

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4351153号
(P4351153)

(45) 発行日 平成21年10月28日(2009.10.28)

(24) 登録日 平成21年7月31日(2009.7.31)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C O 7 K 14/18 (2006.01)	C O 7 K 14/18	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	N
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 O 1 D
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569	H
請求項の数 31 (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-503914 (P2004-503914)	(73) 特許権者	502056400
(86) (22) 出願日	平成15年5月9日(2003.5.9)		バイオーラド パストゥール
(65) 公表番号	特表2006-501151 (P2006-501151A)		フランス国, エフ-92430 マルヌ
(43) 公表日	平成18年1月12日(2006.1.12)		ラ コケット, プールパール ライモン
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/001429		ポワンカーレ, 3
(87) 国際公開番号	W02003/095968	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成15年11月20日(2003.11.20)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成17年6月14日(2005.6.14)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	02/05808		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成14年5月10日(2002.5.10)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物試料において、HCV及びHIVから選ばれる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する抗体を同時検出することを含み、当該方法は：

a) 当該生物試料を、当該微生物に対する捕獲抗体、及びHCVカプシドタンパク質又はHIVのgagタンパク質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ること、
を含み；

ここで、捕獲抗原、及び/又は捕獲された前記微生物に対する抗体に結合することができる標識された検出抗原は、少なくとも1つのエピトープが無効にされているHCVカプシドタンパク質又はHIVのgagタンパク質の抗原性断片を含み、捕獲された前記微生物の抗原に結合することができる捕獲及び/又は検出抗体は、捕獲されている抗原の天然型である前記エピトープを認識する、前記方法。

【請求項 2】

前記微生物が、C型肝炎ウイルス(HCV)である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記微生物がヒト免疫欠損ウイルス(HIV)である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記HIVがHIV-1及び/又はHIV-2である、請求項1又は3に記載の方法。

【請求項5】

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1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

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1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

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1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

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、請求項2～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

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2～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

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HCV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HCV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、

ことを含み、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み、

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天然型である、前記エピトープの1つ、を各々が認識する、請求項2に記載の方法。

【請求項11】

前記捕獲抗体及び検出抗体が各々、以下の配列：⁴⁴LGVR⁴⁷（配列番号19）、³⁰IVGGVYL³⁶（配列番号20）及び²⁹QIVGGV³⁴（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10に記載の方法。

【請求項12】

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、

ことを含み、そして、
前記抗HIV抗体を捕獲するための抗原は、少なくとも1つの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み、

そして前記捕獲及び検出抗体は、当該捕獲されているHIVのgag抗原の天然型である、前記エピトープの1つ、を各々が認識する、請求項3又は4に記載の検出方法。

【請求項13】

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10～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

10

20

30

40

50

前記非イオン性デタージェントがNP40である、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 に記載の方法に用いるキットであって：

- HCVカプシドタンパク質又はHIVのgagタンパク質の抗原性断片を含む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み、しかも同時に当該生物試料中に存在する可能性がある、前記微生物に対する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、天然型である、前記エピトープに対する抗体、を含む、前記キット。

【請求項 1 6】

前記微生物がC型肝炎ウイルス（HCV）である、請求項 1 5 に記載のキット。

【請求項 1 7】

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 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

前記抗体が、以下の配列：⁴⁴LGVR⁴⁷（配列番号 1 9）、³⁰IVGGVYL³⁶（配列番号 2 0）及び²⁹QIVGGV³⁴（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 1 6 又は 1 7 に記載のキット。

【請求項 1 9】

前記微生物がヒト免疫欠損ウイルス（HIV）である、請求項 1 5 に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記HIVがHIV-1及び/又はHIV-2である、請求項 1 5 又は 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 1】

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 1 5 又は 1 9 に記載のキット。

【請求項 2 2】

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む、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 2 3】

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む、請求項 1 9 又は 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 4】

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 2 又は 2 3 に記載のキット。

【請求項 2 5】

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 1 6 ~ 1 8、2 2 及び 2 4 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 2 6】

a) HCVカプシドタンパク質の抗原性断片を含む捕獲抗原であって、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み、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カプシドタンパク質の天然型であるエピトープの1つに対する捕獲抗体；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

c₁) HCVカプシドタンパク質の天然型である他のエピトープに対する標識された検出抗体；及び/又は

c₂) HCVカプシド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み、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、を含む、請求項 2 5 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

a) HCVカプシドタンパク質の抗原性断片を含む捕獲抗原であって、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み、しかも同時に、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カプシドタンパク質の天然型であるエピトープの1つに対する捕獲抗体；前記捕獲抗原及び前記捕獲抗体は固相上に固定されており；及び

c) 前記HCVカプシドタンパク質の天然型である他のエピトープに対する標識された検出抗体、

を含む、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 28】

10

a) HIVのgagタンパク質の抗原性断片を含む捕獲抗原であって、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み、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のgagタンパク質の天然型であるエピトープの1つに対する捕獲抗体；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

c₁) HIVのgagタンパク質の天然型である他のエピトープに対する標識された検出抗体；及び/又は

c₂) HIVのgag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み、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、

20

を含む、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 29】

a) HIVのgagタンパク質の抗原性断片を含む捕獲抗原であって、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み、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のgagタンパク質の天然型であるエピトープの1つに対する捕獲抗体；該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；及び

c) HIVのgagタンパク質の天然型である他のエピトープに対する標識された検出抗体、を含む、請求項 24 に記載のキット。

30

【請求項 30】

非イオン型のデタージェントを少なくとも1種含む、請求項 17 ~ 26 のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 31】

前記非イオン型のデタージェントが、tert-オクチルフェノキシポリ(オキシエチレン)エタノール(NP40)である、請求項 30 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【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。

40

【背景技術】

【0002】

最初は非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

50

とよばれる、ウィルスの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、前記ウィルスの非構造性タンパク質（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、ウィ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ウィルスのゲノムの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ィ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、構造型（カプシド：領域AA1～120における）及び非構造型（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、及び構造型及び非構造型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ウィ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、構造型及び非構造型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ィ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

10

20

30

40

50

可能であり且つ往々にして汚染が生じる。

【 0 0 1 1 】

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。

【 0 0 1 2 】

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。

【 0 0 1 3 】

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。

【 0 0 1 4 】

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られた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。

【 0 0 1 5 】

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マスクリ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。

【 0 0 1 6 】

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。

【 0 0 1 7 】

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。

【 0 0 1 8 】

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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 1 9 】

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、
10 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。

【 0 0 2 0 】

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。
20

【 0 0 2 1 】

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。

【 0 0 2 2 】

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) 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。
30

【 0 0 2 3 】

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。
40

【 0 0 2 4 】

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、使用されるデタージェントがBRIJ又
50

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出されている。

【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A32～36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。

【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。

【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の検出口を回避するだろう。

【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

10

20

30

40

50

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。

【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。

10

【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O)、及びHIV-2及びそれらの変異体を意味する。

【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。

20

【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')₂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うる。

【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。

30

【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】

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。

40

【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。

【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

50

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、詳細にはgp41 (HIV-1) もしくはgp36 (HIV-2) の全部又は一部を意味する。

【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。

10

【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。

【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。

20

【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、Okamotoら（1990）；Nasoffら（1991）；Leathyら（1991）；Takahashiら（1992）；Sallbergら（1992）；及びIshida（1993）を参照のこと。

【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。

30

【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Cerinnoら（1991）中で述べられている。

【0047】

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。

40

【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

50

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。

【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。

10

【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。

20

【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。

【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。

30

【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、動物には200 μ g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。

40

【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。

【0056】

50

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。

【 0 0 5 7 】

【表 1】

表 1

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	⁴⁴ LGVR ⁴⁷ (配列番号19)
mAb 2	IgG2a	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (配列番号20)
mAb 3	IgG1	²⁹ QIVGGV ³⁴ (配列番号21)
mAb 4	IgG1	²⁹ QIVGGV ³⁴ (配列番号21)
mAb 5	IgG1	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (配列番号20)
mAb 6	IgG1	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (配列番号20)

10

20

【 0 0 5 8 】

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。

- 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 2 4) 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 2 5) を含むエピトープ (HIV-2単離体：ROD)

30

【 0 0 5 9 】

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。

【 0 0 6 0 】

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。

40

【 0 0 6 1 】

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。

【 0 0 6 2 】

50

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的タンパク質、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の非構造的タンパク質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の非構造的タンパク質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。

10

【0063】

同様に、gag抗原、gagに対する抗体及び/又はAIDSウイルス(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。

【0064】

20

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、又は更にデングウイルスの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。

【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。

30

【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】

40

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

50

、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、NH₂又はSHにおける修飾も可能である。

【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、ウィルスであり、様々なタイプの肝炎の原因となるウィルス、AIDS(HIV-1、HIV-2など)の原因となるレトロウィルス、CMVウィルス、 Dengueウィルスなどのウィルス、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。

10

【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。

【0071】

【化1】

20

配列番号 1

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRL₄₄GV
R₄₇ATRSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS₇₅

配列番号 2

₆KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRL₄₄GVR₄₇ATR
KTSERSQPRGRRQPIPKA₆₈

30

配列番号 3

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRL₄₄GV
R₄₇ATRKTS₅₃

40

【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】

【化2】

配列番号 23

²⁹³FRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATL
EEMMTAC₃₅₀

10

【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 : RILAVERYLKDQQLLGIWGSGLICTTAVPWNAS.

20

【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。

30

【0078】

【化4】

配列番号 32 : LNSWGCAFRQVC,

配列番号 33 : RVTAIEKYLQDQARLNSWGCAFRQVCHTTVPWVWVNS.

【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。

40

【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

50

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。

【 0 0 8 1 】

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、「Cap 1 ~ 75 (G34-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 4 : Cap 1 ~ 75 (G34-G44-G47)

【 化 5 】

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄G
VG₄₇ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS₇₅

10

【 0 0 8 2 】

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、「Cap 1 ~ 75 (G34-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 5 : Cap 1 ~ 75 (G31-G44-G47)

【 化 6 】

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄G
VG₄₇ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS₇₅

20

【 0 0 8 3 】

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、「Cap 1 ~ 75 (G36-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 6 : Cap 1 ~ 75 (G36-G44-G47)

【 化 7 】

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YG₃₆LPRRGPRG₄₄G
VG₄₇ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS₇₅

30

【 0 0 8 4 】

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、「Cap 6 ~ 68 (G34-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 7 : Cap 6 ~ 68 (G34-G44-G47)

【 化 8 】

₆KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇AT
RKTSEERSQPRGRRQPIPKA₆₈

40

【 0 0 8 5 】

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、「Cap 6 ~ 68 (G31-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 8 : Cap 6 ~ 68 (G31-G44-G47)

【化 9】

₆KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇AT
RKTSEERSQPRGRRQPIPKA₆₈

【 0 0 8 6 】

アミノ酸 3 6、4 4、及び 4 7 のグリシン残基での置換（配列番号 9、「Cap 6 ~ 6 8 (G36-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 9 : Cap 6 ~ 6 8 (G36-G44-G47)

10

【化 1 0】

₆KPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YG₃₆LPRRGPRG₄₄GVG₄₇AT
RKTSEERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS₇₅

【 0 0 8 7 】

アミノ酸 3 4、4 4、及び 4 7 のグリシン残基での置換（配列番号 1 0、「Cap 1 ~ 5 3 (G34-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 1 0 : Cap 1 ~ 5 3 (G34-G44-G47)

20

【化 1 1】

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄G
VG₄₇ATRKTS₅₃

【 0 0 8 8 】

アミノ酸 3 1、4 4、及び 4 7 のグリシン残基での置換（配列番号 1 1、「Cap 1 ~ 5 3 (G31-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 1 1 : Cap 1 ~ 5 3 (G31-G44-G47)

30

【化 1 2】

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIG₃₁GGV₃₄YL₃₆LPRRGPRG₄₄G
VG₄₇ATRKTS₅₃

【 0 0 8 9 】

アミノ酸 3 6、4 4、及び 4 7 のグリシン残基での置換（配列番号 1 2、「Cap 1 ~ 5 3 (G36-G44-G47) に規定されたペプチド」）：

配列番号 1 2 : Cap 1 ~ 5 3 (G36-G44-G47)

40

【化 1 3】

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGV₃₄YG₃₆LPRRGPRG₄₄G
VG₄₇ATRKTS₅₃

50

【 0 0 9 0 】

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))

【 化 1 4 】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPR}_{44}\text{--}$
 $\text{R}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

【 0 0 9 1 】

骨格長の修飾 :

配列番号 1 4 : Cap 1 ~ 7 5 (G34- A45)

【 化 1 5 】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPR}_{44}$
 $\beta\text{A}_{45}\text{VR}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

式中、 Aは アラニンを示す。

【 0 0 9 2 】

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 ')

【 化 1 6 】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPR}_{44}\text{G}_{45}$
 $\text{G}_{46}\text{G}_{46}\text{R}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

【 0 0 9 3 】

極性の逆転 :

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

【 化 1 7 】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGnL}_{29}\text{G}_{30}\text{V}_{31}\text{GGV}_{34}\text{YL}_{36}\text{LPRRGPR}$
 $\text{G}_{44}\text{GVG}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

式中、 nLはノルロイシンを示す。

【 0 0 9 4 】

アミノ酸置換 :

配列番号 1 7 : Cap 1 ~ 7 5 (G34-F35-G44-G47)

【 化 1 8 】

${}^1\text{MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV}_{31}\text{GGG}_{34}\text{F}_{35}\text{L}_{36}\text{LPRRGPRG}_{44}$
 $\text{VVG}_{47}\text{ATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS}_{75}$

【 0 0 9 5 】

10

20

30

40

50

アミノ酸置換：

配列番号 18 : Cap 1 ~ 75 (G34-hS35-G44-G47)

【化19】

₁MSTNPKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIV₃₁GGG₃₄hS₃₅L₃₆LPRRGPRG₄₄
GVG₄₇ATRKTSERSQPRGRRQPIPKARRPEGRS₇₅

式中、hSはホモセリンを示す。

10

【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。

20

【0097】

【化20】

₂₉₃FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGVKNFMTETLLVQNaNPDCKTILKALGPAATL
EEMMTAC₃₅₀ (配列番号22)

【0098】

30

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-Cap 1 ~ 75 (G34-G44-G47) は、このことに関して特に有利でありうる。

【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：

40

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；

50

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事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：

- 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。

【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、
- 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。

【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

10

20

30

40

50

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。

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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の非構造性タンパク質、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。

40

【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

50

;

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つを認識する前記捕獲及び検出抗体、

【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。

【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

;

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つを認識する前記捕獲及び検出抗体、

【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

10

20

30

40

50

、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。

10

【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；

20

- 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。

30

【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、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。

40

【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

50

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、
c₁)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；

c₂)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、

10

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、
c₁)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；

c₂)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、

20

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。

30

【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。

40

【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ピトープ部位を認識するように選択されている。

50

【 0 1 3 2 】

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】

【 0 1 3 3 】

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。

【 0 1 3 4 】

例：C型肝炎ウイルスによる感染症の検出プロトコール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。

【 0 1 3 5 】

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）。

【 0 1 3 6 】

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。

【 0 1 3 7 】

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）。

【 0 1 3 8 】

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。

【 0 1 3 9 】

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）。

【 0 1 4 0 】

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。

【 0 1 4 1 】

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

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

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)。

10

【 0 1 4 3 】

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H₂O₂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。

【 0 1 4 4 】

4) 停止溶液: 1NのH₂SO₄

20

【 0 1 4 5 】

方法:

プロトコール1a: 試料 (血清又は血しょう) 中のC型肝炎ウイ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。

【 0 1 4 6 】

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 - Cap 1 ~ 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。

30

【 0 1 4 7 】

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。

【 0 1 4 8 】

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。

40

【 0 1 4 9 】

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。

【 0 1 5 0 】

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 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

50

る。

【 0 1 5 1 】

反応媒質を 37 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。

【 0 1 5 2 】

次いで、プレートを、洗浄液（トリスNaClバッファー、0 . 0 1 M、pH7 . 4、0 . 1 % Tween20を補った）を使用して洗浄（3回）する。

10

【 0 1 5 3 】

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 1 0 0 μ l を各杯状体に分配する。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。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。

【 0 1 5 4 】

次いで、プレートを、洗浄液（トリスNaClバッファー、0 . 0 1 M、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。

【 0 1 5 5 】

1 0 0 μ 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 ）で30分に渡り展開させる。

20

【 0 1 5 6 】

次いで、1 0 0 μ l の停止溶液を各杯状体に分配する。

【 0 1 5 7 】

反応が停止した後、光密度を分光光度計により 4 5 0 / 6 2 0 nm で読む。

【 0 1 5 8 】

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。

【 0 1 5 9 】

特異性研究は健常な個体に由来する 1 0 0 0 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 2 0 0 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。

30

【 0 1 6 0 】

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 . 2 8 0 OD (optical density) である。

【 0 1 6 1 】

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、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。

40

【 0 1 6 2 】

プロトコール 1 b：試料（血清又は血しょう）中のC型肝炎ウイ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。

50

【 0 1 6 3 】

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：非構造型領域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。

【 0 1 6 4 】

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1100µl/杯状体の割合でコーティングする。

10

【 0 1 6 5 】

以下の段階は、プロトコール1aと同じである。

【 0 1 6 6 】

プロトコール1c：試料（血清又は血しょう）中のC型肝炎ウイ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。

【 0 1 6 7 】

以下の段階に基づいている：

20

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）並びに非構造型領域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。

30

【 0 1 6 8 】

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1100µl/杯状体の割合でコーティングする。

【 0 1 6 9 】

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。

【 0 1 7 0 】

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。

40

【 0 1 7 1 】

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100µlを、そして50µl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。

【 0 1 7 2 】

反応媒質を37℃で1.5時間に渡りインキュベートする。

【 0 1 7 3 】

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、

50

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。

【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、

10

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。

【0176】

プロトコール1d：試料(血清又は血しょう)中のC型肝炎ウイ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

20

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。

【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110µl/杯状体の割合でコーティングする。

30

【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(0.01M、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。

【0181】

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100µlを、そして50µlの試料(血清又は血しょう)を連続して各杯状体に入れる。

40

【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

50

て結合する。

【0185】

プレート、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100μl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。

10

【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。

20

【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】

30

【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 1a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 ~ 75（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】

30

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

40

50

【 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

【 0 2 0 1 】

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。

30

【 0 2 0 2 】

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。

【 0 2 0 3 】

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）。

40

【 0 2 0 4 】

【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 1 5 及び配列番号 1 4 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、純粋に試験された場合認識された。

【 0 2 0 8 】

10

20

30

40

50

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-Cap 1 ~ 7 5 (G34-G44-G47) による)、1c (配列番号 5 を含むペプチドC-G-G-Cap 1 ~ 7 5 (G31-G44-G47) による) 及び 1d (配列番号 4 を含むペプチドC-G-G-Cap 1 ~ 7 5 (G34-G44-G47)) により試験した。

【 0 2 0 9 】

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。

【 0 2 1 0 】

【表 8】

表 8 :

IMPAT/BBI パネル	HCV RNA検出の第1日目に対する遅れ (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

【 0 2 1 1 】

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 1a及び 1c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）。

【0212】

【表9】

表9：

インパス/ BB1 [®] 礼	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

10

20

30

40

50

たった8日、プロトコール1cについては7.7日、そしてプロトコール1dについては7.4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に由来する血清(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】

20

表10：プロトコール 1a

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】

【表 1 2】

20

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】

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。

40

【 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】

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

50

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）。 10

【0226】

2) 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（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、0.01M、pH7.4、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（0.075M）と酢酸ナトリウム（0.1M）の溶液（pH4.0、0.015%のH₂O₂及び4%のジメチルスルホキシド（DMSO）（PROLABO）を含む）、及び 20

【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0.7mMの最終濃度）。

【0231】

5) 停止溶液：1NのH₂SO₄

【0232】

プロトコールa：抗HIV-1P25抗体の検出の材料

以下の配列：

【化21】 30

配列番号 22

²⁹³FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGVKNFMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATL
EEMMTAC₃₅₀

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 40

【化22】

配列番号 23

²⁹³FRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATL
EEMMTAC₃₅₀

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 50

ペプチド。

【0233】

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。

【0234】

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23】

10

³⁰⁸QASQEVKNWMTETLL₃₂₂ (配列番号24)

を認識する抗P25モノクローナル抗体Pm25。

【0235】

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。

20

【0236】

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24】

配列番号 22

²⁹³FRGYVGRFYKTLRAEQAGQGVKNFMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATL
EEMMTAC₃₅₀

30

に対応する突然変異させた合成ペプチド。

【0237】

下のHIV-1MP25タンパク質の配列 :

【化25】

³⁰⁸QASQEVKNWMTETLL₃₂₂ (配列番号24)

40

を認識するモノクローナル抗体Pm25。

【0238】

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)。

【0239】

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。

【0240】

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

50

るようにした。

【0241】

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基づく。

【0242】

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。

【0243】

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。

【0244】

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。

【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。

【0246】

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。

【0247】

反応媒質を37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。

【0248】

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。

【0249】

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）で30分に渡りインキュベートする。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】

100 µl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、100 µl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 / 620 nmで読む。

【0254】

プロトコールb：HIV-1P25抗原の検出

10

20

30

40

50

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、pH 9.6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110 μ l / 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。

10

【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100 μ 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、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

20

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、pH 9.6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110 μ l / 杯状体の割合でコーティングする。

30

【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】

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。

40

【0265】

80 μ lの第1希釈物を、そして20 μ 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。

【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】

50

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 μ 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。

【0269】

最終段階はプロトコールaと同じである。

【0270】

【表13】

10

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

20

30

【0271】

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。

40

【0272】

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の免疫優占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。

【0273】

50

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。

【 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
- Hosein et al. (1991) PNAS Vol. 88, May, pp. 3647 - 3651
- Icardi et al. (2001) J. Clin. Microbiol., 39, pp. 3110-3114
- Ishida, (1993), J. Clin. Microbiol., Vol. 31, No. 4, pp. 936-940 20
- 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
- Peterson et al. (2000) Vox sanguinis, Vol. 78, pp. 80-85
- Ratner et al. (1985) Nature, 313, pp. 277-284 30
- 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
- Takahashi et al. (1992) J. Gen. Virol., Vol. 73(3), London, pp. 667-672
- Wain-Hobson et al. (1985) Cell, 40, pp. 9-17 40
- 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、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

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

20

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

30

<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

40

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg 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> 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

<400> 4

20

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

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

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

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

<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

10

20

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

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

<400> 8

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

10

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

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

30

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

<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

<400> 12

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

30

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			
	65	70	20
<210> 14 <211> 75 <212> PRT <213> Hepatitis C virus			
<220> <221> MOD_RES <222> (45)..(45) <223> bAla			
<400> 14			
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn			30
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

10

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

20

<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

30

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

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

10

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

20

<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

30

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

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

10

<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

20

<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

30

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

40

<211> 58
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 23

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

Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp 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

10

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

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 24

Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu
 1 5 10 15

20

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 2
 <400> 25

Gln Thr Asp Pro Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln Thr Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 26

30

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

<210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1
 <400> 27

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

10

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

20

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

30

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

<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

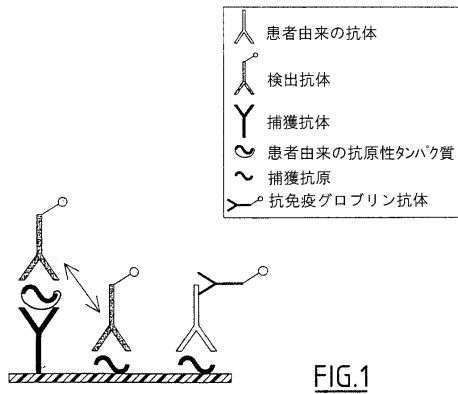
<400> 33

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

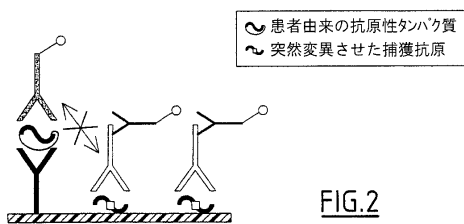
Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr Val Pro Trp
 20 25 30

Val Asn Asp Ser
 35

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/576 (2006.01) G 0 1 N 33/569 L
 G 0 1 N 33/576 Z

(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 パルトー, 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, アブニュ アーネス ブソン, 5

審査官 山中 隆幸

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 9 6 8 7 5 (W O , A 1)

特表 2 0 0 1 - 5 1 4 7 4 9 (J P , A)

特表平 0 6 - 5 0 0 7 9 6 (J P , A)

国際公開第 0 1 / 0 0 4 1 4 9 (W O , A 1)

Virology, 1 9 9 4 年, vol.205, p.462-469

Journal of Virology, 1 9 9 1 年, vol.65, p.1007-1012

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12N15/00-15/90

C07K1/00-19/00

G01N 33/53

G01N 33/543

G01N 33/569

G01N 33/576

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed

Science Direct

JSTPlus(JDreamII)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

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	JP4351153B2	公开(公告)日	2009-10-28
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		
当前申请(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 フェイサギユムリエル 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 フェイサギユ, 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	C12N15/09 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	C12N15/00.ZNA.A C07K14/18 G01N33/53.N G01N33/543.501.D G01N33/569.H G01N33/569.L G01N33/576.Z		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 西山雅也		
审查员(译)	山隆行		
优先权	2002005808 2002-05-10 FR		
其他公开文献	JP2006501151A		
外部链接	Espacenet		

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	⁴⁴ LGVR ⁴⁷ (配列番号19)
mAb 2	IgG2a	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (配列番号20)
mAb 3	IgG1	²⁹ QIVGGV ⁴⁴ (配列番号21)
mAb 4	IgG1	²⁹ QIVGGV ⁴⁴ (配列番号21)
mAb 5	IgG1	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (配列番号20)
mAb 6	IgG1	³⁰ IVGGVYL ³⁶ (配列番号20)