys Thr Ser  
50

<210> 11  
<211> 53  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 11

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

20

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Gly Gly  
20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser  
50

<210> 12  
<211> 53  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

30

<400> 12

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Val Tyr Gly Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala

40

35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser  
50

<210> 13  
<211> 73  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 13

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn 10  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Arg Ala Thr Arg  
35 40 45

Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro  
50 55 60

Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser 20  
65 70

<210> 14  
<211> 75  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (45)..(45)  
<223> bAla

<400> 14 30

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Ala Val Arg Ala  
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
50 55 60 40

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65 70 75

<210> 15  
<211> 76  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 15

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Gly Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Gly Gly Arg  
35 40 45

Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln  
50 55 60

Pro Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65 70 75

<210> 16  
<211> 75  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (29)..(29)  
<223> Nle

<400> 16

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Leu Gly Val Gly  
20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
50 55 60

10

20

30

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65 70 75

<210> 17  
<211> 75  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 17

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Gly Phe Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65 70 75

<210> 18  
<211> 75  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (35)..(35)  
<223> homo-serine

<400> 18

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn  
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly  
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Gly Gly Val Gly Ala  
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro  
50 55 60

10

20

30

40

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ser  
65 70 75

<210> 19  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 19

Leu Gly Val Arg  
1

<210> 20  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 20

Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu  
1 5

<210> 21  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Hepatitis C virus

<400> 21

Gln Ile Val Gly Gly Val  
1 5

<210> 22  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 22

Phe Arg Gly Tyr Val Gly Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln  
1 5 10 15

Ala Gly Gln Gly Val Lys Asn Phe Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln  
20 25 30

Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala  
35 40 45

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys  
50 55

<210> 23

10

20

30

40



Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys  
1 5 10

<210> 28  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 28

Leu Gly Leu Trp Gly Cys Ser Gly Lys His Ile Cys  
1 5 10

<210> 29  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 29

Leu Gly Met Trp Gly Cys Ser Gly Lys His Ile Cys  
1 5 10

<210> 30  
<211> 26  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 30

Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly  
1 5 10 15

Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys  
20 25

<210> 31  
<211> 34  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 31

Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly  
1 5 10 15

Ile Trp Gly Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn  
20 25 30

Ala Ser

10

20

30

<210> 32  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Human immunodeficiency virus type 2  
 <400> 32

Leu Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Human immunodeficiency virus type 2  
 <400> 33

Arg Val Thr Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp Gln Ala Arg Leu Asn  
 1 5 10 15

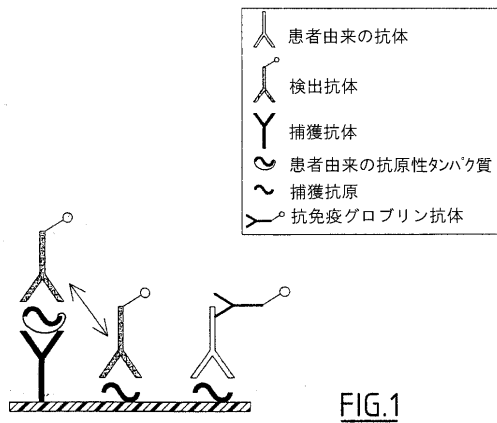
Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr Val Pro Trp  
 20 25 30

Val Asn Asp Ser  
 35

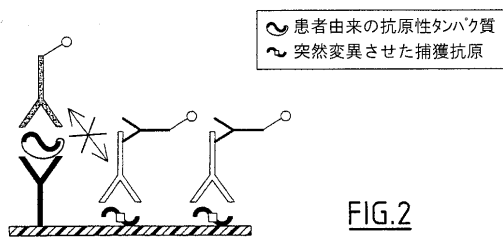
10

20

【 図 1 】



【 図 2 】



## 【手続補正書】

【提出日】平成17年6月14日(2005.6.14)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0149

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0149】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7.4)を使用して洗浄し、そして5%のスクロース、25%のスキムミルク(Candida(登録商標)、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク)及び10mMのEDTAを含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7)を加えることによって飽和させる。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0170

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0170】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7.4)を使用して洗浄し、そして5%のスクロース、25%のスキムミルク(Candida(登録商標)、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク)及び10mMのEDTAを含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7)を加えることによって飽和させる。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0180

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0180】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7.4)を使用して洗浄し、そして5%のスクロース、25%のスキムミルク(Candida(登録商標)、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク)及び10mMのEDTAを含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7)を加えることによって飽和させる。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0245

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0245】

コーティング溶液を取り除いた後、プレートを、0.1%のTween20を含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7.4)を使用して洗浄し、そして5%のスクロース及び25%のスキムミルク(Candida(登録商標)、France、又は他の同等な市販されており入手可能なスキムミルク)を含むリン酸塩バッファー(0.01M、pH7)を加えることによって飽和させる。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/01429

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7 G01N33/569 G01N33/576 C07K14/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 G01N C07K		
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)		
EPO-Internal, EMBL, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 22571 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 23 December 1992 (1992-12-23) the whole document	1-44
X	WO 01 04149 A (US HEALTH) 18 January 2001 (2001-01-18) Sequence 1 abstract	1-44
<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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 October 2003		26/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Moreno, C

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/FR 03/01429

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KUO G ET AL: "AN ASSAY FOR CIRCULATING ANTIBODIES TO A MAJOR ETIOLOGIC VIRUS OF HUMAN NON-A, NON-B HEPATITIS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 244, no. 4902, 21 April 1989 (1989-04-21), pages 362-364, XP000051651 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-44
X	EP 0 388 232 A (CHIRON CORP) 19 September 1990 (1990-09-19) the whole document ---	1-44
X	EP 0 363 025 A (UNIV OSAKA RES FOUND) 11 April 1990 (1990-04-11) the whole document ---	1-44
X	EP 0 442 394 A (UNITED BIOMEDICAL INC) 21 August 1991 (1991-08-21) examples ---	41-44
X	EP 0 451 891 A (AKZO NV) 16 October 1991 (1991-10-16) examples ---	41-44
X	DATABASE EMBL 'Online! Core Protein (genome polyprotein), Database accession no. q68685 XP002237193 abstract & STUYVER L ET AL: "HEPATITIS C VIRUS GENOTYPING BY MEANS OF 5'-UR/CORE LINE PROBE ASSAYS AND MOLECULAR ANALYSIS OF UNTYPEABLE SAMPLES" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 38, 1995, pages 137-157, XP002057867 ISSN: 0168-1702 the whole document ---	41-44
X	KALININA O. ET AL: "A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 76, no. 8, April 2002 (2002-04), pages 4034-4043, XP002237192 figure 4 & DATABASE EMBL 'Online! Core protein (genome polyprotein), Database accession no. q8qp59 abstract --- -/--	41-44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/01429

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 313 666 A (HOFFMANN LA ROCHE) 3 December 1997 (1997-12-03) the whole document ---	1,6,17
X	WO 95 33206 A (ABBOTT LAB) 7 December 1995 (1995-12-07) the whole document ---	1,6,17
X	WO 95 23973 A (ABBOTT LAB) 8 September 1995 (1995-09-08) the whole document ---	1,6,17
X	WO 93 03376 A (IAF BIOCHEM INT) 18 February 1993 (1993-02-18) the whole document ---	1,6,17
X	WO 99 45395 A (CHOWDURY MOHAMMED A ; UNIVERSAL HEALTHWATCH INC (US); BERNSTEIN DAV) 10 September 1999 (1999-09-10) abstract ---	1,6,17
X	WO 98 40744 A (HOESS EVA ; DONIE FREDERIC (DE); FAATZ ELKE (DE); UPMEIER BARBARA ( ) 17 September 1998 (1998-09-17) the whole document -----	1,6-9, 17, 25-27, 36-38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/01429

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9222571	A	23-12-1992	AU 648912 B2	05-05-1994
			AU 1972092 A	12-01-1993
			CA 2087974 A1	14-12-1992
			EP 0544861 A1	09-06-1993
			JP 3350729 B2	25-11-2002
			JP 6500796 T	27-01-1994
			WO 9222571 A1	23-12-1992
WO 0104149	A	18-01-2001	AU 6207700 A	30-01-2001
			CA 2379235 A1	18-01-2001
			EP 1200465 A1	02-05-2002
			WO 0104149 A1	18-01-2001
			US 2002090607 A1	11-07-2002
EP 0388232	A	19-09-1990	AU 4750493 A	20-01-1994
			AU 666767 B2	22-02-1996
			AU 4750593 A	16-12-1993
			AU 666576 B2	15-02-1996
			AU 4750693 A	16-12-1993
			AU 640920 B2	09-09-1993
			AU 5278390 A	22-10-1990
			CA 2012482 A1	17-09-1990
			DD 297446 A5	09-01-1992
			DE 388232 T1	02-05-1991
			EP 1034785 A2	13-09-2000
			EP 0388232 A1	19-09-1990
			FI 106211 B1	15-12-2000
			FI 981381 A	15-06-1998
			FI 20002013 A	13-09-2000
			FI 20002014 A	13-09-2000
			GR 91300016 T1	15-11-1991
			HU 54896 A2	29-04-1991
			HU 9500746 A3	29-01-1996
			JP 2693908 B2	24-12-1997
			JP 7101986 A	18-04-1995
			JP 2809987 B2	15-10-1998
			JP 7145194 A	06-06-1995
			JP 10309197 A	24-11-1998
			JP 10295389 A	10-11-1998
			JP 2000039434 A	08-02-2000
			JP 3171792 B2	04-06-2001
			JP 9215497 A	19-08-1997
			JP 2656995 B2	24-09-1997
			JP 4504715 T	20-08-1992
			KR 185373 B1	01-05-1999
			KR 167125 B1	01-05-1999
KR 187483 B1	01-05-1999			
NO 904712 A	30-10-1990			
NO 960741 A	23-02-1996			
NO 960742 A	23-02-1996			
PT 93480 A ,B	07-11-1990			
RU 2204603 C2	20-05-2003			
US 5714596 A	03-02-1998			
WO 9011089 A1	04-10-1990			
US 5679342 A	21-10-1997			
US 5350671 A	27-09-1994			
US 5698390 A	16-12-1997			
US 6074816 A	13-06-2000			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/01429

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 0388232	A	US 5968775 A	19-10-1999	
		US 5712088 A	27-01-1998	
		US 6096541 A	01-08-2000	
		US 6171782 B1	09-01-2001	
		US 5863719 A	26-01-1999	
		US 2003162167 A1	28-08-2003	
EP 0363025	A	11-04-1990	AT 154391 T	15-06-1997
		AU 623433 B2	14-05-1992	
		AU 4179989 A	05-04-1990	
		DE 68928119 D1	17-07-1997	
		DE 68928119 T2	08-01-1998	
		DK 480889 A	02-04-1990	
		EP 0363025 A2	11-04-1990	
		FI 894580 A	31-03-1990	
		HU 58805 A2	30-03-1992	
		JP 2696116 B2	14-01-1998	
		JP 3139282 A	13-06-1991	
		KR 9208739 B1	08-10-1992	
		NO 893894 A	02-04-1990	
		NO 950527 A	02-04-1990	
		NZ 230560 A	26-05-1992	
		US 5275947 A	04-01-1994	
		US 5298394 A	29-03-1994	
US 5191064 A	02-03-1993			
EP 0442394	A	21-08-1991	US 5106726 A	21-04-1992
		AT 195532 T	15-09-2000	
		CA 2036463 A1	17-08-1991	
		DE 69132365 D1	21-09-2000	
		DE 69132365 T2	05-04-2001	
		EP 0442394 A2	21-08-1991	
		ES 2152211 T3	01-02-2001	
		FI 910720 A	17-08-1991	
		JP 2763408 B2	11-06-1998	
		JP 5148298 A	15-06-1993	
		KR 9400755 B1	29-01-1994	
		US 5639594 A	17-06-1997	
		US 5747239 A	05-05-1998	
		US 5436126 A	25-07-1995	
		US 5582968 A	10-12-1996	
		AU 635124 B2	11-03-1993	
		AU 7439991 A	17-10-1991	
		AT 179184 T	15-05-1999	
		AU 646275 B2	17-02-1994	
		AU 8139091 A	30-01-1992	
		CA 2047792 A1	27-01-1992	
		DE 69131149 D1	27-05-1999	
		DE 468527 T1	24-02-1994	
		EP 0468527 A2	29-01-1992	
		ES 2058049 T1	01-11-1994	
		FI 913560 A	27-01-1992	
		GR 94300008 T1	28-02-1994	
JP 2763215 B2	11-06-1998			
JP 5222094 A	31-08-1993			
KR 9308092 B1	25-08-1993			
EP 0451891	A	16-10-1991	AU 631490 B2	26-11-1992

Information on patent family members				International Application No PCT/FR 03/01429	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
EP 0451891	A	AU 7395691	A	03-10-1991	
		CA 2039481	A1	01-10-1991	
		EP 0451891	A2	16-10-1991	
		FI 911528	A	01-10-1991	
		IE 910928	A1	09-10-1991	
		US 5229491	A	20-07-1993	
		ZA 9102040	A	24-12-1991	
-----					
GB 2313666	A	03-12-1997	NONE		
-----					
WO 9533206	A	07-12-1995	AU 2245595	A	21-12-1995
			CA 2191430	A1	07-12-1995
			EP 0763204	A1	19-03-1997
			JP 10502165	T	24-02-1998
			WO 9533206	A1	07-12-1995
-----					
WO 9523973	A	08-09-1995	AU 1880995	A	18-09-1995
			CA 2161872	A1	08-09-1995
			EP 0698214	A1	28-02-1996
			JP 8510063	T	22-10-1996
			WO 9523973	A2	08-09-1995
-----					
WO 9303376	A	18-02-1993	AT 132268	T	15-01-1996
			AU 2340992	A	02-03-1993
			CA 2114220	A1	18-02-1993
			WO 9303376	A1	18-02-1993
			CN 1070484	A	31-03-1993
			DE 69207200	D1	08-02-1996
			EG 20183	A	30-09-1997
			EP 0605433	A1	13-07-1994
			ES 2085631	T3	01-06-1996
			IE 922452	A1	10-02-1993
			IL 102615	A	15-04-1997
			JP 2931100	B2	09-08-1999
			JP 6509868	T	02-11-1994
			NZ 243636	A	25-06-1993
			PT 100731	A ,B	29-10-1993
			ZA 9205492	A	28-04-1993
-----					
WO 9945395	A	10-09-1999	AU 2790899	A	20-09-1999
			EP 0993615	A1	19-04-2000
			WO 9945395	A1	10-09-1999
-----					
WO 9840744	A	17-09-1998	DE 19727943	A1	24-09-1998
			AT 228248	T	15-12-2002
			AU 6727798	A	29-09-1998
			DE 59806359	D1	02-01-2003
			WO 9840744	A1	17-09-1998
			EP 0972198	A1	19-01-2000
			ES 2187947	T3	16-06-2003
			JP 2001514749	T	11-09-2001
			US 6593079	B1	15-07-2003
			ZA 9801955	A	09-09-1999
-----					

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/01429

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 601N33/569 601N33/576 C07K14/18		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 601N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, EMBL, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 92 22571 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 23 décembre 1992 (1992-12-23) le document en entier ---	1-44
X	WO 01 04149 A (US HEALTH) 18 janvier 2001 (2001-01-18) Sequence 1 abrégé --- -/-	1-44
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  16 octobre 2003		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  26/11/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Moreno, C

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/01429

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	KUO G ET AL: "AN ASSAY FOR CIRCULATING ANTIBODIES TO A MAJOR ETIOLOGIC VIRUS OF HUMAN NON-A, NON-B HEPATITIS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 244, no. 4902, 21 avril 1989 (1989-04-21), pages 362-364, XP000051651 ISSN: 0036-8075 le document en entier ---	1-44
X	EP 0 388 232 A (CHIRON CORP) 19 septembre 1990 (1990-09-19) le document en entier ---	1-44
X	EP 0 363 025 A (UNIV OSAKA RES FOUND) 11 avril 1990 (1990-04-11) le document en entier ---	1-44
X	EP 0 442 394 A (UNITED BIOMEDICAL INC) 21 août 1991 (1991-08-21) exemples ---	41-44
X	EP 0 451 891 A (AKZO NV) 16 octobre 1991 (1991-10-16) exemples ---	41-44
X	DATABASE EMBL 'en ligne! Core Protein (genome polyprotein), Database accession no. q68685 XP002237193 abrégé & STUYVER L ET AL: "HEPATITIS C VIRUS GENOTYPING BY MEANS OF 5'-UR/CORE LINE PROBE ASSAYS AND MOLECULAR ANALYSIS OF UNTYPEABLE SAMPLES" VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 38, 1995, pages 137-157, XP002057867 ISSN: 0168-1702 le document en entier ---	41-44
X	KALININA O. ET AL: "A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 76, no. 8, avril 2002 (2002-04), pages 4034-4043, XP002237192 figure 4 & DATABASE EMBL 'en ligne! Core protein (genome polyprotein), Database accession no. q8qp59 abrégé ---	41-44
	-/--	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No  
 PCT/FR 03/01429

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GB 2 313 666 A (HOFFMANN LA ROCHE) 3 décembre 1997 (1997-12-03) le document en entier ---	1,6,17
X	WO 95 33206 A (ABBOTT LAB) 7 décembre 1995 (1995-12-07) le document en entier ---	1,6,17
X	WO 95 23973 A (ABBOTT LAB) 8 septembre 1995 (1995-09-08) le document en entier ---	1,6,17
X	WO 93 03376 A (IAF BIOCHEM INT) 18 février 1993 (1993-02-18) le document en entier ---	1,6,17
X	WO 99 45395 A (CHOWDURY MOHAMMED A ; UNIVERSAL HEALTHWATCH INC (US); BERNSTEIN DAY) 10 septembre 1999 (1999-09-10) abrégé ---	1,6,17
X	WO 98 40744 A (HOESS EVA ; DONIE FREDERIC (DE); FAATZ ELKE (DE); UPMEIER BARBARA ()) 17 septembre 1998 (1998-09-17)  le document en entier ---	1,6-9, 17, 25-27, 36-38

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

				Demande internationale No PCT/FR 03/01429	
Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9222571	A	23-12-1992	AU 648912 B2		05-05-1994
			AU 1972092 A		12-01-1993
			CA 2087974 A1		14-12-1992
			EP 0544861 A1		09-06-1993
			JP 3350729 B2		25-11-2002
			JP 6500796 T		27-01-1994
			WO 9222571 A1		23-12-1992
WO 0104149	A	18-01-2001	AU 6207700 A		30-01-2001
			CA 2379235 A1		18-01-2001
			EP 1200465 A1		02-05-2002
			WO 0104149 A1		18-01-2001
			US 2002090607 A1		11-07-2002
EP 0388232	A	19-09-1990	AU 4750493 A		20-01-1994
			AU 666767 B2		22-02-1996
			AU 4750593 A		16-12-1993
			AU 666576 B2		15-02-1996
			AU 4750693 A		16-12-1993
			AU 640920 B2		09-09-1993
			AU 5278390 A		22-10-1990
			CA 2012482 A1		17-09-1990
			DD 297446 A5		09-01-1992
			DE 388232 T1		02-05-1991
			EP 1034785 A2		13-09-2000
			EP 0388232 A1		19-09-1990
			FI 106211 B1		15-12-2000
			FI 981381 A		15-06-1998
			FI 20002013 A		13-09-2000
			FI 20002014 A		13-09-2000
			GR 91300016 T1		15-11-1991
			HU 54896 A2		29-04-1991
			HU 9500746 A3		29-01-1996
			JP 2693908 B2		24-12-1997
			JP 7101986 A		18-04-1995
			JP 2809987 B2		15-10-1998
			JP 7145194 A		06-06-1995
			JP 10309197 A		24-11-1998
			JP 10295389 A		10-11-1998
			JP 2000039434 A		08-02-2000
			JP 3171792 B2		04-06-2001
			JP 9215497 A		19-08-1997
			JP 2656995 B2		24-09-1997
			JP 4504715 T		20-08-1992
			KR 185373 B1		01-05-1999
			KR 167125 B1		01-05-1999
KR 187483 B1		01-05-1999			
NO 904712 A		30-10-1990			
NO 960741 A		23-02-1996			
NO 960742 A		23-02-1996			
PT 93480 A , B		07-11-1990			
RU 2204603 C2		20-05-2003			
US 5714596 A		03-02-1998			
WO 9011089 A1		04-10-1990			
US 5679342 A		21-10-1997			
US 5350671 A		27-09-1994			
US 5698390 A		16-12-1997			
US 6074816 A		13-06-2000			

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets		Demande internationale No PCT/FR 03/01429		
Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
EP 0388232	A	US 5968775 A	19-10-1999	
		US 5712088 A	27-01-1998	
		US 6096541 A	01-08-2000	
		US 6171782 B1	09-01-2001	
		US 5863719 A	26-01-1999	
		US 2003162167 A1	28-08-2003	
EP 0363025	A	11-04-1990	AT 154391 T	15-06-1997
		AU 623433 B2	14-05-1992	
		AU 4179989 A	05-04-1990	
		DE 68928119 D1	17-07-1997	
		DE 68928119 T2	08-01-1998	
		DK 480889 A	02-04-1990	
		EP 0363025 A2	11-04-1990	
		FI 894580 A	31-03-1990	
		HU 58805 A2	30-03-1992	
		JP 2696116 B2	14-01-1998	
		JP 3139282 A	13-06-1991	
		KR 9208739 B1	08-10-1992	
		NO 893894 A	02-04-1990	
		NO 950527 A	02-04-1990	
		NZ 230560 A	26-05-1992	
		US 5275947 A	04-01-1994	
		US 5298394 A	29-03-1994	
US 5191064 A	02-03-1993			
EP 0442394	A	21-08-1991	US 5106726 A	21-04-1992
		AT 195532 T	15-09-2000	
		CA 2036463 A1	17-08-1991	
		DE 69132365 D1	21-09-2000	
		DE 69132365 T2	05-04-2001	
		EP 0442394 A2	21-08-1991	
		ES 2152211 T3	01-02-2001	
		FI 910720 A	17-08-1991	
		JP 2763408 B2	11-06-1998	
		JP 5148298 A	15-06-1993	
		KR 9400755 B1	29-01-1994	
		US 5639594 A	17-06-1997	
		US 5747239 A	05-05-1998	
		US 5436126 A	25-07-1995	
		US 5582968 A	10-12-1996	
		AU 635124 B2	11-03-1993	
		AU 7439991 A	17-10-1991	
		AT 179184 T	15-05-1999	
		AU 646275 B2	17-02-1994	
		AU 8139091 A	30-01-1992	
		CA 2047792 A1	27-01-1992	
		DE 69131149 D1	27-05-1999	
		DE 468527 T1	24-02-1994	
EP 0468527 A2	29-01-1992			
ES 2058049 T1	01-11-1994			
FI 913560 A	27-01-1992			
GR 94300008 T1	28-02-1994			
JP 2763215 B2	11-06-1998			
JP 5222094 A	31-08-1993			
KR 9308092 B1	25-08-1993			
EP 0451891	A	16-10-1991	AU 631490 B2	26-11-1992

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No  
PCT/FR 03/01429

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0451891	A	AU 7395691 A	03-10-1991
		CA 2039481 A1	01-10-1991
		EP 0451891 A2	16-10-1991
		FI 911528 A	01-10-1991
		IE 910928 A1	09-10-1991
		US 5229491 A	20-07-1993
		ZA 9102040 A	24-12-1991
GB 2313666	A	03-12-1997	AUCUN
WO 9533206	A	07-12-1995	AUCUN
		AU 2245595 A	21-12-1995
		CA 2191430 A1	07-12-1995
		EP 0763204 A1	19-03-1997
		JP 10502165 T	24-02-1998
WO 9533206 A1	07-12-1995		
WO 9523973	A	08-09-1995	AUCUN
		AU 1880995 A	18-09-1995
		CA 2161872 A1	08-09-1995
		EP 0698214 A1	28-02-1996
		JP 8510063 T	22-10-1996
WO 9523973 A2	08-09-1995		
WO 9303376	A	18-02-1993	AUCUN
		AT 132268 T	15-01-1996
		AU 2340992 A	02-03-1993
		CA 2114220 A1	18-02-1993
		WO 9303376 A1	18-02-1993
		CN 1070484 A	31-03-1993
		DE 69207200 D1	08-02-1996
		EG 20183 A	30-09-1997
		EP 0605433 A1	13-07-1994
		ES 2085631 T3	01-06-1996
		IE 922452 A1	10-02-1993
		IL 102615 A	15-04-1997
		JP 2931100 B2	09-08-1999
		JP 6509868 T	02-11-1994
		NZ 243636 A	25-06-1993
		PT 100731 A, B	29-10-1993
ZA 9205492 A	28-04-1993		
WO 9945395	A	10-09-1999	AUCUN
		AU 2790899 A	20-09-1999
		EP 0993615 A1	19-04-2000
WO 9945395 A1	10-09-1999		
WO 9840744	A	17-09-1998	AUCUN
		DE 19727943 A1	24-09-1998
		AT 228248 T	15-12-2002
		AU 6727798 A	29-09-1998
		DE 59806359 D1	02-01-2003
		WO 9840744 A1	17-09-1998
		EP 0972198 A1	19-01-2000
		ES 2187947 T3	16-06-2003
		JP 2001514749 T	11-09-2001
		US 6593079 B1	15-07-2003
		ZA 9801955 A	09-09-1999

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/576 Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 リュニエ, フランソワ イブ

フランス国, エフ - 7 8 3 9 0 ボワ ダルシー, リュ デュ ボワ, 5

(72) 発明者 フェイサギユ, ムリエル

フランス国, エフ - 9 2 2 1 0 サン クル, リュ ガストン ラトゥシュ, 1 4

(72) 発明者 アンリオ, ステファニー

フランス国, エフ - 9 2 1 5 0 シュルスネ, リュ デ バルトー, 4 1

(72) 発明者 ランベール, ナディーヌ

フランス国, エフ - 7 8 4 0 0 シャトー, アブニユ アーネス ブソン, 5

F ターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA02 CA05 DA86 EA50 EA53

专利名称(译)	同时检测感染性微生物的抗原和抗体的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006501151A</a>	公开(公告)日	2006-01-12
申请号	JP2004503914	申请日	2003-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	Bio-Rad公司巴斯德		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司巴斯德		
[标]发明人	リュニエフランソワイブ フェイスギユムリエル アンリオステファニー ランベールナディーヌ		
发明人	リュニエ, フランソワ イブ フェイスギユ, ムリエル アンリオ, ステファニー ランベール, ナディーヌ		
IPC分类号	C07K14/18 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/576 C07K14/16 C07K16/10 C07K16/42		
CPC分类号	C07K14/1833 C07K14/005 C07K14/161 C07K16/109 C07K16/42 C07K2317/32 C12N2740/16122 C12N2740/16222 C12N2770/24222 G01N33/569 G01N33/56983 G01N33/56988 G01N33/5767 G01N2333/16 G01N2333/18		
FI分类号	C07K14/18.ZNA G01N33/53.N G01N33/543.501.D G01N33/569.H G01N33/569.L G01N33/576.Z		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA02 4H045/CA05 4H045/DA86 4H045 /EA50 4H045/EA53		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 西山雅也		
优先权	2002005808 2002-05-10 FR		
其他公开文献	JP4351153B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种体外检测生物样品中微生物如丙型肝炎病毒感染的方法，该方法同时检测该微生物的抗原和针对该抗原的抗体，并且还涉及实施该方法的试剂和试剂盒。

モノクローナル抗体	クラス	認識される天然のエピトープ
mAb 1	IgG2a	<sup>44</sup> LGVR <sup>47</sup> (配列番号19)
mAb 2	IgG2a	<sup>30</sup> IVGGVYL <sup>36</sup> (配列番号20)
mAb 3	IgG1	<sup>29</sup> QIVGGV <sup>44</sup> (配列番号21)
mAb 4	IgG1	<sup>29</sup> QIVGGV <sup>44</sup> (配列番号21)
mAb 5	IgG1	<sup>30</sup> IVGGVYL <sup>36</sup> (配列番号20)
mAb 6	IgG1	<sup>30</sup> IVGGVYL <sup>36</sup> (配列番号20)