

(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2004-510133

(P2004-510133A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/576
CO 7 K 14/18
CO 7 K 19/00
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19

F I

GO 1 N 33/576 Z N A Z
CO 7 K 14/18
CO 7 K 19/00
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19

テーマコード (参考)

4 B O 2 4
4 B O 6 4
4 B O 6 5
4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 155 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-510948 (P2002-510948)
(86) (22) 出願日 平成13年6月14日 (2001.6.14)
(85) 翻訳文提出日 平成14年12月9日 (2002.12.9)
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/019156
(87) 国際公開番号 W02001/096870
(87) 国際公開日 平成13年12月20日 (2001.12.20)
(31) 優先権主張番号 60/212, 082
(32) 優先日 平成12年6月15日 (2000.6.15)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/280, 811
(32) 優先日 平成13年4月2日 (2001.4.2)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/280, 867
(32) 優先日 平成13年4月2日 (2001.4.2)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591076811
カイロン コーポレーション
アメリカ合衆国, カリフォルニア 946
08, エミリービル, ホートン ストリー
ト 4560
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(72) 発明者 チエン, デイビッド ワイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 945
07, アラモ, ダグラス コート 1
121

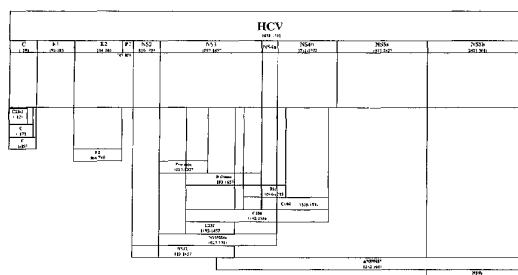
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HCV抗体についてのイムノアッセイ

(57) 【要約】

NS3/4aコンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原を含むHCVイムノアッセイ、ならびにこのイムノアッセイと共に使用するためのイムノアッセイ固体支持体が提供される。本発明は、複数エピトープ融合抗原との組み合わせでのNS3/4aコンホメーションエピトープの使用が、初期のHCVセロコンバージョンを検出するための高感度かつ確実な方法を提供するという知見に一部基づいている。本明細書中で記載されるアッセイはまた、6つの公知のHCV遺伝子型のいずれかによって引き起こされるHCVを検出し得る。複数エピトープ融合タンパク質の使用はまた、マスキングの問題を低減し、基質単位面積当たりのより多数のエピトープを可能にすることによって、抗体の検出における感度を改善し、そして選択性を改善するというさらなる利点を有する。

HCV Genome and Recombinant Proteins



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イムノアッセイ固体支持体であって、本質的に、該支持体に結合する少なくとも 1 つの H C V N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原からなり、ここで、該 N S 3 / 4 a エピトープおよび / または該複数エピトープ融合抗原は、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応する、固体支持体。

【請求項 2】

前記 N S 3 / 4 a エピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

10

【請求項 3】

前記 N S 3 / 4 a エピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 4】

前記 N S 3 / 4 a エピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 5】

前記 N S 3 / 4 a エピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

20

【請求項 6】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 7】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

30

【請求項 8】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 9】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

40

【請求項 10】

イムノアッセイ固体支持体であって、本質的に、該支持体に結合する少なくとも 1 つの H C V N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原からなり、ここで、該 N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープは、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含み、そして該複数エピトープ融合抗原は、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、固体支持体。

【請求項 11】

50

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含み、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載のイムノアッセイ個体支持体。

【請求項 12】

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含み、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載のイムノアッセイ個体支持体。 10

【請求項 13】

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A ~ 3 D に示される前記アミノ酸配列からなり、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示される前記アミノ酸からなる、請求項 10 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 14】

イムノアッセイ固体支持体であって、本質的に、該支持体に結合する少なくとも 1 つの H C V NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原からなり、ここで、該 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープは、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列からなり、そして該複数エピトープ融合抗原は、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列からなる、固体支持体。 20

【請求項 15】

免疫診断試験キットであって、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体、および該免疫診断試験を実施するための指示書を備える、キット。

【請求項 16】

イムノアッセイ固体支持体を作製する方法であって、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；ならびに

(b) 少なくとも 1 つの H C V NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原を該固体支持体に結合する工程、を包含し、ここで、該 NS 3 / 4 a エピトープおよび/または該複数エピトープ融合抗原は、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応する、方法。 30

【請求項 17】

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含み、そして該、複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載の方法。 40

【請求項 18】

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列からなり、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

イムノアッセイ固体支持体を作製する方法であって、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；ならびに

(b) 少なくとも 1 つの H C V NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原を該固体支持体に結合する工程、 50

を包含し、ここで、該 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A ~ 3 D に示されるアミノ酸配列からなり、そして該複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列からなる、方法。

【請求項 20】

複数エピトープ融合抗原であって、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、複数エピトープ融合抗原。

【請求項 21】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 20 に記載の複数エピトープ融合抗原。

10

【請求項 22】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 20 に記載の複数エピトープ融合抗原。

【請求項 23】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A ~ 5 F に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 20 に記載の複数エピトープ融合抗原。

20

【請求項 24】

請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の複数エピトープ融合抗原のコード配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 25】

前記ポリヌクレオチドが、図 5 A ~ 5 F に示される核酸配列、または該核酸配列に少なくとも 80 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項 24 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 26】

前記ポリヌクレオチドが、図 5 A ~ 5 F に示される核酸配列、または該核酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項 24 に記載のポリヌクレオチド。

30

【請求項 27】

前記ポリヌクレオチドが、図 5 A ~ 5 F に示される核酸配列、または該核酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項 24 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 28】

組換えベクターであって、以下：

40

(a) 請求項 24 ~ 27 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド；および

(b) 該ポリヌクレオチドに作動可能に連結された制御エレメントであって、これによって、前記コード配列が、宿主細胞で転写および翻訳され得る、制御エレメント、を含む、組換えベクター。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の組換えベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項 30】

組換え複数エピトープ融合抗原を作製する方法であって、以下：

(a) 請求項 29 に記載の宿主細胞の集団を提供する工程；および

50

(b) 前記組換えベクター中に存在する前記コード配列によってコードされる該複数エピトープ融合抗原が発現される条件下で、該細胞集団を培養する工程を包含する、方法。

【請求項 3 1】

生物学的サンプル中の C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染を検出する方法において使用するための診断試薬を製造するための、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体の使用。

【請求項 3 2】

生物学的サンプル中の C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染を検出する方法であって、該方法は、以下：

10

(a) 請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；

(b) HCV 抗体が生物学的サンプル中に存在する場合に、HCV 抗体が前記 NS 3 / 4 a エピトープおよび / または前記複数エピトープ融合抗原と結合して、第 1 の免疫複合体を形成し得る条件下で、生物学的サンプルを該固体支持体と合わせる工程；

(c) 複合体形成条件下で、工程 (b) からの該固体支持体に、検出可能な標識抗体を添加する工程であって、ここで、該標識抗体が、該免疫複合体と反応する、工程；

(d) 存在する場合、該検出可能な標識抗体と該第 1 の免疫複合体の間で形成された第 2 の免疫複合体を、該生物学的サンプル中の HCV 感染の指標として検出する工程、を包含する、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般的にウイルスの診断に関連する。特に、本発明は、C 型肝炎ウイルス感染を正確に診断するために複数の HCV 抗原を使用するイムノアッセイに関連する。

【0002】

(発明の背景)

C 型肝炎ウイルス (HCV) は、主に輸血および体液交換を介して感染する、非経口の非 A 型肝炎、非 B 型肝炎 (NANBH) の主な原因である。このウイルスは、アメリカ合衆国における総人口の 0.4 ~ 2.0 % に存在する。慢性肝炎は、感染者の 50 % で発症し、そしてこれら感染した個体のおおよそ 20 % が、肝硬変を発症し、これはしばしば肝細胞癌腫を引き起こす。従って、この疾患の研究および制御は、医学的に重要である。

30

【0003】

HCV は、Houghten らによって NANBH の原因として、最初に同定され、そして特徴付けされた。この HCV のウイルスゲノム配列を得るための方法が公知であるのと同様に、この配列も公知である。例えば、国際公開番号 WO 89 / 04669 ; 同 WO 90 / 11089 ; および同 WO 90 / 14436 を参照のこと。HCV は、9.5 kb のポジティブセンス、単鎖 RNA ゲノムを有し、Flaviridae ファミリーウイルスのメンバーである。少なくとも 6 つの別個ではあるが、系統発生分析に基づいてゲノタイプが関連している HCV が、同定されている (Simmonds ら、J. Gen. Vir. 40 (1993) 74 : 2391 ~ 2399)。これらのウイルスは、3000 を超えるアミノ酸残基を有する単一のポリタンパク質をコードする (Choo ら、Science (1989) 244 : 359 ~ 369 ; Choo ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88 : 2451 ~ 2455 ; Han ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88 : 1711 ~ 1715)。ポリタンパク質は、翻訳と同時に、そして翻訳後に、構造タンパク質および非構造 (NS) タンパク質の両方にプロセッシングされる。

40

【0004】

特に、図 1 に示されるように、いくつかのタンパク質は、HCV ゲノムによってコードされる。HCV ポリタンパク質の切断生成物の順番および学名は以下である：NH₂ - C -

50

E 1 - E 2 - P 7 - N S 2 - N S 3 - N S 4 a - N S 4 b - N S 5 a - N S 5 b - C O O H。ポリタンパク質の最初の切断は、3つの構造タンパク質（N末端ヌクレオカプシドタンパク質（「コア」と呼ばれる）ならびに2つのエンベロープ糖タンパク質（「E 1」（Eとしても公知）および「E 2」（E 2 / N S 1としても公知）））ならびにウイルス酵素を含む非構造（N S）タンパク質を遊離する、宿主プロテアーゼによって触媒される。N S領域は、N S 2、N S 3、N S 4、N S 4 a、N S 4 b、N S 5 aおよびN S 5 bと呼ばれる。N S 2は、タンパク質分解活性を有する必須の膜タンパク質である。N S 2は、単独でか、またはN S 3と組み合わせてのいずれかで、N S 2 - N S 3シスル結合を切断し、これは次にN S 3のN末端を生じ、セリンプロテアーゼおよびRNAヘリカーゼの両方の活性を含む大きなポリタンパク質を放出する。N S 3プロテアーゼは、残りのポリタンパク質をプロセシングするために役立つ。ポリタンパク質成熟の終了は、N S 3 - N S 4 aの連結部での自己触媒的切断（N S 3セリンプロテアーゼによって触媒される）によって開始される。引続くH C Vポリタンパク質のN S 3媒介切断は、別のポリペプチドのN S 3分子によるポリタンパク質切断連結部の認識に関連するようである。これらの反応において、N S 3は、N S 3補因子（N S 4 a）、N S 4 bおよびN S 5 a（N S 5 Aはリン酸化機能を有する）、ならびにRNA依存性RNAポリメラーゼ（N S 5 b）を遊離する。

10

【0005】

H C Vに関する免疫学的試薬および診断的試薬として有用なH C Vポリタンパク質由来の多数の一般的なポリペプチドならびに特定のポリペプチドが記載されている。例えば、Houghtonら、欧州公開番号318,216および同388,232; Chooら、Science (1989) 244: 359~362; Kuoralaら、Science (1989) 244: 362~364; Houghtonら、Hepatology (1991) 14: 381~388; Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1992) 89: 10011~10015; Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33~39; Chienら、国際公開番号WO93/00365; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778を参照のこと。これらの出版物は、一般的に、H C VならびにH C Vポリペプチドの免疫学的試薬の製造および使用についての広範な背景を提供する。

20

【0006】

H C V保有者およびH C Vに汚染された血液または血液製剤をスクリーニングおよび同定するための高感度で特異的な方法は、医薬品の重要な進歩を提供する。輸血後肝炎（post-transfusion hepatitis）（PTH）は、輸血された患者のおおよそ10%で発症し、そしてH C Vは、これらの場合の最大90%の原因であった。患者の看護ならびに血液および血液製剤によるか、または緊密な個人的接触によるH C Vの予防および感染についての、確実な診断手段および予後診断手段が必要とされる。従って、いくつかのアッセイがH C V感染の血清診断のために開発されてきた。例えば、Chooら、Science (1989) 244: 359~362; Kuoralaら、Science (1989) 244: 362~364; Chooら、Br. Med. Bull. (1990) 46: 423~441; Ebelingら、Lancet (1990) 335: 982~983; van der Poelら、Lancet (1990) 335: 558~560; van der Poelら、Lancet (1991) 337: 317~319; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778; Valenzuelaら、国際公開番号WO97/44469; ならびにKashiwakumaraら、米国特許第5,871,904号を参照のこと。

30

40

【0007】

血清に基づくいくつかのアッセイが遭遇した重大な問題は、ウイルスの感染と検出との間に有意な間隔（しばしば、80日間を超える）が存在することである。このアッセイの間隔は、輸血レシピエントに対して重大な危険性を生じ得る。この問題を解決するために、直接ウイルスRNAを検出する核酸に基づく試験（NAT）、および抗体応答の代わりに

50

¥にウイルス抗原をアッセイするHCVコア抗原試験が開発された。例えば、Kashiwakumara、米国特許第5,871,904号を参照のこと。

【0008】

しかし、十分な患者の看護を提供し、そして血液および血液製剤によるか、または密接な個人的接触によるHCVの感染を防ぐための高感度で正確な診断手段および予後診断手段の必要性が残っている。

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、複数エピトープ融合抗原との組み合わせでのNS3/4aコンフォメーションエピトープの使用が、初期のHCVセロコンバージョンを検出するための高感度かつ確実な方法を提供するという知見に一部基づいている。本明細書中で記載されるアッセイはまた、6つの公知のHCV遺伝子型のいずれかによって引き起こされるHCVを検出し得る。複数エピトープ融合タンパク質の使用はまた、マスキングの問題を低減し、基質単位面積当たりのより多数のエピトープを可能にすることによって、抗体の検出における感度を改善し、そして選択性を改善するというさらなる利点を有する。

10

【0010】

従って、1つの実施形態において、本発明は、少なくとも1つのHCV NS3/4aのコンフォメーションエピトープおよびそれに結合する複数エピトープ融合抗原から実質的になる、イムノアッセイ固体支持体に関連し、ここでこのNS3/4aエピトープおよび/またはこの複数エピトープ融合抗原は、HCVに感染した個体からの生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体に特異的に反応する。

20

【0011】

NS3/4aエピトープは、その配列がプロテアーゼ活性を有する限りにおいて、図3A~3Dに示されるアミノ酸配列、またはその配列に少なくとも80%の配列同一性、もしくははその配列に90%の配列同一性、もしくははその配列に少なくとも98%の配列同一性、もしくははその間の任意の整数の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、NS3/4aコンフォメーションエピトープは、図3A~3Dに示されるアミノ酸配列からなる。

【0012】

さらなる実施形態において、複数エピトープ融合抗原は、その配列に少なくとも98%の配列同一性、もしくははその配列がHCVに感染した個体由来のサンプル中に存在する抗HCV抗体と特異的に反応する限りにおいて、図5A~5Fに示されるアミノ酸配列、またはその配列に少なくとも80%の配列同一性、もしくははその配列に90%の配列同一性、もしくははその間の任意の整数の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態において、複数の融合エピトープ融合抗原は、図5A~5Fに示されるアミノ酸配列からなる。

30

【0013】

なお別の実施形態において、本発明は、少なくとも1つのHCV NS3/4aコンフォメーションエピトープおよびそれに結合する複数エピトープ融合抗原から実質的になるイムノアッセイ固体支持体に関連し、ここで上記NS3/4aコンフォメーションエピトープは、図3A~3Dに示されるアミノ酸配列、またはその配列に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列(これは、プロテアーゼ活性を有する)を含み、そして上記複数エピトープ融合抗原は、図5A~5Fに示されるアミノ酸配列、またはその配列に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸(これは、HCVに感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体と特異的に反応する)を含む。特定の実施形態において、NS3/4aコンフォメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原は、NS3/4a配列がプロテアーゼ活性を有し、そして複数エピトープ融合抗原が、HCVに感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体に特異的に反応する限りにおいて、図3A~3Dおよび図5A~5Fのアミノ酸配列にそれぞれ少なくとも90%、98%(または、その間の任意の整数)の配列同一性を有する。特定の実施形態に

40

50

において、NS3/4aコンフォメーションエピトープは、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列からなり、そして複数エピトープ融合抗原は、図5A～5Fに示されるアミノ酸配列からなる。

【0014】

別の実施形態において、本発明は、少なくとも1つのHCV NS3/4aコンフォメーションエピトープおよびそれに結合する複数エピトープ融合抗原から実質的になるイムノアッセイ固体支持体に関連し、ここで、上記3/4aコンフォメーションエピトープは、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列からなり、そして上記複数エピトープ融合抗原は、図5A～5Fに示されるアミノ酸配列からなる。

【0015】

なおさらなる実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルス(HCV)感染を検出するための方法に関連し、本方法は、以下の工程を包含する：

(a) 上記のようなイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；

(b) HCV抗体(生物学的サンプル中に存在する場合)が、上記NS3/4aエピトープおよび/または上記複数エピトープ融合抗原との結合するのを可能にする条件下で、生物学的サンプルとこの固体支持体とを組合せて、第一の免疫複合体を形成する工程。

【0016】

(c) 複合体を形成する条件下で、工程(b)からの固体支持体に、検出可能に標識した抗体を添加する工程であって、ここでこの標識された抗体が、上記免疫複合体と反応性である、工程；

(d) 検出可能に標識された抗体と生物学的サンプル中のHCV感染の指標としての第一の免疫複合体(存在する場合)との間に形成される第二の免疫複合体を検出する工程。

【0017】

なおさらなる実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のC型肝炎ウイルス(HCV)感染を検出する方法に関連し、この方法は以下の工程を包含する：

(a) 少なくとも1つのHCV NS3/4aコンフォメーションエピトープおよびそれに結合する複数エピトープ融合抗原から実質的に構成される、イムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、ここで上記NS3/4aコンフォメーションエピトープが、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列から構成され、そして上記複数エピトープ融合抗原が、図5A～5Fに示されるアミノ酸配列から構成される、工程；

(b) HCV抗体(生物学的サンプル中に存在する場合)が、上記NS3/4aエピトープおよび/または上記複数エピトープ融合抗原に結合する条件下で、生物学的サンプルと上記固体支持体とを組み合わせ、第一の免疫複合体を形成する工程；

(c) 複合体を形成する条件下で、工程(b)からの固体支持体に、検出可能に標識された抗体を添加する工程であって、ここでこの標識された抗体は、上記免疫複合体と反応性である、工程。

【0018】

(d) 検出可能に標識された抗体と生物学的サンプル中のHCV感染の指標としての第一の免疫複合体(存在する場合)との間で形成される、第二の免疫複合体を検出する工程。

【0019】

別の実施形態において、本発明は、上記のようなイムノアッセイ固体支持体、および免疫診断試験を実施するための説明書を備える、免疫診断試験キットに関連する。

【0020】

別の実施形態において、本発明は以下を含むイムノアッセイ固体支持体を生成する方法に関連する：

(a) 固体支持体を提供する工程；および

(b) 少なくとも1つのHCV NS3/4aコンフォメーションエピトープと複数エピトープ融合抗原とを固体支持体に結合させる工程であって、ここでこのNS3/4aエピトープおよび/またはこの複数エピトープ融合抗原が、HCVに感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体と特異的に反応する、工程。

10

20

30

40

50

【0021】

特定の実施形態において、コンフォメーションエピトープは、この配列がプロテアーゼ活性を有する限りにおいて、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列、またはその配列に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはその配列に90%の同一性、またはその配列に少なくとも98%の配列同一性、または任意の整数の間の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；そして複数エピトープ融合抗原は、その配列がHCVに感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体と特異的に反応する限りにおいて、図5A～5Fに記載されるアミノ酸配列、またはその配列に少なくとも80%の配列同一性、またはその配列に90%の配列同一性、またはその配列に少なくとも98%の配列同一性、またはその間の任意の整数の間の配列同一性を有する、アミノ酸配列を含む。 10

【0022】

なおさらなる実施形態において、NS3/4aコンホメーションエピトープは、図3A～3Dに記載されるアミノ酸配列からなり、そして複数エピトープ融合抗原は、図5A～5Fに記載されるアミノ酸配列からなる。

【0023】

別の実施形態において、本発明は、イムノアッセイ固体支持体を生成する方法に関し、この方法は、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；および

(b) この固体支持体を、少なくとも1つのHCV NS3/4aコンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合タンパク抗原に結合する工程であって、ここで、このNS3/4aコンホメーションエピトープは、図3A～3Dに記載されるアミノ酸配列からなり、そして、この複数エピトープ融合抗原は、図5A～5Fに記載されるアミノ酸配列からなる。 20

【0024】

なおさらなる実施形態において、本発明は、図5A～5Fに記載されるアミノ酸配列を含む複数エピトープ融合抗原、あるいはそれに対して、少なくとも80%の配列合同同一性を有するか、90%の配列同一性を有するか、または少なくとも98%の配列同一性またはその間の任意の整数の配列同一性を有するアミノ酸配列（この配列は、HCV感染個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体と特異的に反応する）に関する。

【0025】

特定の実施形態において、この複数エピトープ融合抗原は、図5A～5Fに示されるアミノ酸配列からなる。 30

【0026】

他の実施形態において、本発明は、複数エピトープ融合抗原についてのコード配列を含むポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドおよびこのポリヌクレオチドに作動可能に連結された制御エレメントを含む組換えベクター（これによって、コード配列が、宿主細胞において転写および翻訳され得る）、この組換えベクターで形質転換された宿主細胞、ならびに、組換え複数エピトープ融合抗原を作製する方法に関し、この方法は、上記のような宿主細胞の集団を提供する工程およびこの組換えベクター中に存在するコード配列によってコードされる多重エピトープ融合抗原が発現される条件下でこの細胞の集団を培養する工程を包含する。 40

【0027】

本発明のこれらの局面および他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照して、明らかとなる。

【0028】

（発明の詳細な説明）

本発明の実施は、他に示されない限り、当該分野の技術の範囲内の、化学、生化学、組換えDNA技術および免疫学の従来の方法を使用する。このような技術は、文献に完全に説明される。例えば、Fundamental Virology、第2版、I巻およびII巻（B. N. FieldsおよびD. M. Knipe, 編）；Handbook of 50

Experimental Immunology、I - IV 巻 (D. M. Weir および C. C. Blackwell 編、Blackwell Scientific Publications); T. E. Creighton、Proteins: Structures and Molecular Properties (W. H. Freeman and Company、1993); A. L. Lehninger、Biochemistry (Worth Publishers, Inc.、最新添付 (current addition)); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、1989); Methods In Enzymology (S. Colowick および N. Kaplan 編、Academic Press, Inc.)。 10

【0029】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容がそうではないと明らかに示さない限り、複数の参照をも含む。従って、例えば、「抗原」に対する参照は、2以上の抗原の混合物を含む、など。

【0030】

以下のアミノ酸の略語は、この明細書を通して使用される：

アラニン：Ala (A)	アルギニン：Arg (R)
アスパラギン：Asn (N)	アスパラギン酸：Asp (D)
システイン：Cys (C)	グルタミン：Gln (Q)
グルタミン酸：Glu (E)	グリシン：Gly (G)
ヒスチジン：His (H)	イソロイシン：Ile (I)
ロイシン：Leu (L)	リジン：Lys (K)
メチオニン：Met (M)	フェニルアラニン：Phe (F)
プロリン：Pro (P)	セリン：Ser (S)
スレオニン：Thr (T)	トリプトファン：Trp (W)
チロシン：Tyr (Y)	バリン：Val (V)

20

(I. 定義)

本発明を記載する際に、以下の用語が使用され、そして以下に示されるように定義されることが意図される。

【0031】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーをいい。そして生成物の最小長に限定されない。従って、ペプチド、オリゴペプチド、ダイマー、マルチマーなどが、この定義に含まれる。全長タンパク質およびそのフラグメントの両方は、この定義に含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾（例えば、グルコシル化、アセチル化、リン酸化など）を含む。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質の所望の活性が維持される限り、ネイティブな配列に対する、改変（例えば、欠失、付加および置換（天然では、一般に保存的））を含むタンパク質をいう。これらの改変は、部位特異的変異誘発を介してのように意図的であり得るか、またはこのタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅に起因するエラーを介するような、偶発的なものであり得る。 30

【0032】

HCVポリペプチドは、上記のように、HCVポリタンパク質に由来するポリペプチドである。このポリペプチドは、物理的にHCVに由来する必要はないが、合成的にまたは組換え的に生成され得る。さらに、このポリペプチドは、種々のHCV株および単離物のいずれか（例えば、限定されないが、HCVの株1、2、3、4、5または6由来の単離物のいずれか）に由来し得る。多くの保存領域および可変領域が、これらの株で既知であり、そして一般に、これらの領域に由来するエピトープのアミノ酸配列は、2つの配列が整列された場合に、高い程度の配列相同性（例えば、30%より大きい、好ましくは40%より大きいアミノ酸配列相同性）を有する。従って、例えば、用語「NS3/4a」ポリペプチドは、種々のHCV株のいずれかに由来するネイティブなNS3/4a、ならびに 40 50

以下にさらに定義されるようなNS3/4aアナログ、ムテインおよび免疫原性フラグメントをいう。多くのこれらの株の完全な遺伝子型は、公知である。例えば、米国特許第6,150,087号およびGenBank登録番号AJ238800ならびにAJ238799を参照のこと。

【0033】

用語「アナログ」および「ムテイン」は、参照分子の生物学的に活性な誘導体またはこのような誘導体のフラグメント（これらは、本明細書中に記載されるアッセイにおいて免疫反応性のような所望の活性を維持する）をいう。一般に、用語「アナログ」は、改変が免疫原性活性を破壊しない限り、ネイティブ分子に対して、1以上のアミノ酸付加、置換（一般に、天然においては保存される）、および/または欠失を有するネイティブなポリペプチド配列および構造を有する化合物をいう。用語「ムテイン」は、1つ以上のペプチド模倣物（「ペプチド」）を有するペプチドをいい、例えば、国際公開番号WO 91/04282に記載される。好ましくは、このアナログまたはムテインは、ネイティブな分子と少なくとも同じ免疫活性を有する。ポリペプチドアナログおよびムテインを作製するための方法は、当該分野で公知であり、そして以下にさらに記載される。

10

【0034】

特に好ましいアナログは、天然では保存的である置換（すなわち、それらの側鎖が関係するアミノ酸のファミリー内で起こる置換）を含む。具体的に、アミノ酸は、一般的に4つのファミリーに分類される：（1）酸性 - アスパラギン酸およびグルタミン酸；（2）塩基性 - リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性 - アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）無電荷で極性 - グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、しばしば、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンでの、アスパラギン酸のグルタミン酸での、スレオニンのセリンでの単独置換、またはアミノ酸の構造的に関連したアミノ酸の類似の保存的な置換は、生物学的活性に対して、主要な効果は有さないことが、合理的に予測可能である。例えば、目的のポリペプチドは、分子の所望の機能がインタクトなままである限り、約5～10までの保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、もしくは約15～25までの保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、あるいは5～25の間の任意の整数の保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換を有し得る。当業者は、当該分野で周知の、Hopp/WoodsおよびKyte-Doolittleプロットを参照することによって、変化を許容し得る目的の分子の領域を容易に決定し得る。

20

30

【0035】

「フラグメント」は、インタクトな全長ポリペプチド配列および構造の一部のみからなるポリペプチドを意図する。このフラグメントは、ネイティブなポリペプチドのC末端欠失および/またはN末端欠失を含み得る。特定のHCVPタンパク質の「免疫原性フラグメント」は、一般に、全長分子の少なくとも約5～10連続するアミノ酸残基、好ましくは全長分子の少なくとも約15～25連続するアミノ酸残基、および最も好ましくは全長分子の少なくとも約20～50以上連続するアミノ酸残基（これらは、エピトープを規定する）を含み、または5個のアミノ酸と全長配列との間の任意の整数の連続するアミノ酸残基を含むが、ただし、問題のフラグメントは、本明細書中に記載されるアッセイにおいて免疫反応性を保持する。例えば、好ましい免疫原性フラグメントとしては、例えば、ポリタンパク質のアミノ酸10～45、10～53、67～88、および120～130、エピトープ5-1-1（ウイルスゲノムにおけるNS4a/NS4b領域において）、ならびに図1に示されるポリタンパク質の領域のいずれかに由来する規定されたエピトープ（例えば、限定されないが、E1、E2、NS3（例えば、NS3領域由来のポリペプチドc33c）、NS4（例えば、NS3/NS4領域由来のポリペプチドc100）、HCVPポリタンパク質のNS3/4aおよびNS5領域、ならびにHCVPポリタンパク質から同定される他の種々のエピトープのいずれか）を含むHCVコアのフラグメントが挙げられ

40

50

るが、これらに限定されない。例えば、Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chienら、国際公開番号WO 93/00365; Chien、D. Y.、国際公開番号WO 94/01778; 米国特許第6,150,087号および同第6,121,020号を参照のこと。

【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ」は、少なくとも約3~5、好ましくは約5~10または15、および約1000アミノ酸以下（またはこの間の任意の整数のアミノ酸）の配列をいい、これは、それ自体によって、またはより大きな配列の一部として、このような配列に応答して産生される抗体に結合する配列を規定する。フラグメントの長さに臨界的な上限は存在せず、このフラグメントは、ほぼ全長のタンパク質配列、またはHCVポリタンパク質由来の2つ以上のエピトープを含む融合タンパク質でさえ含み得る。本発明における使用のためのエピトープは、これが由来する親タンパク質の一部分の正確な配列を有するポリペプチドに限定されない。実際に、ウイルスゲノムは、一定のフラックスの状態にあり、そして単離物間で比較的高い程度の変異性を示すいくつかの可変領域を含む。従って、用語「エピトープ」は、ネイティブな配列に同一な配列、ならびにネイティブな配列に対する改変（例えば、欠失、付加および置換（一般に、天然においては保存される））を包含する。

【0037】

エピトープを含む所定のポリペプチドの領域は、当該分野で公知の、任意の数のエピトープマッピング技術を使用して、同定され得る。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻（Glenn E. Morris編、1996）Humana Press、Totowa、New Jerseyを参照のこと。例えば、線状エピトープは、例えば、多数のペプチド（これらのペプチドは、タンパク質分子の一部分に対応する）を固体支持体上で同時に合成し、そしてこれらのペプチドを固体支持体になおも付着させつつ、これらのペプチドを抗体を反応させることによって決定され得る。これらの技術は、当該分野で公知であり、そして以下に記載される：米国特許第4,708,871号; Geysenら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysenら(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182; Geysenら(1986) Molec. Immunol 23:709-715。このような技術を使用して、HCVの多くのエピトープが同定されている。例えば、Chienら、Viral Hepatitis and Liver Disease (1994) 320-324頁、およびさらに以下を参照のこと。同様に、コンホメーションエピトープは、例えば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴によって、アミノ酸の空間的立体配座を決定することによって容易に決定され得る。例えば、Epitope Mapping Protocols（前出）を参照のこと。タンパク質の抗原性領域はまた、標準的な抗原性および疎水性親水性指標プロット（例えば、Oxford Molecular Groupから入手可能なOmega version 1.0ソフトウェアプログラムを使用して計算されたもの）を使用して、同定され得る。このコンピュータプログラムは、抗原性プロフィールを決定するためのHopp/Woods法（Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824-3828）、および疎水性親水性指標プロットのためのKyte-Doolittle技術（Kyteら、J. Mol. Biol. (1982) 157:105-132）を使用する。

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「コンホメーションエピトープ」とは、全長の天然のタンパク質内の、エピトープをコードするアミノ酸配列にネイティブな構造的特徴を有する、全長タンパク質、またはそのアナログまたはムテインの一部をいう。ネイティブな構

造的特徴としては、グリコシル化および三次元構造が挙げられるが、これらに限定されない。エピトープ規定配列の長さは、幅広い変動に供され得る。なぜなら、これらのエピトープは、抗原の三次元形状（例えば、折り畳み）によって形成されると考えられるからである。従って、エピトープを規定するアミノ酸は、比較的少ない数であり得るが、分子の長さに沿って幅広く分散し得、折り畳みにより正確なエピトープコンフォメーションにされる。エピトープを規定する残基間の抗原の部分は、エピトープのコンフォメーションな構造に重要ではなくてもよい。例えば、これらの介在する配列の欠失または置換は、エピトープのコンフォメーションに重要な配列（例えば、ジスルフィド結合に關与するシステイン、グリコシル化部位など）が維持される限り、コンホメーションエピトープに影響しなくともよい。

10

【0039】

NS3/4a領域に存在するコンホメーションエピトープは、上で議論される方法を使用して容易に同定される。さらに、所与のポリペプチドにおけるコンホメーションエピトープの存在または非存在は、抗体（コンホメーションエピトープに対するポリクローナル血清またはモノクローナル血清）を用いて目的の抗原をスクリーニングし、そしてその反応性を線形のエピトープのみ（存在する場合）を保持する変性版の抗原の反応性と比較することによって容易に決定され得る。ポリクローナル抗体を使用するこのようなスクリーニングにおいて、ポリクローナル血清を、最初に変性抗原を用いて吸収し、そして目的の抗原に対する抗体を保持するか否かを観測することが有利であり得る。さらに、NS3/4aの場合において、ネイティブなコンフォメーションを保存する分子は、プロテアーゼ酵素活性そして必要に応じて、ヘリカーゼ酵素活性を有する。このような活性は、以下にさらに記載されるように、酵素アッセイを使用して、検出され得る。

20

【0040】

好ましくは、コンホメーションエピトープは、組換え的に産生され、そして、例えば、エピトープの変性なしにその所望の造的特徴を保存する条件下で抽出可能である細胞において発現される。このような細胞としては、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞が挙げられる。HCVポリタンパク質からの組換えコンホメーションエピトープの発現および単離は、例えば、国際公開番号WO96/04301、WO94/01778、WO95/33053、WO92/08734に記載される。あるいは、抗原を発現し、そしてさらに、回収の後にタンパク質を再生することが可能である。化学合成によつてまた、「ネイティブ」な抗原のコンホメーションエピトープと交差反応するコンフォメーション抗原ミミトープ（mimotope）が提供され得ることがまた理解される。

30

【0041】

本明細書中で使用される場合、用語「複数エピトープ融合抗原」または「MEFA」は、複数のHCV抗原がアミノ酸の単一の連続した鎖の一部であるポリペプチドを意図し、この鎖は、天然に存在しない。HCV抗原は、ペプチド結合によって互いに直接的に結合され得るか、または介在するアミノ酸配列によって分離され得る。融合抗原はまた、HCVポリタンパク質に対して外来性の配列を含み得る。さらに、存在するHCV配列は、複数のゲノム型由来であり得、そして/またはHCVの単離体であり得る。本発明のイムノアッセイにおける使用のための特定のMEFAの例は、例えば、国際公開番号WO97/44469に詳細に記載され、そして以下にさらに記載される。

40

【0042】

「抗体」は、化学的手段または物理的手段によって、目的のポリペプチドに特異的に結合する分子を意図する。従って、例えば、HCVコア抗体は、HCVコアタンパク質に特異的に結合する分子である。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、ポリクローナル調製物およびモノクローナル調製物の両方、ならびに以下：ハイブリッド（キメラ）抗体分子（例えば、Winterら（1991）Nature 349:293~299；および米国特許番号第4,816,567号を参照のこと）；F(ab')₂フラグメントおよびF(ab)フラグメント；Fv分子（非共有結合ヘテロダイマー、例えば、Inbarら（1972）Proc Natl Acad Sci USA 69:2659

50

～ 2662 ; および Ehrlich ら (1980) Biochem 19 : 4091 ~ 4096 を参照のこと) ; 単鎖 Fv 分子 (sFv) (例えば、Houston ら (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85 : 5879 ~ 5883 を参照のこと) ; 二量体および三量体の抗体フラグメント構築物 ; ミニ体 (minibodies) (例えば、Pack ら (1992) Biochem 31 : 1579 ~ 1584 ; Cumber ら (1992) J Immunology 149 B : 120 ~ 126 を参照のこと) ; ヒト化抗体分子 (例えば、Riechmann ら (1988) Nature 332 : 323 ~ 327 ; Verhoeven ら (1988) Science 239 : 1534 ~ 1536 ; および 1994 年 9 月 21 日に公開された英国特許公開番号 GB 2, 276, 169 を参照のこと) ; ならびに、このような分子から得られる任意の機能性フラグメントから得られる抗体を含み、ここで、このようなフラグメントは、親の抗体分子の免疫学的結合特性を保持する。 10

【0043】

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル分子」とは、均一な抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、抗体の種または供給源に関して限定されず、それが作製される方法によっても限定されることを意図しない。従って、この用語は、マウスハイブリドーマから得た抗体、ならびにマウスハイブリドーマよりもむしろヒトを使用して得たヒトモノクローナル抗体を包含する。例えば、Cote ら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, p. 77 を参照のこと。 20

【0044】

「単離された」とは、ポリペプチドをいう場合、示された分子が、その分子が天然に見出される生物全体から分離され、そして別々であるか、または同じ型の他の高分子の実質的な非存在下で存在することを意味する。ポリヌクレオチドに関して、用語「単離された」は、天然においてそのポリヌクレオチドと通常関連する配列の全てまたは一部を欠いた核酸分子 ; または天然で存在するが、その配列に関連する異種配列を有する配列 ; または染色体から解離した分子である。

【0045】

「等価な抗原決定基」とは、HCV の異なる亜種または株 (例えば、HCV の株 1、2 または 3) 由来の抗原決定基を意味する。より詳細には、エピトープ (例えば、5 - 1 - 1) が、公知であり、そしてこのようなエピトープは、株 1、2 および 3 の間で変わる。従って、3 つの異なる株由来のエピトープ 5 - 1 - 1 は、等価な抗原決定基であり、従って、たとえそれらの配列が同一でないとしても、「コピー」である。一般的に、等価な抗原決定基のアミノ酸配列は、2 つの配列が整列された場合、高い程度の配列相同性 (例えば、30 % より大きい、好ましくは 40 % より大きい、アミノ酸配列相同性) を有する。 30

【0046】

「相同性」とは、2 つのポリヌクレオチド部分または 2 つのポリペプチド部分の間の類似性の割合をいう。2 つの DNA または 2 つのポリペプチド配列は、これらの配列が、規定された長さの分子にわたって、少なくとも約 50 %、好ましくは少なくとも約 75 %、より好ましくは少なくとも約 80 % ~ 85 %、好ましくは少なくとも約 90 %、そして最も好ましくは少なくとも約 95 % ~ 98 % の配列類似性を示す場合、互いに「実質的に相同」である。本明細書中で使用される場合、実質的に相同はまた、特定の DNA 配列またはポリペプチド配列に対して完全な同一性を示す配列をいう。 40

【0047】

一般的に、「同一性」とは、2 つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列それぞれの正確なヌクレオチド - ヌクレオチドの対応またはアミノ酸 - アミノ酸の対応をいう。同一性の割合は、それらの配列を整列させ、2 つの整列された配列の間の一致の正確な数を数え、短い方の配列の長さによって割り、そして結果に 100 を掛けることによる、2 つの分子間の配列情報の直接的な比較によって決定され得る。

【0048】

容易に入手可能なコンピュータプログラム（例えば、ALIGN, Dayhoff, M. O., Atlas of Protein Sequence and Structure M. O. Dayhoff 編、補遺 5、3:353~358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC（これは、ペプチド分析のために、Smith および Waterman Advances in Appl. Math. 2:482~489, 1981 の局所的相同性アルゴリズムを適合させる））は、相同性または同一性の分析を助けるために使用され得る。ヌクレオチド配列相同性を決定するためのプログラム（例えば、BESTFIT、FASTA および GAPP プログラム（これらもまた、Smith および Waterman のアルゴリズムに依存する））は、Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group, Madison, WI から入手可能) において入手可能である。これらのプログラムは、製造業者によって推奨され、そして上に参照される Wisconsin Sequence Analysis Package に記載されるデフォルトパラメーターを用いて容易に使用される。例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列の相同性の割合は、6 つのヌクレオチド位置のデフォルトスコアリングテーブルおよびギャップペナルティーを用いて Smith および Waterman の相同性アルゴリズムを使用して決定され得る。

【0049】

本発明の状況において相同性の割合を確立する別の方法は、University of Edinburgh による著作権があり、John F. Collins および Shane S. Sturrock によって開発され、IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA) によって配給されるプログラムの MPSRCH パッケージを使用することである。この一そろいのパッケージから、Smith-Waterman アルゴリズムを使用し得、ここで、デフォルトパラメーターは、スコアリングテーブルのために使用される（例えば、12 のギャップオープンペナルティー、1 のギャップ伸長ペナルティー、および 6 のギャップ）。生成されるデータから、「一致」値が「配列相同性」を反映する。配列間の同一性の割合または相同性の割合を計算するための他の適切なプログラムは、当該分野において一般的に公知であり、例えば、別の整列プログラムは、デフォルトパラメーターとともに使用される BLAST である。例えば、BLASTN および BLASTP は、以下のデフォルトパラメーターを使用して用いられ得る：遺伝子コード = 標準；フィルター = なし；鎖 = 両方；カットオフ = 60；期待値 = 10；マトリクス (Matrix) = BLOSUM62；記載 (Descriptions) = 50 配列；ソート = HIGH SCORE；データベース (Database) = 縮重なし、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Snpupdate + PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスにおいて見出され得る：<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>。

【0050】

あるいは、相同性は、相同な領域間に安定な二重鎖を形成する条件下でのポリペプチドのハイブリダイゼーション、続いて、単鎖特異的ヌクレアーゼでの消化、および消化されたフラグメントのサイズの決定によって決定され得る。実質的に相同である DNA 配列は、その特定の系について規定されるように、例えばストリンジェントな条件下で、サザンハイブリダイゼーション実験で同定され得る。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当該分野の技術の範囲内である。例えば、Sambrook ら、上記；DNA Cloning 上記；Nucleic Acid Hybridization、上記を参照のこと。

【0051】

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コード」する配列は、適切な調節配列の制御下に配置される場合、インビトロまたはインビボで、転写され (DNA の場合)、

ポリペプチドに翻訳される (mRNA の場合) 核酸分子である。コード配列の境界は、5' (アミノ) 末端における開始コドンおよび 3' (カルボキシ) 末端における翻訳終止コドンによって決定される。転写終結配列は、コード配列の 3' 側に配置され得る。

【0052】

「作動可能に連結される」とは、そのように記載される成分が、それらの所望の機能を実行するように構成されるエレメントの配置をいう。従って、コード配列に作動可能に連結される所与のプロモーターは、適切な転写因子などが存在する場合、コード配列の発現をもたらし得る。プロモーターは、コード配列の発現を指示するように機能する限り、コード配列と連続である必要はない。従って、例えば、介在する、翻訳されないが転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得 (イントロンは転写され得る)、プロモーター配列は、なお、コード配列に「作動可能に連結される」と考えられ得る。

10

【0053】

核酸分子を記載するために本明細書中で使用される場合、「組換え体」は、その起源または操作により、天然に付随するポリヌクレオチドのうちの全てまたは一部を付随しない、ゲノム、cDNA、ウイルス、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意味する。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される場合、用語「組換え体」は、組換えポリヌクレオチドの発現によって産生されるポリペプチドを意味する。一般的に、目的の遺伝子は、以下にさらに記載のように、クローン化され、次いで、形質転換された生物において発現される。宿主生物は、発現条件下で外来遺伝子を発現してタンパク質を産生する。

20

【0054】

「制御エレメント」とは、それが連結するコード配列の発現を助けるポリヌクレオチド配列をいう。この用語は、プロモーター、転写終結配列、上流調節ドメイン、ポリアデニル化シグナル、非翻訳領域 (5' - UTR および 3' - UTR を含む)、ならびに適切な場合、リーダー配列およびエンハンサー (これらは、集合的に、宿主細胞においてコード配列の転写および翻訳を提供する) を含む。

【0055】

本明細書中で使用される場合、「プロモーター」は、宿主細胞において RNA ポリメラーゼを結合し得、それに作動可能に連結される下流の (3' 方向) コード配列の転写を開始し得る DNA 調節領域である。本発明の目的のために、プロモーター配列は、バックグラウンドよりも上の検出可能なレベルで目的の遺伝子の転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列には、転写開始部位、ならびに RNA ポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン (コンセンサス配列) がある。真核生物プロモーターは、しばしば、常にではないが、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。

30

【0056】

制御配列は、RNA ポリメラーゼがプロモーター配列に結合し、mRNA にコード配列を転写する場合、細胞においてコード配列の「転写を指示し」、次いで、この mRNA は、コード配列によってコードされるポリペプチドに翻訳される。

【0057】

「発現カセット」または「発現構築物」とは、目的の配列または遺伝子の発現を指向し得るアセンブリをいう。この発現カセットは、上記のような制御エレメント (例えば、目的の配列または遺伝子に (これらの転写を指向するように) 作動可能に連結されプロモーター) を含み、そしてしばしば、同様に、ポリアデニル化配列を含む。本発明の特定の実施形態において、本明細書中に記載される発現カセットは、プラスミド構築物内に含まれ得る。この発現カセットの構成成分に加えて、このプラスミド構築物はまた、1 種以上の選択マーカー、このプラスミド構築物が単鎖 DNA として存在することを可能にするシグナル (例えば、M13 の複製起点)、少なくとも 1 ヶ所のマルチクローニングサイト、および「哺乳動物」の複製起点 (例えば、複製の SV40 起点またはアデノウイルス起点) を含み得る。

40

50

【 0 0 5 8 】

本明細書中で使用される「形質転換」とは、挿入のために使用される方法（例えば、直接的な取り込み、トランスフェクション、感染などによる形質転換）に係わらず、外因性ポリヌクレオチドの宿主細胞への挿入をいう。トランスフェクションの特定の方法については、以下をさらに参照のこと。外因性ポリヌクレオチドは、組み込まれていないベクター（例えば、エピソーム）として維持され得るか、または宿主ゲノムに組み込まれ得る。

【 0 0 5 9 】

「宿主細胞」とは、外因性 DNA 配列によって、形質転換された細胞、または形質転換され得る細胞をいう。

【 0 0 6 0 】

本明細書中で使用される「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された組織または流体のサンプルをいい、このサンプルは、一般に、被験体によって産生された抗体を含む。このような抗体を含む代表的なサンプルは、当該分野で公知であり、そして以下が挙げられるが、これらに限定されない：血液、血漿、血清、糞便、尿、骨髓、胆汁、髄液、リンパ液、皮膚のサンプル、皮膚、気道、腸管、および尿生殖路の分泌物、涙、唾液、乳汁、血球、器官、生検材料、ならびにまた培養培地（例えば、組換え細胞、および細胞成分）中での細胞および組織の増殖から得られる馴化培地を含むがこれに限定されないインビトロ細胞培養構築物のサンプル。

10

【 0 0 6 1 】

「共通の固体支持体」とは、被験体のイムノアッセイにおいて使用される HCV ポリペプチドが、共有結合または疎水性吸着のような非共有結合手段で結合している、単一の固体基質をいう。

20

【 0 0 6 2 】

「免疫学的反応」とは、目的の抗原が、HCV に感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 HCV と特異的に反応することを意味する。

【 0 0 6 3 】

「免疫複合体」とは、抗体が抗原上でエピトープに結合する場合に形成される組み合わせを意図する。

【 0 0 6 4 】

本明細書中で使用される場合、用語「標識」および「検出可能な標識」とは、以下を含むが、これらに限定されない検出可能な分子をいう：放射活性同位元素、蛍光剤、化学ルミネッセンサー（chemiluminescer）、発光団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素インヒビター、発光団、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン（streptavidin）またはハプテン）など。用語「発光団」とは、検出可能な範囲で、蛍光を示し得る物質またはその一部をいう。本発明において使用され得る標識の特定の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセイン、FITC、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、ジメチルアクリジニウムエステル（DMAE）、Texas Red、ルミノール、NADPH および α - β - ガラクトシラーゼ。

30

【 0 0 6 5 】

（ II . 発明の実施の形態 ）

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、特定の式に限定されず、プロセスパラメータ自体は、当然、変化し得ることが理解されなければならない。本明細書中で使用される技術が、本発明の特定の実施形態に記載する目的のみのためであり、限定することを意図しないことが理解されなければならない。

40

【 0 0 6 6 】

本明細書中に記載される組成物および方法と類似しているかまたは等価の、多数の組成物および方法が、本発明の実施に使用され得るが、好ましい材料および方法は、本明細書中に記載されている。

【 0 0 6 7 】

50

上記のように、本発明は、初期HCV感染を正確に検出するための、新規の診断方法の発見に基づく。本発明の方法は、高度に免疫原性のHCV抗原の同定および使用に依存し、このHCV抗原は、HCVのセロコンバージョンの初期段階中に存在し、これによって、検出精度を上昇させ、そして誤った結果の発生を減少させる。特に、本明細書中に記載されるイムノアッセイは、同一または異なるいずれかのHCV遺伝子型および単離型(isolate)由来の、HCVポリタンパク質のNS3/4a領域から誘導される高度に免疫原性のコンホメーションエピトープ、および種々のHCVポリペプチドを含む複数のエピトープ融合抗原(例えば、複数の免疫優性エピトープ(例えば、HCVコア、E1、E2、NS3、5-1-1、c100-3およびNS5配列の主に線状エピトープ))を利用する。これらの方法は、以下に記載される数種のアッセイ形態(例えば、HCV抗原が結合する固体支持体を利用するアッセイ形態を含むが、これらに限定されない)のいずれかを使用する、単一のアッセイにより従来から実施され得る。

10

【0068】

HCVポリタンパク質のNS3/4a領域が記載されており、このアミノ酸配列およびこのタンパク質の全体構造は、例えば、Yaoら、Structure(1999年11月)7:1353-1363;Saliら、Biochem.(1998)37:3392-3401;およびBartenschlager,R.,J.Viral Hepat.(1999)6:165-181に開示されている。また、Dasmahapatraら、米国特許第5,843,752号を参照のこと。本発明のイムノアッセイは、天然に存在するHCV粒子またはその感染産物において見出されるようなコンホメーション中に存在する、NS3/4a領域由来の少なくとも1種類のコンホメーションエピトープを利用し、プロテアーゼ、必要に応じて、NS3/4a遺伝子産物によって通常示されるヘリカーゼ酵素活性および/またはHCV感染被験体由来の生物学的サンプル中での抗原と抗体との免疫活性の保持、ならびに抗原の変性におけるエピトープ免疫活性の減少によって明らかとなる。例えば、このコンホメーションエピトープは、加熱、極度に酸性または塩基性のpHの変化によって、または公知の有機変性(例えば、ジチオトレイトール(DTT)または適切な界面活性剤)を添加することによって崩壊され得る。例えば、Protein Purification Methods, a practical approach(E.L.V.HarrisおよびS.Angal編、IRL Press)、上記のように処理されない産物と比較される変性産物を参照のこと。

20

30

【0069】

プロテアーゼ活性およびヘリカーゼ活性は、当該分野で周知の標準的な酵素アッセイを使用して決定され得る。例えば、プロテアーゼ活性は、以下の実施例において記載される手順の使用、および当該分野で周知のアッセイの使用により決定され得る。例えば、Takeshitara、Anal.Biochem.(1997)247:242-246;Kakiuchiら、J.Biochem.(1997)122:749-755;Saliら、Biochemistry(1998)37:3392-3401;Chora、J.Virology Meth.(1998)72:109-115;Cerretaniら、Anal.Biochem.(1999)266:192-197;Zhangら、Anal.Biochem(1999)270:268-275;Kakiuchiら、J.Viol.Meth.(1999)80:77-84;Fowlerら、J.Biomol.Screen.(2000)5:152-158;およびKimら、Anal.Biochem.(2000)284:42-48を参照のこと。同様に、ヘリカーゼ活性アッセイは、当該分野で周知であり、そしてNS3/4aエピトープのヘリカーゼ活性は、例えば、以下を使用して決定され得る:例えば、Hsuら、Biochem.Biophys.Res.Comm.(1998)253:594-599に記載されるようなELISAアッセイ;Kyonoら、Anal.Biochem.(1998)257:120-126に記載されるようなシンチレーション近接アッセイ系(proximity assay system);例えば、Hichamら、Antiviral Res.(2000)46:181-193およびKwongら、Methods Mol.

40

50

Med. (2000) 24: 97 - 116 に記載されるようなハイスループットスクリーニングアッセイ; ならびに当該分野で公知の他のアッセイ方法。例えば、Khura、J. Virol. (2001) 75: 205 - 214; Utamaら、Virology (2000) 273: 316 - 324; Paoliniら、J. Gen. Virol. (2000) 81: 1335 - 1345; Preugschattr、Biochemistry (2000) 39: 5174 - 5183; Preugschattr、Methods Mol. Med. (1998) 19: 353 - 364; ならびにHessonら、Biochemistry (2000) 39: 2619 - 2625 を参照のこと。

【0070】

抗原の長さは、免疫反応性コンホメーションエピトープ (conformational epitope) を維持するのに十分である。しばしば、使用される抗原を含むポリペプチドは、ほとんど全長であるが、このポリペプチドはまた、例えば、可溶性を増加させるためか、または分泌を改善するために切断され得る。一般に、NS3/4a 中に見出されるコンホメーションエピトープは、細胞中で組換えポリペプチドとして発現され、そしてこのポリペプチドは、以下で詳細に記載されるような所望の形態のエピトープを提供する。

【0071】

NS3/4a ポリペプチドに関する代表的なアミノ酸配列は、図3A~3Dに示される。この図の2位~686位に示されるアミノ酸配列は、HCV-1のアミノ酸の1027位~1711位に対応する。Metをコードする開始コドン(ATG)は、1位として示される。さらに、HCV-1の1428位(図3のアミノ酸の403位)に通常存在するThrは、Proに変異され、HCV-1の1429位(図3のアミノ酸の404位)に通常存在するSerは、Ileに変異される。しかし、このエピトープが、プロテアーゼ活性および必要に応じてヘリカーゼ活性が保持されるように、そのネイティブコンホメーションを保持または回復する方法を使用して産生される限り、N末端にMetを有するか、もしくは有さないネイティブ配列、N末端にMetを有するか、もしくは有さない描写アナログ(dipicted analog)、または他のアナログおよびフラグメントのいずれかは、本発明のアッセイにおいて使用され得る。Dasmahapatraら、米国特許第5,843,752号およびZhangら、米国特許第5,990,276号(これらの両方は、NS3/4aのアナログを記載する)。

【0072】

NS3/4aのNS3プロテアーゼは、HCV-1に対して番号付けされた約1027位~約1207位(図3の2位~182位)(例えば、Chooら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451 - 2455を参照のこと)において見出される。NS3プロテアーゼの構造および活性部位は、公知である。例えば、De Francescoら、Antivir. Ther. (1998) 3: 99 - 109; Kochら、Biochemistry (2001) 40: 631 - 640を参照のこと。通常、耐性であるネイティブ配列に対する変化は、分子の活性部位の以外の変化である。特に、図3のアミノ酸1位~155位または2位~155位を保持し、ほとんど置換されないか、または保存的置換のみされることが所望される。155を超えて存在するアミノ酸は、より大きな変化に耐性である。さらに、図3に見出されるNS3/4a配列のフラグメントが使用される場合、これらのフラグメントは、一般に、N末端にMetを有するか、または有さない、少なくともアミノ酸1位~155位または2位~155位、好ましくは、アミノ酸1位~175位または2位~175位、そして最も好ましくは、アミノ酸1位~182位または2位~182位を含む。このヘリカーゼドメインは、HCV-1の約1193位~約1657位(図3の207位~632位)に見出される。従って、ヘリカーゼ活性が所望される場合、この分子の位置は、ほとんど変化しないか、または保存的变化のみされた状態で維持される。当業者は、NS3/4aの既知の構造に基づく変化に耐える他の領域を容易に決定し得る。

【0073】

本明細書中で記載されるイムノアッセイはまた、国際公開番号W O 9 7 / 4 4 4 6 9 に記載されるような、複数のエピトープ融合抗体（「M E F A」と呼ばれる）を利用する。このようなM E F Aは、図1および表1に示されるH C Vポリタンパク質の種々のウイルス領域のうち2種以上から誘導される複数のエピトープを含む。特に、図1および表1に示されるように、H C Vポリタンパク質の切断により、N H₂ - コア - E 1 - E 2 - p 7 - N S 2 - N S 3 - N S 4 a - N S 4 b - N S 5 a - N S 5 b - C O O Hのオーダーで、少なくとも10個の異なる産物を産生する。このコアポリペプチドは、H C V - 1に対して番号付けされた、1位～191位に存在する（H C V - 1ゲノムに関して、C h o oら（1991）P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 88:2451-2455を参照のこと）。このポリペプチドは、さらに、アミノ酸約1位～約173位を含むH C Vポリペプチドを産生するように処理される。このエンベロープポリペプチド（E 1およびE 2）は、それぞれ、約192位～約383位および約384位～約746位に存在する。P 7ドメインは、約747位～約809位に見出される。N S 2は、タンパク質分解性を有する完全な膜タンパク質であり、そしてこのポリタンパク質の約810位～約1026位に見出される。N S 2は、単独か、またはN S 3（約1027位～約1657位に見出される）と組み合わせてかのいずれかで、N S 2 - N S 3単結合（s i s s l e b o n d）を切断し、次に、N S 3 N末端を生成し、そしてセリンプロテアーゼ活性およびR N Aヘリカーゼ活性の両方を含む大きなポリタンパク質を放出する。このN S 3プロテアーゼ（約1027位～約1207位に見出される）は、残りのポリタンパク質を処理するのに役立つ。ヘリカーゼ活性は、約1193位～約1657位に見出される。ポリタンパク質の成熟の完了は、N S 3セリンプロテアーゼにより触媒される、N S 3 - N S 4 a結合の自己触媒による切断より開始される。H C Vポリタンパク質の続くN S - 3媒介切断は、別のポリペプチドのN S 3分子による、ポリタンパク質の切断部の認識に参与するようである。これらの反応において、N S 3は、N S 3補因子（約1658位～約1711位に見出されるN S 4 a）、2個のタンパク質（約1712位～約1972位に見出されるN S 4 b、および約1973位～約2420位に見出されるN S 5 a）、ならびにR N A依存性R N Aポリメラーゼ（約2421位～約3011位に見出されるN S 5 b）を遊離する。

10

20

【0074】

【表1】

30

表1	
ドメイン	概算の境界 *
C(1J)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

10

20

* H C V - 1 に対して番号付けられている。C h o o r a (1 9 9 1) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 2 4 5 1 - 2 4 5 5 を参照のこと。

【 0 0 7 5 】

複数の H C V 抗原は、鎖が天然には存在しないアミノ酸の単一の連続した鎖の一部である。従って、エピトープの線形順序は、エピトープが生じるゲノムにおけるそれらの線形順序とは異なる。本明細書中における使用のための M E F A の配列の線形順序は、好ましくは、最適な抗原性のために配置される。好ましくは、これらのエピトープは、1つより多い H C V 株由来であり、従って、1つのアッセイで複数の H C V 株を検出する付加能力を提供する。従って、本明細書中における使用のための M E F A は、上記のポリタンパク質由来の様々な免疫原性領域を含み得る。さらに、このポリタンパク質のコア領域におけるフレームシフトから生じるタンパク質（例えば、国際公開番号 W O 9 9 / 6 3 9 4 1 に記載されるようなタンパク質）は、M E F A において使用され得る。所望ならば、H C V ポリタンパク質由来の1つ以上のエピトープの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、またはそれ以上は、融合タンパク質中で生じ得る。

30

40

【 0 0 7 6 】

例えば、例えば、E 2 の超可変領域（例えば、アミノ酸 3 8 4 ~ 4 1 0 または 3 9 0 ~ 4 1 0 にわたる領域）由来のエピトープは、M E F A 抗原に含まれ得る。特に有効な E 2 エピトープは、この領域由来のコンセンサス配列（例えば、コンセンサス配列 G l y - S e r - A l a - A l a - A r g - T h r - T h r - S e r - G l y - P h e - V a l - S e r - L e u - P h e - A l a - P r o - G l y - A l a - L y s - G l n - A s n（これは1型 H C V ゲノムのアミノ酸 3 9 0 ~ 4 1 0 のコンセンサス配列を表す））を含むエピトープである。本発明の M E F A に存在する代表的な E 2 エピトープは、アミノ酸 3 9 0 ~ 4 4 4 にわたるハイブリッドエピトープを含み得る。このようなハイブリッド E 2 エピトープは、H C V E 2 のアミノ酸 4 1 1 ~ 4 4 4 のネイティブのアミノ酸配列に融合したアミノ酸 3 9 0 ~ 4 1 0 を表すコンセンサス配列を含み得る。

【 0 0 7 7 】

さらに、抗原は、様々な H C V 株由来であり得る。H C V の複数のウイルス株が公知であり、そしてこれらの株のいずれか由来のエピトープは、融合タンパク質において使用され得る。生物体の任意の所定の種は、個々の生物体ごとに異なり、さらにウイルスのような

50

所定の生物体は多数の異なる株を有することが周知である。例えば、上で説明されたように、HCVは、少なくとも6個の遺伝型を含む。これらの遺伝型の各々は、等価な抗原決定基を含む。より詳細には、各株は、ウイルスの全ての株に存在するが、ウイルス株ごとにわずかに異なる多数の抗原決定基を含む。例えば、HCVは、5-1-1として公知の抗原決定基を含む(図1を参照のこと)。この特定の抗原決定基は、HCVの3つの異なるウイルス株上で3つの異なる形態で現れる。従って、本発明の好ましい実施形態において、5-1-1の3つ全ての形態は、目的のイムノアッセイにおいて使用される複数エピトープ融合抗原上に現れる。同様に、異なるHCV株のコア領域由来の等価な抗原決定基がまた存在する。一般的に、等価な抗原決定基は、アミノ酸配列に関して高度な相同性を有し、この相同性の程度は、整列された場合、一般に30%以上、好ましくは40%以上である。本発明の多コピーエピトープはまた、同じエピトープの正確なコピーである複数のコピーを含み得る。

10

【0078】

図4および6A~6Cは、本発明における使用のための、HCV由来の代表的なMEFAを示す。しかし、HCVゲノム由来の他のエピトープもまた本発明のアッセイを用いる用途を見出すことが理解されるべきである。

【0079】

代表的な複数エピトープ融合抗原であるMEFA 7.1のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、図5A~5Fに示す。MEFA 7.1の一般構造式は、図4に示され、そして以下のとおりである：hSOD-E1(タイプ1)-E2 HVRコンセンサス(タイプ1a)-E2 HVRコンセンサス(タイプ1および2)-ヘリカーゼ(タイプ1)-5-1-1(タイプ1)-5-1-1(タイプ3)-5-1-1(タイプ2)-c100(タイプ1)-NS5(タイプ1)-NS5(タイプ1)-コア(タイプ1+2)-コア(タイプ1+2)。この多コピーエピトープは、HCV-1に関して番号付けされた以下のアミノ酸配列を含む(以下に記載されるアミノ酸配列の番号付けは、Chooら(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455で提供される番号付けの指示に従い、ここでアミノ酸#1は、コア領域のコード配列によりコードされる1番目のメチオニンである)：スーパーオキシドジスムターゼ(SOD、タンパク質の組換え発現を促進するために使用される)のアミノ酸1~156；E1領域由来のポリタンパク質のアミノ酸303~320；HCV-1a E2の超可変領域のコンセンサス配列を表すポリタンパク質のアミノ酸390~410；HCV-1およびHCV-2のE2超可変領域のコンセンサス配列を表す、領域E2由来のポリタンパク質のアミノ酸384~414；ヘリカーゼを規定するHCV-1ポリタンパク質のアミノ酸1193~1658；5-1-1のアミノ酸1689~1735由来のエピトープの3つのコピー(1つはHCV-1由来であり、1つはHCV-3由来であり、そして1つはHCV-2由来であり、これらのコピーは、HCVの3つの異なるウイルス株由来の等価な抗原決定基である)；HCV-1のHCVポリペプチドC100である、ポリタンパク質のアミノ酸1901~1936；HCV-1のNS5領域由来のエピトープの2つの正確なコピー(この各々はHCVポリタンパク質のアミノ酸2278~2313を有する)；およびコア領域由来のエピトープの2つのコピー(1つはHCV-1由来であり、1つはHCV-2由来であり、これらのコピーは、HCV-1のアミノ酸9~32、39~42および64~88、ならびにHCV-2のアミノ酸67~84により表される等価な抗原決定基である)。

20

30

40

【0080】

表2は、本明細書中の図5A~5Fを参照して、様々なエピトープのアミノ酸位置を示す。

【0081】

【表2】

表 2. MEFA 7.1				
mefa aa#	5' 末端部位	エピトープ	hcv aa#	株
1-156	<i>Nco</i> 1	hSOD		
159-176	<i>Eco</i> R1	E1	303-320	1
179-199	<i>Hind</i> 111	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
200-230		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1+2
231-696	<i>Sal</i> 1	ヘリカーゼ	1193-1658	1
699-745	<i>Sph</i> 1	5-1-1	1689-1735	1
748-794	<i>Nru</i> 1	5-1-1	1689-1735	3
797-843	<i>Cla</i> 1	5-1-1	1689-1735	2
846-881	<i>Ava</i> 1	C100	1901-1936	1
884-919	<i>Xba</i> 1	NS5	2278-2313	1
922-957	<i>Bgl</i> 11	NS5	2278-2313	1
958-1028	<i>Nco</i> 1	コア エピトープ	9-32, 39-42 64-88 67-84	1 1 2
1029-1099	<i>Bal</i> 1	コア エピトープ	9-32, 39-42, 64-88 67-84	1 1 2

図 2 に示される本発明の一実施形態において、迅速な捕獲リガンドイムノアッセイを、NS3/4a 由来のコンホメーションエピトープおよび 1 つ以上の複数エピトープ融合抗原（例えば、MEFA 7.1）を使用して実施する。サンプルを、以下にさらに記載されるようにして、抗原（これは固体支持体上に存在し得る）と合わせる。このサンプルが HCV に感染している場合、この固体支持体上に存在するエピトープに対する HCV 抗体は、固体支持体成分に結合する。検出は、検出マーカー（例えば、図 2 に示されるような西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP））の抗原/抗体複合体のメンバーへの結合による。結合は、共有結合的手段により得るか、または続く検出可能に標識された抗体の結合（例えば、標準的なサンドイッチアッセイ）により得るか、または酵素反応（この反応の生成物が検出可能である）により得る。検出マーカーとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：発色団、抗体、抗原、酵素、酵素反応化合物（この切断生成物が検出可能である）、ローダミンまたはローダミン誘導体、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、蛍光化合物、化学発光化合物（例えば、ジメチルアクリジニウムエステル（DMAE、Ciba Corning Diagnostics Corp.））、これらのマーカーの誘導体および/または組み合わせ。検出可能に標識した抗ヒト抗体（存在するヒト IgG 分子を検出し得る）は、都合良く使用され得る。

【0082】

本発明のさらなる理解のために、イムノアッセイおよびこのイムノアッセイを行う方法において使用するためのポリペプチドの生成に関してより詳細な考察が以下に提供される。

【0083】

(HCVイムノアッセイにおける使用のための抗原の生成)

上で説明したように、本発明の分子は、一般に、組換え的に生成される。従って、本発明と共に使用するための、HCV抗原をコードするポリヌクレオチドは、分子生物学の標準的な技術を使用して作製され得る。例えば、上記の分子をコードするポリヌクレオチド配列は、組換え方法を使用して(例えば、この遺伝子を発現する細胞由来のcDNAおよびゲノムライブラリをスクリーニングすることによって、またはこの遺伝子を含むことが知られているベクターから遺伝子を誘導することによって)得られ得る。さらに、所望の遺伝子は、当該分野(例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号)に記載される技術を使用して、ウイルス核酸分子から直接単離され得る。目的の遺伝子はまた、クローン化よりむしろ合成的に生成され得る。これらの分子は、特定の配列について適切なコドンを用いて設計され得る。次いで、完全配列は、標準的な方法により調製される重複オリゴヌクレオチドから構築され、そして完全コード配列に構築される。例えば、Edge(1981)Nature 292:756; Nambairら(1984)Science 223:1299; およびJayら(1984)J. Biol. Chem. 259:6311を参照のこと。

10

【0084】

従って、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を保有するベクターから得られ得るか、または当該分野で公知の様々なオリゴヌクレオチド合成技術(例えば、適切な場合、部位特異的変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR))を使用して、完全にもしくは部分的に合成され得る。例えば、Sambrook、(前出)を参照のこと。特に、所望の配列をコードするヌクレオチド配列を得る1つの方法は、従来の自動化ポリヌクレオチド合成機で生成される重複合成オリゴヌクレオチドの相補的なセットをアニーリングし、続いて適切なDNAリガーゼで連結し、そしてPVRによりこの連結したヌクレオチド配列を増幅することによるものである。例えば、Jayaramanら、(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4081~4088を参照のこと。さらに、オリゴヌクレオチド指向型合成(Jonesら(1986)Nature 54:75~82)、既存のヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド指向型変異誘発(Reichmannら(1988)Nature 332:323~327、およびVerhoeveら(1988)Science 239:1534~1536)、およびT₄DNAポリメラーゼを使用するギャップオリゴヌクレオチド(gapped oligonucleotide)の酵素充填(enzymatic filling-in)(Queenら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029~10033)を本発明で使用して、改変されたかもしくは増大された抗原結合能力、および/または減少した免疫原性を有する分子を提供し得る。

20

30

【0085】

一旦、コード配列が調製または単離されると、このような配列は、任意の適切なベクターまたはレプリコンにクローン化され得る。多数のクローニングベクターが当業者に公知であり、そして適切なクローニングベクターの選択が可能である。適切なベクターとしては、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体または適切なコントロールエレメントと会合した場合に複製し得るウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0086】

次いで、コード配列は、発現のために使用される系に依存して、適切なコントロールエレメントの制御下に置かれる。従って、このコード配列は、プロモータ、リボソーム結合部位(細菌の発現のため)、および必要に応じて、オペレーターの制御下に置かれ、その結果、目的のDNA配列は、適切な形質転換体によってRNAに転写される。このコード配列は、シグナルペプチドまたはリーダー配列(これは後に、翻訳後プロセッシングにおいて、宿主によって除去され得る)を含んでも含まなくても良い。例えば、米国特許第4,431,739号; 同第4,425,437号; 同第4,338,397号を参照のこと。

50

【0087】

制御配列に加えて、宿主細胞の増殖に関連した配列の発現の調節を可能にする調節配列を加えることが所望であり得る。調節配列は、当業者に公知であり、そして例としては、調節化合物を含む、化学的刺激または物理的刺激に対してオンまたはオフにされる遺伝子の発現を引き起こすものが挙げられる。他の型の調節エレメントはまた、ベクター中に存在し得る。例えば、エンハンサーエレメントは、構築物の発現レベルを増加するために本明細書中で使用され得る。例としては、SV40初期遺伝子エンハンサー (Dijkemaら (1985) EMBO J. 4:761)、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復 (LTR) に由来するエンハンサー/プロモーター (Gormanら (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777) およびヒトCMVに由来するエレメント (Boshartら (1985) Cell 41:521) (例えば、CMVイントロンA配列に含まれるエレメント (米国特許第5,688,688)) が挙げられる。発現カセットはさらに、適切な宿主細胞において自律的に複製するための複製起点、1つ以上の選択マーカー、1つ以上の制限部位、高いコピー数についての可能性および強力なプロモーターを含む。

10

【0088】

発現ベクターは、特定のコード配列が適切な制御配列と共にベクター中に位置するように構築され、制御配列に対するコード配列の位置および配向は、コード配列が制御配列の「制御」下で転写されるように存在する (すなわち、制御配列のDNA分子に結合するRNAポリメラーゼは、コード配列を転写する)。目的の分子をコードする配列の改変は、この目的を達成するために所望である。例えば、いくつかの場合において、適切な配向で配列が制御配列に付着するように (すなわち、リーディングフレームを維持するように) 配列を改変することが必要であり得る。制御配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入の前にコード配列に連結され得る。あるいは、コード配列は、制御配列および適切な制限部位をすでに含む発現ベクターに直接クローニングされ得る。

20

【0089】

上に説明されるように、目的の抗原の変異体またはアナログを生成することが所望であり得る。これは、特にNS3/4aに当てはまる。そうするための方法は、例えば、Dasmahapatraら、米国特許第5,843,752号およびZhangら、米国特許5,990,276号において記載されている。目的のアッセイにおける使用のためのこのHCVタンパク質および他のHCVタンパク質の変異体またはアナログは、配列の挿入によって、そして/または配列内での1つ以上のヌクレオチドの置換によって、目的のポリペプチドをコードする配列の一部を欠失することによって調製され得る。ヌクレオチド配列を改変するための方法 (例えば、部位特異的変異誘発など) は、当該分野で公知である。例えば、Sambrookら、前出; Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoderら (1987) BioTechniques 5:786; ZollerおよびSmith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbie-McFarlandら (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409を参照のこと。

30

40

【0090】

分子は、昆虫系、哺乳動物系、細菌系、ウイルス系および酵母系を含む広範な種々の系において発現され得、これらは全て当該分野で公知である。

【0091】

例えば、昆虫細胞発現系 (例えば、バキュロウイルス系) は、当業者に公知であり、そして例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) において記載されている。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料および方法は、特に、Invitrogen, San Diego CA (「MaxBac」キット) から市販されている。同様に、細菌および哺乳動物細胞発現系は、当該分野で周知で

50

あり、そして例えば、Sambrookら、前出、において記載されている。酵母発現系はまた、当該分野で公知であり、そして例えば、Yeast Genetic Engineering (Barrら編、1989) Butterworths, Londonにおいて記載されている。

【0092】

上の系を用いる使用のための多数の適切な宿主細胞がまた公知である。例えば、哺乳動物細胞株は、当該分野で公知であり、そして例えば、チャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞、HeLa細胞、乳児ハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎細胞 (COS)、ヒト胚腎細胞、ヒト肝細胞癌細胞 (例えば、Hep G2)、Madin-Darbyウシ腎 (「MDBK」) 細胞、およびその他を含むがこれらに限定されない、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な不死化細胞株を含む。同様に、E. coli、Bacillus subtilis、およびStreptococcus spp. のような細菌宿主において、本発明の構築物を用いる用途を見出す。本発明において有用な酵母宿主としては特に、Saccharomyces cerevisiae、Candida albicans、Candida maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、Pichia guilliermondii、Pichia pastoris、Schizosaccharomyces pombeおよびYarrowia lipolyticaが挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターを用いる使用のための昆虫細胞としては特に、Aedes aegypti、Autographa californica、Bombyx mori、Drosophila melanogaster、Spodoptera frugiperdaおよびTrichoplusia niが挙げられる。

【0093】

目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、当該分野で周知の遺伝子送達技術を使用して、宿主細胞ゲノムに安定に組み込まれ得るか、または適切な宿主細胞中の安定なエピソームエレメント上に維持され得る。例えば、米国特許第5,399,346号を参照のこと。

【0094】

選択される発現系および宿主に依存して、分子は、タンパク質が発現される条件下で、上記の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を増殖することによって生成される。次いで、発現されたタンパク質は、宿主細胞から単離され、そして精製される。発現系が、タンパク質を増殖培地中に分泌する場合、生成物は、培地から直接精製され得る。生成物が分泌されない場合、生成物は細胞溶解物から単離され得る。適切な増殖条件および回収方法の選択は、当該分野内である。

【0095】

上記の複数エピトープ融合タンパク質において使用される抗原を含む、種々のHCV抗原の生成が、記載されている。例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号および同第5,683,864号; Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33-39; Chienら、国際公開番号WO93/00365; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778; Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011-10015; Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778; および共有に係る、特許になった米国特許出願番号08/403,590および同08/444,818を参照のこと。

【0096】

(免疫診断アッセイ)

一旦生成されると、HCV抗原は、抗体を見出すための公知の抗原を使用する事実上任意のアッセイ形式で使用され得る。これらのアッセイの全ての共通の特徴は、抗原が成分中に存在する任意のこのような抗体に結合するのを可能にする条件下で、抗原が、HCV

抗体を含むことが疑われている身体成分と接触されることである。このような条件は、代表的に、過剰の抗原を使用する際の生理学的温度、pHおよびイオン強度である。抗原の試料とのインキュベーションの後、この抗原からなる免疫複合体が検出される。

【0097】

イムノアッセイの設計は、たくさんのバリエーション、および当該分野で公知の多数の形式に供される。プロトコルは、例えば、固体支持体または免疫沈降を使用し得る。多数のアッセイは、標識された抗体またはポリペプチドの使用を含む；この標識は、上に詳細に議論されるように、例えば、酵素学的標識、蛍光標識、化学発光標識、放射活性標識、または色素分子標識であり得る。免疫複合体由来のシグナルを増幅するアッセイもまた公知である；これらの例は、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイ、および酵素標識媒介イムノアッセイ（例えば、ELISAアッセイ）である。

10

【0098】

イムノアッセイは、制限することなく、異種形式または同種形式、および標準型または競合型の異種形式または同種形式であり得る。異種形式において、ポリペプチドは、代表的に、インキュベーション後にポリペプチドからのサンプルの分離を容易にするために、固体マトリクスまたは固体支持体に結合される。本発明の目的のための固体支持体は、不溶性マトリクスである任意の物質であり得、そして硬式または半硬式の表面を有し得る。例示的な固体支持体としては、ニトロセルロースのような基板（例えば、膜またはマイクロタイターウェル形態）；ポリ塩化ビニル（例えば、シートまたはマイクロタイターウェル）；ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズまたはマイクロタイタープレート）；フッ化ビニリデン；ジアゾ化紙；ナイロン膜；活性化ビーズ；磁気反応性樹脂などが挙げられるがこれらに限定されない。特定の支持体としては、プレート、ペレット、ディスク、キャピラリー、中空系、針、ピン、固体線維、セルロースビーズ、孔-ガラスビーズ、シリカゲル、ジビニルベンゼンと必要に応じて架橋したポリスチレンビーズ、グラフトされたコポリ（co-poly）ビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、N-N'-ビス-アクリロイルエチレンジアミンと必要に応じて架橋したジメチルアクリルアミドビーズ、および疎水性ポリマーでコーティングしたガラス粒子が挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0099】

所望な場合、固体支持体に付加される分子は、スチレン部分またはアクリル部分を作製するために機能化され得る。従って、ポリスチレン、ポリアクリレート、またはポリイミド、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリビニル、ポリジアセチレン、ポリフェニレン-ビニレン、ポリペプチド、多糖類、ポリスルホン、ポリピロール、ポリイミダゾール、ポリチオフェン、ポリエステル、エポキシ、シリカガラス、シリカゲル、シロキサン、ポリリン酸塩、ヒドロゲル、アガロース、セルロースなどの他のポリマーの取り込みを可能にする。

30

【0100】

1つの状況において、固体支持体は、分子が十分に支持体に固定されるように、適切な結合条件下で、まずHCV抗原（本明細書中で集団的に「固相成分」と呼ばれる）と反応される。時々、支持体への固定は、より優れた固相結合特性を有するタンパク質への抗原および/または抗体を最初に結合することによって強化され得る。適切な結合タンパク質としては、ウシ血清アルブミン（BSA）を含む血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシニアン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、卵白アルブミンのような高分子、および当業者に周知の他のタンパク質を含むがこれらに限定されない。支持体に分子を結合するために使用され得る他の試薬としては、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー状アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどが挙げられる。このような分子および抗原にこれらの分子を結合させる方法は、当業者に周知である。例えば、Brinkley, M. A. (1992) Bioconjugate Chem. 3: 2-13; Hashidaら (1984) J. Appl. Biochem. 6: 56-63; ならびにAnjaneyuluおよびStaros (1987) International J. of P

40

50

peptide and Protein Res. 30: 117-124 を参照のこと。

【0101】

固体支持体を固相成分と反応させた後、任意の非固定固相成分を、洗浄することによって支持体から取り除き、次いで支持体結合成分は、適切な結合条件下で HCV 抗体（本明細書中で集合的に「リガンド分子」と呼ばれる）を含むことが疑われている生物学的サンプルと接触される。HCV 抗体がサンプル中に存在する場合、これらは、HCV 抗原と複合体を形成する。非結合リガンド分子を取り除くための洗浄後、検出可能に標識された抗異種（例えば、抗ヒト）抗体（これは、抗 HCV 抗体上のエピトープを認識する）が添加される。これらの抗体は、複合体形成に起因して結合する。

【0102】

同種形式で、試験サンプルは、溶液中の抗原の組み合わせと共にインキュベートされる。例えば、これは、形成される任意の抗原 - 抗体複合体を沈澱させる条件下であり得る。同種アッセイについての標準形式および競合形式の両方がまた、当該分野で公知である。

【0103】

標準形式において、抗体 - 抗原複合体を形成する HCV 抗体の量は、直接的にモニターされる。これは、抗 HCV 抗体上のエピトープを認識する標識された抗異種（例えば、抗ヒト）抗体が、複合体形成に起因して結合するか否かを決定することによって達成され得る。競合形式において、サンプル中の HCV 抗体の量は、複合体中の標識された抗体（または他の競合リガンド）の既知の量の結合に与える競合的影響をモニタリングすることによって推定される。

【0104】

より詳細には、抗 HCV 抗体を含む形成された複合体（または、競合アッセイの場合、競合する抗体の量）は、形式に依存して、多数の公知の技術のいずれかによって検出される。例えば、複合体中の未標識の HCV 抗体は、標識（例えば、酵素標識）と複合体化した抗異種 Ig の結合体を使用して検出され得る。免疫沈降または凝集アッセイ形式で、HCV 抗原と抗体との間の反応は、溶液または懸濁液から沈澱するネットワークを形成し、そして沈澱物の可視層またはフィルムを形成する。抗 HCV 抗体が試験サンプル中に存在しない場合、可視沈澱物は形成されない。

【0105】

上記アッセイ試薬（結合抗体および抗原と共にイムノアッセイ固体支持体を含む）ならびに捕獲されたサンプルと反応する抗体および抗原は、上記のイムノアッセイを行なうために、適切な説明書および他の必要な試薬と共に、キット中に提供され得る。このキットは通常、別々の容器に、抗原の組み合わせ（固体マトリクスにすでに結合しているかまたは抗原をそのマトリクスに結合させるための試薬を伴って別々に）、コントロール抗体処方物（陽性および/または陰性）、標識抗体（アッセイ形式が同一物を必要とする場合）、およびシグナル生成試薬（例えば、酵素基質）（標識がシグナルを直接生成しない場合）を含む。アッセイを実行するための説明書（例えば、書類、テープ、VCR、CD-ROM など）は通常、キットに含まれる。キットはまた、使用される特定のイムノアッセイに依存して、他のパッケージ化試薬および物質（すなわち、洗浄緩衝液など）を含み得る。標準イムノアッセイ（上記のようなアッセイ）は、これらのキットを使用して行なわれ得る。

【0106】

（III. 実験）

以下は、本発明を実行するための特定の実施形態の例である。本実施例は、例示目的のみのために提供され、そして本発明の範囲をいずれにも限定することは意図されない。

【0107】

使用した数値（例えば、量、温度など）に関して精度を確実にするための努力がなされたが、いくつかの実験誤差および偏差は、当然許容されるべきである。

【0108】

（実施例 1）

10

20

30

40

50

(M E F A 7 および M E F A 7 . 1 の構築)

以下の実施例は、複数の H C V エピトープのポリタンパク質カセットの調製を示す。複数エピトープのカセットから発現されるポリタンパク質を、本明細書中において、複数エピトープ融合抗原 (M E F A) と称する。好ましくは、エピトープが反復される場合、超過のコピーは、同じ方向に縦列方向で配置される。エピトープとして使用されるウイルスコード配列の領域は、わずかに変化され、なおかつ抗原性活性を保持し得ること、ならびにアミノ酸の番号付けの指定が種間で変化し得ることが、理解される。従って、反復エピトープは、種配列バリエーションおよび/または番号付けの指定に起因して、一方のエピトープのアミノ酸配列と他方のエピトープのアミノ酸配列が変化し得る。好ましくは、M E F A 内の反復エピトープのアミノ酸配列は、アミノ酸レベルで少なくとも 30 % の相同性であり、より好ましくはアミノ酸レベルで少なくとも 40 % の相同性である。

10

【 0 1 0 9 】

特有の制限酵素部位を導入して、規定された順番でエピトープを連結し、そしてキメラ抗原の設計において改変を促進することによって、本発明の有用性を増強した。制限酵素部位およびクローニング手順の選択は、組換え D N A 技術の当業者によって容易に決定される。好ましくは、エピトープ連結部 (クローニングに起因してエピトープ間で作製されるアミノ酸配列) は、非特異的エピトープを生成しない。非特異的エピトープは、例えば、天然では H C V エピトープに隣接して存在しない非 H C V 配列である。非特異的エピトープは、偽陽性のアッセイ結果を引き起こす試験サンプル中の抗体に結合し得る。好ましくは、複数エピトープ融合タンパク質を、エピトープ連結部において生じるそのような配列に起因する偽陽性結果について試験する。連結配列に起因する M E F A との非特異的相互作用を回避するために、連結部をコードする D N A 配列を、例えば、変異アミノ酸配列との非特異的相互作用が減少され、そしてエピトープフラグメントのクローニングが可能になるように、変異し得る。

20

【 0 1 1 0 】

H C V M E F A 7 発現カセットおよび H C V M E F A 7 . 1 発現カセットを、図 4 に示すように縦列配置で、主要なエピトープを含むコードヌクレオチド配列をクローニングすることによって、構築した。主要なエピトープは、エピトープへの抗体反応頻度および抗体反応強度 (力価) に基づいて選択した (C h e i n , D . Y . ら (1 9 9 4) V i r a l H e p a t i t i s a n d L i v e r D i s e a s e , 3 2 0 - 3 2 4 頁) 。 H C V エピトープをコードする種々の D N A セグメントを、P C R 増幅または合成オリゴヌクレオチドによって構築した。各セグメントのアミノ酸は、上記の表 2 および図 5 A ~ 5 F に示す。完全 H C V - 1 アミノ酸配列 (3 0 1 1 アミノ酸) を、C h o o ら (1 9 9 1) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 2 4 5 1 - 2 4 5 5 によって決定した。H C V に結合し得るオリゴヌクレオチドは、米国特許第 5 , 3 5 0 , 6 7 1 号に記載される。本発明のエピトープ中のアミノ酸の番号付けは、C h o o ら (前出) によって提供される番号付けの指定に従い、ここで、アミノ酸番号 1 は、他に特定しない限り、コア領域のコード配列によってコードされる最初のメチオニンである。例えば、N S 5 由来の 1 つのエピトープセグメントは、H C V ポリタンパク質のアミノ酸 2 2 7 8 ~ 2 3 1 3 によって表される。E 1 領域由来のエピトープは、H C V - 1 ポリタンパク質に関して番号付けられたアミノ酸 3 0 3 ~ 3 2 0 によって表される。

30

40

【 0 1 1 1 】

M E F A 7 および M E F A 7 . 1 は、各々、H C V - 1、H C V - 2 および H C V - 3 由来のエピトープを含み、単一アッセイにおける複数の型のウイルスの検出を可能にする。H C V 血清型を決定する方法は、W O 9 6 / 2 7 1 5 3 に見出される。例えば、5 - 1 - 1 領域由来のエピトープは、H C V の血清型間で変化することが見出されている。本明細書中に記載される M E F A 中に存在する H C V 型特異的 5 - 1 - 1 エピトープの各々のコピーは、試験生物学的サンプル中に存在し得る H C V 型のいずれかの結合を可能にする。

【 0 1 1 2 】

50

M E F A 7 構築物および M E F A 7 . 1 構築物を、酵母発現ベクターの p B S 2 4 . 1 を用いて、*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* 中での発現のために遺伝子操作した。この酵母発現ベクターの p B S 2 4 . 1 は、酵母における自律複製のための 2 μ 配列および酵母遺伝子 *l e u 2 - d* および選択マーカーとしての U R A 3 を含む。細菌中でのプラスミド複製に必要とされる β - ラクタマーゼ遺伝子および C o l E 1 複製起点もまた、この発現ベクター中に存在した。M E F A 7 のための酵母発現ベクター (p s . M E F A 7) を、最初に構築した。引き続いて、M E F A 7 . 1 抗原をコードするプラスミド p s . M E F A 7 . 1 を作製するために、このプラスミドの H C V コアエピトープについてのコード領域を改変した。

【 0 1 1 3 】

詳細には、図 7 A ~ 7 D に示されるように、M E F A 7 についての酵母発現プラスミドを、以下のように構築した。最初に、1 8 9 6 b p の B a m H I / H i n d I I I (A D H 2 / G A P D H ハイブリッドプロモーター、h S O D (アミノ酸 1 ~ 1 5 6)、続いて E 1 エピトープ (アミノ酸 3 0 3 ~ 3 2 0、H C V 1 系) をコードする) を、国際公開番号 W O 9 7 / 4 4 4 6 9 に記載されるように、p s . M E F A 6 (M E F A 6 をコードする発現プラスミド) から単離した。次に、2 6 9 b p の H i n d I I I / S p h I 合成 DNA フラグメント (E 2 H V R 1 a コンセンサスエピトープ (アミノ酸 3 9 0 ~ 4 1 0、H C V - 1)、E 2 H V R 1 + 2 コンセンサスエピトープ (アミノ酸 3 8 4 ~ 4 1 4、H C V 1 + 2) およびヘリカーゼドメインの 5' 末端 (アミノ酸 1 1 9 3 ~ 1 2 2 9、H C V - 1) についてのコード配列を含む) を作製した。1 2 6 4 b p の S p h I / E c l X I フラグメント (ヘリカーゼドメインの残りをコードする (アミノ酸 1 2 3 0 ~ 1 6 5 1、H C V - 1) を、p T a c 5 / H e l I プラスミド DNA からゲル精製した。H i n d I I I / S p h I 合成 DNA フラグメントおよび S p h I / E c l X I の 1 2 6 4 b p フラグメントを、ベクターの p S P 7 2 n e w . H i n d I I I / E c l X I ベクターに連結して、p S P 7 2 n e w . H i n d I I I / E c l X I / e 2 ヘリカーゼを生成した。このベクターは、p S P 7 2 由来の P r o m e g a , M s d i s o n , W I から市販される E . c o l i ベクターである (G e n B a n k / E M B L 登録番号 X 6 5 3 3 2 を参照のこと)。詳細には、いくつかの M E F A 7 エピトープのサブクロニングを容易にするために、新規マルチクロニングサイト (M C S) ポリリンカーを、合成オリゴを介して、p S P 7 2 の S p h I 部位および B g l I I 部位の間に導入した。この M C S 中に特有の部位を有する新規プラスミド (p S P 7 2 n e w と命名する) を、H i n d I I I および E c l X I (E a g I としても公知である) を用いて消化した。次いで、これを脱リン酸化し、そしてゲルで精製した。

【 0 1 1 4 】

E . c o l i H B 1 0 1 コンピテント細胞を、このプラスミドを用いて形質転換し、1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを含む L u r i a ゲルプレートにプレートした。所望のクローンを、ミニプレップ DNA 分析を用いて同定した。配列確認の後、プラスミド p S P 7 2 n e w . H i n d I I I / E c l X I / e 2 . ヘリカーゼ サブクローン番号 4 を、H i n d I I I および E c l X I (E a g I) を用いて消化し、1 5 3 4 b p のフラグメントを作製した。H i n d I I I / E c l X 1 フラグメントを、ゲル精製し、そしてヘリカーゼドメインの最後の最後のアミノ酸 (アミノ酸 1 6 5 1 ~ 1 6 5 8、H C V - 1) をコードする E c l X I / S p h I オリゴヌクレオチドと共に、p G E M 7 H i n d I I I / S p h I ベクターに連結した。H B 1 0 1 コンピテント細胞を、形質転換し、L u r i a - アンピシリン (1 0 0 μ g / m l) 上にプレートした。所望のクローンの同定および配列確認の後、p G E M 7 H i n d I I I / S p h I サブクローン番号 9 を、H i n d I I I および S p h I で消化して、1 5 6 0 b p のフラグメントを作製し、これを、ゲルで精製した (図 7 A を参照のこと)。

【 0 1 1 5 】

M E F A 7 の 3' 末端部分を組み立てるために、以下の工程を実行した。H C V - 1、H C V - 3 および H C V - 2 (この順番で) の 5 - 1 - 1 エピトープ (アミノ酸 1 6 8 9

10

20

30

40

50

～1735)を、p s . M E F A 6 (M E F A 6 をコードする発現プラスミド) (国際公開番号 W O 97/44469 に記載される) から、441bp の S p h I / A v a I フラグメントとしてゲル精製した。このフラグメントを、c100 エピトープ (アミノ酸 1901～1936) をコードする合成 A v a I / X b a I オリゴヌクレオチドをと共に、p S P 7 2 n e w . S p h I / X b a I ベクターに連結した。H B 101 の形質転換、クローンの同定、および配列の確認後、p S P 7 2 n e w S X i サブクローン番号6を、X b a I および N o t I で消化し、p S P 7 2 n e w . X b a I / N o t I ベクターを調製した。さらに、N S 5 エピトープ (アミノ酸 2278～2313、H C V - 1) の二重反復をコードする 221bp の X b a I / N c o I フラグメントを、p s . M E F A 6 から単離した。X b a I / N c o I フラグメントを、H C V - 1 コアエピトープの第1アミノ酸 (アミノ酸 9～17) をコードする N c o I / N o t I オリゴヌクレオチド (ここで、9位の L y s は A r g に変更し、そして11位の A s n は T h r に変更した) と共に、上記の調製した p S P 7 2 n e w . X b a I / N o t I ベクターに連結した。H B 101 形質転換体を分析し、そしてそれらのプラスミド DNA を配列決定した。p S P 7 2 n e w S X / X N i 番号3と命名したサブクローンを、N o t I / S a l I を用いて消化し、引続くサブクローニングのためにベクターを調製した (図7Bを参照のこと)。

10

【0116】

M E F A 7 の3'末端の組立てを完了するために、H C V - 1 のアミノ酸 9～53を有するコアエピトープをコードする配列の二重反復、およびコア領域の2つの遺伝子型特異的エピトープ (アミノ酸 64～88、H C V - 1 およびアミノ酸 67～84、H C V - 2) を、以下のように、N o t I - S a l I で消化した p S P 7 2 n e w S X / X N i サブクローン番号3にサブクローン化した。第1に、コアエピトープのアミノ酸 18～51をコードする 92bp の N o t I / X m n I フラグメントを、p d . C o r e 191 R T クローン番号20から単離した。プラスミド p d . C o r e 191 R T は、p B S 24 . 1 B a m H I / S a l I 酵母発現ベクター、A D H 2 / G A P H D プロモーターの 1365bp の B a m H I - N c o I フラグメント、および H C V - 1 コアの最初の 191 アミノ酸をコードする 615bp の N c o I - S a l I フラグメント (アミノ酸 9を L y s から A r g に、そしてアミノ酸 11を A s n から T h r に変異させた) を連結することによって構築した。上記と同じ2つの変異を有するアミノ酸 1～191 についてのコア配列がクローン化された 615bp の N c o I - S a l I フラグメントは、E . c o l i 発現ベクター由来であった。

20

30

【0117】

92bp の N o t I / X m n I フラグメントを、p S P 7 2 n e w N o t / K p n ベクターおよび完全コアエピトープの3'末端をコードする X m n I / K p n I オリゴヌクレオチドと連結した。陽性クローンの配列確認の後、p S P 7 2 n e w N K i サブクローン番号4を、N o t I および K p n I で消化し、そして224bp のフラグメントを、ゲルで精製した。この N o t I / K p n I フラグメントを、上記のコアエピトープの完全反復をコードする 284bp のオリゴヌクレオチド (K p n I - S a l I 末端) と共に、上記の p S P n e w S X / X N i N o t I / S a l I ベクターに連結した。H B 101 の形質転換、クローンの同定および配列の確認後、p S P 7 2 n e w S X / X N / N S i サブクローン番号18を、S p h I および S a l I で消化し、そして1317bp のフラグメントを、ゲルで精製した (図7Cを参照のこと)。

40

【0118】

最後に、以下のフラグメント (上記に記載される) を、p B S 24 . 1 B a m H I / S a l I 酵母発現ベクターに連結し、p s . M E F A 7 を作製した (図7Dを参照のこと) :

1896bp の B a m H I / H i n d I I I フラグメント (図7A)

1560bp の H i n d I I I / S p h I フラグメント (図7A)

1317bp の S p h I / S a l I フラグメント (図7C)。

【0119】

50

*S. cerevisiae*株AD3を、*ps*・MEFA7を用いて形質転換し、単一の形質転換体を、培地中のグルコースの枯渇後に発現についてチェックした。組換えタンパク質が、クマシーブルー染色によって検出されたように、酵母において高レベルで発現した。詳細には、酵母細胞を、酢酸リチウムプロトコルを用いてMEFA7発現プラスミドで形質転換した。*Ura^r*形質転換体を、単一コロニーについて画線し、そして*Leu^r*/8%グルコースプレート上にパッチし(patch)、プラスミドコピー数を増加させた。*Leu^r*開始培養物を、24時間30℃で増殖させ、次いで、YEPD(酵母抽出物バクトペプトン2%グルコース)中で1:20に希釈した。細胞を、30℃で48時間増殖させ、そして収集した。MEFA7組み換え抗原の発現を試験するために、細胞のアリコート、溶解緩衝液(10mM Tris-Cl(pH7.5)、1mM EDTA、10mM DTT)中、ガラスビーズを用いて溶解した。溶解物を、高速で遠心分離した。上清および不溶性ペレットを、SDSタンパク質ゲル上で分析した。MEFA7は、不溶性ペレット分画中に非常に富んでいた。

10

【0120】

MEFA7抗原を、以下のように精製した。MEFA7を発現する*S. cerevisiae*細胞を、上記のように収集した。細胞を、溶解緩衝液(50mM Tris、0.15M NaCl、1mM EDTA、1mM PMSF、pH8.0)中に懸濁し、そしてDyno-Mill(Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)または等価な容器中でガラスビーズを用いて溶解した。溶解物を、低速条件(3,000~5,000rpm、15分)で遠心分離し、そして不溶性分画を含むペレットを、溶解緩衝液中の漸増濃度の尿素(1M、2M、3M)を用いて洗浄した。タンパク質を、溶解緩衝液中の0.1N NaOH、4M尿素を用いて遠心分離ペレットから可溶化した。細胞の破片を、3,000~5,000rpmで15分間の低速遠心分離によって取り除いた。上清を、6N HClを用いてpH8.0に調整し、これらの条件下で不溶性タンパク質を沈澱させた。

20

【0121】

沈澱物を、遠心分離によって取り除き、そして上清を、2.3% SDS、50mM DTT、pH8.0に調整し、そして3分間煮沸した。混合物中のタンパク質を、0.1% SDS、1mM EDTAを含むpH7.4に調整したリン酸緩衝化生理食塩水中、Pharmacia Sephacryl S-400でゲル濾過によって分画した。MEFA7を含むカラム溶出画分を収集し、プールし、そしてAmicon YM-30膜で濃縮した。ゲル濾過を、同じカラムおよび条件を用いてプールした分画に対して繰り返した。

30

【0122】

試験アッセイにおけるMEFA7の分析の間、検出結合体として使用したモノクローナル抗体が、コアエピトープの特定の配列(アミノ酸33~38)と反応したことが発見された。従って、*ps*・MEFA7.1を、コアエピトープ領域からアミノ酸33~38を排除するように設計した。

【0123】

MEFA7.1についての酵母発現ベクターは、以下のように作製した。最初に、*ps*・MEFA7の3'末端においてコアエピトープの二重反復を改変した。このようにするために、最初のコアエピトープ反復(HCV-1のアミノ酸9~32、39~42および64~88、HCV-2のアミノ酸67~82)をコードする206bpのNcoI/KpnI合成フラグメント、HCV-2のアミノ酸83および84、続く第2のコアエピトープ反復(HCV-1のアミノ酸9~32、アミノ酸39~42およびアミノ酸64~88、HCV-2のアミノ酸67~84)をコードする233bpのKpnI/SalI合成フラグメントを、それぞれ、pSP72new.NcoI/KpnIベクターおよびpSP72new.KpnI/SalIベクターにサブクローン化した。HB101の形質転換、クローンの同定および配列の確認後、pSP72new.NK1クローン番号21を、NcoIおよびKpnIを用いて消化して、206bpのベクターNcoI/K

40

50

p n I フラグメントを単離し、そして p S P 7 2 n e w N S i クローン番号 3 2 を、K p n I および S a l I を用いて消化して、2 3 3 b p の K p n I / S a l I フラグメントを単離した。

【0124】

プラスミド p s . M E F A 7 . 1 を、以下のフラグメントを p B S 2 4 . 1 B a m H I / S a l I 酵母発現ベクター（図 8 を参照のこと）へと連結することによって組み立てた：

p s . M E F A 7 について上記の 1 8 9 6 b p の B a m H I / H i n d I I I フラグメント；

p s . M E F A 7 について上記の 1 5 6 0 b p の H i n d I I I / S p h I フラグメント；

5 - 1 - 1 エピトープ、c 1 0 0 エピトープおよび N S 5 エピトープをコードする、p s . M E F A 7 から単離された 7 7 6 b p の S p h I / N c o I フラグメント；

2 0 6 b p の N c o I / K p n I フラグメント；ならびに

2 3 3 b p の K p n I / S a l I フラグメント。

【0125】

S . c e r e v i s i a e 株 A D 3 を p s . M E F A 7 . 1 で形質転換し、そして 1 つの形質転換体を、上記のように、培地中のグルコースの枯渇後の発現についてチェックした。組換えタンパク質は、クーマシーブルー染色によって検出したところ、酵母において高いレベルで発現された。

【0126】

M E F A 7 . 1 抗原を以下の通りに精製した。M E F A 7 . 1 を発現する S . c e r e v i s i a e 細胞を上記の通りに収集した。この細胞を溶解緩衝液（5 0 m M T r i s 、0 . 1 5 M N a C l 、1 m M E D T A 、p H 8 . 0 ）中に懸濁し、そしてガラスビーズを用いて、D y n o - M i l l （W a b W i l l y A . B a c h o f e n , B a s e l , S w i t z e r l a n d ）または等価な装置において溶解した。溶解産物を J A - 1 0 ローター中で 1 0 , 0 0 0 r p m で 3 0 分間遠心分離し、そして不溶タンパク質画分を含むペレットを、溶解緩衝液中の漸増濃度（1 M 、2 M 、3 M ）の尿素で洗浄した。タンパク質を、溶解緩衝液中の 0 . 1 N N a O H 、4 M 尿素、5 0 m M D T T を用いて遠心分離ペレットから可溶化した。細胞破片を、J A - 1 4 ローター中で 1 4 , 0 0 0 r p m で 2 0 分間の遠心分離によって除去した。上清を 6 N H C l で p H 8 . 0 に調整してこれらの条件下で不溶性のタンパク質を沈澱させた。

【0127】

沈澱物を、J A - 1 4 ローター中で 1 4 , 0 0 0 r p m で 2 0 分間の遠心分離によって除去した。上清を 2 . 3 % S D S に調整し、そして煮沸水中で 7 0 ~ 7 5 まで加熱し、次いで室温まで冷却した。混合物中のタンパク質を、0 . 1 % S D S 、1 m M E D T A を含有し、p H 7 . 4 に調整された P B S 中での P h a r m a c i a S e p h a c r y l S - 4 0 0 H R のゲルろ過によって分画した。M E F A 7 . 1 を含有するカラム溶出画分を収集し、プールし、そして A m i c o n Y M - 3 0 メンブレンで濃縮した。プールしたゲルろ過画分を 2 . 3 % S D S 、5 0 m M D T T に調整し、そして上記の通りに加熱 / 冷却した。このプールを、第一のゲルろ過工程と同じ条件下での P h a r m a c i a S e p h a c r y l S - 3 0 0 H R カラムでの二回目のゲルろ過工程に供した。

【0128】

（実施例 2 : N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープの組換え産生）

N S 3 / 4 a のコンホメーションエピトープを以下の通りに得た。このエピトープは、図 3 A ~ 3 D で指定した配列を有し、ネイティブな配列とは 4 0 3 位（H C V - 1 全長配列のアミノ酸 1 4 2 8 ）および 4 0 4 位（H C V - 1 全長配列のアミノ酸 1 4 2 9 ）で異なる。特に、ネイティブな配列の 1 4 2 8 位で通常生じる T h r は P r o へと変異しており、そしてネイティブな配列の 1 4 2 9 位で生じる S e r は、I l e へと変異している。

【0129】

特に、用いられる酵母発現ベクターは、上記の pBS24.1 であった。このイムノアッセイにおいて用いられるプラスミド p d . h c v 1 a . n s 3 n s 4 a P I を、代表的な NS3/4a エピトープをコードし、以下の通りに産生した。二工程手順を用いた。最初に、以下の DNA 片と一緒に連結した：(a) 5' HindIII クローニング部位、続いて配列 A C A A A A C A A A、イニシエーター A T G、およびアミノ酸 1027 で始まりアミノ酸 1046 で BglI 部位へと続く H C V 1 a についてのコドンを提供する合成オリゴヌクレオチド；(b) p A c H L T n s 3 n s 4 a P I 由来の 683 bp の BglI - ClaI 制限フラグメント（アミノ酸 1046 ~ 1274 をコードする）；ならびに (c) HindIII および ClaI で消化し、脱リン酸化し、そしてゲル精製した pSP72 ベクター（Promega, Madison, WI, GenBank / EMBL 登録番号 X65332）。プラスミド p A c H L T n s 3 n s 4 a P I を、BD Pharmingen (San Diego, CA) から市販されるバキュロウイルス発現ベクターである p A c H L T E c o R I - P s t I ベクターならびに以下のフラグメントを調製した：H C V - 1 ゲノムのアミノ酸 1027 ~ 1336 に対応する 935 bp の E c o R I - A l w n I；H C V - 1 ゲノムのアミノ酸 1336 ~ 1419 に対応する 247 bp の A l w n I - S a c I I；H C V - 1 ゲノムのアミノ酸 1449 ~ 1509 に対応する 175 bp の H i n f I - B g l I；H C V - 1 ゲノムのアミノ酸 1510 ~ 1711 に対応する 619 bp の B g l I - P s t I + 転写終結コドン。H C V - 1 ゲノムのアミノ酸 1420 ~ 1448 に対応し、PI 変異（Pro へと変異させた Thr - 1428、Ile へと変異させた Ser - 1429）を含む、合成によって作製した 91 bp の S a c I I - H i n f I フラグメントを上記の 175 bp の H i n f I - B g l I フラグメントおよび 619 bp の B g l I - P s t I フラグメントと連結し、そして S a c I I および P s t I で消化した p G E M - 5 Z f (+) ベクター中にサブクローン化した。p G E M - 5 Z f (+) は、市販の E . c o l i ベクター（Promega, Madison, WI, GenBank / EMBL 登録番号 X65308）である。コンピテントな HB 101 細胞の形質転換、個々のクローンのミニスクリーニング分析および配列確認後、p G E M 5 . P I クローン 2 由来の 885 bp の S a c I I - P s t I フラグメントをゲル精製した。このフラグメントを、上記の E c o R I - A l w n I 935 bp フラグメント、A l w n I - S a c I I 247 bp フラグメントおよび p A c H L T E c o R I - P s t I ベクターと連結した。得られた構築物を、p A c H L T n s 3 n s 4 a P I と命名した。

【0130】

上記の連結混合物を HB 101 コンピテント細胞中に形質転換し、そして 100 μg / ml アンピシリンを含有する Luria 寒天プレートにプレーティングした。個々のクローンのミニプレップ分析によって推定のポジティブを同定し、そのうちの 2 つを増幅した。pSP72 1 a H C のクローン番号 1 およびクローン番号 2 についてのプラスミド DNA を、Qiagen Maxi prep キットを用いて調製し、そして配列決定した。

【0131】

次いで、以下のフラグメントと一緒に連結した：(a) pSP72 1 a H C # 1 由来の 761 bp の HindIII - ClaI フラグメント（pSP72.1 a H C を、以下と一緒に連結することによって作製した：HindIII および ClaI で消化した pSP72、5' HindIII クローニング部位を提供する合成オリゴヌクレオチド、続いて配列 A C A A A A C A A A、開始コドン A T G およびアミノ酸 1027 で始まり、アミノ酸 1046 での BglI 部位へと続く、H C V 1 a についてのコドン、ならびに p A c H L T n s 3 n s 4 a P I 由来の 683 bp の BglI - ClaI 制限フラグメント（アミノ酸 1046 ~ 1274 をコードする））；(b) 酵母ハイブリッドプロモーター A D H 2 / G A P D H についての 1353 bp の BamHI - HindIII フラグメント；(c) p A c H L T n s 3 n s 4 a P I 由来の 1320 bp の ClaI - SalI フラグメント（Thr 1428 が Pro へと変異し、そして Ser 1429 が Ile へと

変異した H C V 1 a アミノ酸 1 0 4 6 ~ 1 7 1 1 をコードする) ; ならびに (d) B a m H I および S a l I で消化し、脱リン酸化し、そしてゲル精製した p B S 2 4 . 1 酵母発現ベクター。連結混合物をコンピテントな H B 1 0 1 中へと形質転換し、そして 1 0 0 μ g / m l アンピシリンを含有する L u r i a 寒天プレートにプレティングした。個々のクローンのミニプレップ分析によって、予想された 3 4 4 6 b p の B a m H I - S a l I 挿入物 (A D H 2 / G A P D H プロモーター、イニシエーターコドン A T G およびアミノ酸 1 0 2 7 ~ 1 7 1 1 の H C V 1 a N S 3 / 4 a (図 3 A ~ 図 3 D のアミノ酸 1 ~ 6 8 6 として示す) (T h r 1 4 2 8 (図 3 A ~ 3 D のアミノ酸位置 4 0 3) が P r o へと変異し、そして S e r 1 4 2 9 (図 3 A ~ 3 D のアミノ酸位置 4 0 4) が I l e へと変異している) から構成される) を有するクローンを同定した。この構築物を、 p d . H C V 1 a . n s 3 n s 4 a P I (図 9 を参照のこと) と命名した。 10

【 0 1 3 2 】

S . c e r e v i s i a e 株 A D 3 を p d . H C V 1 a . n s 3 n s 4 a P I で形質転換し、そして 1 つの形質転換体を、培地中のグルコースの枯渇後の発現についてチェックした。組換えタンパク質は、クーマシーブルー染色によって検出し、そして N S 3 のヘリカーゼドメインに対するポリクローナル抗体を用いて免疫ブロット分析によって確認したところ、酵母において高いレベルで発現された。

【 0 1 3 3 】

(実施例 3 : N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープの精製)

N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープを以下の通りに精製した。N S 3 / 4 a エピトープを発現する、上記由来の S . c e r e v i s i a e 細胞を、上記の通りに収集した。この細胞を溶解緩衝液 (5 0 m M T r i s (p H 8 . 0) 、 1 5 0 m M N a C l 、 1 m M E D T A 、 1 m M P M S F 、 0 . 1 μ M ペプスタチン、1 μ M ロイペプチン) 中に懸濁し、そして 1 : 1 : 1 の細胞 : 緩衝液 : 0 . 5 m m ガラスビーズの比でガラスビーズを用いて、D y n o - M i l l (W a b W i l l y A . B a c h o f o n , B a s e l , S w i t z e r l a n d) または等価な装置において溶解した。溶解産物を 4 で 3 0 1 0 0 × g で 3 0 分間遠心分離し、そして不溶タンパク質画分を含むペレットを洗浄緩衝液 (6 m l / g 出発細胞ペレット重量) に添加し、そして室温で 1 5 分間揺り動かした。洗浄緩衝液は、5 0 m M N a P O ₄ (p H 8 . 0) 、 0 . 3 M N a C l 、 5 m M β - メルカプトエタノール、1 0 % グリセロール、0 . 0 5 % オクチルグルコシド、1 m M E D T A 、 1 m M P M S F 、 0 . 1 μ M ペプスタチン、1 μ M ロイペプチンからなっていた。細胞破片を、3 0 1 0 0 × g で 3 0 分間、4 での遠心分離によって取り出した。上清を捨て、そしてペレットを保持した。 20 30

【 0 1 3 4 】

タンパク質を、このペレットから以下の通りに抽出した。6 m l / g の抽出緩衝液を添加し、そして室温で 1 5 分間揺り動かした。この抽出緩衝液は、5 0 m M T r i s (p H 8 . 0) 、 1 M N a C l 、 5 m M β - メルカプトエタノール、1 0 % グリセロール、1 m M E D T A 、 1 m M P M S F 、 0 . 1 μ M ペプスタチン、1 μ M ロイペプチンからなっていた。これを、3 0 1 0 0 × g で 3 0 分間、4 で遠心分離した。上清を保持し、そして以下の式を用いて 1 7 . 5 % になるように硫酸アンモニウムを添加した : 上清の容積 (m l) × x % 硫酸アンモニウム / (1 - x % 硫酸アンモニウム) = 上清へと添加される 4 . 1 M 飽和硫酸アンモニウムの m l 。氷上で攪拌しながら硫酸アンモニウムを滴下し、そして溶液を氷上で 1 0 分間攪拌した。溶液を 1 7 7 0 0 × g で 3 0 分間、4 で遠心分離し、そしてペレットを保持し、そして 2 ~ 8 で 4 8 時間まで保存した。 40

【 0 1 3 5 】

ペレットを再懸濁し、そしてポリ U カラム (P o l y U S e p h a r o s e 4 B , A m e r s h a m P h a r m a c i a) に 4 で以下の通りに流した。ペレットを、ペレットの重量 1 グラムあたり 6 m l のポリ U 平衡化緩衝液中に再懸濁した。この平衡化緩衝液は、2 5 m M H E P E S (p H 8 . 0) 、 2 0 0 m M N a C l 、 5 m M D T T (新たに添加した) 、 1 0 % グリセロール、1 . 2 オクチルグルコシドからなっていた。 50

この溶液を 4 で 15 分間で揺り動かし、そして $31000 \times g$ で 30 分間、4 で遠心分離した。

【0136】

ポリウカラム (1 グラムの出発ペレット重量あたり 1 ml 樹脂) を調製した。線形流速は $60 \text{ cm} / \text{時間}$ であり、そしてパッキング流速は $60 \text{ cm} / \text{時間}$ の 133% であった。このカラムを平衡化緩衝液で平衡化し、そして再懸濁した硫酸アンモニウムペレットの上清を、この平衡化したカラムにローディングした。このカラムを、平衡化緩衝液でベースラインになるまで洗浄し、そしてタンパク質を、以下のポリウ溶出緩衝液中で 1 段階溶出で溶出させた: 25 mM HEPES ($\text{pH} 8.0$)、 1 M NaCl、 5 mM DTT (新たに添加した)、10% グリセロール、1.2 オクチルグルコシド。カラムの溶出物を SDS-PAGE (クーマシー染色した) で泳動し、そしてアリコートで凍結して -80 で保存した。NS3/4a エピトープの存在を、NS3 プロテアーゼドメインに対するポリクローナル抗体および 5-1-1 エピトープ (HCV 4a) に対するモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットによって確認した。

10

【0137】

さらに、プロテアーゼ酵素活性を、以下の通りにして精製の間、モニタリングした。NS4A ペプチド (KKGSVVIVGRIVLSGKPAIIIPKK) および NS3/4a コンホメーションエピトープ含有サンプルを $90 \mu\text{l}$ の反応緩衝液 (25 mM Tris ($\text{pH} 7.5$)、 0.15 M NaCl、 0.5 mM EDTA、10% グリセロール、 0.05 n -ドデシル B-D-マルトシド、 5 mM DTT) 中に希釈し、そして室温で 30 分間混合させた。 $90 \mu\text{l}$ の混合物をマイクロタイタープレート (Costar, Inc., Corning, NY) に添加し、そして $10 \mu\text{l}$ の HCV 基質 (AnaSpec, Inc., San Jose CA) を添加した。プレートを混合し、そして Fluostar プレートリーダーで読み取った。結果を、1 分間あたりの相対蛍光単位 (RFU) で表した。

20

【0138】

これらの方法を用いて、 1 M NaCl 抽出物の産物は $3.7 \text{ RFU} / \text{分}$ の活性を含んでおり、硫酸アンモニウム沈澱物は $7.5 \text{ RFU} / \text{分}$ の活性を有し、そしてポリウ精製の産物は $18.5 \text{ RFU} / \text{分}$ の活性を有していた。

【0139】

30

(実施例 4: HCV 抗原での固体支持体のコーティング)

HCV NS3/4a コンホメーションエピトープおよび MEFA 7.1 抗原を、以下の通りにプレートにコーティングした。HCV コーティング緩衝液 (50 mM NaPO₄ ($\text{pH} 7.0$)、 2 mM EDTA および 0.1% クロロアセトアミド) を、 $0.22 \mu\text{l}$ フィルターユニットを通して濾過した。次いで、以下の試薬を、HCV コーティング緩衝液に順次添加し、そして各添加後に攪拌した: $10 \text{ mg} / \text{ml}$ 溶液 (Bayer Corp. Pentex, Kankakee, Illinois) からの $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ BSA (スルフヒドリル改変); 1 M 溶液 (Sigma, St. Louis, MO) からの 5 mM DTT; $0.45 \mu\text{g} / \text{ml}$ NS3/4a ($0.3 \text{ mg} / \text{ml}$ のタンパク質濃度); $0.375 \mu\text{g} / \text{ml}$ MEFA 7.1 ($1 \text{ mg} / \text{ml}$ のタンパク質濃度)。最終溶液を室温で 15 分間攪拌した。

40

【0140】

$200 \mu\text{l}$ の上記溶液を Costar 高結合平底プレート (Corning Inc., Corning, New York) の各ウェルに添加し、そしてこのプレートを加湿チャンバー中で一晩インキュベートした。次いで、このプレートを洗浄緩衝液 ($1 \times \text{PBS}$ 、0.1% TWEEN-20) で洗浄し、タップ乾燥 (Tapped dry) し、そして $285 \mu\text{l}$ の Ortho Post-Coat Buffer ($1 \times \text{PBS}$ 、 $\text{pH} 7.4$ 、1% BSA、3% スクロース) を添加した。このプレートを、少なくとも 1 時間にわたってインキュベートし、タップし、そして 2~8 で一晩乾燥した。このプレートを、将来の使用のために乾燥剤と共に袋に入れた。

50

【0141】

(実施例5)

(初期セロコンバージョン研究)

併用アッセイ(HCV4.0)におけるNS3/4aおよびMEF A7.1抗原の性能を、セロコンバージョン検出の限界を試験し、そしてこれらの限界と他の市販のアッセイにおいて獲得される限界とを比較するために他のHCVアッセイと比較した。HCV感染させた市販のヒト血液サンプルのパネルを使用した。以下の表に示すPHVパネルを、Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI) から購入した。6212パネルを、Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP) から購入した。SCパネルを、North American Biologics, Inc., Boca Raton, FL (NABI) から購入した。血液サンプルを獲得した日を、表に示す。

【0142】

HCV4.0アッセイを、以下の通り実施した。200 μ lの試料希釈緩衝液(1g/l カゼイン、100mg/l 組換えヒトSOD、1g/l クロロアセトアミド、10g/l BSA、500mg/l 酵母抽出物、0.366g/l EDTA、1.162g/l KPO_4 、5ml/l Tween-20、29.22g/l NaCl、1.627g/l $NaPO_4$ 、1% SDS)を、コーティングしたプレートに添加した。次いで、20 μ lのサンプルを添加した。これを、37 $^{\circ}C$ で1時間インキュベートした。このプレートを、洗浄緩衝液(1 $\times$ PBS、pH7.4、0.1% Tween-20)を用いて洗浄した。200 μ lの結合緩衝液(マウス抗ヒトIgG-HRP(例えば、Enhanced SAveバルク結合希釈剤(Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)を用いてORTHOCV3.0 ELISA Test System中で1:22,000希釈したマウス抗ヒトIgG-HRP))を添加し、そして37 $^{\circ}C$ で60分間インキュベートした。これを上記のようにして洗浄し、そして200 μ lの基質溶液(1 OPD錠剤/10ml)を添加した。OPD錠剤は、西洋ワサビペルオキシダーゼ反応による着色のためのo-フェニレンジアミンジヒドロクロリドおよび過酸化水素を含む。これを、暗所にて室温で30分間インキュベートした。この反応を、50 μ l 4N H_2SO_4 を添加することにより停止し、そしてプレートを、690nmでの吸光度(コントロール)と比較して、492nmで読み取った。

【0143】

この研究において用いられた他のアッセイは以下の通りであった。

【0144】

Abbott PRISMアッセイ(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)は市販されており、そして抗体ベースの検出アッセイである。このアッセイを、製造元の説明書を用いて実施した。

【0145】

ORTHOCV Version 3.0 ELISA Test System(HCV3.0)(Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)は、抗体ベースの検出アッセイである。このアッセイを、製造元の説明書を用いて実施した。

【0146】

Pasteur MONOLISA anti-HCV Plus Version 2アッセイ(Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France)は、抗体ベースの検出アッセイである。このアッセイを、製造元の説明書を用いて実施した。

【0147】

HCV4.0アッセイの性能を、HCV3.0、PRISM、およびPasteurアッセイと比較した(表3および表4を参照のこと)。血液パネルに存在するHCV抗体(抗

c 3 3 c または抗 c 2 2) を表 4 に示す。詳細には、上記の 3 つの販売元由来の 1 7 のセロコンバージョンパネルを、上記の技術を用いてアッセイした。見られ得る通り、c 3 3 c パネルについて、H C V 4 . 0 は、9 つの c 3 3 c パネル中の 9 つにおいて、(1 ~ 3 回の採血により) H C V 3 . 0 よりも早期の検出を示し、そして 9 つのパネル中の 6 つにおける P R I S M よりも早期の検出および 9 つのパネル中の 3 つにおける P R I S M と比較して等価な検出を示した。c 2 2 パネルについて、H C V 4 . 0 は、8 つのパネル中の 3 つにおける H C V 3 . 0 よりも早期の検出および他の 5 つのパネルにおける等価な検出を示した。H C V 4 . 0 はまた、8 つのパネル中の 2 つにおける P R I S M よりも早期の検出および 8 つのパネル中の 6 つにおける等価な検出を示した。観察された改善の範囲は、H C V 3 . 0 および P R I S M アッセイの両方よりも 2 ~ 1 4 日であった。

10

【 0 1 4 8 】

【 表 3 】

表 3

ID	採血日	s	Ortho HCV 4.0 HCV 3.0 Prism		
			s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0	0.031	0.05	0.01	0.12
PHV 904-2	2	0.024	0.04	0.01	0.08
PHV 904-3	7	1.391	2.11	0.33	0.51
PHV 904-4	9	2.813	4.28	1.10	1.56
PHV 904-5	14	3.197	4.88	3.27	3.54
PHV 904-6	21	3.176	4.83	3.92	4.45
PHV 904-7	23	3.554	5.40	4.26	4.69

10

PHV 905-1	0	0.015	0.02	0.02	0.06
PHV 905-2	4	0.019	0.03	0.01	0.07
PHV 905-3	7	0.079	0.12	0.02	0.14
PHV 905-4	11	0.950	1.44	0.42	0.70
PHV 905-5	14	1.586	2.41	0.80	1.21
PHV 905-6	18	2.529	3.54	1.32	2.00
PHV 905-7	21	3.177	4.83	2.54	3.44
PHV 905-8	25	3.419	5.20	4.45	4.74
PHV 905-9	28	3.408	5.18	4.85	5.04

20

ID	採血日	s	Ortho HCV 4.0 HCV 3.0 Prism		
			s/co	s/co	s/co
PHV 907-1	0	0.030	0.05	0.01	0.09
PHV 907-2	4	0.023	0.03	0.01	0.09
PHV 907-3	7	0.021	0.03	0.01	0.11
PHV 907-4	13	0.148	0.22	0.13	0.35
PHV 907-5	18	1.726	2.67	0.83	1.68
PHV 907-6	21	2.785	4.23	1.59	3.12
PHV 907-7	154	3.279	4.98	4.85	5.16

30

PHV 908-1	0	0.029	0.04	0.01	0.07
PHV 908-2	3	0.079	0.12	0.01	0.08
PHV 908-3	5	0.399	0.61	0.01	0.13
PHV 908-4	11	1.780	2.71	0.50	1.27
PHV 908-5	13	2.068	3.14	0.67	1.61
PHV 908-6	19	2.793	4.24	1.16	3.11
PHV 908-7	25	3.390	5.16	3.11	4.29
PHV 908-8	27	3.299	5.01	3.78	4.44
PHV 908-9	32	3.474	5.28	4.35	4.54
PHV 908-10	35	3.707	5.63	4.85	4.82
PHV 908-11	41	3.363	5.10	4.85	5.09
PHV 908-12	45	3.372	5.12	3.80	5.79
PHV 908-13	48	3.278	4.98	4.85	5.56

40

表 3(続き)

ID	採血日	s	HCV 4.0		Ortho	Abbott
			s/co	s/co	HCV 3.0	Prism
PHV 913-1	0	0.060	0.09	0.01		0.08
PHV 913-2	2	0.242	0.37	0.02		0.10
PHV 913-3	7	0.893	1.36	0.43 -		0.5 -
PHV 913-4	9	1.141	1.73	0.54 -		0.59 -

PHV 914-1	0	0.033	0.05	0.00		0.06
PHV 914-2	5	0.024	0.04	0.01		0.06
PHV 914-3	9	0.135	0.21	0.01		0.06
PHV 914-4	12	2.653	4.03	0.04		0.09
PHV 914-5	16	3.020	4.59	0.33 -		0.47 -
PHV 914-6	19	2.302	3.50	0.82 -		0.9 -
PHV 914-7	24	2.697	4.10	3.10		2.41
PHV 914-8	30	2.744	4.17	4.85		4.09
PHV 914-9	33	2.991	4.55	4.85		4.52

10

ID	採血日	s	HCV 4.0		Ortho	Abbott
			s/co	s/co	HCV 3.0	Prism
6212-1	11/16/95	0.723	1.10	0.01		0.08
6212-2	11/28/95	2.716	4.13	0.85		1.26
6212-3	11/30/95	3.117	4.74	1.15		1.11
6212-4	12/09/95	3.278	4.98	4.08		2.65
6212-5	12/12/95	3.527	5.36	5.04		3.13
6212-6	12/18/95	3.292	5.00	5.51		3.07
6212-7	12/23/95	3.096	4.71	5.43		2.80
6212-8	01/08/96	3.241	4.93	13.45		3.48
6212-9	01/10/96	3.306	5.02	13.4		4.04

20

6213-1	01/16/96	0.035	0.05	0.01		0.09
6213-2	01/18/96	0.028	0.04	0.00		0.07
6213-3	01/24/96	0.037	0.06	0.01		0.08
6213-4	01/27/96	0.047	0.07	0.01		0.09
6213-5	01/31/96	0.034	0.05	0.01		0.07
6213-6	02/03/96	0.037	0.06	0.01		0.07
6213-7	02/13/96	0.056	0.09	0.01		0.07
6213-8	02/15/96	0.027	0.04	0.01		0.06
6213-9	02/20/96	0.098	0.15	0.01		0.11
6213-10	02/22/96	1.572	2.39	0.46 -		1.26
6213-11	02/28/96	3.410	5.18	4.18		4.75
6213-12	03/02/96	3.224	4.90	4.67		4.68

30

表 3(続き)

ID	採血日	s	HCV 4.0	Ortho HCV 3.0	Abbott Prism
			s/co	s/co	s/co
6214-1	01/13/96	0.042	0.06	0.01	0.09
6214-2	01/15/96	0.016	0.02	0.00	0.07
6214-3	01/21/96	0.035	0.05	0.00	0.07
6214-4	01/23/96	0.028	0.04	0.00	0.07
6214-5	01/29/96	0.031	0.05	0.00	0.08
6214-6	01/31/96	0.028	0.04	0.00	0.09
6214-7	02/05/96	0.364	0.55	0.01	0.59
6214-8	02/07/96	0.916	1.39	0.02 -	1.36
6214-9	02/12/96	2.290	3.48	0.94 -	2.31
6214-10	02/14/96	3.669	5.58	2.29	3.05
6214-11	03/02/96	3.523	5.35	3.15	5.32
6214-12	03/06/96	3.125	4.75	4.75	6.38
6214-13	03/09/96	3.246	4.93	4.89	6.17

10

6222-1	08/18/96	0.023	0.03	0.01	0.08
6222-2	08/20/96	0.151	0.23	0.00	0.06
6222-3	09/04/96	0.053	0.08	0.00	0.06
6222-4	09/06/96	0.016	0.02	0.00	0.06
6222-5	09/11/96	0.015	0.02	0.00	0.07
6222-6	09/13/96	0.009	0.01	0.00	0.06
6222-7	09/23/96	0.817	1.24	0.04	0.36
6222-8	09/27/96	2.862	4.35	1.10	3.74

20

ID	採血日	s	HCV 4.0	Ortho HCV 3.0	Abbott Prism
			s/co	s/co	s/co
SC-0030-A	1	0.024	0.04	0.01	0.05
SC-0030-B	40	1.658	2.52	0.94 -	0.54 -
SC-0030-C	45	2.372	3.60	3.07	3.15

SC-0040-A	1	0.773	1.17	0.02	0.09
SC-0040-B	3	1.491	2.27	0.12	0.54
SC-0040-C	8	2.400	3.65	0.77 -	2.68
SC-0040-D	10	2.639	4.01	1.37	3.23
SC-0040-E	15	3.423	5.20	3.48	3.46

30

【 0 1 4 9 】

【 表 4 】

表 4

		パネル	採血日数 早期検出		初期c33cパネル	初期c22パネル
			HCV 3.0	Abbott Prism		
#1	c33c	PHV 904	2	2	PHV 904	PHV 907
#2	c33c	PHV 905	7	3	PHV 906	PHV 909
#3	c22	PHV 907	3	0	PHV 908	PHV 910
#4	c33c	PHV 908	8	0	PHV 914	PHV 911
#5	c22	PHV 909	0	0	6212	PHV 912
#6	c22	PHV 910	0	0	6213	PHV 913
#7	c22	PHV 911	0	0	6214	SC-0010
#8	c22	PHV 912	0	0	6222	SC-0030
#9	c22	PHV 913	2	2	SC-0040	
#10	c33c	PHV 914	12	12		
#11	c33c	6212	14	12		
#12	c33c	6213	6	0		
#13	c33c	6214	7	0		
#14	c33c	6222	4	4		
#15	c22	SC-0010	0	0		
#16	c22	SC-0030	5	5		
#17	c33c	SC-0040	9	7		
改善の範囲			2-14 日	2-12 日		

10

(実施例 6)

(H C V 4 . 0 遺伝子型の感度)

20

H C V 4 . 0 アッセイの遺伝子型の感度を、上記の H C V 3 . 0 および P a s t e u r アッセイと比較した。詳細には、表 5 に示される 10 の異なる H C V 遺伝子型由来のサンプルを、表に示されるように希釈し（最初のサンプル力価測定に基づき 2 倍または 10 倍）、そして上記の手順を用いて 3 つのアッセイにおいて使用した。3 つの試験全てを同時に実施した。これらのデータをシグナルまたは未処理の O . D . として示す。これらのデータは、H C V 4 . 0 プロトタイプが、希釈した遺伝子型サンプルを検出するのにより高感度であることを示唆する。

【 0 1 5 0 】

【 表 5 】

表 5

HCV4.0および遺伝子型の希釈による感度

希釈	遺伝子型	HCV 4.0 フルタイプ		HCV 3.0 Ortho		Monolisa Ver. 2 Pasteur		HCV 4.0 フルタイプ		HCV 3.0 Ortho		Monolisa Ver. 2 Pasteur	
		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1:2500	1b	2.866	1.007	0.694	2.478	0.701	0.551	2.478	0.701	0.551	0.551	0.551	0.551
1:5000		2.074	0.393	0.218	1.125	0.256	0.195	1.125	0.256	0.195	0.195	0.195	0.195
1:10000		1.099	0.159	0.084	0.609	0.087	0.076	0.609	0.087	0.076	0.076	0.076	0.076
1:20000		0.403	0.045	0.028	0.216	0.035	0.033	0.216	0.035	0.033	0.033	0.033	0.033
1:2500	2b	1.430	0.295	0.658	2.831	0.632	0.462	2.831	0.632	0.462	0.462	0.462	0.462
1:5000		0.551	0.108	0.207	1.752	0.193	0.181	1.752	0.193	0.181	0.181	0.181	0.181
1:10000		0.225	0.032	0.061	0.717	0.069	0.076	0.717	0.069	0.076	0.076	0.076	0.076
1:20000		0.074	0.010	0.019	0.248	0.015	0.025	0.248	0.015	0.025	0.025	0.025	0.025
1:2500	2a/c	1.952	0.467	1.653	1.751	0.457	1.147	1.751	0.457	1.147	1.147	1.147	1.147
1:5000		0.917	0.136	0.782	0.856	0.169	0.474	0.856	0.169	0.474	0.474	0.474	0.474
1:10000		0.395	0.049	0.286	0.384	0.055	0.178	0.384	0.055	0.178	0.178	0.178	0.178
1:20000		0.108	0.011	0.105	0.141	0.018	0.058	0.141	0.018	0.058	0.058	0.058	0.058
1:2500	3a	2.580	0.514	0.941	2.682	1.496	2.271	2.682	1.496	2.271	2.271	2.271	2.271
1:5000		1.622	0.218	0.353	2.744	0.827	0.988	2.744	0.827	0.988	0.988	0.988	0.988
1:10000		0.873	0.067	0.164	1.587	0.316	0.395	1.587	0.316	0.395	0.395	0.395	0.395
1:20000		0.398	0.023	0.050	0.726	0.097	0.120	0.726	0.097	0.120	0.120	0.120	0.120
1:2500	3e	1.207	0.158	0.291	3.516	3.247	ND	3.516	3.247	ND	ND	ND	ND
1:5000		0.461	0.039	0.114	3.502	3.594	ND	3.502	3.594	ND	ND	ND	ND
1:10000		0.155	0.011	0.053	3.224	2.863	ND	3.224	2.863	ND	ND	ND	ND
1:20000		0.054	0.003	0.024	1.192	0.380	ND	1.192	0.380	ND	ND	ND	ND

10

20

30

(実施例7)

(競合研究)

以下の競合研究を、NS3/4aコンホメーションエピトープが、他のHCV抗原と異なる抗体を検出するか否かを評価するために実施した。詳細には、NS3/4a抗原を、以下のようにしてc200抗原と比較した。

40

【0151】

上記のようにして生成された0.5μgおよび1.0μgのNS3/4aまたはc200(Hepatology(1992)15:19-25、ORTHO HCV Vers ion 3.0 ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jerseyにおいて利用可能)を、総量220μl(1×PBS)で20μlのサンプルPHV914-5(感染個体の血液から獲得された初期セロコンバージョンの採血)と混合した。この混合物を、マイクロウェル中で37℃で1時間インキュベートした。次いでこの混合物を、NS3/4aコーティングしたプレートに移し、そして37℃で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、そして以下のようにしてアッセイした。

50

【0152】

1 μ g の c 2 0 0 抗原を、総量約 2 2 0 μ l 中の 1 0 μ l のサンプル P H V 9 1 4 - 5 に添加した。この混合物を、マイクロウェル中で 3 7 で 1 時間インキュベートし、そして 2 0 0 μ l を N S 3 / 4 a コーティングしたプレートに移し (1 0 0 n g / アッセイ)、そして 3 7 で 1 時間インキュベートした。プレートを、1 $\times$ P B S、0 . 1 % T w e e n - 2 0 を用いて 5 回洗浄した。2 0 0 μ l の結合溶液 (上記) を添加し、そしてプレートをインキュベートして、H C V 4 . 0 アッセイについて実施例 4 に記載されるようにアッセイした。P H V 9 1 4 - 5 および 1 $\times$ P B S からなるコントロール (抗原を含まない) もまた上記の通り処理した。

【0153】

結果を表 6 に示す。4 列目に示される % 阻害結果は、3 列目 - { (2 列目 / 3 列目) $\times$ 1 0 0 } として算出する。見られ得る通り、これらのデータは、N S 3 4 a が、初期セロコンバージョン抗体により中和され、そして c 2 0 0 は中和されないことを示す。P H V 9 1 4 - 5 c 3 3 c 初期セロコンバージョンパネルのメンバーにおける抗体が、プレート上にコーティングされた N S 3 4 a と反応する場合、強いシグナルを達成した。c 2 0 0 抗原は、これらの抗体により中和されなかった。このことは、表 6 の上パネルに示される。N S 3 4 a を P H V 9 1 4 - 5 サンプルと混合した場合、それは中和されず、従って、マイクロプレート上にコーティングされた N S 3 4 a と反応する抗体はサンプル中に存在しなかった。これらのデータは、N S 3 4 a が、c 2 0 0 により検出される抗体とは異なるクラスの抗体を検出し得ることを示す。

【0154】

【表 6】

10

20

NS3/4a抗原がc200抗原と比較して早期c33c2ロコンバージョンパネルにおいて異なる抗体を検出することを示す露合研究

	1	2	3	4
			コントロール 1×PBS	% 阻害
c200 + PHV914-5	S			
1ug	1.450	1.645		12
1ug	1.545	1.687		8
0.5ug	1.557	1.913		19
0.5ug	1.719	1.804		5
NS3/4a + PHV914-5	S			
1ug	0.054	1.599		97
1ug	0.037	1.677		98
0.5ug	0.066	1.672		96
0.5ug	NA	1.524		NA

表6

10

20

30

(実施例8)

(NS3/4aコンホメーションエピトープの安定性の研究)

40

アッセイの性能に対するNS3/4aエピトープの安定性の役割を評価するために、以下の研究を実施して、室温での時間に対するNS3/4aの免疫反応性を決定した。小アリコートストックNS3/4aを、表7に示される間隔で、室温に静置し、次いで凍結させた。全てのバイアルを同時にコーティングし、そして2つの初期NS3セロコンバージョンパネルに対して試験した。アッセイを、HCV4.0について上記の実施例5に記載されるように実施した。

【0155】

表7に見られる通り、NS3/4aストックは安定ではなく、そして時間と共に免疫反応性が減少する。さらに、NS3/4aのコンホメーションを維持することは、免疫反応性のために必須である。

50

【 0 1 5 6 】

さらなる安定性の研究を以下の通り実施した。標準的な手順を用いて N S 3 / 4 a に対して作製された 2 つのコンホメーションモノクローナル抗体を、抗 H C V 初期セロコンバージョンパネルと置き換えた。ストック N S 3 / 4 a バイアルを、室温にて 3、6、および 24 時間間隔で保存した。凍結バイアル由来の N S 3 / 4 a を 90 ng / ml でコーティングし、そして上記の手順を用いてアッセイした。結果は、2 つのモノクローナル抗体が実際にコンホメーション抗体であり、そしてそれらの反応性は室温でのストック N S 3 / 4 a 抗原の操作に対して感受性であったことを示唆した。ポジティブコントロールのモノクローナル抗体の反応性は変化しなかった。

【 0 1 5 7 】

【表 7】

時間(時間)	0	6	21.4	29	35.5	46	52	コントロール 参照
	A	D	G	H	I	K	N	s/co
	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-3	1.5	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8
PHV 904-4	3.7	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	4.4
PHV 904-5	4.8	2.0	0.7	0.6	0.3	0.2	0.3	5.5
PHV 904-6	5.4	2.8	1.7	1.0	0.6	0.5	0.6	5.8
PHV 904-7	5.1	3.4	1.5	1.0	1.1	0.5	0.7	5.4
PHV 914-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-4	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
PHV 914-5	2.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
PHV 914-6	2.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4
PHV 914-7	2.8	0.5	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	4.9
PHV 914-8	2.0	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	4.9
酵素								
RFU/分	8.75	4.14	3.08	1.88	1.75	1.75	0.75	

表 7

10

20

30

40

50

(実施例 9)

(変性 NS 3 / 4 a に対する NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープの免疫反応性)
 上記のように生成された NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープの免疫反応性を、NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープ調製物に最終濃度 2 % で SDS を添加することにより変性させた NS 3 / 4 a と比較した。変性 NS 3 / 4 a および立体構造型 NS 3 / 4 a を、上記のようにマイクロタイタープレート上にコーティングした。c 200 抗原 (Hepatology (1992) 15 : 19 - 25、ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey において利用可能) もまた、マイクロタイタープレート上にコーティングした。処方物中の還元剤 (DTT) および

10

20

30

40

50

50

		NS3/4a vs. 変性NS3/4a					
		* ストックNS3/4aに対して2%SDSを1/10とした					
		NS3/4a	dNS3/4a*	c200	NS3/4a	dNS3/4a*	c200
		OD	OD	OD	s/co	s/co	s/co
HCV	PHV 904-1	0.012	0.012	0.009	0.02	0.02	0.01
ヒロコンバージョン	PHV 904-2	0.011	0.009	0.008	0.02	0.01	0.01
	PHV 904-3	1.124	0.071	0.045	1.180	0.11	0.07
	PHV 904-4	2.401	0.273	0.129	2.385	0.44	0.21
	PHV 904-5	3.022	0.793	0.347	3.365	1.25	0.57
	PHV 904-6	2.711	1.472	0.774	2.355	2.57	1.28
	PHV 904-7	3.294	1.860	0.943	5.285	2.99	1.55
	PHV 914-1	0.006	0.004	0.001	0.01	0.01	0.00
	PHV 914-2	0.005	0.004	0.002	0.01	0.01	0.00
	PHV 914-3	0.098	0.003	0.001	0.16	0.00	0.00
	PHV 914-4	1.118	0.006	0.004	1.79	0.01	0.01
	PHV 914-5	2.035	0.044	0.022	3.26	0.07	0.04
	PHV 914-6	2.092	0.074	0.025	3.355	0.12	0.04
	PHV 914-7	2.519	0.261	0.132	4.045	0.45	0.22
	PHV 914-8	2.746	0.907	0.500	3.40	1.46	0.82
	PHV 914-9	3.084	1.730	0.931	1.94	2.78	1.53
HCV 3.0	ネガティブコントロール	0.023	0.024	0.008			
コントロール	ネガティブコントロール	0.027	0.024	0.007			
	ネガティブコントロール	0.021	0.017	0.005			
	平均	0.024	0.022	0.007			
	カットオフ	0.624	0.622	0.607			
	ポジティブコントロール	1.239	0.963	0.575	1.99	1.45	0.95
	ポジティブコントロール	1.445	0.916	0.614	2.32	1.47	1.01

50

【 0 1 6 0 】

【表 9】

表9				
		プレート		
		NS3/4a	dNS3/4a	c200
モノクローナル		OD	OD	OD
4B9/E3	1:100	1.820	0.616	0.369
	1:1000	1.397	0.380	0.246
	1:10000	0.864	0.173	0.070
	1:20000	0.607	0.116	0.085
5B7/D7	1:100	2.885	0.898	0.436
	1:1000	2.866	0.541	0.267
	1:10000	1.672	0.215	0.086
	1:20000	1.053	0.124	0.059
1A8/H2	1:100	1.020	0.169	0.080
	1:1000	0.921	0.101	0.043
	1:10000	0.653	0.037	0.013
	1:20000	0.337	0.027	0.011

10

20

従って、新規のHCV検出アッセイを開示した。前述のことから、本発明の特定の実施形態が、例示の目的で本明細書中に記載されているが、本発明の意図および範囲から逸脱することなく種々の改変がなされ得ることが理解される。

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、HCVゲノムの模式図であり、本発明のアッセイ試薬（タンパク質および抗体）が由来するポリタンパク質の種々の領域を示す。

【図 2】

図 2 は、本発明の代表的なイムノアッセイの模式図である。

【図 3】

図 3 A ~ 3 D は、本発明のアッセイにおける使用のための代表的な NS 3 / 4 a コンホメーション抗原の DNA および対応するアミノ酸配列を示す。図 3 A ~ 3 D の 4 0 3 位および 4 0 4 位のアミノ酸は、HCV - 1 のネイティブなアミノ酸配列の P r o の T h r での置換、および I l e の S e r での置換を表す。

40

【図 4】

図 4 は、M E F A 7 . 1 の模式図である。

【図 5】

図 5 A ~ 5 F は、M E F A の DNA および対応するアミノ酸配列を示す。

【図 6】

図 6 A ~ 6 C は、本発明のイムノアッセイとともに使用するための代表的な M E F A を示す。図 6 A は、M E F A 3 の模式図である。図 6 B は、M E F A 5 の模式図である。図 6 C は、M E F A 6 の模式図である。

50

【 図 7 A 】

図 7 A は、 p s M E F A 7 の構築の図である。

【 図 7 B 】

図 7 B は、p s M E F A 7 の構築の図である。

【 図 7 C 】

図 7 C は、 p s M E F A 7 の構築の図である。

【 図 7 D 】

図 7 D は、p s M E F A 7 の構築の図である。

【 図 8 】

図 8 は、p s M E F A 7 . 1 の構築の図である。

【 図 9 】

図 9 は、p d . H C V 1 a . n s 3 n s 4 a P I の構築の図である。

10

【 図 1 】

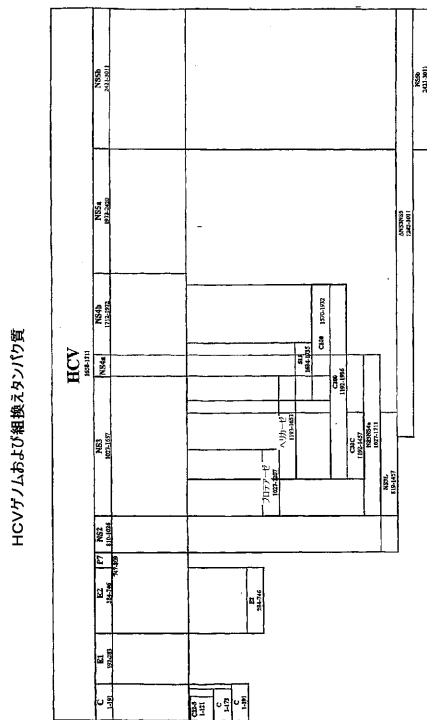
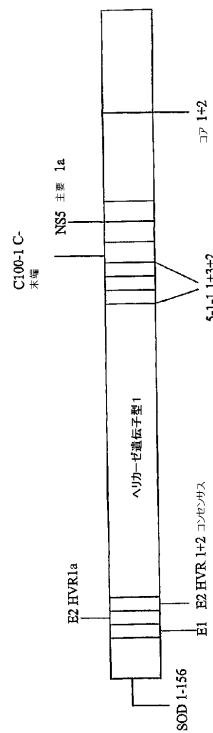


FIG. 1

【 図 4 】



【 図 6 】

MEFA-3 抗原											
HSOD- (1-154)	コ7	コ7	c33c	5-1-1 1型	5-1-1 3型	5-1-1 2型	C-100	C-100	N55	N55	N55
アミ/糖	10 53	10 53	1192 53	1684 1457	1684 1735	1684 1735	1901 1940	1901 1940	2278 2310	2278 2310	2278 2310

MEFA-5 抗原											
HSOD- (1-154)	コ7	コ7	E1	E2	c33c	5-1-1 1型	5-1-1 3型	5-1-1 2型	C-100	N55	N55
アミ/糖	10 53	10 53	303 53	405 320	1192 444	1689 1457	1689 1735	1689 1735	1901 1940	2278 2313	2278 2313

MEFA-6 抗原											
HSOD- (1-154)	E1	E2	c33c	5-1-1 1型	5-1-1 3型	5-1-1 2型	C-100	N55	CORE	CORE	CORE
アミ/糖	303 320	405 444	1192 444	1689 1457	1689 1735	1689 1735	1901 1940	2278 2313	10 53	10 53	10 53

FIG. 6

【 図 7 A 】

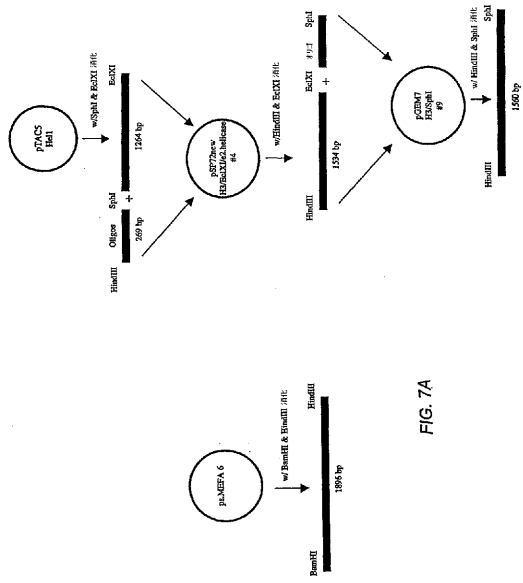


FIG. 7A

【 図 7 B 】

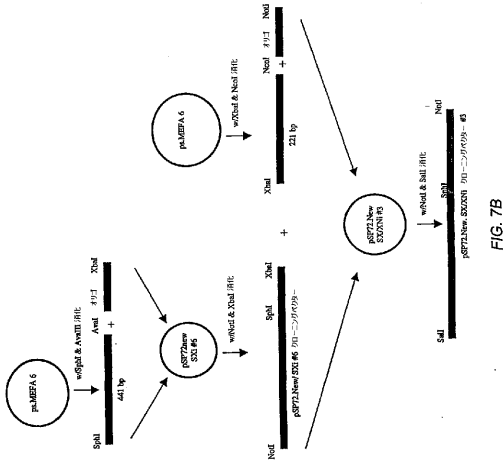


FIG. 7B

【 図 7 C 】

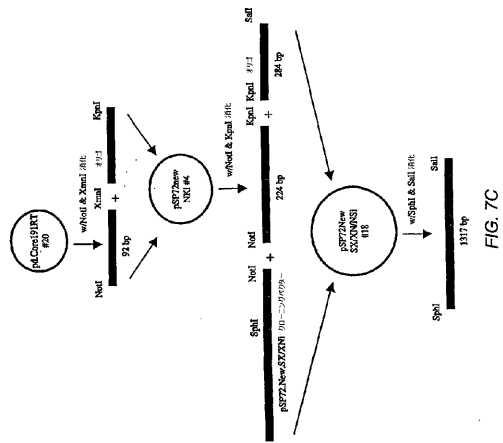


FIG. 7C

【 7 D 】

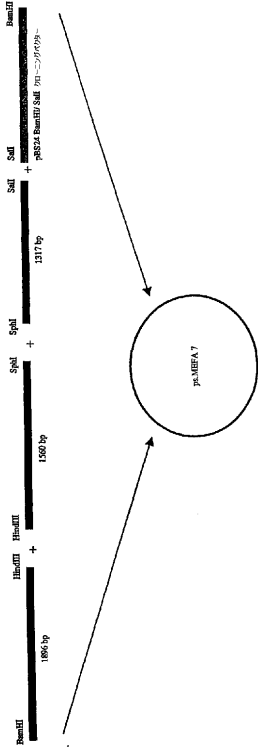


FIG. 7D

【 9 】

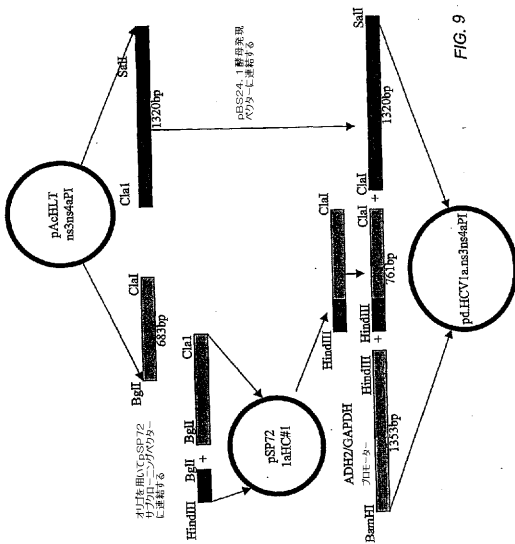


FIG. 9

【 8 】

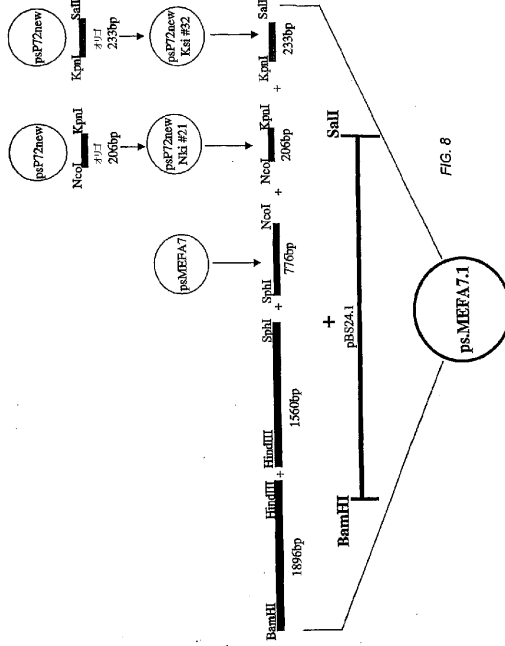


FIG. 8

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96870 A2

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/53** [CL/US]: 136 Galewood Circle, San Francisco, CA 94131 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/19156
- (22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/212,082 15 June 2000 (15.06.2000) US
60/280,811 2 April 2001 (02.04.2001) US
60/280,867 2 April 2001 (02.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **CHIRON CORPORATION** [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **CHIEN, David, Y.** [US/US]; 1121 Douglas Court, Alamo, CA 94507 (US). **ARCANGEL, Phillip** [US/US]; 567 Oakland Avenue #310, Oakland, CA 94611 (US). **TANDESKE, Laura** [US/US]; 305 Melven Court, San Leandro, CA 94577 (US). **GEORGE-NASCIMENTO, Carlos** [CL/US]; 2061 Magnolia Way, Walnut Creek, CA 94595 (US). **COIT, Doris** [US/US]; 1058 Rancho Lindo Drive, Petaluma, CA 94952 (US). **MEDINA-SELBY, Angelica**
- (81) Designated States (national): AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, 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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/96870 A2

(54) Title: IMMUNOASSAYS FOR ANTI-HCV ANTIBODIES

(57) Abstract: HCV immunoassays comprising an NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen are provided, as well as immunoassay solid supports for use with the immunoassays.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

5 IMMUNOASSAYS FOR ANTI-HCV ANTIBODIESTechnical Field

10 The present invention pertains generally to viral diagnostics. In particular, the invention relates to immunoassays using multiple HCV antigens, for accurately diagnosing hepatitis C virus infection.

Background Of The Invention

15 Hepatitis C Virus (HCV) is the principal cause of parenteral non-A, non-B hepatitis (NANBH) which is transmitted largely through body blood transfusion and body fluid exchange. The virus is present in 0.4 to 2.0% of the general population in the United States. Chronic hepatitis develops in about 50% of infections and of these, approximately 20% of infected individuals develop liver cirrhosis which sometimes leads to hepatocellular carcinoma. Accordingly, the study and control of the disease is of
20 medical importance.

 HCV was first identified and characterized as a cause of NANBH by Houghten et al. The viral genomic sequence of HCV is known, as are methods for obtaining the sequence. See, e.g., International Publication Nos. WO 89/04669; WO 90/11089; and WO 90/14436. HCV has a 9.5 kb positive-sense, single-stranded RNA genome and is a
25 member of the Flaviridae family of viruses. At least six distinct, but related genotypes of HCV, based on phylogenetic analyses, have been identified (Simmonds et al., *J. Gen. Virol.* (1993) 74:2391-2399). The virus encodes a single polyprotein having more than 3000 amino acid residues (Choo et al., *Science* (1989) 244:359-362; Choo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:2451-2455; Han et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991)

WO 01/96870

PCT/US01/19156

88:1711-1715). The polyprotein is processed co- and post-translationally into both structural and non-structural (NS) proteins.

In particular, as shown in Figure 1, several proteins are encoded by the HCV genome. The order and nomenclature of the cleavage products of the HCV polyprotein is as follows: NH₂-C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. Initial cleavage of the polyprotein is catalyzed by host proteases which liberate three structural proteins, the N-terminal nucleocapsid protein (termed "core") and two envelope glycoproteins, "E1" (also known as E) and "E2" (also known as E2/NS1), as well as nonstructural (NS) proteins that contain the viral enzymes. The NS regions are termed NS2, NS3, NS4, NS4a, NS4b, NS5a and NS5b. NS2 is an integral membrane protein with proteolytic activity. NS2, either alone or in combination with NS3, cleaves the NS2-NS3 sissle bond which in turn generates the NS3 N-terminus and releases a large polyprotein that includes both serine protease and RNA helicase activities. The NS3 protease serves to process the remaining polyprotein. Completion of polyprotein maturation is initiated by autocatalytic cleavage at the NS3-NS4a junction, catalyzed by the NS3 serine protease. Subsequent NS3-mediated cleavages of the HCV polyprotein appear to involve recognition of polyprotein cleavage junctions by an NS3 molecule of another polypeptide. In these reactions, NS3 liberates an NS3 cofactor (NS4a), NS4b and NS5a (NS5A has a phosphorylation function), and an RNA-dependent RNA polymerase (NS5b).

A number of general and specific polypeptides useful as immunological and diagnostic reagents for HCV, derived from the HCV polyprotein, have been described. See, e.g., Houghton et al., European Publication Nos. 318,216 and 388,232; Choo et al., *Science* (1989) 244:359-362; Kuo et al., *Science* (1989) 244:362-364; Houghton et al., *Hepatology* (1991) 14:381-388; Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:10011-10015; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8:S33-39; Chien et al., International Publication No. WO 93/00365; Chien, D.Y., International Publication No. WO 94/01778. These publications provide an extensive background on HCV generally, as well as on the manufacture and uses of HCV polypeptide immunological reagents.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Sensitive, specific methods for screening and identifying carriers of HCV and HCV-contaminated blood or blood products would provide an important advance in medicine. Post-transfusion hepatitis (PTH) occurs in approximately 10% of transfused patients, and HCV has accounted for up to 90% of these cases. Patient care as well as the prevention and transmission of HCV by blood and blood products or by close personal contact require reliable diagnostic and prognostic tools. Accordingly, several assays have been developed for the serodiagnosis of HCV infection. See, e.g., Choo et al., *Science* (1989) 244:359-362; Kuo et al., *Science* (1989) 244:362-364; Choo et al., *Br. Med. Bull.* (1990) 46:423-441; Ebeling et al., *Lancet* (1990) 335:982-983; van der Poel et al., *Lancet* (1990) 335:558-560; van der Poel et al., *Lancet* (1991) 337:317-319; Chien, D.Y., International Publication No. WO 94/01778; Valenzuela et al., International Publication No. WO 97/44469; and Kashiwakuma et al., U.S. Patent No. 5,871,904.

A significant problem encountered with some serum-based assays is that there is a significant gap between infection and detection of the virus, often exceeding 80 days. This assay gap may create great risk for blood transfusion recipients. To overcome this problem, nucleic acid-based tests (NAT) that detect viral RNA directly, and HCV core antigen tests that assay viral antigen instead of antibody response, have been developed. See, e.g., Kashiwakuma et al., U.S. Patent No. 5,871,904.

However, there remains a need for sensitive, accurate diagnostic and prognostic tools in order to provide adequate patient care as well as to prevent transmission of HCV by blood and blood products or by close personal contact.

Summary of the Invention

The present invention is based in part, on the finding that the use of NS3/4a conformational epitopes, in combination with multiple epitope fusion antigens, provides a sensitive and reliable method for detecting early HCV seroconversion. The assays described herein can also detect HCV infection caused by any of the six known genotypes of HCV. The use of multiple epitope fusion proteins also has the added advantages of decreasing masking problems, improving sensitivity in detecting antibodies by allowing a greater number of epitopes on a unit area of substrate, and improving selectivity.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Accordingly, in one embodiment, the subject invention is directed to an immunoassay solid support consisting essentially of at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, bound thereto, wherein said NS3/4a epitope and/or said multiple epitope fusion antigen react specifically with anti-
5 HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

The NS3/4a epitope may comprise the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto, or 90% sequence identity thereto, or at least 98% sequence identity thereto, or any integer in
10 between, so long as the sequence has protease activity. In certain embodiments, the NS3/4a conformational epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D.

In additional embodiments, the multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto, or 90% sequence identity thereto, or at least 98%
15 sequence identity thereto, or any integer in between, so long as the sequence reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual. In certain embodiments, the multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

In yet another embodiment, the subject invention is directed to an immunoassay
20 solid support consisting essentially of at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, bound thereto, wherein said NS3/4a conformational epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto which has protease activity, and said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence
25 depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual. In certain embodiments, the NS3/4a conformational epitope and the multiple epitope fusion antigen have at least 90%, 98% (or any integer between) sequence identity to the amino acid sequences of Figures 3A-3D and Figures
30 5A-5F, respectively, so long as the NS3/4a sequence has protease activity, and the

WO 01/96870

PCT/US01/19156

multiple epitope fusion antigen reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual. In certain embodiments, the NS3/4a conformational epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, and the multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in
5 Figures 5A-5F.

In another embodiment, the invention is directed to an immunoassay solid support consisting essentially of at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, bound thereto, wherein said NS3/4a conformational epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, and said multiple epitope
10 fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

In still a further embodiment, the invention is directed to a method of detecting hepatitis C virus (HCV) infection in a biological sample, said method comprising:

- (a) providing an immunoassay solid support as described above;
- (b) combining a biological sample with said solid support under conditions which
15 allow HCV antibodies, when present in the biological sample, to bind to said NS3/4a epitope and/or said multiple epitope fusion antigen to form a first immune complex;
- (c) adding to the solid support from step (b) under complex forming conditions a detectably labeled antibody, wherein said labeled antibody is reactive with said immune complex;
- 20 (d) detecting second immune complexes formed between the detectably labeled antibody and the first immune complex, if any, as an indication of HCV infection in the biological sample.

In still a further embodiment, the invention is directed to a method of detecting hepatitis C virus (HCV) infection in a biological sample, said method comprising:

- 25 (a) providing an immunoassay solid support consisting essentially of at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, bound thereto, wherein said NS3/4a conformational epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, and said multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F;

WO 01/96870

PCT/US01/19156

(b) combining a biological sample with said solid support under conditions which allow HCV antibodies, when present in the biological sample, to bind to said NS3/4a epitope and/or said multiple epitope fusion antigen to form a first immune complex;

5 (c) adding to the solid support from step (b) under complex forming conditions a detectably labeled antibody, wherein said labeled antibody is reactive with said immune complex;

(d) detecting second immune complexes formed between the detectably labeled antibody and the first immune complex, if any, as an indication of HCV infection in the biological sample.

10 In another embodiment, the invention is directed to an immunodiagnostic test kit comprising an immunoassay solid support as described above, and instructions for conducting the immunodiagnostic test.

In another embodiment, the subject invention is directed to a method of producing an immunoassay solid support, comprising:

15 (a) providing a solid support; and

(b) binding to the solid support at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, wherein said NS3/4a epitope and/or said multiple epitope fusion antigen react specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

20 In certain embodiments, the conformational epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto, or 90% sequence identity thereto, or at least 98% sequence identity thereto, or any integer in between, so long as the sequence has protease activity; and the multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in
25 Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto, or 90% sequence identity thereto, or at least 98% sequence identity thereto, or any integer in between, so long as the sequence reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

In still further embodiments, the NS3/4a conformational epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D and the multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

5 In another embodiment, the invention is directed to a method of producing an immunoassay solid support, comprising:

(a) providing a solid support; and

(b) binding to the solid support at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, wherein said NS3/4a conformational epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, and said multiple epitope
10 fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

In still a further embodiment, the subject invention is directed to a multiple epitope fusion antigen comprising the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto, or 90% sequence identity thereto, or an amino acid sequence with at least 98% sequence identity thereto, or
15 any integer in between, which sequence reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

In certain embodiments, the multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

In other embodiments, the invention is directed to a polynucleotide comprising a
20 coding sequence for the multiple epitope fusion antigen, a recombinant vector comprising the polynucleotide and control elements operably linked to said polynucleotide whereby the coding sequence can be transcribed and translated in a host cell, a host cell transformed with the recombinant vector, and a method of producing a recombinant multiple epitope fusion antigen comprising providing a population of host cells as above
25 and culturing said population of cells under conditions whereby the multiple epitope fusion antigen encoded by the coding sequence present in said recombinant vector is expressed.

These and other aspects of the present invention will become evident upon reference to the following detailed description and attached drawings.

30

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a diagrammatic representation of the HCV genome, depicting the various regions of the polyprotein from which the present assay reagents (proteins and antibodies) are derived.

5 Figure 2 is a schematic drawing of a representative immunoassay under the invention.

Figures 3A through 3D depict the DNA and corresponding amino acid sequence of a representative NS3/4a conformational antigen for use in the present assays. The amino acids at positions 403 and 404 of Figures 3A through 3D represent substitutions of
10 Pro for Thr, and Ile for Ser, of the native amino acid sequence of HCV-1.

Figure 4 is a diagrammatic representation of MEFA 7.1.

Figures 5A-5F depict the DNA and corresponding amino acid sequence of MEFA
15 7.1.

Figures 6A-6C show representative MEFA's for use with the subject
15 immunoassays. Figure 6A is a diagrammatic representation of MEFA 3. Figure 6B is a diagrammatic representation of MEFA 5. Figure 6C is a diagrammatic representation of MEFA 6.

Figures 7A-7D are diagrams of the construction of psMEFA7.

Figure 8 is a diagram of the construction of psMEFA7.1.

20 Figure 9 is a diagram of the construction of pd.HCV1a.ns3ns4aPI.

Detailed Description of the Invention

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional methods of chemistry, biochemistry, recombinant DNA techniques and
25 immunology, within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., *Fundamental Virology*, 2nd Edition, vol. I & II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L.
30 Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al.,

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

It must be noted that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms "a", "an" and "the" include plural referents unless the content clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "an antigen" includes a mixture of two or more antigens, and the like.

The following amino acid abbreviations are used throughout the text:

	Alanine: Ala (A)	Arginine: Arg (R)
	Asparagine: Asn (N)	Aspartic acid: Asp (D)
10	Cysteine: Cys (C)	Glutamine: Gln (Q)
	Glutamic acid: Glu (E)	Glycine: Gly (G)
	Histidine: His (H)	Isoleucine: Ile (I)
	Leucine: Leu (L)	Lysine: Lys (K)
	Methionine: Met (M)	Phenylalanine: Phe (F)
15	Proline: Pro (P)	Serine: Ser (S)
	Threonine: Thr (T)	Tryptophan: Trp (W)
	Tyrosine: Tyr (Y)	Valine: Val (V)

I. Definitions

In describing the present invention, the following terms will be employed, and are intended to be defined as indicated below.

The terms "polypeptide" and "protein" refer to a polymer of amino acid residues and are not limited to a minimum length of the product. Thus, peptides, oligopeptides, dimers, multimers, and the like, are included within the definition. Both full-length proteins and fragments thereof are encompassed by the definition. The terms also include postexpression modifications of the polypeptide, for example, glycosylation, acetylation, phosphorylation and the like. Furthermore, for purposes of the present invention, a "polypeptide" refers to a protein which includes modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature), to the native sequence, so

WO 01/96870

PCT/US01/19156

long as the protein maintains the desired activity. These modifications may be deliberate, as through site-directed mutagenesis, or may be accidental, such as through mutations of hosts which produce the proteins or errors due to PCR amplification.

5 An HCV polypeptide is a polypeptide, as defined above, derived from the HCV polyprotein. The polypeptide need not be physically derived from HCV, but may be synthetically or recombinantly produced. Moreover, the polypeptide may be derived from any of the various HCV strains and isolates, such as, but not limited to, any of the isolates from strains 1, 2, 3, 4, 5 or 6 of HCV. A number of conserved and variable regions are known between these strains and, in general, the amino acid sequences of
10 epitopes derived from these regions will have a high degree of sequence homology, e.g., amino acid sequence homology of more than 30%, preferably more than 40%, when the two sequences are aligned. Thus, for example, the term "NS3/4a" polypeptide refers to native NS3/4a from any of the various HCV strains, as well as NS3/4a analogs, muteins and immunogenic fragments, as defined further below. The complete genotypes of many
15 of these strains are known. See, e.g., U.S. Patent No. 6,150,087 and GenBank Accession Nos. AJ238800 and AJ238799.

The terms "analog" and "mutein" refer to biologically active derivatives of the reference molecule, or fragments of such derivatives, that retain desired activity, such as immunoreactivity in the assays described herein. In general, the term "analog" refers to
20 compounds having a native polypeptide sequence and structure with one or more amino acid additions, substitutions (generally conservative in nature) and/or deletions, relative to the native molecule, so long as the modifications do not destroy immunogenic activity. The term "mutein" refers to peptides having one or more peptide mimics ("peptoids"), such as those described in International Publication No. WO 91/04282. Preferably, the
25 analog or mutein has at least the same immunoactivity as the native molecule. Methods for making polypeptide analogs and muteins are known in the art and are described further below.

Particularly preferred analogs include substitutions that are conservative in nature, i.e., those substitutions that take place within a family of amino acids that are related in
30 their side chains. Specifically, amino acids are generally divided into four families: (1)

WO 01/96870

PCT/US01/19156

acidic -- aspartate and glutamate; (2) basic -- lysine, arginine, histidine; (3) non-polar -- alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan; and (4) uncharged polar -- glycine, asparagine, glutamine, cysteine, serine, threonine, tyrosine. Phenylalanine, tryptophan, and tyrosine are sometimes classified as aromatic amino acids. For example, it is reasonably predictable that an isolated replacement of leucine with isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, a threonine with a serine, or a similar conservative replacement of an amino acid with a structurally related amino acid, will not have a major effect on the biological activity. For example, the polypeptide of interest may include up to about 5-10 conservative or non-conservative amino acid substitutions, or even up to about 15-25 conservative or non-conservative amino acid substitutions, or any integer between 5-25, so long as the desired function of the molecule remains intact. One of skill in the art may readily determine regions of the molecule of interest that can tolerate change by reference to Hopp/Woods and Kyte-Doolittle plots, well known in the art.

By "fragment" is intended a polypeptide consisting of only a part of the intact full-length polypeptide sequence and structure. The fragment can include a C-terminal deletion and/or an N-terminal deletion of the native polypeptide. An "immunogenic fragment" of a particular HCV protein will generally include at least about 5-10 contiguous amino acid residues of the full-length molecule, preferably at least about 15-25 contiguous amino acid residues of the full-length molecule, and most preferably at least about 20-50 or more contiguous amino acid residues of the full-length molecule, that define an epitope, or any integer between 5 amino acids and the full-length sequence, provided that the fragment in question retains immunoreactivity in the assays described herein. For example, preferred immunogenic fragments, include but are not limited to fragments of HCV core that comprise, e.g., amino acids 10-45, 10-53, 67-88, and 120-130 of the polyprotein, epitope 5-1-1 (in the NS4a/NS4b region of the viral genome) as well as defined epitopes derived from any of the regions of the polyprotein shown in Figure 1, such as but not limited to the E1, E2, NS3 (e.g., polypeptide c33c from the NS3 region), NS4 (e.g., polypeptide c100 from the NS3/NS4 regions), NS3/4a and NS5 regions of the HCV polyprotein, as well as any of the other various epitopes identified

WO 01/96870

PCT/US01/19156

from the HCV polyprotein. See, e.g., Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89:10011-10015; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8:S33-39; Chien et al., International Publication No. WO 93/00365; Chien, D.Y., International Publication No. WO 94/01778; U.S. Patent Nos. 6,150,087 and 6,121,020.

- 5 The term "epitope" as used herein refers to a sequence of at least about 3 to 5, preferably about 5 to 10 or 15, and not more than about 1,000 amino acids (or any integer therebetween), which define a sequence that by itself or as part of a larger sequence, binds to an antibody generated in response to such sequence. There is no critical upper limit to the length of the fragment, which may comprise nearly the full-length of the
- 10 protein sequence, or even a fusion protein comprising two or more epitopes from the HCV polyprotein. An epitope for use in the subject invention is not limited to a polypeptide having the exact sequence of the portion of the parent protein from which it is derived. Indeed, viral genomes are in a state of constant flux and contain several variable domains which exhibit relatively high degrees of variability between isolates.
- 15 Thus the term "epitope" encompasses sequences identical to the native sequence, as well as modifications to the native sequence, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature).

- Regions of a given polypeptide that include an epitope can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. See, e.g., *Epitope*
- 20 *Mapping Protocols* in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. For example, linear epitopes may be determined by e.g., concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still attached to the supports. Such
- 25 techniques are known in the art and described in, e.g., U.S. Patent No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:178-182; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715. Using such techniques, a number of epitopes of HCV have been identified. See, e.g., Chien et al., *Viral Hepatitis and Liver Disease* (1994) pp. 320-324, and further below.
- 30 Similarly, conformational epitopes are readily identified by determining spatial

WO 01/96870

PCT/US01/19156

conformation of amino acids such as by, e.g., x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, e.g., *Epitope Mapping Protocols, supra*. Antigenic regions of proteins can also be identified using standard antigenicity and hydropathy plots, such as those calculated using, e.g., the Omega version 1.0 software program
5 available from the Oxford Molecular Group. This computer program employs the Hopp/Woods method, Hopp et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1981) 78:3824-3828 for determining antigenicity profiles, and the Kyte-Doolittle technique, Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105-132 for hydropathy plots.

As used herein, the term "conformational epitope" refers to a portion of a full-length protein, or an analog or mutein thereof, having structural features native to the
10 amino acid sequence encoding the epitope within the full-length natural protein. Native structural features include, but are not limited to, glycosylation and three dimensional structure. The length of the epitope defining sequence can be subject to wide variations as these epitopes are believed to be formed by the three-dimensional shape of the antigen
15 (e.g., folding). Thus, amino acids defining the epitope can be relatively few in number, but widely dispersed along the length of the molecule, being brought into correct epitope conformation via folding. The portions of the antigen between the residues defining the epitope may not be critical to the conformational structure of the epitope. For example, deletion or substitution of these intervening sequences may not affect the conformational
20 epitope provided sequences critical to epitope conformation are maintained (e.g., cysteines involved in disulfide bonding, glycosylation sites, etc.).

Conformational epitopes present in the NS3/4a region are readily identified using methods discussed above. Moreover, the presence or absence of a conformational epitope in a given polypeptide can be readily determined through screening the antigen of
25 interest with an antibody (polyclonal serum or monoclonal to the conformational epitope) and comparing its reactivity to that of a denatured version of the antigen which retains only linear epitopes (if any). In such screening using polyclonal antibodies, it may be advantageous to absorb the polyclonal serum first with the denatured antigen and see if it retains antibodies to the antigen of interest. Additionally, in the case of NS3/4a, a
30 molecule which preserves the native conformation will also have protease and,

WO 01/96870

PCT/US01/19156

optionally, helicase enzymatic activities. Such activities can be detected using enzymatic assays, as described further below.

Preferably, a conformational epitope is produced recombinantly and is expressed in a cell from which it is extractable under conditions which preserve its desired structural features, e.g. without denaturation of the epitope. Such cells include bacteria, yeast, insect, and mammalian cells. Expression and isolation of recombinant conformational epitopes from the HCV polyprotein are described in e.g., International Publication Nos. WO 96/04301, WO 94/01778, WO 95/33053, WO 92/08734. Alternatively, it is possible to express the antigens and further renature the protein after recovery. It is also understood that chemical synthesis may also provide conformational antigen mimitopes that cross-react with the "native" antigen's conformational epitope.

The term "multiple epitope fusion antigen" or "MEFA" as used herein intends a polypeptide in which multiple HCV antigens are part of a single, continuous chain of amino acids, which chain does not occur in nature. The HCV antigens may be connected directly to each other by peptide bonds or may be separated by intervening amino acid sequences. The fusion antigens may also contain sequences exogenous to the HCV polyprotein. Moreover, the HCV sequences present may be from multiple genotypes and/or isolates of HCV. Examples of particular MEFA's for use in the present immunoassays are detailed in, e.g., International Publication No. WO 97/44469, and are described further below.

An "antibody" intends a molecule that, through chemical or physical means, specifically binds to a polypeptide of interest. Thus, for example, an HCV core antibody is a molecule that specifically binds to the HCV core protein. The term "antibody" as used herein includes antibodies obtained from both polyclonal and monoclonal preparations, as well as, the following: hybrid (chimeric) antibody molecules (see, for example, Winter et al. (1991) *Nature* 349:293-299; and U.S. Patent No. 4,816,567); F(ab')₂ and F(ab) fragments; Fv molecules (non-covalent heterodimers, see, for example, Inbar et al. (1972) *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2659-2662; and Ehrlich et al. (1980) *Biochem* 19:4091-4096); single-chain Fv molecules (sFv) (see, for example, Huston et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-5883); dimeric and trimeric antibody fragment

WO 01/96870

PCT/US01/19156

constructs; minibodies (see, e.g., Pack et al. (1992) *Biochem* 31:1579-1584; Cumber et al. (1992) *J Immunology* 149B:120-126); humanized antibody molecules (see, for example, Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536; and U.K. Patent Publication No. GB 2,276,169, published 21 September 1994);
5 and, any functional fragments obtained from such molecules, wherein such fragments retain immunological binding properties of the parent antibody molecule.

As used herein, the term "monoclonal antibody" refers to an antibody composition having a homogeneous antibody population. The term is not limited regarding the species or source of the antibody, nor is it intended to be limited by the
10 manner in which it is made. Thus, the term encompasses antibodies obtained from murine hybridomas, as well as human monoclonal antibodies obtained using human rather than murine hybridomas. See, e.g., Cote, et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 1985, p. 77.

By "isolated" is meant, when referring to a polypeptide, that the indicated
15 molecule is separate and discrete from the whole organism with which the molecule is found in nature or is present in the substantial absence of other biological macromolecules of the same type. The term "isolated" with respect to a polynucleotide is a nucleic acid molecule devoid, in whole or part, of sequences normally associated with it in nature; or a sequence, as it exists in nature, but having heterologous sequences in
20 association therewith; or a molecule disassociated from the chromosome.

By "equivalent antigenic determinant" is meant an antigenic determinant from different sub-species or strains of HCV, such as from strains 1, 2, or 3 of HCV. More specifically, epitopes are known, such as 5-1-1, and such epitopes vary between the strains 1, 2, and 3. Thus, the epitope 5-1-1 from the three different strains are equivalent
25 antigenic determinants and thus are "copies" even though their sequences are not identical. In general the amino acid sequences of equivalent antigenic determinants will have a high degree of sequence homology, e.g., amino acid sequence homology of more than 30%, preferably more than 40%, when the two sequences are aligned.

"Homology" refers to the percent similarity between two polynucleotide or two
30 polypeptide moieties. Two DNA, or two polypeptide sequences are "substantially

WO 01/96870

PCT/US01/19156

homologous" to each other when the sequences exhibit at least about 50% , preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%-85%, preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95%-98% sequence similarity over a defined length of the molecules. As used herein, substantially homologous also refers to sequences showing complete identity to the specified DNA or polypeptide sequence.

In general, "identity" refers to an exact nucleotide-to-nucleotide or amino acid-to-amino acid correspondence of two polynucleotides or polypeptide sequences, respectively. Percent identity can be determined by a direct comparison of the sequence information between two molecules by aligning the sequences, counting the exact number of matches between the two aligned sequences, dividing by the length of the shorter sequence, and multiplying the result by 100.

Readily available computer programs can be used to aid in the analysis of homology or identity, such as ALIGN, Dayhoff, M.O. in *Atlas of Protein Sequence and Structure* M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC, which adapts the local homology algorithm of Smith and Waterman *Advances in Appl. Math.* 2:482-489, 1981 for peptide analysis. Programs for determining nucleotide sequence homology are available in the Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (available from Genetics Computer Group, Madison, WI) for example, the BESTFIT, FASTA and GAP programs, which also rely on the Smith and Waterman algorithm. These programs are readily utilized with the default parameters recommended by the manufacturer and described in the Wisconsin Sequence Analysis Package referred to above. For example, percent homology of a particular nucleotide sequence to a reference sequence can be determined using the homology algorithm of Smith and Waterman with a default scoring table and a gap penalty of six nucleotide positions.

Another method of establishing percent homology in the context of the present invention is to use the MPSRCH package of programs copyrighted by the University of Edinburgh, developed by John F. Collins and Shane S. Sturrok, and distributed by IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). From this suite of packages the Smith-Waterman algorithm can be employed where default parameters are used for the scoring

WO 01/96870

PCT/US01/19156

table (for example, gap open penalty of 12, gap extension penalty of one, and a gap of six). From the data generated the "Match" value reflects "sequence homology." Other suitable programs for calculating the percent identity or similarity between sequences are generally known in the art, for example, another alignment program is BLAST, used with default parameters. For example, BLASTN and BLASTP can be used using the following default parameters: genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Details of these programs can be found at the following internet address: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Alternatively, homology can be determined by hybridization of polynucleotides under conditions which form stable duplexes between homologous regions, followed by digestion with single-stranded-specific nuclease(s), and size determination of the digested fragments. DNA sequences that are substantially homologous can be identified in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions, as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art. See, e.g., Sambrook et al., *supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

A "coding sequence" or a sequence which "encodes" a selected polypeptide, is a nucleic acid molecule which is transcribed (in the case of DNA) and translated (in the case of mRNA) into a polypeptide *in vitro* or *in vivo* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxy) terminus. A transcription termination sequence may be located 3' to the coding sequence.

"Operably linked" refers to an arrangement of elements wherein the components so described are configured so as to perform their desired function. Thus, a given promoter operably linked to a coding sequence is capable of effecting the expression of the coding sequence when the proper transcription factors, etc., are present. The promoter need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions to direct the expression thereof. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed

WO 01/96870

PCT/US01/19156

sequences can be present between the promoter sequence and the coding sequence, as can transcribed introns, and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

5 "Recombinant" as used herein to describe a nucleic acid molecule means a polynucleotide of genomic, cDNA, viral, semisynthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or manipulation is not associated with all or a portion of the polynucleotide with which it is associated in nature. The term "recombinant" as used with respect to a protein or polypeptide means a polypeptide produced by expression of a recombinant polynucleotide. In general, the gene of interest is cloned and then expressed
10 in transformed organisms, as described further below. The host organism expresses the foreign gene to produce the protein under expression conditions.

A "control element" refers to a polynucleotide sequence which aids in the expression of a coding sequence to which it is linked. The term includes promoters, transcription termination sequences, upstream regulatory domains, polyadenylation
15 signals, untranslated regions, including 5'-UTRs and 3'-UTRs and when appropriate, leader sequences and enhancers, which collectively provide for the transcription and translation of a coding sequence in a host cell.

A "promoter" as used herein is a DNA regulatory region capable of binding RNA polymerase in a host cell and initiating transcription of a downstream (3' direction)
20 coding sequence operably linked thereto. For purposes of the present invention, a promoter sequence includes the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription of a gene of interest at levels detectable above background. Within the promoter sequence is a transcription initiation site, as well as protein binding domains (consensus sequences) responsible for the binding of RNA polymerase. Eucaryotic
25 promoters will often, but not always, contain "TATA" boxes and "CAT" boxes.

A control sequence "directs the transcription" of a coding sequence in a cell when RNA polymerase will bind the promoter sequence and transcribe the coding sequence into mRNA, which is then translated into the polypeptide encoded by the coding sequence.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

“Expression cassette” or “expression construct” refers to an assembly which is capable of directing the expression of the sequence(s) or gene(s) of interest. The expression cassette includes control elements, as described above, such as a promoter which is operably linked to (so as to direct transcription of) the sequence(s) or gene(s) of interest, and often includes a polyadenylation sequence as well. Within certain
5 embodiments of the invention, the expression cassette described herein may be contained within a plasmid construct. In addition to the components of the expression cassette, the plasmid construct may also include, one or more selectable markers, a signal which allows the plasmid construct to exist as single-stranded DNA (e.g., a M13 origin of
10 replication), at least one multiple cloning site, and a “mammalian” origin of replication (e.g., a SV40 or adenovirus origin of replication).

“Transformation,” as used herein, refers to the insertion of an exogenous polynucleotide into a host cell, irrespective of the method used for insertion: for example, transformation by direct uptake, transfection, infection, and the like. For
15 particular methods of transfection, see further below. The exogenous polynucleotide may be maintained as a nonintegrated vector, for example, an episome, or alternatively, may be integrated into the host genome.

A “host cell” is a cell which has been transformed, or is capable of transformation, by an exogenous DNA sequence.

20 As used herein, a “biological sample” refers to a sample of tissue or fluid isolated from a subject, that commonly includes antibodies produced by the subject. Typical samples that include such antibodies are known in the art and include but not limited to, blood, plasma, serum, fecal matter, urine, bone marrow, bile, spinal fluid, lymph fluid, samples of the skin, secretions of the skin, respiratory, intestinal, and genitourinary tracts,
25 tears, saliva, milk, blood cells, organs, biopsies and also samples of *in vitro* cell culture constituents including but not limited to conditioned media resulting from the growth of cells and tissues in culture medium, e.g., recombinant cells, and cell components.

“Common solid support” intends a single solid matrix to which the HCV polypeptides used in the subject immunoassays are bound covalently or by noncovalent
30 means such as hydrophobic adsorption.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

"Immunologically reactive" means that the antigen in question will react specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

5 "Immune complex" intends the combination formed when an antibody binds to an epitope on an antigen.

As used herein, the terms "label" and "detectable label" refer to a molecule capable of detection, including, but not limited to, radioactive isotopes, fluorescers, chemiluminescers, chromophores, enzymes, enzyme substrates, enzyme cofactors, enzyme inhibitors, chromophores, dyes, metal ions, metal sols, ligands (e.g., biotin, 10 avidin, streptavidin or haptens) and the like. The term "fluorescer" refers to a substance or a portion thereof which is capable of exhibiting fluorescence in the detectable range. Particular examples of labels which may be used under the invention include, but are not limited to, horse radish peroxidase (HRP), fluorescein, FITC, rhodamine, dansyl, umbelliferone, dimethyl acridinium ester (DMAE), Texas red, luminol, NADPH and α - β - 15 galactosidase.

II. Modes of Carrying out the Invention

Before describing the present invention in detail, it is to be understood that this invention is not limited to particular formulations or process parameters as such may, of 20 course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments of the invention only, and is not intended to be limiting.

Although a number of compositions and methods similar or equivalent to those described herein can be used in the practice of the present invention, the preferred 25 materials and methods are described herein.

As noted above, the present invention is based on the discovery of novel diagnostic methods for accurately detecting early HCV infection. The methods rely on the identification and use of highly immunogenic HCV antigens which are present during the early stages of HCV seroconversion, thereby increasing detection accuracy and 30 reducing the incidence of false results. In particular, the immunoassays described herein

WO 01/96870

PCT/US01/19156

utilize highly immunogenic conformational epitopes derived from the NS3/4a region of the HCV polyprotein, and multiple epitope fusion antigens comprising various HCV polypeptides, either from the same or different HCV genotypes and isolates, such as multiple immunodominant epitopes, for example, major linear epitopes of HCV core, E1, E2, NS3, 5-1-1, c100-3 and NS5 sequences. The methods can be conveniently practiced in a single assay, using any of the several assay formats described below, such as but not limited to, assay formats which utilize a solid support to which the HCV antigens are bound.

The NS3/4a region of the HCV polyprotein has been described and the amino acid sequence and overall structure of the protein are disclosed in, e.g., Yao et al., *Structure* (November 1999) 7:1353-1363; Sali et al., *Biochem.* (1998) 37:3392-3401; and Bartenschlager, R., *J. Viral Hepat.* (1999) 6:165-181. See, also, Dasmahapatra et al., U.S. Patent No. 5,843,752. The subject immunoassays utilize at least one conformational epitope derived from the NS3/4a region that exists in the conformation as found in the naturally occurring HCV particle or its infective product, as evidenced by the preservation of protease and, optionally, helicase enzymatic activities normally displayed by the NS3/4a gene product and/or immunoreactivity of the antigen with antibodies in a biological sample from an HCV-infected subject, and a loss of the epitope's immunoreactivity upon denaturation of the antigen. For example, the conformational epitope can be disrupted by heating, changing the pH to extremely acid or basic, or by adding known organic denaturants, such as dithiothreitol (DTT) or an appropriate detergent. See, e.g., *Protein Purification Methods, a practical approach* (E.L.V. Harris and S. Angal eds., IRL Press) and the denatured product compared to the product which is not treated as above.

Protease and helicase activity may be determined using standard enzyme assays well known in the art. For example, protease activity may be determined using the procedure described below in the examples, as well as using assays well known in the art. See, e.g., Takeshita et al., *Anal. Biochem.* (1997) 247:242-246; Kakiuchi et al., *J. Biochem.* (1997) 122:749-755; Sali et al., *Biochemistry* (1998) 37:3392-3401; Cho et al., *J. Virol. Meth.* (1998) 72:109-115; Cerretani et al., *Anal. Biochem.* (1999) 266:192-197;

WO 01/96870

PCT/US01/19156

- Zhang et al., *Anal. Biochem.* (1999) 270:268-275; Kakiuchi et al., *J. Virol. Meth.* (1999) 80:77-84; Fowler et al., *J. Biomol. Screen.* (2000) 5:153-158; and Kim et al., *Anal. Biochem.* (2000) 284:42-48. Similarly, helicase activity assays are well known in the art and helicase activity of an NS3/4a epitope may be determined using, for example, an
- 5 ELISA assay, as described in, e.g., Hsu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998) 253:594-599; a scintillation proximity assay system, as described in Kyono et al., *Anal. Biochem.* (1998) 257:120-126; high throughput screening assays as described in, e.g., Hicham et al., *Antiviral Res.* (2000) 46:181-193 and Kwong et al., *Methods Mol. Med.* (2000) 24:97-116; as well as by other assay methods known in the art. See, e.g., Khu et
- 10 al., *J. Virol.* (2001) 75:205-214; Utama et al., *Virology* (2000) 273:316-324; Paolini et al., *J. Gen. Virol.* (2000) 81:1335-1345; Preugschat et al., *Biochemistry* (2000) 39:5174-5183; Preugschat et al., *Methods Mol. Med.* (1998) 19:353-364; and Hesson et al., *Biochemistry* (2000) 39:2619-2625.

- The length of the antigen is sufficient to maintain an immunoreactive
- 15 conformational epitope. Often, the polypeptide containing the antigen used will be almost full-length, however, the polypeptide may also be truncated to, for example, increase solubility or to improve secretion. Generally, the conformational epitope found in NS3/4a is expressed as a recombinant polypeptide in a cell and this polypeptide provides the epitope in a desired form, as described in detail below.

- 20 A representative amino acid sequence for the NS3/4a polypeptide is shown in Figures 3A through 3D. The amino acid sequence shown at positions 2-686 of the figure corresponds to amino acid positions 1027-1711 of HCV-1. An initiator codon (ATG) coding for Met, is shown as position 1. Additionally, the Thr normally occurring at position 1428 of HCV-1 (amino acid position 403 of Figure 3) is mutated to Pro, and the
- 25 Ser normally occurring at position 1429 of HCV-1 (amino acid position 404 of Figure 3) is mutated to Ile. However, either the native sequence, with or without an N-terminal Met, the depicted analog, with or without the N-terminal Met, or other analogs and fragments can be used in the subject assays, so long as the epitope is produced using a method that retains or reinstates its native conformation such that protease activity, and

WO 01/96870

PCT/US01/19156

optionally, helicase activity is retained. Dasmahapatra et al., U.S. Patent No. 5,843,752 and Zhang et al., U.S. Patent No. 5,990,276, both describe analogs of NS3/4a.

The NS3 protease of NS3/4a is found at about positions 1027-1207, numbered relative to HCV-1 (see, Choo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:2451-2455), positions 2-182 of Figure 3. The structure of the NS3 protease and active site are known. See, e.g., De Francesco et al., *Antivir. Ther.* (1998) 3:99-109; Koch et al., *Biochemistry* (2001) 40:631-640. Changes to the native sequence that will normally be tolerated will be those outside of the active site of the molecule. Particularly, it is desirable to maintain amino acids 1- or 2-155 of Figure 3, with little or only conservative substitutions. Amino acids occurring beyond 155 will tolerate greater changes. Additionally, if fragments of the NS3/4a sequence found in Figure 3 are used, these fragments will generally include at least amino acids 1- or 2-155, preferably amino acids 1- or 2-175, and most preferably amino acids 1- or 2-182, with or without the N-terminal Met. The helicase domain is found at about positions 1193-1657 of HCV-1 (positions 207-632 of Figure 3). Thus, if helicase activity is desired, this portion of the molecule will be maintained with little or only conservative changes. One of skill in the art can readily determine other regions that will tolerate change based on the known structure of NS3/4a.

The immunoassays described herein also utilize multiple epitope fusion antigens (termed "MEFAs"), as described in International Publication No. WO 97/44469. Such MEFAs include multiple epitopes derived from two or more of the various viral regions of the HCV polyprotein shown in Figure 1 and Table 1. In particular, as shown in Figure 1 and Table 1, An HCV polyprotein, upon cleavage, produces at least ten distinct products, in the order of NH₂-Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH. The core polypeptide occurs at positions 1-191, numbered relative to HCV-1 (see, Choo et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455, for the HCV-1 genome). This polypeptide is further processed to produce an HCV polypeptide with approximately amino acids 1-173. The envelope polypeptides, E1 and E2, occur at about positions 192-383 and 384-746, respectively. The P7 domain is found at about positions 747-809. NS2 is an integral membrane protein with proteolytic activity and is found at about positions 810-1026 of the polyprotein. NS2, either alone or in combination with

WO 01/96870

PCT/US01/19156

NS3 (found at about positions 1027-1657), cleaves the NS2-NS3 sissle bond which in turn generates the NS3 N-terminus and releases a large polyprotein that includes both serine protease and RNA helicase activities. The NS3 protease, found at about positions 1027-1207, serves to process the remaining polyprotein. The helicase activity is found at about positions 1193-1657. Completion of polyprotein maturation is initiated by autocatalytic cleavage at the NS3-NS4a junction, catalyzed by the NS3 serine protease. Subsequent NS3-mediated cleavages of the HCV polyprotein appear to involve recognition of polyprotein cleavage junctions by an NS3 molecule of another polypeptide. In these reactions, NS3 liberates an NS3 cofactor (NS4a, found about positions 1658-1711), two proteins (NS4b found at about positions 1712-1972, and NS5a found at about positions 1973-2420), and an RNA-dependent RNA polymerase (NS5b found at about positions 2421-3011).

15

20

25

Table 1	
Domain	Approximate Boundaries*
C (core)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

*Numbered relative to HCV-1. See, Choo et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

The multiple HCV antigens are part of a single, continuous chain of amino acids, which chain does not occur in nature. Thus, the linear order of the epitopes is different than their linear order in the genome in which they occur. The linear order of the sequences of the MEFAs for use herein is preferably arranged for optimum antigenicity.

5 Preferably, the epitopes are from more than one HCV strain, thus providing the added ability to detect multiple strains of HCV in a single assay. Thus, the MEFAs for use herein may comprise various immunogenic regions derived from the polyprotein described above. Moreover, a protein resulting from a frameshift in the core region of the polyprotein, such as described in International Publication No. WO 99/63941, may

10 be used in the MEFAs. If desired, at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 or more of one or more epitopes derived from the HCV polyprotein may occur in the fusion protein.

For example, epitopes derived from, e.g., the hypervariable region of E2, such as a region spanning amino acids 384-410 or 390-410, can be included in the MEFA antigen. A particularly effective E2 epitope is one which includes a consensus sequence derived from this region, such as the consensus sequence Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn, which represents a

15 consensus sequence for amino acids 390-410 of the HCV type 1 genome. A representative E2 epitope present in a MEFA of the invention can comprise a hybrid epitope spanning amino acids 390-444. Such a hybrid E2 epitope can include a

20 consensus sequence representing amino acids 390-410 fused to the native amino acid sequence for amino acids 411-444 of HCV E2.

Additionally, the antigens may be derived from various HCV strains. Multiple viral strains of HCV are known, and epitopes derived from any of these strains can be used in a fusion protein. It is well known that any given species of organism varies from

25 one individual organism to another and further that a given organism such as a virus can have a number of different strains. For example, as explained above, HCV includes at least 6 genotypes. Each of these genotypes includes equivalent antigenic determinants. More specifically, each strain includes a number of antigenic determinants that are present on all strains of the virus but are slightly different from one viral strain to

30 another. For example, HCV includes the antigenic determinant known as 5-1-1 (See,

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Figure 1). This particular antigenic determinant appears in three different forms on the three different viral strains of HCV. Accordingly, in a preferred embodiment of the invention all three forms of 5-1-1 appear on the multiple epitope fusion antigen used in the subject immunoassays. Similarly, equivalent antigenic determinants from the core region of different HCV strains may also be present. In general, equivalent antigenic determinants have a high degree of homology in terms of amino acid sequence which degree of homology is generally 30% or more, preferably 40% or more, when aligned. The multiple copy epitope of the present invention can also include multiple copies which are exact copies of the same epitope.

Figures 4 and 6A-6C show representative MEFA's for use in the present invention which are derived from HCV. However, it is to be understood that other epitopes derived from the HCV genome will also find use with the present assays.

The DNA sequence and corresponding amino acid sequence of a representative multiple epitope fusion antigen, MEFA 7.1, is shown in Figures 5A through 5F. The general structural formula for MEFA 7.1 is shown in Figure 4 and is as follows: hSOD-E1(type 1)-E2 HVR consensus(type 1a)-E2 HVR consensus(types 1 and 2)-helicase(type 1)-5-1-1(type 1)-5-1-1(type 3)-5-1-1(type 2)-c100(type 1)-NS5(type 1)-NS5(type 1)-core(types 1+2)-core(types 1+2). This multiple copy epitope includes the following amino acid sequence, numbered relative to HCV-1 (the numbering of the amino acids set forth below follows the numbering designation provided in Choo, et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455, in which amino acid #1 is the first methionine encoded by the coding sequence of the core region): amino acids 1-156 of superoxide dismutase (SOD, used to enhance recombinant expression of the protein); amino acids 303 to 320 of the polyprotein from the E1 region; amino acids 390 to 410 of the polyprotein, representing a consensus sequence for the hypervariable region of HCV-1a E2; amino acids 384 to 414 of the polyprotein from region E2, representing a consensus sequence for the E2 hypervariable regions of HCV-1 and HCV-2; amino acids 1193-1658 of the HCV-1 polyprotein which define the helicase; three copies of an epitope from 5-1-1, amino acids 1689-1735, one from HCV-1, one from HCV-3 and one from HCV-2, which copies are equivalent antigenic determinants from the three different viral

WO 01/96870

PCT/US01/19156

strains of HCV; HCV polypeptide C100 of HCV-1, amino acids 1901-1936 of the polyprotein; two exact copies of an epitope from the NS5 region of HCV-1, each with amino acids 2278 to 2313 of the HCV polyprotein; and two copies of an epitope from the core region, one from HCV-1 and one from HCV-2, which copies are equivalent
5 antigenic determinants represented by amino acids 9 to 32, 39-42 and 64-88 of HCV-1 and 67-84 of HCV-2.

Table 2 shows the amino acid positions of the various epitopes with reference to Figures 5A through 5F herein.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Table 2. MEFA 7.1				
mefa aa#	5' end site	epitope	hcv aa#	strain
1-156	<i>Nco</i> 1	hSOD		
159-176	<i>Eco</i> R1	E1	303-320	1
179-199	<i>Hind</i> 111	E2 HVR1a consensus	390-410	1
200-230		E2 HVR1+2 consensus	384-414	1+2
231-696	<i>Sal</i> 1	Helicase	1193-1658	1
699-745	<i>Sph</i> 1	5-1-1	1689-1735	1
748-794	<i>Nru</i> 1	5-1-1	1689-1735	3
797-843	<i>Cla</i> 1	5-1-1	1689-1735	2
846-881	<i>Ava</i> 1	C100	1901-1936	1
884-919	<i>Xba</i> 1	NS5	2278-2313	1
922-957	<i>Bgl</i> 11	NS5	2278-2313	1
958-1028	<i>Nco</i> 1	core epitopes	9-32, 39-42 64-88 67-84	1 1 2
1029-1099	<i>Bal</i> 1	core epitopes	9-32, 39-42, 64-88 67-84	1 1 2

In one embodiment of the invention, depicted in Figure 2, a rapid capture ligand immunoassay is performed using a conformational epitope from NS3/4a and one or more multiple epitope fusion antigens, such as MEFA 7.1. The sample is combined with the antigens, which may be present on a solid support, as described further below. If the sample is infected with HCV, HCV antibodies to those epitopes present on the solid support will bind to the solid support components. Detection is by the attachment of a detectable marker (such as horse radish peroxidase (HRP) as shown in Figure 2) to a

WO 01/96870

PCT/US01/19156

member of the antigen/antibody complex. Attachment may be by covalent means or by subsequent binding of detectably labeled antibodies, such as in a standard sandwich assay, or by enzyme reaction, the product of which reaction is detectable. The detectable marker may include, but is not limited to, a chromophore, an antibody, an antigen, an enzyme, an enzyme reactive compound whose cleavage product is detectable, rhodamine or rhodamine derivative, biotin, avidin, streptavidin, a fluorescent compound, a chemiluminescent compound, such as dimethyl acridinium ester (DMAE, Ciba Corning Diagnostics Corp.), derivatives and/or combinations of these markers. A detectably labeled anti-human antibody, capable of detecting a human IgG molecule present, can be conveniently used.

In order to further an understanding of the invention, a more detailed discussion is provided below regarding production of polypeptides for use in the immunoassays and methods of conducting the immunoassays.

15 Production of Antigens for use in the HCV Immunoassays

As explained above, the molecules of the present invention are generally produced recombinantly. Thus, polynucleotides encoding HCV antigens for use with the present invention can be made using standard techniques of molecular biology. For example, polynucleotide sequences coding for the above-described molecules can be obtained using recombinant methods, such as by screening cDNA and genomic libraries from cells expressing the gene, or by deriving the gene from a vector known to include the same. Furthermore, the desired gene can be isolated directly from viral nucleic acid molecules, using techniques described in the art, such as in Houghton et al., U.S. Patent No. 5,350,671. The gene of interest can also be produced synthetically, rather than cloned. The molecules can be designed with appropriate codons for the particular sequence. The complete sequence is then assembled from overlapping oligonucleotides prepared by standard methods and assembled into a complete coding sequence. See, e.g., Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair et al. (1984) *Science* 223:1299; and Jay et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Thus, particular nucleotide sequences can be obtained from vectors harboring the desired sequences or synthesized completely or in part using various oligonucleotide synthesis techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and polymerase chain reaction (PCR) techniques where appropriate. See, e.g., Sambrook, *supra*. In particular, one method of obtaining nucleotide sequences encoding the desired sequences is by annealing complementary sets of overlapping synthetic oligonucleotides produced in a conventional, automated polynucleotide synthesizer, followed by ligation with an appropriate DNA ligase and amplification of the ligated nucleotide sequence via PVR. See, e.g., Jayaraman et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4084-4088.

10 Additionally, oligonucleotide directed synthesis (Jones et al. (1986) *Nature* 54:75-82), oligonucleotide directed mutagenesis of pre-existing nucleotide regions (Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327 and Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), and enzymatic filling-in of gapped oligonucleotides using T₄ DNA polymerase (Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033) can be used under the invention to provide molecules having altered or enhanced antigen-binding capabilities, and/or reduced immunogenicity.

Once coding sequences have been prepared or isolated, such sequences can be cloned into any suitable vector or replicon. Numerous cloning vectors are known to those of skill in the art, and the selection of an appropriate cloning vector is a matter of choice. Suitable vectors include, but are not limited to, plasmids, phages, transposons, cosmids, chromosomes or viruses which are capable of replication when associated with the proper control elements.

The coding sequence is then placed under the control of suitable control elements, depending on the system to be used for expression. Thus, the coding sequence can be placed under the control of a promoter, ribosome binding site (for bacterial expression) and, optionally, an operator, so that the DNA sequence of interest is transcribed into RNA by a suitable transformant. The coding sequence may or may not contain a signal peptide or leader sequence which can later be removed by the host in post-translational processing. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

In addition to control sequences, it may be desirable to add regulatory sequences which allow for regulation of the expression of the sequences relative to the growth of the host cell. Regulatory sequences are known to those of skill in the art, and examples include those which cause the expression of a gene to be turned on or off in response to a chemical or physical stimulus, including the presence of a regulatory compound. Other types of regulatory elements may also be present in the vector. For example, enhancer elements may be used herein to increase expression levels of the constructs. Examples include the SV40 early gene enhancer (Dijkema et al. (1985) *EMBO J.* 4:761), the enhancer/promoter derived from the long terminal repeat (LTR) of the Rous Sarcoma Virus (Gorman et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777) and elements derived from human CMV (Boshart et al. (1985) *Cell* 41:521), such as elements included in the CMV intron A sequence (U.S. Patent No. 5,688,688). The expression cassette may further include an origin of replication for autonomous replication in a suitable host cell, one or more selectable markers, one or more restriction sites, a potential for high copy number and a strong promoter.

An expression vector is constructed so that the particular coding sequence is located in the vector with the appropriate regulatory sequences, the positioning and orientation of the coding sequence with respect to the control sequences being such that the coding sequence is transcribed under the "control" of the control sequences (i.e., RNA polymerase which binds to the DNA molecule at the control sequences transcribes the coding sequence). Modification of the sequences encoding the molecule of interest may be desirable to achieve this end. For example, in some cases it may be necessary to modify the sequence so that it can be attached to the control sequences in the appropriate orientation; i.e., to maintain the reading frame. The control sequences and other regulatory sequences may be ligated to the coding sequence prior to insertion into a vector. Alternatively, the coding sequence can be cloned directly into an expression vector which already contains the control sequences and an appropriate restriction site.

As explained above, it may also be desirable to produce mutants or analogs of the antigen of interest. This is particularly true with NS3/4a. Methods for doing so are described in, e.g., Dasmahapatra et al., U.S. Patent No. 5,843,752 and Zhang et al., U.S.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

- Patent No. 5,990,276. Mutants or analogs of this and other HCV proteins for use in the subject assays may be prepared by the deletion of a portion of the sequence encoding the polypeptide of interest, by insertion of a sequence, and/or by substitution of one or more nucleotides within the sequence. Techniques for modifying nucleotide sequences, such as site-directed mutagenesis, and the like, are well known to those skilled in the art. See, e.g., Sambrook et al., *supra*; Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:448; Geisselsoder et al. (1987) *BioTechniques* 5:786; Zoller and Smith (1983) *Methods Enzymol.* 100:468; Dalbie-McFarland et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6409.
- The molecules can be expressed in a wide variety of systems, including insect, mammalian, bacterial, viral and yeast expression systems, all well known in the art.
- For example, insect cell expression systems, such as baculovirus systems, are known to those of skill in the art and described in, e.g., Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987). Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form from, *inter alia*, Invitrogen, San Diego CA ("MaxBac" kit). Similarly, bacterial and mammalian cell expression systems are well known in the art and described in, e.g., Sambrook et al., *supra*. Yeast expression systems are also known in the art and described in, e.g., *Yeast Genetic Engineering* (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, London.
- A number of appropriate host cells for use with the above systems are also known. For example, mammalian cell lines are known in the art and include immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC), such as, but not limited to, Chinese hamster ovary (CHO) cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), human embryonic kidney cells, human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), Madin-Darby bovine kidney ("MDBK") cells, as well as others. Similarly, bacterial hosts such as *E. coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus spp.*, will find use with the present expression constructs. Yeast hosts useful in the present invention include *inter alia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*,

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Kluyveromyces lactis, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Insect cells for use with baculovirus expression vectors include, *inter alia*, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, and *Trichoplusia ni*.

5 Nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences of interest can be stably integrated into a host cell genome or maintained on a stable episomal element in a suitable host cell using various gene delivery techniques well known in the art. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 5,399,346.

10 Depending on the expression system and host selected, the molecules are produced by growing host cells transformed by an expression vector described above under conditions whereby the protein is expressed. The expressed protein is then isolated from the host cells and purified. If the expression system secretes the protein into growth media, the product can be purified directly from the media. If it is not secreted, it can be isolated from cell lysates. The selection of the appropriate growth
15 conditions and recovery methods are within the skill of the art.

The production of various HCV antigens, including antigens used in the multiple epitope fusion proteins described above, has been described. *See, e.g.*, Houghton et al., U.S. Patent Nos. 5,350,671 and 5,683,864; Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8:S33-39; Chien et al., International Publication No. WO 93/00365; Chien, D.Y.,
20 International Publication No. WO 94/01778; Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 82:10011-10015; Chien, D.Y., International Publication No. WO 94/01778; and commonly owned, allowed U.S. Patent Application Serial Nos. 08/403,590 and 08/444,818.

25 Immunodiagnostic Assays

Once produced, the HCV antigens may be used in virtually any assay format that employs a known antigen to detect antibodies. A common feature of all of these assays is that the antigen is contacted with the body component suspected of containing HCV antibodies under conditions that permit the antigen to bind to any such antibodies
30 present in the component. Such conditions will typically be physiologic temperature,

WO 01/96870

PCT/US01/19156

pH and ionic strength using an excess of antigen. The incubation of the antigen with the specimen is followed by detection of immune complexes comprised of the antigen.

Design of the immunoassays is subject to a great deal of variation, and many formats are known in the art. Protocols may, for example, use solid supports, or immunoprecipitation. Most assays involve the use of labeled antibody or polypeptide; the labels may be, for example, enzymatic, fluorescent, chemiluminescent, radioactive, or dye molecules, as discussed in detail above. Assays which amplify the signals from the immune complex are also known; examples of which are assays which utilize biotin and avidin, and enzyme-labeled and mediated immunoassays, such as ELISA assays.

The immunoassay may be, without limitation, a heterogeneous or a homogeneous format, and of a standard or competitive type. In a heterogeneous format, the polypeptide is typically bound to a solid matrix or support to facilitate separation of the sample from the polypeptide after incubation. A solid support, for the purposes of this invention, can be any material that is an insoluble matrix and can have a rigid or semi-rigid surface. Exemplary solid supports include, but are not limited to, substrates such as nitrocellulose (e.g., in membrane or microtiter well form); polyvinylchloride (e.g., sheets or microtiter wells); polystyrene latex (e.g., beads or microtiter plates); polyvinylidene fluoride; diazotized paper; nylon membranes; activated beads, magnetically responsive beads, and the like. Particular supports include plates, pellets, disks, capillaries, hollow fibers, needles, pins, solid fibers, cellulose beads, pore-glass beads, silica gels, polystyrene beads optionally cross-linked with divinylbenzene, grafted co-poly beads, polyacrylamide beads, latex beads, dimethylacrylamide beads optionally crosslinked with N-N'-bis-acryloylethylenediamine, and glass particles coated with a hydrophobic polymer.

If desired, the molecules to be added to the solid support can readily be functionalized to create styrene or acrylate moieties, thus enabling the incorporation of the molecules into polystyrene, polyacrylate or other polymers such as polyimide, polyacrylamide, polyethylene, polyvinyl, polydiacetylene, polyphenylene-vinylene, polypeptide, polysaccharide, polysulfone, polypyrrole, polyimidazole, polythiophene,

WO 01/96870

PCT/US01/19156

polyether, epoxies, silica glass, silica gel, siloxane, polyphosphate, hydrogel, agarose, cellulose, and the like.

In one context, a solid support is first reacted with the HCV antigens (collectively called "the solid-phase components" herein), under suitable binding conditions such that the molecules are sufficiently immobilized to the support. Sometimes, immobilization to the support can be enhanced by first coupling the antigen and/or antibody to a protein with better solid phase-binding properties. Suitable coupling proteins include, but are not limited to, macromolecules such as serum albumins including bovine serum albumin (BSA), keyhole limpet hemocyanin, immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, and other proteins well known to those skilled in the art. Other reagents that can be used to bind molecules to the support include polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, and the like. Such molecules and methods of coupling these molecules to antigens, are well known to those of ordinary skill in the art. See, e.g., Brinkley, M.A. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:2-13; Hashida et al. (1984) *J. Appl. Biochem.* 6:56-63; and Anjaneyulu and Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30:117-124.

After reacting the solid support with the solid-phase components, any nonimmobilized solid-phase components are removed from the support by washing, and the support-bound components are then contacted with a biological sample suspected of containing HCV antibodies (collectively called "ligand molecules" herein) under suitable binding conditions. If HCV antibodies are present in the sample, they will form a complex with the HCV antigens. After washing to remove any nonbound ligand molecules, detectably labeled anti-xenogenic (e.g., anti-human) antibodies, which recognize an epitope on anti-HCV antibodies, is added. These antibodies bind due to complex formation.

In a homogeneous format, the test sample is incubated with the combination of antigens in solution. For example, it may be under conditions that will precipitate any antigen-antibody complexes which are formed. Both standard and competitive formats for homogeneous assays are also known in the art.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

In a standard format, the amount of HCV antibodies forming the antibody-antigen complex is directly monitored. This may be accomplished by determining whether labeled anti-xenogenic (e.g., anti-human) antibodies which recognize an epitope on anti-HCV antibodies will bind due to complex formation. In a competitive format, the amount of HCV antibodies in the sample is deduced by monitoring the competitive effect on the binding of a known amount of labeled antibody (or other competing ligand) in the complex.

More particularly, complexes formed comprising anti-HCV antibody (or, in the case of competitive assays, the amount of competing antibody) are detected by any of a number of known techniques, depending on the format. For example, unlabeled HCV antibodies in the complex may be detected using a conjugate of antixenogeneic Ig complexed with a label, (e.g., an enzyme label). In an immunoprecipitation or agglutination assay format, the reaction between the HCV antigens and the antibody forms a network that precipitates from the solution or suspension and forms a visible layer or film of precipitate. If no anti-HCV antibody is present in the test specimen, no visible precipitate is formed.

The above-described assay reagents, including the immunoassay solid support with bound antibodies and antigens, as well as antibodies and antigens to be reacted with the captured sample, can be provided in kits, with suitable instructions and other necessary reagents, in order to conduct immunoassays as described above. The kit will normally contain in separate containers the combination of antigens (either already bound to a solid matrix or separate with reagents for binding them to the matrix), control antibody formulations (positive and/or negative), labeled antibody when the assay format requires same and signal generating reagents (e.g., enzyme substrate) if the label does not generate a signal directly. Instructions (e.g., written, tape, VCR, CD-ROM, etc.) for carrying out the assay usually will be included in the kit. The kit can also contain, depending on the particular immunoassay used, other packaged reagents and materials (i.e. wash buffers and the like). Standard immunoassays, such as those described above, can be conducted using these kits.

30

WO 01/96870

PCT/US01/19156

III. Experimental

Below are examples of specific embodiments for carrying out the present invention. The examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

- 5 Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g., amounts, temperatures, etc.), but some experimental error and deviation should, of course, be allowed for.

EXAMPLE 1

Construction of MEFA 7 and MEFA 7.1

- 10 The following example illustrates the preparation of a polyprotein cassette of multiple HCV epitopes. The polyprotein expressed from the multiple epitope cassette is referred to herein as a Multiple Epitope Fusion Antigen (MEFA). Preferably, where an epitope is repeated, the extra copy or copies are tandemly arrayed in the same
15 orientation. It is understood that the region of a viral coding sequence used as an epitope may be varied slightly and still retain antigenic activity, and that the amino acid numbering designation may vary from strain to strain. Thus, the repeated epitopes may vary one from another in amino acid sequence due to strain sequence variations and/or numbering designation. Preferably, the amino acid sequences of repeated epitopes
20 within a MEFA are at least 30% homologous at the amino acid level, more preferably at least 40% homologous at the amino acid level.

- Unique restriction enzyme sites were introduced in order to connect the epitopes in the prescribed order and enhance the usefulness of the invention by facilitating modifications in design of a chimeric antigen. The choice of restriction enzyme sites
25 and cloning procedures are readily determined by one of ordinary skill in the art of recombinant DNA technology. Preferably, the epitope junctions (amino acid sequences created between epitopes due to cloning) do not generate non-specific epitopes. Non-specific epitopes are, for example, non-HCV sequences which do not exist adjacent to the HCV epitopes in nature. Non-specific epitopes may bind antibodies in a test sample
30 causing false positive assay results. Preferably, the multiple epitope fusion protein is

WO 01/96870

PCT/US01/19156

tested for false positive results due to such sequences generated at the epitope junctions. To avoid non-specific interactions with the MEFA due to junction sequences, the DNA sequence encoding the junction may, for example, be mutated such that non-specific interactions with the mutant amino acid sequence are reduced, and cloning of the epitope fragments is possible.

The HCV MEFA 7 and 7.1 expression cassettes were constructed by cloning the coding nucleotide sequences containing major epitopes in a tandem array as shown in Figure 4. A major epitope was chosen based on antibody reaction frequency and reaction intensity (titer) to the epitope (Chein, D.Y. et al. (1994) *Viral Hepatitis and Liver Disease*, pp. 320-324). The various DNA segments coding for the HCV epitopes were constructed by PCR amplification or by synthetic oligonucleotides. The amino acids in each segment are set forth in Table 2 above and shown in Figures 5A-5F. The complete HCV-1 amino acid sequence (3011 amino acids) was determined by Choo, et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2451-2455. Oligonucleotides capable of binding to HCV are described in U.S. Patent No. 5,350,671. The numbering of the amino acids in epitopes of the invention follows the numbering designation provided in Choo, et al., *supra*, in which amino acid number 1 is the first methionine encoded by the coding sequence of the core region, unless otherwise specified. For example, one epitope segment from NS5 is represented by amino acids 2278 to 2313 of the HCV polyprotein. An epitope from the E1 region is represented by amino acids 303 to 320, numbered relative to the HCV-1 polyprotein.

MEFA 7 and 7.1 each contain epitopes from HCV-1, HCV-2 and HCV-3, allowing for detection of multiple types of a virus in a single assay. Methods of determining HCV serotype are found in WO 96/27153. For example, epitopes from the 5-1-1 region have been found to vary between serotypes of HCV. A copy of each of the HCV type-specific 5-1-1 epitopes present in the MEFA's described herein allows binding of any of the HCV types that may be present in the test biological sample.

The MEFA 7 and 7.1 constructs were genetically engineered for expression in *Saccharomyces cerevisiae*, utilizing the yeast expression vector pBS24.1 which contains 2 μ sequences for autonomous replication in yeast and the yeast genes *leu2-d* and *URA3*

WO 01/96870

PCT/US01/19156

as selectable markers. The β -lactamase gene and the ColE1 origin of replication, required for plasmid replication in bacteria, were also present in this expression vector. The yeast expression vector for MEFA 7, ps.MEFA7, was constructed first. Subsequently, the plasmid was modified in the coding region for the HCV core epitopes to create the plasmid ps.MEFA7.1, encoding the MEFA 7.1 antigen.

In particular, as shown in Figures 7A through 7D, a yeast expression plasmid for MEFA 7 was constructed as follows. First, a *Bam*HI/*Hind*III fragment of 1896 bp, encoding the ADH2/GAPDH hybrid promoter, hSOD (amino acids 1-156), followed by an E1 epitope (amino acids 303-320, HCV1 strain), was isolated from ps.MEFA6, the expression plasmid encoding MEFA 6, described in International Publication No. WO 97/44469. Next, a *Hind*III/*Sph*I synthetic DNA fragment of 269 bp which contains the coding sequence for E2 HVR1a consensus epitope (amino acids 390-410, HCV-1), E2 HVR1+2 consensus epitope (amino acids 384-414, HCV1+2) and the 5' end of the helicase domain (amino acids 1193-1229, HCV-1) was created. An *Sph*I/*Ecl*XI fragment of 1264 bp, encoding the remainder of the helicase domain (amino acids 1230-1651, HCV-1), was gel-purified from p*Tac5/HeII* plasmid DNA. The *Hind*III/*Sph*I synthetic DNA fragment and the *Sph*I/*Ecl*XI 1264 bp fragment were ligated into vector pSP72new.*Hind*III/*Ecl*XI vector, to produce pSP72new.*Hind*III/*Ecl*XI/e2.helicase. This vector was derived from pSP72 an *E. coli* vector commercially available from Promega, Madison, WI (see, GenBank/EMBL Accession Number X65332). In particular, to facilitate the subcloning of several MEFA 7 epitopes, a new multiple cloning site (MCS) polylinker was introduced, via synthetic oligos, between the *Sph*I and *Bgl*II sites of pSP72. This new plasmid, named pSP72new, was digested with *Hind*III and *Ecl*XI (also known as *Eag*I), which have unique sites in the MCS. It was then dephosphorylated and gel-purified.

E. coli HB101 competent cells were transformed with the plasmid, and plated on Luria agar plates containing 100 μ g/ml ampicillin. Desired clones were identified using miniprep DNA analysis. After sequence verification, the plasmid pSP72new.*Hind*III/*Ecl*XI/e2.helicase subclone #4 was digested with *Hind*III and *Ecl*XI(*Eag*I) to generate a 1534 bp fragment. The *Hind*III/*Ecl*XI fragment was gel-

WO 01/96870

PCT/US01/19156

purified and ligated with *Eco*RI/*Sph*I oligonucleotides, encoding the last amino acids of the helicase domain (amino acids 1651-1658, HCV-1), into a pGEM7 *Hind*III/*Sph*I vector. HB101 competent cells were transformed and plated on Luria-ampicillin (100µg/ml). After identification of the desired clones and sequence confirmation,

5 pGEM7*Hind*III/*Sph*I subclone #9 was digested with *Hind*III and *Sph*I to generate a 1560 bp fragment, which was gel purified (see, Figure 7A).

To assemble the 3' end portion of MEFA 7, the following steps were performed. The 5-1-1 epitopes (amino acids 1689-1735) from HCV-1, HCV-3 and HCV-2 (in this order) were gel-isolated from ps.MEFA6, the expression plasmid encoding MEFA 6,

10 described in International Publication No. WO 97/44469, as an *Sph*I/*Ava*I fragment of 441 bp. This fragment was ligated with synthetic *Ava*I/*Xba*I oligonucleotides encoding the c100 epitope (amino acids 1901-1936) into a pSP72new.*Sph*I/*Xba*I vector. After HB101 transformation, clone identification, and sequence verification, pSP72newSX subclone #6 was digested with *Xba*I and *Not*I to prepare a pSP72new.*Xba*I/*Not*I vector.

15 Additionally, an *Xba*I/*Nco*I fragment of 221 bp, which encoded a double repeat of an NS5 epitope (amino acids 2278-2313, HCV-1), was isolated from ps.MEFA6. The *Xba*I/*Nco*I fragment was ligated with *Nco*I/*Not*I oligonucleotides, encoding the first amino acids of the HCV-1 core epitope, amino acids 9-17, in which the Lys at position 9 was changed to Arg, and the Asn at position 11 was changed to Thr, into the

20 pSP72new.*Xba*I/*Not*I vector prepared above. HB101 transformants were analyzed and their plasmid DNA sequenced. A subclone, termed pSP72newSX/XNi #3, was digested with *Not*I/*Sa*I to prepare a vector for subsequent subcloning (see, Figure 7B).

To complete the assembly of the 3' end of MEFA 7, a double repeat of the sequence encoding a core epitope with amino acids 9-53 from HCV-1, plus two

25 genotype-specific epitopes of the core region (amino acids 64-88, HCV-1 and amino acids 67-84, HCV-2) were subcloned as follows into *Not*I-*Sa*I digested pSP72newSX/XNi subclone #3. First, a *Not*I/*Xmn*I fragment of 92 bp encoding amino acids 18-51 of a core epitope was isolated from pd.Core191RT clone #20. Plasmid pd.Core191RT was constructed by ligating into the pBS24.1 *Bam*HI-*Sa*I yeast

WO 01/96870

PCT/US01/19156

expression vector, a 1365bp *Bam*HI-*Nco*I fragment for the ADH2/GAPDH promoter, and a 615 bp *Nco*I-*Sa*I fragment encoding the first 191 amino acids of HCV-1 core with amino acid 9 mutated from Lys to Arg and amino acid 11 mutated from Asn to Thr. The 615 bp *Nco*I-*Sa*I fragment was derived from an *E. coli* expression vector in which the core sequence for amino acids 1-191, with the same two mutations described above, had been cloned.

The 92 bp *Not*I/*Xmn*I fragment was ligated with a pSP72new*Not*I/*Kpn*I vector and with *Xmn*I/*Kpn*I oligonucleotides which encode the 3' end of the complete core epitope. After sequence verification of the positive clones, pSP72newNKi subclone #4 was digested with *Not*I and *Kpn*I, and a 224 bp fragment was gel-isolated. This *Not*I/*Kpn*I fragment was ligated with 284 bp of oligonucleotides (*Kpn*I-*Sa*I ends) encoding a complete repeat of the core epitope described above into the pSP72newSX/XNi *Not*I/*Sa*I vector described above. After HB101 transformation, clone identification and sequence verification, pSP72newSX/XN/NSi subclone #18 was digested with *Sph*I and *Sa*I and a fragment of 1317 bp was gel-isolated (see, Figure 7C).

Lastly, the following fragments, described above, were ligated into the pBS24.1 *Bam*HI/*Sa*I yeast expression vector to create ps.MEFA7 (see, Figure 7D):

the *Bam*HI/*Hind*III fragment of 1896 bp (Figure 7A)

the *Hind*III/*Sph*I fragment of 1560 bp (Figure 7A)

the *Sph*I/*Sa*I fragment of 1317bp (Figure 7C)

S. cerevisiae strain AD3 was transformed with ps.MEFA7 and single transformants were checked for expression after depletion of glucose in the medium. The recombinant protein was expressed at high levels in yeast, as detected by Coomassie blue staining. In particular, yeast cells were transformed with the MEFA expression plasmid using a lithium acetate protocol. *Ura*^r transformants were streaked for single colonies and patched onto Leu⁻/8% glucose plates to increase plasmid copy number. Leu⁻ starter cultures were grown for 24 hours at 30°C and then diluted 1:20 in YEPD (yeast extract bactopectone 2% glucose) media. The cells were grown for 48 hours at 30°C and harvested. To test for expression of the MEFA 7 recombinant antigen, an aliquot of the cells was lysed with glass beads in lysis buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1

WO 01/96870

PCT/US01/19156

mM EDTA, 10 mM DTT). The lysate was centrifuged at high speed. The supernatant and insoluble pellet were analyzed on SDS protein gels. MEFA 7 was highly enriched in the insoluble pellet fraction.

The MEFA 7 antigen was purified as follows. *S. cerevisiae* cells expressing
 5 MEFA 7 were harvested as described above. The cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8.0) and lysed in a Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland) or equivalent apparatus using glass beads. The lysate was centrifuged at low speed conditions (3,000 to 5,000 rpm, 15 min) and the pellet containing the insoluble protein fraction was washed with increasing
 10 concentrations of urea (1 M, 2 M, 3 M) in lysis buffer. Protein was solubilized from the centrifugation pellet with 0.1 N NaOH, 4 M urea in lysis buffer. Cell debris was removed by low speed centrifugation at 3,000 to 5,000 rpm, 15 min. The supernatant was adjusted to pH 8.0 with 6 N HCl to precipitate proteins insoluble under these conditions.

15 The precipitate was removed by centrifugation and the supernatant was adjusted to 2.3% SDS, 50 mM DTT, pH 8.0 and boiled for 3 min. Proteins in the mixture were fractionated by gel filtration on a Pharmacia Sephacryl S-400 in phosphate buffered saline containing 0.1% SDS, 1 mM EDTA and adjusted to pH 7.4. Column eluate fractions containing MEFA 7 were collected, pooled, and concentrated on an Amicon
 20 YM-30 membrane. Gel filtration was repeated on the pooled fractions using the same column and conditions.

During the analysis of MEFA 7 in a trial assay, it was discovered that a monoclonal antibody used as a detection conjugate reacted with a specific sequence of the core epitope (amino acids 33-38). Thus, ps.MEFA7.1 was designed to eliminate
 25 amino acids 33-38 from the core epitope region.

A yeast expression vector for MEFA 7.1 was made as follows. First, the double repeat of the core epitope at the 3' end of ps.MEFA7 was modified. To do so, an *NcoI/KpnI* synthetic fragment of 206 bp, encoding the first core epitope repeat (amino acids 9-32, 39-42 and 64-88 of HCV-1, and amino acids 67-82 of HCV-2), and a
 30 *KpnI/SalI* synthetic fragment of 233 bp encoding amino acids 83 and 84 of HCV-2,

WO 01/96870

PCT/US01/19156

followed by the second core epitope repeat (amino acids 9-32, amino acids 39-42 and amino acids 64-88, HCV-1, amino acids 67-84, HCV-2) were subcloned respectively into a pSP72new.NcoI/KpnI vector and a pSP72new.KpnI/SalI vector. After HB101 transformation, clone identification and sequence confirmation, pSP72newNKi clone #21 was digested with NcoI and KpnI to isolate the NcoI/KpnI fragment of 206 bp and pSP72newKSi clone #32 was digested with KpnI and SalI to isolate the KpnI/SalI fragment of 233 bp.

Plasmid ps.MEFA7.1 was assembled by ligating the following fragments into the pBS24.1 BamHI/SalI yeast expression vector (see, Figure 8) :

- the BamHI/HindIII fragment of 1896 bp, described above for ps.MEFA7;
- the HindIII/SphI fragment of 1560 bp described above for ps.MEFA7;
- an SphI/NcoI fragment of 776 bp isolated from ps.MEFA7 encoding the 5-1-1 epitopes, c100 epitope and NS5 epitope;
- the NcoI/KpnI fragment of 206 bp;
- and KpnI/SalI fragment of 233 bp.

S. cerevisiae strain AD3 was transformed with ps.MEFA7.1 and single transformants were checked for expression after depletion of glucose in the medium, as described above. The recombinant protein was expressed at high levels in yeast, as detected by Coomassie blue staining.

The MEFA 7.1 antigen was purified as follows. *S. cerevisiae* cells expressing MEFA 7.1 were harvested as described above. The cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0) and lysed in a Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland) or equivalent apparatus using glass beads. The lysate was centrifuged at 10,000 rpm, 30 min in a JA-10 rotor, and the pellet containing the insoluble protein fraction was washed with increasing concentrations of Urea (1 M, 2 M, 3 M) in lysis buffer. Protein was solubilized from the centrifugation pellet with 0.1 N NaOH, 4 M Urea, 50 mM DTT in lysis buffer. Cell debris was removed by centrifugation at 14,000 rpm, 20 min in a JA-14 rotor. The supernatant was adjusted to pH 8.0 with 6 N HCl to precipitate proteins insoluble under these conditions.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

The precipitate was removed by centrifugation at 14,000 rpm, 20 min in a JA-14 rotor. The supernatant was adjusted to 2.3% SDS and heated to 70-75° C in boiling water then cooled to room temperature. Proteins in the mixture were fractionated by gel filtration on a Pharmacia Sephacryl S-400 HR in PBS containing 0.1 % SDS, 1 mM EDTA and adjusted to pH 7.4. Column eluate fractions containing MEFA 7.1 were collected, pooled, and concentrated on an Amicon YM-30 membrane. Pooled gel filtration fractions were adjusted to 2.3 % SDS, 50 mM DTT, and heated/cooled as above. This pool was subjected to a second gel filtration step on a Pharmacia Sephacryl S-300 HR column under the same conditions as the first gel filtration step.

10

EXAMPLE 2

Recombinant Production of an NS3/4a Conformational Epitope

A conformational epitope of NS3/4a was obtained as follows. This epitope has the sequence specified in Figures 3A through 3D and differs from the native sequence at positions 403 (amino acid 1428 of the HCV-1 full-length sequence) and 404 (amino acid 1429 of the HCV-1 full-length sequence). Specifically, the Thr normally occurring at position 1428 of the native sequence has been mutated to Pro and Ser which occurs at position 1429 of the native sequence has been mutated to Ile.

In particular, the yeast expression vector used was pBS24.1, described above. Plasmid pd.hcv1a.ns3ns4aPI, which encoded a representative NS3/4a epitope used in the subject immunoassays, was produced as follows. A two step procedure was used. First, the following DNA pieces were ligated together: (a) synthetic oligonucleotides which would provide a 5' *Hind*III cloning site, followed by the sequence ACAAACAAA, the initiator ATG, and codons for HCV1a, beginning with amino acid 1027 and continuing to a *Bgl*II site at amino acid 1046; (b) a 683 bp *Bgl*II-*Clal*I restriction fragment (encoding amino acids 1046-1274) from pAcHLTns3ns4aPI; and (c) a pSP72 vector (Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL Accession Number X65332) which had been digested with *Hind*III and *Clal*I, dephosphorylated, and gel-purified. Plasmid pAcHLTns3ns4aPI was derived from pAcHLT, a baculovirus expression vector commercially available from BD Pharmingen (San Diego, CA). In particular, a pAcHLT *Eco*RI-*Pst*I vector was

30

WO 01/96870

PCT/US01/19156

prepared, as well as the following fragments: *EcoRI-AlwNI*, 935 bp, corresponding to amino acids 1027-1336 of the HCV-1 genome; *AlwNI-SacII*, 247 bp, corresponding to amino acids 1336-1419 of the HCV-1 genome; *HinfI-BglII*, 175 bp, corresponding to amino acids 1449-1509 of the HCV-1 genome; *BglII-PstI*, 619 bp, corresponding to amino acids 1510-1711 of the HCV-1 genome, plus the transcription termination codon. A *SacII-HinfI* synthetically generated fragment of 91 bp, corresponding to amino acids 1420-1448 of the HCV-1 genome and containing the PI mutations (Thr-1428 mutated to Pro, Ser-1429 mutated to Ile), was ligated with the 175 bp *HinfI-BglII* fragment and the 619 bp *BglII-PstI* fragment described above and subcloned into a pGEM-5Zf(+) vector digested with *SacII* and *PstI*. pGEM-5Zf(+) is a commercially available *E. coli* vector (Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL Accession Number X65308). After transformation of competent HB101 cells, miniscreen analysis of individual clones and sequence verification, an 885 bp *SacII-PstI* fragment from pGEM5.PI clone2 was gel-purified. This fragment was ligated with the *EcoRI-AlwNI* 935 bp fragment, the *AlwNI-SacII* 247 bp fragment and the pAcHLT *EcoRI-PstI* vector, described above. The resultant construct was named pAcHLTns3ns4aPI.

The ligation mixture above was transformed into HB101-competent cells and plated on Luria agar plates containing 100 µg/ml ampicillin. Miniprep analyses of individual clones led to the identification of putative positives, two of which were amplified. The plasmid DNA for pSP72 1aHC, clones #1 and #2 were prepared with a Qiagen Maxiprep kit and were sequenced.

Next, the following fragments were ligated together: (a) a 761 bp *HindIII-ClaI* fragment from pSP721aHC #1 (pSP72.1aHC was generated by ligating together the following: pSP72 which had been digested with *HindIII* and *ClaI*, synthetic oligonucleotides which would provide a 5' *HindIII* cloning site, followed by the sequence ACAAACAAA, the initiation codon ATG, and codons for HCV1a, beginning with amino acid 1027 and continuing to a *BglIII* site at amino acid 1046, and a 683 bp *BglIII-ClaI* restriction fragment (encoding amino acids 1046-1274) from pAcHLTns3ns4aPI); (b) a 1353 bp *BamHI-HindIII* fragment for the yeast hybrid promoter ADH2/GAPDH; (c) a 1320 bp *ClaI-SalI* fragment (encoding HCV1a amino

WO 01/96870

PCT/US01/19156

acids 1046-1711 with Thr 1428 mutated to Pro and Ser 1429 mutated to Ile) from pAcHLTns3ns4aPI; and (d) the pBS24.1 yeast expression vector which had been digested with *Bam*HI and *Sal*I, dephosphorylated and gel-purified. The ligation mixture was transformed into competent HB101 and plated on Luria agar plates containing 100 µg/ml ampicillin. Miniprep analyses of individual colonies led to the identification of clones with the expected 3446 bp *Bam*HI-*Sal*I insert which was comprised of the ADH2/GAPDH promoter, the initiator codon ATG and HCV1a NS3/4a from amino acids 1027-1711 (shown as amino acids 1-686 of Figures 3A-3D), with Thr 1428 (amino acid position 403 of Figures 3A-3D) mutated to Pro and Ser 1429 (amino acid position 404 of Figures 3A-3D) mutated to Ile. The construct was named pd.HCV1a.ns3ns4aPI (see, Figure 9).

S. cerevisiae strain AD3 was transformed with pd.HCV1a.ns3ns4aPI and single transformants were checked for expression after depletion of glucose in the medium. The recombinant protein was expressed at high levels in yeast, as detected by Coomassie blue staining and confirmed by immunoblot analysis using a polyclonal antibody to the helicase domain of NS3.

EXAMPLE 3

Purification of NS3/4a Conformational Epitope

The NS3/4a conformational epitope was purified as follows. *S. cerevisiae* cells from above, expressing the NS3/4a epitope were harvested as described above. The cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 µM pepstatin, 1 µM leupeptin) and lysed in a Dyno-Mill (Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland) or equivalent apparatus using glass beads, at a ratio of 1:1:1 cells:buffer:0.5 mm glass beads. The lysate was centrifuged at 30100 × g for 30 min at 4°C and the pellet containing the insoluble protein fraction was added to wash buffer (6 ml/g start cell pellet weight) and rocked at room temperature for 15 min. The wash buffer consisted of 50 mM NaPO₄ pH 8.0, 0.3 M NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.05% octyl glucoside, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 µM pepstatin, 1

WO 01/96870

PCT/US01/19156

µM leupeptin. Cell debris was removed by centrifugation at 30100 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet retained.

Protein was extracted from the pellet as follows. 6 ml/g extraction buffer was added and rocked at room temperature for 15 min. The extraction buffer consisted of 50 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 µM pepstatin, 1 µM leupeptin. This was centrifuged at 30100 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was retained and ammonium sulfate added to 17.5% using the following formula: volume of supernatant (ml) multiplied by x% ammonium sulfate/(1 - x% ammonium sulfate) = ml of 4.1 M saturated ammonium sulfate to add to the supernatant. The ammonium sulfate was added dropwise while stirring on ice and the solution stirred on ice for 10 min. The solution was centrifuged at 17700 x g for 30 min at 4°C and the pellet retained and stored at 2°C to 8°C for up to 48 hrs.

The pellet was resuspended and run on a Poly U column (Poly U Sepharose 4B, Amersham Pharmacia) at 4°C as follows. Pellet was resuspended in 6 ml Poly U equilibration buffer per gram of pellet weight. The equilibration buffer consisted of 25 mM HEPES pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM DTT (added fresh), 10% glycerol, 1.2 octyl glucoside. The solution was rocked at 4°C for 15 min and centrifuged at 31000 x g for 30 min at 4°C.

A Poly U column (1 ml resin per gram start pellet weight) was prepared. Linear flow rate was 60 cm/hr and packing flow rate was 133% of 60 cm/hr. The column was equilibrated with equilibration buffer and the supernatant of the resuspended ammonium sulfate pellet was loaded onto the equilibrated column. The column was washed to baseline with the equilibration buffer and protein eluted with a step elution in the following Poly U elution buffer: 25 mM HEPES pH 8.0, 1 M NaCl, 5 mM DTT (added fresh), 10% glycerol, 1.2 octyl glucoside. Column eluate was run on SDS-PAGE (Coomassie stained) and aliquots frozen and stored at -80°C. The presence of the NS3/4a epitope was confirmed by Western blot, using a polyclonal antibody directed against the NS3 protease domain and a monoclonal antibody against the 5-1-1 epitope (HCV 4a).

WO 01/96870

PCT/US01/19156

- Additionally, protease enzyme activity was monitored during purification as follows. An NS4A peptide (KKGSVVIVGRVLSGKPAIIPKK), and the sample containing the NS3/4a conformational epitope, were diluted in 90 μ l of reaction buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% glycerol, 0.05 n-Dodecyl B-D-Maltoside, 5 mM DTT) and allowed to mix for 30 minutes at room temperature. 90 μ l of the mixture were added to a microtiter plate (Costar, Inc., Corning, NY) and 10 μ l of HCV substrate (AnaSpec, Inc., San Jose CA) was added. The plate was mixed and read on a Fluostar plate reader. Results were expressed as relative fluorescence units (RFU) per minute.
- Using these methods, the product of the 1 M NaCl extraction contained 3.7 RFU/min activity, the ammonium sulfate precipitate had an activity of 7.5 RFU/min and the product of the Poly U purification had an activity of 18.5 RFU/min.

EXAMPLE 4

Coating Solid Support with the HCV Antigens

- The HCV NS3/4a conformational epitope and MEFA 7.1 antigen were coated onto plates as follows. HCV coating buffer (50 mM NaPO₄ pH 7.0, 2 mM EDTA and 0.1% Chloroacetamide) was filtered through a 0.22 μ filter unit. The following reagents were then added sequentially to the HCV coating buffer and stirred after each addition: 2 μ g/ml BSA-Sulphydryl Modified, from a 10 mg/ml solution (Bayer Corp. Pentex, Kankakee, Illinois); 5 mM DTT from a 1 M solution (Sigma, St. Louis, MO); 0.45 μ g/ml NS3/4a (protein concentration of 0.3 mg/ml); 0.375 μ g/ml MEFA 7.1 (protein concentration of 1 mg/ml). The final solution was stirred for 15 minutes at room temperature.
- 200 μ l of the above solution was added to each well of a Costar high binding, flat bottom plate (Corning Inc., Corning, New York) and the plates were incubated overnight in a moisture chamber. The plates were then washed with wash buffer (1 x PBS, 0.1% TWEEN-20), Tapped dry and 285 μ l Ortho Post-Coat Buffer (1 x PBS, pH 7.4, 1%

WO 01/96870

PCT/US01/19156

BSA, 3% sucrose) added. The plates were incubated for at least 1 hour, tapped and dried overnight at 2-8°C. The plates were pouched with desiccants for future use.

EXAMPLE 5

5 Early Seroconversion Studies

10 The performance of the NS3/4a and MEFA 7.1 antigens in a combination assay (HCV 4.0) was compared to other HCV assays to test the seroconversion detection limits and to compare these limits to those obtained in other commercially available assays. Panels of commercially available human blood samples were used which were HCV-

10 infected. The PHV panels shown in the tables below were purchased from Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI). The 6212 panels were purchased from Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP). The SC panels were purchased from North American Biologics, Inc., BocaRaton, FL (NABI). The day on which the blood samples was obtained is indicated in the tables.

15 The HCV 4.0 assay was conducted as follows. 200 µl of specimen diluent buffer (1 g/l casein, 100 mg/l recombinant human SOD, 1 g/l chloracetamide, 10 g/l BSA, 500 mg/l yeast extract, 0.366 g/l EDTA, 1.162 g/l KPO₄, 5 ml/l Tween-20, 29.22 g/l NaCl, 1.627 g/l NaPO₄, 1% SDS) was added to the coated plates. 20 µl of sample was then added. This was incubated at 37°C for one hour. The plates were washed with wash

20 buffer (1 x PBS, pH 7.4, 0.1% Tween-20). 200 µl conjugate solution (a mouse anti-human IgG-HRP, such as mouse anti-human IgG-HRP diluted 1:22,000 in ORTHO HCV 3.0 ELISA Test System with Enhanced SAv_e bulk conjugate diluent (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) was added and incubated for 60 minutes at 37°C. This was washed as above, and 200 µl substrate solution (1 OPD tablet/10ml)

25 was added. The OPD tablet contains *o*-phenylenediamine dihydrochloride and hydrogen peroxide for horse radish peroxidase reaction color development. This was incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. The reaction was stopped by addition of 50 µl 4N H₂SO₄ and the plates were read at 492 nm, relative to absorbance at 690 nm as control.

30 The other assays used in the study were as follows:

WO 01/96870

PCT/US01/19156

The Abbott PRISM assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), is commercially available and is an antibody-based detection assay. The assay was performed using the manufacturer's instructions.

5 The ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System (HCV 3.0) (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) is an antibody-based detection assay. The assay was conducted using the manufacturer's instructions.

The Pasteur MONOLISA anti-HCV Plus Version 2 assay (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) is an antibody-based detection assay. The assay was performed using the manufacturer's instructions.

10 The performance of the HCV 4.0 assay was compared to the HCV 3.0, PRISM and Pasteur assays (see, Tables 3 and 4). HCV antibodies present in the blood panels (anti-c33c or anti-c22) are set forth in Table 4. In particular, 17 seroconversion panels from the three commercial sources set forth above were assayed using the techniques above. As can be seen, for the c33c panels, HCV 4.0 showed earlier detection (by 1-3
15 bleeds) than HCV 3.0 in 9 out of 9 c33c panels, and earlier detection than PRISM in 6 out of 9 panels and equivalent detection as compared with PRISM in 3 of the 9 panels. For the c22 panels, HCV 4.0 showed earlier detection than HCV 3.0 in 3 of 8 panels and equivalent detection in the other 5 panels. HCV 4.0 also showed earlier detection than PRISM in 2 of 8 panels and equivalent detection in 6 of 8 panels. The range of
20 improvement seen was 2-14 days over both the HCV 3.0 and PRISM assays.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

TABLE 3

ID	Bleed Day	s	Ortho		Abbott
			HCV 4.0	HCV 3.0	Prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0	0.031	0.05	0.01	0.12
PHV 904-2	2	0.024	0.04	0.01	0.08
PHV 904-3	7	1.391	2.11	0.33	0.51
PHV 904-4	9	2.813	4.23	0.70	1.55
PHV 904-5	14	3.197	4.65	3.21	4.54
PHV 904-6	21	3.176	4.53	3.22	4.45
PHV 904-7	23	3.554	5.40	4.50	4.89

ID	Bleed Day	s	Ortho		Abbott
			HCV 4.0	HCV 3.0	Prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 905-1	0	0.015	0.02	0.02	0.06
PHV 905-2	4	0.019	0.03	0.01	0.07
PHV 905-3	7	0.079	0.12	0.02	0.14
PHV 905-4	11	0.950	1.24	0.42	0.70
PHV 905-5	14	1.586	2.41	0.80	1.21
PHV 905-6	16	2.529	3.84	1.82	2.00
PHV 905-7	21	3.177	4.83	2.54	3.44
PHV 905-8	25	3.419	5.20	2.45	4.74
PHV 905-9	28	3.408	5.18	2.85	5.04

ID	Bleed Day	s	Ortho		Abbott
			HCV 4.0	HCV 3.0	Prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 907-1	0	0.030	0.05	0.01	0.09
PHV 907-2	4	0.023	0.03	0.01	0.09
PHV 907-3	7	0.021	0.03	0.01	0.11
PHV 907-4	13	0.148	0.22	0.13	0.35
PHV 907-5	18	1.726	2.62	0.83	1.68
PHV 907-6	21	2.785	4.23	1.59	2.22
PHV 907-7	164	3.279	4.98	4.55	5.18

ID	Bleed Day	s	Ortho		Abbott
			HCV 4.0	HCV 3.0	Prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 908-1	0	0.029	0.04	0.01	0.07
PHV 908-2	3	0.079	0.12	0.01	0.08
PHV 908-3	5	0.399	0.61	0.01	0.13
PHV 908-4	11	1.780	2.74	0.50	1.27
PHV 908-5	13	2.068	3.14	0.67	1.61
PHV 908-6	19	2.793	4.24	1.16	3.11
PHV 908-7	25	3.380	5.15	2.41	4.23
PHV 908-8	27	3.299	5.01	3.75	4.44
PHV 908-9	32	3.474	5.28	4.05	4.74
PHV 908-10	35	3.707	5.53	4.55	4.97
PHV 908-11	41	3.383	5.11	4.33	5.09
PHV 908-12	45	3.372	5.02	4.60	5.29
PHV 908-13	48	3.278	4.98	4.85	5.55

WO 01/96870

PCT/US01/19156

TABLE 3 (continued)

ID	Bleed Day	s	Ortho		Abbott
			HCV 4.0	HCV 3.0	Prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 913-1	0	0.060	0.09	0.01	0.08
PHV 913-2	2	0.242	0.37	0.02	0.10
PHV 913-3	7	0.893	1.56	0.43 -	0.5 -
PHV 913-4	9	1.141	1.73	0.54 -	0.59 -

PHV 914-1	0	0.033	0.05	0.00	0.06
PHV 914-2	5	0.024	0.04	0.01	0.06
PHV 914-3	9	0.135	0.21	0.01	0.06
PHV 914-4	12	2.653	4.03	0.04	0.09
PHV 914-5	16	3.020	4.59	0.33 -	0.47 -
PHV 914-6	19	2.302	3.60	0.82 -	0.9 -
PHV 914-7	24	2.697	4.10	3.10	2.41
PHV 914-8	30	2.744	4.17	4.85	4.09
PHV 914-9	33	2.991	4.55	4.85	4.62

ID	Bleed Day	s	Ortho		Abbott
			HCV 4.0	HCV 3.0	Prism
			s/co	s/co	s/co
6212-1	11/16/95	0.723	4.10	0.01	0.08
6212-2	11/28/95	2.716	4.13	0.65	1.28
6212-3	11/30/95	3.117	2.74	1.15	1.87
6212-4	12/09/95	3.278	3.88	2.08	2.65
6212-5	12/12/95	3.527	3.58	2.04	2.83
6212-6	12/18/95	3.292	3.02	2.51	3.07
6212-7	12/23/95	3.096	2.41	3.31	2.80
6212-8	01/08/96	3.241	4.93	3.34	3.45
6212-9	01/10/96	3.306	5.02	3.38	3.24

6213-1	01/16/96	0.035	0.05	0.01	0.09
6213-2	01/18/96	0.028	0.04	0.00	0.07
6213-3	01/24/96	0.037	0.06	0.01	0.08
6213-4	01/27/96	0.047	0.07	0.01	0.09
6213-5	01/31/96	0.034	0.05	0.01	0.07
6213-6	02/03/96	0.037	0.06	0.01	0.07
6213-7	02/13/96	0.056	0.09	0.01	0.07
6213-8	02/15/96	0.027	0.04	0.01	0.06
6213-9	02/20/96	0.098	0.15	0.01	0.11
6213-10	02/22/96	1.572	2.33	0.46 -	1.20
6213-11	02/28/96	3.410	5.18	1.10	2.70
6213-12	03/02/96	3.224	4.90	2.67	2.68

WO 01/96870

PCT/US01/19156

TABLE 3 (continued)

ID	Bleed Day	s	HCV 4.0		Ortho	Abbott
			s/co	s/co	HCV 3.0	Prism
6214-1	01/13/96	0.042	0.06	0.01	0.09	
6214-2	01/15/96	0.016	0.02	0.00	0.07	
6214-3	01/21/96	0.035	0.05	0.00	0.07	
6214-4	01/23/96	0.028	0.04	0.00	0.07	
6214-5	01/29/96	0.031	0.05	0.00	0.08	
6214-6	01/31/96	0.028	0.04	0.00	0.09	
6214-7	02/05/96	0.364	0.55	0.01	0.59	
6214-8	02/07/96	0.916	1.29	0.02 -	1.35	
6214-9	02/12/96	2.290	3.48	0.94 -	2.31	
6214-10	02/14/96	3.669	5.58	2.28	3.65	
6214-11	03/02/96	3.523	5.35	3.16	3.52	
6214-12	03/06/96	3.125	4.75	3.75	3.08	
6214-13	03/09/96	3.246	4.93	4.89	3.17	

6222-1	08/18/96	0.023	0.03	0.01	0.08	
6222-2	08/20/96	0.191	0.23	0.00	0.08	
6222-3	09/04/96	0.053	0.08	0.00	0.06	
6222-4	09/05/96	0.016	0.02	0.00	0.06	
6222-5	09/11/96	0.015	0.02	0.00	0.07	
6222-6	09/13/96	0.009	0.01	0.00	0.06	
6222-7	09/23/96	0.817	1.24	0.04	0.36	
6222-8	09/27/96	2.862	4.35	1.10	3.74	

ID	Bleed Day	s	HCV 4.0		Ortho	Abbott
			s/co	s/co	HCV 3.0	Prism
SC-0030-A	1	0.024	0.04	0.01	0.05	
SC-0030-B	40	1.658	2.52	0.94 -	0.54 -	
SC-0030-C	45	2.372	3.50	3.07	3.15	

SC-0040-A	1	0.773	1.17	0.02	0.09	
SC-0040-B	3	1.491	2.27	0.12	0.54	
SC-0040-C	8	2.400	3.55	0.77 -	2.58	
SC-0040-D	10	2.639	4.01	1.57	3.25	
SC-0040-E	15	3.423	5.20	3.45	3.45	

WO 01/96870

PCT/US01/19156

TABLE 4

		Panel	Bleed days earlier detection		early c33c panels	early c22 panels
			HCV 3.0	Abbott Prism		
#1	c33c	PHV 904	2	2	PHV 904	PHV 907
#2	c33c	PHV 905	7	3	PHV 905	PHV 909
#3	c22	PHV 907	3	0	PHV 908	PHV 910
#4	c33c	PHV 908	8	0	PHV 914	PHV 911
#5	c22	PHV 909	0	0	6212	PHV 912
#6	c22	PHV 910	0	0	6213	PHV 913
#7	c22	PHV 911	0	0	6214	SC-0010
#8	c22	PHV 912	0	0	6222	SC-0030
#9	c22	PHV 913	2	2	SC-0040	
#10	c33c	PHV 914	12	12		
#11	c33c	6212	14	12		
#12	c33c	6213	6	0		
#13	c33c	6214	7	0		
#14	c33c	6222	4	4		
#15	c22	SC-0010	0	0		
#16	c22	SC-0030	5	5		
#17	c33c	SC-0040	9	7		
Range of improvement			2-14 days	2-12 days		

WO 01/96870

PCT/US01/19156

EXAMPLE 6

HCV 4.0 Genotype Sensitivity

The genotype sensitivity of the HCV 4.0 assay was compared to the HCV 3.0 and Pasteur assays, described above. In particular, samples from 10 different HCV
5 genotypes, specified in Table 5, were diluted as indicated in the table (2-fold or 10-fold depending on initial sample titering) and used in the three assays, using the procedures described above. All three tests were run simultaneously. The data is shown as signal or raw O.D. The data suggests that the HCV 4.0 prototype is more sensitive in detecting diluted genotype samples.

10

WO 01/96870

PCT/US01/19156

TABLE 5

HCV 4.0 and Genotype Dilutional Sensitivity

dilution	genotype	HCV 4.0		HCV 3.0		Monoclonal Ver. 2		HCV 4.0	HCV 3.0		Monoclonal Ver. 2
		prototype	s	Ortho	s	Ortho	Ortho		Ortho	Pasteur	
1:2500	1b	2.866	1.007	0.694	2.478	0.701	4b/c	2.478	1.125	0.256	0.551
1:5000		2.074	0.393	0.218	1.125	0.256		1.125	0.609	0.076	0.195
1:10000		1.099	0.169	0.084	0.609	0.076		0.609	0.216	0.035	0.033
1:20000		0.403	0.045	0.028	0.216	0.035		0.216			
1:2500	2b	1.430	0.295	0.658	2.831	0.632	4a	2.831	1.752	0.193	0.462
1:5000		0.551	0.108	0.207	1.752	0.193		1.752	0.717	0.069	0.181
1:10000		0.225	0.032	0.061	0.717	0.069		0.717	0.248	0.015	0.025
1:20000		0.074	0.010	0.019	0.248	0.015		0.248			
1:2500	2a/c	1.952	0.467	1.653	1.751	0.457	4c	1.751	0.856	0.189	1.147
1:5000		0.917	0.136	0.782	0.856	0.189		0.856	0.384	0.055	0.178
1:10000		0.395	0.049	0.286	0.384	0.055		0.384	0.141	0.018	0.058
1:20000		0.108	0.011	0.105	0.141	0.018		0.141			
1:2500	3a	2.590	0.514	0.941	2.682	1.496	5a	2.682	2.744	0.827	2.271
1:5000		1.622	0.218	0.353	2.744	0.827		2.744	1.587	0.316	0.988
1:10000		0.873	0.067	0.164	1.587	0.316		1.587	0.726	0.097	0.395
1:20000		0.398	0.023	0.050	0.726	0.097		0.726			0.120
1:2500	3e	1.207	0.158	0.291	3.516	3.247	6	3.516	3.602	3.594	ND
1:5000		0.461	0.039	0.114	3.602	3.594		3.602	3.224	2.863	ND
1:10000		0.155	0.011	0.053	3.224	2.863		3.224	1.192	0.380	ND
1:20000		0.054	0.003	0.024	1.192	0.380		1.192			

WO 01/96870

PCT/US01/19156

EXAMPLE 7

Competition Studies

The following competition study was conducted in order to assess whether the NS3/4a conformational epitope detected different antibodies than other HCV antigens.

5 In particular, the NS3/4a antigen was compared with the c200 antigen as follows.

0.5 µg and 1.0 µg of NS3/4a, produced as described above, or c200 (*Hepatology* (1992) 15:19-25, available in the ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey), were mixed with 20 µl of sample PHV914-5 (an early seroconversion bleed obtained from blood of an infected individual) in a total volume of 220 µl (1 x PBS). The mixture was incubated for 1 hour in microwells at 10 37°C. The mixture was then transferred to NS3/4a-coated plates and incubated for 1 hour at 37°C. Plates were washed and assayed as follows.

1 µg of c200 antigen was added to 10 µl of sample PHV914-5 in a total volume of about 220 µl. The mixture was incubated for 1 hour in a micro well at 37°C and 200 µl transferred to an NS3/4a-coated plate (100 ng/assay) and incubated for 1 hour at 15 37°C. Plates were washed five times with 1 x PBS, 0.1% Tween-20. 200 µl of conjugate solution (described above) were added, and the plates incubated and assayed as described in Example 4 for the HCV 4.0 assay. Controls which consisted of PHV914-5 and 1 x PBS (without antigen) were also treated as above.

20 Results are shown in Table 6. Percent inhibition results shown in column 4 are calculated as column 3 minus (column 2 divided by column 3 times 100). As can be seen, the data show that NS34a is neutralized by early seroconversion antibodies and c200 is not. A strong signal was achieved when antibodies in PHV914-5 c33c early seroconversion panel member reacted with the NS34a coated on the plate. The c200 antigen was not neutralized by these antibodies. This is shown in the top panel of Table 25 6. When NS34a was mixed with the PHV914-5 sample, it was neutralized and therefore no antibodies were present in the sample to react with NS34a that was coated on the microplate. The data indicate that NS34a may be detecting a different class of antibodies than is detected by c200.

30

Competition Studies to Show NS3/4a Antigen Detects Different Antibodies in Early c33c Seroconversion Panel Compared to c200 Antigen

	1	2	3	4
			Control 1XPBS	% inhibition
c200	+	PHV914-5	S	
1ug		1.450	1.645	12
1ug		1.545	1.687	8
0.5ug		1.557	1.913	19
0.5ug		1.719	1.804	5
NS3/4a	+	PHV914-5	S	
1ug		0.854	1.599	97
1ug		0.037	1.677	98
0.5ug		0.066	1.672	96
0.5ug		NA	1.524	NA

TABLE 6

WO 01/96870

PCT/US01/19156

EXAMPLE 8

Stability Studies of NS3/4a Conformational Epitope

To assess the role of stability of the NS3/4a epitope to assay performance, the following study was done to determine NS3/4a immunoreactivity versus time at room temperature. Small aliquots of stock NS3/4a were allowed to sit at room temperature and then frozen at intervals as shown in Table 7. All vials were coated simultaneously and tested against two early NS3 seroconversion panels. Assays were conducted as described above in Example 5 for HCV 4.0.

As can be seen in Table 7, the NS3/4a stock is not stable and immunoreactivity decreases with time. In addition, maintaining NS3/4a conformation is necessary for immunoreactivity.

Further stability studies were conducted as follows. Two conformational monoclonal antibodies made against NS3/4a using standard procedures were substituted for anti-HCV early seroconversion panels. Stock NS3/4a vials were stored at room temperature at time intervals 3, 6 and 24 hours. The NS3/4a from the frozen vials was coated at 90 ng/ml and assayed using the procedure described above. Results suggested that the two monoclonals were indeed conformational and their reactivity was sensitive to the handling of stock NS3/4a antigen at room temperature. The reactivity of a positive control monoclonal antibody did not change.

20

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Time (hrs)	0	6	21.4	29	35.5	46	52	control
	A	D	G	H	I	K	N	Reference
	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-3	1.5	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8
PHV 904-4	3.7	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	4.1
PHV 904-5	4.8	2.0	0.7	0.6	0.3	0.2	0.3	5.5
PHV 904-6	5.4	2.6	1.5	1.0	0.6	0.5	0.6	5.8
PHV 904-7	5.1	3.4	1.5	1.0	1.1	0.5	0.7	5.4
PHV 914-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-4	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
PHV 914-5	2.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
PHV 914-6	2.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1
PHV 914-7	2.8	0.5	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	4.9
PHV 914-8	2.9	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	4.9
Enzyme								
RFU/min	8.75	4.14	3.08	1.88	1.75	1.75	0.75	

TABLE 7

WO 01/96870

PCT/US01/19156

EXAMPLE 9

Immunoreactivity of NS3/4a Conformational Epitope Versus Denatured NS3/4a

The immunoreactivity of the NS3/4a conformational epitope, produced as described above, was compared to NS3/4a which had been denatured by adding SDS to the NS3/4a conformational epitope preparation to a final concentration of 2%. The denatured NS3/4a and conformational NS3/4a were coated onto microtiter plates as described above. The c200 antigen (*Hepatology* (1992) 15:19-25, available in the ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) was also coated onto microtiter plates. The c200 antigen was used as a comparison it is presumed to be non-conformational due to the presence of reducing agent (DTT) and detergent (SDS) in its formulation.

The immunoreactivity was tested against two early HCV seroconversion panels, PHV 904 and PHV 914 (commercially available human blood samples from Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA), using the ELISA assay procedure described above. The results are shown in Table 8. The data suggests that the denatured or linearized form of NS3/4a (as well as c200) does not detect early seroconversion panels as early as the NS3/4a conformational epitope.

TABLE 8

[illegible]

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Immunoreactivity of the conformational epitope was also tested using monoclonal antibodies to NS3/4a, made using standard procedures. These monoclonal antibodies were then tested in the ELISA format described above against NS3/4a and denatured NS3/4a and c200 antigen. The data show that anti-NS3/4a monoclonals react to the NS3/4a and denatured NS3/4a in a similar manner to the seroconversion panels shown in Table 9. This result also provides further evidence that the NS3/4a is conformational in nature as monoclonal antibodies can be made which are similar in reactivity to the early c33c seroconversion panels.

10	Table 9				
15	Monoclonal		Plate		
			NS3/4a	dNS3/4a	c200
			OD	OD	OD
			4B9/E3	1:100	1.820
			1:1000	1.397	0.616
20			1:10000	0.864	0.380
			1:100000	0.173	0.246
			1:20000	0.607	0.173
			1:200000	0.116	0.070
			5B7/D7	1:100	2.885
25			1:1000	2.866	0.898
			1:10000	1.672	0.541
			1:20000	1.053	0.267
			1A8/H2	1:100	1.020
			1:1000	0.921	0.169
			1:10000	0.653	0.101
			1:20000	0.337	0.037
					0.013
					0.011

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Accordingly, novel HCV detection assays have been disclosed. From the foregoing, it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope thereof.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

Claims

1. An immunoassay solid support consisting essentially of at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, bound to the support, wherein said NS3/4a epitope and/or said multiple epitope fusion antigen react specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.
2. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said NS3/4a epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto which has protease activity.
3. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said NS3/4a epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 90% sequence identity thereto which has protease activity.
4. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said NS3/4a epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 98% sequence identity thereto which has protease activity.
5. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said NS3/4a epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D.
6. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

7. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 90% sequence identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-
5 infected individual.

8. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 98% sequence identity thereto which reacts
10 specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

9. The immunoassay solid support of claim 1, wherein said multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.
15

10. An immunoassay solid support consisting essentially of at least one HCV NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, bound to the support, wherein said NS3/4a conformational epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 80%
20 sequence identity thereto which has protease activity, and said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

11. The immunoassay solid support of claim 10, wherein said NS3/4a conformational epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid sequence with at least 90% sequence identity thereto which has protease activity, and said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 90%
25

WO 01/96870

PCT/US01/19156

sequence identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

12. The immunoassay solid support of claim 10, wherein said NS3/4a
5 conformational epitope comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D,
or an amino acid sequence with at least 98% sequence identity thereto which has
protease activity, and said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid
sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 98%
sequence identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a
10 biological sample from an HCV-infected individual.

13. The immunoassay solid support of claim 10, wherein said NS3/4a
conformational epitope consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D,
and said multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in
15 Figures 5A-5F.

14. An immunoassay solid support consisting essentially of at least one HCV
NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen, bound to the
support, wherein said NS3/4a conformational epitope consists of the amino acid
20 sequence depicted in Figures 3A-3D, and said multiple epitope fusion antigen consists of
the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

15. An immunodiagnostic test kit comprising the immunoassay solid support of
any of claims 1-14, and instructions for conducting the immunodiagnostic test.
25

16. A method of producing an immunoassay solid support, comprising:
(a) providing a solid support; and
(b) binding to the solid support at least one HCV NS3/4a conformational epitope
and a multiple epitope fusion antigen, wherein said NS3/4a epitope and/or said multiple

WO 01/96870

PCT/US01/19156

epitope fusion antigen react specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

17. The method of claim 16, wherein said NS3/4a conformational epitope
5 comprises the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, or an amino acid
sequence with at least 80% sequence identity thereto which has protease activity, and
said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in
Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence identity thereto
which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from
10 an HCV-infected individual.

18. The method of claim 17, wherein said NS3/4a conformational epitope
consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, and said multiple
epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.
15

19. A method of producing an immunoassay solid support, comprising:
(a) providing a solid support; and
(b) binding to the solid support at least one HCV NS3/4a conformational epitope
and a multiple epitope fusion antigen, wherein said NS3/4a conformational epitope
20 consists of the amino acid sequence depicted in Figures 3A-3D, and said multiple
epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

20. A multiple epitope fusion antigen comprising the amino acid sequence
depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 80% sequence
25 identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a
biological sample from an HCV-infected individual.

21. The multiple epitope fusion antigen of claim 20, wherein said multiple
epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or
30 an amino acid sequence with at least 90% sequence identity thereto which reacts

WO 01/96870

PCT/US01/19156

specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

22. The multiple epitope fusion antigen of claim 20, wherein said multiple epitope fusion antigen comprises the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or an amino acid sequence with at least 98% sequence identity thereto which reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

23. The multiple epitope fusion antigen of claim 20, wherein said multiple epitope fusion antigen consists of the amino acid sequence depicted in Figures 5A-5F.

24. A polynucleotide comprising a coding sequence for the multiple epitope fusion antigen of any of claims 20-23.

25. The polynucleotide of claim 24, wherein said polynucleotide comprises the nucleic acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or a nucleic acid sequence with at least 80% sequence identity thereto which encodes a polypeptide that reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

26. The polynucleotide of claim 24, wherein said polynucleotide comprises the nucleic acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or a nucleic acid sequence with at least 90% sequence identity thereto which encodes a polypeptide that reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

27. The polynucleotide of claim 24, wherein said polynucleotide comprises the nucleic acid sequence depicted in Figures 5A-5F, or a nucleic acid sequence with at least 98% sequence identity thereto which encodes a polypeptide that reacts specifically with anti-HCV antibodies present in a biological sample from an HCV-infected individual.

WO 01/96870

PCT/US01/19156

28. A recombinant vector comprising:
(a) a polynucleotide according to any of claims 24-27;
(b) and control elements operably linked to said polynucleotide whereby the coding sequence can be transcribed and translated in a host cell.
- 5
29. A host cell transformed with the recombinant vector of claim 28.
30. A method of producing a recombinant multiple epitope fusion antigen comprising:
- 10 (a) providing a population of host cells according to claim 29; and
(b) culturing said population of cells under conditions whereby the multiple epitope fusion antigen encoded by the coding sequence present in said recombinant vector is expressed.
- 15
31. Use of an immunoassay solid support according to any of claims 1-14 for the manufacture of a diagnostic reagent for use in a method of detecting hepatitis C virus (HCV) infection in a biological sample.
32. A method of detecting hepatitis C virus (HCV) infection in a biological sample, said method comprising:
- 20 (a) providing an immunoassay solid support according to any of claims 1-14;
(b) combining a biological sample with said solid support under conditions which allow HCV antibodies, when present in the biological sample, to bind to said NS3/4a epitope and/or said multiple epitope fusion antigen to form a first immune complex;
- 25 (c) adding to the solid support from step (b) under complex forming conditions a detectably labeled antibody, wherein said labeled antibody is reactive with said immune complex;

WO 01/96870

PCT/US01/19156

(d) detecting second immune complexes formed between the detectably labeled antibody and the first immune complex, if any, as an indication of HCV infection in the biological sample.

HCY									
1035-1711									
C	E1	E2	N52	N53	N54a	N54b	N55a	N55b	
1-31	107-235	184-246	110-058	107-1-67	107-2-50	107-3-072	107-3-50	107-3-811	
74-239									
24-146									
E3									
24-146									
Prostate 1077-2407									
Bileduct 1077-2471									
E11									
105-4-251									
C100									
1570-3072									
C20									
105-1-195									
C25									
107-2-157									
N55b									
107-2-151									
N55c									
107-2-151									
N55d									
107-2-151									
N55e									
107-2-151									
N55f									
107-2-151									
N55g									
107-2-151									
N55h									
107-2-151									
N55i									
107-2-151									
N55j									
107-2-151									
N55k									
107-2-151									
N55l									
107-2-151									
N55m									
107-2-151									
N55n									
107-2-151									
N55o									
107-2-151									
N55p									
107-2-151									
N55q									
107-2-151									
N55r									
107-2-151									
N55s									
107-2-151									
N55t									
107-2-151									
N55u									
107-2-151									
N55v									
107-2-151									
N55w									
107-2-151									
N55x									
107-2-151									
N55y									
107-2-151									
N55z									
107-2-151									

1/20

WO 01/96870

PCT/US01/19156

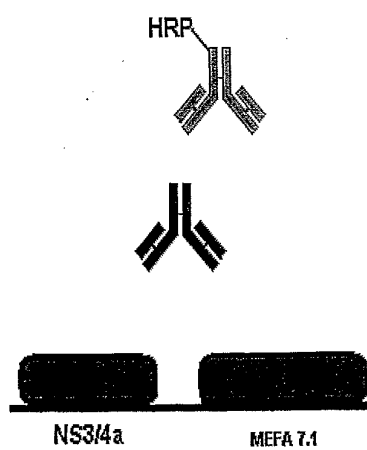


FIG. 2

WO 01/96870

PCT/US01/19156

```

      1                               10
      M A P I T A Y A Q Q
      ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG CAG

      20
      T R G L L G C I I T S L T G R
      ACA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CGG

      30                               40
      D K N Q V E G E V Q I V S T A
      GAC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT

      50
      A Q T F L A T C I M G V C W T
      GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

      60                               70
      V Y H G A G T R T I A S P K G
      GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

      80
      P V I Q M Y T N V D Q D L V G
      CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

      90                               100
      W P A P Q G S R S L T P C T C
      TGG CCC GCT CCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC

      110
      G S S D L Y L V T R H A D V I
      GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

      120                               130
      P V R R R G D S R G S L L S P
      CCC GTG CCG CGG CGG GGT GAT AGC AGG GGC AGC CTG CTG TCG CCC

      140
      R P I S Y L K G S S G G P L L
      CGG CCC ATT TCC TAC TTG AAA GGC TCC TCG GGG GGT CCG CTG TTG

      150                               160
      C P A G H A V G I F R A A V C
      TGC CCC GCG GGG CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGG GCC GCG GTG TGC

      170
      T R G V A K A V D F I P V E N
      ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

      180                               190
      L E T T M R S P V F T D N S S
      CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT

```

FIG. 3A

WO 01/96870

PCT/US01/19156

200
P P V V P Q S F Q V A H L H A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT

210 220
P T G S G K S T K V P A A Y A
CCA ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA

230
A Q G Y K V L V L N P S V A A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

240 250
T L G F G A Y M S K A H G I D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT

260
P N I R T G V R T I T T G S P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC

270 280
I T Y S T Y G K F L A D G G C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC

290
S G G A Y D I I I C D E C H S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

300 310
T D A T S I L G I G T V L D Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA

320
A E T A G A R L V V L A T A T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC

330 340
P P G S V T V P H P N I E E V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT

350
A L S T T G E I P F Y G K A I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

360 370
P L E V I K G G R H L I F C H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT

380
S K K K C D E L A A K L V A L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG

FIG. 3B

WO 01/96870

PCT/US01/19156

390 400
G I N A V A Y Y R G L D V S V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC

410
I P P I G D V V V V A T D A L
ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC

420 430
M T G Y T G D F D S V I D C N
ATG ACC GGC TAT ACG GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT

440
T C V T Q T V D F S L D P T F
ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC

450 460
T I E T I T L P Q D A V S R T
ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT

470
Q R R G R T G R G K P G I Y R
CAA CGT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA

480 490
F V A P G E R P S G M F D S S
TTT GTG GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC

500
V L C E C Y D A G C A W Y E L
GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC

510 520
T P A E T T V R L R A Y M N T
ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC

530
P G L P V C Q D H L E F W E G
CCG GGG CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC

540 550
V F T G L T H I D A H F L S Q
GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG

560
T K Q S G E N L P Y L V A Y Q
ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA

570 580
A T V C A R A Q A P P P S W D
GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC

FIG. 3C

WO 01/96870

PCT/US01/19156

590
Q M W K C L I R L K P T L H G
CAG ATG TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG

600
P T P L L Y R L G A V Q N E I
CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC

620
T L T H P V T K Y I M T C M S
ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG

630
A D L E V V T S T W V L V G G
GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG AGC ACC TGG GTG CTC GTT GGC GGC

650
V L A A L A A Y C L S T G C V
GTC CTG GCT GCT TTG GCC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG

660
V I V G R V V L S G K P A I I
GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

680
P D R E V L Y R E F D E M E E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

686
C
TGC

FIG. 3D

WO 01/96870

PCT/US01/19156

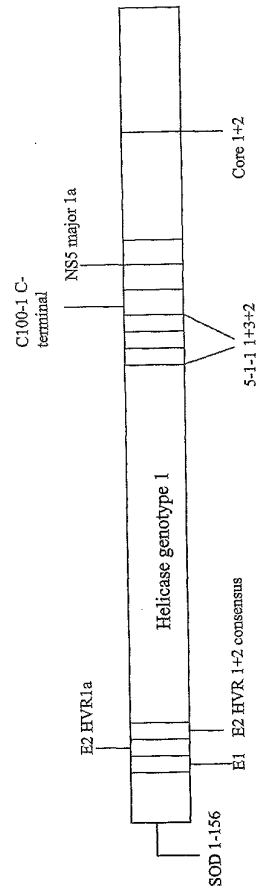


FIG. 4

WO 01/96870

PCT/US01/19156

```

1      10      20      30
M  A  T  K  A  V  C  V  L  K  G  D  G  P  V
ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT

      40      50      60
Q  G  I  I  N  F  E  Q  K  E  S  N  G  P  V
CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG

      70      80      90
K  V  W  G  S  I  K  G  L  T  E  G  L  H  G
AAG GTG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA

      100     110     120
F  H  V  H  E  F  G  D  N  T  A  G  C  T  S
TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT

      130     140     150
A  G  P  H  F  N  P  L  S  R  K  H  G  G  P
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC AGA AAA CAC GGT GGG CCA

      160     170     180
K  D  E  E  R  H  V  G  D  L  G  N  V  T  A
AAG GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT

      190
D  K  D  G  V  A  D  V  S  I  E  D  S  V  I
GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC

      200     210     220
S  L  S  G  D  H  C  I  I  G  R  T  L  V  V
TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CGC ACA CTG GTG GTC

      230     240     250
H  E  K  A  D  D  L  G  K  G  G  N  E  E  S
CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT

      260     270     280
T  K  T  G  N  A  G  S  R  L  A  C  G  V  I
ACA AAG ACA GGA AAC GCT GGA AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT

      290     300     310
G  I  A  Q  N  L  N  S  G  C  N  C  S  I  Y
GGG ATC GCC CAG AAT TTG AAT TCT GGT TGC AAT TGC TCT ATC TAT

      320     330     340
P  G  H  I  T  G  H  R  M  A  W  K  L  G  S
CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CGC ATG GCA TGG AAG CTT GGT TCC

      350
A  A  R  T  T  S  G  F  V  S  L  F  A  P  G
GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC GCC CCA GGT

```

FIG. 5A

WO 01/96870

PCT/US01/19156

200 210
A K Q N E T H V T G G A A A R
GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA GCC GCC CGA

220
T T S G L T S L F S P G A S Q
ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT GCC AGC CAA

230 240
N I Q L I V D F I P V E N L E
AAC ATT CAA TTG ATT GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC CTA GAG

250
T T M R S P V F T D N S S P P
ACA ACC ATG CGA TCT CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA

260 270
V V P Q S F Q V A H L H A P T
GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA

280
G S G K S T K V P A A Y A A Q
GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG

290 300
G Y K V L V L N P S V A A T L
GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG

310
G F G A Y M S K A H G I D P N
GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGC ATC GAT CCT AAC

320 330
I R T G V R T I T T G S P I T
ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG

340
Y S T Y G K F L A D G G C S G
TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG

350 360
G A Y D I I I C D E C H S T D
GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT

370
A T S I L G I G T V L D Q A E
GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG

380 390
T A G A R L V V L A T A T P P
ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC CCT CCG

400
G S V T V P H P N I E E V A L
GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG

410 420

FIG. 5B

WO 01/96870

PCT/US01/19156

S T T G E I P F Y G K A I P L
TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC

430
E V I K G G R H L I F C H S K
GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG

440 450
K K C D E L A A K L V A L G I
AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC

460
N A V A Y Y R G L D V S V I P
AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG

470 480
T S G D V V V A T D A L M T
ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC

490
G Y T G D F D S V I D C N T C
GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT

500 510
V T Q T V D F S L D P T F T I
GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT

520
E T I T L P Q D A V S R T Q R
GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CGC ACT CAA CGT

530 540
R G R T G R G K P G I Y R F V
CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG

550
A P G E R P S G M F D S S V L
GCA CCG GGG GAG CGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC

560 570
C E C Y D A G C A W Y R L T P
TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC

580
A E T T V R L R A Y M N T P G
GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG

590 600
L P V C Q D H L E F W E G V F
CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT

610
T G L T H I D A R F L S Q T K
ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG

620 630
Q S G E N L P Y L V A Y Q A T

FIG. 5C

WO 01/96870

PCT/US01/19156

CAG AGT GGG GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC

640
V C A R A Q A P P P S W D Q M
GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG

650
W K C L I R L K P T L H G P T
TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA

670
P L L Y R L G A V Q N E I T L
CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG

680
T H P V T K Y I M T C M S A D
ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC

700
L E V V T S A C S G K P A I I
CTG GAG GTC GTC AGC AGC GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA

710
P D R E V L Y R E F D E M E E
CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG

730
C S Q H L P Y I E Q G M M L A
TGC TCT CAG CAC TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC

740
E Q F K Q K A L G L S R G G K
GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG

760
P A I V P D K E V L Y Q Q Y D
CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT

770
E M E E C S Q A A P Y I E Q A
GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT

790
Q V I A H Q P K E K V L G L I
CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC

800
D N D Q V V V T P D K E I L Y
GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT

820
E A F D E M E E C A S K A A L
GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC

830
I E E G Q R M A E M L K S K I
ATT GAG GAA GGG CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA

FIG. 5D

WO 01/96870

PCT/US01/19156

850
Q G L L G I L R R H V G P G E
CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CGC CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG

860
G A V Q W M N R L I A F A S R
GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA

880
G N H V S P T H Y V P S R S R
GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG

890
R F A Q A L P V W A R P D Y N
AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC

910
P P L V E T W K K P D Y E P P
CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT

920
V V H G R S S R R F A Q A L P
GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC

940
V W A R P D Y N P P L V E T W
GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG

950
K K P D Y E P P V V H G R K T
AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC

970
K R N T N R R P Q D V K F P G
AAA CGT AAC ACC AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT

980
G G Q I V G R R G P P I P K A
GGC GGT CAG ATC GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT

1000
R R P E G R T W A Q P G Y P W
CGT CGG CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG

1010
P L Y G N K D R R S T G K S W
CCC CTC TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG

1030
G K P G Y P W P R K T K R N T
GGT AAG CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC

1040
N R R P Q D V K F P G G G Q I
AAC CGA CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC

FIG. 5E

WO 01/96870

PCT/US01/19156

1060
V G R R G P P I P K A R R P E
GTT GGT CGC AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG

1070
G R T W A Q P G Y P W P L Y G
GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC

1080
N K D R R S T G K S W G K P G
AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACC GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG

1090
Y P W P
TAT CCT TGG CCC

FIG. 5F

WO 01/96870

PCT/US01/19156

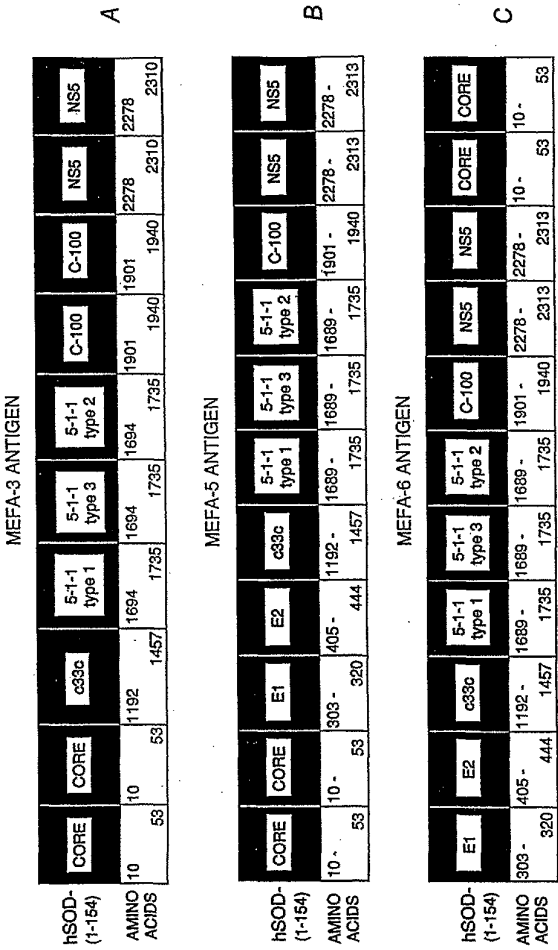


FIG. 6

WO 01/96870

PCT/US01/19156

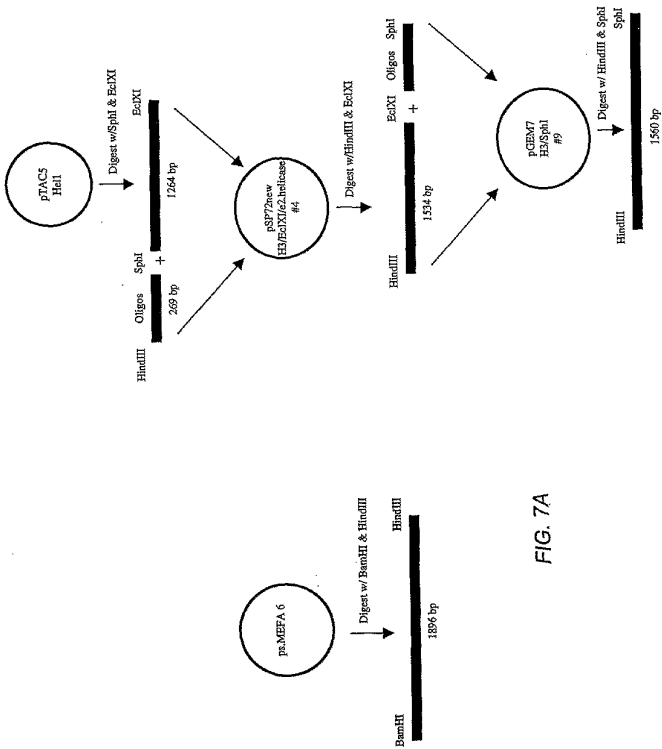


FIG. 7A

WO 01/96870

PCT/US01/19156

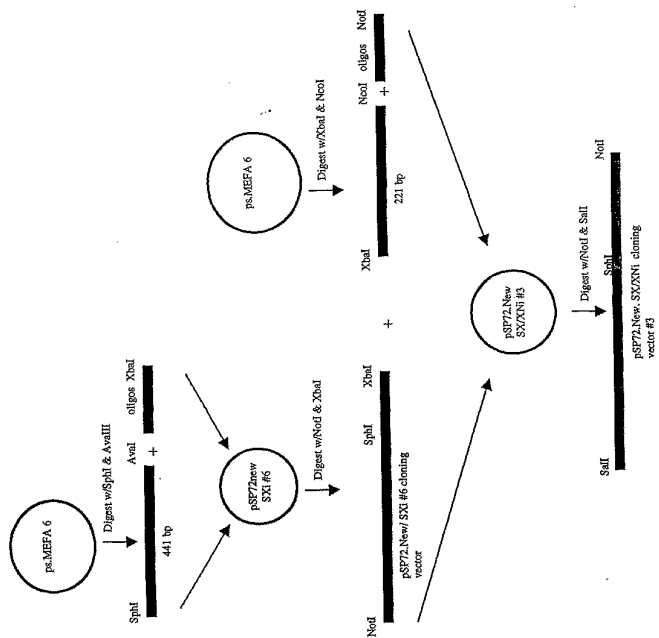


FIG. 7B

WO 01/96870

PCT/US01/19156

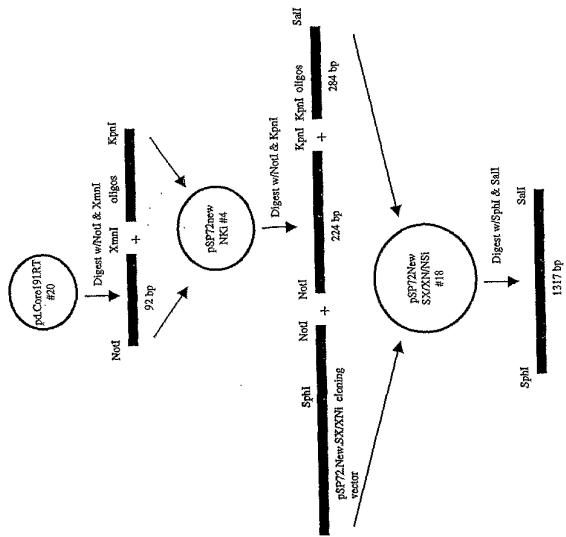


FIG. 7C

WO 01/96870

PCT/US01/19156

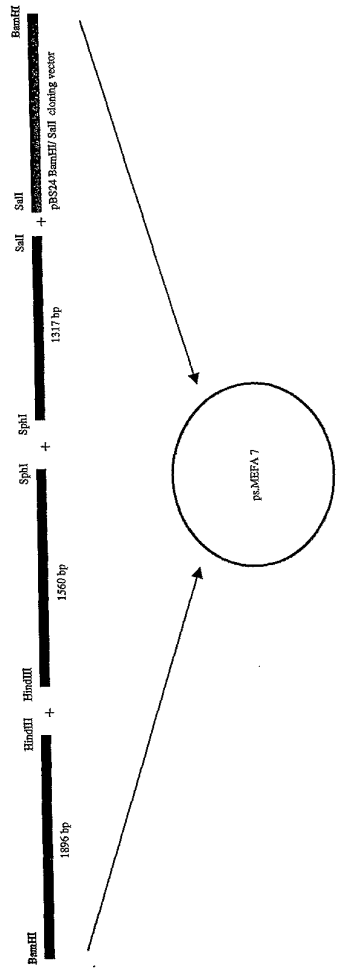
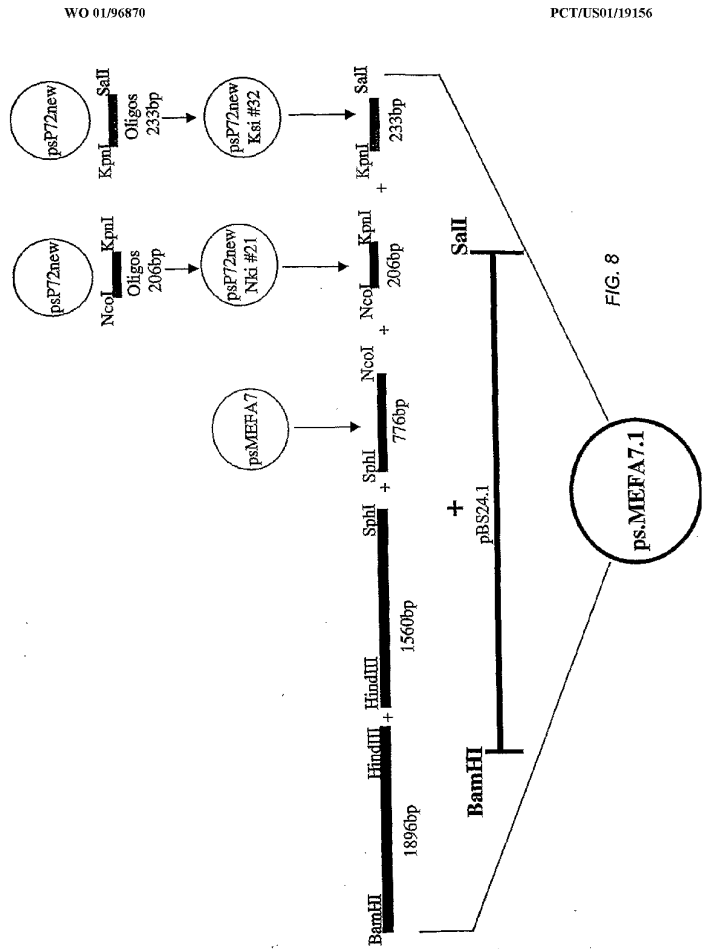
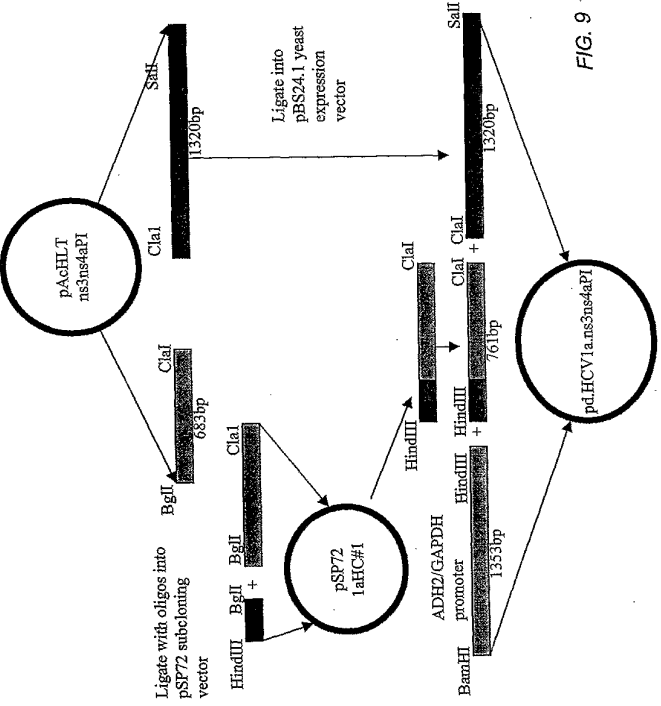


FIG. 7D



WO 01/96870

PCT/US01/19156



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)



PCT



#310, Oakland, CA 94611 (US). **TANDESKE, Laura** [US/US]; 305 Melvin Court, San Leandro, CA 94577 (US).
GEORGE-NASCIEMENTO, Carlos [CL/US]; 2061
 Magnolia Way, Walnut Creek, CA 94595 (US). **COIT,**
Doris [US/US]; 1058 Rancho Lindo Drive, Petaluma, CA
 94952 (US). **MEDINA-SELBY, Angelica** [CL/US]; 136
 Galewood Circle, San Francisco, CA 94131 (US).

Magnolia Way, Walnut Creek, CA 94595 (US). **COIT, Doris** [US/US]; 1058 Rancho Lindo Drive, Petaluma, CA 94952 (US). **MEDINA-SELBY, Angelica** [CI/US]; 136 Galewood Circle, San Francisco, CA 94131 (US).

94952 (US). **MEDINA-SELBY, Angelica** [CI/US]; 136
Galewood Circle, San Francisco, CA 94131 (US).

Agent: HARBIN, Alisa, A.; Chiron Corporation, Intellectual Property R-440, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US).

(US).

Designated States (national): AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, 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, LV, LU, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

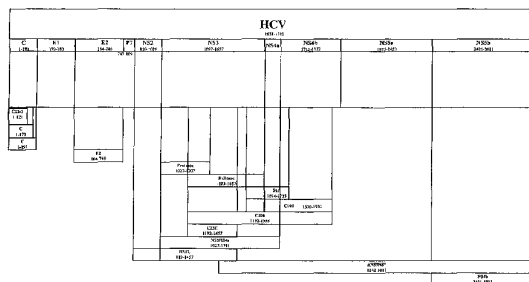
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZW.

patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BL, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

IT, LU, MC, NI, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: IMMUNOASSAYS FOR ANTI-HCV ANTIBODIES

HCV Genome and Recombinant Proteins



(57) Abstract: HCV immunoassays comprising an NS3/4a conformational epitope and a multiple epitope fusion antigen are provided, as well as immunoassay solid supports for use with the immunoassays.

WO 01/096870 A3

WO 01/096870 A3

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:
31 July 2003

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/19156
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53 C07K14/18 G01N33/576		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GB 2 257 784 A (CHIRON CORP) 20 January 1993 (1993-01-20) claim 1; figure 26	1,2
Y	EP 0 318 216 A (CHIRON CORP) 31 May 1989 (1989-05-31) the whole document	1-19,31, 32
Y	GB 2 212 511 A (CHIRON CORP) 26 July 1989 (1989-07-26) the whole document	1-19,31, 32
X	WO 94 25601 A (INNOGENETICS NV; MAERTENS GEERT (BE); STUYVER LIEVEN (BE)) 10 November 1994 (1994-11-10) claim 1	1,2,6, 10, 15-17, 31,32
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ 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 17 January 2003		Date of mailing of the international search report 16. 04. 03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2000, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hinchliffe, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/US 01/19156
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PT 97 247 B (CHIRON CORP) 31 January 1992 (1992-01-31) the whole document	1,2,6, 10, 15-17, 31,32
X	EP 0 870 830 A (TONEN CORP) 14 October 1998 (1998-10-14) the whole document	1,2,6, 10, 15-17, 31,32
X	US 5 683 864 A (CHOO QUI-LIM ET AL) 4 November 1997 (1997-11-04) cited in the application the whole document	1,2,6, 10, 15-17, 31,32
A	WO 97 12043 A (CHIRON CORP) 3 April 1997 (1997-04-03) cited in the application the whole document	1-19,31, 32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		national application No. PCT/US 01/19156
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☒	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-19, 31, 32
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01 /9156

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-19,31,32

An immunoassay solid support and use thereof, comprising both an NS3/4a antigen and a multiple epitope fusion antigen on a solid matrix. Alleged inventive concept is the advantages of detecting early seroconversion using this combination of antigens.

2. Claims: 20-30

A multiple fusion antigen, its sequence, methods for its manufacture, vectors and cell lines containing said sequence are claimed. No inventive concept seems to be provided by the application as to why this sequence and its expression is inventive.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/19156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 2257784 A	20-01-1993	BG 61291 B	30-04-1997
		BR 9106309 A	20-04-1993
		CY 1881 A	05-04-1996
		FI 924349 A	28-09-1992
		JP 5508219 T	18-11-1993
		KR 206150 B	01-07-1999
		LV 10344 A	20-10-1994
		NO 923839 A	19-11-1992
		PL 172133 B	29-08-1997
		RO 109916 B	28-07-1995
		RU 2130969 C	27-05-1999
		AT 139343 T	15-06-1996
		AT 182684 T	15-08-1999
		AU 639560 B	29-07-1993
		AU 7651091 A	30-10-1991
		DE 69120138 D	18-07-1996
		DE 69120138 T	14-11-1996
		DE 69131488 D	02-09-1999
		DE 69131488 T	18-11-1999
		DK 450931 T	01-07-1996
		DK 693687 T	29-11-1999
		EP 0450931 A	09-10-1991
		EP 0693687 A	24-01-1996
		ES 2088465 T	16-08-1996
		ES 2134388 T	01-10-1999
		GR 3020964 T	31-12-1996
		GR 3031361 T	31-01-2000
		HU 62706 A	28-05-1993
		HU 217025 B	29-11-1999
		IE 911105 A	09-10-1991
		JP 2733138 B	30-03-1998
		LT 1747 A, B	25-07-1995
		LV 10344 B	20-02-1996
		WO 9115771 A	17-10-1991
		US 5712087 A	27-01-1998
		US 6312889 B	06-11-2001
		US 5683864 A	04-11-1997
EP 0318216 A	31-05-1989	AT 98690 T	15-01-1994
		AU 624105 B	04-06-1992
		AU 2796789 A	14-06-1989
		BR 8807310 A	13-03-1990
		CN 1285514 A	28-02-2001
		CN 1299973 A	20-06-2001
		CN 1035679 A, B	20-09-1989
		CN 1073719 A, B	30-06-1993
		CN 1249433 A	05-04-2000
		DD 287104 A	14-02-1991
		DD 298524 A	27-02-1992
		DD 298525 A	27-02-1992
		DD 298526 A	27-02-1992
		DD 298527 A	27-02-1992
		DE 3886363 D	27-01-1994
		DE 3886363 T	19-05-1994
		DE 318216 T	13-06-1990
		DK 353789 A	18-07-1989
		ES 2012739 T	01-12-1994
		FI 893447 A	17-07-1989

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/19156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0318216 A		FI 981380 A	15-06-1998
		FI 20001390 A	12-06-2000
		GB 2212511 A,B	26-07-1989
		GR 90300069 T	31-07-1991
		HK 38293 A	30-04-1993
		HR 940493 A	31-08-1997
		HU 53148 A,B	28-09-1990
		HU 220204 B	28-11-2001
		HU 9500427 A	28-12-1995
		IE 62868 B	08-03-1995
		IL 88420 A	31-10-2000
		IN 171237 A	22-08-1992
		IN 171238 A	22-08-1992
		IN 171239 A	22-08-1992
		IN 171240 A	22-08-1992
		IN 169067 A	31-08-1991
		JP 2810032 B	15-10-1998
		JP 10108674 A	28-04-1998
		JP 10290696 A	04-11-1998
		JP 10290697 A	04-11-1998
		JP 2000023683 A	25-01-2000
		JP 2662358 B	08-10-1997
		JP 6225797 A	16-08-1994
		JP 2810022 B	15-10-1998
		JP 9184844 A	15-07-1997
		JP 3171793 B	04-06-2001
		JP 9173079 A	08-07-1997
		JP 2809956 B	15-10-1998
		JP 6128290 A	10-05-1994
		JP 2662350 B	08-10-1997
GB 2212511 A	26-07-1989	AT 98690 T	15-01-1994
		AU 624105 B	04-06-1992
		AU 2796789 A	14-06-1989
		BR 8807310 A	13-03-1990
		CN 1285514 A	28-02-2001
		CN 1299973 A	20-06-2001
		CN 1035679 A,B	20-09-1989
		CN 1073719 A,B	30-06-1993
		CN 1249433 A	05-04-2000
		DD 287104 A	14-02-1991
		DD 298524 A	27-02-1992
		DD 298525 A	27-02-1992
		DD 298526 A	27-02-1992
		DD 298527 A	27-02-1992
		DE 3886363 D	27-01-1994
		DE 3886363 T	19-05-1994
		DE 318216 T	13-06-1990
		DK 353789 A	18-07-1989
		EP 0318216 A	31-05-1989
		ES 2012739 T	01-12-1994
		FI 893447 A	17-07-1989
		FI 981380 A	15-06-1998
		FI 20001390 A	12-06-2000
		GR 90300069 T	31-07-1991
		HK 38293 A	30-04-1993
		HR 940493 A	31-08-1997
		HU 53148 A,B	28-09-1990

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

*Information on patent family members

Inventor's Application No.

PCT/US 01/19156

PCI/US 01/19156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
GB 2212511 A		HU 220204 B	28-11-2001	
		HU 9500427 A	28-12-1995	
		IE 62868 B	08-03-1995	
		IL 88420 A	31-10-2000	
		IN 171237 A	22-08-1992	
		IN 171238 A	22-08-1992	
		IN 171239 A	22-08-1992	
		IN 171240 A	22-08-1992	
		IN 169067 A	31-08-1991	
		JP 2810032 B	15-10-1998	
		JP 10108674 A	28-04-1998	
		JP 10290696 A	04-11-1998	
		JP 10290697 A	04-11-1998	
		JP 2000023683 A	25-01-2000	
		JP 2662358 B	08-10-1997	
		JP 6225797 A	16-08-1994	
		JP 2810022 B	15-10-1998	
		JP 9184844 A	15-07-1997	
		JP 3171793 B	04-06-2001	
		JP 9173079 A	08-07-1997	
		JP 2809956 B	15-10-1998	
		JP 6128290 A	10-05-1994	
		JP 2662350 B	08-10-1997	
WO 9425601 A	10-11-1994	AU 688323 B	12-03-1998	
		AU 6722294 A	21-11-1994	
		BR 9405334 A	25-05-1999	
		CA 2139100 A	10-11-1994	
		CN 1108030 A	06-09-1995	
		EP 0651807 A	10-05-1995	
		EP 1004670 A	31-05-2000	
		EP 0984068 A	08-03-2000	
		EP 0984067 A	08-03-2000	
		FI 946066 A	23-12-1994	
		JP 7508423 T	21-09-1995	
		JP 2002233388 A	20-08-2002	
		JP 2002233389 A	20-08-2002	
		NO 944967 A	21-12-1994	
		NZ 266148 A	24-06-1997	
		SG 50563 A	20-07-1998	
		US 2003032005 A	13-02-2003	
		US 2003008274 A	09-01-2003	
PT 97247	B	31-01-1992	PT 97247 A, B	31-01-1992
EP 0870830	A	14-10-1998	JP 9278794 A	28-10-1997
			US 6322965 B	27-11-2001
US 5683864	A	04-11-1997	US 5712087 A	27-01-1998
			US 6312889 B	06-11-2001
			AT 139343 T	15-06-1996
			AT 182684 T	15-08-1999
			AU 639560 B	29-07-1993
			AU 7651091 A	30-10-1991
			BG 61291 B	30-04-1997
			BR 9106309 A	20-04-1993
			CY 1881 A	05-04-1996
			DE 69120138 D	18-07-1996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

In
national Application No
PCT/US 01/19156

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5683864 A		DE 69120138 T	14-11-1996
		DE 69131488 D	02-09-1999
		DE 69131488 T	18-11-1999
		DK 450931 T	01-07-1996
		DK 693687 T	29-11-1999
		EP 0450931 A	09-10-1991
		EP 0693687 A	24-01-1996
		ES 2088465 T	16-08-1996
		ES 2134388 T	01-10-1999
		FI 924349 A	28-09-1992
		GB 2257784 A,B	20-01-1993
		GR 3020964 T	31-12-1996
		GR 3031361 T	31-01-2000
		HU 62706 A	28-05-1993
		HU 217025 B	29-11-1999
		IE 911105 A	09-10-1991
		JP 2733138 B	30-03-1998
		JP 5508219 T	18-11-1993
		KR 206150 B	01-07-1999
		LT 1747 A,B	25-07-1995
		LV 10344 A	20-10-1994
		LV 10344 B	20-02-1996
		NO 923839 A	19-11-1992
		PL 172133 B	29-08-1997
		RO 109916 B	28-07-1995
		RU 2130969 C	27-05-1999
		WO 9115771 A	17-10-1991
		AU 4750493 A	20-01-1994
		AU 666767 B	22-02-1996
		AU 4750593 A	16-12-1993
		AU 666576 B	15-02-1996
		AU 4750693 A	16-12-1993
		AU 640920 B	09-09-1993
		AU 5278390 A	22-10-1990
		CA 2012482 A	17-09-1990
		DE 388232 T	02-05-1991
		EP 1034785 A	13-09-2000
		EP 0388232 A	19-09-1990
WO 9712043 A	03-04-1997	US 6194140 B	27-02-2001
		AU 717875 B	06-04-2000
		AU 7238496 A	17-04-1997
		CA 2226293 A	03-04-1997
		EP 0850308 A	01-07-1998
		JP 11512606 T	02-11-1999
		NZ 319786 A	28-01-2000
		US 6472180 B	29-10-2002
		US 5989905 A	23-11-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/53	N
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR), OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,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,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZW

- (72) 発明者 アーカンジェル, フィリップ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 1 1, オークランド, オークランド アベニュー
5 6 7, ナンバー 3 1 0
- (72) 発明者 タンデスク, ローラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 7 7, サン リアンドロ, メルベン コート 3 0
5
- (72) 発明者 ジョージ - ナスシェメント, カルロス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 9 5, ウォルナット クリーク, マグノリア ウェ
イ 2 0 6 1
- (72) 発明者 コイト, ドリス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 5 2, ペタルマ, ロンチャ リンド ドライブ 1
0 5 8
- (72) 発明者 メディナ - セルビー, アンジェリカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 3 1, サン フランシスコ, ゲイルウッド サーク
ル 1 3 6

F ターム(参考) 4B024 AA13 BA33 CA02 HA11
4B064 AG33 CA19 CC24 DA15
4B065 AB01 BA02 CA24 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA60 CA02 DA86 EA53 FA74

专利名称(译)	抗HCV抗体的免疫测定		
公开(公告)号	JP2004510133A	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2002510948	申请日	2001-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
[标]发明人	チエンデイビッドワイ アーカンジェルフィリップ タンデスクローラ ジョージナスシエメントカルロス コイトドリス メディナセルビーアンジェリカ		
发明人	チエン, デイビッド ワイ. アーカンジェル, フィリップ タンデスク, ローラ ジョージ-ナスシエメント, カルロス コイト, ドリス メディナ-セルビー, アンジェリカ		
IPC分类号	C07K14/18 C07K19/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/00 C12N2770/24222 G01N33/5767 G01N2333/18 G01N2469/10 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/576.ZNA.Z C07K14/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.N C12N15/00.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA13 4B024/BA33 4B024/CA02 4B024/HA11 4B064/AG33 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA15 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA60 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/212082 2000-06-15 US 60/280811 2001-04-02 US 60/280867 2001-04-02 US		
其他公开文献	JP4837229B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供包含NS3 / 4a构象表位和多表位融合抗原的HCV免疫测定，以及用于该免疫测定的免疫测定固体支持物。本发明部分基于NS3 / 4a构象表位与多个表位融合抗原组合的使用提供敏感且可靠的检测早期HCV血清转化的方法的发现。本文所述的测定法还可以检测由六种已知HCV基因型中的任一种引起的HCV。使用多个表位融合蛋白还具有提高抗体检测灵敏度和通过减少掩蔽问题并且允许每单位基底面积更多数目的表位来提高选择性的附加益处有。

HCV Genome and Recombinant Proteins

