

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3974620号
(P3974620)

(45) 発行日 平成19年9月12日(2007.9.12)

(24) 登録日 平成19年6月22日(2007.6.22)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576	Z
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 5 U
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A

請求項の数 21 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-767 (P2005-767)	(73) 特許権者	399044160
(22) 出願日	平成17年1月5日(2005.1.5)		イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ
(62) 分割の表示	特願2000-545027 (P2000-545027)		ンノートシャップ
原出願日	平成11年4月15日(1999.4.15)		I N N O G E N E T I C S N . V .
(65) 公開番号	特開2005-185285 (P2005-185285A)		ベルギー、ペー-9052ヘント、テヒノ
(43) 公開日	平成17年7月14日(2005.7.14)	(74) 代理人	100081422
審査請求日	平成17年1月5日(2005.1.5)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	98870087.8	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成10年4月17日(1998.4.17)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100116311
前置審査			弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】還元剤を用いる改良された免疫診断アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固相に被覆されたHCV NS3蛋白または少なくとも5個のアミノ酸のエピトープを含むその機能的フラグメントを含むELISAキットまたはラインイムノアッセイキットの製造方法であって、下記工程：

(i) H C V N S 3 蛋白またはその機能的フラグメントでの固相の被覆工程；および
 (i i) 工程 (i) の後の、該固相のブロッキング工程；および
 (i i i) 工程 (i i) の後の、該固相に被覆されたHCV NS3蛋白またはその機能的フラグメントの固定工程；および
 (i v) 工程 (i i i) の後の、該固相の前処理工程

を含み、
(a) E L I S A キットの製造のためには、少なくとも工程 (i i i) において還元剤を添加する、あるいは

(b) ラインイムノアッセイキットの製造のためには、少なくとも工程 (i i) および (i i i) において還元剤を添加する
 ものである、方法。

【請求項2】

(a) において、該還元剤が少なくとも工程 (i) および (i i) において添加される
 請求項1記載の方法。

【請求項3】

該還元剤が D T T、D T E または T C E P である請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

該還元剤が 0 . 1 m M ないし 1 M の範囲の濃度で使用される請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

該還元剤が 0 . 5 m M ないし 5 0 0 m M の範囲の濃度で使用される請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

該還元剤が 1 m M ないし 2 5 0 m M の範囲の濃度で使用される請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【請求項 7】

該還元剤が 0 . 5 m M ないし 5 0 m M の範囲の濃度で使用される請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

該還元剤が 1 m M ないし 3 0 m M の範囲の濃度で使用される請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

該還元剤が 2 m M ないし 2 0 m M の範囲の濃度で使用される請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 10】

該還元剤が 5 m M ないし 1 5 m M の範囲の濃度で使用される請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 11】

該還元剤が約 1 0 m M の濃度で使用される請求項 1 ないし 1 0 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 12】

H C V N S 3 蛋白が配列番号：3 ~ 1 8 からなる群より選択される H C V N S 3 アミノ酸配列を含むものである請求項 1 ないし 1 1 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 13】

該 H C V N S 3 蛋白が融合蛋白中に含まれているものである請求項 1 ないし 1 2 のいずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 14】

該融合蛋白が配列番号：2 0、配列番号：2 2、配列番号：2 4、配列番号：2 6、配列番号：2 8、配列番号：3 0 および配列番号：3 2 からなるアミノ酸配列の群より選択されるものである請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 15】

該 H C V N S 3 蛋白が、S 1 2 0 0、A 1 2 1 8、A 1 3 8 4、P 1 4 0 7、V 1 4 1 2、P 1 4 2 4 もしくは F 1 4 4 4 のいずれか、またはこれらのアミノ酸と L 1 2 0 1、S 1 2 2 2、I 1 2 7 4、S 1 2 8 9、T 1 3 2 1、A 1 3 2 3、T 1 3 6 9、L 1 3 8 2、V 1 4 0 8、A 1 4 0 9 もしくは F 1 4 1 0 のいずれかとの組み合わせを含む H C V N S 3 ヘリカーゼ蛋白である、請求項 1 ないし 1 4 のいずれか 1 項記載の方法。

40

【請求項 16】

該 H C V N S 3 蛋白が、スルホン化工程およびその後の脱スルホン化工程を含む方法により処理された H C V N S 3 蛋白である、請求項 1 ないし 1 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 17】

該 H C V N S 3 蛋白がさらに両性イオン性界面活性剤で処理されたものである請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 18】

該 H C V N S 3 蛋白が両性イオン性界面活性剤としてのエムピゲンで処理されたもの

50

である請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

製造されるイムノアッセイキットが該 HCV NS3 蛋白に対する抗体を検出するために用いられるものである請求項 1 ないし 18 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 20】

製造されるイムノアッセイキットが生物学的試料中の該抗体を検出するために用いられるものである請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

製造されるイムノアッセイキットが初期の HCV NS3 セロコンバージョンを検出するために用いられるものである請求項 1 ないし 20 のいずれか 1 項記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HCV 感染の診断および治療の分野に関する。より詳細には、本発明は、HCV NS3 ヘリカーゼおよびその使用に関する。また本発明は、改良された免疫診断アッセイにも関する。

【背景技術】

【0002】

C 型肝炎ウイルス (HCV) はフラビウイルス科中の属を構成しており、G 型および G B 型肝炎ウイルスならびにペスチウイルスに対して相同性を有する。プラス鎖 RNA ゲノムは少なくとも 9 個の蛋白をコードしている。コア、E1 および E2 は構造蛋白を構成する。NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A および NS5B は非構造 (NS) 蛋白である。HCV 単離体は高レベルの配列異種性を示し、少なくとも 11 タイプおよび 90 サブタイプに分類される (Maertens and Stuyver, 1997)。ヒト肝臓への HCV の感染は、しばしば、臨床的に良性であり、急性フェーズにおいて弱い黄疸を伴う。急激に寛解する C 型肝炎のいくつかの場合には、疾病は気づかれない可能性がある。しかしながら、大部分のケース (> 70%) において、HCV 感染は慢性の持続的なまたは活性のある感染となり、しばしば、肝硬変および自己免疫性疾患といった合併症を伴う。肝細胞癌腫が約 20 ないし 35 年後に生じる可能性があり (Saito et al., 1990)、肝硬変の中間フェーズを伴わない場合がある。今日、予防策はなく、HCV 遺伝子型によっては、インターフェロン - (INF -) での治療のみが治療ケースの約 4 ないし 36% において長期の寛解を引き起こす (Maertens and Stuyver, 1997)。

20

30

【0003】

HCV の生産的培養方法が現在利用できず、ごくわずかな量の HCV 抗原しか感染患者体内を循環していないので、HCV 粒子の直接的検出をルーチンに行うことはできず、HCV RNA を検出するために面倒な増幅方法を用いる間接的診断のみが可能である。他の多くのウイルス感染とは異なり、一般的には、大部分の HCV 蛋白に対する細胞性および体液性免疫応答の存在にもかかわらず HCV 粒子は血液、肝臓およびリンパ球中に持続的に存在する。便利には、HCV 抗体を ELISA 法により検出することができ、そのことにより血液銀行および臨床研究室における高処理量スクリーニングが可能となる。補足的な抗体試験が必要であり、現在、多くの国において必須となっている。このようにして真の HCV の反応性が偽の反応性から区別されるが、偽の反応性は、被覆剤もしくはブロッキング剤への、または HCV 抗原調合物中に存在する汚染混入物質への、または組み換え抗原自体の融合部分もしくは非特異的領域への血清または血漿の免疫グロブリンまたは抗イディオタイプ成分の非特異的結合により生じる可能性がある (McFarlane et al., 1990)。慢性 HCV 疾病、特に治療中のものをモニターするために、PCR または分枝 DNA (bDNA) 法による HCV RNA の検出が最近になって導入された。驚くべきことに、繰り返して HCV Ab 陽性である患者のわずか ~ 70 ないし 94% がネステッド PCR により陽性となるという事実にもかかわらず、HCV RNA の検出は、しばしば、HCV Ab スクリーニング試験を確認するために使用されている (Martin et al., 1994

40

50

)。通常には温和な形態の疾病を示し、低いHCV RNAレベルであるHCV Ab陽性血ドナーのうち、ネステッドPCRにより確認されるのは～40%のオーダーである(Waumans et al., 1993; Stuyver et al., 1996)。それゆえ、片をベースにしたアッセイ(strip-based assay)はHCV Abの確認のためのわずかに信頼できる別法を提供するものである。確認アッセイにおける中間的結果の場合、患者についてHCV RNAの検出よりもむしろ血清学的フォローアップが推奨される(Di Bisceglie et al., 1998)。生の(native)HCV抗原は十分な量の使用ができないので、かかる確認アッセイには合成ペプチドおよび/またはHCV蛋白の組み換えフラグメントが用いられる。抗体確認において最も臨床的に用いられるのはNS3蛋白の反応性である(Zaaijer et al., 1994)。しばしばNS3抗体は一連のセロコンバージョンの最初に出現し、NS3蛋白の反応性は現在利用可能な個々の市販アッセイにおいて異なると思われる。

10

【0004】

イノジェネティックス(Innogenetics)は、通常には合成ペプチドと組み換え蛋白との組み合わせを序列化され容易に読み取れるようになった個別の線として適用する、片による方法(strip technology)の概念を導入した。INNO-LIA HIV Ab試験はルーチンに使用されるウェスタンブロットよりも優れていることが証明された(Pollet et al., 1990)。Line Immuno Assayは多パラメーター試験を可能にし、かくしてカットオフおよび他の評価システムならびに試料添加コントロールを可能にし、さらにELISA試験におけるいくつかの抗原に必要な担体または融合パートナーとして用いられる非HCV蛋白に関する偽の反応性の試験も可能とした。原理的には、該試験フォーマットは異なる病原体または表現型的にリンクした条件を単一試験において組み合わせることを可能にする。

20

【0005】

INNO-LIA HCV Ab IIIは、コア領域、E2超可変領域(HVR)、NS3ヘリカーゼ領域、ならびにNS4A、NS4BおよびNS5A領域に由来するHCV抗原を含む第3世代のLine Immuno Assayである。当該第3世代のアッセイにおいて、高度に精製された組み換えサブタイプ1b NS3蛋白およびE2ペプチドにより高感度が実現される一方で、ペプチドをベースにした試験の特徴である信頼できる特異性(Peeters et al., 1993)が担保されている。おそらく、このアッセイの最も重要な特徴の1つは、今までにないHCV RNA陽性との相関関係である(Claeys et al., 1992; De Beenhouwer et al., 1992)。

30

【0006】

抗原は6本の別個の線としてプラスチックで裏打ちされたナイロン片上に被覆される。さらに、4種の対照線、すなわち、抗ストレプトアビジン、3+陽性対照(抗ヒトIg)、1+陽性対照(ヒトIgG)、および±カットオフ線が各片上に被覆される。希釈された試験試料をLIA III片と一緒にインキュベーションする。HCV抗体が試験試料中に存在する場合には、HCV抗体が片上のHCV抗原線に結合するであろう。次いで、アフィニティー精製されたアルカリ性ホスファターゼで標識したヤギ抗ヒトIgG(H+L)抱合体が添加され、特異的なHCV抗原/抗体複合体が生成されている場合にはこれと反応する。酵素基質とのインキュベーションにより栗色が生じ、その強度は試料から捕獲された特定線上のHCV特異的抗体量に比例する。硫酸を用いて発色を停止させる。HCV特異的抗体が存在しない場合、抱合体のみが±、1+、および3+対照線に結合する。試料を添加しない場合には、±および1+対照線のみが染色される。

40

【非特許文献1】De Beenhouwer et al., (1992) Vox. Sang. 63, 198-203

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

改良されたHCV診断アッセイ成分および治療蛋白を提供することが本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

50

より詳細には、H C V 抗体の診断および/またはH C V の治療に使用する改良されたH C V N S 3 蛋白調合物を提供することが本発明の目的である。

固相上に存在する組み換えまたは合成N S 3 ヘリカーゼ蛋白またはその一部分とH C V 抗体との反応性を増大させる方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

システイン含有組み換え蛋白、より詳細には、組み換えH C V 蛋白の新規精製方法を提供することも本発明の目的である。

新たなH C V N S 3 蛋白コーディング配列を提供することも本発明の目的である。

産物が疑陽性H C V 試料とは反応しない新たなH C V N S 3 蛋白コーディング配列を提供することも本発明の目的である。

本発明の核酸を検出する方法を提供することも本発明の目的である。

10

本発明の核酸を検出するためのプローブおよびプライマーを提供することも本発明の目的である。

本発明の核酸を検出するための診断キットを提供することも本発明の目的である。

新たなH C V N S 3 ポリペプチドを提供することが本発明のもう一つの目的である。

疑陽性H C V 試料とは反応しない新たなH C V N S 3 ポリペプチドを提供することが本発明のもう一つの目的である。

H C V 感染を予防または治療するための医薬組成物を提供することが本発明のもう一つの目的である。

本発明のポリペプチドを検出する方法を提供することが本発明のもう一つの目的である。

20

受動免疫および/または治療に使用する本発明のポリペプチドに対する抗体を提供することが本発明のもう一つの目的である。

本発明のポリペプチドの製造方法を提供することが本発明のもう一つの目的である。

本発明のすべての目的は、後で示す具体例に合致すると考える。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、改良されたH C V 診断アッセイ成分および治療蛋白が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

定義

30

以下の定義は本明細書に用いられる異なる用語および表現を説明するものである。

用語「H C V N S 3」は、H C V N S 3 プロテアーゼまたはヘリカーゼのいずれかの少なくとも一つのエピトープを示すアミノ酸配列（および/またはアミノ酸アナログ）を含むポリペプチドまたはそのアナログ（例えば、ミモトープ（mimotopes））をいう。

用語「C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白」は、E 1またはE 2領域のいずれかの少なくとも一つのエピトープを示すアミノ酸配列（および/またはアミノ酸アナログ）を含むポリペプチドまたはそのアナログ（例えば、ミモトープ）をいう（W096/04385参照、参照により本明細書に一体化させる）。

本発明の実施例セクションにおいて使用される単離体（生物学的試料）は本発明を限定するものでなく、タイプ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または他の新たなH C V 遺伝子型に属するH C V 単離体は本発明の実施に適したH C V 配列源であることも理解されるはずである。

40

【0011】

本発明に使用するH C V 抗原は全長ウイルス蛋白、その実質的に全長のバージョン、あるいはそれらの機能的フラグメント（例えば、エピトープの形成または保持に必須の配列を失っていないフラグメント）であってもよい。さらにそのうえ、本発明のH C V 抗原は、目的のコンホーメーションのエピトープの形成をブロックまたは妨害しない他の配列を包含しうる。抗体（ポリクローナル血清またはモノクローナル抗体）を用いて目的抗原をスクリーニングし、その反応性を、直鎖状エピトープ（存在する場合に）を保持している変性バージョンの抗原の反応性と比較することにより、コンホーメーションのエピトープ

50

の存在または不存在を容易に調べることができる。かかるスクリーニングにおいてポリクローナル抗体を用いる場合、最初にポリクローナル血清を変性抗原に吸着させ、それが目的抗原に対する抗体を保持しているかどうかを調べることが有利であるかもしれない。

【 0 0 1 2 】

用語「融合ポリペプチド」は、ポリペプチド中において、抗原が、詳細にはH C V抗原が天然には存在しない1本の連続したアミノ酸鎖の一部となっているポリペプチドを意味する。ペプチド結合によりH C V抗原を互いに直接連結することができ、スペーサーアミノ酸配列により分離することができる。融合ポリペプチドはH C Vに関して外来性のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

用語「固相」または「固体支持体」は、個々のH C V抗原またはH C V抗原含有融合ポリペプチドが共有結合され、あるいは疎水的吸着のごとき手段により非共有結合される固体を意味する。固相の例はマイクロタイタープレート、ナイロンまたはニトロセルロース片のごとき膜片、およびシリコンチップを包含する。

10

用語「生物学的試料」は、通常には個体により生成された抗体、詳細にはH C Vに対する抗体を含有する、哺乳動物個体（例えば、類人猿、ヒト）の体液または組織を意味する。体液または組織はH C V抗原を含んでいてもよい。かかる成分は当該分野において知られており、血液、血漿、血清、尿、脊髄液、リンパ液、呼吸器、腸管もしくは性器分泌物、涙、唾液、乳、白血球細胞および骨髄腫を包含するが、これらに限らない。体成分は生物学的液体を含む。用語「生物学的液体」は器官から得られる液体をいう。いくつかの生物学的液体は、凝固因子（例えば、因子V I I I）、血清アルブミン、成長ホルモン等のごとき他の生成物の源として使用される。かかる場合において、生物学的液体の源がH C Vのごときウイルスによるコンタミネーションがないことが重要である。

20

【 0 0 1 3 】

用語「免疫学的に反応性のある」は、問題となる抗原がH C V感染個体または免疫個体由来の体成分中の存在する抗H C V抗体と特異的に反応することを意味する。

用語「免疫複合体」は、抗体がエピトープまたは抗原に結合した場合に形成される複合体を意味する。

本明細書の用語E 1およびE 2は、W096/04385中に十分に記載されており、該文献を参照により本明細書に一体化させる。

【 0 0 1 4 】

蛋白に用いられる用語「精製」は、所望蛋白が組成物中の全蛋白成分の少なくとも35%を占めている組成物をいう。好ましくは、所望蛋白は全蛋白成分の少なくとも40%、より好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、さらに好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは、少なくとも約85%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%を占める。純度のパーセンテージ決定に影響しない場合には、組成物は炭水化物、塩類、脂質、溶媒等のごとき他の成分を含んでいてもよい。「単離」H C V蛋白は、純度が少なくとも35%であるH C V蛋白成分を意味する。

30

用語「本質的に精製された蛋白」は、インビトロ診断法に使用され、治療化合物として使用されるように精製されている蛋白をいう。これらの蛋白は細胞の蛋白またはD N A、ベクター由来の蛋白またはD N A、あるいは他のH C Vウイルス性成分を実質的に含まない。通常には、これらの蛋白は均質に精製されている（少なくとも純度80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、より好ましくは99%、さらにより好ましくは99.5%、最も好ましくはS D S - P A G Eおよび銀染色のような慣用的方法によつては混入蛋白が検出されない）。

40

【 0 0 1 5 】

本明細書の用語「組み換え発現」は、本発明蛋白が、以下に詳述する原核細胞、下等もしくは高等真核細胞において組み換え発現法により製造されるという事実をいう。

用語「下等真核細胞」は、酵母、真菌等のごとき宿主細胞をいう。一般的には、下等真

50

核細胞は単細胞である（必ずしもそうでなくもよい）。好ましい下等真核細胞はSaccharomyces、Schizosaccharomyces、Klyveromyces、Pichia（例えば、Pichia pastoris）、Hansenula（例えば、Hansenula polymorpha）、Yarrowia、Schwanniomycetes、Zygosaccharomyces等である。Saccharomyces cerevisiae、S. carlsbergensisおよびK. lactisは最も普通で使用される酵母宿主である。

【0016】

用語「原核細胞」は、E. coli、Lactobacillus、Lactococcus、Salmonella、Streptococcus、Bacillus subtilisまたはStreptomycesのごとき宿主をいう。これらの宿主も本発明の範囲内であると考えられる。

用語「高等真核細胞」は、哺乳動物、爬虫類、昆虫等のごとき高等動物由来の宿主細胞をいう。現在好ましい高等真核宿主細胞はチャニーズハムスター由来（例えば、CHO）、サル由来（例えば、COSおよびVero細胞）、幼若ハムスター腎臓由来（BHK）、ブタ腎臓由来（PK15）のもの、ウサギ腎臓13細胞（RK13）、ヒト骨肉腫細胞系143B、ヒト細胞系HeLaおよびHepG2のようなヒト肝癌細胞系、ならびに昆虫細胞系（例えば、Spodoptera frugiperda）由来のものである。宿主細胞は懸濁液またはフラスコ培養物、組織培養物、器官培養物等として提供されうる。あるいはまた、宿主細胞はトランスジェニック動物であってもよい。

10

【0017】

用語「ポリペプチド」はアミノ酸のポリマーをいい、特定の長さの生成物をいうのではない。よって、ペプチド、オリゴペプチドおよび蛋白はポリペプチドの定義に含まれる。またこの用語はポリペプチドの発現後修飾物、例えば、糖鎖付加物、アセチル化物、リン酸化物等を排除するものではない。例えば、1またはそれ以上のアミノ酸アナログ（例えば、非天然アミノ酸、PNA等を含む）を含有するポリペプチド、置換結合を有するポリペプチド、ならびに当該分野において知られた他の天然および非天然修飾物がこの定義に含まれる。

20

【0018】

用語「組み換えポリヌクレオチド」は、その起源または取り扱いに応じて、ポリヌクレオチドまたはゲノムの核酸、cDNA、半合成または合成のものを意味し、以下のものがある：（1）天然において結合しているポリヌクレオチドの全体または一部分に結合していないもの、（2）天然において結合しているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに結合しているもの、あるいは（3）天然において存在しないもの。

30

【0019】

用語「組み換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系」、「細胞培養物」、ならびに単細胞として培養された微生物または高等真核細胞系を示す他のかかる用語は、組み換えベクターまたは他の導入ポリヌクレオチドのレシピエントとして用いることのできる、あるいは用いられている細胞をいい、トランスフェクションされた元の細胞の子孫を含む。単一の親細胞の子孫は、自然、偶発的または人工的な変異のため、形態またはゲノムもしくは全DNA相補性において必ずしも親と同じでなくともよい。

【0020】

用語「レプリコン」は遺伝学的エレメント、例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、コスミド等であり、細胞中でポリヌクレオチド複製の自律的単位として挙動するもの、すなわち、自分自身の制御下で複製しうるものである。

40

用語「ベクター」は、所望オープンリーディングフレームの複製および/または発現を提供する配列をさらに含むレプリコンである。

【0021】

用語「制御配列」は、連結されているコーディング配列の発現を起こさせるのに必要なポリヌクレオチド配列をいう。かかる制御配列の性質は宿主生物により異なる。原核細胞においては、一般的にかかる制御配列はプロモーター、リボソーム結合部位、およびターミネーターを含む。真核細胞においては、一般的にかかる制御配列はプロモーターを含み、エンハンサーを含んでいてもよい。用語「制御配列」は、最少でも、存在が有利である

50

さらなる成分、例えば、分泌をつかさどるリーダー配列を含んでいてもよい。

【0022】

用語「プロモーター」は、RNAポリメラーゼをDNA鋳型に結合させて、隣接する構造遺伝子に対する正常転写開始部位におけるmRNA生成を開始させるコンセンサス配列を含むヌクレオチド配列である。

「作動可能に連結」なる表現は、そのように説明される成分が意図される様式で機能するような関係にある並置をいう。制御配列に適合した条件下でコーディング配列の発現が達成されるように制御配列がコーディング配列に「作動可能に連結」される。

「オープンリーディングフレーム」(ORF)は、選択されたリーディングフレーム中のポリペプチドをコードしているが停止コドンを含まないポリヌクレオチド配列の領域をいう。この領域はコーディング配列の一部またはコーディング配列全体であってもよい。

「コーディング配列」は、適当な調節配列の制御下に置かれた場合、mRNAおよび/またはポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。5'末端のスタートコドンおよび3'末端の翻訳停止コドンの翻訳によってコーディング配列の境界が決定される。コーディング配列はmRNA、ウイルスRNA、DNA(cDNAを包含)、および組み換えポリヌクレオチド配列を包含しうるが、これらに限らない。

【0023】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は免疫反応性のあるアミノ酸配列を意味する。一般的には、エピトープは少なくとも3個または4個のアミノ酸からなり、より通常には少なくとも5個または6個のアミノ酸、時々、約7個ないし8個、あるいは約10個のアミノ酸からなる。本明細書において用いるように、ポリペプチドのエピトープとは、該ポリペプチド中のエピトープと同じアミノ酸配列ならびにその免疫学的同等物をいう。また、かかる同等物は、例えば、遺伝子型1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4i, 4j, 4k, 4l, 5a, 5b, 6a, 6b, 6c, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 11a, 12aに属する現在知られている配列または株あるいは新たに決定されたHCV(サブ)タイプの株、サブタイプ(=遺伝子型)またはタイプ(グループ)特異的変種を包含する。エピトープを構成するアミノ酸は直鎖状配列の部分である必要はないが、いずれかの数のアミノ酸からなる1個またはそれ以上の列をなして散在し、かくしてコンホーメーションのエピトープを形成していてもよいことが理解されるべきである。

用語「免疫原性」は、体液性および/または細胞性の応答を引き起こす物質の能力をいい、該物質はアジュバント存在下または不存在下において、単独であっても、担体に結合していてもよい。「中和」は、感染性物質の感染性を不完全または完全にブロックする免疫応答をいう。「ワクチン」はHCVに対する不完全または完全な防御を誘導しうる免疫学的組成物である。治療ワクチンと呼ばれる場合には、ワクチンは個体の治療にも有用でありうる。

用語「治療的」は、HCV感染を治療しうる組成物をいう。

「有効量」は、投与された個体において免疫学的応答を誘導するに十分、あるいは意図された系(例えば、免疫アッセイ)において検出可能に免疫反応するに十分なエピトープを有するポリペプチドの量をいう。好ましくは、有効量は、上で定義した治療を行うに十分な量である。正確な必要量は適用例により異なるであろう。

【0024】

「抗体」はポリクローナルまたはモノクローナル抗体をいう。用語「モノクローナル抗体」は、均一な抗体集団を有する抗体組成物をいう。当該用語は抗体の種または源に限定されず、さらにまた作成方法にも限定されない。ヒト化抗体、1本鎖抗体あるいは該抗体の特異性をほぼ保持しているそれらの他のフラグメントが本発明によりカバーされることにも留意すべきである。

本明細書の用語「ヒト化抗体」は、免疫グロブリンのフレームワーク領域の少なくとも一部分がヒト免疫グロブリン配列に由来することを意味する。

本明細書の用語「1本鎖抗体」は、結合抗体の結合ドメイン(重鎖および軽鎖の両方)

10

20

30

40

50

を決定し、結合機能の保存を可能にする連結部分を提供することにより調製される抗体をいう。

本明細書の用語「(抗体の)フラグメント」は、元の抗体の抗原結合機能および特異性を保持している F_{ab} 、 $F_{(ab)_2}$ 、 F_v および他のフラグメントをいう。

【0025】

発明の詳細な説明

より詳細には、本発明は、還元剤の存在下における固相上の抗体を含む固相イムノアッセイに関する。実施例セクションで示すように、本発明者らは、固相に対して被覆された抗原とともに DTT のごとき還元剤が存在することは、固相イムノアッセイと組み合わせた抗原を、該抗原に指向された抗体に対してずっと反応性に見出した。溶液中

10

においても、還元により抗原はより反応性となる。
本発明の還元剤は S-S ジスルフィド架橋を還元するいずれかの作用剤である。「S-S」ジスルフィド架橋の還元は化学反応であり、それによりジスルフィドが還元されてチオール(-SH)になる。WO 96/04385 に開示されたジスルフィド架橋破壊剤および方法を、参照により本明細書に一体化させる。「S-S」還元を、(1) 酵素カスケード経路、または(2) 還元性化合物により行うことができる。チオレドキシン、グルタレドキシンのような酵素はインピボにおけるジスルフィドの還元に関与することが知られており、インピトロにおける「S-S」架橋の還元に有効であることが示されている。pH 7.0 において還元されたチオレドキシンによりジスルフィド結合が迅速に開裂され、DTT との反応に関する速度定数よりも約 10^4 倍大きな見かけの 2 次反応速度を有する

20

【0026】

蛋白のジスルフィド架橋を還元することのできるチオール化合物は、例えば、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリチオール(DTE)、 γ -メルカプトエタノール、チオカルバメート類、ビス(2-メルカプトエチル)スルホンおよび N, N'-ビス(メルカプトアセチル)ヒドラジン、ならびにナトリウム-チオナイトである。

アスコルビン酸または塩化すず($SnCl_2$) のようなチオール基を有しない還元剤は、モノクローナル抗体中のジスルフィド架橋の還元非常に有用であることが示されており(Thakur et al., 1991)、それらを NS3 の還元で使用してもよい。水素化ホウ素ナトリウムでの処理はペプチド中のジスルフィド架橋の還元効果的であることが示されている(Gailit, 1993)。トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)は低い pH においてジスルフィドを還元することができる(Burns et al., 1991)。DTT または水素化ホウ素ナトリウムを還元剤として用いる場合、セレノールはジスルフィドからチオールへの還元を触媒する。市販ジセレニドであるセレノシステアミンが触媒前駆体として使用された(Singh and Kats, 1995)。

30

【0027】

より詳細には、本発明は、抗原を固相に被覆、ブロッキングおよび/または固定する工程の間に還元剤が固相に添加される上記イムノアッセイの製造方法に関する。

また本発明は、固相の前処理工程の間に還元剤が添加される上記イムノアッセイを実行する方法に関する。

40

【0028】

被覆条件は当業者に知られているように広範であり、固相に蛋白を適用し、反応を起こさせて蛋白を固相に結合させることを包含する。結合は、共有結合、疎水結合またはイオン結合、ファンデルワールス力または水素結合であってよいが、これらに限らない。当業者に知られた別のバッファーをこの工程に使用してもよく、カルバメートおよびホスフェートバッファーがあるが、これらに限らない。

当該分野知られている方法によりブロッキングを行うことができ、例えば、アルブミン、血清蛋白、ポリビニルピロリドン(PVP)、界面活性剤、ゼラチン、ポリビニルアルコール(PVA)またはカゼインを用いて行ってもよい。

50

当該分野において知られた方法により固定を行う。

ブロッキング、固定および被覆条件のさらなる例を実施例セクションに示す。

【0029】

さらに詳細には、本発明は、抗原を固相に被覆する工程の間に還元剤が固相に添加される上記方法に関する。被覆バッファの例を実施例セクションに示す。知られている他のすべての被覆バッファも本開示の一部を形成する。

【0030】

また本発明は、固相をブロックする工程の間に還元剤が固相に添加される上記方法にも関し、固相は還元剤の存在下または不存在下でそれに適用された抗原を含む。ブロッキングバッファの例を実施例セクションに示す。知られている他のすべてのブロッキングバッファも本開示の一部を形成する。

10

【0031】

また本発明は、被覆抗原を固相に固定する工程の間に還元剤が固相に添加される上記方法にも関し、固相は還元剤の存在下または不存在下でそれに適用された抗原を含む。固定工程の前に、還元剤の存在下または不存在下でのブロッキング工程を行ってもよい。固定バッファの例を実施例セクションに示す。知られている他のすべての固定バッファも本開示の一部を形成する。

【0032】

また本発明は、試料添加前における固相の前処理工程の間に還元剤が添加される上記方法に関する。被覆、ブロッキングおよび/または固定工程において還元剤で処理されたプレートに関して、あるいは前以て還元剤で処理されていないプレートに関してプレートの前処理を行うことができる。

20

【0033】

結局、酵素免疫アッセイにおいて行われるさらなる工程の間に還元剤を添加してもよいが、可能には、被覆、ブロッキング、固定および/または前処理からなる上記4工程の1つまたはそれ以上において還元剤を適用した後に還元剤を添加する。かかるさらなる工程は抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

【0034】

好ましくは、本発明は、還元剤がDTT、DTEまたはTCEPである上記方法に関する。

30

【0035】

また本発明は、還元剤が0.1 mMないし1 M、より詳細には0.5 mMないし500 mM、さらにより詳細には1 mMないし250 mM、最も詳細には1ないし50 mMの濃度範囲で使用される上記方法に関する。いくつかの適用例においては0.5ないし50 mM、1ないし30 mM、2ないし20 mM、5ないし15 mMの範囲、あるいは約10 mMの還元剤が必要となりうる。他の適用例においては50 ~ 500 mM、100 ~ 300 mMまたは200 mMの濃度のDTTが必要となりうる。DTTは還元剤として特に好ましい。

【0036】

40

また本発明は、抗原がHCV NS3蛋白である上記方法に関する。より詳細には、HCV NS3ヘリカーゼである。E1および/またはE2蛋白のごときHCVエンベロープ蛋白も好ましい。当該分野で知られた他の蛋白も、DTT存在下で固相に添加された場合、あるいは添加後DTTで処理された場合に、該蛋白に対する抗体とうまく反応する可能性がある。

【0037】

また本発明は、該固相免疫アッセイが異なる病原体の抗原または表現型的に関連した条件の組み合わせを含むものである上記方法に関する。

【0038】

また本発明は、上記方法により製造される固相免疫アッセイに関する、より詳細には

50

、還元剤の存在下で抗原を含有するマイクロタイタープレート、膜片またはシリコンチップのごとき固相を少なくとも1個含むキットに関する。

より詳細には、本発明は、上記方法により製造されるELISAに関する。

【0039】

好ましい具体例において、本発明は、好ましくは被覆および/または固定工程において還元剤が添加される上記方法により製造されるELISAに関する。1の好ましい具体例において、被覆工程において還元剤を適用することができる。もう1つの好ましい具体例において、固定工程において還元剤を適用することができる。特に好ましい具体例において、被覆工程および固定工程の両方において還元剤が添加される。

もう1つの好ましい具体例において、本発明は、試料添加前におけるプレートの前処理の間に還元剤が添加される上記方法により製造されるELISAに関する。被覆および/または固定工程において還元剤で処理されたプレートに関して、あるいは前以て還元剤で処理されていないプレートに関してプレートの前処理を行うことができる。プレートの前処理を行うことができる。酵素イムノアッセイにおけるさらなる工程の間に還元剤を添加してもよい。かかるさらなる工程は抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

【0040】

また本発明は、上記方法により製造されるラインイムノアッセイ(LIA)にも関する。

好ましい具体例において、本発明は、好ましくはブロッキング工程および/または洗浄工程において還元剤が添加される上記方法により製造されるラインイムノアッセイ(LIA)に関する。酵素イムノアッセイを製造または実行するさらなる工程の間に還元剤を添加してもよい。かかるさらなる工程は、固定、前処理、抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

【0041】

また本発明は、上記方法により製造されるクイック(QUICK)アッセイにも関する。

好ましい具体例において、本発明は、好ましくは抗原を片に被覆する工程の間に還元剤が添加される上記方法により製造されるQUICKアッセイに関する。QUICKアッセイは、スプレイにより抗原が片上に被覆される水平流れアッセイ(lateral flow assay)である。このアッセイにおいて、好ましくは還元剤をスプレイ溶液に添加する。酵素イムノアッセイの製造または実行におけるさらなる工程の間に還元剤を添加してもよい。かかるさらなる工程は、ブロッキング、固定、前処理、抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

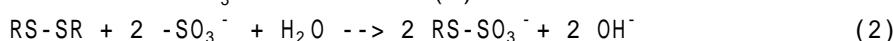
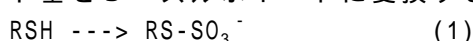
また本発明は、上記抗原に対して生成した抗体のインビトロでの診断のための上記アッセイの使用に関する。

【0042】

また本発明は、スルホン化およびその後の脱スルホン化の工程を含む方法により処理されたHCVN33蛋白にも関する。

スルホン化および脱スルホン化はそれぞれ蛋白に-SO₃基を導入または蛋白から除去する反応である。

スルホン化は、下記反応に従って蛋白(R)上のチオール基(SH)およびジスルフィド基をS-スルホネートに変換するプロセスであると定義される。



反応生成物はS-スルホ蛋白であり、通常には中性pHにおいて安定である。pH > 7において蛋白溶液をテトラチオネートとともにインキュベーションすることにより反応(1)を行うことができる(Inglis and Liu, 1970)。銅イオン存在下で反応(2)を完了させる(Cole, 1967)。Chan(1968)は、酸素の存在下における亜硫酸ナトリウムおよび触媒量のシステインでの蛋白の処理によりスルホ蛋白が得られることを示した。

10

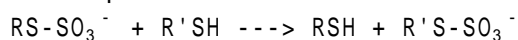
20

30

40

50

(1) 過剰の競合 - S H (チオール) 基により、(2) 還元剤により、あるいは(3) 非中性 pH 条件におけるインキュベーションにより、脱スルホン化を行うことができる。



低分子量化合物または蛋白性 - S H 基から競合チオール基を得てもよい。

モノ - またはジチオール含有化合物の例は：

システイン、システアミン、還元されたグルタチオン、N - アセチルシステイン、ホモシステイン、 -メルカプトエタノール、チオカルバメート類、ビス(2 -メルカプトエチル)スルホン(BMS)およびN, N' - ビス(メルカプトアセチル)ヒドラジン(BMH)、5, 5' - ジチオビス - (2 - ニトロ安息香酸)(DTNBまたはElman試薬)、ジチオスレイトール(DTT)およびジチオエリスリトール(DTE)である。

10

【0043】

さらに本発明は、両性イオン性界面活性剤でさらに処理された上記HCV NS3蛋白に関する。エムピゲン(Empigen)はベタインとして知られ、両性イオン性界面活性剤の特に好ましい例である。他の適当な界面活性剤は当業者に知られており、WO96/04385にも説明されている。

【0044】

さらに本発明は、少なくとも2つ、好ましくは3つまたは4つ、さらに好ましくはすべての下記工程：

(a) 組み換え宿主細胞からの溶解物をスルホン化すること、あるいは塩化グアニジウム(好ましくは、6M Gu.HCl)の存在下で組み換え宿主細胞を溶解させて細胞溶解物をスルホン化すること、

20

(b) 好ましくは細胞残渣を除去した後に、両性イオン性界面活性剤で処理すること、

(c) スルホン化組み換え蛋白を精製すること、あるいはスルホン化組み換え蛋白を精製し、その後両性イオン性界面活性剤を除去すること、ここに好ましくは、精製はクロマトグラフィー、より好ましくはNi - IMACクロマトグラフィーであり、組み換え蛋白はHis - タグを付した組み換え蛋白である、

(d) 好ましくはモル過剰のDTTのごとき還元剤でスルホン化組み換え蛋白を脱スルホン化すること、

(e) モル過剰のDTTの存在下で貯蔵すること

30

を含む、システイン含有組み換え発現蛋白の精製方法に関する。

エムピゲンは両性イオン性界面活性剤の特に好ましい例である。かかる両性イオン性界面活性剤およびDTTを用いることは、HCV NS3ヘリカーゼおよびHCVエンベロープ蛋白の精製プロトコルを改良するものである。

【0045】

また本発明は、図1(配列番号：3 ~ 18)に示すHCV NS3ポリ蛋白(polyprotein)をコードするHCVポリ核酸(polynucleic acid)、または図2 - 1、3 - 1、4 - 1、5 - 1、6 - 1、7 - 1および8 - 1(配列番号：19、21、23、25、27、29および31)に示す配列を有するHCVポリ核酸に関する。

また本発明は、図2 - 1、3 - 1、4 - 1、5 - 1、6 - 1、7 - 1および8 - 1において特徴づけられ、さらにその産物が疑陽性HCV試料と反応しない事実により特徴づけられる上記HCVポリ核酸、あるいは疑陽性HCV試料と反応しないNS3エピトープをコードする該ポリ核酸の部分にも関する。配列番号：19、21、23、25、27、29および31により示されるクローンによってコードされる蛋白は疑陽性HCV試料と反応しないという特性を有するが、DTT処理後、それらは大部分の既知NS3抗体陽性試料と反応し得た。

40

【0046】

さらに本発明は、説明したポリ核酸を含む組み換えベクターに関する。

さらに本発明は、本発明のベクターを含む宿主細胞に関する。

【0047】

50

さらに本発明は、本発明の核酸の検出方法に関する。この検出方法は、MaertensおよびStuyverのWO 96 / 13590に記載のごとき当該分野で知られたいずれの方法であってもよい。

より詳細には、本発明は、

本発明の核酸をプローブと接触させ；

該核酸と該プローブとの間に形成された複合体を調べることを含む、本発明の核酸の検出方法に関する。

したがって、本発明は、プローブもしくはプライマーとして使用される上記単離核酸またはそのフラグメントに関する。

【0048】

さらに本発明は、本発明の少なくとも1つのプライマーおよび/または少なくとも1つのプローブを含む、上記核酸配列を検出するための診断キットに関する。これらの適用を見渡すための詳細な説明についてはWO 96 / 13590を参照のこと。

【0049】

還元により得られる反応性のほかに、NS3の反応性はNS3抗原の配列によっても重大に決定される。

それゆえ、本発明は、図1、2-2、3-2、4-2、5-2、6-2、7-2および8-2（配列番号：20、22、24、26、28、30、32）に示すアミノ酸配列の部分または全体を有するHCVポリペプチドにも関する。また本発明は、図1（配列番号：1~18）に示すHCV NS3ヘリカーゼ蛋白またはそのユニークな部分にも関する

。また本発明は、S1200、A1218、A1384、P1407、V1412、P1424もしくはF1444のいずれか、またはこれらのアミノ酸とL1201、S1222、I1274、S1289、T1321、A1323、T1369、L1382、V1408、A1409もしくはF1410のいずれかとの組み合わせを含むHCV NS3ヘリカーゼ蛋白またはHCV NS3ヘリカーゼ蛋白の部分にも関する。上記番号付けは広く受け入れられているHCVアミノ酸の番号付けシステムによるものである。

【0050】

さらに本発明は、本発明のポリペプチドまたはその機能的同等物もしくはフラグメントを含む医薬組成物に関する。用語「医薬組成物」は、本発明のポリペプチドおよび医薬上許容される担体もしくは賦形剤（両方の用語を混用することができる）を含む組成物または医薬（両方の用語を混用することができる）に関する。この医薬組成物を医薬として使用することができる。この医薬組成物をHCV感染の治療または予防のための医薬として使用することができる。当業者に知られた適当な担体または賦形剤はセイライン、リンゲル液、ブドウ糖液、Hankの溶液、固定油脂（fixed oils）、オレイン酸エチル、セイライン中5%ブドウ糖、等張性および化学的安定性を高める物質、バッファーならびに保存料である。他の適当な担体は、それ自体組成物を与えられる個体に有害な抗体の産生を誘導しない担体を包含し、例えば、蛋白、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸およびアミノ酸コポリマーのごときものである。当業者の知識内の適当な方法により「医薬組成物」または「医薬」を投与することができる。好ましい投与経路は非経口経路またはワクチンである。非経口投与またはワクチン投与において、本発明の医薬を、上記の医薬上許容される賦形剤と混合された溶液、懸濁液またはエマルジョンのごとき1回分の注射可能形態として処方する。例えば、ワクチンとして適用するため、あるいはポリクローナル抗血清/抗体を生じさせるためには、有効量は種、年齢、および個体の一般的な状態、治療すべき症状の重さ、選択される個々のポリペプチドならびに投与方法等により様々である。比較的広範囲かつクリティカルでない範囲にわたって有効量が見出されると考えられる。ルーチンな実験のみにより適切な有効量を容易に決定することができる。HCV疾患の予防のためのNS3および/またはE1および/またはE2および/またはE1/E2単量体またはオリゴマーエンベロープ蛋白の好ましい範囲は0.01ないし10000 μg/回、好ましくは0.1ないし1000 μg/回、より好ましくは1ないし50 μg/回、

10

20

30

40

50

g / 回である。十分な免疫応答およびその後のHCVに対する防御を得るためには1個体につき数回の投与が必要になるかもしれない。治療的ワクチンの場合、必要な投与回数は10回以上であるかもしれない。連続的輸液を用いてもよい。その場合、5ないし20 μg / kg / 分、より好ましくは7ないし15 μg / kg / 分の量で医薬を輸液してもよい。本発明の医薬組成物は、配列番号：3～18、20、22、24、26、28、30、32に示される配列の機能的に同等な変種またはフラグメントを含んでいてもよい。変種またはフラグメントは、本発明のポリペプチドの蛋白配列全体あるいは本発明のポリペプチドの蛋白配列の一部を含む分子であって、ある種の修飾が付されており、本発明のポリペプチドの生物学的特性のすべてまたは一部を保持している分子をいう。かかる修飾は、多糖鎖の付加、ある種の化学基の付加、脂質部分の付加、他のペプチドまたは蛋白配列との融合ならびに分子内架橋の形成を包含するが、これらに限らない。

10

【0051】

また本発明は上記HCVポリペプチドを含むイムノアッセイにも関する。該イムノアッセイは当該分野で知られたいずれのフォーマットのタイプであってもよい(例えば、WO96/13590およびColigan et al. 1992参照)。詳細には、本発明は、本発明のポリペプチドを検出する方法に関し、該方法は、

該ポリペプチドを該ポリペプチドに結合するリガンドと接触させ；

該ポリペプチドと該リガンドとの間に形成された複合体を調べることを含む。

また本発明は、本発明のポリペプチドに結合するリガンドにも関する。用語「リガンド」は、本発明のポリペプチドに結合しうる分子をいう。リガンドは、特に、本発明のポリペプチドに対して特異的に生成した(当該分野において知られた方法により)ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体をいい、さらに抗体様構築物およびLorre et alのEP9780062.0に詳述された他の構築物も包含する。かかる抗体は生物学的液体中の抗原の検出に非常に有用である可能性がある。ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジンを用いるアッセイ、ELISAおよび免疫沈降、免疫組織化学的手法および凝集アッセイのごとき当該分野で知られたイムノアッセイにより抗原の検出を行うことができる。これらのアッセイに関する詳細な説明はWO96/13590にあり、参照により本明細書に一体化させる。

20

【0052】

さらにそのうえ、該抗体はHCVまたは他の疾病の治療に非常に有用である可能性があり、それゆえ、非ヒト宿主において生成される場合にはヒト化されていてもよい。したがって、本発明は、医薬上許容される賦形剤中のこれらの抗体を含む、医薬として使用される組成物に関する。

30

また本発明は、本発明の該抗体を製造し使用方法にも関する。HCVポリペプチドの製造および使用方法はWO96/13590に開示されている。該使用は診断における使用のみならず治療的および予防的使用も包含する。本発明のNS3蛋白はワクチン組成物中に含有させるのにも適する。かかるワクチン組成物は、有効成分のほかに、当該分野で知られたいずれかのタイプのアジュバントを含んでいてもよい。WO96/13590の内容を参照により本明細書の説明に取り入れる。本発明のNS3蛋白は、薬剤スクリーニング目的のようにNS3ヘリカーゼが適用可能ないずれの適用例にも使用することができる。

40

【実施例1】

【0053】

実施例1 HCV NS3タイプ1bクローン19bのイー・コリ(E. coli)における発現

1.1 HCV NS3タイプ1bクローン19aおよび19b遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマーHCP r 59 (5'-GGGCCCCACCATGGGGTTGCGAAGGCGG TGGACTT-3') (配列番号：1)およびHCP r 60 (5'-CTATTAGCTGAAAGTCGACTGTCTGGGTG ACAGCA-3') (配列番号：2)を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン(アミノ酸1188

50

~ 1465) を RT-PCR により HCV サブタイプ 1b 血清 IG 8309 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより PCR フラグメント 19 を得て、イー・コリ中にクローン化した。センスプライマー HCP r 59 は、人工的なメチオニンを含む Apa I 制限部位を導入する。アンチセンスオリゴヌクレオチド HCP r 60 は aa (アミノ酸) 1465 の後ろに停止コドンを導入する。次いで、PCR フラグメントを Apa I で切断し、得られた 833 bp の Apa I フラグメントを Apa I で切断した発現ベクター pmTNFHRP (Innogenetics, Ghent, Belgium) 中に組み込んだ。4つのC型肝炎クローン (HCC 1) を配列決定した: HCC 119a および HCC 119b (図1および図2 - 2 に示す推定アミノ酸配列参照)。クローン HCC 119b (pmTNFHRPHCC 119b) をさらなるサブクローニングのために保存した。

10

【0054】

1.2 発現プラスミド pEmTNFMPPHHCC 119b の構築

ベクター pmTNFHRPHCC 119b から出発して、NS3クローン19bコーディング配列を 900 bp の Nco I フラグメントとして単離し、Nco I で切断した発現ベクター pEmTNFMPPH (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクター pEmTNFMPPHHCC 119b を得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3クローン19bを発現する(配列番号: 19および20; 図2)。

【0055】

1.3 イー・コリにおけるHCV NS3クローン19bの発現

イー・コリ株 MC1061 (pAcI) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミド pEmTNFMPPHHCC 119b で形質転換した。pEmTNFMPPHHCC 119b を有する MC1061 (pAcI) 細胞を、10 μg/ml のテトラサイクリンを補足した Luria Broth (LB) 中、28 °C において一晩増殖させた。培養物を新鮮 LB で 20 倍に希釈し、次いで、28 °C で増殖させて OD₆₀₀ を 0.2 とし、その後、温度を 42 °C まで上昇させた。誘導から 2 ~ 3 時間後に細胞を集めた。HCV NS3クローン19b融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

20

【実施例2】

【0056】

実施例2 イー・コリにおけるHCV NS3クローンB9の発現

2.1 HCV タイプ1aクローンB9遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー HCP r 59 (5'-GGGCCCCACCATGGGGTTGCGAAGGCGGTGGACTT-3') (配列番号: 1) および HCP r 60 (5'-CTATTAGCTGAAAGTCGACTGTCTGGGTGACAGCA-3') (配列番号: 2) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (アミノ酸 1188 ~ 1465) を RT-PCR により HCV サブタイプ 1a 血清 IG 21054 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより PCR フラグメント B を得て、イー・コリ中にクローン化した。センスプライマー HCP r 59 は、人工的なメチオニンを含む Apa I 制限部位を導入する。アンチセンスオリゴヌクレオチド HCP r 60 は aa 1465 の後ろに停止コドンを導入する。次いで、PCR フラグメントを pGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI, US) 中に組み込んだ。4つのC型肝炎クローンを配列決定した: B7、B9、B12 および B14 (図1および図3 - 2 に示す推定アミノ酸配列参照)。クローン B9 (pGEMTNS3B9) をさらなるサブクローニングのために保存した。

30

40

【0057】

2.2 発現プラスミド pIGFH111NS3B9 の構築

ベクター pGEMTNS3B9 から出発して、B9コーディング配列を 850 bp の Nco I / Stu I フラグメントとして単離し、Nco I / Stu I で切断した発現ベクター pIGFH111 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクター pIGFH111NS3B9 を得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部

50

位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3クローンB9を発現する(配列番号: 21および22; 図3)。

【0058】

2.3 イー・コリにおけるHCV NS3クローンB9の発現

イー・コリ株MC1061(pAcI)細胞(Wertman et al., 1986)をプラスミドpIGFH111NS3B9で形質転換した。pIGFH111NS3B9を有するMC1061(pAcI)細胞を、10μg/mlのテトラサイクリンを補足したLuria Broth(LB)中、28°Cにおいて一晚増殖させた。培養物を新鮮LBで20倍に希釈し、次いで、28°Cで増殖させてOD₆₀₀を0.2とし、その後、温度を42°Cまで上昇させた。誘導から2~3時間後に細胞を集めた。HCV NS3クローンB9融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

10

【実施例3】

【0059】

実施例3 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ1aクローンA26、C16およびD18の発現

プライマーHCP r59およびHCP r60を用いるクローンB9の単離に関して説明したのと同様にして、クローンA26、C16およびD18を、それぞれ、HCVサブタイプ1a感染血清IG21051、IG17790およびIG21068から単離した。最初に、クローンA5、A26、C1、C3、C4、C12、C16、D17、D18およびD19をクローン化し、次いで、配列決定した(図1に示す推定アミノ酸配列参照)。クローンA26、C16およびD18をさらなるサブクローンのために保存した。

20

【実施例4】

【0060】

実施例4 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ3aクローン21および32の発現

4.1 HCV NS3タイプ3aクローン21および32遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー403(5'GGGCCCCACCATAGGTGTAGCAAAAAGCCCTACAGTT-3') (配列番号: 33) および404(5'-CTATTAGCTGAAGTCAACGTACTGTTCAACAGC-3') (配列番号: 34) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン(アミノ酸1188~1465)をRT-PCRによりHCVサブタイプ3a血清IG21349(Innogenetics, Ghent, Belgium)から増幅した。これにより、いずれの場合にも約850bpのPCRフラグメントが得られ、次いで、pGEM-Tベクター(Promega, Madison, WI, US)中にサブクローンした。クローン化された各PCRフラグメントから、数個のクローンを配列決定したが、配列決定により、各血清由来のただ1個のクローン化フラグメントだけが完全に正しいものであることがわかった。これらは血清IG21349に関してはクローン31(pGEM-TNS3T3a.21)であり、血清IG20014に関してはクローン32(pGEM-TNS3T3a.32)であった(図4および5)。

30

【0061】

4.2 発現プラスミドpIGFH111NS3T3a.21およびpIGFH111NS3T3a.32の構築

ベクターpGEM-TNS3T3a.21およびpGEM-TNS3T3a.32から出発して、クローン21および32コーディング配列を850bpのNcoI/SalIフラグメントとして単離し、NcoI/SalIで切断した発現ベクターpIGFH111(Innogenetics, Ghent, Belgium)に挿入し、それぞれベクターpIGFH111NS3T3a.21およびpIGFH111NS3T3a.32を得た。これらのプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3タイプ3aクローン21および32を発現する(配列番号: 23~26; 図4および5)。

40

【0062】

50

4.3 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ3aクローン21および32の発現

イー・コリ株MC1061 (pAcI) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミド pIGFH111NS3T3a.21 および pIGFH111NS3T3a.32 でそれぞれ形質転換した。pIGFH111NS3T3a.21 または pIGFH111NS3T3a.32 を有するMC1061 (pAcI) 細胞を、10 μg/ml のテトラサイクリンを補足したLuria Broth (LB) 中、28 °C において一晩増殖させた。培養物を新鮮LBで20倍に希釈し、次いで、28 °C で増殖させてOD₆₀₀を0.2とし、その後、温度を42 °C まで上昇させた。誘導から2~3時間後に細胞を集めた。HCV NS3タイプ3aクローン21および32融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

10

【実施例5】

【0063】

実施例5 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2aクローン3の発現

5.1 HCV NS3タイプ2aクローン3遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー412 (5'-GGGCCCCACCATGGGCGTGGCCAAGTCCATAGACTT-3') (配列番号: 35) および413 (5'-CTATTAGCTGAAGTCTACAACCTTGAGTGACCGC-3') (配列番号: 36) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (アミノ酸1188~1465) をRT-PCRによりHCVサブタイプ2a血清IG21342 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより、約850bpのPCRフラグメントが得られ、次いで、pGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI, US) 中にサブクローンした。数個のクローンを配列決定し、クローン3 (pGEM-TNS3T2a) をさらなるサブクローニングのために保存した (図6)。

20

【0064】

5.2 発現プラスミドpIGFH111NS3T2aの構築

ベクターpGEM-TNS3T2aから出発して、クローン3コーディング配列を850bpのNcoIフラグメントとして単離し、NcoIで切断した発現ベクターpIGFH111 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクターpIGFH111NS3T2aを得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3タイプ2aクローン3を発現する (配列番号: 27および28; 図6)。

30

【0065】

5.3 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2aクローン3の発現

イー・コリ株MC1061 (pAcI) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミド pIGFH111NS3T2aで形質転換した。pIGFH111NS3T2aを有するMC1061 (pAcI) 細胞を、10 μg/ml のテトラサイクリンを補足したLuria Broth (LB) 中、28 °C において一晩増殖させた。培養物を新鮮LBで20倍に希釈し、次いで、28 °C で増殖させてOD₆₀₀を0.2とし、その後、温度を42 °C まで上昇させた。誘導から2~3時間後に細胞を集めた。HCV NS3タイプ2aクローン3融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

40

【実施例6】

【0066】

実施例6 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2bクローン9の発現

6.1 HCV NS3タイプ2bクローン9遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー401 (5'-GGGCCCCACCATGGGCGTAGCCAAATCCATTGACTT-3') (配列番号: 37) および402 (5'-CTATTAGCTGAAGTCTACAATTTGAGAGACCGC-3') (配列番号: 38) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (アミノ酸1188~1465) をRT-PCRによりHCVサブタイプ2b血清IG20192 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより、約850bpのPCRフラグメントが得られ、pGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI, US) 中にサブクローンした。数個のクロー

50

ーンを配列決定し、クローン 9 をさらなるサブクローニングのために保存した (図 7) 。

【 0 0 6 7 】

6 . 2 発現プラスミド p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 b の構築

ベクター p G E M - T N S 3 T 2 b から出発して、クローン 9 コーディング配列を 8 5 0 b p の N c o I フラグメントとして単離し、N c o I で切断した発現ベクター p I G F H 1 1 1 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクター p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 b を得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミ T N F の N 末端の 2 5 a a との融合蛋白として H C V N S 3 タイプ 2 b クローン 9 を発現する (配列番号 : 2 9 ~ 3 0 ; 図 7) 。

【 0 0 6 8 】

6 . 3 イー・コリにおける H C V N S 3 タイプ 2 b クローン 9 の発現

イー・コリ株 M C 1 0 6 1 (p A c I) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミド p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 b で形質転換した。p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 b を有する M C 1 0 6 1 (p A c I) 細胞を、1 0 μ g / m l のテトラサイクリンを補足した Luria Broth (L B) 中、2 8 ℃ において一晚増殖させた。培養物を新鮮 L B で 2 0 倍に希釈し、次いで、2 8 ℃ で増殖させて O D₆₀₀ を 0 . 2 とし、その後、温度を 4 2 ℃ まで上昇させた。誘導から 2 ~ 3 時間後に細胞を集めた。H C V N S 3 タイプ 2 b クローン 9 融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体および H C V 陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

【 実施例 7 】

【 0 0 6 9 】

実施例 7 イー・コリにおける H C V N S 3 タイプ 2 c クローン 1 4 の発現

7 . 1 H C V N S 3 タイプ 2 c クローン 1 4 遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー 4 0 1 (5'-GGGCCCCACCATGGGCGTAGCCAAATCCATTGACT T-3') (配列番号 : 3 7) および 4 0 2 (5'-CTATTAGCTGAAGTCTACAATTTGAGAGACCGC-3') (配列番号 : 3 8) を用いて、N S 3 ヘリカーゼドメイン (アミノ酸 1 1 8 8 ~ 1 4 6 5) を R T - P C R により H C V サブタイプ 2 c 血清 I G 2 0 0 3 1 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより、約 8 5 0 b p の P C R フラグメントが得られ、p G E M - T ベクター (Promega, Madison, WI, US) 中にサブクローンした。数個のクローンを配列決定し、クローン 1 4 (p G E M - T N S 3 T 2 c) をさらなるサブクローニ

【 0 0 7 0 】

7 . 2 発現プラスミド p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 c の構築

ベクター p G E M - T N S 3 T 2 c から出発して、クローン 1 4 コーディング配列を 8 5 0 b p の N c o I フラグメントとして単離し、N c o I で切断した発現ベクター p I G F H 1 1 1 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクター p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 c を得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミ T N F の N 末端の 2 5 a a との融合蛋白として H C V N S 3 タイプ 2 c クローン 1 4 を発現する (配列番号 : 3 1 および 3 2 ; 図 8) 。

【 0 0 7 1 】

7 . 3 イー・コリにおける H C V N S 3 タイプ 2 c クローン 1 4 の発現

イー・コリ株 M C 1 0 6 1 (p A c I) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミド p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 c で形質転換した。p I G F H 1 1 1 N S 3 T 2 c を有する M C 1 0 6 1 (p A c I) 細胞を、1 0 μ g / m l のテトラサイクリンを補足した Luria Broth (L B) 中、2 8 ℃ において一晚増殖させた。培養物を新鮮 L B で 2 0 倍に希釈し、次いで、2 8 ℃ で増殖させて O D₆₀₀ を 0 . 2 とし、その後、温度を 4 2 ℃ まで上昇させた。誘導から 2 ~ 3 時間後に細胞を集めた。H C V N S 3 タイプ 2 c クローン 1 4 融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体および H C V 陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

【 実施例 8 】

【 0 0 7 2 】

実施例 8 9 体積の 8 M 塩酸グアニジニウム ($\text{Gu} \cdot \text{HCl}$) および 1 体積の 0 . 2 M NaHPO_4 を各グラム当量の湿イー・コリ細胞ペーストに添加し、連続的にボルテックスすることにより溶液を均質化させた。固体 $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ および Na_2SO_3 を溶液に添加して、それぞれの最終濃度を 6 5 m M および 3 6 0 m M とした。 CuSO_4 (ストック溶液 : 2 5 % NH_3 中 0 . 1 M) を添加して最終濃度 1 0 0 μM とした。暗所かつ室温において溶液を一晩攪拌し、 - 7 0 でインキュベーションした後、 4 で遠心分離 (2 0 0 0 0 r p m で 3 0 分、 J A 2 0 ローター) することにより清澄化させた。

エムピゲン BB^{TM} (Albright & Wilson Ltd., Okibury, UK) およびイミダゾールを上清に添加して最終濃度をそれぞれ 1 % (w / v) および 2 0 m M とした。 1 N HCl を用いて pH を 7 . 2 に合わせた。 3 L の細胞培養物に相当する試料を、 2 0 m M イミダゾールを含有するバッファー A で平衡化しておいた 2 5 m L の $\text{Ni} - \text{IDA} - \text{Sepharose FF}$ (XK 16/20 カラム, Pharmacia, Upsala, Sweden) に 2 m L / 分で負荷した (バッファー A : 5 0 m M ホスフェート、 6 M $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$ 、 1 % エムピゲン、 pH 7 . 2) 。 $\text{Ni} - \text{IDA} - \text{Sepharose}$ カラムを下記バッファーで順次洗浄した :

2 0 m M イミダゾール含有バッファー A

3 5 m M イミダゾール含有バッファー A

5 0 m M イミダゾール含有バッファー A

5 0 m M イミダゾール含有バッファー B (バッファー B : 5 0 m M ホスフェート、 6 M $\text{Gu} \cdot \text{HCl}$ 、 pH 7 . 2)

2 0 0 m M イミダゾール含有バッファー B。

2 8 0 n m における吸光度がベースラインに達するまでクロマトグラフィーにおいて各洗浄を行った。 5 0 m M EDTA 、 5 0 0 m M NaCl 、 pH 7 . 0 でカラムを再生した。

非還元的条件および銀染色を用いる $\text{SDS} - \text{PAGE}$ によりフラクションを分析した。 $\text{mTNF} - \text{NS3} - \text{B9}$ 融合蛋白を 2 0 0 m M イミダゾールでの溶出物中に回収した。ウサギ抗ヒト TNF (1 μg NS3 / レーン) およびウサギ抗イー・コリ (1 0 μg NS3 / レーン) を用いるウェスタンブロッティングにより、この単一クロマトグラフィー工程後にお NS3 純度が 9 9 % 以上であることが示された。

2 0 0 m M イミダゾール溶出フラクションをプールし、脱塩した。

4 0 m L の $\text{Ni} - \text{IDA}$ 溶出試料を、 5 0 m M ホスフェート、 6 M 尿素、 1 m M EDTA 、 pH 7 . 2 で平衡化しておいた 3 0 0 m L の Sephadex G25 カラム (XK 50, Pharmacia, Upsala, Sweden) に 1 0 m L / 分で負荷した。 1 0 m L のフラクションを集め、マイクロ BCA 法 (Pierce, Rockford, IL, US) により蛋白濃度を調べた。脱塩バッファーを用いて蛋白濃度を 5 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ に合わせ、次いで、脱スルホン化および還元を行った。全工程にわたる収量は、 1 L の培養物あたり 5 0 ~ 5 5 m g の精製 NS3 融合蛋白であった。

最後に、 DTT (ストック溶液 : 蒸留水中 1 0 0 m M) を、 NS3 抗原中のシステイン含量 (例えば、 $\text{NS3} - 19b$ は 7 個のシステインを含む) に対して 1 0 0 倍モル過剰添加した。溶液に窒素を吹き込み、 2 8 で 1 時間インキュベーションした。次いで、 ELISA および LIA 被覆用に NS3 試料を適当なバッファーで希釈した。

【 実施例 9 】

【 0 0 7 3 】

実施例 9 LIA において試験した NS3 ヘリカーゼ抗体の反応性

NS3 ヘリカーゼ抗体の反応性を調べるために、ホスフェート緩衝化セイライン中の 5 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ NS3 抗原溶液をナイロン膜片上に適用した。 1 8 ~ 2 4 において少なくとも 1 時間片を乾燥させ、次いで、還元剤 DTT の存在下 (1 0 m M) または不存在下で $\text{PBS} / \text{カゼイン}$ でブロックした。次いで、 DTT 不含または 1 0 m M DTT 含有する $\text{Tween} - 20$ 含有 PBS で、次いで、 DTT 不含または 1 0 m M DTT 含有する 1 m M EDTA 含有水で片を洗浄した。膜を 3 0 分乾燥させ、異なる患者の試料を調べ

10

20

30

40

50

るために片状に切断した。

抗HCVセロコンバージョンパネルPHV903 (Boston Biomedica Inc., Boston, U S) とともに片をインキュベーションした実験結果を表1に示す。

【実施例10】

【0074】

実施例10 ELISAにおいて試験したNS3ヘリカーゼ抗体の反応性

NS3ヘリカーゼ抗体の反応性を調べるために、実施例4のごとく精製したNS3抗原でELISAプレートを次のように被覆した。

マイクロタイタープレートのウェルを、200mM DTT含有またはDTT不含の1mM EDTA含有50mM炭酸バッファーを含有する被覆バッファー中、濃度0.3μg/mlのNS3蛋白で被覆した。マイクロタイタープレートを20℃で18時間インキュベーションし、1ウェルあたり300μlのPBS/カゼインバッファーでブロックした。プレートを20℃で2時間インキュベーションし、次いで、200mM DTT含有またはDTT不含の1mM EDTA含有固定バッファー300μlで、20℃で2時間固定した。

結果を表2および3に示す。表2は、NS3で被覆し、DTTありまたはなしで固定したアッセイをBBIセロコンバージョンパネルPHV901およびPHV902に適用した場合のノイズ対シグナル値を示す。表3は、DTTを用いるアッセイによりHCV抗体をより早く検出できる日数をまとめたものである。明らかに、アッセイにDTTを用いることによって、12のHCVセロコンバージョンにおけるより早い検出の全日数34を得ることができる。

【0075】

【表1】

表1 実施例9で説明したHCV NS3で被覆したLIAにおいて試験したBBIパネル

PHV	+DTT ¹	-DTT ¹
903-01	-	-
903-02	-	-
903-03	+/-	-
903-04	2	-
903-05	2	+/-
903-06	2	+/-
903-07	4	2
903-08	4	2

¹-: 反応せず; +反応陽性; 同じ片上にスプレイされた異なるカットオフ線との比較において強度等級を示す。

【表 2】

表 2 実施例 10 において説明した HCV NS3 で被覆した ELISA にいて試験した BBI パネル

メンバー ID 番号	採血日	+ DTT (OD ₄₅₀)	- DTT (OD ₄₅₀)
PHV901-01	09/23/93	0.1	0.3
PHV901-02	11/27/93	0.1	0.3
PHV901-03	12/29/93	2.0	2.9
PHV901-04	12/31/93	2.1	3.0
PHV901-05	01/05/94	2.2	3.1
PHV901-06	01/07/94	2.4	3.2
PHV901-07	02/01/94	4.1	6.0
PHV901-08	02/09/94	3.9	5.9
PHV901-09	03/01/94	4.0	7.9
PHV901-10	03/08/94	4.1	7.8
PHV901-11	04/14/94	4.2	8.3
PHV903-01	02/07/92	0.2	0.2
PHV903-02	02/12/92	0.9	0.9
PHV903-03	02/14/92	1.3	1.6
PHV903-04	02/19/92	2.5	2.7
PHV903-05	02/21/92	2.8	2.8
PHV903-06	02/26/92	3.2	4.6
PHV903-07	02/28/92	3.5	5.4
PHV903-08	03/04/92	3.5	4.1
PHV904-01	04/18/95	0.1	0.2
PHV904-02	04/20/95	0.1	0.3
PHV904-03	04/25/95	0.1	0.2
PHV904-04	04/27/95	0.1	0.2
PHV904-05	05/02/95	0.4	0.4
PHV904-06	05/09/95	0.8	0.5
PHV904-07	05/11/95	0.8	0.5
PHV905-01	11/17/95	0.1	0.2
PHV905-02	11/21/95	0.1	0.3
PHV905-03	11/24/95	0.1	0.3
PHV905-04	11/28/95	0.2	0.3
PHV905-05	12/01/95	0.5	0.3
PHV905-06	12/05/95	1.0	0.4
PHV905-07	12/08/95	2.5	0.8
PHV905-08	12/12/95	3.5	2.2
PHV905-09	12/15/95	3.5	3.2

10

20

30

40

【表 3】

表 2 のつづき

メンバー I D 番号	採血日	+ DTT	- DTT
PHV 907-01	04/06/96	0.1	0.2
PHV907-02	04/10/96	0.1	0.2
PHV907-03	04/13/96	0.1	0.2
PHV907-04	04/19/96	3.0	2.2
PHV907-05	04/24/96	3.7	4.1
PHV907-06	04/27/96	3.6	4.1
PHV907-07	09/17/96	3.9	7.6
PHV908-01	01/26/96	0.1	0.1
PHV908-02	01/29/96	0.1	0.1
PHV908-03	01/31/96	0.1	0.1
PHV908-04	02/06/96	0.1	0.1
PHV908-05	02/08/96	0.1	0.1
PHV908-06	02/14/96	0.2	0.1
PHV908-07	02/20/96	1.4	0.2
PHV908-08	02/22/96	1.6	0.2
PHV908-09	02/27/96	1.9	0.2
PHV908-10	03/01/96	2.3	0.2
PHV908-11	03/07/96	2.3	0.4
PHV908-12	03/11/96	2.8	0.5
PHV908-13	03/14/96	2.8	0.5
PHV909-01	01/28/96	0.1	0.4
PHV909-02	02/15/96	2.3	5.4
PHV909-03	02/17/96	2.4	5.3
PHV910-01	08/26/96	0.1	0.2
PHV910-02	08/30/96	0.4	0.2
PHV910-03	09/03/96	2.7	3.1
PHV910-04	09/06/96	3.6	6.4
PHV910-05	09/10/96	3.9	8.1
PHV911-01	10/30/96	0.1	0.2
PHV911-02	11/02/96	0.1	0.2
PHV911-03	11/13/96	2.1	4.0
PHV911-04	11/20/96	3.6	7.8
PHV911-05	11/23/96	3.7	7.7
PHV912-01	01/06/96	0.2	0.3
PHV912-02	01/10/96	0.2	0.2
PHV912-03	01/13/96	4.5	9.9

10

20

30

40

【表 4】

表 2 のつづき

メンバー I D 番号	採血日	DTT	-DTT
PHV902-01	02/10/92	0.1	0.2
PHV902-02	02/12/92	0.1	0.2
PHV902-03	02/17/92	0.1	0.3
PHV902-04	02/19/92	0.3	0.6
PHV902-05	02/24/92	2.6	3.9
PHV902-06	02/26/92	3.1	5.9
PHV902-07	03/02/92	3.4	6.5
PHV906-01	10/07/95	0.5	0.3
PHV906-02	10/09/95	0.5	0.4
PHV906-03	10/14/95	1.6	0.6
PHV906-04	10/17/95	1.5	1.2
PHV906-05	10/21/95	2.2	3.0
PHV906-06	10/24/95	2.5	4.5
PHV906-07	10/28/95	2.9	5.7

10

20

【表 5】

表 3 B B I パネルの概観—より早く検出できる日数

PHV	+DTT	-DTT
901	0	0
902	0	0
903	0	0
904	0	0
905	7	0
906	3	0
907	0	0
908	24	0
910	0	0
911	0	0
912	0	0

30

【 0 0 7 6 】

文献

Burns, J., Butler, J., Moran, J., and Whitesides, G. (1991) Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem.* 56, 2648-2650.

40

Chan, W. (1968) A method for the complete S sulfonation of cysteine residues in proteins. *Biochemistry* 7, 4247-4254.

Claeys, H., Volkaerts, A., Verhaert, H., De Beenhouwer, H., and Vermylen, C. (1992) Evaluation of anti-HCV capsid indeterminate samples. *The Lancet* 340, 249.

Cole, R. (1967) Sulfitolysis. *Meth. Enzymol.* 11, 206.

Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulis, D., Shevach, E. and Strober, W. (1992) *Cur*

50

rent protocols in immunology. Wiley Interscience.

De Beenhouwer, H., Verhaert, H., Claeys, H., and Vermylen, C. (1992) Confirmation of hepatitis C virus positive blood donors by immunoblotting and polymerase chain reaction. *Vox. Sang.* 63, 198-203.

Di Bisceglie, AM, Carithers, RL Jr, Gores, GJ (1998) Hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 28, 1161-1165.

Gailit, J. (1993) Restoring free sulfhydryl groups in synthetic peptides. *Anal. Biochem.*, 214, 334-335. 10

Holmgren, A. (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254, 9627-9632.

Inglis, A., and Liu, T. (1970) The stability of cysteine and cystine during acid hydrolysis of proteins and peptides. *J. Biol. Chem.* 245, 112-116.

McFarlane, I., Smith, H., Johnson, P., Bray, G., Vergani, D., and Williams, R. (1990) Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenic factor or false-positive result? *The Lancet* 335, 754-757. 20

Maertens, G. and Stuyver, L. (1997) Genotypes and Genetic variation of hepatitis C virus. In: *Molecular Medicine of Hepatitis* (Eds. Zuckerman, A. and Harrison, T.), *Molecular Medical Science Series* (Eds. James, K. and Morris A) John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, Chapter 13, pp. 183-233.

Marin, M., Bresciani, S., Puoti, M., Rodella, A., Gussago, A., Ravaggi, A., Pizzocolo, G., Albertini, A., and Cariani, E. (1994) Clinical significance of serum HCV RNA as marker of HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32, 3008-3012. 30

Peeters, D., Dekeyser, F., DeLeys, R., Maertens, G., and Pollet, D. (1993) Confirmation of anti-hepatitis C virus antibodies using the INNO-LIA HCV Ab III including Core, E2/NS1, NS3, NS4, and NS5 epitopes. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Tokyo*, abstract 413.

Pollet, D., Saman, E., Peeters, D., Warmenbol, H., Heyndricks, L., Wouters, C., Beelaert, G., van der Groen, G., and Van Heuverswyn, H. (1990) Confirmation and differentiation of antibodies to human immunodeficiency virus 1 and 2 with a strip-based assay including recombinant antigens and synthetic peptides. *Clin. Chem.* 37, 1700-1707. 40

Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., Choo, Q.-L., Houghton, M., and Kuo, G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6547-6549.

Singh, R., and Kats, L. (1995) Catalysis of reduction of disulfide by selenol. *Anal. Biochem.*, 232, 86-91.

Stuyver, L., Fretz, C., Esquivel, C., Boudifa, A., Jaulmes, D., Azar, N., Lunel, 50

F., Leroux-Roels, G., Maertens, G., and Fournel, J. (1996) HCV genotype analysis in apparently healthy anti-HCV positive Parisian blood donors. *Transfusion* 36, 552-558.

Thakur, M., DeFulvio, J., Richard, M., and Park, C. (1991) Technetium-99m labeled monoclonal antibodies: evaluation of reducing agents. *Nucl. Med. Biol.*, 18, 227- 233.

Waumans, L., Claeys, H., Verhaert, H., Mertens, W., and Vermylen, C. (1993) Hepatitis C virus confirmation in blood donor screening. *Vox. Sang.* 64, 145-149. 10

Wertman K.F., Wyman A.R. and Botstein D. (1986) Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* 49: 253-262.

Zaaijer, H., Vrieling, H., van Exel-Oehlers, P., Cuypers, H., and Lelie, P. (1994) Confirmation of hepatitis C infection: a comparison of five immunoblot assays. *Transfusion* 34, 603-607.

【産業上の利用可能性】

【0077】

本発明は、HCVに関する研究、HCV診断薬の製造の分野などに利用可能である。 20

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1-1】HCVサブタイプ1aおよび1b感染血清から単離されたHCV NS3クローンのアミノ酸配列を示す。

【図1-2】HCVサブタイプ1aおよび1b感染血清から単離されたHCV NS3クローンのアミノ酸配列を示す。

【図1-3】HCVサブタイプ1aおよび1b感染血清から単離されたHCV NS3クローンのアミノ酸配列を示す。

【図1-4】HCVサブタイプ1aおよび1b感染血清から単離されたHCV NS3クローンのアミノ酸配列を示す。 30

【図1-5】HCVサブタイプ1aおよび1b感染血清から単離されたHCV NS3クローンのアミノ酸配列を示す。

【図2-1】mTNFH6NS3クローン19b融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図2-2】mTNFH6NS3クローン19b融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図3-1】mTNFH6NS3クローンB9融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。 40

【図3-2】mTNFH6NS3クローンB9融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図4-1】mTNFH6NS3タイプ3aクローン21融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図4-2】mTNFH6NS3タイプ3aクローン21融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。 50

【図5-1】mTNFH6NS3タイプ3aクローン32融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図5-2】mTNFH6NS3タイプ3aクローン32融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図6-1】mTNFH6NS3タイプ2a融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図6-2】mTNFH6NS3タイプ2a融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

10

【図7-1】mTNFH6NS3タイプ2b融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図7-2】mTNFH6NS3タイプ2b融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図8-1】mTNFH6NS3タイプ2c融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

20

【図8-2】mTNFH6NS3タイプ2c融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジntagおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図1-1】

```

NS3A5  MGVAKAVDFEVENLEITMRSPVFTDSSPPAVPQSFQVAHLHAFTSSGSKTKVPAVAA
NS3A26  -----T-----V-----
NS3B7   -----S-----G-----
NS3B9   -----S-----S-----
NS3B12  -----S-----S-----
NS3B14  -----S-----S-----
NS3C1   -----SM-----T-----
NS3C3   -----SM-----T-----S-----
NS3C4   -----SM-----T-----
NS3C12  -----SM-----T-----
NS3C16  -----SM-----T-----
NS3D17  -----S-----D-----
NS3D18  -----S-----D-----
NS3D19  -----S-----D-----
NS3HCCL19A  -----V-----T-----
NS3HCCL19B  -----V-----T-----

```

【図1-2】

```

NS3A5  QGFKVLVLFNSVAALIGFGAYMSRAHGIDFNRTGVRITITGSPITSTYTGKFLADGGCS
NS3A26  -----L-----KV-----
NS3B7   -----L-----KV-----
NS3B9   -----L-----KV-----
NS3B12  -----L-----KV-----
NS3B14  -----L-----KV-----
NS3C1   -----L-----KV-----
NS3C3   -----L-----KV-----
NS3C4   -----L-----KV-----
NS3C12  -----L-----KV-----
NS3C16  -----L-----KV-----
NS3D17  -----L-----KV-----
NS3D18  -----L-----KV-----
NS3D19  -----L-----KV-----
NS3HCCL19A  -----L-----KV-----
NS3HCCL19B  -----L-----KV-----

```

【 1 - 3 】

GGAYDMICDECHSTDATSILGTVLDDQRETAGARLWVLAATAAPGGSVTVPHPIBEVA
 -----I-----T-----
 NS3A5 -----T-----
 NS3A26 -----T-----
 NS3B7 -----T-----
 NS3B9 -----I-----
 NS3B12 -----I-----
 NS3B14 -----D-----
 NS3B12 -----T-----
 NS3B14 -----T-----
 NS3C1 -----S-T-----
 NS3C3 -----S-T-----
 NS3C4 -----S-T-----
 NS3C1 -----S-T-----
 NS3C4 -----S-T-----
 NS3C12 -----S-T-----
 NS3D16 -----S-T-----
 NS3D17 -----T-----
 NS3D18 -----V-----
 NS3D19 -----V-----
 NS3HCCLL19A -----I-S-----
 NS3HCCLL19B -----I-S-----

【 1 - 5 】

PTSGDVVVVATDALMTGTFDSDVDCNCTVQTVDFE
 ----- (配列番号 3)
 ----- (配列番号 4)
 ----- (配列番号 5)
 ----- (配列番号 6)
 ----- (配列番号 7)
 ----- (配列番号 8)
 ----- (配列番号 9)
 ----- (配列番号 10)
 ----- (配列番号 11)
 ----- (配列番号 12)
 ----- (配列番号 13)
 ----- (配列番号 14)
 ----- (配列番号 15)
 ----- (配列番号 16)
 ----- (配列番号 17)
 ----- (配列番号 18)
 NS3A5 -----
 NS3A26 -----
 NS3B7 -----
 NS3B9 -----
 NS3B12 -----
 NS3B14 -----
 NS3C1 -----
 NS3C3 -----
 NS3C4 -----
 NS3C12 -----
 NS3D16 -----
 NS3D17 -----
 NS3D18 -----
 NS3D19 -----
 NS3HCCLL19A -----
 NS3HCCLL19B -----

【 1 - 4 】

LSTTGFIPYKALPLEAIKGRHLIFCHSKKCKDELAARLTAUGVNAVAYYRGLDVSVI
 -----R-----
 NS3A5 -----
 NS3A26 -----
 NS3B7 -----N-V-----
 NS3B9 -----N-V-----
 NS3B12 -----P-----
 NS3B14 -----V-----
 NS3C1 -----V-----
 NS3C3 -----T-----
 NS3C4 -----T-----
 NS3C12 -----T-----
 NS3C16 -----T-----
 NS3D17 -----T-----
 NS3D18 -----K-----
 NS3D19 -----V-----
 NS3HCCLL19A -----QV-----
 NS3HCCLL19B -----I-V-----
 -----SGV-----
 -----SGF-----

【 2 - 1 】

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAATTCGAGTGCACAGCCCTGTAGCCACGTCGTAGCAAAC
 CACCAGTGGAGGAGCAGGGAATTCACCATCACCATCACCACGATGCCGGGCCATCGGTCAT
 GGGGTTCGAAGCGGTGGACTTTGTACCCGTAGAGTCTATGGAACACCCATGCCGTCC
 CGGTCTTTACGATAACTCATCTCTCCGCGGTACCGCAGACATTCGAAGTGGCCCAT
 CTACACGCCCCCACTGGTAGTGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGTGCATATGCAGCCCAA
 GGTACAAAGTACTTGTCTGAACCCATCCGTTGCCGCCACTTAGGATTCCGGGGCGTAT
 AITGCTAAAGCACGTGTCTGGACCTTAAACCTTAGAAGTGGGTAAAGGACCATCACACCG
 GCGCCCCATTACGTACTCCACCTACCGCAGTTTCTTGGCAAGTGGTGTCTCTGGG
 GCGGCTTACGACATCATAATATGTAGTGGTCCACTCGATTGACTCAACTCCATCTTG
 GCATCGGCACCGTCTGGATCAGGGCGGAGACGGTGGAGCGGGCTTGTCTGCTCCG
 ACTGCTACACCTCCGGGTCCGTCACCGTCCACATCCCAACATCGAGGAGGTGGCTCTG
 TCCAGCACTGGAGAGATCCCTTTTATGGCAAGCCATCCCATCGAGGTGCATCAAAGGG
 GGGAGGCACCTCAATTTCTGCCATTCCAAAGAAATGTGACGAGCTCGCCGCAAGGTA
 TGGCTCTGGATCAAGCTGTAGGCTATTACCGAGGCTGTATGTCTCCGTCATACCG
 ACTAGCGGAGACTCTTGTGTGGACAGACCCCTTATGACAGGCTTTTACCGGCGAC
 TTTGACTCAGTGTGACTGTAAACACATGCGTCAACCCAGACAGTGCATCTTACGCTAA

(配列番号 19)

【 2 - 2 】

MYRSSQNSDDKPVARVAVANHQVEEQGIHHHHHHVDPGPMGVAKAVDFIPVESMETMRSFVFTD
 NSSPPAVPQTFQVAHLHAPTSGSKSTKVPAAAYAQGYKVLVNLNPSVAATLGFAYMSKAHGVDPN
 IRTGVRTITGAEITYSTYKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDAISLIGITVLDQAEATGAR
 LWLATAATPGSVTVPHPIBEVALSSSEIIPFYKALPLEAIKGRHLIFCHSKKCKDELAARK
 SFGINAVAYYRGLDVSIVPTSSDVVVVATDALMTGTFDSDVDCNCTVQTVDFE

(配列番号 20)

【 3 - 1 】

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAATTCGAGTGCACAGCCCTGTAGCCACGTCGTAGCAAACCCAA
 ATGGAGAGGAGGGAATTCACCATCACCATCACCACGATGCCGGGCCATCGGTCAT
 AGCGGTGGCTTTATCCCGTGGAGGCTTAGAARACACCATGAGTCCCGGTGTTACAGAC
 AACTCTCCCGCGCAGCACTCCCGCAGCTTCCAGSTGCCCACTGCTCCACCGGCAAG
 CGTAAGAGCACCAGGTCGCGCCGATATCGGGCTCAGGGCTACAAAGTGTCTGTCTCAAC
 CCTCCGTTGCTGCAACATTTGGGCTTTGGTGTACATGTCCAAGGCCATGGATTGATCTTAAC
 ATCAGGACTGGGTAAGGACAATTACTACTGGCAGCCCATCAGTACTCCACTACGGCAAGTT
 CCTTGGCCAGCGCGGTGCTCGGGGGTGCCTTATGACATAATAATTTGACAGAGTGCCTCCA
 CAGATGCAACATCTATTTTGGGCTCGGCCTGCTGCTGACCAAGCAGAGACTCGGGGGCGAGA
 GTGTTGTGCTTGGCACCGCTACCCCTCCGGGCTCCGTCAGCTGCCCCCTTAATATCGAGGA
 GTTGTCTTCCACACCGGAGAGTCCCTTTTACGGAAAGCTATCCCTCTGAGGCAATCA
 AAGGGGAGACATCTCATCTTCCCACTCAAAGAAAGTGGCAGACTCCCGCCCAACCG
 GTCGCGTGGGTGCAATCCGCTGCTTACTACCGCGGCTTACGCTGCCGCTCATCCCGACCG
 TGGCGATGTTGCTGCTGCAACTGATGCTCATGACCGGTTTACCGGCTGACTTCGACTCGG
 TGATAGACTGTAATAGTGTCTCACCAGACAGTGCATCTCAGCTAA

(配列番号 21)

【 3 - 2 】

MYRSSQNSDDKPVARVAVANHQVEEQGIHHHHHHVDPGPMGVAKAVDFIPVESMETMRSFVFTD
 NSSPPAVPQTFQVAHLHAPTSGSKSTKVPAAAYAQGYKVLVNLNPSVAATLGFAYMSKAHGVDPN
 IRTGVRTITGAEITYSTYKFLADGGCSGGAYDIIICDECHSTDAISLIGITVLDQAEATGAR
 LWLATAATPGSVTVPHPIBEVALSSSEIIPFYKALPLEAIKGRHLIFCHSKKCKDELAARK
 VALGVNAVAYYRGLDVSIVPTSSDVVVVATDALMTGTFDSDVDCNCTVQTVDFE

(配列番号 22)

【 図 4 - 1 】

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAAATTCGAGTGCACAAGCCTGTAGCCACAGCTCGTAGCAAAAC
CACCAGTGGAGGAGCAGGGAATTCACCATCACCATCACCACAGTGGATCCCGGGCCCATG
GCCCGGGGATTTGGGCCCCCATATAGGTGTAGCAAAGCCCTACAGTTTCATACCAAGTGGAA
ACCCCTAGTACGACGAGTGGTCTCCATCTTTCTCTGCAAAATTCACCTCTCCCTGCTGTC
CAGCAGGCTTCAAGTAGGCTATCTCTTCCGCCGACCCGACGCGTAAAGAGCAAGAG
GTCCCGGCCGCTTATGTAGCACAAGGATATAAGTGTCTCGTGTGCAATCCATCCGTTGG
GCCACACTAGGCTTGGCTCTTTCATGTCTGCGTCCATATGGGATCGAACCCCAACATCCCG
ATCGGAAACCGCACCGTCAACAAGTGGTCTAACTGACCTATTCACCTACGGTAAGTTT
CTCCGCGACCGGGTGTCTCCGGGGGGGCATATGATGTAAATATCTGTGATGAATGTCTAT
GCCAAGAGCCCACTAGCATATTTGGGCATAGGCACGCTCTTAGATCAGCCGAGAGCGGCT
GGGTGAGGCTGACCGTATTAGCAGCAGCACTCCCGCAGGACGATCACTGTGCCACAT
CTTAACATCGAAGAGTGGCCCTGGCTCTAAGGTGAGATCCCTTTACGCTAAGGCT
ATAACGATAGCCCTCTCAAGGGGGGAGACACCTGCTTTTTCGCAATTCCLAGAAALAN
TGTGATGAGCTAGCATCAAACCTCAGAGGTATGGGGCTCAACGCTTGGGCTACTATAGG
GGTCTCGATGTTTCCGTCATACCAACAACAGGAGACGCTGCTGGTCTGGCTACTGACGCC
CTCATGACTGGATTCACTGGAGACTTCGATCTCTCATAGACTGCAACGTTGGCTGTGAA
CAGTACGTTGACTTCAGCTAA

(配列番号 23)

【 図 4 - 2 】

MVRSSSQNSDDKPVAVHVNHQVEEQIHHHHHHVDPGPMAGLPPPIGVAKALQFIPVE
TLSTQARSPSFDNSPPAVPQSYQVGYLHAPTGSKSTKVPVAYAQYKVLVLPNSVA
ATLGFSGFMSRAYIDPNIRTNRTGNRTVTKAKLYSTYTKFLADGGCSGGAYDVIICDECH
AQDATSLILGICTVLDQAEATAGVRLTVLATATPPGSIIVPHSNIEEVALGSEGEIPFYGKA
IPIALLKGRHLIFCHSKKCKDLASLKRGLMGLNAVAYRGLDVSIVPTTGDVVVATDA
LMTGTFGDFSDVIDCNVAVEQYVDFE

(配列番号 24)

【 図 5 - 1 】

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAAATTCGAGTGCACAAGCCTGTAGCCACAGCTCGTAGCAAAAC
CACCAGTGGAGGAGCAGGGAATTCACCATCACCATCACCACAGTGGATCCCGGGCCCATG
GCCCGGGGATTTGGGCCCCCATATAGGTGTAGCAAAGCCCTACAGTTTCATACCAAGTGGAA
ACCCCTAGCAGCAGGCTAGGTTCCATCTTTCTCTGCAAAATTCACCTCTCCCTGCTGTC
CCACAGGCTATCAGTAGGTAAGTCTCATGCCGACCCGACGCGTAAAGAGCAAAAG
CCCGGCCGCTTATGTAGCACAAGGATATAAGTGTCTCGTGTGCAATCCATCCGTTGG
GCCACACTAGGCTTGGCTCTTTCATGTCTGCGTCCATATGGGATCGAACCCCAACATCCCG
ATCGGAAACCGCACCGTCAACAAGTGGTCTAACTGACCTATTCACCTACGGTAAGTTT
CTTCGCGATGGGGTGTCTCCGGGGGGGCATATGATGTAAATATCTGTGATGAATGTCTAT
GCCAAGAGCCTACTAGCATATTTGGGTATAGGCACGCTCTTAGATCAGCCGAGAGCGCT
GGGTGAGGCTGACGGTATTAGCAGCAGCAGCCCGCCAGCAGCATCACTGTCCACAT
CTTAACATCGAAGAGTGGCCCTGGCTCTGAGGCTGAGATCCCTTTACGCCAAGGCT
ATACGATATCCCTGCTCAAGGGGGGAGGACCTTATCTTTGCCAATTCCLAGAAALAN
TGTGATAAGATAGCTTCCAACTCAGAGGATGGGGCTCAACGCTGAGCGTACTATAGA
GGTCTCGATGTTTCCGTCATACCAACAACAGGAGACGCTGATGTTGGCTACTGACGCC
CTCATGACTGGATACACCGGGACTTCGATCTCTCATAGACTGCAACGTTGGCTGTGAA
CAGTACGTTGACTTCAGCTAA

(配列番号 25)

【 図 7 - 1 】

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAAATTCGAGTGCACAAGCCTGTAGCCACAGCTCGTAGCAAAAC
CACCAGTGGAGGAGCAGGGAATTCACCATCACCATCACCACAGTGGATCCCGGGCCCATG
GGCTAGGCCAAATTCATTGACTTCATCCCTGTTGAATCTCTCGATATCCGCTCAGCGTCA
CCAGTCTTCTGACACAGCAGCCACCGAGTGTGCTTCACTCAGCTCAGGTTGGGCTAT
TTGACCGCCGCAACGGGAGCGGGAAGAGACCAAGGCTCCCTGCGCATATGCTAGTACG
GGTATAAAGTACTCTGTGTAATTCCTCTGTCGGCCGACCGTCCGCTTGGGGCCCTAC
ATGTCCLAAAGCCAGCGGATCAACCCCAACATCAGAACCGGGGTACGGACTGTGACCCAC
GGGACCCCATCACTCACTCACTTATGGCAAGTTTCTCGAGATGGGGCTGCTCAGCC
GGCGCTATGATGTATCATATATGCGATGAATGCCACTCAGTGGAGCTACTACCATCTT
GGCATTTGGAACAGTCTCTGACAGGCGGAGACCCCGGTTGCTAGGTTAGTGGTTTTAGCC
ACAGCCACGCCCTCTGTTGATCAGTGAACAATCTCTCATAGCAACATAGAGGAGGTGGCTCT
GGTCAATGAGGCGAGATCCCTTTACGCCAAGGCTATTCCTTACGCTTTCATCAAGGGG
GGCAGACACTAATCTTTGCCATTCAGAAAGAGTGGGATGAGCTCGCGGAGCGCTT
CGGGCATGGGTGTCAAGCCGTTGCTTACTATAGGGGTTCTCGAGTCTCTGTATACCA
ACTCAAGGAGAGTGGTGGTGGTGGTCCACCGATGCCCTAATGACTGGATACACCGGTGAC
TTGACTCTGTTATTGACTGCAACGTTGGCTCTCTCAATTTAGACTTCAGCTAA

(配列番号 29)

【 図 7 - 2 】

MVRSSSQNSDDKPVAVHVNHQVEEQIHHHHHHVDPGPMGVAKSIDFIPVESLDIASRS
PSFDNSTPPAVPQSYQVGYLHAPTGSKSTKVPVAYAQYKVLVLPNSVAATLGFAGY
MSKAGHINPNIRTVGRTVTTGDPITYSTYTKFLADGGCSAGAYDVIICDECHSVADTTIL
GIGTVLDQAEATAGVRLTVLATATPPGSIIVPHSNIEEVALGHEGEIPFYGKAIPLAFIKG
GRHLIFCHSKKCKDLAALRGMGLNAVAYRGLDVSIVPTQGDVVVATDALMTGYTGD
FDSVIDCNVAVSQIVDFE

(配列番号 30)

【 図 8 - 1 】

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAAATTCGAGTGCACAAGCCTGTAGCCACAGCTCGTAGCAAAAC
CACCAGTGGAGGAGCAGGGAATTCACCATCACCATCACCACAGTGGATCCCGGGCCCATG
GGCGTAGCCAAATTCATTGACTTCATCCCGTTGAGTCTCTCGACATCGTAGTGGTCT
CCAGCTTCACTGACACAGTACACCTCCAGCCGTTGCTCAGACTACCAAGTGGGCTAT
CTCCACGGCCCACTGGTAGCGGGAAGAGTACCAAGTCCCTGACGCTACGCCGCTCAG
GGTACAGGTTGCTGGTACTGAACCCCTCCGTTGGCTGCCCTTTGGGATTTGGGGCTTAC
ATGTCCLAAAGCCAGCGAGTCAATCCCAATATCAGGACCGGGTTCGACGGTGAACACT
GGGATCCCATCACTCACTCCAGTATGGCAATTCCTCGAGATGGAGGCTGCTCTGGA
GGCGCTATGGCATATAATGCGAAGAAATGCCATTCGACGACTCCACGACCATCTCT
GGCATCGGGACCGTCTCGACCAAGCTGAGACAGTGGATAGTGGTGGTGGTCTTGGCC
ACGGCGACCCACCGGATCTGTAAACCCACACCCCAACATAGAGGAGGTGGCCCTC
GGCCAGAGGGGAAATCCCTTCTATGGGAGGCCATCCCTCTCAACCATCAAGGGA
GGACGACATTAATCTTCTGTCTTCAAGAAAGTGGCAGAGCTCGCGGTGGCCGCTC
CGAGCATGGGCTTAACCGGTTGGCATACAGAGGGCTTACGCTCTCCGTGATACCA
ACACAAAGGAGAGTGGTGGTGGTGGTCCACCGAGCCCTCATGACAGGATATACGGAGAC
TTGACTCTGTTATTGACTGCAACGTTGGCTCTCTCAATTTAGACTTCAGCTAA

(配列番号 31)

【 図 5 - 2 】

MVRSSSQNSDDKPVAVHVNHQVEEQIHHHHHHVDPGPMAGLPPPIGVAKALQFIPVE
TLSTQARSPSFDNSPPAVPQSYQVGYLHAPTGSKSTKVPVAYAQYKVLVLPNSVA
ATLGFSGFMSRAYIDPNIRTNRTGNRTVTKAKLYSTYTKFLADGGCSGGAYDVIICDECH
AQDATSLILGICTVLDQAEATAGVRLTVLATATPPGSIIVPHSNIEEVALGSEGEIPFYGKA
IPIALLKGRHLIFCHSKKCKDLASLKRGLMGLNAVAYRGLDVSIVPTTGDVVVATDA
LMTGTFGDFSDVIDCNVAVEQYVDFE

(配列番号 26)

【 図 6 - 1 】

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAAATTCGAGTGCACAAGCCTGTAGCCACAGCTCGTAGCAAAAC
CACCAGTGGAGGAGCAGGGAATTCACCATCACCATCACCACAGTGGATCCCGGGCCCATG
GGCGTAGCCAAATTCATTGACTTCATCCCGTTGAGACTCTGAGACTCGTACCGGGTCC
CCACCTTTAGTGACACAGCAGCCACCGGCTGTGCCCAAGACTCATCAGTCCGGGTAC
TTGCATGCCCAACCGGACCGGAAAGAGCACAAGTCCCGCTCGCATGAGCCCGCCAG
GGGTATAAGTGGTGTAGTCTCAATCCCTCGGTCGCTACCCCTGGGTTTGGAGCGTAC
CTCTCAAGGCAACCGGATCAATCCCAACTTAGACTGGACTGGACTGGACTGGACTGG
CGGAAACCATCAGTACTCCAGTATGGCAATTCCTGCGCATGGGGCTGGCGAGT
GGCGCTATGACATCATATATGCGATGAATGCCAGCCGTTGGTGCACACTTCTC
GGCTCGGAACAGTCCCTGACCAAGCAGACAGCCCGGGTTCAGCTTACTGTGCTGGCT
ACGCCACCGCCCGGGTCTGACCAACCCCATCCCAACATAGAGGAGTGGCCCTC
GGCAGAGGGTGGAGCCCTTCTATGGGAGGCGCTCCCGCTGCTTACATCAAGGGA
GGGAGACACTTGTCTTCTGCGACTCAAGAAAGTGTGACGAGCTCGCGCGGCCCTC
CGGGCATGGGCTGACGCTGTGGCTACTACAGAGGCTCGAGCTCTCCGTATACCA
GCTCAGGAGATGAGTGGTCTGCGCACCGAGCCCTCATGACGGGTTCACTGGAGAC
TTTACTCGTGTACTGACTGCAATGTAGCGGCTACTCAAGTTGAGACTTCAGCTAA

(配列番号 27)

【 図 6 - 2 】

MVRSSSQNSDDKPVAVHVNHQVEEQIHHHHHHVDPGPMGVAKSIDFIPVETLIDVTRS
PSFDNSTPPAVPQSYQVGYLHAPTGSKSTKVPVAYAQYKVLVLPNSVAATLGFAGY
LSKAGHINPNIRTVGRTVTTGDPITYSTYTKFLADGGCSAGAYDVIICDECHAVDATTIL
GIGTVLDQAEATAGVRLTVLATATPPGSIIVPHSNIEEVALGSEGEIPFYGKAIPLSYIKG
GRHLIFCHSKKCKDLAALRGMGLNAVAYRGLDVSIVPTQGDVVVATDALMTGYTGD
FDSVIDCNVAVTQVDFE

(配列番号 28)

【 図 8 - 2 】

MVRSSSQNSDDKPVAVHVNHQVEEQIHHHHHHVDPGPMGVAKSIDFIPVESLDIVTRS
PSFDNSTPPAVPQSYQVGYLHAPTGSKSTKVPVAYAQYKVLVLPNSVAATLGFAGY
MSKAGHINPNIRTVGRTVTTGDPITYSTYTKFLADGGCSAGAYDVIICDECHSVADTTIL
GIGTVLDQAEATAGVRLTVLATATPPGSIIVPHSNIEEVALGHEGEIPFYGKAIPLSTIKG
GRHLIFCHSKKCKDLAALRGMGLNAVAYRGLDVSIVPTQGDVVVATDALMTGYTGD
FDSVIDCNVAVSQIVDFE

(配列番号 32)

【配列表】

0003974620000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	39/29	(2006.01)	A 6 1 K	39/29	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 1
C 0 7 K	1/22	(2006.01)	C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	14/18	(2006.01)	C 0 7 K	14/18	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
C 1 2 N	9/00	(2006.01)	C 1 2 N	9/00	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A

- (72)発明者 ヘールト・メールテンス
ベルギー、ペー - 8 3 1 0 ブルッヘ、ジルファースパレンストラート 6 4 番
- (72)発明者 ヨースト・ロウワヒー
ベルギー、ペー - 2 0 7 0 ズウェインドレヒト、メルセレストラート 4 5 番
- (72)発明者 アルフォンス・ボスマン
ベルギー、ペー 1 7 4 5 オブウエイク、フルスト 1 6 5 番
- (72)発明者 エルウィン・サブロン
ベルギー、ペー - 1 7 8 5 メルヒテム、ロブレークラーン 1 アー番
- (72)発明者 マーン・ズレイン
フランス、エフ - 5 9 9 1 0 ボンデュ、ドメーヌ・ドゥ・ラ・ヴィーヌ 2 0 1 番

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開平 0 6 - 0 7 4 9 5 6 (J P , A)
特開昭 6 0 - 1 2 6 3 0 0 (J P , A)
特表平 0 9 - 5 0 4 5 3 4 (J P , A)
特表平 0 5 - 5 0 7 6 1 2 (J P , A)
特表平 0 9 - 5 0 3 3 9 6 (J P , A)
国際公開第 9 6 / 0 0 6 3 5 5 (W O , A 1)
国際公開第 9 7 / 0 1 2 0 4 3 (W O , A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 9 8

专利名称(译)	用还原剂改进的免疫诊断试验		
公开(公告)号	JP3974620B2	公开(公告)日	2007-09-12
申请号	JP2005000767	申请日	2005-01-05
[标]申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司南玫瑰汾笔记本闭嘴 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司, Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
当前申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司, Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	ヘルトメールテンス ヨーストロウワヒー アルフォンスボスマン エルウィンサブロン マーンズレイン		
发明人	ヘルト・メールテンス ヨースト・ロウワヒー アルフォンス・ボスマン エルウィン・サブロン マーン・ズレイン		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/543 G01N33/531 C12N15/09 C12N5/10 A61K39/29 A61K45/00 A61P31/14 A61P43/00 C07K1/22 C07K14/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K38/00 C12N9/00 C12P21/02 C12Q1/68 C12Q1/25 C12Q1/70 G01N33/573		
CPC分类号	A61P31/14 A61P43/00 C07K14/005 C12N2770/24222 C12Q1/707 G01N33/54306 G01N33/54393 G01N33/576 G01N33/5767		
FI分类号	G01N33/576.Z G01N33/543.525.U G01N33/531.B C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K39/29 A61K45 /00 A61P31/14 A61P43/00.101 C07K1/22 C07K14/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K37/02 C12N9/00 C12P21/02.C C12Q1/68.A A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00. AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA07 4B024/BA33 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /HA12 4B050/CC03 4B050/DD20 4B050/FF14C 4B050/GG01 4B050/KK04 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QQ44 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B064/AG33 4B064 /CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084 /AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA27 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/NA01 4C084/NA14 4C084/ZA311 4C084 /ZA751 4C084/ZB331 4C084/ZC511 4C085/AA02 4C085/BA87 4C085/BA92 4C085/CC08 4C085 /DD21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/FF13 4C085/FF19 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA29 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045 /GA26 4H045/GA45		
代理人(译)	田中, 三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	1998870087 1998-04-17 EP		
其他公开文献	JP2005185285A		

摘要(译)

要解决的问题：提供改进的丙型肝炎病毒（HCV）诊断测定组分和治疗性蛋白质，更确切地说，提供用于HCV抗体诊断和/或HCV治疗的改进的HCV NS3蛋白质组合物。解决方案：用于制备或进行固相免疫测定的方法包括在用于在固相上覆盖，阻断和/或固定抗原的步骤中或在用于预处理固相的步骤中添加还原剂，其中还原剂是二硫苏糖醇（DTT），二硫赤藓糖醇（DTE）或三（2-羧乙基）膦（TCEP）和抗原是HCV NS3蛋白。Ž

において試験したBBIパネル

PHV	+DTT ¹	-DTT ¹
903-01	-	-
903-02	-	-
903-03	+/-	-
903-04	2	-
903-05	2	+/-
903-06	2	+/-
903-07	4	2
903-08	4	2