

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4836281号  
(P4836281)

(45) 発行日 平成23年12月14日(2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年10月7日(2011.10.7)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 1 1 N
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576 Z
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F
請求項の数 26 (全 53 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2007-530139 (P2007-530139)	(73) 特許権者 507251918 ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダ イアグノスティクス インコーポレイテッ ド アメリカ合衆国 カリフォルニア 946 62-8097, エミリービル, ピー .オー. ボックス 8097, インテ レクチュアル プロパティー - アール 440
(86) (22) 出願日 平成17年8月26日(2005.8.26)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(65) 公表番号 特表2008-511326 (P2008-511326A)	(74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明
(43) 公表日 平成20年4月17日(2008.4.17)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 国際出願番号 PCT/US2005/030325	
(87) 国際公開番号 W02006/024020	
(87) 国際公開日 平成18年3月2日(2006.3.2)	
審査請求日 平成20年3月7日(2008.3.7)	
(31) 優先権主張番号 60/604,858	
(32) 優先日 平成16年8月27日(2004.8.27)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 60/618,390	
(32) 優先日 平成16年10月12日(2004.10.12)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCV非構造タンパク質変異体およびその使用

(57) 【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、該固体支持体は、改変C型肝炎ウイルス(HCV) NS3プロテアーゼドメインを含むポリペプチドを含み、該改変NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性は、該改変を有さない対応するHCV NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性と比較して阻害されており、ここで、該ポリペプチドは、NS3高次構造エピトープを含み、かつHCV感染個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体に特異的に反応し、ここで、該ポリペプチドが、配列番号2、4または6に記載のアミノ酸配列を含む、固体支持体。

【請求項2】

請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該ポリペプチドは、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含む、固体支持体。

【請求項3】

請求項2に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該ポリペプチドは、配列番号2に記載のアミノ酸配列からなる、固体支持体。

【請求項4】

請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該ポリペプチドは、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含む、固体支持体。

【請求項5】

請求項4に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該ポリペプチドは、配列番号4に

記載のアミノ酸配列からなる、固体支持体。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該ポリペプチドは、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む、固体支持体。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該ポリペプチドは、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなる、固体支持体。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該固体支持体は、該支持体に結合した多エピトープ融合抗原をさらに含み、ここで、前記ポリペプチドおよび/または該多エピトープ融合抗原は、H C V 感染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。

10

【請求項 9】

請求項 8 に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、前記多エピトープ融合抗原は、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列、または該配列に対する少なくとも 80 % の配列同一性を有しかつ H C V 感染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 10】

請求項 8 に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、前記多エピトープ融合抗原は、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列、または該配列に対する少なくとも 90 % の配列同一性を有しかつ H C V 感染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。

20

【請求項 11】

請求項 8 に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、前記多エピトープ融合抗原は、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列、または該配列に対する少なくとも 98 % の配列同一性を有しかつ H C V 感染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 12】

請求項 8 に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該多エピトープ融合抗原は、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなる、固体支持体。

30

【請求項 13】

生物学的サンプルにおける C 型肝炎ウイルス ( H C V ) 感染を検出する方法であって、該方法は、以下：

( a ) 請求項 1 ~ 12 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 ) 生物学的サンプルと該固体支持体とを、該生物学的サンプル中に H C V 抗体が存在する場合に該 H C V 抗体が前記ポリペプチドおよび/または前記多エピトープ融合抗原に結合可能である条件下で混合し、第 1 免疫複合体を形成する工程；

( c ) 工程 ( b ) からの該固体支持体に、複合体形成条件下で検出可能に標識された抗体を加える工程であって、ここで、該標識された抗体は、該免疫複合体に反応性である工程；

40

( d ) 該検出可能に標識された抗体と該第 1 免疫複合体との間に形成された第 2 免疫複合体が存在する場合、該第 2 免疫複合体を、該生物学的サンプル中の H C V 感染の指標として検出する工程、  
を包含する方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 請求項 12 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体、および免疫診断試験を実施するための指示書を含む、免疫診断試験キット。

【請求項 15】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドであって、該ポリペプ

50

チドは、NS3 高次構造エピトープを含む、ポリペプチド。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、NS3 高次構造エピトープを含む、ポリペプチド。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

10

【請求項 19】

配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、NS3 高次構造エピトープを含む、ポリペプチド。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなる、ポリペプチド。

【請求項 21】

請求項 15 ~ 請求項 20 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドのコード配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 22】

組換えベクターであって、以下：

(a) 請求項 21 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る制御エレメントであって、それによって前記コード配列が宿主細胞中で転写され得、かつ翻訳され得る、制御エレメント、を含む組換えベクター。

20

【請求項 23】

請求項 22 に記載の組換えベクターによって形質転換された、宿主細胞。

【請求項 24】

組換えポリペプチドを産生する方法であって、該方法は、以下：

(a) 請求項 23 に記載の宿主細胞の集団を産生する工程；および

(b) 該細胞の集団を、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ポリペプチドが発現される条件下で培養する工程、を包含する方法。

30

【請求項 25】

イムノアッセイ固体支持体を作製する方法であって、該方法は、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；および

(b) 該固体支持体に、請求項 15 ~ 請求項 20 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 種のポリペプチドを結合させる工程を包含する方法。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の方法であって、前記固体支持体に、多エピトープ融合抗原を別個の位置で結合させる工程を、さらに包含する方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般に、C型肝炎ウイルス(HCV)構築物およびこれを使用する方法に関する。より詳細には、本発明は、NS3分子のタンパク分解活性が阻害されるような改変NS3プロテアーゼドメインを有する、免疫原性かつ免疫反応性であるHCVタンパク質に関する。この改変タンパク質は、高次構造エピトープを保持し、従って、HCV感染を

50

診断するためのイムノアッセイにおいて有用であり、かつ、HCVに対する免疫応答を刺激するために有用である。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

C型肝炎ウイルス(HCV)は、ほとんど輸血および体液交換を介して伝染する、非経口的な非A非B型肝炎(NANBH)の主要な原因である。このウイルスは、米国内の一般住民の0.4~2.0%に存在する。感染の約50%において慢性肝炎が発症し、そして、感染個体の約20%が肝硬変を発症する。肝硬変は時々、肝細胞癌をもたらす。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。

10

【0003】

HCVは、最初に、HoughtenらによってNANBHの原因として同定され、そして性質決定された。HCVのウイルスゲノム配列は、この配列を得るための方法と同様に公知である。例えば、特許文献1、特許文献2および特許文献3を参照のこと。HCVは、9.5kbの+(センス)鎖の、一本鎖RNAゲノムを有し、そしてフラビウイルス科のウイルスのメンバーである。少なくとも6つの、異なるが関連したHCVの遺伝子型が、系統発生分析に基づいて同定されている(非特許文献1)。このウイルスは、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(非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4)。このポリタンパク質は、翻訳と同時におよび翻訳後に、構造タンパク質ならびに非構造(NS)タンパク質の両方にプロセッシングされる。

20

【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産物の順序および名称は、以下のようなものである: NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。このポリタンパク質の最初の切断は、宿主のプロテアーゼによって触媒され、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(core)」と称される)および2つのエンベローブ糖タンパク質(「E1」(Eとしても公知である)および「E2」(E2/NS1としても公知である))、ならびにウイルス酵素を含む非構造(NS)タンパク質を生じさせる。これらのNS領域は、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5aおよびNS5bと称される。NS2は、タンパク質分解活性を有する内在性膜タンパク質である。NS2は、単独もしくはNS3との組み合わせのいずれかにおいて、NS2-NS3シスル(ssl)結合を切断し、次にNS3のN末端を生成し、そしてセリンプロテアーゼおよびRNAヘリカーゼ活性の両方を含む大きなポリタンパク質を生じる。このNS3プロテアーゼが機能して、残りのポリタンパク質をプロセッシングする。詳細には、HCV NS3タンパク質は、3つの機能的ドメインを含む、630アミノ酸のタンパク質である。セリン様プロテアーゼドメインは、アミノ末端内に位置し、一方、ヘリカーゼ活性およびNTPase活性は、カルボキシ末端内に存在する。NS3のセリンプロテアーゼは、NS3/4a、NS4a/b、NS4b/5aおよびNS5a/bの接合部の切断を担っている。

30

【0005】

HCVについての免疫学的試薬および診断試薬として有用である、(HCVポリタンパク質に由来する)多くの一般的なポリペプチドおよび特定のポリペプチドが、記載されている。例えば、Houghtonらの特許文献4および特許文献5、非特許文献2、非特許文献5、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8、Chienらの特許文献6、Chien, D. Y.の特許文献7を参照されたい。これらの刊行物は、一般に、HCVに対し、そしてHCVポリペプチド免疫学的試薬の製造および使用に対し、広範囲な背景を提供する。それにより、簡潔さのために、これらの刊行物の開示は、本明細書中で参考として援用される。

40

【0006】

HCVのキャリアならびにHCV汚染された血液および血液製剤をスクリーニングしそ

50

して同定するための高感度かつ特異的な方法は、医薬における重要な進歩を提供する。輸血後肝炎（P T H）は、輸血を受けた患者の約10%で起こり、そしてH C Vは、これらの症例の90%以下の原因となっている。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親密な個人的接触によるH C Vの伝染の予防は、信頼性のある診断ツールおよび予後診断ツールを必要とする。従って、H C V感染の血清診断のための幾つかのアッセイが、開発されている。例えば、非特許文献2、非特許文献5、非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12、Chien, D. Y.の特許文献7、Valenzuelaの特許文献8、Kashiwakumaの特許文献9を参照されたい。

#### 【0007】

特許文献10（その全体が本明細書中で参考として援用される）は、NS3/4a高次構造エピトープを多エピトープ融合抗原（MEFA）と組み合わせて用いるイムノアッセイを記載する。このアッセイは、初期H C Vセロコンバージョンを検出するための感度が高くかつ信頼性のある方法を提供する。特許文献10に記載されるように、酵母において発現されそして非還元条件下で精製されたNS3/4aは、プロテアーゼ機能およびヘリカーゼ機能の両方を含む。何故なら、この様式で精製されたNS3/4aは、天然の高次構造を保存しているからである。この様式で精製されたNS3/4aは、初期セロコンバージョン抗体検出において、c200抗原もしくはc33c抗原よりも感度が高いことが見出されている。NS3/4aおよびMEFA 7.1を抗原として用いる抗体アッセイにおいて、セロコンバージョン抗体は、現在市販されているH C Vアッセイよりも2~14日間早く検出された。しかし、NS3タンパク質は、自己加水分解を受け、そしてNS3プロテアーゼ活性に起因して、MEFA 7.1を切断する。

#### 【0008】

特許文献11および特許文献12は、低下したタンパク分解活性を有する変異NS3プロテアーゼドメインを含むH C Vタンパク質を記載する。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親密な個人的接触によるH C Vの伝染を予防するための、感度の高い、正確な診断ツールおよび予後診断ツールの需要が存在し続けている。

【特許文献1】国際公開第89/04669号パンフレット

【特許文献2】国際公開第90/11089号パンフレット

【特許文献3】国際公開第90/14436号パンフレット

【特許文献4】欧州特許出願公開第318,216号明細書

【特許文献5】欧州特許出願公開第388,232号明細書

【特許文献6】国際公開第93/00365号パンフレット

【特許文献7】国際公開第94/01778号パンフレット

【特許文献8】国際公開第97/44469号パンフレット

【特許文献9】米国特許第5,871,904号明細書

【特許文献10】米国特許第6,632,601号明細書

【特許文献11】国際公開第04/00547号パンフレット

【特許文献12】国際公開第01/38360号パンフレット

【非特許文献1】Simmonds, J. Gen. Virol., 1993年, 第74巻, p. 2391-2399

【非特許文献2】Choo, Science, 1989年, 第244巻, p. 359-362

【非特許文献3】Choo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991年, 第88巻, p. 2451-2455

【非特許文献4】Han, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991年, 第88巻, p. 1711-1715

【非特許文献5】Kuo, Science, 1989年, 第244巻, p. 362-364

10

20

30

40

50

【非特許文献6】Houghtonら, Hepatology, 1991年, 第14巻, p. 381 - 388

【非特許文献7】Chienら, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1992年, 第89巻, p. 10011 - 10015

【非特許文献8】Chienら, J. Gastroent. Hepatol., 1993年, 第8巻, p. S33 - 39

【非特許文献9】Chooら, Br. Med. Bull., 1990年, 第46巻, p. 423 - 441

【非特許文献10】Ebelingら, Lancet, 1990年, 第335巻, p. 982 - 983

【非特許文献11】van der Poelら, Lancet, 1990年, 第335巻, p. 558 - 560

【非特許文献12】van der Poelら, Lancet, 1991年, 第337巻, p. 317 - 319

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、改変プロテアーゼドメインを有するHCV NS3ポリペプチドの使用は、HCV感染を検出するための優れた試薬を提供するという知見に一部基づく。この改変NS3ポリペプチドは、高次構造エピトープを保持する(従って、免疫反応性を保持する)一方で、プロテアーゼ活性を除去されている。何故なら、このNS3ポリペプチドは、プロテアーゼ活性をプロテアーゼ活性を除去するように改変されているからであり、これらは、NS3タンパク分解性切断部位を保持する他のHCVポリペプチドに関して、そしてさもなければ機能的NS3プロテアーゼによってタンパク分解的に切断される他のHCVポリペプチドに関して、特に有用である。従って、この改変NS3ポリペプチドは、HCV感染の存在の正確かつ効率的な検出のために、単独で使用されてもよく、または他のHCV試薬(とりわけ、多エピトープ融合抗原(MEFA))と組み合わせて使用されてもよい。MEFAの使用は、基質の単位面積あたりより多い数のエピトープを与えることにより、マスクング(masking)問題の低減、抗体検出についての選択性の改善および感度の改善の、さらなる利益を提供する。本明細書中で記載されるアッセイは、HCVの6種の公知の遺伝子型のいずれかによって引き起こされるHCV感染を検出するために使用され得る。

【0010】

従って、1つ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に関し、この固体支持体は、改変C型肝炎ウイルス(HCV)NS3プロテアーゼドメインを含むポリペプチドを含み、この改変NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性は、改変を有さない対応するHCV NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性と比較して阻害されている。このポリペプチドは、NS3高次構造エピトープを含み、かつHCV感染個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体に特異的に反応する。特定の実施形態において、この改変は、全長HCV-1ポリタンパク質に対して番号付けられた、His-1083、Asp-1105および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含む。

【0011】

さらなる実施形態において、この免疫アッセイ固体支持体上のこのポリペプチドは、Thr-1428に対応するアミノ酸に対するProの置換、およびSer-1429に対応するアミノ酸に対するIleの置換をさらに含む。

【0012】

さらなる実施形態において、この免疫アッセイ固体支持体上のこのポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、このポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 3 】

なおさらなる実施形態において、この免疫アッセイ固体支持体上のこのポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列からなる。

## 【 0 0 1 4 】

さらなる実施形態において、この免疫アッセイ固体支持体上のこのポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列からなる。

## 【 0 0 1 5 】

なおさらなる実施形態において、この固体支持体は、この支持体に結合した多エピトープ融合抗原をさらに含み、ここで、上記ポリペプチドおよび/またはこの多エピトープ融合抗原は、H C V 感染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。

10

## 【 0 0 1 6 】

特定の実施形態において、この多エピトープ融合抗原は、配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列、またはこの配列に対する少なくとも 8 0 % (例えば、少なくとも 9 0 % もしくは少なくとも 9 8 %) の配列同一性を有しかつ H C V 感染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。さらなる実施形態において、この多エピトープ融合抗原は、配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列からなる

さらなる実施形態において、本発明は、生物学的サンプルにおける C 型肝炎ウイルス (H C V) 感染を検出する方法に関する。この方法は、以下の工程を包含する：

20

( a ) 上述のイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；

( b ) 生物学的サンプルとこの固体支持体とを、生物学的サンプル中に H C V 抗体が存在する場合に H C V 抗体が上記ポリペプチドおよび/または上記多エピトープ融合抗原に結合可能である条件下で混合し、第 1 免疫複合体を形成する工程；

( c ) 工程 ( b ) からの固体支持体に、複合体形成条件下で検出可能に標識された抗体を加える工程であって、ここで、この標識された抗体は、上記免疫複合体に反応性である工程；

( d ) この検出可能に標識された抗体と第 1 免疫複合体との間に形成された第 2 免疫複合体が存在する場合、第 2 免疫複合体を、生物学的サンプル中の H C V 感染の指標として検出する工程。

30

## 【 0 0 1 7 】

なおさらなる実施形態において、本発明は、上述の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指示書を含む、免疫診断試験キットに関する。

## 【 0 0 1 8 】

さらなる実施形態において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドに関し、このポリペプチドは、N S 3 高次構造エピトープを含む。特定の実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列からなる。

## 【 0 0 1 9 】

さらなる実施形態において、本発明は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドに関し、このポリペプチドは、N S 3 高次構造エピトープを含む。特定の実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列からなる。

40

## 【 0 0 2 0 】

さらなる実施形態において、本発明は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドに関し、このポリペプチドは、N S 3 高次構造エピトープを含む。特定の実施形態において、このポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸配列からなる。

## 【 0 0 2 1 】

なおさらなる実施形態において、本発明は、上述のポリペプチドのうちいずれか 1 種についてのコード配列を含むポリヌクレオチド、ならびにこのポリヌクレオチドとこのポリヌクレオチドに作動可能に連結される制御エレメント (それによって上記コード配列が宿

50

主細胞中で転写され得、かつ翻訳され得る)とを含む組換えベクターに関する。さらなる実施形態において、本発明は、この組換えベクターによって形質転換された宿主細胞に関する。なおさらなる実施形態において、本発明は、組換えポリペプチドを産生する方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) 上述の宿主細胞の集団を産生する工程；および

(b) この細胞の集団を、上記組換えベクター中の上記コード配列によってコードされるポリペプチドが発現される条件下で培養する工程。

【0022】

さらなる実施形態において、本発明は、イムノアッセイ固体支持体を作製する方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) 固体支持体を提供する工程；および

(b) この固体支持体に、上述の少なくとも1種のポリペプチドを結合させる工程。

特定の実施形態において、この方法は、上記固体支持体に多エピトープ融合抗原を別個の位置で結合させる工程を、さらに包含する。

【0023】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下の詳細な説明および添付の図面を参照することにより明らかになる。さらに、特定の手順もしくは組成物をより詳細に説明する種々の参考文献が、本明細書中で示され、それにより、本明細書中でその全体が参考として援用される。

【0024】

(発明の詳細な説明)

本発明の実施は、特に明記されない限り、当業者の技術の範囲内の従来の化学的方法、生物化学的方法、組換えDNA技術による方法および免疫学的方法を使用する。このような技術は、文献中に完全に説明されている。例えば、Fundamental Virology, 第2版, 第I巻および第II巻(B. N. FieldsおよびD. M. Knipe編)；Handbook of Experimental Immunology, 第I巻～第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., 最新版)；Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版)；Methods In Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan編, Academic Press, Inc.)を参照のこと。

【0025】

本明細書中に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、前出および後出を問わず、本明細書によってその全体が参考として援用される。

【0026】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される、単数形「a」、「an」、および「the」には、文脈中で明らかに別のものを示さない限り、複数形が含まれることに留意しなければならない。したがって、例えば、「抗原(an antigen)」という言葉及には、2種以上のこのような抗原の混合物が含まれる、などである。

【0027】

以下のアミノ酸の略語は、本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)

10

20

30

40

50

ロイシン：L e u ( L )                      リジン：L y s ( K )  
 メチオニン：M e t ( M )                  フェニルアラニン：P h e ( F )  
 プロリン：P r o ( P )                      セリン：S e r ( S )  
 トレオニン：T h r ( T )                  トリプトファン：T r p ( W )  
 チロシン：T y r ( Y )                      バリン：V a l ( V )。

## 【 0 0 2 8 】

( I . 定義)

本発明の記載において、以下の用語が使用され、そして以下で示すように定義されることが意図される。

## 【 0 0 2 9 】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーをいい、産物の長さの下限に制限されない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、ダイマー、および多量体などは、この定義の範囲内に含まれる。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、グリコシル化、アセチル化、およびリン酸化など）を含む。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望の活性を保持する限り、天然の配列の改変（例えば、欠失、付加、および置換（一般に、本質的に保存的である））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による意図的なものであっても、タンパク質を産生する宿主の変異またはPCR増幅に起因するエラーなどによる偶発的なものであってもよい。

## 【 0 0 3 0 】

HCVポリペプチドは、HCVポリタンパク質に由来する、上に定義されるようなポリペプチドである。このポリペプチドは、物理的にHCVに由来することを必要とせず、合成的または組換え的に産生され得る。さらに、このポリペプチドは、種々のHCV株および単離物（例えば、HCVの株1、株2、株3、株4、株5もしくは株6に由来する単離物のいずれかであるが、これらに限定されない）のいずれかに由来し得る。これらの株の間の多くの保存領域および可変領域が公知であり、そして一般的に、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つの配列が並列された場合に、高度の配列相同性（例えば、30%を超える（好ましくは、40%を超える）アミノ酸配列相同性）を有する。従って、例えば、用語「NS3/4a」ポリペプチドとは、種々のHCV株のいずれかに由来する天然のNS3/4a、ならびに以下でさらに定義されるようなNS3/4aアナログ、NS3/4aムテインおよびNS3/4a免疫原性フラグメントをいう。これらの株の多く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および同AJ238799を参照されたい。

## 【 0 0 3 1 】

HCVポリタンパク質に「由来する」ポリペプチドは、参照HCVポリタンパク質の1つ以上の領域もしくは領域の部分の配列を含むポリペプチドを意図する。代表的には、ポリペプチドは、エピトープを含む領域もしくは領域の部分からなり、一般に、以下で規定する参照ポリペプチドに実質的に相同なアミノ酸配列を有する。従って、用語「由来する」は、分子の元来の供給源を同定するために使用されるが、この分子が作製される方法（例えば、化学合成による方法もしくは組換え手段による方法であり得る）を限定することを意味しない。

## 【 0 0 3 2 】

用語「アナログ」および「ムテイン」とは、所望の活性（例えば、本明細書中で記載されるアッセイにおける免疫反応性）を保持する、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をいう。一般的に、用語「アナログ」とは、天然の分子に対する1個以上のアミノ酸の付加、置換（一般的に本質的に保存的であるか、または改変NS3の場合においては活性なタンパク分解部位において本質的に非保存的である）および/または欠失を（これらの改変が免疫原性活性を破壊しない限り）含む、天然の

10

20

30

40

50

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」とは、1種以上のアミノ酸様分子（アミノ分子および/またはイミノ分子のみを含む化合物、1種以上のアミノ酸アナログ（例えば、非天然アミノ酸などが挙げられる）を含むポリペプチド、置換された連結を有するポリペプチド、ならびに当該分野で公知の他の改変（環状分子および分枝状分子などの、天然に存在する分子および天然に存在しない（例えば合成の）分子の両方）が挙げられるが、これらに限定されない）を有するポリペプチドをいう。この用語はまた、1種以上のN置換グリシン残基（「ペプトイド」）および他の合成アミノ酸もしくは合成ペプチドを含む分子をも含む。（例えば、ペプトイドの記載について、米国特許第5,831,005号；同第5,877,278号；および同第5,977,301号；Nguyenら, Chem Biol. (2000) 7: 463-473；ならびにSimonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 9367-9371を参照されたい。）好ましくは、アナログまたはムテインは、少なくとも天然の分子と同一の免疫活性を有する。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。

#### 【0033】

上記で説明される通り、アナログは、一般的に、天然において保存的な置換（すなわち、その側鎖において関連するアミノ酸のファミリー内で起こる置換）を含む。具体的には、アミノ酸は、一般的に、以下の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）非荷電極性 - - グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、チロシンは、ときとして、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との単独置換、アスパラギン酸のグルタミン酸との単独置換、トレオニンのセリンとの単独置換、または同様の、構造的に関連するアミノ酸によるアミノ酸の保存的置換は、生物学的活性に大きな影響を与えないことが容易に予想される。例えば、目的のポリペプチドは、この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個までの保存的アミノ酸置換もしくは非保存的アミノ酸置換、またはさらに約15~25個までの保存的アミノ酸置換もしくは非保存的アミノ酸置換、または5~25の間の任意の整数の保存的アミノ酸置換もしくは非保存的アミノ酸置換を含み得る。当業者は、当該分野で周知のHopp/WoodsプロットおよびKyte-Doolittleプロットを参照することにより、目的の分子の変化を許容し得る領域を容易に決定し得る。

#### 【0034】

「改変NS3」は、NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性が破壊されるような改変を有するNS3ポリペプチドを意味する。従って、この改変NS3ポリペプチドは、非改変親NS3ポリペプチドと比較した場合に、より低いプロテアーゼ活性を示す。この改変は、天然の分子に対する1個以上のアミノ酸の付加、置換（一般的に、本質的に非保存的である）および/または欠失を含み得、この改変において、NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性は、破壊される。プロテアーゼ活性を測定する方法は、以下でさらに議論される。

#### 【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。フラグメントは、天然のポリペプチドのC末端の欠失、および/またはN末端の欠失を含み得る。特定のHCVTタンパク質の「免疫原性フラグメント」は、一般的に、エピトープを定義する全長分子の少なくとも約5~10個の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個の連続するアミノ酸残基、最も好ましくは全長分子の少なくとも約20~50個またはそれより多くの連続したアミノ酸残基、あるいは5個のアミノ酸と全長配列との間の任意の整数の連続したアミノ酸残基を含むが、但しここで、目的のフラグメントは、本明細書中に記載されるアッセイに

10

20

30

40

50

において免疫反応性を保持することが条件である。例えば、好ましい免疫原性フラグメントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：例えば、HCVコアポリタンパク質の10～45、10～53、67～88および120～130のアミノ酸を含むHCVコアのフラグメント、エピトープ5-1-1（ウイルスゲノムのNS4a/NS4b領域内）、ならびに図1で示されるポリタンパク質の任意の領域（例えば、HCVポリタンパク質のE1領域、E2領域、NS3領域（例えばNS3領域由来のc33cポリペプチド）、NS4領域（例えばNS3/NS4領域由来のc100ポリペプチド）、NS3/4a領域およびNS5領域であるが、これらに限定されない）に由来する規定のエピトープ、ならびにHCVポリタンパク質から同定された任意の種々の他のエピトープ。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, 国際出願公開第93/00365号; Chien, D. Y., 国際出願公開第94/01778号; 米国特許第6,150,087号および同第6,121,020号（これら全ては、本明細書中でその全体が参考として援用される）を参照されたい。

#### 【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ」とは、少なくとも約3～5個、好ましくは約5～10個または15個、および約1,000個以下（またはその間の任意の整数）のアミノ酸の配列であって、それ自体の配列またはより大きな配列の一部を定義し、このような配列に対する応答において産生される抗体に結合する配列をいう。フラグメントの長さの上限は存在せず、このフラグメントは、タンパク質配列のほぼ全長を含んでもよく、HCVポリタンパク質由来の2種以上のエピトープを含む融合タンパク質ですら含んでもよい。本発明で使用するためのエピトープは、由来する親タンパク質の一部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、ウイルスゲノムは、常に不安定な状態であり、単離物の間で比較的高い可変性を示す、いくつかの可変ドメインを含む。したがって、用語「エピトープ」は、天然の配列と同一の配列、ならびに欠失、付加、および置換（一般的に、本質的に保存的である）のような天然の配列に対する改変配列を包含する。

#### 【0037】

エピトープを含む所与のポリペプチドの領域は、当該分野で周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することができる。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、一次エピトープは、例えば、固体支持体上で多数のペプチド（タンパク質分子の一部に対応するペプチド）を同時に合成し、そしてこれらのペプチドがなお支持体に結合している間に、これらのペプチドと抗体とを反応させることによって決定され得る。このような技術は当該分野で公知であり、そして例えば、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（これら全ては、本明細書中でその全体が参考として援用される）に記載される。このような技術を使用して、多くのHCV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) pp. 320-324、および以下をさらに参照されたい。同様に、高次構造エピトープは、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴によるようなアミノ酸の空間的高次構造の決定によって容易に同定される。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、標準的な抗原性プロットおよびハイドロパシープロット（例えば、Oxford Molecular Groupから利用可能なOmegaバージョン1.0ソフトウェア

10

20

30

40

50

プログラムを使用して計算したものを)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にHopp/Woods法(Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981)、78:3824-3828)を使用し、そしてハイドロパシープロットを決定するために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、「高次構造エピトープ」とは、全長天然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対して天然のままである構造的特徴を有する、全長タンパク質の一部、またはこれらのアナログもしくはムテインをいう。天然の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、3つのエピトープが抗原の三次元形状(例えば、折りたたみ)によって形成されると考えられるので、広範な変動に供され得る。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広範に散在し、折りたたみを介して正確なエピトープ高次構造となる。エピトープを規定する残基の間の抗原の部分は、エピトープの高次構造の構成に重要ではない場合がある。例えば、これらの介在性配列の欠失もしくは置換は、エピトープの高次構造に重要な配列(例えば、ジスルフィド結合に関与するシステイン、グリコシル化部位など)が維持されている場合、高次構造エピトープに影響を及ぼさない場合がある。

【0039】

NS3/4a領域内に存在する高次構造エピトープは、上述の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高次構造エピトープの存在もしくは非存在は、抗体(この高次構造エピトープに対するポリクローナル血清もしくはモノクローナル抗体)による目的の抗原のスクリーニング、ならびにその反応性をこの抗原の変性型(存在する場合でも、一次エピトープしか有さない)に対する反応性と比較する工程を介して、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で吸収させ、そして目的の抗原に対する抗体を有するか否かを調べることは、有利であり得る。

【0040】

好ましくは、高次構造エピトープは、組換え的に産生され、そしてエピトープの所望の構造特徴を保存する条件下で(例えば、エピトープの変性を伴わずに)エピトープを抽出可能である細胞において発現される。そ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ポリタンパク質に由来する組換え高次構造エピトープの発現および単離は、例えば、国際出願公開第96/04301号、同第94/01778号、同第95/33053号、同第92/08734号(これらの出願は、本明細書中でその全体が参考として援用される)に記載される。あるいは、抗原を発現し、そしてこのタンパク質を回収後さらに復元することが可能である。また、化学的合成は、天然の抗原の高次構造エピトープと交差反応可能である高次構造抗原ミミトープ(mimotope)を提供し得ることもまた、理解される。

【0041】

用語「多エピトープ融合抗原」もしくは「MEFA」は、本明細書中で使用される場合、多数のウイルス抗原が、天然で存在しない、1つの連続したアミノ酸の鎖として編成されているポリペプチドを意図する。本明細書中で使用される場合、MEFAは、HCV抗原に限定される。HCV抗原は、ペプチド結合によって互いに直接接続してもよく、または介在するアミノ酸配列によって分離されてもよい。融合抗原はまた、HCVポリタンパク質に対して外因性である配列をも含み得る。さらに、存在するHCV配列は、多数のHCVの遺伝子型および/または多数のHCVの単離物に由来し得る。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、国際出願公開第97/44469号、米国特許第6,514,731号、同第6,428,792号および同第6,632,601号(これらの全てはその全体が本明細書中で参考として援用される)におい

10

20

30

40

50

て詳述されており、さらに以下で説明される。

【0042】

「抗体」は、抗原に存在する目的のエピトープに特異的に結合する分子を意図する。「特異的に結合する」は、抗体が、エピトープを認識し、そして「鍵と鍵穴(lock and key)」型の相互作用においてエピトープと相互作用し、抗原と抗体との間に複合体を形成することを意味する。これは、抗体と例えば試験基質との間に生じ得る非特異的結合とは対照的である。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。用語「抗体」は、本明細書中で使用される場合、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から得られる抗体、ならびに以下を包含する：ハイブリッド(キメラ)抗体分子(例えば、Winterら(1991) Nature 349: 293-299; および米国特許第4,816,567号を参照); F(ab')<sub>2</sub> およびF(ab)フラグメント; Fv分子(非共有結合性ヘテロダイマー、例えば、Inbarら(1972) Proc Natl Acad Sci USA 69: 2659-2662; およびEhrlichら(1980) Biochem 19: 4091-4096を参照); 単鎖Fv分子(sFv)(例えば、Houstonら(1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-5883を参照); 二量体抗体フラグメント構築物および三量体抗体フラグメント構築物; ミニボディ(minibody)(例えば、Packら(1992) Biochem 31: 1579-1584; Cumberら(1992) J Immunology 149B: 120-126を参照); ヒト化抗体分子(例えば、Riechmannら(1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyanら(1988) Science 239: 1534-1536; および英国特許出願公開第2,276,169号(1994年9月21日公開)を参照); ならびに、このような分子から得られた、親抗体分子の免疫学的結合特性を保持している任意の機能的フラグメント。

【0043】

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」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、抗体の種もしくは供給源に関して限定されず、作製された様式によっても限定されない。従って、この用語は、マウスハイブリドーマから得られた抗体、ならびにマウスハイブリドーマではなくヒトハイブリドーマを用いて得られ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を参照されたい。

【0044】

ポリペプチドに関する場合、「単離された」により、指定の分子が、この分子が天然において見出される生物全体から分離されて独立しているか、または他の同種の生物学的高分子の実質的に非存在下で存在していることが、意味される。ポリヌクレオチドに関する用語「単離された」は、通常天然で伴っている配列全体または一部を有さない核酸分子であるか、または天然に存在する通りの配列であるがそれと結合する異種配列を有する配列であるか、あるいは染色体から分離された分子である。

【0045】

「等価な抗原決定基」は、HCVの株1、株2、株3のような異なるHCVの亜種または株に由来する抗原決定基を意味する。より具体的には、エピトープは、公知であり(例えば、HCV-1ポリタンパク質配列に対して番号付けられたおよそ1694~1735位に存在する「5-1-1」)、そしてこのようなエピトープは、株1と、株2と、株3との間で変動する。従って、3つの異なる株に由来するエピトープ5-1-1は、等価な抗原決定基であり、従って、その配列が同一でなくとも、「コピー」である。一般に、等価な抗原決定基のアミノ酸配列は、2つの配列が並列される場合、高度な(例えば、30%より大きく、好ましくは40%より大きい)配列相同性を有する。

【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

10

20

30

40

50

似性の%をいう。2つのDNA配列または2つのポリペプチド配列は、定義した分子の長さによって、これらの配列が少なくとも約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%、および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」とはまた、特定のDNA配列またはポリペプチド配列に対する完全な同一性を示す配列をもいう。

#### 【0047】

一般的に、「同一性」とは、それぞれ、2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列の正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の対応をいう。%同一性は、配列を並列することによって2つの分子（参照配列と参照配列に対する%同一性が未知である配列と）の間の配列情報を直接比較する工程、並列された2つの配列間の正確な適合の数を計数する工程、参照配列の長さで除算する工程、およびこの結果に100を掛ける工程によって決定され得る。

#### 【0048】

すぐに利用可能なコンピュータプログラム（例えば、ペプチド分析用のSmith and Watermanの局所的相同性アルゴリズム（Advances in Appl. Math. 2: 482 - 489, 1981）に適合させたALIGN（Dayhoff, M.O., Atlas of Protein Sequence and Structure, M.O. Dayhoff編、第5補遺, 3: 353 - 358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC））が、相同性および同一性の分析を補助するために使用され得る。ヌクレオチド配列の相同性を決定するためのプログラムは、Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8（Genetics Computer Group, Madison, WIから利用可能）で利用可能である（例えば、やはりSmith and Watermanアルゴリズムに依存するBESTFITプログラム、FASTAプログラム、およびGAPプログラム）。これらのプログラムは、製造者によって推奨され、かつ上記で言及したWisconsin Sequence Analysis Packageに記載される初期設定のパラメータを使用して容易に利用される。例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列の%相同性は、初期設定のスコアリング表およびヌクレオチド上の6つの位置でのギャップペナルティを使用したSmith and Watermanの相同性アルゴリズムを使用して決定され得る。

#### 【0049】

本発明に関連して%相同性を確立する別の方法は、エディンバラ大学が著作権を有し、Jolm F. CollinsおよびShane S. Sturrokによって開発され、そしてIntelliGenetics, Inc.（Mountain View, CA）から販売されているMPSRCHプログラムパッケージを使用することである。このパッケージ一式から、スコアリング表のために初期設定のパラメータ（例えば、12のギャップオープンペナルティ、1のギャップ伸長ペナルティ、および6のギャップ）を使用するSmith-Watermanアルゴリズムが、使用され得る。作成されたデータからの「適合」値は、「配列相同性」を反映する。配列間の同一性または類似性の%を計算するための他の適切なプログラムは、一般的に、当該分野で公知であり、例えば、別のアラインメントプログラムは、初期設定のパラメータを使用したBLASTである。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、以下の初期設定のパラメータを使用して使用され得る：遺伝コード=標準；フィルタ=なし；鎖=両方；カットオフ=60；期待値=10；行列=BLOSUM62；記載=50配列；分類=ハイスコア；データベース=非重複、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻訳物+Swiss protein+Spupdate+PIR。これらのプログラムの詳細は、すぐに利用できる。

#### 【0050】

あるいは、相同性は、相同領域間で安定な二重鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、その後の一本鎖特異的ヌクレアーゼによる消化、および消化フラグメントのサイズ決定によって決定され得る。実質的に相同なDNA配列は、例えば、特定の系について規定したストリンジェントな条件下での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の定義は、当業者の範囲内である。例えば、Sambrookら、前出；DNA Cloning、前出；Nucleic Acid Hybridization、前出を参照のこと。

#### 【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おいた場合に、インビトロまたはインビボで転写（DNAの場合）され、そしてポリペプチドに翻訳（mRNAの場合）される核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンによって決定される。転写終結配列は、コード配列に対して3'側に配置され得る。

10

#### 【0052】

「作動可能に連結された」とは、そのように記載される構成要素がその所望の機能を発揮するように構成されるエレメントの配置をいう。したがって、コード配列に作動可能に連結された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に、コード配列の発現を達成し得る。プロモーターは、その発現を指向するように機能する限り、コード配列に隣接する必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列は、転写されたイントロンがそうであるように、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得るので、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た」と見なされ得る。

20

#### 【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、ゲノム起源、cDNA起源、ウイルス起源、半合成起源、または合成起源のポリヌクレオチドを意味し、このポリヌクレオチドは、その起源または操作ゆえに、天然において結合するポリヌクレオチドの全体または一部と結合しない。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たポリペプチドを意味する。一般的に、目的の遺伝子は、クローニングされ、次いで、以下でさらに記載されるように、形質転換された生物中で発現される。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。

30

#### 【0054】

「制御エレメント」とは、それが連結されるコード配列の発現を補助す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、ポリアダニル化シグナル、非翻訳領域（5'-UTRおよび3'-UTR、ならびに、適切な場合、リーダー配列およびエンハンサーが含まれる）を包含し、これらは、宿主細胞におけるコード配列の転写および翻訳を共同して提供する。

#### 【0055】

本明細書中で使用される場合、「プロモーター」は、宿主細胞中でRNAポリメラーゼに結合し、そしてそこに作動可能に連結された下流（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、バックグラウンドを超える検出可能なレベルで目的の遺伝子の転写を開始するために必要な、最小数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列内に、転写開始部位およびRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン（共通配列）が存在する。真核生物プロモーターは、しばしば「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含むが、常にこれらを含むわけではない。

40

#### 【0056】

RNAポリメラーゼがプロモーター配列に結合し、そしてコード配列をmRNAに転写する場合、制御配列は、細胞中のコード配列の「転写を指示し」、その後、このmRNAは、コード配列によってコードされたポリペプチドに翻訳される。

50

## 【 0 0 5 7 】

「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集合をいう。発現カセットは、上に記載される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（これらの転写を指示するように）作動可能に連結されたプロモーター）を含み、多くの場合、またポリアデニル化配列をも含む。本発明の特定の実施形態では、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。発現カセットの構成要素に加えて、プラスミド構築物はまた、1つ以上の選択可能マーカ、プラスミド構築物を一本鎖DNAとして存在させるシグナル（例えば、M13複製起点）、少なくとも1つのマルチクロニングサイト、および「哺乳動物」の複製起点（例えば、SV40またはアデノウイルスの複製起点）を含み得る。

10

## 【 0 0 5 8 】

本明細書中で使用される場合、「形質転換」とは、宿主細胞への外因性ポリヌクレオチドの挿入をいい、挿入のために使用した方法（例えば、直接取り込み、トランスフェクション、および感染などによる形質転換）を問わない。特定のトランスフェクション法については、以下をさらに参照のこと。外因性ポリヌクレオチドは、非組み込みベクター（例えば、エピソード）として維持され得るか、または宿主ゲノム内に組み込まれ得る。

## 【 0 0 5 9 】

「宿主細胞」は、外因性DNA配列によって、形質転換されている細胞であるか、または形質転換可能な細胞である。

## 【 0 0 6 0 】

本明細書中で使用される場合、「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織もしくは液体のサンプルをいい、通常、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、血液、血漿、血清、糞便、尿、骨髄、胆汁、脊髄液、リンパ液、皮膚のサンプル、皮膚、気道、腸および生殖器官の分泌物、涙、唾液、乳汁、血球、器官、生検ならびにまたインビトロ細胞培養構成物（培養培地中の細胞および組織の増殖から得られた調製培地（例えば組換え細胞および細胞構成要素）が挙げられるが、これらに限定されない）のサンプルが挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【 0 0 6 1 】

「共通の固体支持体」は、本発明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、共有結合的に結合するか、または非共有結合的手段（例えば、疎水性吸着）によって結合する、1つの固体マトリックスを意図する。

30

## 【 0 0 6 2 】

「免疫学的に反応性である」または「免疫反応性である」は、目的の抗原が、HCV感染個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体に特異的に反応することを意味する。

## 【 0 0 6 3 】

「免疫原性」とは、目的の抗原が、個体に投与された場合に免疫応答を誘発することを意図する。

## 【 0 0 6 4 】

「免疫複合体」とは、抗体が抗原上のエピトープに結合する場合に形成される結合物を意図する。

40

## 【 0 0 6 5 】

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、検出の可能な分子をいい、放射性同位体、蛍光剤（fluorescer）、化学発光剤（chemiluminescer）、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素インヒビター、発色団、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）、もしくはハプテン）などが挙げられるが、これらに限定されない。用語「蛍光剤」とは、検出可能な範囲の蛍光を示すことの可能な基質もしくはその部分をいう。本発明の下で使用され得る標識の特定の例としては、西洋

50

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)、テキサスレッド、ルミノール、NADPHおよび - - ガラクトシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0066】

(II. 発明を実施する形態)

本発明を詳細に説明する前に、本発明は特定の処方物または処理パラメータに制限されず、当然に変更可能であることが理解されるべきである。本明細書中で使用される専門用語は、本発明の特定の実施形態を記載することのみを目的とし、本発明を制限することを意図しないことがまた、理解されるべきである。

10

【0067】

本明細書中に記載のものに類似するか、またはそれらと等価な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る。

【0068】

上述のように、本発明は、(例えば、NS3プロテアーゼのタンパク分解活性が阻害されるような) 改変NS3ドメインを有するHCVポリペプチド変異体は、高次構造エピトープを保有し得、したがって、HCV感染の存在を検出するための免疫アッセイにおいて有用であることの知見に基づく。NS3変異体は、初期HCV感染を正確に検出するための診断方法において特に有用である。この方法は、HCVセロコンバージョンの初期段階の間にHCV感染を検出するために使用され得、それによって、検出精度を上昇させ、そして間違った結果の発生率を低下させる。

20

【0069】

特に、本明細書中で記載される免疫アッセイは、タンパク分解活性を破壊するが高次構造エピトープを保持する変異を有する、HCVポリタンパク質のNS3/4a領域に由来する高度に免疫活性であるエピトープを用いる。この改変NS3ポリペプチドは、免疫アッセイにおいて単独で使用されてもよく、または他のHCV抗原と組み合わせて使用されてもよい。この他のHCV抗原は、例えば、同じかもしくは異なるHCV遺伝子型および単離物のいずれかに由来する種々のHCVポリペプチドを含む、多エピトープ融合抗原であり、これらのHCVポリペプチドは、例えば、多数の免疫優性エピトープであり、例えば、HCV core配列、E1配列、E2配列、NS3配列、5-1-1配列、c100-3配列およびNS5配列の主な一次エピトープである。この方法は、好都合にも、以下で記載されるいくつかのアッセイ形式のいずれかを用いる1回のアッセイにおいて実施され得、これらのアッセイ形式は、例えば、HCV抗原が結合する固体支持体を用いるアッセイ形式であるが、これらに限定されない。

30

【0070】

本発明のさらなる理解のために、改変NS3ポリペプチドおよびHCV融合体(すなわち、MEFA)、ならびにタンパク質の産生およびこのタンパク質を使用する方法に関してより詳細な議論が以下で提供される。

40

【0071】

(HCVタンパク質)

HCV株のゲノムは、約9,000~12,000ヌクレオチドの単一のオープンリーディングフレームを含み、これは、ポリタンパク質に転写される。図1および表1に示されるように、切断の際、HCVポリタンパク質は、NH<sub>2</sub>-Core-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOHの順序で、少なくとも10個の異なる生成物を生成する。coreポリペプチドは、HCV-1に対して番号付けされた1位~191位に存在する(HCV-1ゲノムについては、Chooら、(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455を参照のこと)。このポリペプチドはさらにプロセッシングされて、ほぼアミノ酸1~

50

173を含むHCVポリペプチドを生じる。エンベロープポリペプチドであるE1およびE2は、それぞれ、ほぼ192位～383位および384位～746位に存在する。P7ドメインは、ほぼ747位～809位に見出される。NS2は、タンパク分解活性を有する内在性膜タンパク質であり、そしてこのポリタンパク質のほぼ810位～1026位に見出される。NS3（ほぼ1027位～1657位に見出される）との組み合わせにおいて、NS2は、NS2-NS3シスル結合を切断し、次にNS3のN末端を生成し、そしてセリンプロテアーゼおよびRNA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。NS3プロテアーゼ（ほぼ1027位～1207位に見出される）が機能して、残りのポリタンパク質をプロセッシングする。このヘリカーゼ活性は、ほぼ1193位～1657位に見出される。NS3は、NS3補因子（ほぼ1658位～1711位に見出されるNS4a）、2つのタンパク質（ほぼ1712位～1972位に見出されるNS4b、およびほぼ1973位～2420位に見出されるNS5a）、ならびにRNA依存性RNAポリメラーゼ（ほぼ2421位～3011位に見出されるNS5b）を遊離させる。ポリタンパク質の成熟の完了は、NS3セリンプロテアーゼによって触媒される、NS3-NS4a連結における自己触媒的な切断によって開始される。

10

【0072】

【表1】

表1	
ドメイン	おおよその境界*
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

20

\* HCV-1 に対して番号付けされた。Chooら、(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451~2455を参照のこと。

30

【0073】

本発明の改変NS3ポリペプチドは、プロテアーゼ活性を阻害するように変異され、それによって、改変NS3ドメイン（例えば、NS3/4aポリペプチド）を含むポリペプチドのさらなる切断、および改変NS3ポリペプチドと組み合わせて使用されるさらなるHCVタンパク質の触媒性切断が、阻害される。NS3ポリペプチドは、NS3プロテアーゼドメインの全てもしくは一部分の欠失によって改変され得る。あるいは、タンパク分解活性は、プロテアーゼドメインの活性領域内のアミノ酸の置換によって阻害され得る。最後に、触媒部位が改変されるようなこのドメインの活性領域に対するアミノ酸の付加もまた、タンパク分解活性を阻害するために寄与する。好ましくは、プロテアーゼ活性を低下させるかもしくは消失させる改変は、天然のNS3タンパク質もしくはNS3/4aタンパク質における高次構造エピトープを破壊しない。

40

【0074】

上で説明されたように、プロテアーゼ活性は、全長HCV-1ポリタンパク質に対して番号付けされた（Chooら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451-2455を参照）アミノ酸のおよそ1027位～1207位（図3の2位～182位）において見出されるNS3プロテアーゼおよび活性部位の構造は、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。したがって、天然の配列に対する欠失もしくは改変は、代表的

50

に、分子の活性部位もしくはその近位に存在する。特に、図3の1~182もしくは2~182、好ましくは1~170もしくは2~170、または1~155もしくは2~155において存在する1つ以上のアミノ酸を改変するか、またはこれに対して欠失を起こすことが望ましい。好ましい改変は、プロテアーゼの活性部位における触媒性三連構造(すなわち、H残基、D残基もしくはS残基)に対する、プロテアーゼ不活性化のための改変である。これらの残基は、それぞれ、全長HCVポリタンパク質に対して番号付けられた1083位、1105位および1165位(それぞれ図3の58位、80位および140位)に存在する。このような改変は、NS3プロテアーゼのタンパク分解性切断活性を抑制し、その一方で、免疫反応性を維持する。特に好ましい置換は、天然において非保存的な置換であり、例えば、通常プロテアーゼドメインの1083位、1105位および1165位において見出されるアミノ酸残基の1つ以上に対するAlaの置換である。当業者は、活性を破壊するために欠失させるためのNS3プロテアーゼの位置を、容易に決定し得る。

10

**【0075】**

さらに、これらの部位における他の適切なアミノ酸改変は、例えば、De Francesco, *Antivir. Ther.* (1998) 3 (第3補遺): 99-109; ならびにSchechterおよびBerger, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (1967) 27: 157-162に記載されるようなHCV NS3プロテアーゼの公知の構造および機能に基づき、当業者によって容易に決定され得る。特に、NS3プロテアーゼはセリンプロテアーゼであり、そしてタンパク分解メカニズムは、セリンによる標的したペプチド結合の求核攻撃に基づく。多くの場合、基の求核特性は、アスパラギン酸によって「タンパク質アクセプター状態」に拘束されたヒスチジンの存在によって改善される。セリン、ヒスチジンおよびアスパラギン酸の並列した側鎖は、ほとんどのセリンプロテアーゼに共通する触媒性三連構造を構築する。セリンプロテアーゼの活性部位は、ポリペプチド基質が結合する間隙として形成される。SchechterおよびBerger (SchechterおよびBerger, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (1967) 27: 157-162) は、ポリペプチド基質 (Pi, ..., P3, P2, P1, P1', P2', P3', ..., Pj) およびその対応する結合基質 (Si, ..., S3, S2, S1, S1', S2', S3', ..., Sj) のN末端からC末端までのアミノ酸残基を標識し、そしてこの切断は、P1とP1'との間で触媒されることを見出した。NS3キモトリプシン様折りたたみを採用し、そして非常に長い、溶媒に曝露された基質結合部位を含み、このことは、非常に長いペプチド基質 (P6-P4') を要求することと一貫する。NS3プロテアーゼは、基質のP1位におけるシステイン残基を優先する傾向を有する。したがって、上および当該分野で記載されるような公知の構造および機能に基づき、当業者は、NS3プロテアーゼのタンパク分解活性を破壊するために寄与する他のアミノ酸置換、付加および欠失を容易に決定し得る。

20

30

**【0076】**

NS3タンパク分解活性の存在もしくは非存在は、当業者に公知の方法を用いて容易に決定され得る。例えば、プロテアーゼ活性もしくはその欠損は、以下の実施例に記載される手順を用いて、ならびに当該分野で周知のアッセイを用いて、決定され得る。例えば、Takeshita, *Anal. Biochem.* (1997) 247: 242-246; Kakiuchi, *J. Biochem.* (1997) 122: 749-755; Sali, *Biochemistry* (1998) 37: 3392-3401; Chou, *J. Virol. Meth.* (1998) 72: 109-115; Cerretani, *Anal. Biochem.* (1999) 266: 192-197; Zhang, *Anal. Biochem.* (1999) 270: 268-275; Kakiuchi, *J. Virol. Meth.* (1999) 80: 77-84; Fowler, *J. Biomol. Screen.* (2000) 5: 153-158; およびKim, *Anal. Biochem.* (2000) 284: 42-48を参照されたい。

40

50

## 【0077】

また、さらなる変異が、NS3分子内に存在してもよいが、存在する必要はない。これらの変異は、例えば、ヘリカーゼドメインにおける変異（例えば、1428位および1429位において見出されるアミノ酸残基のうちの一つもしくは両方の置換、例えば、通常1428位に存在するThrからProへの置換、および通常1429位に存在するSerからIleへの置換）である。これらの変異は、本明細書中で「PI」変異体と呼ばれる。図4Bは、代表的な改変NS3構築物を示す。このタンパク質は、N末端MetおよびNS3のアミノ酸1027~1657を含み、したがって、HCVポリタンパク質の全長NS3ドメインを含む。通常1165位に存在するSerは、Alaと置換される。さらに、この変異体は、上述のPI置換を含む。この構築物のDNAおよびアミノ酸配列は、図6A~図6Cに示される。

10

## 【0078】

本発明の改変NS3ポリペプチドはまた、改変NS3プロテアーゼドメインに加えて、NS3ヘリカーゼドメイン（すなわち、NS3ポリペプチド全体および/またはHCVポリタンパク質の一つ以上の他の領域からの一つ以上のポリペプチド）をも含み得る。好ましくは、改変NS3ポリペプチドは、NS4aポリペプチドもしくはそのフラグメントを含む。実際、HCVポリタンパク質の領域の全ては、このような融合体中に存在し得る。これらのポリペプチドは、NS3ポリペプチドと同一のHCV単離物に由来し得るか、または異なる株に由来し得、そして単離物は、種々のHCV遺伝子型のいずれかを有し、広範な範囲のHCV遺伝子型に対して増大した保護を提供する単離物を含む。さらに、ポリペプチドは、免疫診断が使用される特異的な遺伝子型領域において固有である、特定のウイルススクレードに基づいて選択される。この改変HCVタンパク質が、広範な種々の状況において、HCV感染を診断する有効な手段を提供することは、容易に理解される。

20

## 【0079】

多くのHCV株および単離物の核酸配列ならびにアミノ酸配列は、HCVポリタンパク質の種々の領域の核酸配列およびアミノ酸配列（決定されているCore、NS2、p7、E1、E2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5bの遺伝子およびポリペプチドが挙げられる）を含む。例えば、単離物HCV J1.1は、Kubora (1989) Japan. Nucl. Acids Res. 17: 10367-10372; Takeuchi (1990) Gene 91: 287-291; Takeuchi (1990) J. Gen. Virol. 71: 3027-3033; および Takeuchi (1990) Nucl. Acids Res. 18: 4626において記載される。2つの別個の単離物であるHCV-JおよびBKの完全なコード配列は、Kato (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9524-9528 および Takamizawa (1991) J. Virol. 65: 1105-1113 にそれぞれ記載される。

30

## 【0080】

HCV-1単離物を記載する刊行物としては、Choo (1990) Brit. Med. Bull. 46: 423-441; Choo (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451-2455 および Han (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1711-1715 が挙げられる。HCV単離物であるHC-J1およびHC-J4は、Okamoto (1991) Japan J. Exp. Med. 60: 167-177において記載される。HCV単離物であるHCT 18~、HCT 23、Th、HCT 27、EC1およびEC10は、Weiner (1991) Virol. 180: 842-848において記載される。HCV単離物Pt-1、HCV-K1およびHCV-K2は、Enomoto (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 170: 1021-1025において記載される。HCV単離物A、C、DおよびEは、Tsukiyama-Kohara (1991) Virus Genes 5: 243-254において記載される。

40

50

## 【0081】

融合タンパク質の各成分は、同じHCV株もしくは単離物から得られても、異なるHCV株もしくは単離物から得られてもよい。例えば、改変NS3ポリペプチドは、HCVの第1の株に由来し得、そして存在する他のHCVポリペプチドは、HCVの第2の株に由来し得る。あるいは、他のHCVポリペプチドの1種以上（例えば、NS2、NS4a、NS4b、Core、p7、E1および/またはE2）が存在する場合、これはHCVの第1の株に由来し得、そして残りのHCVポリペプチドは、HCVの第2の株に由来し得る。さらに、存在するHCVポリペプチドの各々が、異なるHCV株に由来し得る。

## 【0082】

特定の実施形態において、改変NS3タンパク質はまた、NS4aドメインもしくはその一部分（例えば、NS4aおよび/またはNS4bドメイン）またはそのフラグメントを含む。改変NS3タンパク質（NS4aドメインを含むかもしくは含まない）はまた、他のHCV領域（例えば、NS5aドメイン、HCVのコアポリペプチドなど）と融合され得る。これらの領域は、これらが天然のHCVポリタンパク質中で天然に存在する順番である必要はない。したがって、例えば、存在する場合、NS4aポリペプチドは、NS3ポリペプチドのN末端および/またはC末端に融合させられ得る。

## 【0083】

図4Aおよび図4Cは、代表的な改変NS3ポリペプチドを示す。この図において、通常1165位に存在するSerは、Alaと置換される。さらに、この変異体は、上記のPI置換（すなわち、通常1428位に存在するThrからProへの置換、および通常1429位に存在するSerのIleへの置換）を含む。図4Aにおいて、このタンパク質は、N末端からC末端の方向で、N末端MetおよびNS3のアミノ酸1027~1657およびNS4aのアミノ酸1658~1711を含む。この融合体は、したがって、HCVポリタンパク質の全長NS3ドメインおよびNS4aドメインを含む。このタンパク質のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列は、図5A~図5Cに示される。図4Cにおいて、このタンパク質は、N末端からC末端への方向で、N末端MetおよびNS4aのアミノ酸1678~1690、その後のアミノ酸配列SGS、次いで、NS3のアミノ酸1029~1657を含む。したがって、この融合体は、NS4aドメインの13個のアミノ酸、その後の三ペプチド可撓性（flexible）リンカー配列（「turn」配列と呼ばれる）、次いでNS3ドメインのほぼ全体（N末端の最初の2つのアミノ酸を除く）を含む。このturn配列は、NS4aがプロテアーゼのポケットに折りたたまれることを可能にする。このタンパク質のこのヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列は、図7A~7Cに示される。本明細書中の番号付けは、HCV血清型が容易に決定できるように、全長HCV-1ポリタンパク質および等価な領域を参照している。

## 【0084】

上で記載される改変NS3ポリペプチドは、多エピトープ融合抗原（「MEFA」と呼ばれる；国際公開第97/44469号ならびに米国特許第6,514,731号および同第6,428,792号において記載され、これらの開示は本明細書中でその全体が参考として援用される）と共にイムノアッセイにおいて使用され得る。このようなMEFAは、図1および表1に示し、上で詳細に記載したようなHCVポリタンパク質の2つ以上の種々のウイルス領域に由来する多数のエピトープを含む。このような改変NS3ポリペプチドのMEFAと一緒にの使用は、MEFAのNS3タンパク分解性切断は起こらず、したがって、HCVイムノアッセイにおける使用のためによりよい試薬を提供する。

## 【0085】

多数のHCV抗原は、天然に存在しない、1つの連続する鎖のアミノ酸として並列される。したがって、エピトープの線形順序は、これらが存在するゲノムにおける線形順序とは異なる。本明細書中の使用のためのMEFAの配列の線形順序は、好ましくは、最適な抗原性で並列される。好ましくは、このエピトープは、1種より多いHCV株に由来し、それによって、1回のアッセイにおいてHCVの多数の株を検出するさらなる能力を提供する。したがって、本明細書中の使用のためのMEFAは、上記のポリタンパク質に由来

10

20

30

40

50

する種々の免疫原性領域を含み得る。しかし、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、国際公開第99/63941号において記載される）は、MEFAもしくは上記の改変NS3を有する融合体において使用され得る。所望される場合、HCVポリタンパク質に由来する1種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またはそれ以上が、この融合タンパク質中に存在し得る。

【0086】

MEFAにおける使用のためのさらなるHCVエピトープとしては、E2の超過片領域に由来するエピトープ（例えば、アミノ酸384～414もしくは390～410におよぶ領域）、またはGly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn（配列番号11）の領域からの共通配列（HCV1型へ飲むのアミノ酸390～410についての共通配列を表す）が挙げられる。本発明のMEFA中に存在する代表的なE2エピトープは、アミノ酸384～414におよぶ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E2エピトープは、第2の株からの共通配列に融合するアミノ酸390～410を表す共通配列を含み得る。あるいは、存在するE2エピトープは、アミノ酸390～444におよぶ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E2エピトープは、上で詳述するようなアミノ酸390～410を表す共通配列を含み得、これは、例えば、HCV E2のアミノ酸411～444の天然のアミノ酸配列に融合する。

【0087】

さらに、この抗原は、種々のHCV株に由来し得る。HCVの多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に由来するエピトープは、融合タンパク質において使用され得る。有機体の任意の所定の種は、個々の個体間で互いに異なっており、さらに所定の有機体（例えばウイルス）は、多くの異なる株を有し得ることが、周知である。例えば、上で説明したように、HCVは、少なくとも6種の遺伝子型を含む。これらの遺伝子型の各々は、等価な抗原性決定基を含む。より具体的には、各株は、ウイルスの全ての株において存在するが、ウイルス株間で互いにわずかに異なっている、多くの抗原性決定基を含む。例えば、HCVは、5-1-1として公知である抗原性決定基を含む（図1参照）。この5-1-1エピトープは、全長HCV-1ポリタンパク配列に対して番号付けられた、およそ1694位～1735位で見出される。この特定の抗原性決定基は、HCV-1、HCV-2およびHCV-3において3つの異なる形態で現れる。したがって、本発明の好ましい実施形態において、5-1-1のこれらの形態の3つ全ては、本発明のイムノアッセイにおいて使用される多エピトープ融合抗原上に現れる。同様に、異なるHCV株のコア領域からの等価な抗原決定基もまた、存在し得る。一般に、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、並列させた場合、一般に、30%以上であり、好ましくは40%以上である。また、本発明の多数のコピーのエピトープは、同じエピトープの正確なコピーである多数のコピーをも含み得る。

【0088】

図8および図11A～図11Cは、HCVに由来する、本発明における使用のための代表的なMEFAを示す。しかし、HCVゲノムに由来する他のエピトープもまた、本発明のアッセイにおいて用途を見出すことが理解される。

【0089】

代表的な多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は、図9A～図9Fに示される。このMEFAはまた、米国特許第6,632,601号においても記載され、本明細書中で参考としてその全体が援用される。MEFA 7.1についての一般構造式は、図8において示され、そして、以下の通りである：  
hSOD-E1(1型)-E2HVR共通(1a型)-E2HVR共通(1型および2型)-ヘリカーゼ(1型)-5-1-1(1型)-5-1-1(3型)-5-1-1(2型)-c100(1型)-NS5(1型)-NS5(1型)-core(1+2型)-co

10

20

30

40

50

re (1+2型)。この多数のコピーのエピトープは、HCV-1に対して番号付けされた(以下に示すアミノ酸の番号付けは、Choo,ら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455において提供される指定番号付け(ここで、アミノ酸番号1は、core領域のコード配列によってコードされる第1メチオニンである)にしたがう)、以下のアミノ酸配列を含む:スーパーオキシドジスムターゼ(SOD、このタンパク質の組換え体発現を増大するために使用される)のアミノ酸1~156; E1領域からのポリタンパク質のアミノ酸303~320; このポリタンパク質のアミノ酸390~410(HCV-1a E2の超可変領域の共通配列を表す); E2領域からのポリタンパク質のアミノ酸384~414(HCV-1およびHCV-2のE2超可変領域の共通配列を表す); HCV-1ポリタンパク質のアミノ酸1193~1658(ヘリカーゼを規定する); 5-1-1アミノ酸1689~1735由来のエピトープの3つのコピー(2つはHCV-1由来、1つはHCV-3由来そして1つはHCV-2由来、これらのコピーはHCVの3つの異なる株に由来する等価な抗原決定基である); HCV-1のHCVポリペプチドC100、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(各々、HCVポリタンパク質のアミノ酸2278~2313を有する); ならびにコア領域由来のエピトープの2つのコピー(1つはHCV-1由来でありそして1つはHCV-2由来であって、これらのコピーは、HCV-1の9~32、39~42および64~88およびHCV-2の67~84のアミノ酸によって表される等価な公言決定基である)。

10

【0090】

20

表2は、本明細書中で図9A~9Fに関連する種々のエピトープのアミノ酸位置を示す。

【0091】

【表 2】

表 2. MEFA 7.1				
mefa アミノ酸番号	5' 末端部位	エピトープ	hcv アミノ酸番号	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 共通	390-410	1
200-230		E2 HVR1+2 共通	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>Cl</i> a1	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

本発明の1つの実施形態(図2に示す)において、急速培養リガンドイムノアッセイ(rapid capture ligand immunoassay)が、改変NS3ポリペプチド、もしくは改変NS3ポリペプチドを含む融合体、および1つ以上の多エピトープ融合抗原(例えばMEFA 7.1)を用いて実施される。サンプルは、抗原と混合され、以下でさらに記載されるように、この抗原は、固体支持体上に存在してもよい。サンプルがHCVに感染している場合、固体支持体上に存在するこれらの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、検出可能マーカー(例えば、図2で示すように西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP))の抗原/抗体複合体への結合による。結合は、共有結合性手段によってもよく、もしくは次の検出可能標識化抗体(例えば、標準的サンドイッチアッセイ)の結合によってもよく、または酵素反応(この反応の産物が検出可能である)によってもよい。この検出可能マーカーとしては、発色団、抗体、抗原、酵素、酵素反応性化合物(その切断産物が検出可能である)、ローダミンもしく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(streptavidin)、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))、これらのマーカーの誘導体および/または組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。存在するヒトIgG分子を検出可能である、検出可能標識化抗ヒト抗体が、都合よく使用され得る。

## 【0092】

(HCV抗原の産生)

上で説明したように、本発明の分子は、一般に、組換え的に産生される。したがって、

本発明による使用のための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、組換え的方法を用いて（例えば、この遺伝子を発現する細胞由来のcDNAライブラリーおよびゲノムライブラリーのスクリーニングによって、またはこの遺伝子を含むことが公知であるベクターからこの遺伝子を誘導することによって）得られ得る。さらに、所望される遺伝子は、当該分野で記載される技術（例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号）を用いて、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、クローニングされるのではなく合成的に産生され得る。この分子は、特定の配列についての適切なコドンによって設計され得る。次いで、完全な配列は、標準的方法によって調製される重複するオリゴヌクレオチドから集められ、そして完全なコード配列に集合される。例えば、Edge(1981)Nature 292:756; Nam Bairら(1984)Science 223:1299; およびJayら(1984)J. Biol. Chem. 259:6311を参照のこと。

10

## 【0093】

したがって、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を有するベクターから得られてもよく、または適切な場合、完全に合成されてもよく、もしくは部分的に当該分野で公知の種々のオリゴヌクレオチド合成技術（例えば、部位特異的変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術）を用いて合成されてもよい。例えば、Sambrook、前出を参照。特に、所望の配列をコードするヌクレオチド配列を得るひとつの方法は、従来の自動化ポリヌクレオチド合成機において産生された重複する合成オリゴヌクレオチドの相補的な組をアニーリングする工程、その後、適切なDNAリガーゼによるライゲーション、およびPCRを介するリガンドヌクレオチド配列の増幅を行うことによる方法である。例えば、Jayaramanら(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084-4088を参照。さらに、オリゴヌクレオチド指向型合成(Jonesら(1986)Nature 54:75-82)、既に存在しているヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド指向型突然変異誘発(Riechmannら(1988)Nature 332:323-327およびVerhoeyenら(1988)Science 239:1534-1536)、ならびにT4DNAポリメラーゼを用いるギャップのあるポリヌクレオチドの酵素的埋め合わせ(filling-in)(Queenら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033)は、改変されたかもしくは増強された抗原結合能力および/または低下された免疫原性を有する分子を提供するために、本発明の下で使用され得る。

20

30

## 【0094】

所望のヌクレオチド配列（たとえばNS3もしくは他のHCV抗原）の変異体もしくはアナログを産生するための方法が、周知である。例えば、Dasmahapatraら、米国特許第5,843,752号およびZhangら、米国特許第5,990,276号を参照のこと。イムノアッセイにおける使用のためのNS3もしくは他のHCV抗原の変異体もしくはアナログは、目的のポリペプチドをコードする配列の一部分の欠失、配列の挿入および/または配列内の1つ以上のヌクレオチドの置換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技術（例えば、部位特異的変異誘発など）は、当業者に周知である。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。

40

## 【0095】

一旦、コード配列が調製されるかもしくは単離されると、このような配列は、任意の適切なベクターもしくはレプリコン内にクローニングされ得る。多く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は、選択できる問

50

題である。適切なベクターとしては、適切なコントロールエレメントと結合した場合に複製可能である、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、もしくはウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0096】

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、適切な制御エレメントの制御下に置かれる。したがって、コード配列は、プロモーター、リボソーム結合部位（細菌発現のため）、および、必要に応じて、オペレーター、の制御下に置かれ得、それによって目的のDNA配列は、適切な形質転換体によってRNAへ転写される。コード配列は、宿主の翻訳後プロセッシングによって後に除去され得るシグナルペプチドもしくはリーダー配列を含んでも、含まなくてもよい。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。

10

【0097】

制御配列に加えて、宿主細胞の成長に関連して配列の発現を調節可能である調節配列を付加することが所望され得る。調節配列は、当業者に公知であり、そして例としては、化学的刺激もしくは物理的刺激（調節性化合物の存在を含む）に応答して遺伝子発現のオンオフ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もまた、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、本明細書中で、構築物の発現レベルを上昇させるために使用され得る。例としては、SV40初期遺伝子エンハンサー（Dijkemaら（1985）EMBOJ. 4:761）、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復配列（LTR）エンハンサー/プロモーター（Gormanら（1982）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 19:6111）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号））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ける自己複製のための複製起点、1つ以上の選択可能マーカー、1つ以上の制限部位、大きなコピー数のための能力および強力なプロモーターを含み得る。

20

【0098】

発現ベクターは、特定のコード配列が適切な調節配列と共に配置されるように構築され、制御配列に対するコード配列の位置および方向は、コード配列が制御配列の「制御」下で転写されるような位置および方向である（すなわち、制御配列においてDNA分子に結合するRNAポリメラーゼが、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ことが所望され得る。例えば、いくつかの場合、配列を改変し、それによってこの配列が適切な方向で制御配列に結合し得る（すなわち、リーディングフレームを維持する）ようにする必要がある場合がある。制御配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入前に、コード配列とライゲーションされ得る。あるいは、コード配列は、既に制御配列および適切な制限部位を含む発現ベクター内に直接クローニングされてもよい。

30

【0099】

この分子は、広範な種々の系において発現され得、この系としては、昆虫発現系、哺乳動物発現系、細菌発現系、ウイルス発現系および酵母発現系が挙げられ、これらは全て、当該分野で周知である。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第1555号（1987）において記載される。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系についての材料および方法は、キット形態で、特にInvitrogen, San Diego CAから（「MaxBac」キット）市販されている。同様に、細菌細胞発現系および哺乳動物発現系は、当該分野で周知であり、そして例えば、Sambrookら、前出に記載されている。酵母発現系もまた、当該分野で公知であり、例えば、Yeast Genetic Engineering（Barrら、編、1989）Butterworths, Londonに記載されている。

40

50

## 【0100】

上記の系と共に使用するための多くの適切な宿主細胞もまた、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、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能である不死化細胞株を含む。これらの不死化細胞株は、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa 細胞、新生仔ハムスター腎臓 (BHK) 細胞、サル腎臓細胞 (COS)、ヒト胎性腎細胞、ヒト肝細胞癌腫細胞 (例えば、Hep G2)、Madin-Darby ウシ腎臓 (「MDBK」) 細胞、などであるが、これらに限定されない。同様に、細菌宿主 (例えば、E. coli、Bacillus subtilis、および Streptococcus spp.) は、本発明の発現構築物と共に用途を見出す。本発明における酵母宿主としては、特に、Saccharomyces cerevisiae、Candida albicans、Candida maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、Pichia guillierimondii、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と共に使用する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。

10

20

## 【0101】

目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、当該分野で周知の種々の遺伝子送達技術を用いて、宿主細胞ゲノム内に安定的に組み込まれてもよく、または適切な宿主細胞において安定なエピソームエレメント上で維持されてもよい。例えば、米国特許第 5,399,346 号を参照のこと。

## 【0102】

選択された発現系および宿主に依存して、分子は、上述の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞によって、タンパク質が発現される条件下で産生される。発現されたタンパク質は、次いで、宿主細胞から単離され、そして精製される。発現系が増殖培地中にタンパク質を分泌する場合、産物は、培地から直接精製され得る。分泌されない場合、このタンパク質は、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、当業者の範囲内である。

30

## 【0103】

種々の HCV 抗原 (上述の種々の融合体において使用される抗原を含む) の組換え体産生は、記載されている。例えば、国際公開第 94/01778 号、同第 93/00365 号、同第 04/00547 号および同第 01/38360 号; 米国特許第 5,350,671 号、同第 5,683,864 号、同第 6,346,375 号、同第 6,150,087 号、同第 6,514,731 号、同第 6,428,792 号および同第 6,632,601 号; Chienら, J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33-39; Chien, D.Y., 国際公開第 94/01778 号; Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011-10015 を参照されたい。これらの全ての開示は、本明細書中でその全体が参考として援用される。改変 NS3 ポリペプチドを産生する好ましい方法は、実施例 1 において記載される。

40

## 【0104】

(免疫診断アッセイ)

一旦産生されると、HCV 抗原は、抗体を検出するために既知の抗原を使用する実質的に任意のアッセイ形式において使用され得る。これらの全てのアッセイに共通する特徴は、抗原が、HCV 抗体を含むことが疑われる身体の成分と、この抗原がこの成分中に存在する任意のこのような抗体に結合することを可能にする条件下で、接触させられることである。このような条件は、代表的に、生理学的な温度、pH およびイオン強度であり、過

50

剰な抗原を用いる。この抗原と標本とのインキュベーションの次に、抗原からなる免疫複合体の検出が行われる。

【0105】

イムノアッセイの設計は、大きく変動し得、そして多くの形式が、当該分野で公知である。例えば、プロトコールは、固体支持体を使用してもよく、または免疫沈降を使用してもよい。ほとんどのアッセイは、標識化抗体もしくは標識化ポリペプチドの使用を包含する；例えば、標識は、上で詳しく考察した通り、酵素分子、蛍光分子、化学発光分子、放射活性分子もしくは色素分子であり得る。免疫複合体から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、ピオチンおよびアビジンを使用するアッセイ、ならびに酵素標識化イムノアッセイおよび酵素媒介型イムノアッセイ（例えば、ELISAアッセイ）である。

10

【0106】

このイムノアッセイは、限定されないが、異種形式でも同種形式でもよく、そして標準型でも競合型でもよい。異種形式において、ポリペプチドは、代表的に、固体マトリックスもしくは固体支持体に結合し、インキュベーション後に、このポリペプチドからサンプルを分離することを容易にする。本発明の目的のために、固体支持体は、可溶性マトリックスである任意の材料であり得、そして剛性もしくは半剛性の表面を有し得る。例示的な固体支持体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ニトロセルロースのような基質（例えば、膜もしくはマイクロタイターウェル形態）；塩化ポリビニル（例えば、シートもしく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、ビーズもしくはマイクロタイターウェル）；フッ化ポリビニリジン；ジアゾ化紙；ナイロン膜；活性型ビーズ、磁気応答ビーズなど。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、中空ファイバー、針、ピン、固体ファイバー、セルロースビーズ、穴あきガラス（pore-glass）ビーズ、シリカゲル、必要に応じてジビニルベンゼンに架橋したポリスチレンビーズ、グラフト共重合ビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、必要に応じてN-N'-ビス-アクリロイルエチレンジアミンに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。

20

【0107】

所望される場合、固体支持体に添加されるべき分子は、スチレン部分もしくはアクリレート部分を作製するように容易に官能性付与され得、どれによって、この分子のポリスチレン、ポリアクリレートもしくは他のポリマー（例えば、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、ポリチオフエン、ポリエーテル、エポキシ、石英ガラス、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、セルロースなどへの組み込みを可能にする。

30

【0108】

1種より多くのHCV抗原（例えば、改変NS3ポリペプチドおよびMEFAもしくは別のHCV抗原）がアッセイにおいて使用される場合、これらの抗原は、同じ固体支持体上もしくはこのアッセイにおいて合わせられ得る異なる固体支持体上で提供され得る。したがって、例えば、これらの抗原は、別個の実態として、例えば、1枚のプレート上に存在してもよく、または、例えば、目的のアッセイにおける使用のために混合される個々の微小ビーズ上に存在してもよい。

40

【0109】

1つの状況において、図2で示すように、固体支持体は、最初に、改変NS3ポリペプチド（例えば、NS3aPI.1165, NS3PI.1165もしくはd.4a.t.NS3PI.1165）およびMEFA（例えばMEFA7.1）のようなHCV抗原（本明細書中で、集合的に「固相成分」と呼ぶ）と、この分子が十分に固体支持体に固定化されるような適切な結合条件下で反応させられる。時々、支持体への固定化は、抗原のより良い固相結合特性を有するタンパク質への最初のカップリングによって増強され得る

50

。適切なカップリングタンパク質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：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アニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミン、および当業者に公知の他のアルブミン。分子を支持体に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、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどが挙げられる。そのような分子およびこれらの分子の抗原へのカップリングの方法は、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 Peptide and Protein Res.* 30: 117-124 を参照されたい。

10

## 【0110】

固体支持体を固相成分と反応させた後、任意の非固定化固相成分は、洗浄によって支持体から除去され、次いで、この支持体に結合した成分は、HCV抗体（本明細書中で集合的に「リガンド分子」と呼ぶ）を含むことが疑われる生物学的サンプルと、適切な結合条件下で接触させられる。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。任意の非結合リガンド分子を除去するための洗浄の後、検出可能に標識化された抗体（例えば、抗HCV抗体上のエピトープを認識する抗外因性抗体（例えば、抗ヒト抗体））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。

20

## 【0111】

別のアッセイ形式が、図12に示される。このアッセイ形式は、当該分野で周知であり、ビオチン標識化抗体（改変NS3および、必要な場合MEFA（例えば、MEFA 7.1）と結合する）と反応させられるストレプトアビジンコーティングされた固体支持体を用いる。このサンプルは、適切な結合条件下で加えられる。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。任意の非結合リガンド分子を除去するための洗浄の後、上述のように、検出可能に標識化された抗体が添加される。

## 【0112】

同種形式において、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、形成された任意の抗原-抗体複合体を沈殿す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、当該分野で公知である。

30

## 【0113】

標準形式において、抗体-抗原複合体を形成するHCV抗体の量が、直接モニタリングされる。これは、抗HCV抗体上のエピトープを認識する標識化外因性抗体（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、複合体中の既知の量の標識化抗体（または他の競合性リガンド）の結合における競合作用をモニタリングすることによって推定される。

## 【0114】

より詳細には、抗HCV抗体（または、競合アッセイにおいては、競合性抗体の量）を含んで形成される複合体が、その形式に依存して、多くの公知の技術のいずれかによって検出される。例えば、複合対中の未標識化HCV抗体は、標識（例えば、酵素標識）と複合体化した抗外因性Igの複合体を用いて検出され得る。免疫沈降アッセイ形式もしくは凝集アッセイ形式において、HCV抗原と抗体との間の反応は、ネットワークを形成し、このネットワークは、溶液もしくは懸濁液から沈殿し、そして沈殿物の可視の層もしくは薄膜を形成する。抗HCV抗体が試験標本中に存在しない場合、可視の沈殿物は形成されない。上述のアッセイ試薬（結合した抗体および抗原を有するイムノアッセイ固体支持体、ならびに捕獲したサンプルと反応させられる抗体および抗原を含む）は、上述のイムノアッセイを実施するために、適切な指示書および他の必要な試薬と共にキット中で提供され得る。このキットは、抗原の組み合わせ（既に固体マトリックスに結合していても、ま

40

50

たはマトリックスに結合するための試薬と別個でもよい)、コントロール抗体処方物(ポジティブおよび/またはネガティブ)、標識がシグナルを直接産生しない場合にアッセイ形式が同一のシグナル発生試薬(例えば酵素基質)を必要とする場合は標識化抗体を、通常、別個の容器で、含む。アッセイを実施するための指示書(例えば、書類、テープ、VCR、CD-ROMなど)が、キット中に含まれる。このキットはまた、使用される特定のイムノアッセイに依存して、他の梱包された試薬および材料(すなわち、洗浄緩衝液など)を含んでもよい。上述のもののような標準的イムノアッセイが、これらのキットを用いて実施され得る。

【実施例】

【0115】

10

(III. 実施例)

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の例である。これらの例は、例示のみの目的で提供され、そして本発明の範囲を限定することをいかなるようにも意図しない。

【0116】

使用される数値(例えば、量、温度など)に関して正確さを期するために努力がなされているが、無論、ある程度の実験誤差および偏差は許容される。

【0117】

(実施例1)

(改変NS3タンパク質の産生)

(I. NS34aPI)

20

NS3ヘリカーゼドメインに対する変異を有するがプロテアーゼドメインに対しては変異を有さない、NS34aPIを、以下のような酵母発現ベクターpBS24.1による発現のために産生した。NS34aPIは、HCV-1全長配列に対して番号付けされたアミノ酸Thr-1428およびSer-1429がそれぞれProおよびIleに変異されていることを除き、天然のNS3/4aポリペプチドについてのアミノ酸配列を含む。この酵母発現ベクターpBS24.1は、酵母における自己複製のために2μ配列を含み、そして選択可能マーカーとして酵母遺伝子であるleu2-dおよびURA3を含む。ラクタマーゼ遺伝子およびColE1複製起点(細菌におけるプラスミド複製のために必要である)もまた、この発現ベクター中に存在する。NS34aPIをコードするプラスミドpd.hcv1a.ns3ns4aPIを、以下のように産生した。2工程の

手順を使用した。第1に、以下のDNA断片を、ライゲーションして一緒にした:(a) 5' HindIIIクロニング部位を提供する合成オリゴヌクレオチド、およびその後続く配列ACAAAACA(AA(配列番号12)、開始ATG、ならびにHCV1aについてのコドン(アミノ酸1027で始まり、アミノ酸1046におけるBglI部位まで続く);(b) pAcHLTns3ns4aPI由来の683bpのBglI-ClaiI制限フラグメント(コードするアミノ酸は1046~1274);ならびに(c) HindIIIおよびClaiIで切断し、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pAcHLTns3ns4aPIは、pAcHLT(BD Pharmingen(San Diego, CA)から市販されている場急路ウイルス発現ベクター)に由来した。詳細には、pAcHLT EcoRI-PstIベクターおよび以下のフラグメントを調製した:EcoRI-AlwNI、935bp、HCV-1ゲノムのアミノ酸1027~1336に対応する;AlwNI-SacII、247bp、HCV-1ゲノムのアミノ酸1336~1419に対応する;HinfI-BglI、175bp、HCV-1ゲノムのアミノ酸1449~1509に対応する;BglI-PstI、619bp、HCV-1ゲノムのアミノ酸1510~1711に対応する、および転写終止コドン。合成的に産生した91bpのフラグメントであるSacII-HinfI(HCV-1ゲノムのアミノ酸1420~1448に対応し、かつPI変異(Thr-1428からProへの変異、Ser-1429からIleへの変異)を有する)を、上述の175bpのHinfI-BglIフラグメントおよび619bpのBglI-Pst

30

40

50

Iフラグメントとライゲーションし、そしてSacIIおよびPstIで消化したpGEM-5Zf(+)ベクター内にサブクローニングした。pGEM-5Zf(+)は、市販のE.coliベクター(Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL登録番号X65308)である。コンピテントHB101細胞の形質転換後、個々のクローンのミニスクリーン分析および配列評価を行い、pGEM5.PIクローン2からの885bpのSacII-PstIフラグメントを、ゲル精製した。このフラグメントを、EcoRI-AlwNIの935bpフラグメント、AlwNI-SacIIの247bpフラグメントおよび上述のpAcHLT EcoRI-PstIベクターとライゲーションした。得られた構築物を、pAcHTns3ns4aPIと名づけた。

#### 【0118】

上記のライゲーション混合物を、HB101コンピテント細胞内に形質転換し、そして100μg/mlアンピシリンを含有するLuria寒天プレート上でプレート培養した。個々のクローンのミニプレップ分析から、推定される陽性を同定し、これらのうちの2つを増幅した。pSP72 1aHCについてのプラスミドDNA(クローン番号1および2)を、Qiagen Maxiprepキットで精製し、そして配列決定した。

#### 【0119】

次に、以下のフラグメントを、ライゲーションして一緒にした：(a) pSP72 1aHC #1からの761bp HindIII-ClaIフラグメント(pSP72.1aHCを、以下をライゲーションして一緒にすることによって産生した：HindIIIおよびClaIによって切断した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、その後続く配列ACAAAACA(AA(配列番号12)、開始コドンATG、およびHCV1aについてのコドン(アミノ酸1027で始まり、アミノ酸1046におけるBglII部位まで続く)、ならびにpAcHTns3ns4aPIからの683bpのBglII-ClaI制限フラグメント(コードするアミノ酸は1046~1274である))；(b) 酵母ハイブリッドプロモーターADH2/GAPDHについての1353bpのBamHI-HindIIIフラグメント；(c) pAcHTns3ns4aPIからの1320bpのClaI-SalIフラグメント(Thr 1428からProへの変異およびSer 1429からIleへの変異を有する、HCV1aアミノ酸1046~1711をコードする)；ならびに(d) BamHIおよびSalIで切断し、脱リン酸化し、そしてゲル精製したpBS24.1酵母発現ベクター。このライゲーション混合物を、コンピテントHB101内に形質転換し、そして100μg/mlアンピシリン含有のLuria寒天プレート上にプレート培養した。個々のクローンのミニプレップ分析から、3446bp BamHI-SalI挿入物(ADH2/GAPDHプロモーター、開始コドンATGおよびThr 1428からProへの変異およびSer 1429からIleへの変異を有するHCV1a NS34aのアミノ酸1027~1711からなる)を有することが予測されるクローンを同定した。この構築物を、pd.HCV1a.ns3ns4aPIと名付けた。

#### 【0120】

S.cerevisiae株AD3を、pd.HCV1a.ns3ns4aPIによって形質転換し、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に発現について確認した。組換えタンパク質は、酵母において高レベルで発現した。このことは、クーマシーブルー染色によって検出され、そしてNS3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るイムノブロットによって確認した。

#### 【0121】

NS3/4aタンパク質を、以下のように精製した。上記のS.cerevisiae細胞(NS34aPIタンパク質を発現する)を収集し、そして細胞を、溶解緩衝液(50mM Tris pH8.0、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μMペプスタチン、1μMロイペプシン)中に浮遊させ、そしてこれを、Dyno-Mill(Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)もしくは等価の装置において、1:1:1の細胞:緩衝液:0.5m

10

20

30

40

50

mガラスビーズの比でガラスビーズを用いて使用して、溶解した。この溶解物を、30100×gで30分間4で遠心分離し、そして不溶性タンパク質画分を含むペレットに洗浄緩衝液（出発細胞ペレット重量1gあたり6ml）を加え、室温で15分間振とうした。この洗浄緩衝液は、50mM NaPO<sub>4</sub>（pH8.0）、0.3M NaCl、5mM -メルカプトエタノール、10%グリセロール、0.05%オクチルグルコシド、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μMペプスタチン、1μMロイペプチンからなる。細胞屑を、30100×gで30分間4の遠心分離によって除去した。上清を捨て、ペレットを残した。

#### 【0122】

タンパク質を、以下のようにペレットから抽出した。6ml/g抽出緩衝液を添加し、そして室温で15分間振とうした。この抽出緩衝液は、50mM Tris（pH8.0）、1M NaCl、5mM -メルカプトエタノール、10%グリセロール、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μMペプスタチン、1μMロイペプチンからなっていた。これを、30100×gで30分間4で遠心分離した。この上清を保持し、そして硫酸アンモニウムを、以下の式を用いて17.5%まで添加した：上清の容量（ml）×x%硫酸アンモニウム/（1-x%硫酸アンモニウム）=上清に添加した4.1M飽和硫酸アンモニウムの量（ml）。硫酸アンモニウムを氷上で攪拌しながら滴下し、そしてこの溶液を氷上で10分間攪拌した。この溶液を、17700×gで30分間4で遠心分離し、そしてペレットを得て、2～8で48時間まで保存した。

#### 【0123】

このペレットを再懸濁し、そしてポリウカラム（ポリウセファロース4B、Amersham Pharmacia）に4で以下のようにかけた。ペレットを、ペレット1gあたり6mlのポリウ平衡化緩衝液中に再懸濁した。平衡化緩衝液は、25mM HEPES（pH8.0）、200mM NaCl、5mM DTT（新鮮に添加した）、10%グリセロール、1.2オクチルグリコシドから構成されていた。この溶液を、4で15分間振とうし、そして31000×gで30分間4で遠心分離した。

#### 【0124】

ポリウカラム（出発ペレット重量1gあたり1mlの樹脂）を、調製した。線形流速は、60cm/時間であり、そしてパッキング流速は、133%の60cm/時間であった。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、平衡化カラム上にロードした。このカラムを、平衡化緩衝液で基線まで洗浄し、そしてタンパク質を、以下のポリウ溶出緩衝液（25mM HEPES（pH8.0）、1M NaCl、5mM DTT（新鮮に加えた）、10%グリセロール、1.2オクチルグルコシド）中で、溶出工程で溶出した。カラム溶出物を、SDS-PAGE（クーマシー染色）にかけ、そしてアリコートをし、凍結させそして-80で保存した。NS34aPIタンパク質の存在を、NS3プロテアーゼドメインに対して指向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るウェスタンブロットによって確認した。

#### 【0125】

さらに、プロテアーゼ酵素活性を、精製の間以下のようにモニタリングした。NS4aペプチド（KKGSVVIVGRIVLSGKPAIIPKK、配列番号）およびNS34aPIタンパク質を含有するサンプルを、90μlの反応緩衝液（25mM Tris（pH7.5）、0.15M NaCl、0.5mM EDTA、10%グリセロール、0.05n-ドデシルB-D-マルトシド、5mM DTT）中で希釈し、そして30分間室温で混合させた。90μl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10μlのHCV基質（AnaSpec, Inc., San Jose CA）を添加した。このプレートを混合し、そしてFluostarプレートリーダー上で読み取った。結果を、1分間あたりの相対蛍光単位（RFU）として表した。

#### 【0126】

これらの方法（1M NaCl抽出の産物は3.7RFU/分の活性を含んだ）を用い、この硫酸アンモニウム沈殿は、7.5RFU/分の活性を有し、そしてポリU精製の産物は、18.5RFU/分の活性を有した。

## 【0127】

（II. プロテアーゼドメインに変異を有する改変NS3抗原）

NS3プロテアーゼドメインに対する変異を有する改変NS3抗原を、上記のNS34aPI配列の部位特異的変異誘発を用いて産生した。詳細には、プロテアーゼ触媒性三連構造中のSer-1165についてのコドンを、Alaコドンに変異させた。1165位のSerからAlaへの置換を含むNS34aPI構築物の図を、図4Aに示す。この構築物のヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列を、図5A～図5Cに示す。この構築物を、「NS34aPI.1165」と呼んだ。

10

## 【0128】

さらに、図4Cに示した改変NS3タンパク質を、産生した。上記のタンパク質と同様に、改変NS3もまた、ヘリカーゼドメインにPI変異を含んだ。このタンパク質は、NS4aのアミノ酸1678～1690、およびその後にアミノ酸配列SGS、次いでNS3のアミノ酸1029～1657を含んだ。SGS配列は、NS4aポリペプチドをプロテアーゼポケットに折りたたんで酵素的に活性な分子を作製する、可撓性のリンカー配列を提供する。このタンパク質のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を、図7A～図7Cに示す。この構築物を、「d.4a.t.NS3PI.1165」と呼んだ。

## 【0129】

20

最後に、アミノ酸1165におけるAla置換およびヘリカーゼドメインにおけるPI置換を含む改変NS3タンパク質（図4Bに示す）を、以下のように産生した。このタンパク質のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を、図6A～図6Cに示す。この構築物を、「NS3PI.1165」と呼んだ。

## 【0130】

NS3PI.1165酵母発現ベクターを構築するために、以下の工程を行った。最初に、プラスミドpSP72NS3NS4a.PI.HindIII/Clai#9を、BglI/CIaIフラグメント（上述のように、pAcHLT NS3NS4aPIから単離した）と97bpのHindIII/BglI合成オリゴヌクレオチド（下記）とのライゲーションによって作製し、次いで、HB101内に形質転換した。

30

## 【0131】

## 【数1】

AGCTTACAAAACAAAATGCATCACCATCACCATCACGCGCC

Hbgl-1 ( 配列番号 14)

GCGTACGCCGTGATGGGCGCGTGATGGTGATGGTGATGCATTTTGTTTTGT

A

Hbgl-2 ( 配列番号 15)

40

CATCACGGCGTACGCCAGCAGACAAGGGGCCTCCTAGGGTGCATAATCA

CCAGCCTAAC

Hbgl-5 ( 配列番号 16)

AGGCTGGTGATTATGCACCCTAGGAGGCCCTTGCTGCTGG

Hbgl-6 ( 配列番号 17)

50

ミニスクリーンおよび配列確認の後、プラスミド pSP72NS3NS4a.PI.HindIII/Clai#9 を (DAM<sup>-</sup>メチル化した) SCS110 E.coli コンピテント細胞内に再形質転換した。次いで、このプラスミドを、ムターゼ (部位特異的変異誘発 (GeneTailor Site-Directed Mutagenesis, Invitrogen, San Diego CA)) を用いた、HCV1aNS3 プロテアーゼ触媒性三連構造のセリン1165 からアラニンへの変異) に対するテンプレートとして使用して、以下の PCR プライマーを使用した:

【0132】

【数2】

5' TTTCCTACTTGAAAGGCTCCgcaGGGGGTCCGCT 3' (配列番号 18)

10

3'GGGGCCGGGTAAAGGATGAACTTTCCGAGG5' (配列番号 19)

ミニスクリーン分析および配列評価の後、正しい配列を有するクローンを、pSP72NS3NS4a.PImut1165#32 と名付けた。次に、このプラスミドを、HindIII および AvrII (BlnI) で消化して、下の HCV1a NS3 ドメイン由来の N 末端の 14 アミノ酸をコードする 58 塩基対の合成オリゴヌクレオチド (酵母の好むコドンを用いる) とのライゲーションのためのベクターを調製した。

【0133】

【数3】

AGCTTACAAAACAAAATGGCGCCAATCACTGCTTACGCTCAACAAACCAG

AGGCCTC

HA-1 (配列番号 20)

20

CTAGGAGGCCTCTGGTTTGTGAGCGTAAGCAGTGATTGGCGCCATTTTGT

TTTGTA

HA-2 (配列番号 21)

30

HB101 形質転換、ミニスクリーン分析および配列評価の後、正しい配列を有する新規なプラスミドを、pSP72H3/ClaiNS3mut1165#15 と名付けた。HCV1a NS3 ドメインの Clai 部位はメチル化されているので、SCS110 E.coli コンピテント細胞を、pSP72H3/ClaiNS3mut1165#15 サブクローンを形質転換するために使用した。次に、このプラスミドを、HindIII および Clai で消化し、761bp のフラグメントを調製した。

【0134】

第2に、1129bp の Clai/EagI フラグメントを、バキュロウイルス発現プラスミド pAcHLTns3ns4a.PI から単離した。この Clai/EagI フラグメントを、NS3 ドメインの C 末端および NS4a ペプチドをコードする 195bp の合成オリゴヌクレオチドと共に pSP72 Clai/SalI ベクター内にライゲーションして、サブクローン pSP72NS3NS4a.PI Clai/SalI#30 を作製した。このサブクローンを、SCS110 コンピテント細胞内に形質転換し、ここで、Clai 部位は、HB101 においてのようにメチル化されなかった。

【0135】

40

【数 4】

GGCCGACCTGGAGGTCGTCACGAGCACCTGGGTGCTCGTTGGCGGCGTCC  
TGGCTGCTTTGGCCGCGTATTGCCTGTCAACAGG

PI3p-1 ( 配列番号 22)

CTGCGTGGTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGGAAGCCGGCAATCA  
TACCTGACAGGGAAGTCCTCTAC

PI3p-2 ( 配列番号 23)

10

GTCAGGTATGATTGCCGGCTTCCCGGACAAGACGACCCTGCCCACTATGA  
CCACGCAGCCTGTTGACAGGCAATACGC

PI3p-3 ( 配列番号 24)

GGCCAAAGCAGCCAGGACGCCGCAACGAGCACCCAGGTGCTCGTGACG  
ACCTCCAGGTC

PI3p-4 ( 配列番号 25)

20

CGAGAGTTCGATGAGATGGAAGAGTGCTGATAAG

PI3p-5 ( 配列番号 26)

TCGACTTATCAGCACTCTTCCATCTCATCGAACTCTCGGTAGAGGACTTCC  
CT

PI3p-6 ( 配列番号 27)

30

このプラスミドから、制限酵素である *Ava*3 および *Sal*I で消化することによってベクターを調製し、それによって、*NS4a* ドメインを削除した。このベクター内に、37bp の合成オリゴヌクレオチドをライゲーションし、そして *HB101* 内に形質転換した。

【0136】

【数 5】

TGTCGGCCGACCTGGAGGTCGTCACGTGATAAG

avsal-1 ( 配列番号 28)

40

TCGACTTATCACGTGACGACCTCCAGGTCGGCCGACATGCA

avsal-2 ( 配列番号 29)

ミニスクリーン分析および配列評価の後、*pSP72 ClaISalI NS3PI* サブクローン #101 を作製した。このプラスミドを、前に記載したように、1320bp の *ClaI/SalI* フラグメントを単離するために、再び *SCS110* 内に再形質転換した。

【0137】

最後に、*Bam*HI / *Hind*III *ADH2/GAPDH* プロモーター、*Hind*

50

I I I / C l a I 7 6 1 b p フラグメントおよび C l a I / S a l I 1 3 2 0 b p フラグメントを、p B S 2 4 . 1 B a m H I / S a l I 酵母発現ベクター内にライゲーションし、そして E . c o l i 株 H B 1 0 1 コンピテント細胞を用いて形質転換した。個々のコロニーのミニプレップ分析から、3 2 8 4 b p と予測したフラグメントを有するクローンを同定した。この構築物を、p d . N S 3 P I . 1 1 6 5 # 2 1 と名付けた。S . c e r e v i s i a e A D 3 株の酵母における発現を、p d . H C V 1 a . n s 3 n s 4 a P I について、上述のように確認した。

【 0 1 3 8 】

d . 4 a . t . N S 3 P I . 1 1 6 5 酵母発現プラスミドを、以下のように産生した。N S 4 a ペプチドおよびその後のアミノ酸配列 S e r - G l y - S e r ならびに N S 3 ドメインのアミノ酸 1 0 2 9 ~ 1 0 3 9 をコードする 1 0 0 b p の合成オリゴヌクレオチドを、ベクター p S P 7 2 N S 3 N S 4 a P I m u t 1 1 6 5 # 3 2 H i n d I I I / A v r I I ( 上記 ) 内にライゲーションし、そして H B 1 0 1 内に形質転換した。

【 0 1 3 9 】

【 数 6 】

AGCTTACAAAACAAAATGGGCTGCGTG

HA-5 ( 配列番号 30)

GACCCTGCCCACTATGACCACGCAGCCCATTTTGTTTTGTA

HA-6 ( 配列番号 31)

GTCATAGTGGGCAGGGTCGTCTTGTCCGGTTCGGTCCATCACTGCTTAC

GCTCAACAAACCAGAGGCCTC

HA-7 ( 配列番号 32)

CTAGGAGGCCTCTGGTTTGTGAGCGTAAGCAGTGATGGAACCGGAACCG

GACAAGAC

HA-8 ( 配列番号 33)

ミニスクリーンおよび配列評価の後、p S P 7 2 4 a - t - N S 3 P I . 1 1 6 5 # 1 4 を作製した。得られたプラスミドを、次いで、上記の理由で S C S 1 1 0 内に形質転換し、そして 8 0 3 b p の H i n d I I I / C l a I フラグメントを、単離した。d . 4 a . t . N S 3 P I . 1 1 6 5 酵母発現プラスミドを作製するため、A D H 2 / G A P D H B a m H I / H i n d I I I プロモーターを、8 0 3 b p の H i n d I I I / C l a I フラグメントおよび N S 3 P I 領域の 3 ' 末端をコードする 1 1 5 8 b p の C l a I / S a l I フラグメントと共に p A B 2 4 B a m H I / S a l I 酵母発現ベクター内にライゲーションした。p d . 4 a - t - n s 3 . 1 1 6 5 # 4 を、S . c e r e v i s i a e A D 3 酵母株内に形質転換し、そして 1 つの形質転換体を、上述のように、p d . H C V 1 a . n s 3 n s 4 a P I の発現について確認した。

【 0 1 4 0 】

タンパク質を、上のように精製した。変異体タンパク質の全ては、酵母において N S 3 4 a P I の発現レベルと同等の発現レベルを有し、そして、これを N S 3 4 a P I の純度 ( 9 0 % を超える純度 ) と同等の純度で精製した。S D S - P A G E およびウェスタンブロットは、改変 N S 3 ポリペプチドのタンパク分解活性の欠損を確認した。詳細には、N S 3 4 a P I . 1 1 6 5 は、未切断の全長タンパク質であり、そして N S 3 P I . 1 1 6 5 および N S 3 4 a P I . 1 1 6 5 は、M E F A 7 . 1 を切断しないことを示した。し

10

20

30

40

50

たがって、この改変タンパク質は、タンパク分解活性を欠損していた。

【0141】

(実施例2)

(変異HCV抗原を用いるイムノアッセイ)

HCV抗原および、特定されるいくつかの場合、MEFA 7.1抗原を、以下のように、イムノアッセイのためにプレート上にコーティングした。MEFA 7.1を、米国特許第6,632,601号(本明細書中でその全体が参考として援用される)において記載されるように産生した。MEFA 7.1は、NS3プロテアーゼに対する天然の基質である。HCVコーティング緩衝液(50mM NaPO<sub>4</sub>(pH7.0)、2mM EDTAおよび0.1%クロロアセトアミド)を、0.22μ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、そして各添加の後で撹拌した: 2μg/ml BSA-スルフヒドリル改変(10mg/ml溶液から)(Bayer Corp. Pentex, Kankakee, Illinois); 5mM DTT(1M溶液から)(Sigma, St. Louis, MO); 0.45μg/ml NS3/4a(0.3mg/mlのタンパク質濃度); 0.375μg/ml MEFA 7.1(1mg/mlのタンパク質濃度)。最終溶液を、室温で15分間撹拌した。

10

【0142】

200μlの上記溶液を、Costar high binding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、湿潤チャンバ内で一晚インキュベートした。次いでこのプレートを、洗浄緩衝液(1xPBS、0.1% TWEEN-20)で洗浄し、タッピング乾燥(Tapped dry)し、そして285μlのOrtho Post-Coat Buffer(1xPBS(pH7.4)、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時間インキュベートし、タッピングしそして一晚2~8で乾燥させた。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。

20

【0143】

NS34aPI(タンパク分解ドメインの変異を有さない)と比較した改変NS3抗原の性能を、研究した。HCV感染している市販のヒト血液サンプルのパネルを使用した。以下の表で示すPHVパネルを、Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA(BBI)から購入した。

30

【0144】

HCVアッセイを、以下のように実施した。200μlの標本希釈緩衝液(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<sub>4</sub>、5ml/l Tween-20、29.22g/l NaCl、1.627g/l NaPO<sub>4</sub>、1% SDS)を、コーティングしたプレートに添加した。これを、37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(1xPBS(pH7.4)、0.1% Tween-20)で洗浄した。200μlの結合体溶液(マウス抗ヒトIgG-HRP、例えば、ORTHO HCV 3.0 ELISA Test System中で増強したSAVeバルク結合体希釈液(Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)により1:22で希釈したマウス抗ヒトIgG-HRPを添加し、そして60分間37でインキュベートした。これを、上述のように洗浄し、そして200μlの基質溶液(1個のOPD錠剤/10ml)を添加した。このOPD錠剤は、西洋ワサビペルオキシダーゼ反応発色のために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有する。これを、室温で30分間暗所でインキュベートした。この反応を、50μlの4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加によって停止させ、そしてこのプレートを、492nmで読み取り、コントロールとしての690nmにおける吸光度と比較する。

40

【0145】

50

結果を、表3～表6に示す。詳細には、表3は、NS3PI.1165およびNS34aPI.1165対NS34aPIのイムノアッセイ性能の比較の結果を示す。表3に示されるように、プロテアーゼ欠損変異体の両方とも、免疫反応性であり、2倍の量でコーティングした場合、タンパク分解活性を有するNS34aPIコントロール分子の約80～90%の反応性を保持する。表6は、d.4a.t.NS3PI.1165、NS3PI.1165およびNS34aPI.1165対NS34aPIのイムノアッセイ性能の比較の結果を示す。表6で示すように、適切なレベルでコーティングした場合、d.4a.t.NS3PI.1165、NS3PI.1165およびNS34aPI.1165は、NS34aPIの免疫反応性と同等の免疫反応性を示し、d.4a.t.NS3PI.1165は、NS34aPIの免疫反応性と最も近い免疫反応性を示す。

10

## 【0146】

表4および表7から理解され得るように、また、NS3PI.1165、NS34aPI.1165およびd.4a.t.NS3PI.1165は、MEFA 7.1と組み合わせて使用した場合、NS34aPIの反応性と非常に類似した反応性を達成した。

## 【0147】

表5は、MEFA 7.1と組み合わせたアッセイ、もしくはMEFA 7.1と組み合わせないアッセイのどちらかにおける、NS3PI.1165およびd.4a.t.NS3PI.1165対NS34aPIのイムノアッセイ性能の比較の結果を示す。理解され得るように、単独もしくはMEFA 7.1との組み合わせのどちらも、天然NS34aPIの免疫反応性と非常に類似した免疫反応性を達成した。したがって、試験した改変NS3タンパク質の3種全てが、免疫反応性を有した。

20

## 【0148】

これらの3種の改変NS3タンパク質は、ヘリカーゼ活性を有した（データは示さず）が、プロテアーゼ活性は有さなかった。さらに、図13および図14で示すように、改変MS3変異体タンパク質は、NS3プロテアーゼの天然の基質であるMEFA 7.1を切断しなかった。

## 【0149】

発明者らの知識の限り、これはNS3の免疫反応性およびプロテアーゼ活性が分離でき、かつセリンプロテアーゼ活性の削除は、このタンパク質の抗体認識部位に影響しないことの最初の実証である。

30

## 【0150】

(実施例3)

(初期セロコンバージョン検出および市販のアッセイとの比較)

(市販のアッセイ)

C33c抗原およびC200抗原は、非常に免疫反応性であり、そしてこれらの高原に対する抗体は、初期セロコンバージョンパネルにおいて見出される。したがって、イムノアッセイにおけるd.4a.t.NS3PI.1165およびMEFA 7.1、またはNS34aPIおよびMEFA 7.1の性能を、よく性質決定された、HCV感染ヒト血液サンプルの市販のc33cパネルおよびc200パネルを用いて研究して、セロコンバージョン感受性を評価し、そしてこれらの結果を、市販の抗HCV ELISAキットにおいて得られる結果と比較した。特に、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、製造業者の指示書を用いて実施した。ORTHO HCV Version 3.0 ELISA Test System(HCV 3.0)(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、製造業者の指示書を用いて実施した。

40

## 【0151】

結果を、表7に示す。試験するパネルについて、NS34aPIおよびMEFA 7.1、ならびにd.4a.t.NS3PI.1165およびMEFA 7.1は、初期セロ

50

コンバージョンパネルにおいて、c33c型抗体およびc200型抗体を検出した。この検出は、Ortho HCV 3.0およびAbbott Prismアッセイより2～12日間早かった。

【0152】

(表3：MEFA 7.1なしで単独でコーティングしたNS3変異体タンパク質の免疫反応性)

【0153】

【表3】

	NS3 PI.1165				NS34a PI.1165				NS34a PI	
	(90ng)		(180ng)		(90ng)		(180ng)		(90ng)	
	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO
PHV904-1	0.024	0.04	0.027	0.04	0.029	0.05	0.037	0.06	0.034	0.054
PHV904-2	0.023	0.04	0.026	0.04	0.033	0.05	0.037	0.06	0.024	0.038
PHV904-3	0.523	0.85	0.785	1.28	0.904	1.47	1.041	1.68	1.590	2.560
PHV904-4	1.002	1.64	1.785	2.90	3.020	4.91	3.211	5.19	3.435	5.532
PHV904-5	1.521	2.49	2.720	4.42	3.528	5.74	3.559	5.75	3.547	5.711
PHV904-6	2.076	3.39	3.210	5.22	3.569	5.90	3.582	5.79	3.533	5.689
PHV904-7	2.466	4.03	3.903	6.35	3.874	6.30	3.874	6.26	3.874	6.238
PHV913-1	0.012	0.02	0.013	0.02	0.020	0.03	0.026	0.04	0.025	0.041
PHV913-2	0.013	0.02	0.013	0.02	0.016	0.03	0.022	0.04	0.023	0.037
PHV913-3	0.044	0.07	0.057	0.09	0.033	0.05	0.053	0.09	0.057	0.092
PHV913-4	0.182	0.30	0.260	0.42	0.145	0.23	0.175	0.28	0.346	0.557
PHV914-1	0.012	0.02	0.011	0.02	0.014	0.02	0.023	0.04	0.020	0.032
PHV914-2	0.012	0.02	0.014	0.02	0.016	0.03	0.018	0.03	0.018	0.029
PHV914-3	0.056	0.09	0.085	0.14	0.018	0.03	0.021	0.03	0.086	0.139
PHV914-4	0.388	0.63	0.606	0.99	0.163	0.27	0.268	0.43	1.732	2.789
PHV914-5	0.606	0.99	1.040	1.69	0.728	1.18	1.164	1.88	3.098	4.989
PHV914-6	0.687	1.12	1.186	1.93	0.722	1.17	1.507	2.44	3.314	5.337
PHV914-7	0.974	1.59	1.536	2.50	2.565	4.17	3.122	5.04	3.442	5.542
PHV914-8	1.550	2.53	2.510	4.08	3.416	5.55	3.474	5.61	3.453	5.560
PHV914-9	2.122	3.47	3.098	5.04	3.480	5.66	3.494	5.64	3.486	5.614

(表4：MEFA 7.1と共にコーティングしたNS3変異体タンパク質の免疫反応性)

【0154】

10

20

30

【表4】

	MEFA 7.1 75ng		MEFA 7.1 75ng		MEFA 7.1 75ng	
	NS34aPI 90ng		NS3PI 1165 180		NS34aPI 1165 180ng	
	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO
PHV904	0.02	0.0	0.02	0.0	0.04	0.0
PHV904	0.02	0.0	0.02	0.0	0.04	0.0
PHV904	0.78	1.2	1.18	1.9	1.02	1.6
PHV904	2.40	3.9	3.29	5.3	3.49	5.5
PHV904	3.27	5.3	3.55	5.7	3.61	5.7
PHV904	3.43	5.6	3.57	5.8	3.63	5.8
PHV904	3.89	6.3	3.88	6.3	3.85	6.1
PHV913	0.04	0.0	0.02	0.0	0.04	0.0
PHV913	0.27	0.4	0.10	0.1	0.22	0.3
PHV913	1.26	2.0	0.60	0.9	1.39	2.2
PHV913	1.40	2.3	0.85	1.3	1.76	2.8
PHV914	0.01	0.0	0.01	0.0	0.02	0.0
PHV914	0.01	0.0	0.01	0.0	0.02	0.0
PHV914	0.02	0.0	0.07	0.1	0.02	0.0
PHV914	0.42	0.7	0.97	1.5	0.29	0.4
PHV914	1.26	2.0	2.31	3.7	1.63	2.6
PHV914	1.50	2.4	2.42	3.9	2.10	3.3
PHV914	2.33	3.8	3.04	4.9	3.42	5.4
PHV914	3.30	5.4	3.43	5.5	3.53	5.6
PHV914	3.38	5.5	3.47	5.6	3.55	5.6

10

20

(表5: MEFA 7.1と共に(左のパネル)もしくはMEFA 7.1なしで(右のパネル)コーティングしたNS3変異体タンパク質の免疫反応性)

【0155】

【表5】

	MEFA 7.1と組み合わせた NS34aPI および NS3 変異体						NS34aPI および変異体のみ					
	NS34aPI & MEFA 7.1		NS3PI 1165 & MEFA 7.1		4A1 NS3 & MEFA 7.1		NS34aPI		NS3PI 1165		4A1 NS3 (S1185 A)	
	(90ng)	(75ng)	(360ng)	(75ng)	(180ng)	(75ng)	90ng	360ng	180ng	180ng	180ng	180ng
	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO
PHV904-1	-0.008	-0.01	0.002	0.00	0.029	0.05	0.120	0.19	0.021	0.03	0.059	0.09
PHV904-2	-0.007	-0.01	0.006	0.01	0.022	0.04	0.018	0.03	0.100	0.16	0.054	0.09
PHV904-3	2.075	3.40	0.833	1.37	1.485	2.76	1.853	2.98	1.784	2.76	1.779	2.81
PHV904-4	3.090	5.06	1.753	2.87	2.930	4.85	3.015	4.85	3.127	4.83	3.150	4.97
PHV904-5	3.263	5.34	2.820	4.62	3.374	5.59	3.169	5.10	3.472	5.37	3.474	5.48
PHV904-6	3.405	5.57	3.297	5.40	3.459	5.73	3.388	5.46	3.483	5.38	3.537	5.58
PHV904-7	3.854	6.31	3.860	6.33	3.857	6.38	3.907	6.29	3.881	6.00	3.881	6.12
PHV913-1	0.009	0.01	0.010	0.02	0.004	0.01	0.016	0.03	0.007	0.01	0.019	0.03
PHV913-2	0.124	0.20	0.028	0.05	0.091	0.15	0.017	0.03	0.009	0.01	0.024	0.04
PHV913-3	0.739	1.21	0.240	0.39	0.522	0.86	0.115	0.19	0.099	0.15	0.072	0.11
PHV913-4	1.186	1.94	0.297	0.49	0.724	1.20	0.600	0.97	0.517	0.80	0.465	0.73
PHV914-1	0.001	0.00	-0.004	-0.01	-0.004	-0.01	0.026	0.04	0.006	0.01	0.023	0.04
PHV914-2	0.005	0.01	-0.014	-0.02	0.001	0.00	0.023	0.04	0.010	0.02	0.018	0.03
PHV914-3	0.323	0.53	0.032	0.05	0.069	0.11	0.151	0.24	0.109	0.17	0.104	0.16
PHV914-4	1.870	3.06	0.410	0.67	1.157	1.92	1.389	2.24	1.502	2.32	1.225	1.93
PHV914-5	2.889	4.73	1.013	1.66	2.615	4.33	2.444	3.93	2.832	4.38	2.820	4.45
PHV914-6	2.941	4.81	1.158	1.90	2.567	4.25	2.365	3.81	2.751	4.25	2.863	4.52
PHV914-7	3.227	5.28	2.008	3.29	3.165	5.24	2.728	4.39	3.377	5.22	3.221	5.08
PHV914-8	3.327	5.44	3.014	4.94	3.327	5.51	3.285	5.29	3.368	5.21	3.429	5.41
PHV914-9	3.282	5.37	3.012	4.94	3.364	5.57	3.327	5.36	3.348	5.17	3.392	5.35

30

40

(表6: 単独でコーティングしたNS3/4aPIのアッセイ性能)

【0156】

【表 6】

BBI ID	NS3/4a PI		4a.LNS3 PI (S1165 A)		NS3 PI (S1165 A)		NS3/4a PI (S1165 A)													
	シグナル	S/C	シグナル	S/C	シグナル	S/C	シグナル	S/C												
PHV904-1	0.120	0.19	0.027	0.04	0.059	0.09	0.046	0.07	0.034	0.05	0.042	0.07	0.021	0.03	0.036	0.06	0.032	0.05	0.041	0.06
PHV904-2	0.018	0.03	0.060	0.10	0.054	0.09	0.071	0.11	0.027	0.04	0.033	0.05	0.100	0.16	0.030	0.05	0.033	0.05	0.038	0.06
PHV904-3	1.853	1.065	1.983	1.63	1.779	2.81	2.055	3.129	0.957	1.53	2.202	3.52	1.784	2.276	0.880	1.41	1.247	1.97	1.709	2.67
PHV904-4	3.015	4.85	2.854	3.22	3.150	4.97	3.496	5.159	1.430	2.19	2.928	4.69	3.127	4.83	2.480	3.96	3.096	4.90	3.298	5.16
PHV904-5	3.169	5.10	2.854	4.63	3.474	5.48	3.552	5.68	1.796	2.79	3.191	5.11	3.472	5.37	2.998	4.81	3.411	5.40	3.496	5.47
PHV904-6	3.388	5.46	3.133	5.09	3.537	5.58	3.575	5.72	1.796	2.87	3.191	5.11	3.483	5.38	3.190	5.12	3.450	5.46	3.494	5.47
PHV904-7	3.907	6.29	3.899	6.33	3.881	6.12	3.881	6.21	2.004	3.21	3.906	6.25	3.881	6.09	3.906	6.27	3.892	5.16	3.881	6.07
PHV913-1	0.016	0.03	0.007	0.01	0.019	0.03	0.023	0.04	0.030	0.05	0.011	0.02	0.007	0.01	0.026	0.04	0.025	0.04	0.042	0.07
PHV913-2	0.017	0.03	0.017	0.03	0.024	0.04	0.014	0.02	0.012	0.02	0.013	0.02	0.009	0.01	0.018	0.03	0.025	0.04	0.041	0.06
PHV913-3	0.115	0.19	0.081	0.13	0.072	0.11	0.094	0.15	0.063	0.10	0.058	0.09	0.099	0.15	0.053	0.09	0.070	0.11	0.093	0.14
PHV913-4	0.600	0.97	0.339	0.55	0.465	0.73	0.677	1.08	0.237	0.38	0.376	0.60	0.517	0.80	0.211	0.34	0.323	0.51	0.394	0.62
PHV914-1	0.026	0.04	0.015	0.02	0.023	0.04	0.026	0.04	0.010	0.02	0.014	0.02	0.006	0.01	0.024	0.04	0.014	0.02	0.015	0.02
PHV914-2	0.023	0.04	0.012	0.02	0.018	0.03	0.028	0.04	0.017	0.03	0.015	0.02	0.010	0.02	0.014	0.02	0.019	0.03	0.013	0.02
PHV914-3	0.151	0.24	0.077	0.13	0.104	0.16	0.175	0.28	0.067	0.11	0.095	0.15	0.109	0.17	0.024	0.04	0.025	0.04	0.043	0.07
PHV914-4	1.389	2.24	0.782	1.27	1.225	1.93	2.306	3.69	0.432	0.69	0.895	1.43	1.502	2.32	0.209	0.34	0.418	0.66	0.717	1.12
PHV914-5	2.444	3.93	1.540	2.60	2.820	4.45	3.424	5.48	0.733	1.17	1.592	2.55	2.832	4.38	0.836	1.34	1.575	2.48	2.257	3.53
PHV914-6	2.365	3.81	1.593	2.59	2.863	4.32	3.455	5.53	0.744	1.19	1.779	2.85	2.751	4.25	1.113	1.79	2.068	3.21	2.602	4.07
PHV914-7	2.728	4.39	1.994	3.24	3.221	5.08	3.505	5.61	0.936	1.50	2.053	3.29	3.377	5.22	2.175	3.49	3.091	4.89	3.262	5.10
PHV914-8	3.285	5.29	2.681	4.35	3.429	5.41	3.487	5.58	1.446	2.31	2.897	4.63	3.368	5.23	3.251	5.22	3.428	5.42	3.456	5.41
PHV914-9	3.327	5.36	2.782	4.52	3.392	5.35	3.461	5.54	1.525	2.44	3.038	4.86	3.348	5.17	3.258	5.23	3.463	5.48	3.476	5.44

10

20

30

(表 7 : アッセイ性能 : より初期のセロコンバージョン検出)

【 0 1 5 7 】

40

【表 7】

BBI ID	NS3/4a PI & MEFA 7.1		4a.t.NS3 PI (S1165A) & MEFA 7.1		Field Data		Prism より 先んじた日数
	(90ng)	(75ng)	(180ng)	(75ng)	HCV 3.0	Prism	
	シグナル	S/CO	シグナル	S/CO	s/co	s/co	
PHV904-1	-0.008	-0.01	0.029	0.05			
PHV904-2	-0.007	-0.01	0.022	0.04			
PHV904-3	2.075	3.40	1.485	2.46			
PHV904-4	3.090	5.06	2.930	4.85			
PHV904-5	3.263	5.34	3.374	5.59			
PHV904-6	3.405	5.57	3.459	5.73			
PHV904-7	3.854	6.31	3.857	6.33			
PHV913-1	0.009	0.01	0.004	0.01	0.01	0.08	
PHV913-2	0.124	0.20	0.091	0.15	0.02	0.10	> 2 日間
PHV913-3	0.739	1.21	0.522	0.86	0.43	0.50	
PHV913-4	1.186	1.94	0.724	1.20	0.54	0.59	
PHV914-1	0.001	0.00	-0.004	-0.01	0.00	0.06	
PHV914-2	0.005	0.01	0.001	0.00	0.01	0.06	
PHV914-3	0.323	0.53	0.069	0.11	0.01	0.06	
PHV914-4	1.870	3.06	1.157	1.92	0.04	0.09	> 12 日間
PHV914-5	2.889	4.73	2.615	4.33	0.33	0.47	
PHV914-6	2.941	4.81	2.567	4.25	0.82	0.90	
PHV914-7	3.227	5.28	3.165	5.24	3.10	2.41	
PHV914-8	3.327	5.44	3.327	5.51	4.85	4.09	
PHV914-9	3.282	5.37	3.364	5.57	4.85	4.52	

10

20

(表 8 : アッセイ性能 : 遺伝子型希釈感受性)

【 0 1 5 8 】

【表 8】

遺伝子型	希釈	NS3NS4a PI	MEFA 7.1	MEFA 7.1 + NS3NS4a PI	Ortho HCV 3:0	Monolisa Ver.2 Pasteur
		O.D.	O.D.	O.D.	O.D.	O.D.
1b	1:5000	2.929	1.396	2.074	0.393	0.218
	1:10000	2.506	0.826	1.099	0.159	0.084
	1:20000	1.78	0.355	0.403	0.045	0.028
2a/c	1:2500			1.952	0.467	1.653
	1:5000	1.868	0.717	0.917	0.136	0.782
	1:10000	0.863	0.312	0.395	0.049	0.286
2b	1:2500	ND	ND	1.430	0.295	0.658
	1:5000	ND	ND	0.551	0.108	0.207
	1:10000	ND	ND	0.225	0.032	0.061
3a	1:2500			2.580	0.514	0.941
	1:5000	2.879	0.964	1.622	0.218	0.353
	1:10000	1.676	0.432	0.873	0.067	0.164
4a	1:20000	0.864	0.165	0.398	0.023	0.050
	1:2500			2.831	0.632	0.462
	1:5000	2.4	0.824	1.752	0.193	0.181
5a	1:10000	1.169	0.265	0.717	0.069	0.076
	1:5000	2.889	1.763	2.744	0.827	0.988
	1:10000	2.317	1.036	1.587	0.316	0.395
6	1:20000	1.315	0.416	0.726	0.097	0.120
	1:100	3.406	2.872	3.602	3.594	ND
	1:1000	2.978	2.455	3.224	2.863	ND
1:10000	2.841	0.984	1.192	0.380	ND	
1:20000	2.262	0.509				

30

40

したがって、検出アッセイにおける改変 HCV NS3 タンパク質およびその使用を、開示した。上記から、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、本発明の精神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

50

解される。

【図面の簡単な説明】

【0159】

【図1】図1は、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、HCVゲノムの図示である。

【図2】図2は、本発明に従う改変NS3ポリペプチドを用いる代表的なイムノアッセイの概略図である。ここで、HCV抗原は、固体支持体上に固定化されている。

【図3】図3（配列番号7および配列番号8）は、代表的な天然の非改変NS3タンパク質ドメインのDNAおよび対応するアミノ酸配列を示す。

【図4】図4A～図4Cは、本発明に従う変異体NS3タンパク質の概略図である。図4A～図4Cにおいて、通常1165位に存在するSerは、Alaと置換されている。さらに、図4A～図4Cにおいて示される全ての変異体は、通常1428位に存在するThrに対するProの置換、および通常1429位に存在するSerに対するIleの置換を含む。図4Aにおいて、このタンパク質は、N末端からC末端への方

10

向で、N末端Met、NS3の1027～1657のアミノ酸およびNS4aの1658～1711のアミノ酸を含み、従って、HCVポリタンパク質の全長のNS3ドメインおよびNS4aドメインを含む。図4Bにおいて、このタンパク質は、N末端からC末端への方

20

向で、N末端Met、NS4aの1678～1690のアミノ酸、その後配列Ser-Gly-Ser、次いでNS3の1029～1657のアミノ酸を含む。

【図5】図5A～図5C（配列番号1および配列番号2）は、図4Aからのタンパク質（「NS34aPI.1165」と呼ばれる）のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。

【図6】図6A～図6C（配列番号3および配列番号4）は、図4Bからのタンパク質（「NS3PI.1165」と呼ばれる）のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。

【図7】図7A～図7C（配列番号5および配列番号6）は、図4Cからのタンパク質（「d.4a.t.NS3PI.1165」と呼ばれる）のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。

30

【図8】図8は、MEFA 7.1の概略図である。

【図9】図9A～図9F（配列番号9および配列番号10）は、MEFA 7.1のDNAおよび対応するアミノ酸配列を示す。

【図10】図10は、pd.HCV1a.ns3ns4aPIの構造の図である。

【図11】図11A～図11Cは、本発明の医務のアッセイでの使用のための代表的なMEFAを示す。図11Aは、MEFA 3の概略図である。図11Bは、MEFA 5の概略図である。図11Cは、MEFA 6の概略図である。

【図12】図12は、改変NS3ポリペプチドおよびストレプトアビジンコーティングした固体支持体を用いる、代表的なイムノアッセイ形式の概略図である。

【図13】図13は、NS3変異体タンパク質は自己加水分解を受けず、MEFA 7.1を切断しないことを示す、クーマシー染色したSDS-PAGEゲルの図である。レーン1：NS34aPI；レーン2：NS34aPI.1165；レーン3：NS3PI.1165；レーン4：NS34aPI+MEFA 7.1、時間=0；レーン5：NS34aPI+MEFA 7.1、時間=40分間；レーン6：NS34aPI+MEFA 7.1、時間=2時間；レーン7：NS34aPI.1165+MEFA 7.1、時間=0；レーン8：NS34aPI.1165+MEFA 7.1、時間=40分間；レーン9：NS34aPI.1165+MEFA 7.1、時間=2時間；レーン10：NS3PI.1165+MEFA 7.1、時間=0；レーン11：NS3PI.1165+MEFA 7.1、時間=40分間；レーン12：NS3PI.1165+MEFA 7.1、時間=2時間；レーン13：MEFA 7.1。

40

50

【図14】図14は、MEFA 7.1に対する一次抗体として抗SODを用い、そして二次抗体として抗マウス-HRPを用いたウエスタンブロットの図であり、NS3タンパク質は、自己加水分解を受けず、MEFA 7.1を切断しないことを示す。レーン1：NS34aPI；レーン2：NS34aPI.1165；レーン3：NS3PI.1165；レーン4：NS34aPI+MEFA 7.1、時間=0；レーン5：NS34aPI+MEFA 7.1、時間=40分；レーン6：NS34aPI+MEFA 7.1、時間=2時間；レーン7：NS34aPI.1165+MEFA 7.1、時間=0；レーン8：NS34aPI.1165+MEFA 7.1、時間=40分；レーン9：NS34aPI.1165+MEFA 7.1、時間=2時間；レーン10：NS3PI.1165+MEFA 7.1、時間=0；レーン11：NS3PI.1165+MEFA 7.1、時間=40分；レーン12：NS3PI.1165+MEFA 7.1、時間=2時間；レーン13：MEFA 7.1。

10

HCV 遺伝子および組換えタンパク質

【図1】

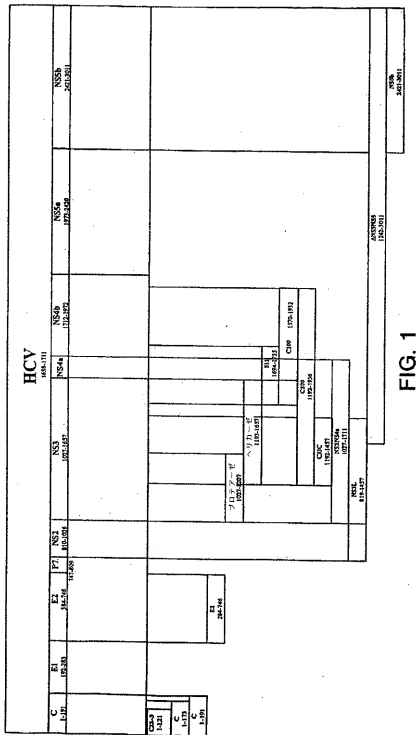


FIG. 1

【図2】

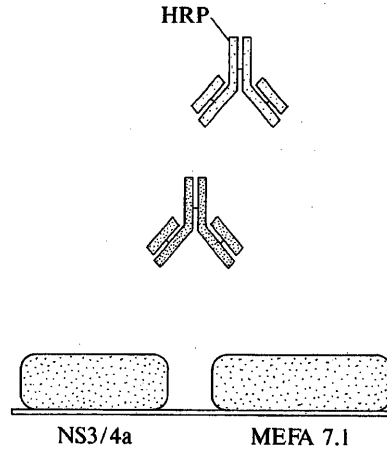


FIG. 2

【 図 3 】

```

1      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
LCA AGG GGC CTC CTA GGG TGC ATA CTA ACT GGC CAG

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

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

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

60     F V I Q K Y T N V D Q D L V G
ACT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CRA GAC CTT GTG GGC

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

80     G S S D L Y L V T R H A D V I
AGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAG GCC GAT GTC ATT

90     P V R R R G D S E R G S L L S P
CCC GTG CCG CCG GGT GAT AGC AGG GCG CTG CTG TCG CCC

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

110    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

120    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

130    L E T T M R S
CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC

```

FIG. 3

【 図 5 A 】

```

1      M A P I T A Y A Q Q T R G L L
ATG GCG CCC ATC ACG GCG TAC GCC CAG ACA AGG GGC CTC CTA

20     G C I I T S L T G R D K N Q V E G E V Q
GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GCG GAG CAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG

30     I V S T R A Q T F L A T C I N G V C W T
ATT GTG TCA ACT GCT GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGG GTG TGC TGG ACT

40     V Y H G A G T R T I A S P K G F V I Q M
GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT CCT GTC ATC CAG ATG

50     Y T N V D Q D L V G M P A P Q G S R S L
TAT ACC AAT GTA GAC CRA GAC CTT GTG GCG TGG CCC GCT CCG CRA GGT AGC CGA TCA TTG

60     T P C T C G S S D L Y L V T R H A D V I
ACA CCC TGC ACT TGC GGC TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAG GCC GAT GTC ATT

70     P V R R R G D S E R G S L L S P R P I S Y
CCC GTG CCG CCG GGT GAT AGC AGG GCG CTG CTG TCG CCC CCG CCG ATT TCC TAC

80     L K G S A G G P L L C P A G H R A V G I F
TTG AAA GGC TCC GCA GGG GGT CCG CTG TTG TCG CCC GCG GGG CRA GCC GTG GGC ATA TTT

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

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

110    Q S F Q V A H L H A P T G S G K S T K V
CAG ASC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC

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

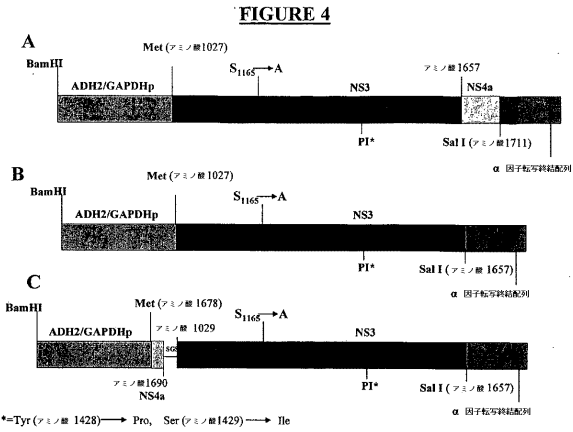
130    T L G F G A Y M S K K A H G I D P N I R T
ACA CTC GCG TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC

140    G V R T I T A G S P I T Y S T Y G K F L
GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT

```

FIG. 5A

【 図 4 】



【 図 5 B 】

```

280    A D G P C T G U S O S / 8 0 3 2 5
GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

290    D I I I C D E C H S
ACG GAT GGC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CRA CAG GAG ACT CCG GGG

300    T D A T S I L G I G T V L D Q A E T A G
ACG GAT GGC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CRA CAG GAG ACT CCG GGG

310    A R L V L A T A T P P G S V I V P H P
GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC

320    A R L V L A T A T P P G S V I V P H P
GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC

330    N I E E V A L S T T G E I P F Y G K A I
ARC ATC GAG GAG GTT CGT GTC TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

340    P L E V I K G G R H L I F C H S K K R C
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG ARA CAT CTC ATC TTC TGT CMT TCA AAG AAG AAG TGC

350    D E L A A K L V A L G I N A V A Y Y R G
GAC GAA CTC GGC GCA AAG CTC GCG GCA TTG GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CCG GGT

360    L D V S V I P P I G D V V V V A T D A L
CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG CCG ATC GGC GAT GTT GTC CTG GTG GCA ACC GAT GCC CTC

370    M T G Y T G D F D S V I D C N T C V T Q
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT CTC ACC CAG

380    T V D F S L D P T F T I E T I T L P Q D
ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAG CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT

390    A V S R T Q R R G R T G R G K P G I Y R
GCT GTC TCC CCG ACT CAA CGT GCG GGC AGG ACT GGC AAG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA

400    F V A P G E R P S G M F D S S V L C E C
TTT GTG GCA CCG GGG GAG CCG CCG TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC TGT GAG TGC

410    Y D A G C A W Y E L T P A E T T V R L R
TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC GCG GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA

420    A Y M N T P G L P V C Q D H L E F W E G
GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG CTT CCG GTG TGC CAG CAG GAT CTT GAA TTT TGG GAG GCG

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

440    E N L P Y L V A Y Q A T V C A R A Q A P
GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CRA GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CRA GCC CCT

```

FIG. 5B

【 5 C 】

580 590  
 P P S P E T U S O S E / R O S E S L I R L K P T L H G  
 CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG TGG ARG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG  
 600 610  
 P T P L L Y R L G A V Q N E I T L T H P  
 CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG ACG CAC CCA  
 620 630  
 V T K Y I M T C M S A D L E V V T S T W  
 GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC CTG GAG GTC ACG AGC ACC TGG  
 640 650  
 V L V G G V L A A L A A Y C L S T G C V  
 GTG CTC GTT GGC GGC GTC CTG GCT TTG GGC GCG TAT TGC CTG TCA ACA GGC TGC GTG  
 660 670  
 V I V G R V V L S G K P A I I P D R E V  
 GTC ATA GTG GGC AGG GTC CTC TTG TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA GTC  
 680 686  
 L Y R E F D E M E E C O P  
 CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TGA

FIG. 5C

【 6 A 】

1 10  
 M A P I T A Y A Q Q T R G L L  
 ATG GCC CCA ATC ACT GCT TAC GCT CAA CAA ACC AGA GGC CTC CTA  
 20 30  
 G C I I T S L T G R D K N Q V E G E V O  
 GGG TGC ATA ATC ACC AGC CTA ACT GGC CCG GAA AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG  
 40 50  
 I V S T A A Q T F L A T C I N G V C W T  
 ATT GTG TCA ACT GCT GCC CAA ACC TTC CTG GCA ACG TGC ATC AAT GGC GTG TGC TGG ACT  
 60 70  
 V Y H G G T R T I A S P F K G P V I Q H  
 GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GGC TCA CCC AAG GGT CCT GTC ATC CAG ATG  
 80 90  
 Y T N V D Q D L V G W P A P Q G S R S L  
 TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC TGG CCC COT GCG CAA GGT AGC CGA TCA TTG  
 100 110  
 T P C T G S S D L Y L V T R H A D V I  
 ACA CCC TGC ACT TGC 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 R P I S Y  
 CCC GTG CCG CCG GGT GAT AGC AGG GGC ACC CTG GTC TCG CCC CCG CCC ATT TCC TAC  
 140 150  
 L K G S A G G P L L C P A G H A V G I F  
 TTG AAA GGC TCC GCA GGG GGT CCG CTG TTG TCC CCC GGC GGC CAC GTC GGC GAT TTT  
 160 170  
 R A A V C T R G V A K A V D F I P V E N  
 AGG GCC GCG GTG TGC ACC CGT GGA GTG GCT AAG GCG GTC GAT TTT ATC CCT GTG GAG AAC  
 180 190  
 L E T T H R S F V F T D N S S P P V V F  
 CTA GAG ACA ACC ATG AAG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA GTA GTG CCG  
 200 210  
 Q S F Q V A H L H A P T G S G K S T K V  
 CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG TTC  
 220 230  
 P A A Y A A Q G Y K V L V L N P S V A A  
 CCG GCT GCA TAT GCA GGT CAG GCG 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 P N I R T  
 ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC ATC AAG ACC  
 260 270  
 G V R T I T T G S P I T Y S T Y G K F L  
 GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT

FIG. 6A

【 6 B 】

280 290  
 A D G G P E T U S O S E / R O S E S D I I I C D E C H S  
 GCC GAC GGC GGG TGC 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 A E T A G  
 ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG ACT GCG GGG  
 320 330  
 A R L V V L A T A T P P G S V T V P H P  
 GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC SCC ACC CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC  
 340 350  
 N I E E V A L S T T G E I P F Y G K A I  
 AAC ATC GAG GAG GTT 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 S K K K C  
 CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG AAG AAG TTC  
 380 390  
 D E L A A K L V R L G I M A V A Y Y R G  
 GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC AAT GCC GTG GGC TAC TAC CCG GGT  
 400 410  
 L D V S V I P F I G D V V V A T D A L  
 CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GTC GCA ACC GAT GCC CTC  
 420 430  
 M T G Y T G D F D S V I D C N T C V T Q  
 ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT GTC ACC CAG  
 440 450  
 T V D F S L D P T F T I E T I T L P Q D  
 ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT  
 460 470  
 A V S R T Q R R G R T G R G K P G I Y R  
 GCT GTC TCC CCG ACT CAA COT CGG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA  
 480 490  
 F V A P G E R F S G M F D S S V L C E C  
 TTT GTG GCA CCG GGG GAG CSC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC TGT GAG TGC  
 500 510  
 Y D A G C A W Y E L T P A E T V R L R  
 TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CCA  
 520 530  
 A Y M N T P G L P V C Q D H L E F W E G  
 GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG CTT CCC GTC 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 T K Q S G  
 GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG CAG AGT GGG  
 560 570  
 E N L P Y L V A Y Q A T V C A R A Q A P  
 GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA GCC ACC GTG TGC GCT AAG GCT CAA GCC CCT

FIG. 6B

【 6 C 】

580 590  
 P P S P E T U S O S E / R O S E S L I R L K P T L H G  
 CCC CCA TCG TGG GAC CAG ATG TGG ARG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG  
 600 610  
 P T P L L Y R L G A V Q N E I T L T H P  
 CCA ACA CCC CTG CTA TAC AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG ACG CAC CCA  
 620 630  
 V T K Y I M T C M S A D L E V V T S T W  
 GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACG TGA

FIG. 6C

【図7A】

1 10 M G C V V I V G R V V L S G S  
 ATG GGC TGC GTG GTC ATA GTG GGC AGG GTC GTG TTC GGT TCC

20 30 G S I T A Y A Q Q T R G L L G C I I T S  
 GGT TCC ATC ACT GCT TAC GCT CAA CAA ACC AGA GGC CTC CTA GGG TGC ATA ATC ACC AGC

40 50 L T G R D K N Q V E G E V Q I V S T A A  
 CTA ACT GGC GGC AAA AAC CAA GTG GAG GGT GAG GTC CAG ATT GTG TCA ACT GCT GGC

60 70 Q T F L A T C I N G V C H T V Y H G A G  
 CAA ACC TTC CTC GCA ACG TGC ATC AAT GGG GGC TGC TGG ACT GTC TAC CAC GGG GCC GGA

80 90 T R T I A S P K G P V I Q M Y T N V D Q  
 ACC AGG ACC ATC GGG TCA CCC AAG GGT CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA

100 110 D L V G W P A P Q G S R S L T P C T C G  
 GAC CTT GTG GGC TGG CCC GCT CCG CCA GGT AGC CGA TCA TTG ACA CCC TGC ACT TGC GGC

120 130 S S D L Y L V T R H A D V I P V R R R G  
 TCC TCG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT CCC GTG GCG CGG GGT

140 150 D S R G S L L S P R P I S Y L K G S A G  
 GAT ACG AGG GGC AGC CTG CTG CCG CCC ACC ATT TGC TAC TGC AAA GGC TCC GCA GGG

160 170 G P L L C P A G H A V G I F R A A V C T  
 GGT CCG CTG TTG TGC CCC GCG GGC CAC GCC GTG GGC ATA TTT AGS GCC GCG GTG TGC ACC

180 190 R G V A K A V D F I P V E N L E T T M R  
 CCT GGA GTG GCT AAG GCG GTC GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAG CTA GAG ACA ACC ATG AGG

200 210 S P V F T D N S S P P V V P Q S F Q V A  
 TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT

220 230 H L H A F T G S G K S T K V F A A Y A A  
 CAC CTC CAT GCT CCC ACA GGC GTC AAG GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT

240 250 Q G Y K V L V L N P S V A A T L G F G A  
 CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GGT GCT GCA ACA CTG GGC TTT GGT GCT

260 270 Y M S K R H G I D P N I R T G V R T I T  
 TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGC ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC

FIG. 7A

【図7B】

280 290 T G S P E T R U S O S / S O S E S G K F L A D G G C S  
 ACT GGC AGC CCC ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGC TGC TGG

300 310 G G A Y D I I I C D E C H S T D A T S I  
 GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACC GAT GCC ACA TCC ATC

320 330 L G I G T V L D Q A E T A G A R L V V L  
 TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA CCA GAG ACT GGG GGG CCG AGA CTG GTT GTG CTC

340 350 A T A T P P G S V T V P H P N I E E V A  
 GCC ACC GCC ACC CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT GCC ACC GAT GCC ACA TCC ATC

360 370 L S T T G E I P F Y G K A I F L E V I K  
 CTC TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC GAA GTA ATC AAG

380 390 G G R H L I F C H S K K K C D E L A A K  
 GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG AAG TGC CCG GAC GAC GGC GGT GCA AAG

400 410 L V A L G I N A V A Y Y R G L D V S V I  
 CTG GTC GCA TTG GGC ATC AAT GCC GTG GGC TAC TAC GGC GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC

420 430 P P I G D V V V V A T D A L M T G Y T G  
 CCG CCC ATC GGC GAT GTT GTC GTC GCA ACC GAT GCC ATC ACC GGC TAT ACC GCT

440 450 D F D S V I D C N T C V T Q T V D F S L  
 GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT

460 470 D P T F T I E T I T L P Q D A V S R T Q  
 GGC CCT ACC TTC ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CCA GAT GCT GTC TCC GCG TAT CCA

480 490 R R G R T G R G K P G I Y R F V A P G E  
 CGT GCG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG GCA CCG GGG GAG

500 510 R P S G H F D S S V L C E C Y D A G C A  
 CCG CCC TCC GGC ATG TTC GAG TCG TCC GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT

520 530 W Y E L T P A E T T V R L R A Y N N T F  
 TGT TAT GAG CTC ACG CCC GCG ACT ACA GTT AGC GTA OGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG

540 550 G L P V C Q D H L E F W E G C V F T G L T  
 GGC CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC CTT TTT ACA GGC CTC ACT

560 570 H I D A H F L S Q T K Q S G E N L P Y L  
 CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG CAG AGT GGG GAG AAG CTT CCT TAC CTG

FIG. 7B

【図7C】

580 590 V A Y P E T R U S O S / S O S E S A Q A P P P S W D Q  
 GTA GCG TAC CAA GCC ACC CTG TGC GCT AGG GGT CAA GCC CCT CCC CCA TCG TGG GAC CAG

600 610 M N K C L I R L K P T L H G P T P L L Y  
 ATG TGG AAG TGT TTG ATT GCG CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGG CCA ACA CCC CTG CTA TAC

620 630 R L G A V Q N E I T L T H P V T K Y I H  
 AGA CTG GGC GCT GTT CAG AAT GAA ATC ACC CTG ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG

640 646 T C N S A B L E V V T O P  
 ACA TGC ATG TCG GCC GAC CTG GAG GTC GTC ACC TCA

FIG. 7C

【図8】

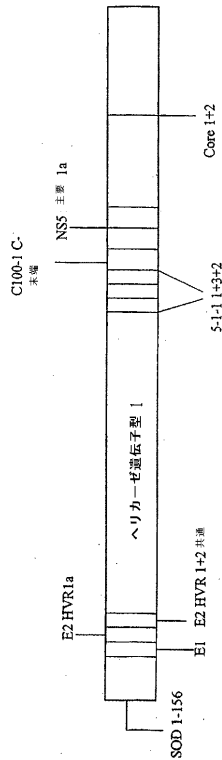


FIG. 8

【 9 A 】

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

20 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

40 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

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

70 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

80 K D E E R H V G D L G N V T A  
 AAG GAT GAA GAG AGC CAT GTT GGA GAT TTG GGC AAT GTG ACT GCT

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

110 S L S G D H C I I G R T L V I  
 TCA CTC TCA GGA GAC CAT TCC ATT GGC GGC ACA CTG GTG GTC

130 H E K A D D L G K G N E E S  
 CAT GAA AAA CCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT

140 T K T G H A G S R L A C G V S  
 ACA AAG ACA GGA AGC OCT GCA AGT ATG GCA TGG ACT TGT GTA ATT

160 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

170 P G H I T G H R M A N K L G S  
 CCC GGC CAT ATA ACG OCT GCA CCG ATG GCA TGG AAG CTT GGT TCC

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

FIG. 9A

【 9 B 】

200 A K Q N E T H V T G G A A A R 210  
 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 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 V V P Q S P Q V A H L H A P T 270  
 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 G Y X V L V L N P S V A A T L 300  
 GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTS

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

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

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

350 G A Y D I I I C D E C H S T D 360  
 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 AAT GGC ACT GTC CTT GAC CAA GCA GAG

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

FIG. 9B

【 9 C 】

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 CTC

410 S T T G E I P F Y G K A I P L 420  
 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 GGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG

440 K K C D E L A A K L V A L G I 450  
 AAG AAG TCC 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 CCG GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG

470 T S G D V V V A T D A L M T 480  
 ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC 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 CTG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT

500 V T Q T V D F S L D P T F T I 510  
 GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AAG CTT GAC GCT 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 CCG ACT CAA GGT

530 R G R T G R G K P G I Y R F V 540  
 CCG GGC AGG ACT GGC AAG 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 GGC CCC TCC GCG ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC

560 C E C Y D A G C A N Y E L T P 570  
 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 AAG CTA CCA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG

FIG. 9C

【 9 D 】

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

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

620 Q S G E N L P Y L V A Y Q A T 630  
 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 S W D Q M  
 GTG TCC SCT AAG 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 660  
 TGG AAG TGT TTG ATT GCG 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 N T C N S A D 690  
 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 ACG 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 720  
 CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CAA 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 750  
 GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CCA 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 CAC TAC GAT

770 E M E E C S Q R A P Y I E O A 780  
 GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT

FIG. 9D

【 9 E 】

```

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

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

820
R 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 ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA

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

860
G A V Q W M N R L I A F A S E
GGG GCA GTG CAG TGG ATG AAC CCG 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 ACC CAC TAC GTT CCG TCT AAG TCC CGG

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

910
P P L V E T W K K P D Y R 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 T
GTG GTC CAC GGC AGA TCT TCT CCG 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 CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG

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

970
K R N T H R R P Q D V K F P G
AAA CTT AAC ACC AAC CCG CCG CCG GAC GTC AAG TTC CCG GGT
    
```

FIG. 9E

【 9 F 】

```

G G Q I V G R R G G G P P I P K A 990
GGC GGT CAG ATC GTT GGT CCG 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 CCG 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 CCG 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 COT AAC ACC

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

1050
V G R R G P P I P K A R R P E
GTT GGT CCG AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT COT CCG CCC GAG

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

1090
N K D R R S T G K S H G K P G
AAT AAG GAC AGA CCG TCT ACC GGT AAG TCC TGG GGT AAG CCA GCG

1099
Y P W
TAT CCT TGG CCC
    
```

FIG. 9F

【 1 0 】

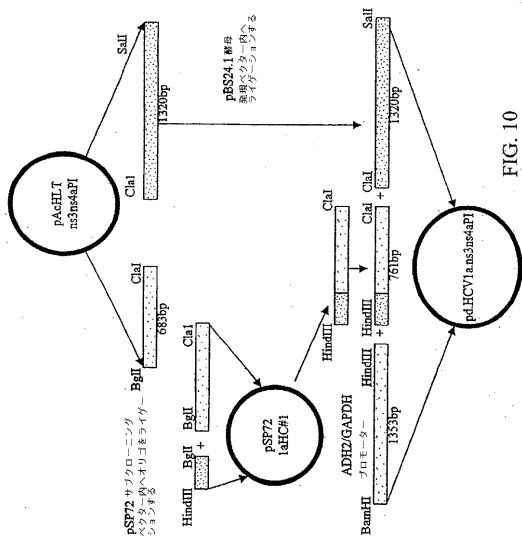


FIG. 10

【 1 1 】

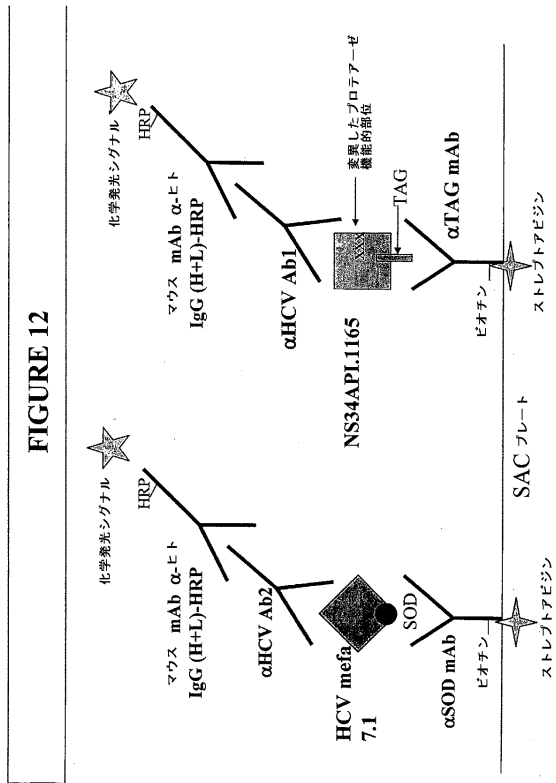
MEFA-3 抗原		MEFA-5 抗原		MEFA-6 抗原	
NSOD- (1-154) アミノ酸	CORE 10-53	C33c 1192-1457	E1 303-320	E2 405-444	CORE 10-53
		5-1-1 1型 1684-1735	5-1-1 1型 1689-1735	5-1-1 1型 1689-1735	5-1-1 1型 1689-1735
		5-1-1 2型 1684-1901	5-1-1 2型 1689-1735	5-1-1 2型 1689-1735	5-1-1 2型 1689-1735
		5-1-1 3型 1684-1901	5-1-1 3型 1689-1735	5-1-1 3型 1689-1735	5-1-1 3型 1689-1735
		C-100 1801-1940	C-100 1801-1940	C-100 1801-1940	C-100 1801-1940
		NS5 2278-2310	NS5 2278-2310	NS5 2278-2310	NS5 2278-2310
					CORE 10-53

FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11C

【 1 2 】



【 1 3 】

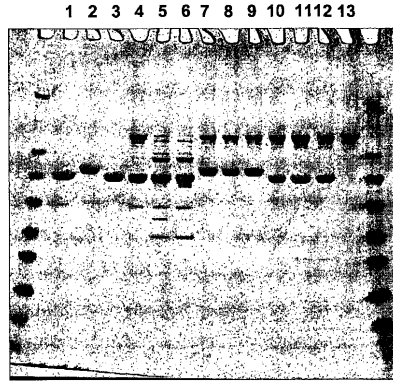


FIGURE 13

【 1 4 】

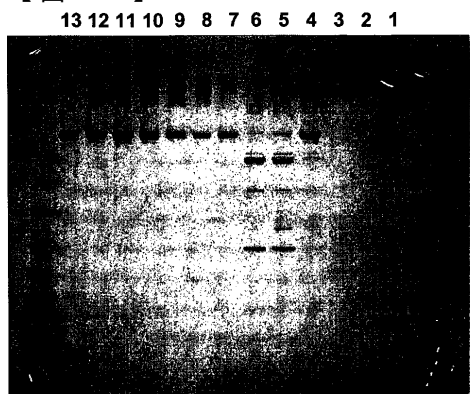


FIGURE 14

【配列表】

0004836281000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/18	(2006.01)	C 0 7 K 14/18	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 9/50	(2006.01)	C 1 2 N 9/50	
C 1 2 N 11/02	(2006.01)	C 1 2 N 11/02	

- (31)優先権主張番号 60/621,502  
 (32)優先日 平成16年10月22日(2004.10.22)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 60/621,790  
 (32)優先日 平成16年10月25日(2004.10.25)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 チェン, デイビッド ワイ.  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 , エミリービル, ホートン ストリート 4 5  
 6 0 , カイロン コーポレーション 気付  
 (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 6 0 8 , エミリービル, ホートン ストリート 4 5  
 6 0 , カイロン コーポレーション 気付  
 (72)発明者 フー, セリーヌ ユエン-ウェイ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 , エミリービル, ホートン ストリート 4 5  
 6 0 , カイロン コーポレーション 気付  
 (72)発明者 リン, サンサン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8 , エミリービル, ホートン ストリート 4 5  
 6 0 , カイロン コーポレーション 気付  
 (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 6 0 8 , エミリービル, ホートン ストリート 4 5  
 6 0 , カイロン コーポレーション 気付

審査官 鶴 剛史

- (56)参考文献 国際公開第2001/096870(WO, A1)  
 国際公開第2004/005473(WO, A1)  
 特表2003-516732(JP, A)  
 国際公開第93/000365(WO, A1)  
 国際公開第94/001778(WO, A1)  
 国際公開第2004/021871(WO, A1)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53  
 C07K 14/18  
 C12M 1/34  
 C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 5/10

C12N 15/09

C12P 21/02

C12Q 1/02

G01N 33/543

G01N 33/576

C12N 9/50

C12N 11/02

CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	HCV非结构蛋白突变体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP4836281B2</a>	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	JP2007530139	申请日	2005-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	诺华科尔多瓦点击罪和诊断公司		
申请(专利权)人(译)	诺华Vakushinzu和诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华Vakushinzu和诊断公司		
[标]发明人	チェンデイビッドワイ コイトドリス フーセリーヌユエンウェイ リンサンサン メディナセルビーアンジェリカ		
发明人	チェン, デイビッド ワイ. コイト, ドリス フー, セリーヌ ユエン-ウェイ リン, サンサン メディナ-セルビー, アンジェリカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/576 C12Q1/02 C12M1/34 C07K14/18 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12N9/50 C12N11/02		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/00 C12N2770/24222 G01N33/5767 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.511.N G01N33/576.Z C12Q1/02 C12M1/34.F C07K14/18 C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C C12N9/50 C12N11/02		
代理人(译)	夏木森下		
审查员(译)	武鹤		
优先权	60/604858 2004-08-27 US 60/618390 2004-10-12 US 60/621502 2004-10-22 US 60/621790 2004-10-25 US		
其他公开文献	JP2008511326A5 JP2008511326A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

描述了修饰的HCV非结构蛋白。该蛋白质含有修饰的NS3结构域，从而抑制NS3分子的蛋白水解活性。修饰的蛋白质保留构象表位。还描述了包含修饰的NS3分子的HCV免疫测定。在一个实施方案中，本发明提供了修饰的HCV涉及包含含有NS3蛋白酶结构域的多肽的免疫测定固体支持物，所述修饰的NS3多肽的蛋白酶活性被抑制，相比于相应HCV NS3的蛋白酶活性的多肽不修改为。该多肽包含NS3构象表位，并且特异性地与来自HCV感染的个体的生物样品中存在的抗HCV抗体反应。

表1	
ドメイン	おおよその境界*
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