

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-512594

(P2005-512594A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 6 3
A 6 1 K 39/29	A 6 1 K 39/29	4 B O 6 4
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 B O 6 5
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/20	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-556514 (P2003-556514)	(71) 出願人	596020794 ペーイーオー・メリュール
(86) (22) 出願日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		フランス国 69280 マルスイーレ トワル (番地なし)
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月30日 (2004.8.30)	(71) 出願人	504249064 イー・エヌ・エス・エ・イール・エム・イ ンスト・ナット・サンテ・エ・ルシエルシ ュ・メディカル
(86) 国際出願番号	PCT/FR2002/004578		フランス・F-75013・パリ・リュ トルビヤック・101
(87) 国際公開番号	W02003/055994	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成15年7月10日 (2003.7.10)	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(31) 優先権主張番号	01.17048		
(32) 優先日	平成13年12月28日 (2001.12.28)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HXHVウイルス、核物質、ペプチド物質および用途

(57) 【要約】

本発明は、以下の特性、(i)少なくとも部分的に1本鎖であるDNAゲノムであり、(ii)前記ゲノムが蛋白質またはポリ蛋白質をコードする少なくとも1個のオープンリーディングフレーム(ORF)を含み、(iii)前記ゲノムが前記配列に属する少なくとも40個のヌクレオチドの各部分について、配列番号1またはその相補的配列と少なくとも90%相同であるヌクレオチド配列を含む特性を有する単離HXHVウイルスに関する。本発明はまた、核材料およびペプチド材料およびそれらの用途に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の特性、

(i)少なくとも部分的に1本鎖であるDNAゲノムであり、

(ii)前記ゲノムが1つの蛋白質または1つのポリ蛋白質をコードする少なくとも1つのリーディングフレーム(ORF)を含み、

(iii)前記ゲノムが、前記配列に属する少なくとも40のヌクレオチドの任意部分について、配列番号1またはその相補配列と少なくとも90%の相同性を示すヌクレオチド配列を含む

を有する単離HXXHVウイルス。

10

【請求項 2】

(iii)の前記配列が、前記配列に属する40のヌクレオチドの任意部分について、配列番号1またはその相補的配列と少なくとも95%の相同性を示すことを特徴とする請求項1に記載のウイルス。

【請求項 3】

(iii)の前記配列が、前記配列に属する40のヌクレオチドの任意部分について、配列番号1またはその相補的配列と少なくとも98%の相同性を示すことを特徴とする請求項1または2に記載のウイルス。

【請求項 4】

ゲノムが配列番号2~6から選択されたペプチド配列をコードする少なくとも1つのリーディングフレームを含むことを特徴とする請求項1から3のいずれか一項に記載のウイルス。

20

【請求項 5】

請求項1から4のいずれか一項に記載のHXXHVウイルスのゲノムから得られることができる核酸配列。

【請求項 6】

配列番号1またはその相補的配列に属する少なくとも12の連続したヌクレオチドのヌクレオチド配列を含む、またはそれから構成されることを特徴とするDNAヌクレオチド断片。

【請求項 7】

配列番号1またはその相補的配列に属する少なくとも15の連続したヌクレオチドを含む、またはそれから構成されることを特徴とする請求項6に記載の断片。

30

【請求項 8】

配列番号1またはその相補的配列に属する少なくとも18の連続したヌクレオチドを含む、またはそれから構成されることを特徴とする請求項6または7に記載の断片。

【請求項 9】

配列番号1またはその相補的配列に属する少なくとも21の連続したヌクレオチドを含む、またはそれから構成されることを特徴とする請求項6から8のいずれか一項に記載の断片。

【請求項 10】

前記連続したヌクレオチドが配列番号1のヌクレオチド813から開始してヌクレオチド1361で終わる部分または相補的断片に属することを特徴とする請求項6から9のいずれか一項に記載の断片。

40

【請求項 11】

前記連続したヌクレオチドが配列番号1のヌクレオチド927から開始してヌクレオチド968で終わる部分または相補的断片に属することを特徴とする請求項6から9のいずれか一項に記載の断片。

【請求項 12】

配列番号1またはその相補的断片を含むか、またはそれから構成されることを特徴とする請求項6から11のいずれか一項に記載の断片。

50

【請求項 1 3】

請求項6から12のいずれか一項に記載された断片またはその相補的断片の転写産物。

【請求項 1 4】

請求項6から12のいずれか一項に記載の断片またはその相補的断片を含むか、またはそれから構成されることを特徴とするDNA分子。

【請求項 1 5】

請求項13に記載の転写産物を含むか、またはそれから構成されることを特徴とするRNA分子。

【請求項 1 6】

ポリペプチド配列が請求項1から4までのいずれか一項に記載のHXHVウイルスのゲノムによってコードされたポリペプチド。 10

【請求項 1 7】

配列番号5に属する少なくとも7のアミノ酸のペプチド配列を含むか、またはそれから構成されるペプチド断片。

【請求項 1 8】

配列番号5を含むか、またはそれから構成されることを特徴とする請求項17に記載の断片。

【請求項 1 9】

配列番号5に属するせいぜい15のアミノ酸のペプチド配列を含むか、またはそれから構成されることを特徴とする請求項16に記載の断片。 20

【請求項 2 0】

配列番号6を含むか、またはそれから構成されることを特徴とする請求項17または18に記載の断片。

【請求項 2 1】

アミノ酸6個から10個、または8個から12個のペプチド配列を含むか、またはそれから構成され、前記アミノ酸が配列番号5に属することを特徴とする、請求項17または19に記載の断片。

【請求項 2 2】

発現に必要なエレメントの制御下に置かれた請求項5に記載の核酸配列、または請求項6から12のいずれか一項に記載の断片、または請求項14に記載のDNA分子の発現を可能にする、原核生物または真核生物から得られた細胞で機能する発現カセット。 30

【請求項 2 3】

請求項22に記載の発現カセットを含むベクター。

【請求項 2 4】

請求項22に記載の発現カセットまたは請求項23に記載の発現ベクターを含む原核生物または真核生物由来の細胞。

【請求項 2 5】

COSおよびCHO細胞から選択された真核生物から得られることを特徴とする請求項24に記載の細胞。

【請求項 2 6】

*Saccharomyces cerevisiae*および*Pichia Pastoris*細胞から選択された低級真核生物から得られることを特徴とする請求項24に記載の細胞。 40

【請求項 2 7】

請求項22に記載の発現カセット、請求項23に記載のベクター、または請求項24から26のいずれか一項に記載の細胞によって生成することができるポリペプチド。

【請求項 2 8】

請求項24から26のいずれか一項に記載された宿主細胞を適切な培養培地で培養し、生成した前記ポリペプチドを必要な純度まで精製する、請求項16に記載のポリペプチドまたは請求項17から20のいずれか一項に記載のポリペプチド断片の調製方法。

【請求項 2 9】

請求項16または27に記載されたポリペプチドまたは請求項17から20のいずれか一項に記載されたペプチド断片から成る免疫原性ポリペプチド。

【請求項30】

配列番号6から成ることを特徴とする請求項29に記載のポリペプチド。

【請求項31】

哺乳類動物を請求項29または30に記載の免疫原性ペプチドで免疫することによって得ることができるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体。

【請求項32】

請求項6または27に記載のポリペプチドまたは請求項17から20、29および30のいずれか一項に記載のポリペプチド断片を含むことを特徴とする診断組成物。

10

【請求項33】

請求項31に記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含むことを特徴とする診断組成物。

【請求項34】

HXHVウイルスに感染している、または感染した可能性が疑われる生物試料を、抗体-抗原複合体形成を可能にする所定の条件下で、請求項32に記載の診断組成物と接触させ、かつ前記複合体形成を検出する、請求項1に記載のHXHVウイルス、または少なくとも請求項16または27に記載のポリペプチドまたは請求項17から20のいずれか一項に記載のポリペプチド断片に対する抗体の検出方法。

【請求項35】

生物試料を、抗体-抗原複合体形成を可能にする所定の条件下で、請求項32に記載の診断組成物と接触させ、かつ前記複合体形成を検出する、生物学的試料中の請求項16または17に記載のポリペプチドまたは請求項17から20のいずれか一項に記載のポリペプチド断片の検出方法。

20

【請求項36】

適切な媒体および/またはアジュバントおよび/または希釈剤および/または薬剤として許容される賦形剤と一緒にした請求項16または27に記載のポリペプチド、または請求項17から20、29または30のいずれか一項に記載のポリペプチド断片、または請求項1に記載のHXHVウイルスを含むことを特徴とする免疫原性またはワクチン組成物。

【請求項37】

請求項5に記載の核酸配列、または請求項6から12のいずれか一項に記載のヌクレオチド断片、または請求項14または15に記載のDNAまたはRNA分子とハイブリダイズでき、前記ハイブリダイゼーションは検出すべきプローブ-核酸配列複合体の T_m (融解温度)より低いほぼ12 から20 の間で選択された温度および塩濃度の組み合わせに対応する厳密な条件下で実施されることを特徴とする少なくとも12のヌクレオチドのプローブ。

30

【請求項38】

請求項5に記載の核酸配列、または請求項6から12のいずれか一項に記載のヌクレオチド断片、または請求項14または15に記載のDNAまたはRNA分子とハイブリダイズでき、前記ハイブリダイゼーションが増幅および/または検出すべきプライマー-核酸配列複合体の T_m (融解温度)より低いほぼ12 から20 の間で選択された温度および塩濃度の組み合わせに対応する厳密な条件下で実施されることを特徴とする少なくとも12のヌクレオチドのプライマー。

40

【請求項39】

配列番号19から22のいずれか1つから選択されたことを特徴とする、請求項5に記載の核酸配列、または請求項6から12のいずれか一項に記載のヌクレオチド断片、または請求項14に記載のDNA分子とハイブリダイズすることができるプライマー。

【請求項40】

請求項5に記載の核酸配列、または請求項6から12のいずれか一項に記載のヌクレオチド断片、または請求項14または15に記載のDNAまたはRNA分子に結合できることを特徴とする抗核酸抗体。

50

【請求項 4 1】

請求項37、38、39および40に記載の少なくとも1つのプローブまたは少なくとも1つのプライマーまたは少なくとも1つの抗核酸抗体を含むことを特徴とする診断組成物。

【請求項 4 2】

生物試料からDNAまたはRNAを抽出するために、必要であれば前記試料を処理して、定義した厳密な条件下で、前記試料を請求項37、38または39に記載の少なくとも1つのプローブまたは少なくとも1つのプライマーと接触させ、試料中におけるウイルスDNAまたはRNAの存在を前記ウイルスDNAまたはRNAと少なくとも1つのプローブとのハイブリダイゼーションを示すこと、または前記DNAまたはRNAの増幅のいずれかによって検出する、生物試料中のウイルスDNAまたはRNAの検出方法。

10

【請求項 4 3】

血清または血漿試料を患者から収集して、前記試料からDNAおよび/またはRNAを抽出するために、必要であれば前記試料を処理して、前記試料を請求項31に記載の少なくとも1つの抗核酸抗体と接触させて、前記抗体は場合によっては適切なマーカーで標識されており、核酸/抗体複合体の形成を示す、ウイルスDNAおよび/またはRNAの検出方法。

【請求項 4 4】

少なくとも1つのポリペプチドまたは請求項16から20、29および30のいずれか一項に記載の1つのポリペプチド断片をコードするDNA配列を含み、前記DNAは適切な媒体および/または希釈剤と混合された、ワクチン組成物。

【請求項 4 5】

治療上、またはワクチンとして関心のある少なくとも1つの遺伝子を含むベクターであって、前記遺伝子は特に、

20

(i)請求項16から20、29および30のいずれか一項に記載の少なくとも1つのポリペプチドまたはポリペプチド断片、または

(ii)(i)に記載の少なくとも1つのポリペプチドまたはポリペプチド断片に結合することができるポリクローナルまたはモノクローナル抗体の少なくとも全部または一部、または

(iii)(i)に記載の少なくとも1つのポリペプチドまたはポリペプチド断片を阻害する少なくとも1つの分子、または

(iv)(i)に記載の少なくとも1つのポリペプチドまたはポリペプチド断片に結合し、および/またはその機能を阻害することができる少なくとも1つのリガンドまたはリガンドの任意部分のいずれか

30

をコードするベクター。

【請求項 4 6】

特に、請求項45に記載のベクターを含むこと、および関心のある前記遺伝子を *in vivo* でのその発現を確実にするエレメントの制御下に置くことを特徴とする治療組成物またはワクチン組成物。

【請求項 4 7】

請求項5で記載された少なくとも1つの核酸配列または請求項6から12のいずれか一項で記載された少なくとも1つのヌクレオチド断片または請求項14で記載された少なくとも1つのDNA分子あるいは請求項45で記載されたベクターで形質転換された、特に真核細胞、たとえばCOSおよびCHO細胞および低級真核細胞、たとえば酵母細胞、特に *Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia pastoris* から得られた細胞から選択された遺伝子的に改変された細胞。

40

【請求項 4 8】

請求項47に記載の細胞を含むことを特徴とする医薬組成物またはワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

肝炎は最も重要な伝染性疾患である。最も多い伝染様式は、輸血、臓器移植および血液

50

透析であるが、肝炎はまた、汚染した食品または水を摂取することによって、および個人間の接触によって伝染することができる。

【背景技術】

【0002】

ウイルス性肝炎は、ゲノムおよび複製様式によって互いに区別できる様々なウイルス病原体によって誘導される。ウイルス性肝炎は、様々な重症度の障害を肝臓に引き起こす。世界中で10億人以上の人々がウイルス性肝炎に罹患している。肝硬変または肝癌に進行し得る慢性型肝炎には重度の危険性が存在する。ウイルス性肝炎は、詳細に明らかにされた症状、たとえば黄疸、高トランスアミナーゼ濃度(アスパラギン酸トランスアミナーゼまたはAST、アラニントランスアミナーゼまたはALT、乳酸脱水素酵素またはLDH)および肝臓病変を検出することによって診断することができる。様々な肝炎ウイルスA、B、C、D、E、GおよびTTVが知られているにもかかわらず、肝炎全体の5%、劇症肝炎の40%が未解明のままなので、未知の肝炎ウイルスが存在すると推測される。これらの原因不明の肝炎は、輸血後に生じ、散発型、慢性型または劇症型である。これらは通常、肝炎Xと呼ばれる。

10

【0003】

肝炎G(GBV-A、GBV-B、GBV-C)およびTTVウイルスは最近、ヒトにおいては病原性がないらしいことが確認されたので、これらで原因不明の肝炎、または肝炎Xの症例を説明することはできない。

【0004】

インターフェロン治療によってトランスアミナーゼを正常化することができた患者における原因不明の重篤な肝炎1例から、本発明者等は、「RDA」(Representational Difference Analysis)サブトラクションハイブリダイゼーション技術によって、トランスアミナーゼピーク時の血清とトランスアミナーゼ正常化後の血清の間で異なって示される核酸をクローニングすることができた。トランスアミナーゼピーク時の血清に特異的なDNA配列を表す643個のクローンをスクリーニングした。ヒトゲノムまたはその他のあらゆる公知の配列との相同な可能性を排除するために、様々な経路を検討した。

20

・643個のクローンと「ヒトゲノムDNA」ゾンデとのハイブリダイゼーションによって、593個のクローンが「ヒトゲノムDNA」プローブとハイブリダイズし、50個のクローンが「ヒトゲノムDNA」とハイブリダイズせず、挿入部を含むことを示すことを可能にした。

・NCBIサイトのBLASTプログラムをサイトによって与えられた変数に従って使用し、これらの50個のクローンの配列と公表された配列との間にあり得る相同性についてデータベースを検索した。

30

・放射活性標識「ヒトゲノムDNA」プローブを使用して選択したクローンのDNAに対する「ドットプロット」によって、およびプローブとして選択した放射標識クローンを使用したヒトゲノムDNAのサザンプロットングによって、前段階で選択した4個のクローンをさらにスクリーニングした。

【0005】

これらの様々な段階の最後に、データベースでは配列がわからない2個のDNAクローンを選択した。クローニングした配列内で実施したPCRによって、血液提供者から得たヒトゲノムDNAについて試験して、結局、ヒトゲノムDNAおよびデータベースに存在するあらゆる配列との相同性が欠如した1400塩基対の挿入部を含有する1個のクローンを選択した。このクローンの配列をXHと称した。この配列はGCに富み(62%)、4個のオープンリーディングフレームを有する。次に、この単離した配列について4種類の実験を平行して行い特徴づけた。

40

・生物学的臨床研究および疫学的研究。

・分子についての研究。

・特異的抗体の産生。

・電子顕微鏡による研究。

【0006】

結果によって、以下のことが示される。

50

- ・特異的プライマーを使用したPCRによって、XH配列は研究に用いた原因不明の慢性肝炎を有する患者(試験した110人の患者のうち)10%において見いだされる。
 - ・この配列は、クローニングしたXH配列に特異的な同様のPCRによって試験した血液提供者にはない。
 - ・この配列は、少なくとも部分的に一本鎖であるDNA配列である。
 - ・これはいくつかのリーディングフレームを有し、このリーディングフレームのうち1つは21kDの蛋白質をコードし、この蛋白質は抗体産生を誘導するために必要な免疫原性および親水特性の全てを示す領域を備えている。
 - ・PCRによってXH配列(XH⁺)が陽性の非A-E患者の血清のスクロース勾配分画によって、XH配列が陽性の2つの連続した画分(1.3~1.5g/cm³)の単離が可能となり、その中で大きさや規則性がウイルス病原体と適合した粒子が検出された。これらの粒子は、PCRによってXH配列が陰性の勾配画分では認められない。この新規感染性病原体はHXHVと呼ばれた。
- 【非特許文献1】Kramer A他、(Molecular Immunology, Vol.32, No.7, 459~469頁(1995))
- 【非特許文献2】Kohler G and Milstein C.(1975): Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256:495~497
- 【非特許文献3】Galfré G.ほか(1977) Nature, 266: 522~550
- 【非特許文献4】Roda A., Bolelli G.F.: Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, 449~454(1980)
- 【非特許文献5】Jones他、Nature 321:522-525 (1986) 20
- 【非特許文献6】Reichmann他、Nature 332: 523-329 (1988)
- 【非特許文献7】Presta他、Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)
- 【非特許文献8】Blazar他、1997、Journal of Immunology 159: 5821-5833
- 【非特許文献9】Bird他、1988, Science 242: 423-426
- 【非特許文献10】Arakawa他、1996, J. Biochem 120: 657-662
- 【非特許文献11】Chaudray他、1989, Nature 339: 394-497
- 【非特許文献12】Remington's Pharmaceutical Sciences 16th著、Mack Publishing Co
- 【非特許文献13】Gerge H. Keller and Mark M. Manak、DNAPROBES、第2版、Stockton Press, 1193, 45 West 24th St., New York, N.Y. 10010 USA 30
- 【非特許文献14】Wallace R.B他、DNA. Nucleic. Acid. Res. 6, 3543-3557(1997)
- 【非特許文献15】Wallace R. B他、Science, 209, 1396-1400(1980)
- 【非特許文献16】Itakura K. and Riggs A.D., Science, 209, 1401-1405(1980)
- 【非特許文献17】Suggs S.V.他、PNAS, 78, 6613-6617(1981)
- 【非特許文献18】Wallace R.B他、DNA. Nucleic. Acids. Res., 9,3647-3656(1981)
- 【非特許文献19】Wallace R.B他、DNA. Nucleic. Acids. Res., 9, 879-894(1981)
- 【非特許文献20】Conner B.J.他、PNAS, 80, 278-282(1983)
- 【非特許文献21】Philippe Cros他、Nucleic Acides Researc, 1994, Vol.22, No.15, 2951-2957
- 【非特許文献22】Anderson, W.F.他、(1988) Bioessays, 8(2), 69-74 40
- 【非特許文献23】Lee, J.S.他、(1984) FEBS Lett., 168, 303-306
- 【非特許文献24】Malfoy, B.他、(1982) Biochemistry, 21(22), 5463-5467
- 【非特許文献25】Stollar, B.D.他、J.J.(著)Methods in Enzymology, Academic Press, pp70-85
- 【非特許文献26】Traincard, F.他、(1989) J. Immunol. Meth., 123, 83-91
- 【非特許文献27】Traincard, F.他、(1989) Mol. Cell. Probes, 3, 27-38)
- 【非特許文献28】Chemin他、J of hepatol., 2001
- 【非特許文献29】Minoru Shibata他、The Journal of Infectious Diseases 2001, 184: 400-404
- 【発明の開示】 50

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明は、単離HXHVウイルスに関し、HXHVから得ることができる核酸およびポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、ウイルス性肝炎を有することが疑われる患者または動物のHXHVウイルス感染を診断する手段および感染に関連した疾患を予防または治療する医薬組成物またはワクチン組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、本発明は、

-以下の特性

(i)少なくとも部分的に1本鎖であるDNAゲノム、

(ii)前記ゲノムが1個または複数の蛋白質またはポリ蛋白質をコードする1個または複数のリーディングフレーム(ORF)を含み、

(iii)前記ゲノムが配列番号1の配列または配列番号1と相補的な配列とハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を含み、好ましくは、前記ゲノムは、前記配列に属する少なくとも40個のヌクレオチドの任意部分について、配列番号1またはその相補的配列と少なくとも90%、有利には少なくとも95%、さらに少なくとも98%の相同性を示すヌクレオチド配列を有することを示す単離HXHVウイルス、

-HXHVウイルスのゲノムまたは前記ゲノムの断片から得ることができる核酸配列、または配列番号1または配列番号1に相補的な配列に相同な核酸配列で、配列番号1で表される配列の長さ全体にわたって少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、有利には少なくとも98%の相同性を示し、前記ウイルスが前記で定義された特性を有する核酸配列、

-配列番号1のDNAヌクレオチド配列または配列番号1で表される配列に対して少なくとも90%、たとえば少なくとも95%または98%の相同性を示すヌクレオチド配列またはそれらの相補的DNA配列または前記DNAヌクレオチド配列の転写産物の少なくとも12個の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも15個または18個の連続したヌクレオチド、有利には少なくとも21個の連続したヌクレオチドのDNAまたはRNAヌクレオチド配列を含む、またはそれから構成されるDNAまたはRNAヌクレオチド断片、特に、前記連続ヌクレオチドが以下の部分、配列が配列番号1のヌクレオチド813から開始しヌクレオチド1361で終了する部分、および配列が配列番号1のヌクレオチド927から開始しヌクレオチド968で終了する部分の1つに属する断片、その相補的断片および前記断片の転写産物および配列番号1またはその相補的DNA配列または配列番号1の転写産物である配列を含むか、またはそれから構成される断片、

-配列番号1で表されるDNAヌクレオチド配列を含む、またはそれから構成されるか、または前記で定義したような少なくとも1個のDNAヌクレオチド断片またはその相補的配列を含むDNA分子、

-配列番号1で表されるDNAヌクレオチド配列または前記で定義したような少なくとも1個のその断片またはそれらの相補的配列の転写産物であるRNAヌクレオチド配列を含むか、またはそれから構成されるRNA分子に関する。

【0009】

前記相同体は、配列番号1の配列に機能的同等物(functional equivalents)、すなわち、少なくとも1個のコドンをも他のコドンと置換しても同一のアミノ酸をコードすることができるDNA配列をカバーする。これは、遺伝子コードの縮重と呼ばれる。要するに、アルギニン、セリンおよびロイシンのコードの縮重数は6を示し(すなわち、これらそれぞれに対して6個の異なるコドンが存在する)、一方その他のアミノ酸、たとえばグルタミン酸、グルタミン、チロシン、ヒスチジンおよびその他少数の縮重数は2である。アミノ酸全てのうち、トリプトファンおよびメチオニンのみは縮重数は1である。したがって、配列がたとえば配列番号6で表されるポリペプチドを発現するためには、コドン組成が配列番号1で表された核酸配列とは異なる変種および機能的核酸配列を使用することが可能であることは明らかである。

10

20

30

40

50

【0010】

前記で定義した相同性はまた、HXHVウイルスの変異体、特に天然の変動によって得られた変異体に関する。実際に、ウイルスが比較的高い程度で自然発生的に、または誘導的に変異することは専門家には周知である。

【0011】

本発明はまた、

-HXHVウイルスのゲノムまたは前記ゲノムの断片、またはそれらの機能的同等物または配列番号1で表される配列に対して少なくとも90%の相同性、好ましくは少なくとも95%の相同性、有利には少なくとも98%の相同性を示すヌクレオチド配列によってコードされること、およびウイルスが前記で決定した特性を備えていることを特徴とするポリペプチド配列またはその断片の少なくとも1個を含むポリペプチド、

10

-配列番号5で示されるペプチド配列または配列番号5と機能的に対応するペプチド配列の少なくとも4個のアミノ酸、好ましくは少なくとも5個または6個のアミノ酸、有利には少なくとも7個のアミノ酸、さらに好ましくは多くて15個のアミノ酸、特に6個から15個のアミノ酸、有利には6個から10個、または8個から12個のアミノ酸のペプチド配列を含むか、またはそれから構成されることを特徴とするポリペプチド断片。本発明者等は特に、配列番号5には、必要な免疫原性および液性応答を誘導するために必要な親水特性を表すアミノ酸14個の領域があることを示した。アミノ酸14個のこのポリペプチドは、配列番号6として同定される。彼らはまた、慢性非A非E肝炎の患者において抗HXHV抗体を検出するためのELISA試験方法を開発することができたので、アミノ酸14個のこのポリペプチドが配列番号5で表される配列の抗原領域に対応することを示した。有利なポリペプチド断片は、配列番号6または配列番号6と機能的に対応するポリペプチド配列を含むか、またはそれから構成される、

20

-配列番号5または配列番号5と機能的に対応するペプチド配列で示されるペプチド配列を含むか、またはそれから構成されるポリペプチド断片に関する。

【0012】

「ポリペプチド」とは、連続した様々な数のアミノ酸、たとえば、オリゴヌクレオチド、蛋白質、融合蛋白質、融合ペプチド、合成ペプチドを有する単離された状態のペプチドのことである。ポリペプチドは、当業者に周知の様々な技術によって、特に化学合成法または遺伝子組み換え技術によって得ることができる。本発明によるポリペプチドは、従来の合成法、たとえば自動ペプチド合成機で、または前記ポリペプチドをコードするDNA配列をプラスミドまたはウイルスなどの発現ベクターに挿入し、この発現ベクターで細胞を形質転換して、これらの細胞を培養することを含む遺伝子操作技術によって得ることができる。

30

【0013】

参照ペプチド配列に対応するペプチド配列と言う表現は、改変によって実質的に前記参照ペプチド配列の免疫反応特性を維持するか、または生じさえすれば、1個または複数のアミノ酸の挿入および/または欠失および/または置換および/または伸長および/または短縮および/または化学修飾によって改変されたアミノ酸配列を意味すると理解される。

【0014】

したがって、配列番号5の免疫反応特性を維持した発現機能的に対応する配列は、特に1個または複数のアミノ酸が1個または複数の他のアミノ酸によって置換された配列、1個または複数のL型のアミノ酸が1個または複数のD型のアミノ酸と置換された配列、およびその逆の配列、アミノ酸側鎖の改変、たとえば、アミン官能基のアセチル化、チオール官能基のカルボキシル化、カルボン酸官能基のエステル化、ペプチド結合の改変、たとえば、カルバ、レトロ、インベルソ、レトロ-インベルソ、還元およびメチレンオキシ結合を導入した配列を意味するものと理解される。

40

【0015】

たとえば、本発明のポリペプチドの配列の1個または複数のアミノ酸は、機能的同等物として作用をする極性が類似した1個または複数のその他のアミノ酸によって置換するこ

50

とが可能である。関心のあるポリペプチド配列におけるアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属する種類のその他の構成要素から決定することができる。たとえば、非極性(疎水性)アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが含まれる。正電荷を持つ(塩基性)アミノ酸には、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが含まれる。負電荷を持つ(酸性)アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。関心のあるポリペプチド配列におけるアミノ酸のその他の置換は、Kramer A他、(Molecular Immunology, Vol.32, No.7, 459~465頁(1995))による文献に含まれる情報から決定することができる。これらの著者等は、組み合わせによって分子の数が急増する問題を抑えるため、同様の物理化学的特性を有するアミノ酸から構成されるアミノ酸群を使用したバンクを設定しており、本発明において主に同等物と見なされるアミノ酸を以下に挙げたこれらの6群それぞれと一緒にグループ分けした。

群1:アラニン、プロリン、グリシン

群2:アスパラギン酸、グルタミン酸

群3:ヒスチジン、リジン、アルギニン

群4:アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン

群5:フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン

群6:イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン

【0016】

参照ペプチド配列に対するペプチド配列の対応は、パーセントで表した前記参照配列との同一性または相同性によって確認することができる。このパーセントは、2種類の配列を整列させて、一方を他方に対して移動して、2種類の配列のアミノ酸を比較することによって、所与の数の隣接したアミノ酸の配列について決定する。同一性のパーセントは、同じ位置における参照配列のアミノ酸と同一なアミノ酸の数から決定する。パーセント相同性は、同じ位置における参照配列のアミノ酸に対応するアミノ酸の数から決定する。

【0017】

本発明はまた、発現に必要なエレメントの制御下に置かれた前述のような核酸配列またはDNA配列またはDNA分子の発現を可能にする原核生物または真核生物から得られた細胞で機能する発現カセットに関する。この発現カセットの特徴は、原核生物、特にE.coli、または真核または低級真核生物、特にCOSおよびCHO細胞およびSaccharomyces cerevisiae細胞およびPichia pastoris細胞から得られた細胞で機能することである。

【0018】

本発明はまた、前記発現カセットを含むベクター、前記で定義した発現カセットまたはベクターを含む原核生物、たとえばE.coliまたは真核生物、好ましくは真核または低級真核生物から得られた細胞、有利にはCOSまたはCHO細胞またはSaccharomyces cerevisiaeまたはPichia pastorisから得られた細胞、および該発現カセット、該ベクターまたは該細胞によって産生したポリペプチドに関する。

【0019】

本発明の課題は、前記の定義を満足させる宿主細胞を適切な培養培地中で培養すること、前記宿主細胞は、前記で定義したDNA核酸配列または前記で定義したDNA核断片または前記で定義したDNA分子を含有する発現ベクターで形質転換されていること、および産生した前記ポリペプチドを必要な程度まで精製することから成る前記で定義したポリペプチドまたはポリペプチド断片の調製方法である。

【0020】

本発明の課題はまた、ペプチド配列を有すること、または前記で定義したポリペプチド、特に配列番号6で表されるポリペプチドから構成されることを特徴とする免疫原性ポリペプチドである。このような免疫原性ポリペプチドは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体または前記抗体の断片産生のために使用し、本発明には哺乳類動物(ウサギ、ラット、マウス)をこのような免疫原性ポリペプチドで免疫することによって得られた

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体またはそれらの断片が含まれる。

【0021】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の産生は当業者には周知である。モノクローナル抗体の産生については、Kohler G and Milstein C. (1975): Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* 256:495-497およびGalfré G.他 (1977) *Nature*, 266: 522-550、ポリクローナル抗体の産生については、Roda A., Bolelli G.F.: Production of high-titer antibody to bile acids, *Journal of Steroid Biochemistry*, Vol. 13, pp 449-454 (1980)を参照することによって説明することができる。抗体はまた、マウス、ラットまたはウサギをHXHVウイルス粒子で免疫することによって産生することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を産生するために、免疫原を免疫用支持物としての血清アルブミン(ペプチドSA)またはスカシガイのヘモシアニン(ペプチドKLH)に結合させることができる。本発明の場合、配列番号6で同定された免疫原をBSA(牛血清アルブミン)に結合する。動物に数回免疫原を注射し、抗体を血清から収集し、精製して(「正常な」肝粉末と接触させて)、次に通常の技術、たとえばELISAまたはウェスタンブロット試験を使用して特異性をスクリーニングする。モノクローナル抗体を産生するためには、フロインド完全アジュバントを使用して動物に免疫原の注射を受けさせる。免疫した動物から得られた血清およびハイブリドーマ培養上清は、従来技術、たとえばELISAまたはウェスタンブロット試験を使用して、その特異性および選択性を分析する。最も特異的で、最も敏感な抗体を産生するハイブリドーマを選択する。モノクローナル抗体はまた、作製したハイブリドーマを細胞培養することによって *in vitro*において、またはこのハイブリドーマをマウスに腹腔内注射した後腹水から回収することによって生成することができる。上清、または腹水のような産生様式の如何に関わらず、次に抗体を精製する。使用した精製方法は、主にイオン交換ゲルおよび排除クロマトグラフィまたはアフィニティクロマトグラフィ(プロテインAまたはG)による濾過である。最も有効な抗体を同定するために、十分な数の抗体を機能試験によってスクリーニングする。抗体、抗体断片または抗体誘導体、たとえば遺伝子操作によって生成したキメラ抗体の *in vitro*産生は、当業者には周知である。ヒト化抗体を使用することは有利である。非ヒト抗体、たとえばマウス抗体の「ヒト」型は、非ヒトイムノグロブリンから得られた最小限の配列を含むキメラ抗体である。多くの場合、ヒト化抗体とは、受容体の超可変領域の残基が非ヒト提供種(提供抗体)、たとえば、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の超可変領域の残基で置換され、所望する特異性、親和性および能力を有するヒトイムノグロブリン(受容体抗体)である。いくつかの場合では、ヒトイムノグロブリンのFv領域の残基(FR)は対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体には、受容抗体または提供抗体には見いだされない残基を含めることができる。これらの改変は、抗体の性能を高めるために実施される。一般的に、ヒト化抗体には、少なくとも、および好ましくは、超可変領域ループの全てまたはほとんど全てが非ヒトイムノグロブリンに対応し、FR領域の全てまたはほとんど全てがヒトイムノグロブリンのものである2個の可変ドメインが含まれる。ヒト化抗体はまた、場合によっては少なくともイムノグロブリン、たとえばヒトイムノグロブリンの定常(Fc)領域の少なくとも一部を含んでよい(Jones他、*Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann他、*Nature* 332: 323-329 (1988);およびPresta他、*Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992))。

【0022】

より具体的には、発現抗体断片とは天然抗体のF(ab)₂、Fab、Fab'、sFv断片(Blazar他、1997、*Journal of Immunology* 159: 5821-5833およびBird他、1988、*Science* 242: 423-426)のことを意味するものと理解され、得られた発現とは、特に天然抗体のキメラ誘導体を意味するものと理解される(たとえば、Arakawa他、1996、*J. Biochem* 120: 657-662およびChaudray他、1989、*Nature* 339: 394-397参照)。これらの抗体断片および抗体誘導体は、選択的に標的抗原に結合する能力を保持している。

【0023】

こうして得られたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体またはその断片は、生

10

20

30

40

50

物試料中の前記で定義したような少なくとも1種のポリペプチドまたは1種のポリペプチド断片を検出する方法で使用する診断組成物に組み込まれ、それによって抗体/抗原複合体の形成を可能にする所定の条件下で生物試料を組成物と接触させ、前記複合体を検出する。

【0024】

本発明の課題はまた、前記で定義したポリペプチドまたはポリペプチド断片を含む診断組成物、およびHXHVウイルスまたは少なくとも本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片に特異的な抗体を検出する方法で、それによって、HXHVウイルスに感染しているか、または感染した可能性が疑われる生物試料を、抗体/抗原複合体の形成を可能にする所定の条件下で該診断組成物と接触させ、前記複合体の形成を検出する。添付した図の実験部分で説明した方法によって、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片配列番号6は非A、非E肝炎の患者におけるHXHVウイルスに特異的な抗体の検出を可能にすることが明らかに示される。

10

【0025】

ウイルス病原体に感染している間に、宿主はこのウイルス病原体に特異的な抗体を生じること(液性応答)が知られている。実験の部で、ウサギを本発明の免疫原で免疫するとウサギの抗体産生が可能になることを示す。非A、非E肝炎の患者はHXHVウイルスに特異的な抗体を生じることまた示された。したがって、本発明の課題はまた、少なくともHXHVウイルスに感染したヒトまたは動物を治療することを企図する医薬組成物調製用の生物材料およびHXHVウイルス感染に対する治療ワクチンおよび潜在的HXHVウイルス感染を防ぐための予防ワクチンを作製するために使用することができる免疫原調製物であり、前記免疫原調製物には、

20

(i)少なくとも1種の本発明の天然、組換えまたは合成ポリペプチドまたはポリペプチド断片のいずれか、または

(ii)たとえば、弱毒化または変異形態のHXHVウイルスが含まれる。

【0026】

本発明の課題はまた、HXHVウイルスに感染した患者に投与したとき、ウイルスの増殖および/または複製を抑えるか、さらには阻害もする能力を有する医薬組成物を調製するための、前記の(i)で定義したような少なくとも1種のポリペプチドまたはポリペプチド断片に特異的な少なくとも1種のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体または本発明の前記抗体の少なくとも1種の断片である。これらの抗体またはその断片は、中和抗体と呼ばれる。

30

【0027】

したがって、本発明は場合によっては適切な媒体および/またはアジュバントおよび/または希釈剤および/または薬剤として許容される賦形剤と一緒にした本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片またはHXHVウイルスを含むことを特徴とする免疫原またはワクチン組成物、並びに場合によっては適切な媒体および/またはアジュバントおよび/または希釈剤および/または薬剤として許容される賦形剤と一緒にした前記で定義した生物材料を含む医薬組成物に関する。

【0028】

生物試料という表現は、たとえば、血液、血清、血漿、肝臓生検抽出物などの組織試料を意味するものと理解される。

40

【0029】

調製されたワクチンは、注射することが可能で、すなわち液体溶液または懸濁液である。場合によっては、この調製物は乳化してよい。抗原分子は、薬剤として許容され、活性成分に適合した賦形剤と混合することができる。好ましい賦形剤の例は、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールまたは同等物またはそれらの組み合わせである。所望するならば、ワクチンは微量の湿潤剤または乳化剤などの補助物質、pH緩衝剤または水酸化アルミニウム、ムラミールジペプチドまたはそれらの変種などのアジュバントを含有してよい。ペプチドの場合、より大きな分子(KLH、破傷風毒素)に結合させると

50

、ときどき免疫原性が増大する。これらのワクチンは、従来通り注射によって、たとえば筋肉内に投与する。その他の投与形態に好ましい他の製剤には、座薬および、時には経口製剤が含まれる。

【0030】

「薬剤として許容される媒体」という表現は、たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences 16版、Mack Publishing Co.に記載されたように、ヒトまたは動物に投与することができる担体および媒体を意味するものと理解される。薬剤として許容される媒体は、好ましくは等張、低張または低めの高張で、比較的低イオン強度である。薬剤として許容される賦形剤およびアジュバントの定義はまた、前記に引用したRemington's Pharmaceutical Sciencesにある。

10

【0031】

本発明の課題はまた、

-定義された厳密な条件下で、本発明の核酸配列またはDNAまたはRNAヌクレオチド断片またはDNAまたはRNA分子とハイブリダイズできることを特徴とするプローブ、好ましくは、本発明のプローブには、少なくとも12個のヌクレオチドが含まれ、ハイブリダイゼーションは、検出すべきプローブ/ヌクレオチド配列複合体の T_m (「融解点」)より低い約12 と20 との間で選択された温度と塩濃度の組み合わせに対応した厳密な条件下で実施する、

-定義された厳密な条件下で、本発明の核酸配列またはDNAまたはRNAヌクレオチド断片またはDNAまたはRNA分子とハイブリダイズできることを特徴とするプライマー、好ましくは、本発明のプライマーには、少なくとも12個のヌクレオチドが含まれ、ハイブリダイゼーションは、増幅および/または検出すべきプライマー/ヌクレオチド配列複合体の T_m (融解点)より低い約12 と20 との間で選択された温度と塩濃度の組み合わせに対応した厳密な条件下で実施する、

20

-配列番号19から22の配列のいずれかから選択することを特徴とする本発明の核酸配列またはヌクレオチド断片またはDNA分子とハイブリダイズできるプライマー、

-核酸配列またはDNAまたはRNAヌクレオチド断片またはDNAまたはRNA分子に結合できることを特徴とする抗核酸抗体、

-前記で定義した少なくとも1種のプローブまたは1種のプライマーまたは1種の抗核酸抗体を含むことを特徴とする診断組成物、

-試料を患者から収集し、前記試料からDNAおよび/またはRNAを抽出するために必要であれば前記試料を処理し、前記試料を定義した厳密な条件下で、本発明の少なくとも1種のプローブまたは1種のプライマーと接触させ、試料中のウイルスDNAおよび/またはRNAの存在は前記ウイルスDNAおよび/またはRNAと少なくとも1種のプローブとのハイブリダイゼーションを示すことによって、または前記DNAおよび/またはRNAを増幅することによって検出する、ウイルスDNAおよび/またはRNAの検出方法、および

30

血清または血漿試料を患者から収集し、前記試料からDNAおよび/またはRNAを抽出するために必要であれば前記試料を処理し、前記試料を少なくとも1種の抗核酸抗体と接触させ、前記抗体は場合によっては適切な任意のマーカで標識し、核酸/抗体複合体の形成を示す、ウイルスDNAおよび/またはRNAの検出方法である。

【0032】

ポリヌクレオチド、プローブまたはプライマーの作製は、当業者の一般的な知識の一部である。特に、制限酵素の使用、および自動化合成機による化学合成法について述べることができる。限定された厳密な条件下で、前記で定義したようなDNAまたはRNAヌクレオチド配列またはヌクレオチド断片とハイブリダイズすることができるプローブおよびプライマーは、この定義の一部である。適切な厳密条件を定義することは当業者の能力の範囲内である。特徴的な厳密条件は、研究すべきハイブリッドの T_m (「融解点」)より低い約12 と20 との間で選択された温度と塩濃度の組み合わせに対応したものである。したがって、Gerge H. Keller and Mark M. Manakによる本、DNA PROBES、第2版、Stockton Press, 1193, 49 West 24th St., New York, N.Y. 10010 USAを参照することができる。単一点突然変異を区別するための厳密な条件は、少なくとも1979年から知られている。一例として

40

50

Wallace R.B他、DNA. Nucleic. Acid. Res. 6, 3543-3557(1979)、Wallace R. B他、Science, 209, 1396-1400(1980)、Itakura K. and Riggs A.D.、Science, 209, 1401-1405(1980)、Suggs S.V.他、PNAS, 78, 6613-6617(1981)、Wallace R.B他、DNA. Nucleic. Acid. Res., 9,3647-3656(1981)、Wallace R.B他、DNA. Nucleic. Acids. Res., 9, 879-894(1981)およびConner B.J.他、PNAS, 80, 278-282(1983)を挙げることができる。さらに、抗核酸抗体を産生するための技術は公知である。一例としてPhilippe Cros他、Nucleic Acides Research, 1994, Vol.22, No.15, 2951-2957、Anderson, W.F.他、(1988) Bioessays, 8(2), 69-74、Lee, J.S.他、(1984) FEBS Lett., 168, 303-306、Malfoy, B.他、(1982) Biochemistry, 21(22), 5463-5467、Stollar, B.D.他、J.J.(著)Methods in Enzymology, Academic Press, pp70-85、Traincard, F.他、(1989) J. Immunol. Meth., 123, 83-91およびTraincard, F.他、(1989) Mol. Cell. Probes, 3, 27-38)を挙げることができる。

【 0 0 3 3 】

本発明はまた、

- 本発明の少なくとも1種のポリペプチドまたは1種のポリペプチド断片をコードするDNA配列であって、適切な媒体および/または希釈剤と混合されたDNA配列を含むワクチン組成物、
- 本発明の少なくとも1種のポリペプチドまたはポリペプチド断片の合成を特異的に妨害することができることを特徴とするアンチセンスまたはアンチジーンオリゴヌクレオチド、
- 少なくとも1種のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは1種のアンチジーンオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする医薬組成物、
- 治療薬またはワクチンとして関心のある少なくとも1種の遺伝子を含むことを特徴とするベクターであって、前記遺伝子が特に、
 - (i)本発明の少なくとも1種のポリペプチドまたは1種のポリペプチド断片、
 - (ii)または、(i)で定義した少なくとも1種のポリペプチドまたはポリペプチド断片に結合することができるポリクローナルまたはモノクローナル抗体の少なくとも全てまたは一部、
 - (iii)または、(i)で定義した少なくとも1種のポリペプチドまたはポリペプチド断片を阻害する少なくとも1種の分子、
 - (iv)または、(i)で定義した少なくとも1種のポリペプチドまたはポリペプチド断片に結合し、かつ/またはその機能を阻害することができる少なくとも1種のリガンドまたはリガンドの任意部分をコードするベクター、
- 特に、請求項37で定義したベクターを含み、関心のある前記遺伝子がin vivoでの発現を確実にするエレメントの制御下に置かれていることを特徴とする治療組成物またはワクチン組成物、
- ヒトまたは哺乳類動物への投与を可能にする形態で、少なくとも1個の細胞、特に天然に抗体を産生しない細胞、および場合によってはその前培養物を含む医薬組成物またはワクチン組成物調製用の生物材料であって、前記細胞が本発明の少なくとも1種のポリペプチドまたは1種のポリペプチド断片をin vivoでコードするか、または本発明の少なくとも1種のポリペプチドまたは1種のポリペプチド断片の機能および/または結合および/または発現を阻害する少なくとも1種の分子をコードするか、または本発明の少なくとも1種のポリペプチドまたは1種のポリペプチド断片に結合することができる少なくとも1種の抗体または1種の抗体断片をコードする少なくとも1種の遺伝子を含有する少なくとも1種の核酸配列によってin vitroにおいて遺伝子的に改変されている生物材料、
- 本発明の少なくとも1種の核酸配列またはヌクレオチド断片またはDNA分子またはベクターで形質転換された、特に真核細胞、たとえばCOSおよびCHO細胞および低級真核細胞、たとえば酵母から選択された、特にSaccaromyces cerevisiaeおよびPichia pastorisから得られた遺伝的に改変された細胞、および
- このような細胞を含む医薬組成物またはワクチン組成物に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

前記で定義した医薬組成物は、特に「従来の」組換え蛋白質をベースとしたワクチン組成物と比較して、特に有利であるDNAワクチン組成物である。実際に、組換え蛋白質はワクチン目的のために使用するには、特に組換え抗原精製の非常に重要な段階が必要なので、扱いにくく、高価な系である。さらに、遭遇する困難の1つは、良好な免疫記憶を維持するために十分に長期間ワクチンを持続させることである。対照的に、DNAワクチン法の利点はDNA固有の特性に備わっており、この方法は簡単かつ非常に安価で、筋肉内または皮内注射によって簡単に実施される。さらに、

-DNAワクチンは非感染性/非複製性であり、

-DNAによる免疫は、*in vivo*トランスフェクションの形態であるため、ウイルス抗原は天然の構造で哺乳類細胞において発現し、

-ウイルス感染の場合のように、液性および細胞性両方の高い免疫応答が誘導され、

-さらに、DNAワクチンは物理化学的均質性のために容易に一緒にすることができることに注意されたい。

10

【0035】

1. 材料および方法

1-1. 生物材料の原料

RDA用に使用する材料は、血清バンクに保管された血清から構成される。RDAをインターフェロンでうまく治療された原因不明の重篤な肝炎の症例に適用した。この患者における抗ウイルス治療後のトランスアミナーゼの正常化および特に治療停止後の再発は、治療を再導入したときまた生じる応答と共に、この疾患のウイルス原因論に有利となる要素である。治療前の血清試料および治療後の血清試料をRDA用に使用したところ、治療前の試料には潜在的にHxHVウイルスが含有まれており、治療後の試料にはほとんど、または全くウイルスが含まれていなかった。

20

【0036】

1-1.1 公知の肝炎ウイルスの予備研究

・超高度PCRによるスクリーニング

非常に低量で、または変異体の形態で存在し得る公知の肝炎ウイルスの存在を排除するために、慢性肝炎(B、C、GおよびTTV)の原因となる肝炎ウイルスについて感度の高い(10個のウイルスゲノムを検出できる)高感度PCR試験が開発された(Chemin他、*J of hepatol.*, 2001)。

30

【0037】

インターフェロンで治療した患者から継続的に採取して、サブトラクションハイブリダイゼーション法のために使用する血清は、公知の肝炎ウイルス全ておよびSENウイルスについてこれらの試験では陰性のままであった(Minoru Shibata他、*The Journal of Infectious Diseases* 2001, 184: 400-404)。

【0038】

1-1.2 RDA法用の試料の選択

・テスター試料またはトランスアミナーゼピーク時の陽性対照:トランスアミナーゼピーク時に収集した血清から抽出した総核酸。

40

・ドライバー試料または処理後の陰性対照:トランスアミナーゼ最低濃度時に収集した血清から抽出した総核酸。

【0039】

核酸抽出は、QIAGEN QIAamp(登録商標)Viral RNA Mini Kitで実施する。ディファレンシャル技術は、CLONTECH製のCLONTECH PCR-Select(商標)cDNA Subtraction Kitを使用して、製造者の指示に従って実施する。

【0040】

1-2. RDA法

1-2.1 原理

Lysitsyn他によって1993年に開発されたこの方法は、以下の原理に基づいており、Clon

50

techキット (CLONTECH PCR-Select(商標)cDNA Subtraction Kit)を使用した。

【0041】

・ゲノムDNAの複雑度の軽減

RDAの第1段階は、ゲノムの複雑度を軽減することにある。そのためには、可能な適当な頻度の切断部位を有する制限酵素を使用して、ゲノムの複雑度を軽減することが必要である。この段階の結果、最初の配列を表すが複雑度が少ない一連の配列が生じるので、「代表的」という用語が使用される。研究すべきゲノムの複雑度を予備的に減少させることによって、試料の完全なハイブリダイゼーションを促進して濃縮段階の効率を高める。

【0042】

・濃縮

アダプターをウイルスゲノムを含有するテスター試料のDNA断片の各末端に(リガーゼによって)結合させる。ドライバー試料にはアダプターはない。

【0043】

サブトラクティブハイブリダイゼーション中、テスターを過剰なドライバーに曝露させる。ドライバーDは、テスターTと共通の数多くのDNA断片を含有しており、したがって2種類の集団に共通のテスターDNA断片の自己ハイブリダイゼーションを制限することによって競合阻害剤の役割を果たす。

【0044】

全体に変性/再生の過程を行うと、その間に配列の相補性によって3種類の結合が生じる。

【0045】

ドライバーを大過剰にすると、両プールに共通の断片は主にD/Dハイブリッド(アダプターなし)を形成し、またT/Dハイブリッド(2本鎖の1本の末端にアダプターを有する)も形成する。T/Tハイブリッドのみが両端に、PCRの前の伸長段階の間に補充されるアダプターを有する。T/T二本鎖を選択した後、この手法を数回繰り返すことによって、理論的にテスターのみに存在する配列を精製することが可能である。しかし、サブトラクティブハイブリダイゼーション技術の有効性は、ヒトゲノムが非常に複雑で、任意の血清試料中にゲノムDNA配列が豊富にあることのために、部分的に制限される。サブトラクション段階の反復によって、最終濃縮係数 10^2 から 10^3 がもたらされるが、係数 10^6 が求められる。

【0046】

したがって、この方法と第2のいわゆる動力学的濃縮方法とを一緒にすることが必要である。前段階の間に添加したアダプターに相補的なプライマーを使用するPCR段階によってこれを実施する。したがってT/T二本鎖は、PCRによって指数関数的に増幅し、T/D二本鎖は直線的増幅を受け、得られた断片は一本鎖である。T/Dハイブリッドに関しては、増幅しない。二本鎖DNAに使用したヌクレアーゼで一本鎖DNAを切断することが可能である。増幅後にテスターのその他の配列に対して標的DNAを濃縮するために、この二本鎖テスターの選択的濃縮方法を様々なアダプターで繰り返すことができる。一般的に、この反応を三回行って、求めるべきウイルス配列について 10^6 の濃縮係数を得ることが可能である。その後、得られた生成物を配列決定および分析のためにプラスミドにサブクローニングする。

【0047】

1-2.2 プロトコール

RDAは、前述した患者から得られたDNAを使用して、テスターおよびドライバー試料について実施する。

【0048】

・制限酵素RsaIによる試料の消化

この手法は、テスターのDNAおよびドライバーのDNAについて別々に実施する。

【0049】

どの列もし損じることのないように、RDA実験は同試料のRNAと平行して実施する。しかし、公知の配列と相同性を示さないクローンはウイルスRNAから得ることはできなかった

10

20

30

40

50

。

【0050】

以下の混合物の調製：

10XRsal緩衝液(5 μ l)、Rsal(10U/ μ l)(1.5 μ l)、核酸(2 μ g)43.5 μ lの混合物を調製する。この混合物を37 $^{\circ}$ Cで1時間30分インキュベートし、反応は20XEDTA/グリコーゲン2.5 μ lで停止する。抽出は、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)50 μ lで実施する。遠心は、14000rpmで10分間実施して、上部水相を収集する。さらにクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)50 μ lで抽出を実施し、その後14000rpmで10分間遠心して、上部水相を収集する。この水相を4M NH₄OAc 25 μ lおよび95%エタノール187.5 μ lで沈殿させ、その後14000rpmで20分間遠心して、上清を除去する。ペレットを80%エタノール 200 μ lで洗浄する。さらに14000rpmで5分間遠心を実施して、上清を除去する。ペレットを5から10分間空気乾燥して、次にH₂O 5.5 μ lに溶解する。

10

【0051】

・テスターの(手法の最終段階に必要なPCRプライマーの配列を含有する)アダプターへの連結。

テスター1 μ lを水5 μ lで希釈する。連結混合物は、以下の通りに調製する:H₂O(15 μ l)、5X連結緩衝液(BIOLABS)(10 μ l)、T4 DNAリガーゼ(400U/ μ l)BIOLABS(5 μ l)。

【0052】

混合物1.1は、以下の通りに調製する:テスター2 μ l、アダプター1(10 μ M)2 μ l、マスターミックス6 μ l。

20

【0053】

混合物1.2は、以下の通りに調製する。テスター2 μ l、アダプター2R(10 μ M)2 μ l、マスターミックス6 μ l。

【0054】

サブトラクトされていない対照の調製:混合物1.1 2 μ lを混合物1.2 2 μ lに添加した。このように調製した混合物を16 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートして、反応は20xEDTA/グリコーゲン 1 μ lを添加することによって停止する。リガーゼは、72 $^{\circ}$ Cで5分間不活性化して、この混合物を氷中で冷却する。

【0055】

・サブトラクティブハイブリダイゼーション:テスター-ドライバー

この手法は、テスターのDNAとドライバーのDNAについて別々に実施する。

30

【0056】

第1ハイブリダイゼーション

アダプター1(混合物H1)またはアダプター2R(混合物H2)に連結したテスターのDNAから成る2種類の混合物H1およびH2を別々に調製した。混合物H1:ドライバー1.5 μ l、「テスター1-1」1.5 μ l、4Xハイブリダイゼーション緩衝液1 μ l。混合物H2:ドライバー1.5 μ l、「テスター1-2」1.5 μ l、4Xハイブリダイゼーション緩衝液1 μ l。これらの混合物それぞれに油を添加して、各混合物を98 $^{\circ}$ Cで1分30秒間、その後第2のハイブリダイゼーション直前に68 $^{\circ}$ Cで6時間インキュベートした。

【0057】

第2ハイブリダイゼーション

以下の混合物を調製する:ドライバー1 μ l、4Xハイブリダイゼーション緩衝液、1 μ l、H₂O 2 μ l。

40

【0058】

混合物1 μ lを98 $^{\circ}$ Cで1分30秒間変性する。

【0059】

混合物H2 15 μ lを油/試料界面で収集する。空気を吸引して、ドライバーを収集し、全体を混合物H1に添加する。全体を68 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。

【0060】

サブトラクトされたDNAの希釈。

50

ハイブリダイズした試験管に希釈緩衝液200 μ lを添加する。吸引して除去した後、この混合物を68 $^{\circ}$ Cで7分間インキュベートして、反応を氷中で停止する。

【0061】

・RDA生成物のPCR

この手法は、

-DNAから得られたRDA生成物、

-サブトラクトされていない対照、キットのサブトラクトされた対照およびキットの陽性PCR対照に別々に実施する。

【0062】

1回目のPCR:

以下の混合物を調製する。H₂O 19.5 μ l、10XPCR緩衝液2.5 μ l、dNTP(それぞれ10mM)0.5 μ l、PCRプライマー1(10 μ M)1 μ l、50XアドバンテージcDNAポリメラーゼミックス0.5 μ l、RDA試料1 μ l。

10

【0063】

使用したプログラムは以下の通りである:75 $^{\circ}$ C 5分、94 $^{\circ}$ C 30秒

【0064】

次の25回:94 $^{\circ}$ C 10秒、66 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分30秒

【0065】

2回目のPCR

1回目のPCR生成物1 μ lを使用:同様の混合物を使用する。

20

【0066】

20回実施する:94 $^{\circ}$ C 10秒、68 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分30秒。

【0067】

Clontech PCR-select(商標)cDNA subtraction kitのプライマー対を使用すると、それらはRDA法開始時にテスターDNAに「結合した」アダプターに配置する。

【0068】

試料8 μ lの1XTBE中での1%アガロースゲルにおける臭化エチジウム染色による分析

【0069】

次に、RDA生成物をプラスミドpTOP0にトポイソメラーゼIを使用して連結し、その後Invitrogen TOP0 TA Cloning(登録商標)Kitを使用してE.coliにクローニングする。

30

【0070】

II-RDA生成物の分析

II-1. RDAによって生じたクローンのスクリーニング

RDA技術は、テスター試料およびドライバー試料から、2種類の試料の間の潜在的差異が何であるかを反映したPCR生成物を得ることを可能にする。これは、サブトラクトされた物質を構成する。

【0071】

RDA生成物をクローニングした後、以下に説明した段階によって643個のクローンをスクリーニングした。

【0072】

II-2 クローニング生成物の複製物

ヒト由来のクローンを最大限除去するために、「DNA」RDAクローンの複製物をEcoRI/PstIで消化し、³²Pで放射標識したヒトゲノムDNAに対応するプローブとハイブリダイズさせる。

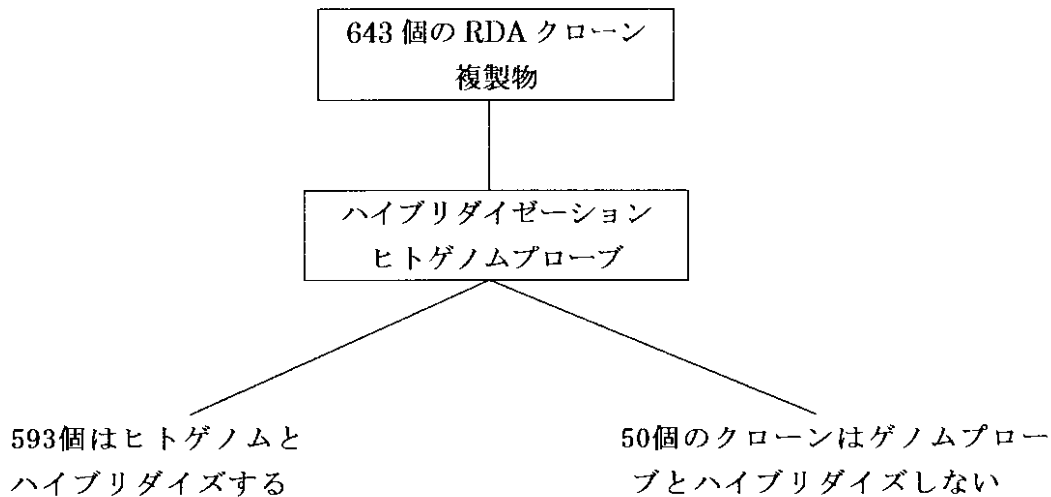
40

【0073】

このスクリーニング終了時の結果は以下に示す。

【0074】

【表 A】



10

【0075】

11-3. データバンクの調査

第1段階終了時に選択した50個のクローンの配列を決定する。それぞれの配列をヒトゲノムのデータバンク、Swissprot、Embl、Genbank、Draftの公知の配列と比較する。未知のものがいくつか出現する。配列分布の結果を以下に挙げる。

20

ホスファターゼ	23%
ヒトDNA染色体16+17	31%
蛋白質分解酵素	8%
ヒトイムノグロブリン	16%
未知	8%

【0076】

11-4. さらにスクリーニング

以下に説明した方法に従って、さらにスクリーニング段階を前段階で選択した4個のクローンに実施した。

30

【0077】

・ ^{32}P で放射標識したEcoRI/PstIゲノムDNAプローブを使用して選択したクローンのDNAに対するドットプロット。

【0078】

・プローブとして、既に選択した ^{32}P 標識クローンを使用したゲノムDNAのサザンプロット。

【0079】

これらの様々な段階の終了時に、データバンクで配列が知られていない2種類の「DNA」クローンを選択した。

【0080】

以下の段階は、これらのデータの原因不明の肝炎に罹った患者から得られた試料と、一方は血液提供者、他方は非ウイルス性の肝臓病変を患った患者から成る対照との両方に対する関係を立証することである。そのために、プライマーを2種類のクローンのDNA内で合成し、ヒトゲノムに頻発するDNA配列に対応するクローンのDNAの可能性を排除するために、これらのプライマーを使用して血液提供者の血清から抽出したゲノムDNAにPCRを実施した。

40

【0081】

DNAのRDAから得られた1400bpの挿入物(XH)を含有する1クローンは、ヒトゲノムDNAおよびデータベースに存在するあらゆる配列との相同性が欠如しているので選択した。

【0082】

50

この配列は、GCに富み(62%)、いくつかのオープンリーディングフレームを有する。配列番号1と同定する。このオープンリーディングフレームは配列番号2、3、4および5と同定する。

【0083】

III. 肝炎Xに関連する配列: XHの特徴付け

単離したXH配列の性質を特徴付け、具体的に述べるために4種類の取り組みを平行して使用した。

- 生物学的臨床研究および疫学的研究。

- 「分子」的取り組み。

- 特異抗体の産生。

- 電子顕微鏡による研究。

10

【0084】

III-1 生物学的臨床研究および疫学的研究

- PCRによるXH配列の増幅を可能にするために、様々なプライマーとプローブの組み合わせを合成した。

【0085】

以下のプライマーの組み合わせを使用することが可能である。

センスプライマー(1M13):

5'-CCCGCCCCGCTGATGAAAAG-3'(配列番号10)

アンチセンスプライマー(3T7)

5'-ATGCCAACGCCAGAGTCCG-3'(配列番号13)

PCRサイクル: 75 5分、94 2分、94 10秒 × 28、66 30秒 × 28、72 1分30秒 × 28および72 7分。

20

2回目のPCR:

1回目の試料3 μ lを水27 μ lで希釈した。

【0086】

以下の混合物を調製した。H₂O 17.5 μ l、10XPCR緩衝液2.5 μ l、dNTP(それぞれ10mM)0.5 μ l、ネステッドPCRセンスプライマー(10 μ M)1 μ l、ネステッドPCRアンチセンスプライマー2R(10 μ M)1 μ l、50XアドバンテージcDNAポリメラーゼミックス0.5 μ l、RDA試料1/10 2 μ l。

30

【0087】

以下のプライマー対を使用した。

センスプライマー(1M13)

5'-CCCGCCCCGCTGATGAAAAG-3'(配列番号10)

アンチセンスプライマー(1T7)

5'-GATGTTTCTGTGTCTGTGGG-3'(配列番号14)

PCRサイクル: 94 2分、94 10秒 × 10~15、68 30秒 × 10~15、72 1分30秒 × 10~15および72 7分。

【0088】

まず第1に、トランスアミナーゼが正常な90人の血液提供者をPCRによってスクリーニングした。全てXH配列が陰性であった。

40

【0089】

- 平行して、RDAの実施を可能にした患者血清の様々な日時におけるXH配列の存在を求めた。XH配列の存在は、トランスアミナーゼが特に高い時点にのみ認められた。この患者でトランスアミナーゼが減少した後の肝臓生検を分析すると、この配列が存在することが明らかである。この場合、この患者は現在10年間インターフェロンで治療を受けており、治療の中止を試みた結果トランスアミナーゼが迅速に増加し、肝疾患に関係する病原体の根強い存続を示唆していることに注意されたい。

【0090】

- 原発性胆汁性肝硬変の症例20例はまた、血清および肝臓におけるXH配列が陰性的のまま

50

であった。薬剤誘導性肝炎4例についても調べたところ、やはり陰性であることがわかった。自己免疫性肝炎の1/21例のみおよびアルコール性肝炎の1/7例がXH配列陽性であった。対照集団に対するこれらの結果によって、XH配列が通常「正常な」ヒト血清またはウイルスが原因ではない肝臓病変の場合では存在しないことを確かめることができた。

【0091】

非常に有利なことに、非A、非E肝炎に罹ったHotel Dieu in Lyonの患者から得られた肝臓および血清試料を分析することによって、それらの10%(11/109)がXH配列のキャリアであることを認めることができた。モロッコの慢性非A、非E肝炎の患者でもHXHV DNA陽性の患者は同じ割合であった。

【0092】

-血清のPCRによってXH配列が陽性の患者はまた、生検が入手可能であるとき、肝臓生検から抽出したDNAでも陽性であるようだ。XH配列の存在はまた、同じ患者では、数年経っても、様々な時点で認めることができる。

【0093】

-PCRによって増幅した生成物を配列決定したところ、患者は互いに非常に類似した配列を示す。

【0094】

-これらの患者は全て、微細な肝炎から肝硬変まで肝臓病変の程度が異なる慢性肝炎を有している。数人のみが、肝炎ウイルスの伝達に関して明らかに確立された危険因子である輸血を受けた。これらの患者は公知のいかなる肝炎ウイルスのキャリアでもなかったの

10

20

【0095】

-さらに、ブラジルの急性非A、非E肝炎の13例を分析したところ、急性期のこれらの患者11人においてXH配列の存在の検出できた。

【0096】

III-2 「分子的」取り組み

単離したDNA(1本鎖または2本鎖)の性質を測定するために、XH配列は磁気粒子に結合させたXH配列の2種類のDNA鎖のいずれかに特異的な2種類のオリゴヌクレオチドに交互に捕捉させた(Gene Trapper cDNA positive selection system, Gibco BRL(商標))。使用したオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

30

センスオリゴヌクレオチドS6M13:

5'-GCCATGTAACCTCGGCAGTGC-3'(配列番号9)

アンチセンスオリゴヌクレオチドComp S6M13:

5'-GCACTGCCGAGTTACATGGC-3'(配列番号15)

【0097】

第2の場合では、特異的オリゴヌクレオチドで捕捉後、遊離した生成物を、-PCRおよびXH特異的プローブによるPCR生成物のハイブリダイゼーション。
-クローニング、PCRによるクローンの分析、クローニングした生成物の複製物のハイブリダイゼーション、このクローンの配列決定によって分析する。

【0098】

この取り組みは、TOP0ベクターにクローニングされたXH配列について有効であった。この様式では、RDAから得られた配列は、PCRから得られるので、2本鎖である。この捕捉方法をクローニングした配列に実施したことによって、最終的に存在する2種類のDNA鎖の捕捉が可能になる。

40

【0099】

患者を循環するXH配列の性質は、PCRでXH配列陽性の「肝炎X」患者のいくつかの血清を使用して調べた。この血清は、捕捉操作前に超遠心したりしなかったりする。

【0100】

これらの結果は全て、1種類のオリゴヌクレオチド(センスオリゴヌクレオチド、S6M13)のみが患者血清中で循環するXH配列を保持できることを示す。結果的に、これらの配列は

50

、少なくとも部分的に1本鎖である。XH DNAの性質が1本鎖であるという仮説は、DNAの1本鎖形態に特異的なS1ヌクレアーゼによるXH DNAの予備処理試験によって裏付けられる。XH DNA陽性の血清抽出物を予備処理するとPCRシグナルは破壊されるので、したがってこの配列の性質が1本鎖であることを立証される。

【0101】

III-3 特異的抗体の産生

-XH配列(配列番号1)は、4個のオープンリーディングフレームを有する。ORF1は配列番号2に存在し、配列番号1の塩基1から103によってコードされる101個のアミノ酸を含む。ORF2は配列番号3に存在し、配列番号1の塩基829から1233によってコードされる135個のアミノ酸を含む。ORF3は配列番号4に存在し、配列番号1の塩基270から674によってコードされる135個のアミノ酸を含む。ORF4は配列番号5に存在し、配列番号1の塩基813から1361によってコードされる183個のアミノ酸を含む。コンピュータ分析によって、選択された蛋白質は、抗体産生を誘発するために必要な免疫原性および親水性の特性全てを備えた14個のアミノ酸領域を有することが示された。

10

【0102】

-前記の14個のアミノ酸領域に対応するポリペプチドをポリクローナル抗体産生のために合成した。このポリペプチドの配列を以下に挙げ、配列番号6を参照することによって同定する。

RRAAELHRRDQYRL

【0103】

ウサギを免疫するために、BSAに結合するようにシステイン(C)をこのポリペプチドのCOOH末端に付加した。免疫原RRAAELHRRDQYRLC-BSAをウサギにウサギ1匹当たり注射1回当たり100 μ gの量で注射した。使用した免疫方法は以下の通りである。

20

D0:血液10mlの1回目採取、免疫:免疫原(1mg/ml)0.1mg+生理食塩水0.4ml+0.5mlCFA 1ml ID(0.1ml \times 10)

D28:免疫原(1mg/ml)0.1mg+生理食塩水0.4ml+0.5ml IFA ID-1ml ID(0.1ml \times 10)

D56:免疫原(1mg/ml)0.1mg+生理食塩水0.4ml+0.5ml IFA-1ml SC(0.25ml \times 4)

D63:抗凝固剤なしに耳からの血液3mlの1回目採取

D84:免疫原(1mg/ml)0.1mg+生理食塩水0.4ml+0.5ml AFI 1ml IM(0.25ml \times 4)

D91:抗凝固剤なしに耳からの血液9mlの2回目採取

30

D112:免疫原(1mg/ml)0.1mg+生理食塩水0.4ml+0.5ml IFA-1ml ID(0.1ml \times 10)

D119:抗凝固剤なしに耳からの血液9mlの3回目採取

【0104】

特異的抗体の産生は、非A、非E患者の生検におけるXH配列の発現をその他の患者分類または対照と平行してスクリーニングするための非常に有効な手段である。

【0105】

アミノ酸14個のポリペプチド(配列番号6)を使用して、慢性非A、非E肝炎の患者に潜在的に存在するHXHVウイルスに特異的な抗体を捕捉するためのELISA試験を開発する。マイクロタイタープレートのウェルに、炭酸緩衝液に1/100で希釈したストレプトアビジン100 μ lを沈着させる。沈着後、インキュベータ内において37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートして、その後洗浄を3回実施する。次に、PBSで1/100に希釈したビオチン化ペプチド100 μ lを各ウェルに添加する。混合物を4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。次に、洗浄を3回実施する。次に、部位を飽和させるためにPBS+ヤギ血清250 μ lを添加する。全体を37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートする。3回洗浄後、(PBS Tween+SCで適切な希釈度で希釈した)試験すべき血清それぞれ100 μ lを添加し、インキュベータ内において37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションを実施する。次に、洗浄を3回実施して、抗ヒトIgG抗体結合ペルオキシダーゼの希釈溶液100 μ lを沈着させる。全体を、インキュベータ内において37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする。インキュベーション後、3回の洗浄段階を行う。オルトフェニレンジアミン(100 μ l)を添加することによって視覚化を実施する。H₂SO₄ 50 μ lを添加することによって反応を遮断し、OD492nmおよび635nmで読み取りを実施する。結果を添付した図に表す。この図から

40

50

明白なように、XH配列がPCRによって検出された16人の中で、6人の患者がこの技法によって非常に良く検出された。7人目の患者は、閾値限界で弱く検出された。

【0106】

III-4 電子顕微鏡研究

-XH配列の存在に関連する可能性のあるウイルス粒子を単離するためにスクロース勾配を調製した。そのために、非A、非E肝炎群の患者の血清を使用した。この勾配の2つの隣接した画分は、PCRによってXH配列陽性を示した。これらの画分は、ほぼ1.2から1.5g/cm³の程度の密度に対応する。電子顕微鏡研究によって、大きさおよび規則性(半径110nm)がウイルス病原体のものと適合した粒子を観察することが可能になった。これらの粒子が電子顕微鏡で観察される頻度によって、ほぼ 5×10^5 粒子/ml血清程度の濃度であることが示唆される。

10

【0107】

開発したELISA試験によって、血液提供者および様々な分類の患者における「抗XH」抗体の存在を探索することが可能となった。

【0108】

IV 血液提供者および患者の研究

IV-1. 抗XH抗体の探索

血液提供者および様々な分類の患者における抗XH抗体の探索をELISA試験によって実施した。結果を以下の表に表す。

【0109】

20

【表1】

表

	血液提供者		患者						
	TN	TE	VHC+	VHB+	HIV+	非A-E*	非A-E**	H*	H**
研究 総数	408	389	45	40	31	44	13	47	41
抗XH 陽性の %	1.22	6.2	3	16	35	23	31	36	17

30

TNは、「トランスアミナーゼ濃度が正常な血液提供者」を意味する。

TEは、「トランスアミナーゼ濃度が高い血液提供者」を意味する。

HCV+は、「HCV陽性患者」を意味する。

HBV+は、「HBC陽性患者」を意味する。

HIV+は、「HIV陽性患者」を意味する。

非A-E*は、「慢性非A-E肝炎の患者」を意味する。

非A-E**は、「劇症非A-E肝炎の患者」を意味する。

40

H*は、「1987年以前に、すなわち、界面活性剤溶媒で血液を処理する前に輸血を受けた血友病患者」を意味する。

H**は、「1987年以後に輸血を受けた血友病患者」を意味する。

【0110】

トランスアミナーゼが正常な血液提供者408人と高トランスアミナーゼの血液提供者389人との間の抗XH抗体の存在率の差は有意である。2重盲検法によって試験したこれら2群の間に認められたこの差は、抗XH抗体の存在と肝炎疾患との間に因果関係があることを示唆している。高トランスアミナーゼの血液提供者(20%)の画分は、PCRによってXH配列が陽性であることが見いだされた。この配列は、トランスアミナーゼが正常な血液提供者では見

50

いだされなかった。

【0111】

HIV陽性患者の抗XH抗体陽性の割合(35%)は、HBV慢性キャリア患者の16%およびHCV慢性キャリアの3%と比較してより高いことが見いだされた。患者が曝される危険因子の詳細な研究によって、XH配列は非経口経路および性的経路によって伝達され得ることが示された。

【0112】

ELISAで慢性または劇症非A、非E肝炎陽性の患者のみが、PCRでは症例の50%が陽性であるが、一方HCV群またはHBV群の患者あるいは血友病患者のDNAについて陽性は検出されなかった。

【0113】

慢性または治癒に達する原因不明の急性肝炎患者についての研究もまた実施した。研究した13の症例のうち、11例が疾患の急性期に抗XH抗体が陽性であることがわかった。モニターできた例のうち、全てがこの期間中抗体が陽性のままであった。

【0114】

IV-2. PCRによるXH配列の探索

XH配列を増幅するために、Roche(登録商標)Light cyclerを使用したリアルタイム定量的PCR法を開発した。特に、抗XH抗体が陽性であることが見いだされた11人の患者において、ORF4のXH配列を増幅するために使用した。

【0115】

以下に説明した4種類の特異的プライマーを合成して、HPLCで精製した。

S1(センス):5'-GCGTTGTGGTTCTGTTGC-3'(配列番号19)

S2(センス):5'-GATCAATATCGCCTACGC-3'(配列番号20)

AS1(アンチセンス):5'-CTGAAGGATAGGGCTGATG-3'(配列番号21)

AS2(アンチセンス):5'-CTGTTCCGCCAGCCACCAG-3'(配列番号22)

【0116】

PCRは、Qiagen(登録商標)キット「QuantiTect SYBR Green PCR Kit」(登録商標)を使用して実施する。

【0117】

反応混合物の組成は以下の通りである。

Master mix quantitect Qiagen	10 μl
センスプライマー(15 μM)	1 μl
アンチセンスプライマー(15 μM)	1 μl
標的DNA	5 μl
水(RNA分解酵素を含まない)	3 μl
キャピラリ管1本当たりの全量	20 μl

【0118】

20 μlを沈着したら、キャピラリ管を密封して、短期間遠心し、Light cyclerのロータに設置する。

【0119】

PCR プロトコール

・活性化:

95 °Cで15分間。

【0120】

・増幅/定量:

サイクル数 45

	変性	アニーリング	伸長
温度(°C)	95	52	72
インキュベーション(s)	0	5	Tx*
遷移温度の程度(°C/s)	20	20	20

10

20

30

40

50

T_x^{*}:温度は、使用したプライマーの組み合わせに左右される。

プライマー	アンプリコンの大きさ (bp)	T _x (s)
S1/AS1	441	18
S1/AS2	312	13
S1/AS2	331	13
S2/AS2	232	10

【0121】

・融解曲線の分析:

	変性	アニーリング	伸長
温度 ()	95	40	95
インキュベーション (s)	0	5	0
温度遷移の程度	20	20	0.3

10

【0122】

・冷却:

40 で30秒

【0123】

・関心のある配列を検出するための閾値の特徴付け

プラスミドに挿入されたXH配列の理論的検出閾値は、キャピラリ管1本当たり1コピーと2コピーとの間である。最も頻繁に使用したアンプリコンS1/AS2(312bp)のT_mは88 である。

20

【0124】

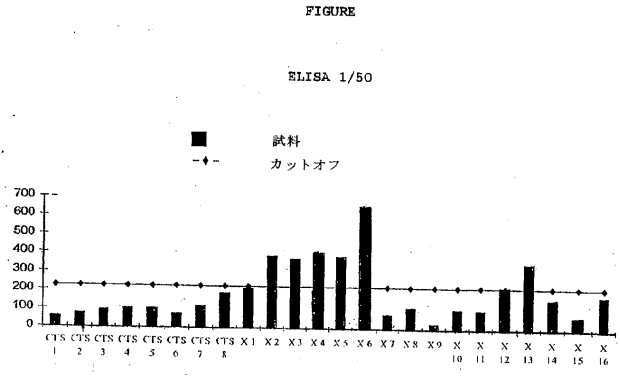
この技術の適用によって、特に、慢性肝炎まで進行した患者5人のうち4人はPCRでXH配列が陽性であることが示された。逆に、回復した患者6人のうち5人はPCRでXH配列が陰性になった。

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1】本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片配列番号6が非A、非E肝炎の患者におけるHXHVウイルスに特異的な抗体の検出を可能にすることを示す。

【 図 1 】



【 配列表 】

[2005512594000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/04578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N7/00 C07K14/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DENIS F ET AL: "LES NOUVEAUX VIRUS DES HEPATITES E, GB ET SUIVANTS. NEW HEPATITIS VIRUSES E, GB AND NEXT" TRANSFUSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE, ARNETTE-BLACKWELL, PARIS, FR, vol. 3, no. 1, 1996, pages 19-25, XP000612674 ISSN: 1246-7820 the whole document	1
A	BOWDEN D S ET AL: "NEW HEPATITIS VIRUSES: ARE THERE ENOUGH LETTERS IN THE ALPHABET?" MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA, XX, XX, vol. 164, no. 2, 1996, pages 87-89, XP000612664 the whole document	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 23 April 2003	Date of mailing of the international search report 09/05/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Panzica, G	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No
 PCT/FR 02/04578

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N7/00 C07K14/18		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DENIS F ET AL: "LES NOUVEAUX VIRUS DES HEPATITES E, GB ET SUIVANTS. NEW HEPATITIS VIRUSES E, GB AND NEXT" TRANSFUSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE, ARNETTE-BLACKWELL, PARIS, FR, vol. 3, no. 1, 1996, pages 19-25, XP000612674 ISSN: 1246-7820 le document en entier	1
A	BOWDEN D S ET AL: "NEW HEPATITIS VIRUSES: ARE THERE ENOUGH LETTERS IN THE ALPHABET?" MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA, XX, XX, vol. 164, no. 2, 1996, pages 87-89, XP000612664 le document en entier	1
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
23 avril 2003		09/05/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Panzica, G

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/005	C 0 7 K 14/005	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 16/08	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 7/00	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
	C 1 2 N 5/00	B

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

(74) 代理人 100101465

弁理士 青山 正和

(74) 代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72) 発明者 イザベル・ケミン

フランス・F - 6 9 3 0 0 ・カルール・モンテ・デ・ソルダ・2

(72) 発明者 クリスチャン・トレボ

フランス・F - 6 9 5 0 0 ・ブロン・パサージュ・デュ・ヴェルディエ・スッド・4

(72) 発明者 フレデリック・ベディン

フランス・F - 6 9 0 0 2 ・リヨン・リュ・ギヤスパール・アンドレ・6

(72) 発明者 コレット・ジョリヴェ - レイノード

フランス・F - 6 9 7 2 0 ・サン・ボネ・デ・ムレ・ルート・ナショナル・ル・セドゥレ・2 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA33 BA41 BA80 CA04 CA09 CA12 CA20
 DA02 DA12 GA11 HA11 HA13 HA14 HA15 HA17
 4B063 QA01 QA19 QQ10 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR35 QR39 QR42
 QR48 QR56 QR62 QS16 QS25 QS33 QS34 QX01 QX02
 4B064 AG01 AG27 AG32 CA06 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 DA01
 DA13
 4B065 AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA43 CA45 CA46
 4C085 AA03 BA87 CC02 CC08 EE01 EE06
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA02 DA75 DA76 DA86 EA20
 EA50 FA71 FA72 FA74

专利名称(译)	HXHV病毒，核材料，多肽物质和用途		
公开(公告)号	JP2005512594A	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2003556514	申请日	2002-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司 EËNS EM鳗鱼坚果安装桑特萨尔瓦多壳邦医疗		
申请(专利权)人(译)	Beio梅里埃 E-NTT S.等鳗鱼EM安装螺母桑特等RECHERCHE医疗		
[标]发明人	イザベルケミン クリスチャントレポ フレデリックベディン コレットジョリヴェレイノード		
发明人	イザベル・ケミン クリスチャン・トレポ フレデリック・ベディン コレット・ジョリヴェ・レイノード		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/29 A61P1/16 A61P31/20 C07K14/005 C07K14/18 C07K16/08 C12N1/19 C12N5/02 C12N5/10 C12N7/00 C12N7/02 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68		
CPC分类号	A61P1/16 A61P31/20 C07K14/005 C12N7/00 C12N2770/24221 C12N2770/24251		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/29 A61P1/16 A61P31/20 C07K14/005 C07K16/08 C12N1/19 C12N7/00 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.N C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA33 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/AG32 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA87 4C085/CC02 4C085/CC08 4C085/EE01 4C085/EE06 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA02 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 正和青山 村山彦		
优先权	2001017048 2001-12-28 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

具有以下特征的分离的HXHV病毒：(i)至少部分为单链的DNA基因组，(ii)所述基因组包含一个编码一种蛋白质或一种多蛋白的阅读框(ORF)(iii)所述基因组包含对于属于所述序列的至少40个核苷酸的任何区段，其与SEQ ID NO:1或其互补序列，核酸材料和肽材料和用途具有至少90%的同源性。

表 A]

