

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4837229号
(P4837229)

(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 33/576 (2006.01)

GO 1 N 33/576 Z N A Z

請求項の数 20 (全 53 頁)

(21) 出願番号	特願2002-510948 (P2002-510948)	(73) 特許権者	591076811
(86) (22) 出願日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		ノバルティス バクシンズ アンド ダイ
(65) 公表番号	特表2004-510133 (P2004-510133A)		アグノスティックス, インコーポレーテッ
(43) 公表日	平成16年4月2日 (2004.4.2)		ド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/019156		アメリカ合衆国, カリフォルニア 946
(87) 国際公開番号	W02001/096870		08, エミリービル, ホートン ストリー
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		ト 4560
審査請求日	平成20年5月12日 (2008.5.12)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/212,082		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成12年6月15日 (2000.6.15)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/280,811	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成13年4月2日 (2001.4.2)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HCV抗体についてのイムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

イムノアッセイ固体支持体であって、本質的に、該支持体に結合する少なくとも1つのHCV NS3/4aコンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原からなり、ここで、該NS3/4aエピトープおよび/または該複数エピトープ融合抗原は、HCV感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体と特異的に反応し、該NS3/4aエピトープが、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも80%の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、固体支持体。

【請求項2】

前記NS3/4aエピトープが、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項3】

前記NS3/4aエピトープが、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも98%の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項4】

前記NS3/4aエピトープが、図3A～3Dに示されるアミノ酸配列からなる、請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体。

10

20

【請求項 5】

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

【請求項 6】

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

10

【請求項 7】

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

【請求項 8】

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

【請求項 9】

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

20

【請求項 10】

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A～3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含み、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A～5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 90 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

30

【請求項 11】

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A～3 D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含み、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A～5 F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 98 % の配列同一性を有し、H C V 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 H C V 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

40

【請求項 12】

前記 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、図 3 A～3 D に示されるアミノ酸配列からなり、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5 A～5 F に示されるアミノ酸からなる、請求項 9 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 13】

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

50

ノ酸配列からなる、固体支持体。

【請求項 14】

免疫診断試験キットであって、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体、および該免疫診断試験を実施するための指示書を備える、キット。

【請求項 15】

イムノアッセイ固体支持体を作製する方法であって、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；ならびに

(b) 少なくとも 1 つの HCV NS3/4a コンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原を該固体支持体に結合する工程、
を包含し、ここで、該 NS3/4a エピトープおよび／または該複数エピトープ融合抗原は、HCV 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 HCV 抗体と特異的に反応し、該 NS3/4a エピトープが、図 3A～3D に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80% の配列同一性を有し、プロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、方法。

10

【請求項 16】

前記複数エピトープ融合抗原が、図 5A～5F に示されるアミノ酸配列、または該アミノ酸配列に少なくとも 80% の配列同一性を有し、HCV 感染した個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗 HCV 抗体と特異的に反応するアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 NS3/4a コンホメーションエピトープが、図 3A～3D に示されるアミノ酸配列からなり、そして前記複数エピトープ融合抗原が、図 5A～5F に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 16 に記載の方法。

20

【請求項 18】

イムノアッセイ固体支持体を作製する方法であって、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；ならびに

(b) 少なくとも 1 つの HCV NS3/4a コンホメーションエピトープおよび複数エピトープ融合抗原を該固体支持体に結合する工程、
を包含し、ここで、該 NS3/4a コンホメーションエピトープが、図 3A～3D に示されるアミノ酸配列からなり、そして該複数エピトープ融合抗原が、図 5A～5F に示されるアミノ酸配列からなる、方法。

30

【請求項 19】

生物学的サンプル中の C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染を検出する方法において使用するための診断試薬を製造するための、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体の使用。

【請求項 20】

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

(a) 請求項 1～13 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；

40

(b) HCV 抗体が生物学的サンプル中に存在する場合に、HCV 抗体が前記 NS3/4a エピトープおよび／または前記複数エピトープ融合抗原と結合して、第 1 の免疫複合体を形成し得る条件下で、該生物学的サンプルを該固体支持体と合わせる工程；

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

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

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

(技術分野)

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

【0002】

(発明の背景)

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

10

【0003】

HCVは、HoughtenらによってNANBHの原因として、最初に同定され、そして特徴付けされた。このHCVのウイルスゲノム配列を得るための方法が公知であると同様に、この配列も公知である。例えば、国際公開番号WO89/04669;同WO90/11089;および同WO90/14436を参照のこと。HCVは、9.5kbのポジティブセンス、単鎖RNAゲノムを有し、Flaviridaeファミリーウイルスのメンバーである。少なくとも6つの別個ではあるが、系統発生分析に基づいてゲノタイプに関連しているHCVが、同定されている(Simmondsら、J. Gen. Virol. (1993) 74:2391~2399)。これらのウイルスは、3000を超えるアミノ酸残基を有する単一のポリタンパク質をコードする(Chooら、Science (1989) 244:359~369;Chooら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:2451~2455;Hanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88:1711~1715)。ポリタンパク質は、翻訳と同時に、そして翻訳後に、構造タンパク質および非構造(NS)タンパク質の両方にプロセッシングされる。

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生成物の順番および学名は以下である: NH₂-C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。ポリタンパク質の最初の切断は、3つの構造タンパク質(N末端ヌクレオカプシドタンパク質(「コア」と呼ばれる)ならびに2つのエンベロープ糖タンパク質(「E1」(Eとしても公知)および「E2」(E2/NS1としても公知)))ならびにウイルス酵素を含む非構造(NS)タンパク質を遊離する、宿主プロテアーゼによって触媒される。NS領域は、NS2、NS3、NS4、NS4a、NS4b、NS5aおよびNS5bと呼ばれる。NS2は、タンパク質分解活性を有する必須の膜タンパク質である。NS2は、単独でか、またはNS3と組み合わせてのいずれかで、NS2-NS3シスル結合を切断し、これは次にNS3のN末端を生じ、セリンプロテアーゼおよびRNAヘリカーゼの両方の活性を含む大きなポリタンパク質を放出する。NS3プロテアーゼは、残りのポリタンパク質をプロセッシングするために役立つ。ポリタンパク質成熟の終了は、NS3-NS4aの連結部での自己触媒的切断(NS3セリンプロテアーゼによって触媒される)によって開始される。引続くHCVポリタンパク質のNS3媒介切断は、別のポリペプチドのNS3分子によるポリタンパク質切断連結部の認識に関連するようである。これらの反応において、NS3は、NS3補因子(NS4a)、NS4bおよびNS5a(NS5Aはリン酸化機能を有する)、ならびにRNA依存性RNAポリメラーゼ(NS5b)を遊離する。

30

40

【0005】

HCVに関する免疫学的試薬および診断的試薬として有用なHCVポリタンパク質由来の多数の一般的なポリペプチドならびに特定のポリペプチドが記載されている。例えば、Houghtonら、欧州公開番号318,216および同388,232;Chooら、Science (1989) 244:359~362;Kuoら、Science (19

50

89) 244:362~364; Houghtonら、Hepatology (1991) 14:381~388; Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011~10015; Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33~39; Chienら、国際公開番号WO93/00365; Chien, D. Y.、国際公開番号WO94/01778を参照のこと。これらの出版物は、一般的に、HCVならびにHCVポリペプチドの免疫学的試薬の製造および使用についての広範な背景を提供する。

【0006】

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

【0007】

血清に基づくいくつかのアッセイが遭遇した重大な問題は、ウイルスの感染と検出との間に有意な間隔 (しばしば、80日間を超える) が存在することである。このアッセイの間隔は、輸血レシピエントに対して重大な危険性を生じ得る。この問題を解決するために、直接ウイルスRNAを検出する核酸に基づく試験 (NAT)、および抗体応答の代わりに Ψ にウイルス抗原をアッセイするHCVコア抗原試験が開発された。例えば、Kashiwakumaら、米国特許第5, 871, 904号を参照のこと。

【0008】

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

【0009】

(発明の要旨)

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

【0010】

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

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

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

【0014】

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

【0015】

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

（a）上記のようなイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；

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

【0016】

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

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

【0017】

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

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

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

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

【0018】

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

【0019】

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

【0020】

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

（a）固体支持体を提供する工程；および

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

（a）固体支持体を提供する工程；および

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

10

20

30

40

50

からなる。

【0024】

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

【0025】

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

10

【0026】

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

【0027】

20

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

【0028】

（発明の詳細な説明）

本発明の実施は、他に示されない限り、当該分野の技術の範囲内の、化学、生化学、組換えDNA技術および免疫学の従来の方法を使用する。このような技術は、文献に完全に説明される。例えば、Fundamental Virology、第2版、I巻およびII巻（B. N. FieldsおよびD. M. Knipe、編）；Handbook of Experimental Immunology、I-IV巻（D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、Blackwell Scientific Publications）；T. E. Creighton、Proteins: Structures and Molecular Properties（W. H. Freeman and Company、1993）；A. L. Lehninger、Biochemistry（Worth Publishers, Inc.、最新添付（current addition））；Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版、1989）；Methods in Enzymology（S. ColowickおよびN. Kaplan編、Academic Press, Inc.）。

30

【0029】

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

40

【0030】

以下のアミノ酸の略語は、この明細書を通して使用される：

アラニン：Ala (A)	アルギニン：Arg (R)
アスパラギン：Asn (N)	アスパラギン酸：Asp (D)
システイン：Cys (C)	グルタミン：Gln (Q)
グルタミン酸：Glu (E)	グリシン：Gly (G)
ヒスチジン：His (H)	イソロイシン：Ile (I)
ロイシン：Leu (L)	リジン：Lys (K)

50

メチオニン：Met (M)	フェニルアラニン：Phe (F)
プロリン：Pro (P)	セリン：Ser (S)
スレオニン：Thr (T)	トリプトファン：Trp (W)
チロシン：Tyr (Y)	バリン：Val (V)

(I. 定義)

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

【0031】

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

【0032】

HCVポリペプチドは、上記のように、HCVポリタンパク質に由来するポリペプチドである。このポリペプチドは、物理的にHCVに由来する必要はないが、合成的にまたは組換え的に生成され得る。さらに、このポリペプチドは、種々のHCV株および単離物のいずれか（例えば、限定されないが、HCVの株1、2、3、4、5または6由来の単離物のいずれか）に由来し得る。多くの保存領域および可変領域が、これらの株で既知であり、そして一般に、これらの領域に由来するエピトープのアミノ酸配列は、2つの配列が整列された場合に、高い程度の配列相同性（例えば、30%より大きい、好ましくは40%より大きいアミノ酸配列相同性）を有する。従って、例えば、用語「NS3/4a」ポリペプチドは、種々のHCV株のいずれかに由来するネイティブなNS3/4a、ならびに以下にさらに定義されるようなNS3/4aアナログ、ムテインおよび免疫原性フラグメントをいう。多くのこれらの株の完全な遺伝子型は、公知である。例えば、米国特許第6,150,087号およびGenBank登録番号AJ238800ならびにAJ238799を参照のこと。

【0033】

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

【0034】

特に好ましいアナログは、天然では保存的である置換（すなわち、それらの側鎖が関係するアミノ酸のファミリー内で起こる置換）を含む。具体的に、アミノ酸は、一般的に4つのファミリーに分類される：（1）酸性—アスパラギン酸およびグルタミン酸；（2）塩基性—リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性—アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）無電荷で極性—グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、

10

20

30

40

50

スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、しばしば、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンでの、アスパラギン酸のグルタミン酸での、スレオニンのセリンでの単独置換、またはアミノ酸の構造的に関連したアミノ酸の類似の保存的な置換は、生物学的活性に対して、主要な効果は有さないことが、合理的に予測可能である。例えば、目的のポリペプチドは、分子の所望の機能がインタクトなままである限り、約5～10までの保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、もしくは約15～25までの保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、あるいは5～25の間の任意の整数の保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換を有し得る。当業者は、当該分野で周知の、Hopp/WoodsおよびKyte-Doolittleプロットを参照することによって、変化を許容し得る目的の分子の領域を容易に決定し得る。

10

【0035】

「フラグメント」は、インタクトな全長ポリペプチド配列および構造の一部のみからなるポリペプチドを意図する。このフラグメントは、ネイティブなポリペプチドのC末端欠失および／またはN末端欠失を含み得る。特定のHCVタンパク質の「免疫原性フラグメント」は、一般に、全長分子の少なくとも約5～10連続するアミノ酸残基、好ましくは全長分子の少なくとも約15～25連続するアミノ酸残基、および最も好ましくは全長分子の少なくとも約20～50以上連続するアミノ酸残基（これらは、エピトープを規定する）を含み、または5個のアミノ酸と全長配列との間の任意の整数の連続するアミノ酸残基を含むが、ただし、問題のフラグメントは、本明細書中に記載されるアッセイにおいて免疫反応性を保持する。例えば、好ましい免疫原性フラグメントとしては、例えば、ポリタンパク質のアミノ酸10～45、10～53、67～88、および120～130、エピトープ5-1-1（ウイルスゲノムにおけるNS4a/NS4b領域において）、ならびに図1に示されるポリタンパク質の領域のいずれかに由来する規定されたエピトープ（例えば、限定されないが、E1、E2、NS3（例えば、NS3領域由来のポリペプチドc33c）、NS4（例えば、NS3/NS4領域由来のポリペプチドc100）、HCVポリタンパク質のNS3/4aおよびNS5領域、ならびにHCVポリタンパク質から同定される他の種々のエピトープのいずれか）を含むHCVコアのフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015; Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39; Chienら、国際公開番号WO 93/00365; Chien、D. Y.、国際公開番号WO 94/01778; 米国特許第6,150,087号および同第6,121,020号を参照のこと。

20

30

【0036】

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

40

【0037】

エピトープを含む所定のポリペプチドの領域は、当該分野で公知の、任意の数のエピトープマッピング技術を使用して、同定され得る。例えば、Epitope Mapping

50

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

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「コンホメーションエピトープ」とは、全長の天然のタンパク質内の、エピトープをコードするアミノ酸配列にネイティブな構造的特徴を有する、全長タンパク質、またはそのアナログまたはムテインの一部をいう。ネイティブな構造的特徴としては、グリコシル化および三次元構造が挙げられるが、これらに限定されない。エピトープ規定配列の長さは、幅広い変動に供され得る。なぜなら、これらのエピトープは、抗原の三次元形状（例えば、折り畳み）によって形成されると考えられるからである。従って、エピトープを規定するアミノ酸は、比較的少ない数であり得るが、分子の長さに沿って幅広く分散し得、折り畳みにより正確なエピトープコンフォメーションにされる。エピトープを規定する残基間の抗原の部分は、エピトープのコンフォメーションな構造に重要ではなくてもよい。例えば、これらの介在する配列の欠失または置換は、エピトープのコンフォメーションに重要な配列（例えば、ジスルフィド結合に関与するシステイン、グリコシル化部位など）が維持される限り、コンホメーションエピトープに影響しなくてもよい。

【0039】

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

【0040】

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

10

【0041】

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

【0042】

20

「抗体」は、化学的手段または物理的手段によって、目的のポリペプチドに特異的に結合する分子を意図する。従って、例えば、HCVコア抗体は、HCVコアタンパク質に特異的に結合する分子である。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、ポリクローナル調製物およびモノクローナル調製物の両方、ならびに以下：ハイブリッド(キメラ)抗体分子(例えば、Winterら(1991) Nature 349:293~299; および米国特許番号第4,816,567号を参照のこと); F(ab')₂フラグメントおよびF(ab)フラグメント; Fv分子(非共有結合ヘテロダイマー、例えば、Inbarら(1972) Proc Natl Acad Sci USA 69:2659~2662; およびEhrlichら(1980) Biochem 19:4091~4096を参照のこと); 単鎖Fv分子(sFv)(例えば、Houstonら(1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:5879~5883を参照のこと); 二量体および三量体の抗体フラグメント構築物; ミニ体(minibodies)(例えば、Packら(1992) Biochem 31:1579~1584; Cumberら(1992) J Immunology 149B:120~126を参照のこと); ヒト化抗体分子(例えば、Riechmannら(1988) Nature 332:323~327; Verhoeyanら(1988) Science 239:1534~1536; および1994年9月21日に公開された英国特許公開番号GB2,276,169を参照のこと); ならびに、このような分子から得られる任意の機能性フラグメントから得られる抗体を含み、ここで、このようなフラグメントは、親の抗体分子の免疫学的結合特性を保持する。

30

40

【0043】

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

【0044】

「単離された」とは、ポリペプチドをいう場合、示された分子が、その分子が天然に見出

50

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

【0045】

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

10

【0046】

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

20

【0047】

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

【0048】

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

30

40

【0049】

本発明の状況において相同性の割合を確立する別の方法は、University of Edinburghによる著作権があり、John F. CollinsおよびShane S. Sturrockによって開発され、IntelliGenetics, Inc

50

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

10

【0050】

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

20

【0051】

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コード」する配列は、適切な調節配列の制御下に配置される場合、インビトロまたはインビボで、転写され（DNAの場合）、ポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端における開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端における翻訳終止コドンによって決定される。転写終結配列は、コード配列の3'側に配置され得る。

30

【0052】

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

【0053】

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

40

【0054】

「制御エレメント」とは、それが連結するコード配列の発現を助けるポリヌクレオチド配

50

列をいう。この用語は、プロモーター、転写終結配列、上流調節ドメイン、ポリアデニル化シグナル、非翻訳領域（5'－UTRおよび3'－UTRを含む）、ならびに適切な場合、リーダー配列およびエンハンサー（これらは、集合的に、宿主細胞においてコード配列の転写および翻訳を提供する）を含む。

【0055】

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

10

【0056】

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

【0057】

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

20

【0058】

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

30

【0059】

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

【0060】

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

40

【0061】

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

50

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

（II. 発明の実施の形態）

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

【0066】

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

【0067】

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

【0068】

HCVポリタンパク質のNS3/4a領域が記載されており、このアミノ酸配列およびこのタンパク質の全体構造は、例えば、Yaoら、Structure（1999年11月）7：1353-1363；Saliら、Biochem.（1998）37：3392-3401；およびBartenschlager, R., J. Viral Hepat.（1999）6：165-181に開示されている。また、Dasmahapatraら、米国特許第5,843,752号を参照のこと。本発明のイムノアッセイは、天然に存在するHCV粒子またはその感染産物において見出されるようなコンホメーション中に存在する、NS3/4a領域由来の少なくとも1種類のコンホメーションエピトープを利用し、プロテアーゼ、必要に応じて、NS3/4a遺伝子産物によって通常示されるヘリ

10

20

30

40

50

カーゼ酵素活性および／またはHCV感染被験体由来の生物学的サンプル中での抗原と抗体との免疫活性の保持、ならびに抗原の変性におけるエピトープ免疫活性の減少によって明らかとなる。例えば、このコンホメーションエピトープは、加熱、極度に酸性または塩基性のpHの変化によって、または公知の有機変性（例えば、ジチオトレイトール（DTT）または適切な界面活性剤）を添加することによって崩壊され得る。例えば、Protein Purification Methods, a practical approach (E. L. V. HarrisおよびS. Angal編、IRL Press)、上記のように処理されない産物と比較される変性産物を参照すること。

【0069】

プロテアーゼ活性およびヘリカーゼ活性は、当該分野で周知の標準的な酵素アッセイを使用して決定され得る。例えば、プロテアーゼ活性は、以下の実施例において記載される手順の使用、および当該分野で周知のアッセイの使用により決定され得る。例えば、Takeshitaら、Anal. Biochem. (1997) 247: 242-246; Kakiuchiら、J. Biochem. (1997) 122: 749-755; Saliら、Biochemistry (1998) 37: 3392-3401; Choら、J. Virol. Meth. (1998) 72: 109-115; Cerretaniら、Anal. Biochem. (1999) 266: 192-197; Zhangら、Anal. Biochem (1999) 270: 268-275; Kakiuchiら、J. Virol. Meth. (1999) 80: 77-84; Fowlerら、J. Biomol. Screen. (2000) 5: 152-158; およびKimら、Anal. Biochem. (2000) 284: 42-48を参照のこと。同様に、ヘリカーゼ活性アッセイは、当該分野で周知であり、そしてNS3/4aエピトープのヘリカーゼ活性は、例えば、以下を使用して決定され得る：例えば、Hsuら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) 253: 594-599に記載されるようなELISAアッセイ；Kyonoら、Anal. Biochem. (1998) 257: 120-126に記載されるようなシンチレーション近接アッセイ系（proximity assay system）；例えば、Hichamら、Antiviral Res. (2000) 46: 181-193およびKwongら、Methods Mol. Med. (2000) 24: 97-116に記載されるようなハイスループットスクリーニングアッセイ；ならびに当該分野で公知の他のアッセイ方法。例えば、Khuら、J. Virol. (2001) 75: 205-214; Utamaら、Virology (2000) 273: 316-324; Paoliniら、J. Gen. Virol. (2000) 81: 1335-1345; Preugschatら、Biochemistry (2000) 39: 5174-5183; Preugschatら、Methods Mol. Med. (1998) 19: 353-364; ならびにHessonら、Biochemistry (2000) 39: 2619-2625を参照のこと。

【0070】

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

【0071】

NS3/4aポリペプチドに関する代表的なアミノ酸配列は、図3A～3Dに示される。この図の2位～686位に示されるアミノ酸配列は、HCV-1のアミノ酸の1027位～1711位に対応する。Metをコードする開始コドン（ATG）は、1位として示される。さらに、HCV-1の1428位（図3のアミノ酸の403位）に通常存在するThrは、Proに変異され、HCV-1の1429位（図3のアミノ酸の404位）に通

10

20

30

40

50

常存在する Ser は、Ile に変異される。しかし、このエピトープが、プロテアーゼ活性および必要に応じてヘリカーゼ活性が保持されるように、そのネイティブコンホメーションを保持または回復する方法を使用して産生される限り、N末端に Met を有するか、もしくは有さないネイティブ配列、N末端に Met を有するか、もしくは有さない描写アナログ (depicted analog)、または他のアナログおよびフラグメントのいずれかは、本発明のアッセイにおいて使用され得る。Dasmahapatra ら、米国特許第 5,843,752 号および Zhang ら、米国特許第 5,990,276 号 (これらの両方は、NS3/4a のアナログを記載する)。

【0072】

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

【0073】

本明細書中で記載されるイムノアッセイはまた、国際公開番号 WO97/44469 に記載されるような、複数のエピトープ融合抗体 (「MEFA」と呼ばれる) を利用する。このような MEFA は、図 1 および表 1 に示される HCV ポリタンパク質の種々のウイルス領域のうち 2 種以上から誘導される複数のエピトープを含む。特に、図 1 および表 1 に示されるように、HCV ポリタンパク質の切断により、NH₂-コア-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH のオーダーで、少なくとも 10 個の異なる産物を産生する。このコアポリペプチドは、HCV-1 に対して番号付けされた、1 位 ~ 191 位に存在する (HCV-1 ゲノムに関して、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、アミノ酸約 1 位 ~ 約 173 位を含む HCV ポリペプチドを産生するように処理される。このエンベロープポリペプチド (E1 および E2) は、それぞれ、約 192 位 ~ 約 383 位および約 384 位 ~ 約 746 位に存在する。P7 ドメインは、約 747 位 ~ 約 809 位に見出される。NS2 は、タンパク質分解性を有する完全な膜タンパク質であり、そしてこのポリタンパク質の約 810 位 ~ 約 1026 位に見出される。NS2 は、単独か、または NS3 (約 1027 位 ~ 約 1657 位に見出される) と組み合わせてかのいずれかで、NS2-NS3 単結合 (sisle bond) を切断し、次に、NS3 N末端を生成し、そしてセリンプロテアーゼ活性および 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。この NS3 プロテアーゼ (約 1027 位 ~ 約 1207 位に見出される) は、残りのポリタンパク質を処理するのに役立つ。ヘリカーゼ活性は、約 1193 位 ~ 約 1657 位に見出される。ポリタンパク質の成熟の完了は、NS3 セリンプロテアーゼにより触媒される、NS3-NS4a 結合の自己触媒による切断より開始される。HCV ポリタンパク質の続く NS-3 媒介

切断は、別のポリペプチドのNS3分子による、ポリタンパク質の切断部の認識に関与するようである。これらの反応において、NS3は、NS3補因子（約1658位～約1711位に見出されるNS4a）、2個のタンパク質（約1712位～約1972位に見出されるNS4b、および約1973位～約2420位に見出されるNS5a）、ならびにRNA依存性RNAポリメラーゼ（約2421位～約3011位に見出されるNS5b）を遊離する。

【0074】

【表1】

表1	
ドメイン	概算の境界 *
C(UT)	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

* HCV-1 に対して番号付けられている。Chooら（1991）Proc. Natl . Acad. Sci. USA 88: 2451-2455を参照のこと。

【0075】

複数のHCV抗原は、鎖が天然には存在しないアミノ酸の単一の連続した鎖の一部である。従って、エピトープの線形順序は、エピトープが生じるゲノムにおけるそれらの線形順序とは異なる。本明細書中における使用のためのMEFAの配列の線形順序は、好ましくは、最適な抗原性のために配置される。好ましくは、これらのエピトープは、1つより多いHCV株由来であり、従って、1つのアッセイで複数のHCV株を検出する付加能力を提供する。従って、本明細書中における使用のためのMEFAは、上記のポリタンパク質由来の様々な免疫原性領域を含み得る。さらに、このポリタンパク質のコア領域におけるフレームシフトから生じるタンパク質（例えば、国際公開番号WO99/63941に記載されるようなタンパク質）は、MEFAにおいて使用され得る。所望ならば、HCVポリタンパク質由来の1つ以上のエピトープの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10、またはそれ以上は、融合タンパク質中で生じ得る。

【0076】

例えば、例えば、E2の超可変領域（例えば、アミノ酸384～410または390～410にわたる領域）由来のエピトープは、MEFA抗原に含まれ得る。特に有効なE2エピトープは、この領域由来のコンセンサス配列（例えば、コンセンサス配列Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn（これは1型HCVゲノムのアミノ酸390～410のコンセンサス配列を表す））を含むエピ

トープである。本発明のMEFAに存在する代表的なE2エピトープは、アミノ酸390～444にわたるハイブリッドエピトープを含み得る。このようなハイブリッドE2エピトープは、HCV E2のアミノ酸411～444のネイティブのアミノ酸配列に融合したアミノ酸390～410を表すコンセンサス配列を含み得る。

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

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

基である)。

【0080】

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

【0081】

【表2】

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

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

E、Ciba Corning Diagnostics Corp.)), これらのマーカーの誘導体および／または組み合わせ。検出可能に標識した抗ヒト抗体（存在するヒトIgG分子を検出し得る）は、都合良く使用され得る。

【0082】

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

【0083】

（HCVイムノアッセイにおける使用のための抗原の生成）

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

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

次いで、コード配列は、発現のために使用される系に依存して、適切なコントロールエレ

10

20

30

40

50

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

【0087】

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

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

例えば、昆虫細胞発現系（例えば、バキュロウイルス系）は、当業者に公知であり、そして例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) において記載されている。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系のための材料および方法は、特に、Invitrogen, San Diego CA (「MaxBac」キット) から市販されている。同様に、細菌および哺乳動物細胞発現系は、当該分野で周知であり、そして例えば、Sambrookら、前出、において記載されている。酵母発現系はまた、当該分野で公知であり、そして例えば、Yeast Genetic Engineering (Barrら編、1989) Butterworths, London において記載されている。

10

【0092】

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

20

【0093】

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

30

【0094】

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

40

【0095】

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

50

のこと。

【0096】

(免疫診断アッセイ)

一旦生成されると、HCV抗原は、抗体を見出すための公知の抗原を使用する事実上任意のアッセイ形式で使用され得る。これらのアッセイの全ての共通の特徴は、抗原が成分中に存在する任意のこのような抗体に結合するのを可能にする条件下で、抗原が、HCV抗体を含むことが疑われている身体成分と接触されることである。このような条件は、代表的に、過剰の抗原を使用する際の生理学的温度、pHおよびイオン強度である。抗原の試料とのインキュベーションの後、この抗原からなる免疫複合体が検出される。

【0097】

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

【0098】

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

【0099】

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

【0100】

1つの状況において、固体支持体は、分子が十分に支持体に固定されるように、適切な結合条件下で、まずHCV抗原（本明細書中で集団的に「固相成分」と呼ばれる）と反応される。時々、支持体への固定は、より優れた固相結合特性を有するタンパク質への抗原および／または抗体を最初に結合することによって強化され得る。適切な結合タンパク質としては、ウシ血清アルブミン（BSA）を含む血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシニアン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、卵白アルブミンのような高分子、および当業者に周知の他のタンパク質を含むがこれらに限定されない。支持体に分子を結

10

20

30

40

50

合するために使用され得る他の試薬としては、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー状アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどが挙げられる。このような分子および抗原にこれらの分子を結合させる方法は、当業者に周知である。例えば、Brinkley, M. A. (1992) Bioconjugate Chem. 3: 2-13; Hashida ら (1984) J. Appl. Biochem. 6: 56-63; ならびに Anjaneyulu および Staros (1987) International J. of Peptide and Protein Res. 30: 117-124 を参照のこと。

【0101】

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

10

【0102】

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

【0103】

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

20

【0104】

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

30

【0105】

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

40

【0106】

（III. 実験）

以下は、本発明を実行するための特定の実施形態の例である。本実施例は、例示目的のみ

50

のために提供され、そして本発明の範囲をいずれにも限定することは意図されない。

【0107】

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

【0108】

（実施例1）

（MEFA 7およびMEFA 7.1の構築）

以下の実施例は、複数のHCVエピトープのポリタンパク質カセットの調製を示す。複数エピトープのカセットから発現されるポリタンパク質を、本明細書中において、複数エピトープ融合抗原（MEFA）と称する。好ましくは、エピトープが反復される場合、超過
10
のコピーは、同じ方向に縦列方向で配置される。エピトープとして使用されるウイルスコード配列の領域は、わずかに変化され、なおかつ抗原性活性を保持し得ること、ならびにアミノ酸の番号付けの指定が種間で変化し得ることが、理解される。従って、反復エピトープは、種配列バリエーションおよび／または番号付けの指定に起因して、一方のエピトープのアミノ酸配列と他方のエピトープのアミノ酸配列が変化し得る。好ましくは、MEFA内の反復エピトープのアミノ酸配列は、アミノ酸レベルで少なくとも30%の相同性であり、より好ましくはアミノ酸レベルで少なくとも40%の相同性である。

【0109】

特有の制限酵素部位を導入して、規定された順番でエピトープを連結し、そしてキメラ抗原の設計において改変を促進することによって、本発明の有用性を増強した。制限酵素部位およびクローニング手順の選択は、組換えDNA技術の当業者によって容易に決定される。好ましくは、エピトープ連結部（クローニングに起因してエピトープ間で作製されるアミノ酸配列）は、非特異的エピトープを生成しない。非特異的エピトープは、例えば、天然ではHCVエピトープに隣接して存在しない非HCV配列である。非特異的エピトープは、偽陽性のアッセイ結果を引き起こす試験サンプル中の抗体に結合し得る。好ましくは、複数エピトープ融合タンパク質を、エピトープ連結部において生じるそのような配列に起因する偽陽性結果について試験する。連結配列に起因するMEFAとの非特異的相互作用を回避するために、連結部をコードするDNA配列を、例えば、変異アミノ酸配列との非特異的相互作用が減少され、そしてエピトープフラグメントのクローニングが可能になるように、変異し得る。
20
30

【0110】

HCV MEFA 7発現カセットおよびHCV MEFA 7.1発現カセットを、図4に示すように縦列配置で、主要なエピトープを含むコードヌクレオチド配列をクローニングすることによって、構築した。主要なエピトープは、エピトープへの抗体反応頻度および抗体反応強度（力価）に基づいて選択した（Chein, D. Y. ら（1994）Viral Hepatitis and Liver Disease, 320-324頁）。HCVエピトープをコードする種々のDNAセグメントを、PCR増幅または合成オリゴヌクレオチドによって構築した。各セグメントのアミノ酸は、上記の表2および図5A~5Fに示す。完全HCV-1アミノ酸配列（3011アミノ酸）を、Chooら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455
40
によって決定した。HCVに結合し得るオリゴヌクレオチドは、米国特許第5,350,671号に記載される。本発明のエピトープ中のアミノ酸の番号付けは、Chooら（前出）によって提供される番号付けの指定に従い、ここで、アミノ酸番号1は、他に特定しない限り、コア領域のコード配列によってコードされる最初のメチオニンである。例えば、NS5由来の1つのエピトープセグメントは、HCVポリタンパク質のアミノ酸2278~2313によって表される。E1領域由来のエピトープは、HCV-1ポリタンパク質に関して番号付けられたアミノ酸303~320によって表される。

【0111】

MEFA 7およびMEFA 7.1は、各々、HCV-1、HCV-2およびHCV-3由来のエピトープを含み、単一アッセイにおける複数の型のウイルスの検出を可能にす
50

る。HCV血清型を決定する方法は、WO 96/27153に見出される。例えば、5-1-1領域由来のエピトープは、HCVの血清型間で変化することが見出されている。本明細書中に記載されるMEFA中に存在するHCV型特異的5-1-1エピトープの各々のコピーは、試験生物学的サンプル中に存在し得るHCV型のいずれかの結合を可能にする。

【0112】

MEFA 7構築物およびMEFA 7.1構築物を、酵母発現ベクターのpBS24.1を用いて、*Saccharomyces cerevisiae*中での発現のために遺伝子操作した。この酵母発現ベクターのpBS24.1は、酵母における自律複製のための2μ配列および酵母遺伝子*leu2-d*および選択マーカーとしてのURA3を含む。細菌中でのプラスミド複製に必要とされるβ-ラクタマーゼ遺伝子およびColE1複製起点もまた、この発現ベクター中に存在した。MEFA7のための酵母発現ベクター(p s. MEFA7)を、最初に構築した。引き続いて、MEFA7.1抗原をコードするプラスミドp s. MEFA7.1を作製するために、このプラスミドのHCVコアエピトープについてのコード領域を改変した。

【0113】

詳細には、図7A～7Dに示されるように、MEFA 7についての酵母発現プラスミドを、以下のように構築した。最初に、1896bpのBamHI/HindIII(ADH2/GAPDHハイブリッドプロモーター、hSOD(アミノ酸1～156)、続いてE1エピトープ(アミノ酸303～320、HCV1系)をコードする)を、国際公開番号WO 97/44469に記載されるように、p s. MEFA6(MEFA6をコードする発現プラスミド)から単離した。次に、269bpのHindIII/SphI合成DNAフラグメント(E2 HVR1aコンセンサスエピトープ(アミノ酸390～410、HCV-1)、E2 HVR1+2コンセンサスエピトープ(アミノ酸384～414、HCV1+2)およびヘリカーゼドメインの5'末端(アミノ酸1193～1229、HCV-1)についてのコード配列を含む)を作製した。1264bpのSphI/EclXIフラグメント(ヘリカーゼドメインの残りをコードする(アミノ酸1230～1651、HCV-1))を、pTac5/HeLIプラスミドDNAからゲル精製した。HindIII/SphI合成DNAフラグメントおよびSphI/EclXIの1264bpフラグメントを、ベクターのpSP72new. HindIII/EclXIベクターに連結して、pSP72new. HindIII/EclXI/e2ヘリカーゼを生成した。このベクターは、pSP72由来のPromega, Madison, WIから市販されるE. coliベクターである(GenBank/EMBL登録番号X65332を参照のこと)。詳細には、いくつかのMEFA7エピトープのサブクローニングを容易にするために、新規マルチクローニングサイト(MCS)ポリリンカーを、合成オリゴを介して、pSP72のSphI部位およびBglII部位の間に導入した。このMCS中に特有の部位を有する新規プラスミド(pSP72newと命名する)を、HindIIIおよびEclXI(EagIとしても公知である)を用いて消化した。次いで、これを脱リン酸化し、そしてゲルで精製した。

【0114】

E. coli HB101コンピテント細胞を、このプラスミドを用いて形質転換し、100μg/mlのアンプシリンを含むLuriaゲルプレートにプレートした。所望のクローンを、ミニプレップDNA分析を用いて同定した。配列確認の後、プラスミドpSP72new. HindIII/EclXI/e2. ヘリカーゼ サブクローン番号4を、HindIIIおよびEclXI(EagI)を用いて消化し、1534bpのフラグメントを作製した。HindIII/EclXIフラグメントを、ゲル精製し、そしてヘリカーゼドメインの最後の最後のアミノ酸(アミノ酸1651～1658、HCV-1)をコードするEclXI/SphIオリゴヌクレオチドと共に、pGEM7 HindIII/SphIベクターに連結した。HB101コンピテント細胞を、形質転換し、Luria-アンプシリン(100μg/ml)上にプレートした。所望のクローンの同定およ

び配列確認の後、pGEM7HindIII/SphI サブクローン番号9を、HindIIIおよびSphIで消化して、1560bpのフラグメントを作製し、これを、ゲルで精製した(図7Aを参照のこと)。

【0115】

MEFA 7の3'末端部分を組み立てるために、以下の工程を実行した。HCV-1、HCV-3およびHCV-2(この順番で)の5-1-1エピトープ(アミノ酸1689~1735)を、ps.MEFA6(MEFA 6をコードする発現プラスミド)(国際公開番号WO 97/44469に記載される)から、441bpのSphI/AvaIフラグメントとしてゲル精製した。このフラグメントを、c100エピトープ(アミノ酸1901~1936)をコードする合成AvaI/XbaIオリゴヌクレオチドをと共に、pSP72new.SphI/XbaIベクターに連結した。HB101の形質転換、クローンの同定、および配列の確認後、pSP72newSX サブクローン番号6を、XbaIおよびNotIで消化し、pSP72new.XbaI/NotIベクターを調製した。さらに、NS5エピトープ(アミノ酸2278~2313、HCV-1)の二重反復をコードする221bpのXbaI/NcoIフラグメントを、ps.MEFA6から単離した。XbaI/NcoIフラグメントを、HCV-1コアエピトープの第1アミノ酸(アミノ酸9~17)をコードするNcoI/NotIオリゴヌクレオチド(ここで、9位のLysはArgに変更し、そして11位のAsnはThrに変更した)と共に、上記の調製したpSP72new.XbaI/NotIベクターに連結した。HB101形質転換体を分析し、そしてそれらのプラスミドDNAを配列決定した。pSP72newSX/XNi 番号3と命名したサブクローンを、NotI/SalIを用いて消化し、引続くサブクローニングのためにベクターを調製した(図7Bを参照のこと)。

【0116】

MEFA 7の3'末端の組立てを完了するために、HCV-1のアミノ酸9~53を有するコアエピトープをコードする配列の二重反復、およびコア領域の2つの遺伝子型特異的エピトープ(アミノ酸64~88、HCV-1およびアミノ酸67~84、HCV-2)を、以下のように、NotI-SalIで消化したpSP72newSX/XNi サブクローン番号3にサブクローン化した。第1に、コアエピトープのアミノ酸18~51をコードする92bpのNotI/XmnIフラグメントを、pd.Core191RTクローン番号20から単離した。プラスミドpd.Core191RTは、pBS24.1 BamHI/SalI酵母発現ベクター、ADH2/GAPHDプロモーターの1365bpのBamHI-NcoIフラグメント、およびHCV-1コアの最初の191アミノ酸をコードする615bpのNcoI-SalIフラグメント(アミノ酸9をLysからArgに、そしてアミノ酸11をAsnからThrに変異させた)を連結することによって構築した。上記と同じ2つの変異を有するアミノ酸1~191についてのコア配列がクローン化された615bpのNcoI-SalIフラグメントは、E.coli発現ベクター由来であった。

【0117】

92bpのNotI/XmnIフラグメントを、pSP72newNot/Kpnベクターおよび完全コアエピトープの3'末端をコードするXmnI/KpnIオリゴヌクレオチドと連結した。陽性クローンの配列確認の後、pSP72newNKi サブクローン番号4を、NotIおよびKpnIで消化し、そして224bpのフラグメントを、ゲルで精製した。このNotI/KpnIフラグメントを、上記のコアエピトープの完全反復をコードする284bpのオリゴヌクレオチド(KpnI-SalI末端)と共に、上記のpSPnewSX/XNi NotI/SalIベクターに連結した。HB101の形質転換、クローンの同定および配列の確認後、pSP72newSX/XN/NSi サブクローン番号18を、SphIおよびSalIで消化し、そして1317bpのフラグメントを、ゲルで精製した(図7Cを参照のこと)。

【0118】

最後に、以下のフラグメント(上記に記載される)を、pBS24.1 BamHI/S

10

20

30

40

50

a l I 酵母発現ベクターに連結し、p s . M E F A 7 を作製した（図 7 D を参照のこと）：

1 8 9 6 b p の B a m H I / H i n d I I I フラグメント（図 7 A）

1 5 6 0 b p の H i n d I I I / S p h I フラグメント（図 7 A）

1 3 1 7 b p の S p h I / S a l I フラグメント（図 7 C）。

【0119】

S . c e r e v i s i a e 株 A D 3 を、p s . M E F A 7 を用いて形質転換し、単一の形質転換体を、培地中のグルコースの枯渇後に発現についてチェックした。組換えタンパク質が、クマシーブルー染色によって検出されたように、酵母において高レベルで発現した。詳細には、酵母細胞を、酢酸リチウムプロトコルを用いて M E F A 発現プラスミドで形質転換した。U r a ⁻ 形質転換体を、単一コロニーについて画線し、そして L e u ⁻ / 8 % グルコースプレート上にパッチし（p a t c h）、プラスミドコピー数を増加させた。L e u ⁻ 開始培養物を、2 4 時間 3 0 ° C で増殖させ、次いで、Y E P D（酵母抽出物バクトペプトン 2 % グルコース）中で 1 : 2 0 に希釈した。細胞を、3 0 ° C で 4 8 時間増殖させ、そして収集した。M E F A 7 組み換え抗原の発現を試験するために、細胞のアリコート、溶解緩衝液（1 0 m M T r i s - C l（p H 7 . 5）、1 m M E D T A、1 0 m M D T T）中、ガラスビーズを用いて溶解した。溶解物を、高速で遠心分離した。上清および不溶性ペレットを、S D S タンパク質ゲル上で分析した。M E F A 7 は、不溶性ペレット分画中に非常に富んでいた。

【0120】

M E F A 7 抗原を、以下のように精製した。M E F A 7 を発現する S . c e r e v i s i a e 細胞を、上記のように収集した。細胞を、溶解緩衝液（5 0 m M T r i s、0 . 1 5 M N a C l、1 m M E D T A、1 m M P M S F、p H 8 . 0）中に懸濁し、そして D y n o - M i l l（W a b W i l l y A . B a c h o f o n, B a s e l, S w i t z e r l a n d）または等価な容器中でガラスビーズを用いて溶解した。溶解物を、低速条件（3, 0 0 0 ~ 5, 0 0 0 r p m、1 5 分）で遠心分離し、そして不溶性分画を含むペレットを、溶解緩衝液中の漸増濃度の尿素（1 M、2 M、3 M）を用いて洗浄した。タンパク質を、溶解緩衝液中の 0 . 1 N N a O H、4 M 尿素を用いて遠心分離ペレットから可溶化した。細胞の破片を、3, 0 0 0 ~ 5, 0 0 0 r p m で 1 5 分間の低速遠心分離によって取り除いた。上清を、6 N H C l を用いて p H 8 . 0 に調整し、これらの条件下で不溶性タンパク質を沈澱させた。

【0121】

沈澱物を、遠心分離によって取り除き、そして上清を、2 . 3 % S D S、5 0 m M D T T、p H 8 . 0 に調整し、そして 3 分間煮沸した。混合物中のタンパク質を、0 . 1 % S D S、1 m M E D T A を含む p H 7 . 4 に調整したリン酸緩衝化生理食塩水中、P h a r m a c i a S e p h a c r y l S - 4 0 0 でゲル濾過によって分画した。M E F A 7 を含むカラム溶出画分を収集し、プールし、そして A m i c o n Y M - 3 0 膜で濃縮した。ゲル濾過を、同じカラムおよび条件を用いてプールした分画に対して繰り返した。

【0122】

試験アッセイにおける M E F A 7 の分析の間、検出結合体として使用したモノクローナル抗体が、コアエピトープの特定の配列（アミノ酸 3 3 ~ 3 8）と反応したことが発見された。従って、p s . M E F A 7 . 1 を、コアエピトープ領域からアミノ酸 3 3 ~ 3 8 を排除するように設計した。

【0123】

M E F A 7 . 1 についての酵母発現ベクターは、以下のように作製した。最初に、p s . M E F A 7 の 3 ' 末端においてコアエピトープの二重反復を改変した。このようにするために、最初のコアエピトープ反復（H C V - 1 のアミノ酸 9 ~ 3 2、3 9 ~ 4 2 および 6 4 ~ 8 8、H C V - 2 のアミノ酸 6 7 ~ 8 2）をコードする 2 0 6 b p の N c o I / K p n I 合成フラグメント、H C V - 2 のアミノ酸 8 3 および 8 4、続く第 2 のコアエピ

10

20

30

40

50

トープ反復（HCV-1のアミノ酸9～32、アミノ酸39～42およびアミノ酸64～88、HCV-2のアミノ酸67～84）をコードする233bpのKpnI/SalI合成フラグメントを、それぞれ、pSP72new. NcoI/KpnIベクターおよびpSP72new. KpnI/SalIベクターにサブクローン化した。HB101の形質転換、クローンの同定および配列の確認後、pSP72new. NKi クローン番号21を、NcoIおよびKpnIを用いて消化して、206bpのベクターNcoI/KpnIフラグメントを単離し、そしてpSP72newNSi クローン番号32を、KpnIおよびSalIを用いて消化して、233bpのKpnI/SalIフラグメントを単離した。

【0124】

プラスミドps. MEFA7. 1を、以下のフラグメントをpBS24. 1 BamHI/SalI酵母発現ベクター（図8を参照のこと）へと連結することによって組み立てた：

ps. MEFA7について上記の1896bpのBamHI/HindIIIフラグメント；

ps. MEFA7について上記の1560bpのHindIII/SphIフラグメント；

5-1-1エピトープ、c100エピトープおよびNS5エピトープをコードする、ps. MEFA7から単離された776bpのSphI/NcoIフラグメント；

206bpのNcoI/KpnIフラグメント；ならびに

233bpのKpnI/SalIフラグメント。

【0125】

S. cerevisiae株AD3をps. MEFA7. 1で形質転換し、そして1つの形質転換体を、上記のように、培地中のグルコースの枯渇後の発現についてチェックした。組換えタンパク質は、クーマシーブルー染色によって検出したところ、酵母において高いレベルで発現された。

【0126】

MEFA7. 1抗原を以下の通りに精製した。MEFA7. 1を発現するS. cerevisiae細胞を上記の通りに収集した。この細胞を溶解緩衝液（50mM Tris、0.15M NaCl、1mM EDTA、pH8.0）中に懸濁し、そしてガラスビーズを用いて、Dyno-Mill（Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland）または等価な装置において溶解した。溶解産物をJA-10ローター中で10,000rpmで30分間遠心分離し、そして不溶タンパク質画分を含むペレットを、溶解緩衝液中の漸増濃度（1M、2M、3M）の尿素で洗浄した。タンパク質を、溶解緩衝液中の0.1N NaOH、4M 尿素、50mM DTTを用いて遠心分離ペレットから可溶化した。細胞破片を、JA-14ローター中で14,000rpmで20分間の遠心分離によって除去した。上清を6N HClでpH8.0に調整してこれらの条件下で不溶性のタンパク質を沈澱させた。

【0127】

沈澱物を、JA-14ローター中で14,000rpmで20分間の遠心分離によって除去した。上清を2.3% SDSに調整し、そして煮沸水中で70℃～75℃まで加熱し、次いで室温まで冷却した。混合物中のタンパク質を、0.1% SDS、1mM EDTAを含有し、pH7.4に調整されたPBS中でのPharmacia Sephacryl S-400 HRでのゲルろ過によって分画した。MEFA7. 1を含有するカラム溶出画分を収集し、プールし、そしてAmicon YM-30メンブレンで濃縮した。プールしたゲルろ過画分を2.3% SDS、50mM DTTに調整し、そして上記の通りに加熱／冷却した。このプールを、第一のゲルろ過工程と同じ条件下でのPharmacia Sephacryl S-300 HRカラムでの二回目のゲルろ過工程に供した。

【0128】

(実施例 2：NS 3／4 a コンホメーションエピトープの組換え産生)

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

【0 1 2 9】

特に、用いられる酵母発現ベクターは、上記の p B S 2 4 . 1 であった。このイムノアッセイにおいて用いられるプラスミド p d . h c v 1 a . n s 3 n s 4 a P I を、代表的な NS 3／4 a エピトープをコードし、以下の通りに産生した。二工程手順を用いた。最初に、以下の DNA 片を一緒に連結した：(a) 5' H i n d I I I クローニング部位、続いて配列 A C A A A A C A A A、イニシエーター A T G、およびアミノ酸 1 0 2 7 で始まりアミノ酸 1 0 4 6 で B g l I 部位へと続く H C V 1 a についてのコドンを提供する合成オリゴヌクレオチド；(b) p A c H L T n s 3 n s 4 a P I 由来の 6 8 3 b p の B g l I - C l a I 制限フラグメント (アミノ酸 1 0 4 6 ～ 1 2 7 4 をコードする)；ならびに (c) H i n d I I I および C l a I で消化し、脱リン酸化し、そしてゲル精製した p S P 7 2 ベクター (P r o m e g a, M a d i s o n, W I, G e n B a n k / E M B L 登録番号 X 6 5 3 3 2)。プラスミド p A c H L T n s 3 n s 4 a P I を、B D P h a r m i n g e n (S a n D i e g o, C A) から市販されるバキュロウイルス発現ベクターである p A c H L T から誘導した。特に、p A c H L T E c o R I - P s t I ベクターならびに以下のフラグメントを調製した：H C V-1 ゲノムのアミノ酸 1 0 2 7 ～ 1 3 3 6 に対応する 9 3 5 b p の E c o R I - A l w n I；H C V-1 ゲノムのアミノ酸 1 3 3 6 ～ 1 4 1 9 に対応する 2 4 7 b p の A l w n I - S a c I I；H C V-1 ゲノムのアミノ酸 1 4 4 9 ～ 1 5 0 9 に対応する 1 7 5 b p の H i n f I - B g l I；H C V-1 ゲノムのアミノ酸 1 5 1 0 ～ 1 7 1 1 に対応する 6 1 9 b p の B g l I - P s t I + 転写終結コドン。H C V-1 ゲノムのアミノ酸 1 4 2 0 ～ 1 4 4 8 に対応し、P I 変異 (P r o へと変異させた T h r - 1 4 2 8、I l e へと変異させた S e r - 1 4 2 9) を含む、合成によって作製した 9 1 b p の S a c I I - H i n f I フラグメントを上記の 1 7 5 b p の H i n f I - B g l I フラグメントおよび 6 1 9 b p の B g l I - P s t I フラグメントと連結し、そして S a c I I および P s t I で消化した p G E M - 5 Z f (+) ベクター中にサブクローン化した。p G E M - 5 Z f (+) は、市販の E . c o l i ベクター (P r o m e g a, M a d i s o n, W I, G e n B a n k / E M B L 登録番号 X 6 5 3 0 8) である。コンピテントな H B 1 0 1 細胞の形質転換、個々のクローンのミニスクリーニング分析および配列確認後、p G E M 5 . P I クローン 2 由来の 8 8 5 b p の S a c I I - P s t I フラグメントをゲル精製した。このフラグメントを、上記の E c o R I - A l w n I 9 3 5 b p フラグメント、A l w n I - S a c I I 2 4 7 b p フラグメントおよび p A c H L T E c o R I - P s t I ベクターと連結した。得られた構築物を、p A c H L T n s 3 n s 4 a P I と命名した。

【0 1 3 0】

上記の連結混合物を H B 1 0 1 コンピテント細胞中に形質転換し、そして 1 0 0 μ g / m l アンピシリンを含有する L u r i a 寒天プレートにプレーティングした。個々のクローンのミニプレップ分析によって推定のポジティブを同定し、そのうちの 2 つを増幅した。p S P 7 2 1 a H C のクローン番号 1 およびクローン番号 2 についてのプラスミド DNA を、Q i a g e n M a x i p r e p キットを用いて調製し、そして配列決定した。

【0 1 3 1】

次いで、以下のフラグメントを一緒に連結した：(a) p S P 7 2 1 a H C # 1 由来の 7 6 1 b p の H i n d I I I - C l a I フラグメント (p S P 7 2 . 1 a H C を、以下を一緒に連結することによって作製した：H i n d I I I および C l a I で消化した p S P 7 2、5' H i n d I I I クローニング部位を提供する合成オリゴヌクレオチド、続いて配列 A C A A A A C A A A、開始コドン A T G およびアミノ酸 1 0 2 7 で始まり、アミノ

10

20

30

40

50

酸1046でのBglII部位へと続く、HCV1aについてのコドン、ならびにpAcHLTns3ns4aPI由来の683bpのBglII-ClaI制限フラグメント（アミノ酸1046～1274をコードする）；（b）酵母ハイブリッドプロモーターADH2/GAPDHについての1353bpのBamHI-HindIIIフラグメント；（c）pAcHLTns3ns4aPI由来の1320bpのClaI-SalIフラグメント（Thr 1428がProへと変異し、そしてSer 1429がIleへと変異したHCV1aアミノ酸1046～1711をコードする）；ならびに（d）BamHIおよびSalIで消化し、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。連結混合物をコンピテントなHB101中へと形質転換し、そして100μg/mlアンピシリンを含有するLuria寒天プレートにプレーティングした。個々のクローンのミニプレップ分析によって、予想された3446bpのBamHI-SalI挿入物（ADH2/GAPDHプロモーター、イニシエーターコドンATGおよびアミノ酸1027～1711のHCV1a NS3/4a（図3A～図3Dのアミノ酸1～686として示す）（Thr 1428（図3A～3Dのアミノ酸位置403）がProへと変異し、そしてSer 1429（図3A～3Dのアミノ酸位置404）がIleへと変異している）から構成される）を有するクローンを同定した。この構築物を、pd. HCV1a.ns3ns4aPI（図9を参照のこと）と命名した。

【0132】

S. cerevisiae株AD3をpd. HCV1a.ns3ns4aPIで形質転換し、そして1つの形質転換体を、培地中のグルコースの枯渇後の発現についてチェックした。組換えタンパク質は、クーマシーブルー染色によって検出し、そして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て免疫ブロット分析によって確認したところ、酵母において高いレベルで発現された。

【0133】

（実施例3：NS3/4aコンホメーションエピトープの精製）

NS3/4aコンホメーションエピトープを以下の通りに精製した。NS3/4aエピトープを発現する、上記由来のS. cerevisiae細胞を、上記の通りに収集した。この細胞を溶解緩衝液（50mM Tris（pH8.0）、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μMペプスタチン、1μMロイペプチン）中に懸濁し、そして1:1:1の細胞：緩衝液：0.5mmガラスビーズの比でガラスビーズを用いて、Dyno-Mill（Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland）または等価な装置において溶解した。溶解産物を4℃で30100×gで30分間遠心分離し、そして不溶タンパク質画分を含むペレットを洗浄緩衝液（6ml/g出発細胞ペレット重量）に添加し、そして室温で15分間揺り動かした。洗浄緩衝液は、50mM NaPO₄（pH8.0）、0.3M NaCl、5mM β-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っていた。細胞破片を、30100×gで30分間、4℃での遠心分離によって取り出した。上清を捨て、そしてペレットを保持した。

【0134】

タンパク質を、このペレットから以下の通りに抽出した。6ml/gの抽出緩衝液を添加し、そして室温で15分間揺り動かした。この抽出緩衝液は、50mM Tris（pH8.0）、1M NaCl、5mM β-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。上清を保持し、そして以下の式を用いて17.5%になるように硫酸アンモニウムを添加した：上清の容積（ml）×x%硫酸アンモニウム/（1-x%硫酸アンモニウム）=上清へと添加される4.1M飽和硫酸アンモニウムのml。氷上で攪拌しながら硫酸アンモニウムを滴下し、そして溶液を氷上で10分間攪拌した。溶液を17700×gで30分間、4℃で遠心分離し、そしてペレットを保持し、そして2℃～8℃で48時間まで保存した。

【0135】

ペレットを再懸濁し、そしてポリUカラム (Poly U Sepharose 4B, Amersham Pharmacia) に4℃で以下の通りに流した。ペレットを、ペレットの重量1グラムあたり6mlのポリU平衡化緩衝液中に再懸濁した。この平衡化緩衝液は、25mM HEPES (pH 8.0)、200mM NaCl、5mM DTT (新たに添加した)、10%グリセロール、1.2オクチルグルコシドからなっていた。この溶液を4℃で15分間で揺り動かし、そして31000×gで30分間、4℃で遠心分離した。

【0136】

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

【0137】

さらに、プロテアーゼ酵素活性を、以下の通りにして精製の間、モニタリングした。NS4Aペプチド (KKGSVVIVGRIVLSGKPAIIPKK) およびNS3/4aコンホメーションエピトープ含有サンプルを90μlの反応緩衝液 (25mM Tris (pH 7.5)、0.15M NaCl、0.5mM EDTA、10%グリセロール、0.05nードデシルB-D-マルトシド、5mM DTT) 中に希釈し、そして室温で30分間混合させた。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。プレートを混合し、そしてFluostarプレートリーダーで読み取った。結果を、1分間あたりの相対蛍光単位 (RFU) で表した。

【0138】

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

【0139】

(実施例4: HCV抗原での固体支持体のコーティング)

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

【0140】

200μlの上記溶液をCostar高結合平底プレート (Corning Inc., Corning, New York) の各ウェルに添加し、そしてこのプレートを加湿チ

10

20

30

40

50

ャンバー中で一晩インキュベートした。次いで、このプレートを洗浄緩衝液（1×PBS、0.1% TWEEN-20）で洗浄し、タップ乾燥（Tapped dry）し、そして285μlのOrtho Post-Coat Buffer（1×PBS、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時間にわたってインキュベートし、タップし、そして2～8℃で一晩乾燥した。このプレートを、将来の使用のために乾燥剤と共に袋に入れた。

【0141】

（実施例5）

（初期セロコンバージョン研究）

併用アッセイ（HCV4.0）におけるNS3/4aおよびMEF7.1抗原の性能を、セロコンバージョン検出の限界を試験し、そしてこれらの限界と他の市販のアッセイにおいて獲得される限界とを比較するために他のHCVアッセイと比較した。HCV感染させた市販のヒト血液サンプルのパネルを使用した。以下の表に示すPHVパネルを、Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI) から購入した。6212パネルを、Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP) から購入した。SCパネルを、North American Biologics, Inc., Boca Raton, FL (NABI) から購入した。血液サンプルを獲得した日を、表に示す。

10

【0142】

HCV4.0アッセイを、以下の通り実施した。200μlの試料希釈緩衝液（1g/l カゼイン、100mg/l 組換えヒトSOD、1g/l クロロアセトアミド、10g/l BSA、500mg/l 酵母抽出物、0.366g/l EDTA、1.162g/l KPO₄、5ml/l Tween-20、29.22g/l NaCl、1.627g/l NaPO₄、1% SDS）を、コーティングしたプレートに添加した。次いで、20μlのサンプルを添加した。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（1×PBS、pH7.4、0.1% Tween-20）を用いて洗浄した。200μlの結合緩衝液（マウス抗ヒトIgG-HRP（例えば、Enhanced SAvバルク結合希釈剤（Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey）を用いてORTHOCV3.0 ELISA Test System中で1:22,000希釈したマウス抗ヒトIgG-HRP））を添加し、そして37℃で60分間インキュベートした。これを上記のようにして洗浄し、そして200μlの基質溶液（1 OPD錠剤/10ml）を添加した。OPD錠剤は、西洋ワサビペルオキシダーゼ反応による着色のためのオフェニレンジアミンジヒドロクロリドおよび過酸化水素を含む。これを、暗所にて室温で30分間インキュベートした。この反応を、50μl 4N H₂SO₄を添加することにより停止し、そしてプレートを、690nmでの吸光度（コントロール）と比較して、492nmで読み取った。

20

30

【0143】

この研究において用いられた他のアッセイは以下の通りであった。

【0144】

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

40

【0145】

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

【0146】

Pasteur MONOLISA anti-HCV Plus Version 2

50

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

【0147】

HCV 4.0 アッセイの性能を、HCV 3.0、PRISM、および Pasteur アッセイと比較した (表3および表4を参照のこと)。血液パネルに存在する HCV 抗体 (抗 c33c または 抗 c22) を表4に示す。詳細には、上記の3つの販売元由来の17のセロコンバージョンパネルを、上記の技術を用いてアッセイした。見られ得る通り、c33c パネルについて、HCV 4.0 は、9つの c33c パネル中の9つにおいて、(1~3回の採血により) HCV 3.0 よりも早期の検出を示し、そして9つのパネル中の6つにおける PRISM よりも早期の検出および9つのパネル中の3つにおける PRISM と比較して等価な検出を示した。c22 パネルについて、HCV 4.0 は、8つのパネル中の3つにおける HCV 3.0 よりも早期の検出および他の5つのパネルにおける等価な検出を示した。HCV 4.0 はまた、8つのパネル中の2つにおける PRISM よりも早期の検出および8つのパネル中の6つにおける等価な検出を示した。観察された改善の範囲は、HCV 3.0 および PRISM アッセイの両方よりも2~14日であった。

10

【0148】

【表3】

表 3

ID	採血日	s	HCV 4.0	Ortho HCV 3.0	Abbott Prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0	0.031	0.05	0.01	0.12
PHV 904-2	2	0.024	0.04	0.01	0.08
PHV 904-3	7	1.391	2.11	0.33	0.51
PHV 904-4	9	2.813	4.28	1.10	1.56
PHV 904-5	14	3.197	4.86	3.27	3.54
PHV 904-6	21	3.176	4.83	3.92	4.45
PHV 904-7	23	3.554	5.40	4.26	4.69

PHV 905-1	0	0.015	0.02	0.02	0.06
PHV 905-2	4	0.019	0.03	0.01	0.07
PHV 905-3	7	0.079	0.12	0.02	0.14
PHV 905-4	11	0.950	1.44	0.42	0.70
PHV 905-5	14	1.586	2.41	0.80 -	1.21
PHV 905-6	18	2.529	3.64	1.92	2.00
PHV 905-7	21	3.177	4.83	2.54	3.44
PHV 905-8	25	3.419	5.20	4.46	4.74
PHV 905-9	28	3.408	5.48	4.86	5.04

ID	採血日	s	HCV 4.0	Ortho HCV 3.0	Abbott Prism
			s/co	s/co	s/co
PHV 907-1	0	0.030	0.05	0.01	0.09
PHV 907-2	4	0.023	0.03	0.01	0.09
PHV 907-3	7	0.021	0.03	0.01	0.11
PHV 907-4	13	0.148	0.22	0.13	0.35
PHV 907-5	18	1.726	2.67	0.83 -	1.68
PHV 907-6	21	2.785	4.23	1.59	3.12
PHV 907-7	164	3.279	4.98	4.85	5.16

PHV 908-1	0	0.029	0.04	0.01	0.07
PHV 908-2	3	0.079	0.12	0.01	0.08
PHV 908-3	5	0.399	0.61	0.01	0.13
PHV 908-4	11	1.780	2.71	0.50	1.27
PHV 908-5	13	2.068	3.12	0.67	1.61
PHV 908-6	19	2.793	4.24	1.16	3.11
PHV 908-7	25	3.390	5.16	3.11	4.29
PHV 908-8	27	3.299	5.01	3.78	4.44
PHV 908-9	32	3.474	5.28	4.85	4.54
PHV 908-10	35	3.707	5.63	4.85	4.92
PHV 908-11	41	3.363	5.11	4.86	5.09
PHV 908-12	45	3.372	5.12	3.80	5.79
PHV 908-13	48	3.278	4.98	4.85	5.56

表 3(続き)

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

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

ID	採血日	s	HCV 4.0		Ortho	Abbott
			s/co	s/co	HCV 3.0	Prism
6212-1	11/16/95	0.723	1.10	0.01	0.08	
6212-2	11/28/95	2.716	4.13	0.85	1.26	
6212-3	11/30/95	3.117	4.74	1.15	1.11	
6212-4	12/09/95	3.278	4.88	4.08	2.65	
6212-5	12/12/95	3.527	5.36	5.04	3.13	
6212-6	12/18/95	3.292	5.00	5.51	3.07	
6212-7	12/23/95	3.096	4.71	5.43	2.80	
6212-8	01/08/96	3.241	4.93	13.4	3.48	
6212-9	01/10/96	3.306	5.02	13.4	4.04	

6213-1	01/16/96	0.035	0.05	0.01	0.09	
6213-2	01/18/96	0.028	0.04	0.00	0.07	
6213-3	01/24/96	0.037	0.06	0.01	0.08	
6213-4	01/27/96	0.047	0.07	0.01	0.09	
6213-5	01/31/96	0.034	0.05	0.01	0.07	
6213-6	02/03/96	0.037	0.06	0.01	0.07	
6213-7	02/13/96	0.056	0.09	0.01	0.07	
6213-8	02/15/96	0.027	0.04	0.01	0.06	
6213-9	02/20/96	0.098	0.15	0.01	0.11	
6213-10	02/22/96	1.572	2.39	0.46 -	1.26	
6213-11	02/28/96	3.410	5.18	4.18	4.75	
6213-12	03/02/96	3.224	4.80	4.67	4.68	

10

20

30

表 3(続き)

ID	採血日	s	HCV 4.0	Ortho HCV 3.0	Abbott Prism
			s/co	s/co	s/co
6214-1	01/13/96	0.042	0.06	0.01	0.09
6214-2	01/15/96	0.016	0.02	0.00	0.07
6214-3	01/21/96	0.035	0.05	0.00	0.07
6214-4	01/23/96	0.028	0.04	0.00	0.07
6214-5	01/29/96	0.031	0.05	0.00	0.08
6214-6	01/31/96	0.028	0.04	0.00	0.09
6214-7	02/05/96	0.364	0.55	0.01	0.59
6214-8	02/07/96	0.916	1.39	0.02 -	1.36
6214-9	02/12/96	2.290	3.48	0.94 -	2.31
6214-10	02/14/96	3.669	5.58	2.29	3.05
6214-11	03/02/96	3.523	5.35	3.15	5.32
6214-12	03/06/96	3.125	4.75	4.75	5.38
6214-13	03/09/96	3.246	4.93	4.89	5.17

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

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

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

【 0 1 4 9 】

【表 4】

表 4

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

10

(実施例 6)

(HCV 4. 0 遺伝子型の感度)

20

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

【0 1 5 0】

【表 5】

表 5

HCV4.0および遺伝子型の希釈による感度

希釈	遺伝子型	HCV 4.0 オルトタイプ		HCV 3.0 Ortho		Monolisa Ver. 2 Pasteur		HCV 4.0 オルトタイプ		HCV 3.0 Ortho		Monolisa Ver. 2 Pasteur	
		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1:2500	1b	2.866	1.007	0.694	0.694	2.478	0.701	0.551	0.551	0.701	0.551	0.551	0.551
1:5000		2.074	0.393	0.218	0.218	1.125	0.256	0.195	0.195	0.256	0.195	0.195	0.195
1:10000		1.099	0.159	0.084	0.084	0.609	0.087	0.076	0.076	0.087	0.076	0.076	0.076
1:20000		0.403	0.045	0.028	0.028	0.216	0.035	0.033	0.033	0.035	0.033	0.033	0.033
1:2500	2b	1.430	0.295	0.658	0.658	2.831	0.632	0.462	0.462	0.632	0.462	0.462	0.462
1:5000		0.551	0.108	0.207	0.207	1.752	0.193	0.181	0.181	0.193	0.181	0.181	0.181
1:10000		0.225	0.032	0.061	0.061	0.717	0.069	0.076	0.076	0.069	0.076	0.076	0.076
1:20000		0.074	0.010	0.019	0.019	0.248	0.045	0.025	0.025	0.045	0.025	0.025	0.025
1:2500	2a/c	1.952	0.467	1.553	1.553	1.751	0.457	1.147	1.147	0.457	1.147	1.147	1.147
1:5000		0.917	0.136	0.782	0.782	0.856	0.169	0.474	0.474	0.169	0.474	0.474	0.474
1:10000		0.395	0.049	0.286	0.286	0.384	0.055	0.178	0.178	0.055	0.178	0.178	0.178
1:20000		0.108	0.011	0.105	0.105	0.141	0.018	0.058	0.058	0.018	0.058	0.058	0.058
1:2500	3a	2.580	0.514	0.941	0.941	2.682	1.496	2.271	2.271	1.496	2.271	2.271	2.271
1:5000		1.622	0.218	0.353	0.353	2.744	0.827	0.988	0.988	0.827	0.988	0.988	0.988
1:10000		0.873	0.067	0.164	0.164	1.587	0.316	0.395	0.395	0.316	0.395	0.395	0.395
1:20000		0.398	0.023	0.050	0.050	0.726	0.097	0.120	0.120	0.097	0.120	0.120	0.120
1:2500	3a	1.207	0.158	0.291	0.291	3.516	3.247	ND	ND	3.247	3.247	ND	ND
1:5000		0.461	0.039	0.114	0.114	3.602	3.594	ND	ND	3.594	3.594	ND	ND
1:10000		0.155	0.011	0.053	0.053	3.224	2.863	ND	ND	2.863	2.863	ND	ND
1:20000		0.054	0.003	0.024	0.024	1.192	0.380	ND	ND	0.380	0.380	ND	ND

(実施例 7)

(競合研究)

以下の競合研究を、NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープが、他の HCV 抗原と異なる抗体を検出するか否かを評価するために実施した。詳細には、NS 3 / 4 a 抗原を、以下のようにして c 2 0 0 抗原と比較した。

【0151】

上記のようにして生成された 0. 5 μ g および 1. 0 μ g の NS 3 / 4 a または c 2 0 0 (Hepatology (1992) 15:19-25、ORTHO HCV Version 3. 0 ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey において利用可能) を、総量 220 μ l (1 $\times$ PBS) で 20 μ l のサンプル PHV 914-5 (感染個体の血液から獲得された初期セロコンバージョンの採血) と混合した。この混合物を、マイクロウェル中で 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。次いでこの混合物を、NS 3 / 4 a コーティングしたプレートに移し、そして 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、そして以下のようにしてアッセイした。

10

20

30

40

50

【0152】

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

【0153】

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

【0154】

【表 6】

10

20

NS34a抗原がc200抗原と比較して早期c33セロコンバージョンパネルにおいて異なる抗体を検出することを示す融合研究

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

表6

(実施例8)

(NS3/4aコンホメーションエピトープの安定性の研究)

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

【0155】

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

【0156】

さらなる安定性の研究を以下の通り実施した。標準的な手順を用いてNS3／4aに対して作製された2つのコンホメーションモノクローナル抗体を、抗HCV初期セロコンバージョンパネルと置き換えた。ストックNS3／4aバイアルを、室温にて3、6、および24時間間隔で保存した。凍結バイアル由来のNS3／4aを90 ng／mlでコーティングし、そして上記の手順を用いてアッセイした。結果は、2つのモノクローナル抗体が実際にコンホメーション抗体であり、そしてそれらの反応性は室温でのストックNS3／4a抗原の操作に対して感受性であったことを示唆した。ポジティブコントロールのモノクローナル抗体の反応性は変化しなかった。

【0157】

10

【表7】

時間(時間)	0	6	21.4	29	35.5	46	52	エンドポイント 参照
	A	D	G	H	I	K	N	
	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co	s/co
PHV 904-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 904-3	1.5	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8
PHV 904-4	3.7	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	4.4
PHV 904-5	4.8	2.0	0.7	0.6	0.3	0.2	0.3	5.5
PHV 904-6	5.4	2.8	1.1	1.0	0.6	0.5	0.6	5.8
PHV 904-7	5.1	3.1	1.5	1.0	1.1	0.5	0.7	5.4
PHV 914-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PHV 914-4	0.5	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7
PHV 914-5	2.1	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
PHV 914-6	2.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4
PHV 914-7	2.8	0.5	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	4.9
PHV 914-8	2.9	0.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	4.9
RFU/分	8.75	4.14	3.08	1.88	1.75	1.75	0.75	

表 7

(実施例 9)

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

10

20

30

40

50

【 0 1 5 8 】

【 0 1 5 9 】

【表 8】

表 8

		NS3/4a vs. 変性NS3/4a					
		*シグナルNS3/4aに対しC2%SDSgeを用いた					
		NS3/4a	dNS3/4a*	c200	NS3/4a	dNS3/4a*	c200
		OD	OD	OD	s/co	s/co	s/co
HCV	PHV 904-1	0.012	0.012	0.009	0.02	0.02	0.01
セロコンバージョン	PHV 904-2	0.011	0.009	0.008	0.02	0.01	0.01
	PHV 904-3	1.124	0.071	0.045	1.180	0.11	0.07
	PHV 904-4	2.401	0.273	0.129	3.85	0.44	0.21
	PHV 904-5	3.022	0.793	0.347	4.35	1.26	0.57
	PHV 904-6	2.711	1.472	0.774	4.35	2.87	1.28
	PHV 904-7	3.294	1.860	0.943	5.28	2.99	1.55
	PHV 914-1	0.006	0.004	0.001	0.01	0.01	0.00
	PHV 914-2	0.005	0.004	0.002	0.01	0.01	0.00
	PHV 914-3	0.098	0.003	0.001	0.16	0.00	0.00
	PHV 914-4	1.118	0.006	0.004	1.79	0.01	0.01
	PHV 914-5	2.035	0.044	0.022	3.26	0.07	0.04
	PHV 914-6	2.092	0.074	0.025	3.35	0.12	0.04
	PHV 914-7	2.519	0.261	0.132	4.04	0.45	0.22
	PHV 914-8	2.746	0.907	0.500	4.40	1.46	0.82
	PHV 914-9	3.084	1.730	0.931	4.94	2.73	1.53
HCV 3.0	ネガティブコントロール	0.023	0.024	0.008			
コントロール	ネガティブコントロール	0.027	0.024	0.007			
	ネガティブコントロール	0.021	0.017	0.005			
	平均	0.024	0.022	0.007			
	カットオフ	0.624	0.622	0.607			
	ポジティブコントロール	1.239	0.903	0.575	1.99	1.45	0.95
	ポジティブコントロール	1.445	0.916	0.614	2.32	1.47	1.01

【 0 1 6 0 】

【表 9】

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

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

【図面の簡単な説明】

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

【図2】図2は、本発明の代表的なイムノアッセイの模式図である。

【図3】図3A～3Dは、本発明のアッセイにおける使用のための代表的なNS3/4aコンホメーション抗原のDNAおよび対応するアミノ酸配列を示す。図3A～3Dの403位および404位のアミノ酸は、HCV-1のネイティブなアミノ酸配列のProのThrでの置換、およびIleのSerでの置換を表す。

【図4】図4は、MEFA7.1の模式図である。

【図5】図5A～5Fは、MEFAのDNAおよび対応するアミノ酸配列を示す。

【図6】図6A～6Cは、本発明のイムノアッセイとともに使用するための代表的なMEFAを示す。図6Aは、MEFA3の模式図である。図6Bは、MEFA5の模式図である。図6Cは、MEFA6の模式図である。

【図7A】図7Aは、psMEFA7の構築の図である。

【図7B】図7Bは、psMEFA7の構築の図である。

【図7C】図7Cは、psMEFA7の構築の図である。

【図7D】図7Dは、psMEFA7の構築の図である。

【図8】図8は、psMEFA7.1の構築の図である。

【図9】図9は、pd.HCV1a.ns3ns4aPIの構築の図である。

【図 1】

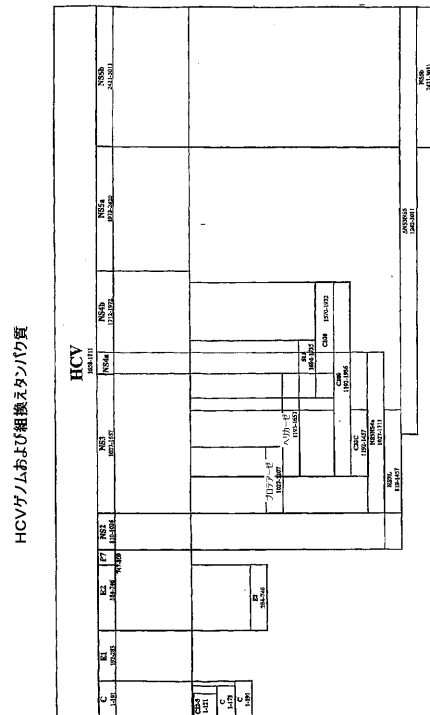


FIG. 1

【図 2】

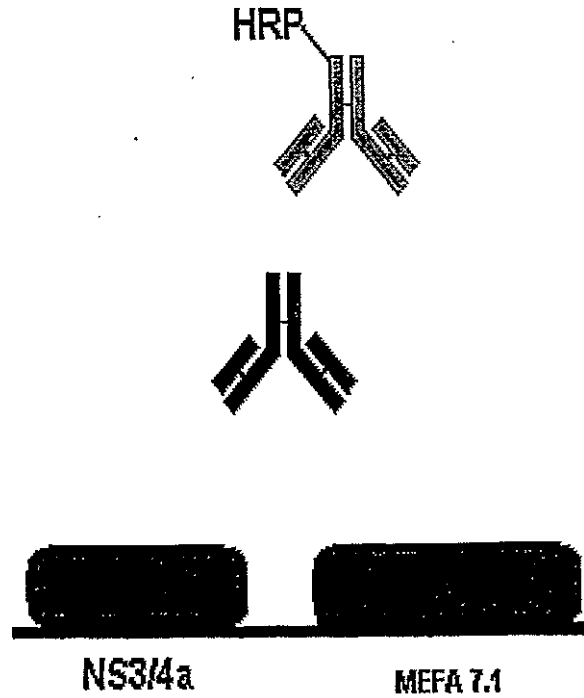


FIG. 2

【図 3 A】

```

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

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

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

40
A Q T F L A T C I N G V C M T
GCC 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
GTC TAC CAC GGG GCC GGA ACG AGG ACC ATC GCG TCA CCC AAG GGT

60
P V I Q M Y T N V D Q D L V G
CCT GTC ATC CAG ATG TAT ACC AAT GTA GAC CAA GAC CTT GTG GGC

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

80
G S S D L Y L V T R H A D V I
GGC TCC TGG GAC CTT TAC CTG GTC ACG AGG CAC GCC GAT GTC ATT

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

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

110
C F A G H A V G I F R A A V C
TGC CCC GCG GCG CAC GCC GTG GGC ATA TTT ATC GGC GCC GCG GTG TGC

120
T R G V A K A V D F I P V E N
ACC COT GGA GTG GCT AAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT GTG GAG AAC

130
L E T T M R S P V F T D N S S
CTA GAG ACA ACC ATG AGG TCC CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT

```

FIG. 3A

【図 3 B】

```

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

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

220
A Q G Y K V L V L H P S V A A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA

230
T L G P G A Y M S K A H G I D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT

240
P N I R T G V R T I T T G S P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC AGC CCC

250
I T Y S T Y G K F L A D G G C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC

260
S G G A Y D I I I C D E C H S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC

270
T D A T S I L G I G T V L D Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GGC ACT GTC CTT GAC CAA

280
A E T A G A R L V V L A T A T
GCA GAG ACT CCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC

290
P P G S V T V P H P H I E E V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT

300
A L S T T G E I P F Y G K A I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC

310
P L E V I K G G R H L I F C H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT

320
S K K K C D E L A A K L V A L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG

```

FIG. 3B

【図 3 C】

390 400
 G I N A V A Y Y R G L D V S V
 GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CCG GGT CTT GAC GTG TCC GTC
 410
 I P P I G D V V V V A T D A L
 ATC CCG CCG ATC GGC GAT GTT GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC
 420 430
 M T G Y T G D F D S V I D C H
 ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GCG GTG ATA GAC TGC AAT
 440
 T C V T Q T V D F S L D P T F
 ACG TGT GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC
 450 460
 T I E T I T L P Q D A V S R T
 ACC ATT GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC CCG ACT
 470
 Q R R G R T G R G K P G I Y R
 CAA CGT CCG GGC AGG ACT GGC AGG GGC AAG CCA GGC ATC TAC AGA
 480 490
 F V A P G E R P S G M F D S S
 TTT GTG GCA CCG GGC GAG CCG CCC TCC GCG ATG TTC GAC TCG TCC
 500
 V L C E C Y D A G C A W Y E L
 GTC CTC TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC
 510 520
 T P A E T T V R L R A Y M N T
 ACG CCC GGC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC
 530
 P G L P V C Q D H L E F W E G
 CCG GGC CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC
 540 550
 V F T G L T H I D A H F L S Q
 GTC TTT ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG
 560
 T K Q S G E N L P Y L V A Y Q
 ACA AAG CAG AGT GGC GAG AAC CTT CCT TAC CTG GTA GCG TAC CAA
 570 580
 A T V C A R A Q A P P P S W D
 GCC ACC GTG TGC GCT AGG GCT CAA GCG CCT CCC CCA TCG TGG GAC

FIG. 3C

【図 3 D】

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

FIG. 3D

【図 4】

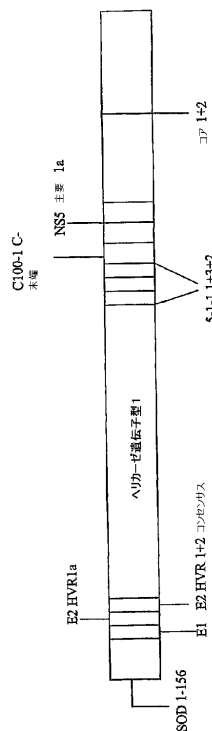


FIG. 4

【図 5 A】

1 10
 M A T K A V C V L K G D G P V
 ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TGG AAG GGT GAC GGC CCA GTT
 20 30
 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 60
 F H V H E F G D N T A G C T S
 TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT
 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 GGC CCA
 80 90
 K D E E R H V G D L G N V T A
 AAG GAT GAA GAG AGG CAT GTT GGA GAC TTG GGC AAT GTG ACT GCT
 100
 D K D G V A D V S I E D S V I
 GAC AAA GAT GGT GTG GCC GAT GTG TCT ATT GAA GAT TCT GTG ATC
 110 120
 S L S G D H C I I G R T L V V
 TCA CTC TCA GGA GAC CAT TGC ATC ATT GGC CCG ACA CTG GTG GTC
 130
 H E K A D D L G K G G N R E S
 CAT GAA AAA GCA GAT GAC TTG GGC AAA GGT GGA AAT GAA GAA AGT
 140 150
 T K T G N A G S R L A C G V I
 ACA AAG ACA GGA AAC GCT GGA AGT CGT TTG GCT TGT GGT GTA ATT
 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
 170 180
 P G H I T G H R M A W K L G S
 CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC CCG ATG GCA TGG AAG CTT GGT TCC
 190
 A A R T T S G F V S L F A P G
 GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC GCC CCA GGT

FIG. 5A

【図 5 B】

200 210
 A K Q N E T H V T G G A A A R
 GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC TTC 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 CCA GGT GCC AGC CAA
 230 240
 N I Q L Y 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 D
 ACA ACC ATG CGA TCT CCG GTG TTC ACG GAT AAC TCC TCT CCA CCA
 260 270
 V V P Q S F Q V A H L H A P T
 GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG CAC GCT CTC CAT GCT CCC ACA
 280
 G S G K S T K V P A A Y A A Q
 GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA GCT CAG
 290 300
 G Y K V L V L N P S V A A T L
 GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA ACA CTG
 310
 G F G A Y M S K A H G I D P N
 GGC TTT GGT GCT TAC TAC TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC
 320 330
 I R T G V R T I T T G S P I T
 ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GGC GAC CCC ATC ACG
 340
 Y S T Y G K F L A D G G C S G
 TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC TCG GGG
 350 360
 G A Y D I I C D E C H S T D
 GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC ACG GAT
 370
 A T S I L G X G T V L D Q A E
 GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATT GAC ACT GTT CTT GAC CAA GCA GAG
 380 390
 T A G A R L V V L A T A T P P
 ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GGC ACC CCT CCG
 400
 G S V T V T P H P N I E E V A L
 GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCA AAC ATC GAG GAG GTT GCT CTG
 410 420

FIG. 5B

【図 5 C】

S T T G H I P F Y G K A I P L
 TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATC CCC CTC
 430
 R V Y K G G R H L I F C H S K
 GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT TCA AAG
 440
 K K C D E L A A K L V A L G I
 AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG GGC ATC
 460
 N A V A Y Y R G L D V S V I P
 AAT GCC GTG GCC TAC TAC CCG GGT CTT GAC GTG TCC GTC ATC CCG
 470 480
 T S G D V V V A T D A L M T
 ACC AGC GGC GAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC ATG ACC
 490
 G Y T G D F D S V I D C N T C
 GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT ACG TGT
 500 510
 V T Q T V D F S L D P T F T I
 GTC ACC CAG ACA GTC GAT TTC AGC CTT GAC CCT ACC TTC ACC ATT
 520
 E T I T L P Q D A V S R T Q R
 GAG ACA ATC ACG CTC CCC CAA GAT GCT GTC TCC GGC ACT CAA CGT
 530 540
 R G R T G R G K P G I Y R F V
 CCG GGC AGG ACT GGC AGG GGG AAG CCA GGC ATC TAC AGA TTT GTG
 550
 A P G E R P S G M F D S S V L
 GCA CCG GGG GAG GGC CCC TCC GGC ATG TTC GAC TCG TCC GTC CTC
 560 570
 C E C Y D A G C A W Y E L T P
 TGT GAG TGC TAT GAC GCA GGC TGT GCT TGG TAT GAG CTC ACG CCC
 580
 A E T T V R L R A Y M N T P G
 GCC GAG ACT ACA GTT AGG CTA CGA GCG TAC ATG AAC ACC CCG GGG
 590 600
 L P V C Q D H L E F W E G V F
 CTT CCC GTG TGC CAG GAC CAT CTT GAA TTT TGG GAG GGC GTC TTT
 610
 T G L T H I D A H F L S Q T K
 ACA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA TCC CAG ACA AAG
 620 630
 Q S G E N L P Y L V A Y Q A T

FIG. 5C

【図 5 D】

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 TGC GCT AGG OCT CAA GCC CCT CCC ACA TCG TGG GAC CAG ATG
 650 660
 W K C L I R L K P T L H G P T
 TGG AAG TGT TTG ATT CGC CTC AAG CCC ACC CTC CAT GGT GGC 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
 680 690
 T H P V T K Y I M T C M S A D
 ACG CAC CCA GTC ACC AAA TAC ATC ATG ACA TGC ATG TCG GGC 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
 710 720
 P D R E V L Y R E F D E M E E
 CCT GAC AGG GAA GTC CTC TAC CGA GAG TTC CAT 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
 740 750
 E Q F K Q K A L G L S R G G K
 GAG CAG TTC AAG CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG
 760
 P A I V P D K B V L Y Q Q Y D
 CCG GCA ATC GTT CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT
 770 780
 E M E B C S Q A A P Y I E Q A
 GAG ATG GAA GAG TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT
 790
 Q V I A H Q F K E K V L G L I
 CAG GTA ATA GCT CAC CAG TTC AAG GAA AAG GTC CTT GGA TTG ATC
 800 810
 D N D Q V V V T P D K E I L Y
 GAT AAT GAT CAA GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT
 820
 E A F D E M E E C A S K A A L
 GAG GCC TTT GAT GAG ATG GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC
 830 840
 I E E G Q R M A E M L K S K I
 ATT GAG GAA GCG CAG CCG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA

FIG. 5D

【図 5 E】

Q G L L G I L R R H V G P G E
 CAA GGC CTC CTC GGG ATA CTG CCG CCG CAC GTT GGT CCT GGC GAG
 850
 G A V Q W M N R L I A F A S R
 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 E S R
 GGG AAC CAT GTT TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CCG
 890 900
 R F A Q A L P V W A R P D Y N
 AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CCG CCG GAC TAT AAC
 910
 P P L V E T W K K P D Y E P P
 CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT
 920 930
 V V H G R S S R R F A Q A L P
 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 CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG
 950 960
 K K P D Y E P P V V H G R K T
 AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC
 970
 K R N T N R R P Q D V K F P G
 AAA CGT AAC ACC AAC CCG CCG CCG GAC GTC AAG TTC CCG GGT
 980 990
 G G Q I V G R E G P P I P K A
 GGC GGT CAG ATC GTT GGT CCG AGG GGC CCT CCT ATC CCC AAG GCT
 1000
 E E 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 1020
 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 F R N T
 GGT AAG CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC
 1040 1050
 N R R P Q D V K F P G G G Q I
 AAC CGA CCG CCG CAG GAC GTC AAG TTT CCG GGT GGC GGT CAG ATC

FIG. 5E

【図 5 F】

[illegible]

FIG. 5F

【図 7 A】

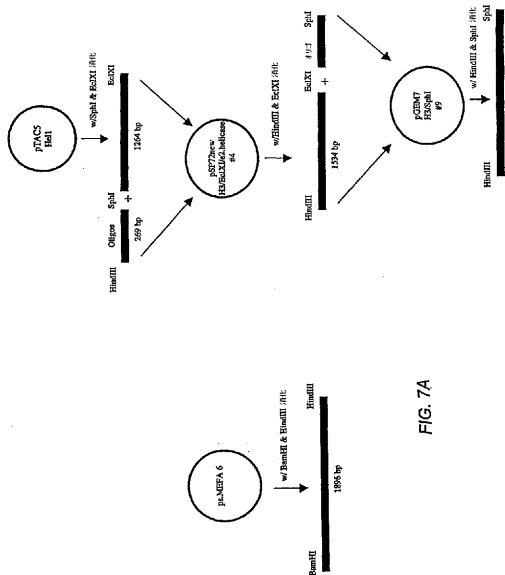


FIG. 7A

【图 6】

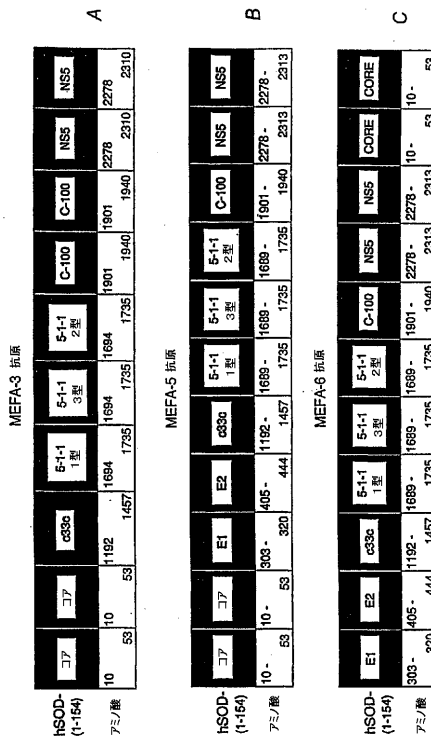


FIG. 6

【图 7 B】

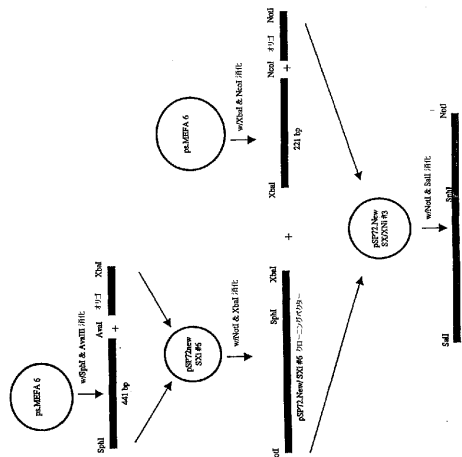
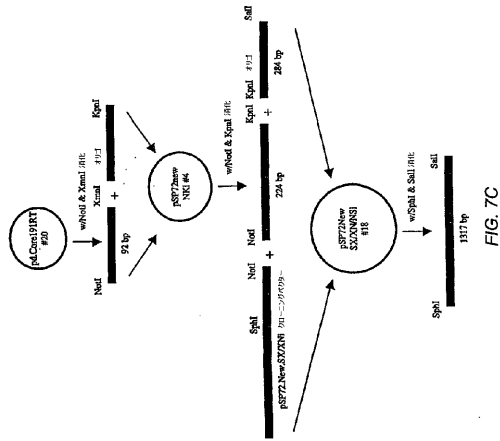
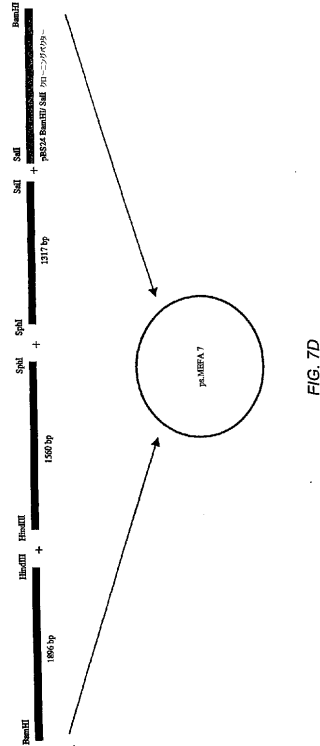


FIG. 7B

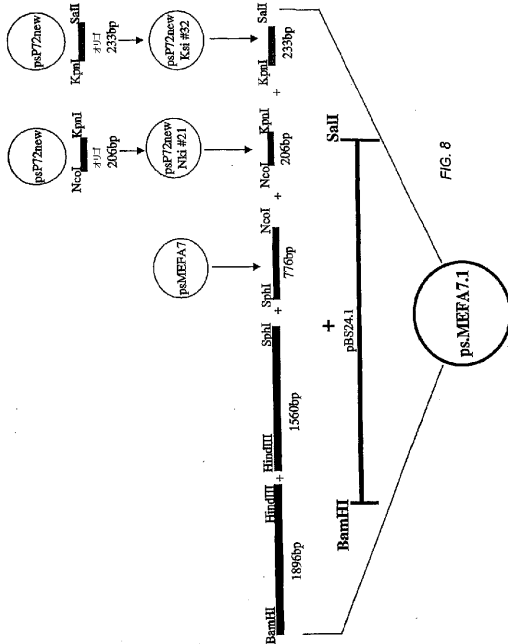
【図 7 C】



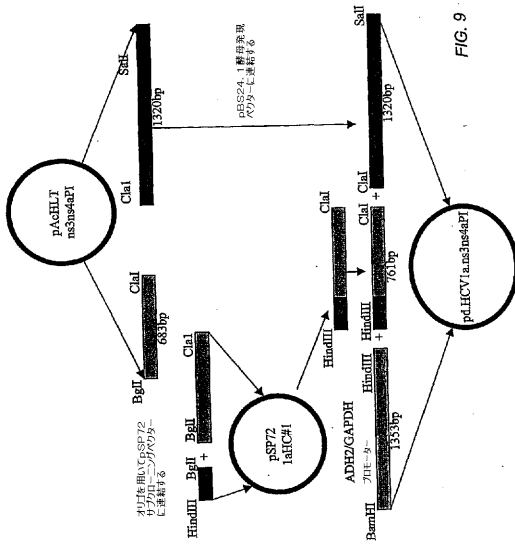
【図 7 D】



【図 8】



【図 9】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/280,867

(32)優先日 平成13年4月2日(2001.4.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 チエン, デイビッド ワイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94507, アラモ, ダグラス コート 1121

(72)発明者 アーカンジェル, フィリップ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94611, オークランド, オークランド アベニュー
567, ナンバー310

(72)発明者 タンデスク, ローラ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94577, サン リアンドロ, メルベン コート 30
5

(72)発明者 ジョージナスシメント, カルロス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94595, ウォルナット クリーク, マグノリア ウェ
イ 2061

(72)発明者 コイト, ドリス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94952, ペタルマ, ロンチャ リンド ドライブ 1
058

(72)発明者 メディナーセルビー, アンジェリカ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94131, サン フランシスコ, ゲイルウッド サーク
ル 136

審査官 山村 様子

(56)参考文献 特開平05-508219 (JP, A)

特表平07-508423 (JP, A)

米国特許第05683864 (US, A)

国際公開第97/044469 (WO, A1)

国際公開第00/07023 (WO, A1)

Structure, 1999年, Vol. 7, No. 11, p. 1353-1363

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

C07K 14/18

C07K 19/00

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 15/09

专利名称(译)	抗HCV抗体的免疫测定		
公开(公告)号	JP4837229B2	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	JP2002510948	申请日	2001-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华Bakushinzu和诊断公司		
[标]发明人	チエンデイビッドワイ アーカンジェルフィリップ タンデスクローラ ジョージナスシエメントカルロス コイトドリス メディナセルビーアンジェリカ		
发明人	チエン, デイビッド ワイ. アーカンジェル, フィリップ タンデスク, ローラ ジョージ-ナスシエメント, カルロス コイト, ドリス メディナ-セルビー, アンジェリカ		
IPC分类号	G01N33/576 C07K14/18 C07K19/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/00 C12N2770/24222 G01N33/5767 G01N2333/18 G01N2469/10 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/576.ZNA.Z		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/212082 2000-06-15 US 60/280811 2001-04-02 US 60/280867 2001-04-02 US		
其他公开文献	JP2004510133A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

NS3 / 4A构象表位，并包括多个表位融合抗原HCV免疫测定，和用于与所述免疫测定中使用的免疫测定固体支持物提供。本发明部分基于以下发现：使用NS3 / 4a构象表位与多表位融合抗原组合提供了用于检测早期HCV血清转换的灵敏且可靠的方法。。本文描述的测定还可以检测由六种已知HCV基因型中的任何一种引起的HCV。使用多个表位的融合蛋白还降低了掩蔽问题，通过允许每个衬底单位面积的表位更多数量的，附加的优点，以改善抗体的检测灵敏度，并改善选择性有。

表 1	
ドメイン	概算の境界 *
C (コジ)	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