

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4834279号
(P4834279)

(45) 発行日 平成23年12月14日 (2011.12.14)

(24) 登録日 平成23年9月30日 (2011.9.30)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/576 (2006.01)

GO 1 N 33/576 Z N A Z

請求項の数 37 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2002-510953 (P2002-510953)	(73) 特許権者	591076811
(86) (22) 出願日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		ノバルティス バクシンズ アンド ダイ
(65) 公表番号	特表2004-506878 (P2004-506878A)		アグノスティックス、インコーポレーテッ
(43) 公表日	平成16年3月4日 (2004.3.4)		ド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/019369		アメリカ合衆国、カリフォルニア 946
(87) 国際公開番号	W02001/096875		08, エミリービル, ホートン ストリー
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		ト 4560
審査請求日	平成20年5月16日 (2008.5.16)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/212,082		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成12年6月15日 (2000.6.15)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/280,811	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成13年4月2日 (2001.4.2)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCV 抗原／抗体の組合せアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イムノアッセイ固体支持体であって、該支持体に結合された、少なくとも1つのC型肝炎ウイルス (HCV) 抗コア抗体、および少なくとも1つの単離されたHCV NS3/4aエピトープを含み、該NS3/4aエピトープが、コンホメーションエピトープであり、そして図4A～4Dに示されるアミノ酸配列、または、該配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有し、かつプロテアーゼ活性を有するアミノ酸配列を含む、支持体。

【請求項 2】

前記支持体に結合された少なくとも2つのHCV抗コア抗体を含む、請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 3】

前記少なくとも1つの抗コア抗体が、HCVコア抗原のN末端領域に対して指向される、請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 4】

前記少なくとも1つの抗コア抗体が、HCV 1ポリタンパク質配列に対して番号付された、HCVのアミノ酸10～53に対して指向される、請求項3に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 5】

前記少なくとも1つの抗コア抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 6】

前記支持体に結合された多エピトープ融合抗原をさらに含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 7】

前記多エピトープ融合抗原が、図 7 A ~ 7 F に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 8】

イムノアッセイ固体支持体であって、該支持体に結合された、2 つの C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗コアモノクローナル抗体、および図 4 A ~ 4 D に示されるアミノ酸配列を含む HCV NS3 / 4 a コンホメーションエピトープを含む、支持体。

10

【請求項 9】

前記 2 つの抗コア抗体が、HCV コア抗原の N 末端領域に対して指向される、請求項 8 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 10】

前記 2 つの抗コア抗体が、HCV 1 ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCV のアミノ酸 10 ~ 53 に対して指向される、請求項 9 に記載のイムノアッセイ固体支持体。

【請求項 11】

イムノアッセイ固体支持体であって、該支持体に結合された、2 つの C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗コアモノクローナル抗体、図 4 A ~ 4 D に示されるアミノ酸配列を含む HCV NS3 / 4 a コンホメーションエピトープ、および図 7 A ~ 7 F に示されるアミノ酸配列を含む多エピトープ融合抗原を含む、支持体。

20

【請求項 12】

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

(a) 請求項 1 に記載のイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；

(b) 生物学的サンプルと該固体支持体を、HCV 抗原および抗体が、該生物学的サンプル中に存在する場合に、それぞれ、前記少なくとも 1 つの抗コア抗体および前記 NS3 / 4 a エピトープに結合可能な条件下で混合する工程；

(c) 以下を、工程 (b) 由来の固体支持体に、複合体を形成する条件下で加える工程：

30

(i) 第 1 の検出可能な標識抗体であって、ここで、該第 1 の検出可能な標識抗体は、検出可能な標識 HCV 抗コア抗体であり、ここで、該標識抗コア抗体は、該固体支持体に結合した少なくとも 1 つの抗コア抗体とは異なる HCV コアエピトープに対して指向される、第 1 の検出可能な標識抗体；

(ii) 該 NS3 / 4 a エピトープと反応する生物学的サンプル由来の HCV 抗体と反応する抗原；および

(iii) (ii) の抗原と反応する、第 2 の検出可能な標識抗体；

(d) もしあれば、該生物学的サンプルにおける HCV 感染を示すような、該抗体と該抗原との間に形成される複合体を検出する工程、

40

を包含する、方法。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つの抗コア抗体は、前記 HCV コア抗原の N 末端領域に対して指向され、そして前記検出可能な標識 HCV 抗コア抗体は、該 HCV コア抗原の C 末端領域に対して指向される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの抗コア抗体は、HCV 1 ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCV のアミノ酸 10 ~ 53 に対して指向され、そして前記検出可能な標識 HCV 抗コア抗体は、HCV 1 ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCV のアミノ酸 120 ~ 130 に対して指向される、請求項 13 に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記生物学的サンプル由来の H C V 抗体と反応する前記抗原が、前記 H C V ポリタンパク質の c 3 3 c 領域由来のエピトープを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 c 3 3 c エピトープが、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ (h S O D) アミノ酸配列と融合され、そして前記第 2 の検出可能な標識抗体が、該 h S O D アミノ酸配列と反応する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 17】

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

- (a) 請求項 2 に記載のイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；
- (b) 生物学的サンプルと該固体支持体を、H C V 抗原および抗体が、該生物学的サンプル中に存在する場合に、それぞれ、前記少なくとも 2 つの抗コア抗体および前記 N S 3 / 4 a エピトープに結合可能な条件下で混合する工程；
- (c) 以下を、工程 (b) 由来の固体支持体に、複合体を形成する条件下で加える工程：

- (i) 第 1 の検出可能な標識抗体であって、ここで、該第 1 の検出可能な標識抗体は、検出可能な標識 H C V 抗コア抗体であり、ここで、該標識抗コア抗体は、該固体支持体に結合した少なくとも 2 つの抗コア抗体とは異なる H C V コアエピトープに対して指向される、第 1 の検出可能な標識抗体；

- (i i) h S O D アミノ酸配列に融合された H C V ポリタンパク質の c 3 3 c 領域由来のエピトープ；および

- (i i i) 該 h S O D アミノ酸配列と反応する、第 2 の検出可能な標識抗体；

- (d) もしあれば、該生物学的サンプルにおける H C V 感染を示すような、該抗体と該抗原との間に形成される複合体を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 18】

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

- (a) 請求項 8 に記載のイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；
- (b) 生物学的サンプルと該固体支持体を、H C V 抗原および抗体が、該生物学的サンプル中に存在する場合に、それぞれ、前記少なくとも 2 つの抗コア抗体および前記 N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープに結合可能な条件下で混合する工程；
- (c) 以下を、工程 (b) 由来の固体支持体に、複合体を形成する条件下で加える工程：

- (i) 第 1 の検出可能な標識抗体であって、ここで、該第 1 の検出可能な標識抗体は、検出可能な標識 H C V 抗コア抗体であり、ここで、該標識抗コア抗体は、該固体支持体に結合した少なくとも 2 つの抗コア抗体とは異なる H C V コアエピトープに対して指向される、第 1 の検出可能な標識抗体；

- (i i) h S O D アミノ酸配列に融合された H C V ポリタンパク質の c 3 3 c 領域由来のエピトープ；および

- (i i i) 該 h S O D アミノ酸配列と反応する、第 2 の検出可能な標識抗体；

- (d) もしあれば、該生物学的サンプルにおける H C V 感染を示すような、該抗体と該抗原との間に形成される複合体を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 19】

前記少なくとも 2 つの抗コア抗体は、前記 H C V コア抗原の N 末端領域に対して指向され、そして前記検出可能な標識 H C V 抗コア抗体は、該 H C V コア抗原の C 末端領域に対して指向される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 20】

前記少なくとも2つの抗コア抗体は、HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCVのアミノ酸10～53に対して指向され、そして前記検出可能な標識HCV抗コア抗体は、該HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCVのアミノ酸120～130に対して指向される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

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

- (a) 請求項6に記載のイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；
- (b) 生物学的サンプルと該固体支持体を、HCV抗原および抗体が、該生物学的サンプル中に存在する場合に、前記少なくとも1つの抗コア抗体、前記NS3/4aエピトープ、および前記多エピトープ融合抗原に結合可能な条件下で混合する工程；
- (c) 以下を、工程(b)由来の固体支持体に、複合体を形成する条件下で加える工程：

(i) 第1の検出可能な標識抗体であって、ここで、該第1の検出可能な標識抗体は、検出可能な標識HCV抗コア抗体であり、ここで、該標識抗コア抗体は、該固体支持体に結合した少なくとも1つの抗コア抗体とは異なるHCVコアエピトープに対して指向される、第1の検出可能な標識抗体；

(ii) 第1の抗原および第2の抗原であって、該抗原は、それぞれ、該NS3/4aエピトープおよび該多エピトープ融合抗原に反応する生物学的サンプル由来のHCV抗体と反応する、第1の抗原および第2の抗原；および

(iii) (ii)の抗原と反応する、第2の検出可能な標識抗体；

(d) もしあれば、該生物学的サンプルにおけるHCV感染を示すような、該抗体と該抗原との間に形成される複合体を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項22】

前記少なくとも1つの抗コア抗体は、前記HCVコア抗原のN末端領域に対して指向され、そして該第1の検出可能な標識HCV抗コア抗体は、該HCVコア抗原のC末端領域に対して指向される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記少なくとも1つの抗コア抗体は、HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCVのアミノ酸10～53に対して指向され、そして前記検出可能な標識HCV抗コア抗体は、HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCVのアミノ酸120～130に対して指向される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記生物学的サンプル由来のHCV抗体と反応する前記第1の抗原が、前記HCVポリタンパク質のc33c領域由来のエピトープを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項25】

前記c33cエピトープが、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(hSOD)アミノ酸配列と融合され、そして前記第2の検出可能な標識抗体が、該hSODアミノ酸配列と反応する、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記生物学的サンプル由来のHCV抗体と反応する前記第2の抗原が、前記HCVポリタンパク質のc22領域由来のエピトープを含む、請求項21に記載の方法。

【請求項27】

前記c22領域由来のエピトープは、前記HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCVポリタンパク質のアミノ酸Lys₁₀～Ser₉₉を含み、該アミノ酸Lys₁₀～Ser₉₉は、Arg47の欠失および44位でのTrpのLeuへの置換を有し、ここで、該エピトープは、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(hSOD)アミノ酸配列と融合され、そして前記第2の検出可能な標識抗体は、該hSODアミノ酸配列と反応する、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

前記多エピトープ融合抗原が、図 7 A ~ 7 F に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 29】

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

(a) 請求項 11 に記載のイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；

(b) 生物学的サンプルと該固体支持体を、HCV 抗原および抗体が、該生物学的サンプル中に存在する場合に、それぞれ、前記少なくとも 2 つの抗コア抗体、前記 NS3 / 4 a コンホメーションエピトープ、および前記多エピトープ融合抗原に結合可能な条件下で混合する工程；

(c) 以下を、工程 (b) 由来の固体支持体に、複合体を形成する条件下で加える工程：

(i) 第 1 の検出可能な標識抗体であって、ここで、該第 1 の検出可能な標識抗体は、検出可能な標識 HCV 抗コア抗体であり、ここで、該標識抗コア抗体は、該固体支持体に結合した少なくとも 2 つの抗コア抗体とは異なる HCV コアエピトープに対して指向される、第 1 の検出可能な標識抗体；

(ii) hSOD アミノ酸配列に融合された HCV ポリタンパク質の c33c 領域由来のエピトープ、および hSOD アミノ酸配列に融合された HCV ポリタンパク質の c22 領域由来のエピトープ；および

(iii) 該 hSOD アミノ酸配列と反応する、第 2 の検出可能な標識抗体；

(d) もしあれば、該生物学的サンプルにおける HCV 感染を示すような、該抗体と該抗原との間に形成される複合体を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 30】

前記少なくとも 2 つの抗コア抗体は、前記 HCV コア抗原の N 末端領域に対して指向され、そして前記検出可能な標識 HCV 抗コア抗体は、該 HCV コア抗原の C 末端領域に対して指向される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記少なくとも 2 つの抗コア抗体は、HCV 1 ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCV のアミノ酸 10 ~ 53 に対して指向され、そして前記検出可能な標識 HCV 抗コア抗体は、HCV 1 ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCV のアミノ酸 120 ~ 130 に対して指向される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 c22 領域由来のエピトープは、前記 HCV 1 ポリタンパク質配列に対して番号付けした、HCV ポリタンパク質のアミノ酸 Lys₁₀ ~ Ser₉₉ を含み、該アミノ酸 Lys₁₀ ~ Ser₉₉ は、Arg 47 の欠失および 44 位での Trp の Leu への置換を有する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

免疫診断的検査キットであって、請求項 1 ~ 11 のいずれかに 1 項に記載のイムノアッセイ固体支持体、および免疫診断的検査を行うための指示書を含む、キット。

【請求項 34】

イムノアッセイ固体支持体を作製する方法であって、該方法は、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；および

(b) 少なくとも 1 つの C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗コア抗体、および少なくとも 1 つの単離された HCV NS3 / 4 a コンホメーションエピトープを、該支持体に対して結合させる工程、

を包含し、該 NS3 / 4 a エピトープが、コンホメーションエピトープであり、そして図 4 A ~ 4 D に示されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 35】

10

20

30

40

50

イムノアッセイ固体支持体を作製する方法であって、該方法は、以下：

(a) 固体支持体を提供する工程；および

(b) 2つのC型肝炎ウイルス(HCV)抗コア抗体、および単離されたHCV NS3/4aコンホメーションエピトープを、該支持体に対して結合させる工程、
を包含し、該NS3/4aエピトープが、コンホメーションエピトープであり、そして図4A～4Dに示されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項36】

多エピトープ融合抗原の少なくとも1つを、前記支持体に結合させる工程をさらに包含する、請求項34または35に記載の方法。

【請求項37】

請求項1に記載のイムノアッセイ固体支持体であって、該支持体に結合された、少なくとも1つのC型肝炎ウイルス(HCV)抗コア抗体、および少なくとも1つの単離されたHCV NS3/4aエピトープを含み、該NS3/4aエピトープが、コンホメーションエピトープであり、そして図4A～4Dに示されるアミノ酸配列を含む、イムノアッセイ固体支持体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、一般的にウイルスの診断に関連する。特に、本発明は、C型肝炎ウイルス感染を正確に診断するための抗原/抗体の組み合わせアッセイに関連する。

【0002】

(発明の背景)

C型肝炎ウイルス(HCV)は、主に輸血および性的接触を介して感染する、非経口の非A型肝炎、非B型肝炎(NANBH)の主な原因である。このウイルスは、献血者の0.4～2.0%に存在する。慢性肝炎は、感染者の約50%で発症し、そしてこれらの感染した個体のうちおよそ20%が、肝硬変を発症し、これはしばしば肝細胞癌を引き起こす。従って、この疾患の研究および制御は、医学的に重要である。

【0003】

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

【0004】

特に、図1に示されるように、いくつかのタンパク質は、HCVゲノムによってコードされる。HCVポリタンパク質の切断生成物の順番および学名は以下である：NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。ポリタンパク質の最初の切断は、3つの構造タンパク質(N末端ヌクレオカプシドタンパク質(「コア」と呼ばれる)ならびに2つのエンベローブ糖タンパク質(「E1」(Eとしても公知)および「E2」(E2/NS1としても公知))ならびにウイルス酵素を含む非構造(NS)タンパク質を遊離する、宿主プロテアーゼによって触媒される。

10

20

30

40

50

NS領域は、NS2、NS3、NS4、およびNS5と呼ばれる。NS2は、タンパク質分解活性を有する内在性膜タンパク質である。NS2は、単独でか、またはNS3と組み合わせてのいずれかで、NS2-NS3シスル (sisle) 結合を切断し、これは次にNS3のN末端を生じ、セリンプロテアーゼおよびRNAヘリカーゼの両方の活性を含む大きなポリタンパク質を放出する。NS3プロテアーゼは、残りのポリタンパク質をプロセッシングするために役立つ。ポリタンパク質成熟の終了は、NS3-NS4aの連結部での自己触媒的切断 (NS3セリンプロテアーゼによって触媒される) によって開始される。引続くHCVポリタンパク質のNS3媒介切断は、別のポリペプチドのNS3分子によるポリタンパク質切断連結部の認識に関連するようである。これらの反応において、NS3は、NS3補因子 (NS4a)、2つのタンパク質 (NS4bおよびNS5a)、ならびにRNA依存性RNAポリメラーゼ (NS5b) を遊離する。

10

【0005】

HCVについての免疫学的試薬および診断的試薬として有用なHCVポリタンパク質由来の多数の一般的なポリペプチドならびに特定のポリペプチドが記載されている。例えば、Houghtonら、欧州公開番号318,216および同388,232; Chooら、Science (1989) 244: 359~362; Kuoら、Science (1989) 244: 362~364; Houghtonら、Hepatology (1991) 14: 381~388; Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1992) 89: 10011~10015; Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33~39; Chienら、国際公開番号WO 93/00365; Chien, D. Y., 国際公開番号WO 94/01778を参照のこと。これらの刊行物は、一般的に、HCVならびにHCVポリペプチドの免疫学的試薬の製造および使用についての広範な背景を提供する。

20

【0006】

HCV保有者およびHCVに汚染された血液または血液製剤をスクリーニングおよび同定するための高感度で特異的な方法は、医薬品における重要な進歩を提供する。輸血後肝炎 (post-transfusion hepatitis) (PTH) は、輸血された患者のおよそ10%で発症し、そしてHCVは、これらの症例の最大90%の原因であった。患者の看護についての、ならびに血液および血液製剤によるか、または緊密な個人的接触によるHCVの予防および感染についての、確実な診断手段および予後診断手段が必要とされる。従って、いくつかのアッセイがHCV感染の血清診断のために開発されてきた。例えば、Chooら、Science (1989) 244: 359~362; Kuoら、Science (1989) 244: 362~364; Chooら、Br. Med. Bull. (1990) 46: 423~441; Ebelingら、Lancet (1990) 335: 982~983; van der Poelら、Lancet (1990) 335: 558~560; van der Poelら、Lancet (1991) 337: 317~319; Chien, D. Y., 国際公開番号WO 94/01778; Valenzuelaら、国際公開番号WO 97/44469; ならびにKashiwakumaら、米国特許第5,871,904号を参照のこと。

30

【0007】

血清に基づくいくつかのアッセイで遭遇する重大な問題は、ウイルスの感染と検出との間に有意な間隔 (しばしば、80日間を超える) が存在することである。このアッセイの間隔は、輸血レシピエントに対して重大な危険性を生じ得る。この問題を克服するために、直接ウイルスRNAを検出する核酸に基づく試験 (NAT)、および抗体応答の代わりにウイルス抗原をアッセイするHCVコア抗原試験が開発された。例えば、Kashiwakumaら、米国特許第5,871,904号; Beldら、Transfusion (2000) 40: 575~579を参照のこと。

40

【0008】

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

50

の必要性が残っている。

【 0 0 0 9 】

(発明の要旨)

本発明は、H C V セロコンバージョン抗体が、代表的に抗コアおよび抗N S - 3 (ヘリカーゼ)であるという知見に一部基づいている。従って、本発明は、単一の固体マトリックスを使用してサンプル中に存在するH C V 抗原およびH C V 抗体の両方を検出し得るH C V コア抗原とN S 3 抗体との組み合わせアッセイを提供する。

【 0 0 1 0 】

従って、1つの実施形態において、本発明は、少なくとも1つのH C V 抗コア抗体およびそれに結合する少なくとも1つの単離されたH C V N S 3 / 4 a エピトープを含むイムノアッセイ固体支持体に関する。この抗体およびN S 3 / 4 a エピトープは、本明細書中に記載される分子のいずれかであり得る。さらに、固体支持体は、図7 A ~ 7 F に示されるアミノ酸配列を含む多エピトープ融合抗原のような、本明細書中に記載される多エピトープ融合抗原のいずれかを含み得る。

10

【 0 0 1 1 】

特定の実施形態において、固体支持体は、それに結合する少なくとも2つのH C V 抗コア抗体を含む。さらに、抗コア抗体は、モノクローナル抗体であり得る。さらに、N S 3 / 4 a エピトープは、コンホメーションエピトープ(例えば、図4 A ~ 4 D に示されるアミノ酸配列を含むコンホメーションN S 3 / 4 a エピトープ)であり得る。

【 0 0 1 2 】

別の実施形態において、本発明は、少なくとも2つのH C V 抗コアモノクローナル抗体およびそれに結合する少なくとも1つのH C V N S 3 / 4 a コンホメーションエピトープ(図4 ~ 4 D に示されるアミノ酸配列を含む)を含むイムノアッセイ固体支持体に関する。

20

【 0 0 1 3 】

なおさらなる実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のH C V 感染を検出する方法に関する。本方法は、以下の工程を包含する：(a) 上記のようなイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；(b) H C V 抗原およびH C V 抗体(生物学的サンプル中に存在する場合)が、それぞれ少なくとも1つの抗コア抗体およびN S 3 / 4 a エピトープと結合することを可能にする条件下で、生物学的サンプルと固体支持体とを組み合わせる工程；(c) 工程(b) からの固体支持体に、複合体が形成する条件下で(i) 検出可能に標識した第一の抗体(ここでこの検出可能に標識した第一の抗体は、検出可能に標識されたH C V 抗コア抗体であり、ここでこの標識された抗コア抗体は、固体支持体に結合する少なくとも1つの抗コア抗体とは異なるH C V コアエピトープに対して指向される)；(i i) N S 3 / 4 a エピトープと反応性の生物学的サンプル由来のH C V 抗体と反応する抗原；および(i i i) 検出可能に標識した第二の抗体(ここで、この検出可能に標識された第二の抗体は、(i i) の抗原と反応性である)を添加する工程；ならびに(d) 抗体と抗原(存在する場合)との間に形成された複合体を、生物学的サンプル中のH C V 感染の指標として検出する工程。N S 3 / 4 a エピトープは、コンホメーションエピトープ(例えば、図4 A ~ 4 D に示されるN S 3 / 4 a 配列を有するコンホメーションエピトープ)であり得る。

30

【 0 0 1 4 】

なお別の実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のH C V 感染を検出する方法に関する。この方法は以下の工程を包含する：(a) 上記のようなイムノアッセイ固体支持体(それに結合する少なくとも2つのH C V 抗コア抗体を有する)を提供する工程；(b) H C V 抗原およびH C V 抗体(生物学的サンプル中に存在する場合)が、それぞれ少なくとも2つの抗コア抗体およびN S 3 / 4 a エピトープと結合することを可能にする条件下で、生物学的サンプルと固体支持体とを組み合わせる工程；(c) 工程(b) からの固体支持体に、複合体が形成する条件下で(i) 検出可能に標識した第一の抗体(ここでこの検出可能に標識した第一の抗体は、検出可能に標識されたH C V 抗コア抗体であり、

40

50

ここでこの標識された抗コア抗体は、固体支持体に結合する抗コア抗体とは異なるHCVコアエピトープに対して指向される)；(ii)hSODアミノ酸配列に融合されたHCVポリタンパク質のc33c領域由来のエピトープ；および(iii)検出可能に標識した第二の抗体(ここで、この検出可能に標識された第二の抗体は、hSODアミノ酸配列と反応性である)を添加する工程；ならびに(d)抗体と抗原(存在する場合)との間に形成された複合体を、生物学的サンプル中のHCV感染の指標として検出する工程。NS3/4aエピトープは、コンホメーションエピトープ(例えば、図4A~4Dに示されるNS3/4a配列を有するコンホメーションエピトープ)であり得る。

【0015】

上記実施形態のいずれかにおいて、抗コア抗体は、HCVコア抗原のN末端領域に対して(例えば、HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けされた、HCVのアミノ酸10-53に対して)指向され得、そして/または検出可能に標識されたHCV抗コア抗体は、HCVコア抗原のC末端領域(例えば、HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けされたHCVのアミノ酸120-130)に対して指向され得る。さらに、生物学的サンプルからのHCV抗体と反応する抗原は、NS3領域(例えば、HCVポリタンパク質のc33c領域由来のエピトープ)由来であり得、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(hSOD)アミノ酸配列と融合され得る。この実施形態において、検出可能に標識された第二の抗体は、hSODアミノ酸配列と反応性である。

【0016】

別の実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のHCV感染を検出する方法に関する。この方法は以下の工程を包含する：(a)2つのHCV抗コアモノクローナル抗体および図4A~4Dに示されるアミノ酸配列を含むコンホメーションエピトープを含むイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；(b)HCV抗原およびHCV抗体(生物学的サンプル中に存在する場合)が、それぞれ少なくとも2つの抗コア抗体およびNS3/4aコンホメーションエピトープと結合することを可能にする条件下で、生物学的サンプルと固体支持体とを組み合わせる工程；(c)工程(b)からの固体支持体に、複合体が形成する条件下で(i)検出可能に標識した第一の抗体(ここでこの検出可能に標識した第一の抗体は、検出可能に標識されたHCV抗コア抗体であり、ここでこの標識された抗コア抗体は、固体支持体に結合する少なくとも2つの抗コア抗体とは異なるHCVコアエピトープに対して指向される)；(ii)hSODアミノ酸配列に融合されたHCVポリタンパク質のc33c領域由来のエピトープ；および(iii)検出可能に標識した第二の抗体(ここで、この検出可能に標識された第二の抗体は、hSODアミノ酸配列と反応性である)を添加する工程；ならびに(d)抗体と抗原(存在する場合)との間に形成された複合体を、生物学的サンプル中のHCV感染の指標として検出する工程。

【0017】

特定の実施形態において、少なくとも2つの抗コア抗体は、HCVコア抗原のN末端領域に対して(例えば、HCV1ポリタンパク質に対して番号付けされた、HCVのアミノ酸10-53に対して)指向され、そして検出可能に標識されたHCV抗コア抗体は、HCVコア抗原のC末端領域に対して(例えば、HCV1ポリタンパク質配列に対して番号付けされたHCVのアミノ酸120-130に対して)指向される。

【0018】

別の実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のHCV感染を検出する方法に関する。この方法は以下の工程を包含する：(a)多エピトープ融合抗原を含むイムノアッセイ固体支持体を提供する工程；(b)HCV抗原およびHCV抗体(生物学的サンプル中に存在する場合)が、少なくとも1つの抗コア抗体、NS3/4aエピトープおよび多エピトープ融合抗原と結合することを可能にする条件下で、生物学的サンプルと固体支持体とを組み合わせる工程；(c)工程(b)からの固体支持体に、複合体が形成する条件下で(i)検出可能に標識した第一の抗体(ここでこの検出可能に標識した第一の抗体は、検出可能に標識されたHCV抗コア抗体であり、ここでこの標識された抗コア抗体は、固体支持体に結合する少なくとも1つの抗コア抗体とは異なるHCVコアエピトープに対

10

20

30

40

50

して指向される)；(i i) 生物学的サンプル由来のH C V抗体と反応する第一の抗原および第二の抗原(それぞれ、N S 3 / 4 a エピトープおよび多エピトープ融合抗原と反応性である)；および(i i i) 検出可能に標識した第二の抗体(ここで、この検出可能に標識された第二の抗体は、(i i) の抗原と反応性である)を添加する工程；ならびに(d) 抗体と抗原(存在する場合)との間に形成された複合体を、生物学的サンプル中のH C V感染の指標として検出する工程。

【0019】

上記のように、抗コア抗体は、H C Vコア抗原のN末端領域に対して指向され得、この検出可能に標識された第一のH C V抗コア抗体は、H C Vコア抗原のC末端領域に対して指向され得る。さらに、生物学的サンプル由来のH C V抗体と反応する第一の抗原は、H C Vポリタンパク質のc 3 3 c領域由来のエピトープを含み得、そしてh S O Dアミノ酸配列と融合され得る。この状況において、検出可能に標識された第二の抗体は、h S O Dアミノ酸配列と反応性である。さらに、生物学的サンプル由来のH C V抗体と反応する第二の抗原は、H C Vポリタンパク質のc 2 2領域由来のエピトープ(例えば、H C V 1ポリタンパク質配列に対して番号付けされた、A r g 4 7の欠失および4 4位でのL e uのT r pでの置換を有するH C Vポリタンパク質のアミノ酸L y s₁₀ ~ S e r₉₉を含むエピトープ)を含み得る。このエピトープは、h S O Dアミノ酸配列と融合され得る。その場合、検出可能に標識された第二の抗体は、h S O Dアミノ酸配列と反応性である。多エピトープ融合抗原は、図7 A ~ 7 Fに示されるアミノ酸配列を含み得る。

【0020】

なおさらなる実施形態において、本発明は、生物学的サンプルにおけるH C V感染を検出する方法に関し、この方法は、以下：(a) イムノアッセイ固体支持体を提供する工程であって、この固体支持体は、この固体支持体に結合された、2つのH C V抗コアモノクローナル抗体、H C V N S 3 / 4 aコンホメーションエピトープ(図4 A ~ 4 Dに記載されるアミノ酸配列を含む)、および多重エピトープ融合抗原(図7 A ~ 7 Fに記載されるアミノ酸配列を含む)を含む、工程；(b) H C V抗原および抗体が、生物学的サンプルに存在する場合に、少なくとも2つの抗コア抗体、N S 3 / 4 aコンホメーションエピトープ、および多重エピトープ融合抗原の各々に結合する条件下で、生物学的サンプルを固体支持体と合わせる工程；(c) 複合体形成条件下で、工程(b)からの固体支持体に、(i) 第一の検出可能に標識された抗体(ここで、第一の検出可能に標識された抗体は、検出可能に標識されたH C V抗コア抗体であり、ここで、この標識された抗コア抗体は、固体支持体に結合された少なくとも2つの抗コア抗体とは異なるH C Vコアエピトープに対して指向される)；(i i) h S O Dアミノ酸配列に融合されたH C Vポリタンパク質のc 3 3 c領域由来のエピトープおよびh S O Dアミノ酸配列に融合されたH C Vポリタンパク質のc 2 2領域由来のエピトープ；ならびに(i i i) 第二の検出可能に標識された抗体(ここで、この第二の検出可能に標識された抗体は、このh S O Dアミノ酸配列と反応性である)を添加する工程；(d) (存在する場合、生物学的サンプルにおけるH C V感染の指標としての)抗体と抗原との間の複合体を検出する工程、を包含する。

【0021】

この実施形態において、少なくとも2つの抗コア抗体は、H C Vコア抗原のN末端領域に対して(例えば、H C Vのアミノ酸1 0 ~ 5 3(H C V 1ポリタンパク質に対して番号付けされた)に対して)指向され得、そして検出可能に標識されたH C V抗コア抗体は、H C Vコア抗原のC末端領域に対して(例えば、H C Vのアミノ酸1 2 0 ~ 1 3 0(H C V 1ポリタンパク質に対して番号付けされた)に対して)指向される。さらに、c 2 2領域由来のエピトープは、H C V 1ポリタンパク質に対して番号付けされた、H C Vポリタンパク質のアミノ酸L y s₁₀ ~ S e r₉₉を含み得、ここで、A r g 4 7が欠失し、そして4 4位でL u eがT r pに置換されている。

【0022】

他の実施形態において、本発明は、免疫診断試験キットに関し、このキットは、上記のイムノアッセイ固体支持体および免疫診断試験を実施するための説明書を含む。

【 0 0 2 3 】

なおさらなる実施形態において、本発明は、イムノアッセイ固体支持体を生成する方法に関し、この方法は、(a) 固体支持体を提供する工程；および(b) 少なくとも1つのHCV抗コア抗体（例えば、1つまたは2つ以上）、および少なくとも1つの単離されたHCV NS3/4aエピトープ、ならびに必要に応じて、多重エピトープ融合抗原を、固体支持体に結合する工程を包含する。この抗コア抗体、NS3/4aエピトープ、および多重エピトープ融合抗原は、上記の通りである。

【 0 0 2 4 】

さらなる実施形態において、本発明は、多重エピトープ融合抗原に関し、この抗原は、図7A～7Fに記載されるアミノ酸配列またはこのアミノ酸配列に対して少なくとも80%の配列同一性（例えば、90%以上の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列は、HCV感染個体由来の生物学的サンプル中に存在する抗HCV抗体と特異的に反応する。特定の実施形態において、この多重エピトープ融合抗原は、図5A～5Fに示されるアミノ酸配列からなる。

【 0 0 2 5 】

さらなる実施形態において、本発明は、上記の多重エピトープ融合抗原についてのコード配列を含むポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、この組換えベクターで形質転換された宿主細胞、ならびに、組換え多重エピトープ融合抗原を作製する方法に関し、この方法は、(a) 上記のような宿主細胞の集団を提供する工程；および(b) この組換えベクター中に存在するコード配列によってコードされる多重エピトープ融合抗原が発現される条件下でこの細胞の集団を培養する工程を包含する。

【 0 0 2 6 】

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

【 0 0 2 7 】

(発明の詳細な説明)

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

【 0 0 2 8 】

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

【 0 0 2 9 】

以下のアミノ酸の略語は、この明細書を通して使用される：

アラニン：Ala (A)	アルギニン：Arg (R)
アスパラギン：Asn (N)	アスパラギン酸：Asp (D)
システイン：Cys (C)	グルタミン：Gln (Q)

グルタミン酸：G l u (E)	グリシン：G l y (G)
ヒスチジン：H i s (H)	イソロイシン：I l e (I)
ロイシン：L e u (L)	リジン：L y s (K)
メチオニン：M e t (M)	フェニルアラニン：P h e (F)
プロリン：P r o (P)	セリン：S e r (S)
スレオニン：T h r (T)	トリプトファン：T r p (W)
チロシン：T y r (Y)	バリン：V a l (V)

(I . 定義)

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

10

【 0 0 3 0 】

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

20

【 0 0 3 1 】

H C V ポリペプチドは、上記のように、H C V ポリタンパク質に由来するポリペプチドである。このポリペプチドは、物理的に H C V に由来する必要はなく、合成的にまたは組換え的に生成され得る。さらに、このポリペプチドは、種々の H C V 株および単離物のいずれか（例えば、限定されないが、H C V の株 1、2、3、または 4 由来の単離物のいずれか）に由来し得る。多くの保存領域および可変領域が、これらの株で既知であり、そして一般に、これらの領域に由来するエピトープのアミノ酸配列は、2つの配列が整列された場合に、高い程度の配列相同性（例えば、30%より大きい、好ましくは40%より大きいアミノ酸配列相同性）を有する。従って、例えば、用語「N S 3 / 4 a」ポリペプチドは、種々の H C V 株のいずれかに由来するネイティブな N S 3 / 4 a、ならびに以下にさらに定義されるような N S 3 / 4 a アナログ、ムテインおよび免疫原性フラグメントをいう。多くのこれらの株の完全な遺伝子型は、公知である。例えば、米国特許第 6, 150, 087 号および G e n B a n k 登録番号 A J 2 3 8 8 0 0 ならびに A J 2 3 8 7 9 9 を参照のこと。

30

【 0 0 3 2 】

用語「アナログ」および「ムテイン」は、参照分子の生物学的に活性な誘導体またはこのような誘導体のフラグメント（これらは、本明細書中に記載されるアッセイにおいて免疫反応性のような所望の活性を維持する）をいう。一般に、用語「アナログ」は、改変が免疫原性活性を破壊しない限り、ネイティブ分子に対して、1以上のアミノ酸付加、置換（一般に、性質が保存的である）、および/または欠失を有するネイティブなポリペプチド配列および構造を有する化合物をいう。用語「ムテイン」は、1つ以上のペプチド模倣物（「ペプトイド」）を有するペプチドをいい、例えば、国際公開番号 W O 9 1 / 0 4 2 8 2 に記載される。好ましくは、このアナログまたはムテインは、ネイティブな分子と少なくとも同じ免疫活性を有する。ポリペプチドアナログおよびムテインを作製するための方法は、当該分野で公知であり、そして以下にさらに記載される。

40

【 0 0 3 3 】

特に好ましいアナログは、性質が保存的である置換（すなわち、それらの側鎖が関係するアミノ酸のファミリー内で起こる置換）を含む。具体的に、アミノ酸は、一般的に4つのファミリーに分類される：（1）酸性 - - アスパラギン酸およびグルタミン酸；（2）塩

50

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

10

【0034】

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

20

30

【0035】

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

40

【0036】

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

50

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

【0037】

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

【0038】

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

【0039】

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

10

【0040】

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

【0041】

20

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

30

40

【0042】

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

【0043】

「組換え体」タンパク質は、所望の活性を有し、そして本明細書中に記載される組換えD

50

N A 技術によって調製されたタンパク質である。一般的に、目的の遺伝子は、以下にさらに記載のように、クローン化され、次いで、形質転換された生物において発現される。宿主生物は、発現条件下で外来遺伝子を発現してタンパク質を産生する。

【 0 0 4 4 】

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

10

【 0 0 4 5 】

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

【 0 0 4 6 】

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

20

【 0 0 4 7 】

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

30

【 0 0 4 8 】

容易に入手可能なコンピュータプログラム（例えば、A L I G N , D a y h o f f , M . O . , A t l a s o f P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e M . O . D a y h o f f 編、補遺 5、3 : 3 5 3 ~ 3 5 8 , N a t i o n a l b i o m e d i c a l R e s e a r c h F o u n d a t i o n , W a s h i n g t o n , D C（これは、ペプチド分析のために、S m i t h および W a t e r m a n A d v a n c e s i n A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 ~ 4 8 9 , 1 9 8 1 の局所的相同性アルゴリズムを適合させる））は、類似性または同一性の分析を助けるために使用され得る。ヌクレオチド配列類似性および同一性を決定するためのプログラム（例えば、B E S T F I T、F A S T A および G A P プログラム（これらもまた、S m i t h および W a t e r m a n のアルゴリズムに依存する））は、W i s c o n s i n S e q u e n c e A n a l y s i s P a c k a g e , V e r s i o n 8 (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , M a d i s o n , W I から入手可能)において入手可能である。これらのプログラムは、製造業者によって推奨され、そして上に参照される W i s c o n s i n S e q u e n c e A n a l y s i s P a c k a g e に記載されるデフォルトパラメーターを用いて容易に使用される。例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列の相同性の割合は、6 つのヌクレオチド位置のデフォルトスコアリングテーブルおよびギャップペナルティーを用いて S m i t h および W a t e r m a n の相同性アルゴリズム

40

50

を使用して決定され得る。

【0049】

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

【0050】

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

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

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

10

20

30

40

50

列の転写および翻訳を提供する)を含む。

【0054】

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

10

【0055】

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

【0056】

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

20

【0057】

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

30

【0058】

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

【0059】

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

【0060】

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

40

【0061】

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

【0062】

本明細書中で使用される「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された組織または流体のサンプルをいい、このサンプルとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血液、血漿、血清、糞便、尿、骨髄、胆汁、髄液、リンパ液、皮膚のサンプル、以下の外分泌物(皮膚、気道、腸管、および尿生殖路)、涙、唾液、乳汁、血球、器官、生検材料、ならびにまた培養培地(例えば、組換え細胞、および細胞成分)中での細胞およ

50

び組織の増殖から得られる馴化培地を含むがこれに限定されないインビトロ細胞培養構築物のサンプル。

【0063】

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

10

【0064】

(II. 発明の実施の形態)

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

【0065】

20

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

【0066】

上記のように、本発明は、初期 HCV 感染を正確に検出するための、新規の診断方法の発見に基づく。この方法は、高度に免疫原性の HCV 抗体および HCV 抗原の同定および使用に依存し、この HCV 抗体および抗原は、HCV のセロコンバージョンの初期段階中に存在し、これによって、検出精度を上昇させ、そして誤った結果の発生を減少させる。この方法は、単一のアッセイフォーマットにおいて都合良く実施され得る。

【0067】

30

より具体的には、このアッセイは、1 種以上の HCV 抗コア抗体 (同一の HCV コアエピトープまたは異なる HCV コアエピトープのいずれかに対して指向される) および HCV ポリタンパク質の NS3/4a 領域由来のエピトープが結合されている固体支持体で実施される。本発明において有用な特定の抗コア抗体の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸 10 位 ~ 53 位の間；アミノ酸 10 位 ~ 45 位の間；アミノ酸 67 位 ~ 88 位の間；アミノ酸 120 位 ~ 130 位の間に見出されるコア領域におけるエピトープに対して指向されるモノクローナル抗体のような抗体分子、あるいは例えば、以下において同定されたコアエピトープのいずれかに対して指向される抗体：Houghton ら、米国特許第 5,350,671 号；Chien ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:10011-10015；Chien ら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8:S33-39；Chien ら、国際公開番号 WO93/00365；Chien, D.Y.、国際公開番号 WO94/01778；ならびに共有に係る、特許になった米国特許出願番号 08/403,590 および同 08/444,818。

40

【0068】

HCV ポリタンパク質の NS3/4a 領域が記載されており、このアミノ酸配列およびこのタンパク質の全体構造は、例えば、Yao ら、Structure (1999 年 11 月) 7:1353-1363；Sali ら、Biochem. (1998) 37:3392-3401；および Bartenschlager, R., J. Viral Hepat. (1999) 6:165-181 に開示されている。また、Dasmahapatra

50

ら、米国特許第5,843,752号を参照のこと。本発明のイムノアッセイは、天然に存在するHCV粒子またはその感染産物において見出されるようなコンホメーション中に存在する、NS3/4a領域由来の少なくとも1種類のコンホメーションエピトープを利用し、プロテアーゼ、必要に応じて、NS3/4a遺伝子産物によって通常示されるヘリカーゼ酵素活性および/またはHCV感染被験体由来の生物学的サンプル中での抗原と抗体との免疫活性の保持、ならびに抗原の変性におけるエピトープ免疫活性の減少によって明らかとなる。例えば、このコンホメーションエピトープは、加熱、極度に酸性または塩基性のpHの変化によって、または公知の有機変性（例えば、ジチオトレイトール（DTT）または適切な界面活性剤）を添加することによって崩壊され得る。例えば、Protein Purification Methods, a practical approach (E.L.V. HarrisおよびS. Angal編、IRL Press) 10、上記のように処理されない産物と比較される変性産物を参照のこと。

【0069】

プロテアーゼ活性およびヘリカーゼ活性は、当該分野で周知の標準的な酵素アッセイを使用して決定され得る。例えば、プロテアーゼ活性は、当該分野で周知のアッセイの使用により決定され得る。例えば、Takeshitaら、Anal. Biochem. (1997) 247: 242-246; Kakiuchiら、J. Biochem. (1997) 122: 749-755; Saliら、Biochemistry (1998) 37: 3392-3401; Choら、J. Virol. Meth. (1998) 72: 109-115; Cerretaniら、Anal. Biochem. (1999) 266: 192-197; Zhangら、Anal. Biochem (1999) 270: 268-275; Kakiuchiら、J. Virol. Meth. (1999) 80: 77-84; Fowlerら、J. Biomol. Screen. (2000) 5: 152-158; およびKimら、Anal. Biochem. (2000) 284: 42-48を参照のこと。プロテアーゼ活性を試験するための特に便利なアッセイは、以下の実施例において記載される。 20

【0070】

同様に、ヘリカーゼ活性アッセイは、当該分野で周知であり、そしてNS3/4aエピトープのヘリカーゼ活性は、例えば、以下を使用して決定され得る：例えば、Hsuら、Biochem. Biophys. Res. Commun. (1998) 253: 594-599に記載されるようなELISAアッセイ; Kyonoら、Anal. Biochem. (1998) 257: 120-126に記載されるようなシンチレーション近接アッセイ系（proximity assay system）; 例えば、Hichamら、Antiviral Res. (2000) 46: 181-193およびKwongら、Methods Mol. Med. (2000) 24: 97-116に記載されるようなハイスループットスクリーニングアッセイ; ならびに当該分野で公知の他のアッセイ方法。例えば、Khuら、J. Virol. (2001) 75: 205-214; Utamaら、Virology (2000) 273: 316-324; Paoliniら、J. Gen. Virol. (2000) 81: 1335-1345; Preugschatら、Biochemistry (2000) 39: 5174-5183; Preugschatら、Methods Mol. Med. (1998) 19: 353-364; ならびにHessonら、Biochemistry (2000) 39: 2619-2625を参照のこと。 30 40

【0071】

抗原の長さは、免疫反応性コンホメーションエピトープ（conformational epitope）を維持するのに十分である。しばしば、使用される抗原を含むポリペプチドは、ほとんど全長であるが、このポリペプチドはまた、例えば、可溶性を増加させるためか、または分泌を改善するために切断され得る。一般に、NS3/4a中に見出されるコンホメーションエピトープは、細胞中で組換えポリペプチドとして発現され、そしてこのポリペプチドは、以下で詳細に記載されるような所望の形態のエピトープを提供す 50

る。

【0072】

NS3/4aポリペプチドに関する代表的なアミノ酸配列は、図3および図4A~4Dに示される。図3の182位に存在する太字のアラニンは、別に存在し得る分子の自己触媒を防止するために、この位置において見出されるネイティブなセリンと置換される。図4A~4Dの2位~686位に示されるアミノ酸配列は、HCV-1のアミノ酸の1027位~1711位に対応する。Metをコードする開始コドン(ATG)は、1位として示される。さらに、HCV-1の1428位(図4のアミノ酸の403位)に通常存在するThrは、Proに変異され、HCV-1の1429位(図4のアミノ酸の404位)に通常存在するSerは、Ileに変異される。しかし、このエピトープが、プロテアーゼ活性および必要に応じてヘリカーゼ活性が保持されるように、そのネイティブコンホメーションを保持または回復する方法を使用して産生される限り、N末端にMetを有するか、もしくは有さないネイティブ配列、N末端にMetを有するか、もしくは有さない描写アナログ(dipicted analog)、または他のアナログおよびフラグメントのいずれかは、本発明のアッセイにおいて使用され得る。Dasmahapatra、米国特許第5,843,752号およびZhangら、米国特許第5,990,276号(これらの両方は、NS3/4aのアナログを記載する)。

【0073】

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

【0074】

固体支持体はまた、他の抗原を含み得る。例えば、国際公開番号WO97/44469に記載されるような、複数のエピトープ融合抗体(「MEFA」と呼ばれる)を、本発明のアッセイでの使用のために固体支持体に結合し得る。このようなMEFAは、図1および表1に示される種々のウイルス領域のうち2種以上から誘導される複数のエピトープを含む。特に、図1および表1に示されるように、HCVポリタンパク質の切断により、NH₂-コア-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOHの順序で、少なくとも10個の異なる産物を産生する。このコアポリペプチドは、HCV-1に対して番号付けされた、1位~191位に存在する(HCV-1ゲノムに関して、Chooら(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455を参照のこと)。このポリペプチドは、さらに、アミノ酸約1位~約173位を含むHCVポリペプチドを産生するように処理される。このエンベロープポリペプチド(E1およびE2)は、それぞれ、約192位~約383位および約384位~約746位に存在する。P7ドメインは、約747位~約809位に見出される。NS2は、タンパク質分解活性を有する完全な膜タンパク質であり、そしてこのポリタンパク質の約810位~約1026位に見出される。NS2は、単独か、またはNS3(約

10

20

30

40

50

1027位～約1657位に見出される)と組み合わせてかのいずれかで、NS2 - NS3単結合(sissle bond)を切断し、次に、NS3 N末端を生成し、そしてセリンプロテアーゼ活性およびRNAヘリカーゼ活性の両方を含む大きなポリタンパク質を放出する。このNS3プロテアーゼ(約1027位～約1207位に見出される)は、残りのポリタンパク質を処理するのに役立つ。ヘリカーゼ活性は、約1193位～約1657位に見出される。ポリタンパク質の成熟の完了は、NS3セリンプロテアーゼにより触媒される、NS3 - NS4a結合の自己触媒による切断より開始される。HCVポリタンパク質の続くNS - 3媒介切断は、別のポリペプチドのNS3分子による、ポリタンパク質の切断部の認識に関与するようである。これらの反応において、NS3は、NS3補因子(約1658位～約1711位に見出されるNS4a)、2個のタンパク質(約1712位～約1972位に見出されるNS4b、および約1973位～約2420位に見出されるNS5a)、ならびにRNA依存性RNAポリメラーゼ(約2421位～約3011位に見出されるNS5b)を遊離する。

【0075】

【表1】

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

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

【0076】

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

【0077】

例えば、E2の超可変領域（例えば、アミノ酸384～410または390～410にわたる領域）由来のエピトープは、MEFA抗原に含まれ得る。特に有効なE2エピトープは、この領域由来のコンセンサス配列（例えば、コンセンサス配列Gly-Ser-Ala-Ala-Arg-Thr-Thr-Ser-Gly-Phe-Val-Ser-Leu-Phe-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Gln-Asn（これは1型HCVゲノムのアミノ酸390～410のコンセンサス配列を表す））を含むエピトープである。本発明のMEFAに存在する代表的なE2エピトープは、アミノ酸390～444にわたるハイブリッドエピトープを含み得る。このようなハイブリッドE2エピトープは、HCV E2のアミノ酸411～444のネイティブのアミノ酸配列に融合したアミノ酸390～410を表すコンセンサス配列を含み得る。

10

【0078】

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

20

【0079】

本発明のアッセイと共に使用するための代表的なMEFAは、国際公開番号WO97/44469に記載される。本明細書中で使用するためのさらなる代表的なMEFAとしては、MEFA12、MEFA13、およびMEFA13.1と呼ばれるMEFAが挙げられる。これらのMEFAは、単に例示であり、そしてHCVゲノム由来の他のエピトープもまた本発明のアッセイを用いる用途を見出し、そしてこれらまたは他のMEFAに組み込まれえることが理解されるべきである。

30

【0080】

MEFA12のDNA配列および対応するアミノ酸配列を、図7A～7Fに示す。MEFA12の一般構造式は、図6に示され、そして以下のとおりである：hSOD-E1（タイプ1）-E2 HVRコンセンサス（タイプ1a）-E2 HVRコンセンサス（タイプ1および2）-c33cショート（タイプ1）-5-1-1（タイプ1）5-1-1（タイプ3）-5-1-1（タイプ2）-c100（タイプ1）-NS5（タイプ1）-NS5（タイプ1）-コア（タイプ1+2）-コア（タイプ1+2）。この多コピーエピトープは、HCV-1に関して番号付けされた以下のアミノ酸配列を含む（以下に記載されるアミノ酸配列の番号付けは、Chooら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455で提供される番号付けの指示に従い、ここでアミノ酸#1は、コア領域のコード配列によりコードされる1番目のメチオニンである）：スーパーオキシドジスムターゼ（SOD、タンパク質の組換え発現を促進するために使用される）のアミノ酸1～69；E1領域由来のポリタンパク質のアミノ酸303～320；HCV-1a E2の超可変領域のコンセンサス配列を表すポリタンパク質のアミノ酸390～410；HCV-1およびHCV-2のE2超可変領域のコンセンサス配列を表す、領域E2由来のポリタンパク質のアミノ酸384～414；ヘリカーゼを規定する

40

50

HCV-1 ポリタンパク質のアミノ酸 1211 ~ 1457 ; 5-1-1 のアミノ酸 1689 ~ 1735 由来のエピトープの 3 つのコピー (2 つは HCV-1 由来であり、1 つは HCV-3 由来であり、そして 1 つは HCV-2 由来であり、これらのコピーは、HCV の 3 つの異なるウイルス株由来の等価な抗原決定基である) ; HCV-1 の HCV ポリペプチド C100 である、ポリタンパク質のアミノ酸 1901 ~ 1936 ; HCV-1 の NS5 領域由来のエピトープの 2 つの正確なコピー (この各々は HCV ポリタンパク質のアミノ酸 2278 ~ 2313 を有する) ; およびコア領域由来の 3 つのエピトープの 2 つのコピー (1 つは HCV-1 由来であり、1 つは HCV-2 由来であり、これらのコピーは、HCV-1 のアミノ酸 9 ~ 53 および 64 ~ 88、ならびに HCV-2 のアミノ酸 67 ~ 84 により表される等価な抗原決定基である) 。

10

【0081】

表 2 は、本明細書中の図 7A ~ 7F を参照して、MEFA12 中の様々なエピトープのアミノ酸位置を示す。この表における番号付けは、HCV-1 に関する。Choo ら (1991) Proc. Natl. Sci. USA 88 : 2451 - 2455 を参照のこと。MEFA13 および 13.1 はまた、それぞれ、表 3 および 4 に示されるような改変を有する、MEFA12 について上で特定された一般式を共有する。

【0082】

【表 2】

表 2. MEFA 12				
mefa aa#	5' 末端部位	エピトープ	hcv aa#	株
1-69*	<i>NcoI</i>	hSOD		
72-89	<i>MluI</i>	E1	303-320	1
92-112	<i>HindIII</i>	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
113-143		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1, 2
146-392	<i>SpeI</i>	C33C ショート	1211-1457	1
395-441	<i>SphI</i>	5-1-1	1689-1735	1
444-490	<i>NruI</i>	5-1-1	1689-1735	3
493-539	<i>ClaI</i>	5-1-1	1689-1735	2
542-577	<i>AvaI</i>	C100	1901-1936	1
580-615	<i>XbaI</i>	NS5	2278-2313	1
618-653	<i>BglII</i>	NS5	2278-2313	1
654-741	<i>NcoI</i>	コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
742-829	<i>BalI</i>	コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

20

30

40

* SOD タンパク質は、検出結合体である HRP 標識抗 SOD 抗体が MEFA に結合しな

50

いように切断される。コアエピトープは、検出に使用される H C V コアに対する抗体が M E F A に結合しないように変異される。

【 0 0 8 3 】

【 表 3 】

表 3. MEFA 13				
mefa aa#	5' 末端部位	エピトープ	hcv aa#	株
1-156	<i>Nco</i> I	変異した hSOD (aa 70-72, ALA)		
161-178	<i>Mlu</i> I	E1	303-320	1
181-201	<i>Hind</i> III	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
202-232		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1, 2
235-451		C33C ショート	1211-1457	1
454-500	<i>Hind</i> III	5-1-1 PImut*	1689-1735	1
503-549	<i>Nru</i> I	5-1-1 PImut*	1689-1735	3
552-598	<i>Cla</i> I	5-1-1 PImut*	1689-1735	2
601-636	<i>Ava</i> I	C100	1901-1936	1
639-674	<i>Xba</i> I	NS5	2278-2313	1
677-712	<i>Bgl</i> II	NS5	2278-2313	1
713-800		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
801-888		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

* 5 - 1 - 1 エピトープは、NS 3 / 4 a 組換えタンパク質によって標的化される可能な切断部位 (C S または C A) を除去することによって改変される。C S または C A の代わりに、この配列は P I に変えられる。さらに、S O D タンパク質は、検出結合体である H R P 標識抗 S O D 抗体が M E F A に結合しないように変異される。コアエピトープは、検出に使用される H C V に対する抗体が M E F A に結合しないように変異される。

【 0 0 8 4 】

【 表 4 】

表 4. MEFA 13.1				
mefa aa#	5'末端部位	エピトープ	hcv aa#	株
1-86	<i>NcoI</i>	変異した hSOD (aa 70-72, ALA)		
89-106	<i>MluI</i>	E1	303-320	1
109-129	<i>HindIII</i>	E2 HVR1a コンセンサス	390-410	1
130-160		E2 HVR1+2 コンセンサス	384-414	1, 2
163-379		C33Cショート	1211-1457	1
382-428	<i>HindIII</i>	5-1-1 PImut*	1689-1735	1
431-477	<i>NruI</i>	5-1-1 PImut*	1689-1735	3
480-526	<i>ClaI</i>	5-1-1 PImut*	1689-1735	2
529-564	<i>AvaI</i>	C100	1901-1936	1
567-602	<i>XbaI</i>	NS5	2278-2313	1
605-640	<i>BglIII</i>	NS5	2278-2313	1
641-728		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2
729-816		コア エピトープ	9-53, R47L 64-88 67-84	1 1 2

* 5 - 1 - 1 エピトープは、NS 3 / 4 a 組換えタンパク質によって標的化される可能な切断部位 (CS または CA) を除去することによって改変される。CS または CA の代わりに、この配列は PI に変えられる。さらに、SOD タンパク質は、検出結合体である HRP 標識抗 SOD 抗体が MEFA に結合しないように変異される。コアエピトープは、検出に使用される HCV コアに対する抗体が MEFA に結合しないように変異される。

【 0 0 8 5 】

1 つのアッセイ様式において、サンプルは、以下にさらに記載されるように、固体支持体と合わされる。サンプルが HCV に感染している場合、コア抗原およびこの固体支持体上に存在するこれらのエピトープに対する HCV 抗体は、固体支持体成分に結合する。次いで、検出可能に標識された抗コア抗体が、加えられる。この標識された抗コア抗体は、固体支持体に結合する抗コア抗体とは異なるエピトープに対して指向される。この抗コア抗体は、固体支持体上の抗コア抗体により捕捉されるコア抗原に結合する。

【 0 0 8 6 】

生物学的サンプル由来の捕捉された HCV 抗体 (この捕捉されたサンプルの HCV 抗体は NS 3 / 4 a エピトープと反応性である) と反応する抗原もまた加えられる。この抗原は、好ましくは、HCV ポリタンパク質の NS 3 領域由来のエピトープである。この抗原は、サンプル由来の捕捉された HCV 抗体に結合する。このようなエピトープを含む多数の

10

20

30

40

50

抗原が公知であり、これには、c 3 3 c および c 1 0 0 領域由来の抗原、および NS 3 エピトープ（例えば、c 2 5）を含む融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。これらおよび他の NS 3 エピトープは、本発明のアッセイにおいて有用であり、そして当該分野で公知であり、そして例えば、以下に記載されている：Houghton ら、米国特許第 5, 3 5 0, 6 7 1 号；Chien ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011 - 10015；Chien ら、J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33 - 39；Chien ら、国際公開番号 WO 93 / 00365；Chien, D. Y., 国際公開番号 WO 94 / 01778；ならびに共有に係る特許になった米国特許出願番号 08 / 403, 590 および同 08 / 444, 818。

10

【0087】

上記の抗原に対する第 2 の標識された抗体が加えられる。この抗体は、抗原に含まれる任意のエピトープに対して指向され得る。例えば、この抗体は、抗原中に存在する NS 3 領域に対して指向され得る。あるいは、上記の抗原が融合タンパク質として発現される場合、第 2 の標識された抗原は、融合パートナーに対して指向され得る。特に、固体支持体が MEFA を含む場合、さらなる抗原および抗体がアッセイに加えられる。これらのアッセイ様式は、以下にさらに説明される。

【0088】

本発明の代表的なアッセイを図 2 に示す。この図に示されるように、固体支持体は、2 つの抗コアモノクローナル抗体（c 1 1 - 3 および C 1 1 - 7 と呼ばれる）を含む。これらの抗体は、アミノ酸 10 ~ 53（HCV 1 ポリタンパク質配列に関して番号付けした）のコアタンパク質の N 末端領域に見出されるエピトープに対して指向される。この固体支持体はまた、NS 3 / 4 a に対するエピトープを含む。生物学的サンプルが、この固体支持体に加えられる。HCV コア抗原、および NS 3 / 4 a エピトープに対する抗体（この両方はサンプル中に存在する）は、固体支持体上の捕捉試薬に結合する。

20

【0089】

西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）- 標識抗コアモノクローナル抗体 c 1 1 - 14（アミノ酸の 120 ~ 130 位に見出されるコアの C 末端領域に対する抗体、HCV 1 ポリタンパク質配列に関して番号付けされている）が、加えられる。ヒト SOD（hSOD）由来の配列および c 3 3 c 領域由来のエピトープを含む融合タンパク質が、この融合タンパク質の SOD 部分に対する第 2 の HRP 標識抗体と同様に、加えられる。SOD - c 3 3 c 融合タンパク質は、抗 NS 3 抗体に結合し、そして抗 SOD 抗体は、次いで、SOD - c 3 3 c 融合タンパク質に結合する。標識の検出は、HCV 感染の存在を表す。

30

【0090】

本発明の別の代表的なアッセイを図 8 に示す。抗体アッセイの構成は、NS 3 / 4 a および MEFA 12 の両方を使用する抗原 - 抗体 - 抗原サンドイッチ捕捉アッセイである。固体支持体は、上記の 2 つの抗コアモノクローナル抗体、NS 3 / 4 a に対するエピトープ、および代表的な MEFA である MEFA 12（これは、ヒト SOD の短縮型を含む）を含む。上記のアッセイのように、生物学的サンプルがこの固体支持体に加えられる。HCV コア抗原、ならびに NS 3 / 4 a エピトープおよび MEFA のエピトープに対する抗体は、サンプル中に存在し、これは固体支持体上の捕捉試薬に結合する。2 つの抗原（1 つは、NS 3 / 4 a に結合するサンプル抗体（上記のような）と反応性であり、そして 1 つは、MEFA 12 に結合するサンプル抗体と反応性である）が添加される。図 8 において、MEFA 12 / サンプル抗体複合体と反応性の抗原は、SOD 分子と c 2 2 k s Δ 4 7 - L 4 4 W との間の融合物である。この c 2 2 k s 抗原はコア領域由来であり、そしてポリタンパク質のアミノ酸 L y s₁₀ ~ S e r₉₉、ならびに通常存在する A r g₄₇ の欠失、および 44 位における L e u の T r p での置換を含む。抗原検出結合体は、上記の第 2 の HRP 標識モノクローナル抗 SOD 抗体である。

40

【0091】

上記の抗原 / 抗体組み合わせアッセイは、HCV コア抗原ならびに NS 3 / 4 a および /

50

またはコアに対する抗体の両方が、同じアッセイにおいて同じ支持体により検出され得る場合、特に有利である。さらに、上記のように、さらなるHCVエピトープ（例えば、c100、5-1-1、NS5抗原に対するSOD融合タンパク質）、およびポリタンパク質のコア領域におけるフレームシフトから生じるタンパク質（例えば、国際公開番号WO99/63941に記載されるようなタンパク質）は、HCVの他の非構造的エピトープを網羅する組み合わせカクテルにおいて使用され得る。

【0092】

本発明のさらなる理解のために、より詳細な議論は、本発明のイムノアッセイにおける使用のための抗体の生成、このイムノアッセイにおける使用のためのポリペプチドの生成、およびこのイムノアッセイを実施する方法に関して以下に記載される。

10

【0093】

（HCVイムノアッセイにおける使用のための抗体の生成）

上で説明したように、アッセイは、固体支持体（例えば、1つ以上の抗コア抗体）に結合した種々の抗体、およびHCV感染がサンプル中に存在する場合に形成される抗原/抗体複合体を検出する種々の抗体を利用する。これらの抗体は、ポリクローナル抗体調製物またはモノクローナル抗体調製物、単一特異的抗血清、ヒト抗体であってもよいし、例えば、ヒト化抗体、変性抗体、 $F(ab')_2$ フラグメント、 $F(ab)$ フラグメント、 Fv フラグメント、単一ドメイン抗体、二量体または三量体の抗体フラグメント構築物、ミニ抗体（minibodies）、または問題の抗原に結合するそれらの機能的フラグメントのような抗体ハイブリッド抗体またはキメラ抗体であってもよい。

20

【0094】

抗体は、当業者に周知の技術、ならびに例えば、米国特許第4,011,308号；同第4,722,890号；同第4,016,043号；同第3,876,504号；同第3,770,380号；および同第4,372,745号に記載される技術を使用して生成される。例えば、ポリクローナル抗体は、適切な動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギ）を、目的の抗原で免疫することによって生成される。免疫原性を増強するために、抗原は、免疫の前にキャリアに結合され得る。このようなキャリアは、当業者に周知である。免疫は、一般に、生理食塩水中、好ましくは、フロイントの完全アジュバントのようなアジュバント中の抗原を混合または乳化することによって、そして混合物またはエマルジョンを非経口的（一般に、皮下または筋肉内）に注射することによって行なわれる。動物は、一般に、好ましくは、フロイントの不完全アジュバントを使用して、生理食塩水中の抗原の1回以上の注射で、2～6週後に追加免疫される。抗体はまた、当該分野で公知の方法を使用する、インビトロ免疫によって生成され得る。次いで、ポリクローナル抗血清は、免疫動物から得られる。例えば、抗HCVポリクローナル抗体の生成については、Houghtonら、米国特許第5,350,671号を参照のこと。

30

【0095】

モノクローナル抗体は、一般に、KohlerおよびMilstein(1975)Nature 256:495-497の方法またはその改変物を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットが、上記のように免疫される。しかし、血清を抽出するために動物を出血させるのではなく、脾臓（および必要に応じていくつかの大きいリンパ節）が取り出され、そして単一の細胞に分離される。所望の場合、脾臓細胞は、抗原でコーティングしたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することによって、（非特異的に接着した細胞の除去後に）スクリーニングされ得る。B細胞（抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現する）はプレートに結合し、そして懸濁液の残りと共に洗い流されない。次いで得られたB細胞（または全ての分離した脾臓細胞）は、黒色腫細胞と融合するように誘導されてハイブリドーマを形成し、そして選択的な培地（例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン培地、「HAT」）で培養される。得られたハイブリドーマは、限界希釈によってプレートされ、そして、免疫抗原に特異的に結合する（そして関連していない抗原に結合しない）抗体の生成についてアッセイされる。次いで、選択されたモノクローナル抗体スクリーニングハイブリドーマは、インビトロ（例えば、組織培養瓶ま

40

50

たは中空線維反応器中)またはインピボ(例えば、マウスの腹水のような)のいずれかで培養される。

【0096】

種々の抗HCVモノクローナル抗体の生成は、例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号;Chienら、国際公開番号WO93/00365;共有に係る、特許となった米国特許出願番号08/403,590および同08/444,818;およびKashiwakumara、米国特許番号5,871,904号において記載されている。

【0097】

上に説明されたように、目的の抗原を認識する能力を保持する抗体フラグメントはまた、目的のイムノアッセイにおいて用途を見出す。インタクトな抗体分子の免疫学的結合特性を示し得る抗原結合部位を含む多数の抗体フラグメントが公知である。例えば、機能的な抗体フラグメントは、例えば、ペプシンを使用して、抗体分子から抗原結合を担わない定常領域を切断することによって生成され、F(ab')₂フラグメントを生成する。これらのフラグメントは、2つの抗原結合部位を含むが、重鎖の各々から定常領域の一部分を欠く。同様に、所望な場合、Fabフラグメント(単一の抗原結合部位を含む)が、例えば、パパインでのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の消化によって、生成され得る。機能的フラグメント(重鎖および軽鎖の変領域のみを含む)は、免疫グロブリン分子の組換え生成または優先的タンパク質分解切断のような標準的な技術を使用して、生成され得る。これらのフラグメントは、Fvとして公知である。例えば、Inbarら(1972)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69:2659-2662;Hochmanら(1976)Biochem 15:2706-2710;およびEhrlichら(1980)Biochem 19:4091-4096を参照のこと。

【0098】

単鎖Fv(「sFv」または「scFv」)ポリペプチドは、ペプチドコードリンカーによって連結されるV_Hコード遺伝子およびV_Lコード遺伝子を含む遺伝子融合物から発現される共有結合したV_H-V_Lヘテロ二量体である。Hustonら(1988)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85:5879-5883。天然に凝集しているが化学的に分離した、抗体V領域由来の軽鎖および重鎖ポリペプチドを、抗原結合部位の構造に実質的に類似した三次元構造に折り畳まれるsFv分子に変換する化学的構造(リンカー)を区別および開発するための多数の方法が記載されている。例えば、米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号、および同第4,946,778号を参照のこと。sFv分子は、当該分野で記載される方法を使用して生成され得る。例えば、Hustonら(1988)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号、および同第4,946,778号を参照のこと。設計基準は、一方の鎖のC末端と、他方の鎖のN末端との間の距離にわたる適切な長さを決定することを包含し、ここで、リンカーは、一般に、コイル化する傾向がないか、または二次構造を形成しない親水性低分子アミノ酸残基から形成される。このような方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号、および同第4,946,778号を参照のこと。適切なリンカーは、一般に、代替のセットのグリシンおよびセリン残基のポリペプチド鎖を含み、そして可溶性を増強するために、挿入されたグルタミン酸およびリジン残基を含み得る。

【0099】

「ミニ抗体(mini-antibodies)」または「ミニ抗体(minibodies)」もまた、本発明を用いる用途が見出される。ミニ抗体は、ヒンジ領域によってsFvから分離された、そのC末端にオリゴマー形成ドメインを含むsFvポリペプチド鎖である。Packら(1992)Biochem 31:1579-1584。オリゴマー形成ドメインは、さらなるジスルフィド結合によってさらに安定化され得る自己会合αヘリックス(例えば、ロイシンジッパー)を含む。このオリゴマー形成ドメインは、膜を

10

20

30

40

50

横切る特定の方向への折り畳みと適合性であるように設計され、この折り畳みは、ポリペプチドの機能的な結合タンパク質へのインピボの折り畳みを容易にすると考えられているプロセスである。一般に、ミニ抗体は、当該分野で周知の方法を使用して生成される。例えば、Packら(1992) Biochem 31:1579-1584; Cumberら(1992) J Immunology 149B:120-126を参照のこと。

【0100】

(HCVイムノアッセイにおける使用のための抗原の生成)

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

【0101】

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

【0102】

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

【0103】

次いで、コード配列は、発現のために使用される系に依存して、適切なコントロールエレメントの制御下に置かれる。従って、このコード配列は、プロモータ、リボソーム結合部

10

20

30

40

50

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

【0104】

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

【0105】

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

【0106】

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

【0107】

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

【0108】

例えば、昆虫細胞発現系（例えば、バキュロウイルス系）は、当業者に公知であり、そし

10

20

30

40

50

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

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

種々のHCV抗原の組換え生成が記載されている。例えば、Houghtonら、米国特許第5,350,671号;Chienら、J. Gastroent. Hepatol. (1993)8:S33-39;Chienら、国際公開番号WO93/00365;Chien, D. Y., 国際公開番号WO94/01778を参照のこと。

【0113】

(免疫診断アッセイ)

一旦生成されると、上記の抗コア抗体およびNS3/4a抗原は、本イムノアッセイにおける使用のために適切な固体支持体上に配置される。本発明の目的のための固体支持体は、不溶性マトリクスである任意の物質であり得、そして剛性または半剛性の表面を有し得

10

20

30

40

50

る。例示的な固体支持体としては、ニトロセルロースのような基材（例えば、膜またはマイクロタイターウェル形態）；ポリ塩化ビニル（例えば、シートまたはマイクロタイターウェル）；ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズまたはマイクロタイタープレート）；ポリフッ化ビニリデン；ジアゾ化紙；ナイロン膜；活性化ビーズ、磁気応答性樹脂などが挙げられるがこれらに限定されない。特定の支持体としては、プレート、ペレット、ディスク、キャピラリー、中空繊維、針、ピン、固体繊維、セルロースビーズ、孔 - ガラスビーズ、シリカゲル、ジビニルベンゼンと必要に応じて架橋したポリスチレンビーズ、グラフトされたコポリ（*c o - p o l y*）ビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、N - N' - ビス - アクリロイルエチレンジアミンと必要に応じて架橋したジメチルアクリルアミドビーズ、および疎水性ポリマーでコーティングしたガラス粒子が挙げられる。

10

【0114】

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

【0115】

20

1つの状況において、固体支持体を、分子が十分に支持体に固定されるような適切な結合条件下で、まずHCV抗コア抗体およびNS3/4aエピトープ（本明細書中で集合的に「固相成分」と呼ばれる）、および必要に応じて1つ以上のMEFAと反応させる。時々、支持体への固定は、より優れた固相結合特性を有するタンパク質への抗原および/または抗体を最初に結合することによって強化され得る。適切なカップリングタンパク質としては、ウシ血清アルブミン（BSA）を含む血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシニアン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、オボアルブミンのような高分子、および当業者に周知の他のタンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。支持体に分子を結合させるために使用され得る他の試薬としては、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどが挙げられる。このような分子および抗原にこれらの分子を結合させる方法は、当業者に周知である。例えば、Brinkley, M. A. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 2 - 13; Hashidaら (1984) *J. Appl. Biochem.* 6: 56 - 63; ならびにAnjaneyuluおよびStaros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30: 117 - 124を参照のこと。

30

【0116】

固体支持体を固相成分と反応させた後、任意の非固定固相成分を、洗浄することによって支持体から取り除き、次いで支持体結合成分を、適切な結合条件下で、HCV抗体および抗原（本明細書中で集合的に「リガンド分子」と呼ばれる）を含むことが疑われている生物学的サンプルと接触させる。任意の結合していないリガンド分子を除去するために洗浄した後、支持体に結合した抗コア抗体と異なるエピトープに対して指向する第2の抗コア抗体を、適切な結合条件下で添加する。添加される抗コア抗体は、上記のように、検出可能な標識を含み、そして支持体に結合した抗コア抗体と反応したサンプル中に存在し得る任意のコア抗原を結合するように作用する。NS3/4Aエピトープと順番に反応したサンプル中に存在する抗体と反応し得る1つ以上の抗原もまた、添加される。上記で説明したように、抗原は、代表的に、HCVポリタンパク質のNS3領域から誘導され、特に、HCVのc33c領域から誘導される。これらから誘導されるエピトープの領域の説明に関しては、Houghtonら、米国特許第5,350,671号; Chienら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1989) 89: 10011 - 10015; 国際公

40

50

開番号W O 9 3 / 0 0 3 6 5 ; ならびに、一般に所有された、許可された米国特許出願第 0 8 / 4 0 3 , 5 9 0 および 0 8 / 4 4 4 , 8 1 8 を参照のこと。この抗原に対する標識抗体もまた、添加される。従って、抗体は、サンプル中に存在する抗 N S 3 抗体と反応した抗原に結合する。この目的のために、c 3 3 c エピトープは、c 3 3 c とヒトスーパーオキシドジスムターゼ (h S O D) との間の融合として好都合に提供され、例えば、H o u g h t o n ら、米国特許第 5 , 3 5 0 , 6 7 1 号に記載される方法によって組換え産生され得る。ヒト S O D のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、公知であり、H a l l e w e l l ら、米国特許第 5 , 7 1 0 , 0 3 3 号に報告される。従って、ヒト S O D に対する標識抗体は、N S 3 / 4 a エピトープ、このエピトープと反応するサンプル中の任意の抗体、およびサンプル中のその抗体と順に結合するポリペプチドの間で形成される複合体の存在を検出するために使用され得る。

10

【 0 1 1 7 】

M E F A が固体支持体上に存在する場合、M E F A 上に存在する抗原に結合する生物学的サンプル由来の抗体と反応性である 1 つ以上のさらなる抗原もまた、アッセイに添加され得る。この状況において特に有用なことは、H C V のコア領域由来の抗原であり、より詳細には、H C V ポリタンパク質の 1 1 9 N 末端コアアミノ酸を含む c 2 2 抗原由来であることである。c 2 2 由来の 1 つの特定の抗原は、ポリタンパク質のアミノ酸 L y s ₁₀ ~ S e r ₉ , ならびに通常存在する A r g 4 7 の欠失および 4 4 位に T r p の代わりに L e u を含む、c 2 2 k s Δ 4 7 - L 4 4 W である。上記の c 3 3 c エピトープに関して、この抗原は、h S O D およびヒト S O D に対するその標識抗体との融合として提供され、サンプル中に存在する抗体と、N S 3 / 4 a エピトープおよび / または M E F A との間に形成される複合体 (これらの複合体はまた、H C V 抗原 (例えば、c 3 3 c および c 2 2) と結合する) の存在を検出するために使用され得る。

20

【 0 1 1 8 】

より詳細には、E L I S A 方法を、使用し得、ここで、マイクロタイタープレートのウェルを、固相成分と接触させる。次いで、リガンド分子を含むかまたは含むことが疑われる生物学的サンプルを、コーティングされたウェルに添加する。リガンド - 分子の固定化された固相成分への結合を可能にするのに十分なインキュベーション期間の後、プレートを洗浄して、未結合の部分を除去し得、そして、検出可能に標識された 2 次結合分子 (標識抗コア抗体) 、N S 3 エピトープ含有分子、および N S 3 エピトープ含有部分に対する抗体を、添加される。これらの分子を、任意の捕獲サンプル抗原および抗体と反応させ、プレートを洗浄し、そして標識抗体の存在が、当該分野で周知の方法を用いて検出される。

30

【 0 1 1 9 】

上記のアッセイ試薬 (抗体および抗原を有するイムノアッセイ固体支持体、ならびに捕獲サンプルと反応する抗体および抗原を含む) をまた、適切な指示書および他の必要な試薬と共にキット中に提供して、上記のようにイムノアッセイを実行し得る。このキットはまた、使用する特定のイムノアッセイに依存して、適切な標識ならびに他のパッケージングされた試薬および材料 (すなわち、洗浄緩衝液など) を含み得る。標準的なイムノアッセイ (例えば、上記に記載されるもの) を、これらのキットを使用して実行し得る。

【 0 1 2 0 】

40

(I I I . 実験)

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

【 0 1 2 1 】

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

【 0 1 2 2 】

(実施例 1)

(H C V 抗原 / 抗体の組み合わせイムノアッセイ)

本発明の H C V 抗原 / 抗体の組み合わせイムノアッセイを、セロコンバージョン検出限界

50

を試験し、そしてこれらの限界を以下のような他の市販で入手されるアッセイに対する限界と比較するために、他のHCVアッセイと比較した。

【0123】

(A. 材料および方法)

(血液サンプル) 市販のヒト血液サンプルのパネルを使用した。このようなパネルは、例えば、Boston Biomedica, Inc., West Bridgewater, MA (BBI); Bioclinical Partners, Franklin, MA (BCP); およびNorth American Biologics, Inc., Boca Raton, FL (NABI) から入手可能である。表5および6に示した日は、血液を被験体から収集した日である。

10

【0124】

(モノクローナル抗体) モノクローナル抗体c11-3、c11-7およびc11-14を、Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey から入手した。c11-3およびc11-7抗体は、コアのN末端部分(HCV1ポリペプチドに対する番号付けでアミノ酸10~53)に対して指向する。c11-14モノクローナル抗体は、コアのC末端部分(HCV1ポリペプチドに対する番号付けでアミノ酸120~130)に対して指向する。c11-14抗体は、標準的な手順を用いて西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)に結合体化されていた。

【0125】

モノクローナル抗体5A-3は、SODのアミノ酸1~65に対して指向された抗SOD抗体であり、標準的な技術を使用して作製された。この抗体は、上記のようにHRPに結合体化されていた。

20

【0126】

(B. 抗原)

c33c抗原(266アミノ酸、HCV1ポリタンパク質のアミノ酸1192~1457)を、5-1-1抗原の合成について記載された方法(Chooら、Science(1989)244:359-362)によって、E. coli中で内部SOD融合ポリペプチドとして発現させた。組換え抗原を、Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. (1989)89:10011-10015に記載されるように精製した。SOD-c33cの生産手順については、Houghtonら、米国特許第5,350,671号もまた、参照のこと。

30

【0127】

本アッセイに使用されるNS3/4aエピトープは、図3に特定される配列を有するコンホメーションエピトープである。

【0128】

(C. イムノアッセイ形式)

Abbott PRISMアッセイ(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)は、市販され、そして抗体に基づく検出アッセイである。このアッセイを、製造者らの指示書を用いて実行した。

【0129】

ORTHO HCV バージョン 3.0 ELISA試験システム(本明細書中、Ortho 3.0アッセイと称する、Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)は、抗体に基づく検出アッセイである。このアッセイを、製造者らの指示書を用いて実行した。

40

【0130】

Roche Amplicorアッセイ(Roche, Pleasant, CA)は、市販のPCRに基づくアッセイである。このアッセイを、製造者らの指示書を用いて実行した。

【0131】

Gen-Probe TMAアッセイ(San Diego, CA)は、市販の転写媒介

50

増幅アッセイである。このアッセイを、製造者らの指示書を用いて実行した。

【0132】

Ortho抗原アッセイ(Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey)は、抗原に基づく検出アッセイである。このアッセイを、製造者らの指示書を用いて実行した。

【0133】

本HCV抗原/抗体の組み合わせイムノアッセイを、以下のように実行した。1×リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)(pH7.4)中、各々4mg/mLの精製モノクローナル抗体C11-7とC11-3とを合わせ、そしてウェルを混合した。90ngのNS3/4a組換え抗原を、同じコーティング緩衝液に添加した。この溶液は、コーティング前に30分間混合した。200μLの上記の溶液を、96ウェル Costar 培地結合マイクロタイタープレート(Corning, Inc.)へ各ウェルにつき添加した。プレートを、15~30で16~24時間インキュベートした。プレートを、dH₂Oを用いて2回洗浄し、続いて、300μL/ウェル 後コーティング緩衝液(1% ウシ血清アルブミン(BSA), 1×PBS)を用いて1時間洗浄し、そして300μL/ウェルの安定緩衝液(1×PBS, 1% BSA, マンニトール、ポリエチレングリコール(PEG), ゼラチン)を用いて1時間洗浄した。プレートを吸引し、そして、凍結乾燥機中、4で24時間乾燥させた。プレートを、乾燥剤と一緒に小袋に入れた。

【0134】

抗原/抗体の組み合わせイムノアッセイを実行するために、100μLの増強溶解緩衝液(1% N-ラウリルサルコシン、0.65M NaCl、50mg/mL マウスIgG試験等級(Sigma, St. Louis, MO)、1% スルフヒドリル改変BSA(Bayer)、0.1% カゼイン)を、このプレートに添加した。次いで、100μLのサンプルを、添加した。これを、振盪器上、40で1時間インキュベートした。プレートを、Ortho Plate Washer上、1×PBS、0.1% Tween-20を用いて6回洗浄した。200μLの結合溶液(250ng/アッセイ SOD-c33c抗原を有する1:75希釈c11-14-HRP、ならびにSOD抽出物を含まないHCV3.0サンプル希釈物中の1:5000希釈マウス抗SOD-HRP(Ortho HCV バージョン 3.0 ELISA試験システム(Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey))(全て、添加の30分前に調製した)。この溶液を、振盪しながら40で45分間インキュベートした。これを、上記のように6回洗浄し、そして200μLの基質溶液(1OPD錠剤/10mL)を、添加した。OPD錠剤は、西洋ワサビペルオキシダーゼ反応の色素発生のためのo-フェニレンジアミンジハイドロクロライドおよび過酸化水素を含み、そしてSigma, St. Louis, MOから市販されている。これを、30分間、15~30で暗闇中インキュベートした。この反応を、50mL 4N H₂SO₄の添加によって停止させ、そしてプレートを、コントロールとしての690nmでの吸光度に対して、492nmで読み取った。

【0135】

(D. 結果)

種々のアッセイの結果を、表5および表6に示し、これは示したようにHCV感染に曝露された血液サンプルで実施した2つの別々の実験を示す。斜線領域は、ウイルスの検出を示す。以下に示されるように、Chironの組み合わせ抗原/抗体アッセイは、全てのサンプル中でセロコンバージョンを検出し、一方全ての他の抗体および抗原ベースのアッセイは、少なくとも1つのサンプルにおいてセロコンバージョンを検出することに失敗した。特に、いずれの抗体ベースのアッセイも、少なくとも18日目までセロコンバージョンを検出しなかった(表5)。表6は、いずれの抗体ベースのアッセイも、HCV感染の存在を22日目で検出しなかったことを示す。さらに、Ortho抗原ベースのアッセイは、85日目からセロコンバージョンの検出に失敗した。

【0136】

従って、上記の結果に基づいて、新規の組み合わせ抗体 / 抗原アッセイが、他の従来の抗体および抗原ベースのアッセイを用いて得られる偽陰性数を減少させることは明らかである。

【 0 1 3 7 】

【 表 5 】

表 5 HCV セロコンバージョン						
日数	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen-Probe TMA	Ortho Ag	Chiron Ag/Ab
0	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$	9.25	18.6	2.8
4	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$	9.29	19.0	3.1
7	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$	9.52	22.3	1.5
13	0.3	0.1	$>5 \times 10^5$	9.59	26.2	1.7
18	1.3	0.4	$>5 \times 10^5$	9.70	15.9	1.2
21	2.2	1.0	$>5 \times 10^5$	9.39	11.3	1.5
164	4.2	4.4	4×10^4	9.28	0.11	2.5

【 0 1 3 8 】

【 表 6 】

表 6 HCV セロコンバージョン						
日数	Abbott PRISM	Ortho 3.0	Roche Amplicor	Gen-Probe TMA	Ortho Ag	Chiron Ag/Ab
0	0.1	0.0	BLD		0.11	0.5
13	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$		44.0	3.0
20	0.1	0.0	$>5 \times 10^5$		24.2	1.3
22	0.3	0.0	$>5 \times 10^5$		29.2	1.6
85	5.4	4.7	BQR		0.06	1.1
131	4.3	4.7	BQR		0.09	1.0
135	4.6	4.7	3×10^3		0.09	1.2
138	5.5	4.7	BLD		0.08	1.2
146	5.9	4.7	BLD		0.11	2.1
152	5.2	4.7	BQR		0.07	1.8

(実施例 2)

(Thr から Pro および Ser から Ile への置換を伴う NS 3 / 4 a コンホメーショ

10

20

30

40

50

ンエピトープの産生)

NS3/4aのコンホメーションエピトープを以下の通りに得た。このエピトープは、図4A~4Dで指定した配列を有し、ネイティブな配列とは403位(HCV-1全長配列のアミノ酸1428)および404位(HCV-1全長配列のアミノ酸1429)で異なる。特に、ネイティブな配列の1428位で通常生じるThrはProへと変異しており、そしてネイティブな配列の1429位で生じるSerは、Ileへと変異している。

【0139】

特に、用いられる酵母発現ベクターは、上記のpBS24.1であった。このイムノアッセイにおいて用いられる代表的なNS3/4aエピトープをコードするプラスミドp d . h c v 1 a . n s 3 n s 4 a P I を、以下の通りに作製した。二工程手順を用いた。最初に、以下のDNA片を一緒に連結した：(a) 5' HindIIIクロニング部位、続いて配列ACAAAACAAA、イニシエーターATG、およびアミノ酸1027で始まりアミノ酸1046のBglI部位へと続くHCV1aについてのコドンを提供する合成オリゴヌクレオチド；(b) pAcHLTns3ns4aPI由来の683bpのBglI-Clai制限フラグメント(アミノ酸1046~1274をコードする)；ならびに(c) HindIIIおよびClaiで消化し、脱リン酸化し、そしてゲル精製したpSP72ベクター(Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL登録番号X65332)。プラスミドpAcHLTns3ns4aPIを、BD Pharmingen(San Diego, CA)から市販されているバキュロウイルス発現ベクターであるpAcHLTから誘導した。特に、pAcHLT EcoRI-PstIベクターならびに以下のフラグメントを調製した：HCV-1ゲノムのアミノ酸1027~1336に対応する935bpのEcoRI-AlwNI；HCV-1ゲノムのアミノ酸1336~1419に対応する247bpのAlwNI-SacII；HCV-1ゲノムのアミノ酸1449~1509に対応する175bpのHinfI-BglI；HCV-1ゲノムのアミノ酸1510~1711に対応する619bpのBglI-PstI+転写終結コドン。HCV-1ゲノムのアミノ酸1420~1448に対応し、PI変異(Proへと変異させたThr-1428、Ileへと変異させたSer-1429)を含む、合成によって作製した91bpのSacII-HinfIフラグメントを上記の175bpのHinfI-BglIフラグメントおよび619bpのBglI-PstIフラグメントと連結し、そしてSacIIおよびPstIで消化したpGEM-5Zf(+)ベクター中にサブクローン化した。pGEM-5Zf(+)は、市販のE. coliベクター(Promega, Madison, WI, GenBank/EMBL登録番号X65308)である。コンピテントなHB101細胞の形質転換、個々のクローンのミニスクリーニング分析および配列確認後、pGEM5.PIクローン2由来の885bpのSacII-PstIフラグメントをゲル精製した。このフラグメントを、上記のEcoRI-AlwNI 935bpフラグメント、AlwNI-SacII 247bpフラグメントおよびpAcHLT EcoRI-PstIベクターと連結した。得られた構築物を、pAcHLTns3ns4aPIと命名した。

【0140】

上記の連結混合物をHB101コンピテント細胞中に形質転換し、そして100μg/mlアンピシリンを含有するLuria寒天プレートにプレーティングした。個々のクローンのミニプレップ分析によって推定のポジティブを同定し、そのうちの2つを増幅した。pSP72 1aHCのクローン番号1およびクローン番号2についてのプラスミドDNAを、Qiagen Maxiprepキットを用いて調製し、そして配列決定した。

【0141】

次いで、以下のフラグメントを一緒に連結した：(a) pSP72 1aHC #1由来の761bpのHindIII-Claiフラグメント(pSP72.1aHCを、以下を一緒に連結することによって作製した：HindIIIおよびClaiで消化したpSP72、5' HindIIIクロニング部位を提供する合成オリゴヌクレオチド、続いて配列ACAAAACAAA、開始コドンATGおよびアミノ酸1027で始まり、アミノ

10

20

30

40

50

酸1046でのBglII部位へと続く、HCV1aについてのコドン、ならびにpAcHLTns3ns4aPI由来の683bpのBglII-ClaI制限フラグメント(アミノ酸1046~1274をコードする);(b)酵母ハイブリッドプロモーターADH2/GAPDHについての1353bpのBamHI-HindIIIフラグメント;(c)pAcHLTns3ns4aPI由来の1320bpのClaI-SalIフラグメント(Thr1428がProへと変異し、そしてSer1429がIleへと変異したHCV1aアミノ酸1046~1711をコードする);ならびに(d)BamHIおよびSalIで消化し、脱リン酸化し、そしてゲル精製したpBS24.1酵母発現ベクター。連結混合物をコンピテントなHB101中へと形質転換し、そして100μg/mlアンピシリンを含有するLuria寒天プレートにプレーティングした。個々のコロニーのミニプレップ分析によって、予想された3446bpのBamHI-SalI挿入物(ADH2/GAPDHプロモーター、イニシエーターコドンATGおよびアミノ酸1027~1711のHCV1a NS3/4a(図4A~図4Dのアミノ酸1~686として示す)(Thr1428(図4A~4Dのアミノ酸位置403)がProへと変異し、そしてSer1429(図4A~4Dのアミノ酸位置404)がIleへと変異している)から構成される)を有するクローンを同定した。この構築物を、pd.HCV1a.ns3ns4aPIと命名した(図5を参照のこと)。

10

【0142】

S.cerevisiae株AD3をpd.HCV1a.ns3ns4aPIで形質転換し、そして1つの形質転換体を、培地中のグルコースの枯渇後の発現についてチェックした。組換えタンパク質は、クマシーブルー染色によって検出し、そしてNS3のヘリカーゼドメインに対するポリクローナル抗体を用いて免疫ブロット分析によって確認したところ、酵母において高いレベルで発現された。

20

【0143】

(実施例3)

(NS3/4aコンホメーションエピトープの精製)

NS3/4aコンホメーションエピトープを以下の通りに精製した。NS3/4aエピトープを発現する、上記由来のS.cerevisiae細胞を、上記の通りに収集した。この細胞を溶解緩衝液(50mM Tris(pH8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μMペプスタチン、1μMロイペプチン)中に懸濁し、そして1:1:1の細胞:緩衝液:0.5mmガラスビーズの比でガラスビーズを用いて、Dyno-Mill(Wab Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)またはそれに相当する装置において溶解した。溶解産物を4で30100×gで30分間遠心分離し、そして不溶タンパク質画分を含むペレットを洗浄緩衝液(6ml/g出発細胞ペレット重量)に添加し、そして室温で15分間揺り動かした。洗浄緩衝液は、50mM NaPO₄(pH8.0)、0.3M NaCl、5mM β-メルカプトエタノール、10%グリセロール、0.05%オクチルグルコシド、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μMペプスタチン、1μMロイペプチンからなっていた。細胞破片を、30100×gで30分間、4での遠心分離によって取り出した。上清を捨て、そしてペレットを保持した。

30

40

【0144】

タンパク質を、このペレットから以下の通りに抽出した。6ml/gの抽出緩衝液を添加し、そして室温で15分間揺り動かした。この抽出緩衝液は、50mM Tris(pH8.0)、1M NaCl、5mM β-メルカプトエタノール、10%グリセロール、1mM EDTA、1mM PMSF、0.1μMペプスタチン、1μMロイペプチンからなっていた。これを、30100×gで30分間、4で遠心分離した。上清を保持し、そして以下の式を用いて17.5%になるように硫酸アンモニウムを添加した:上清の容積(ml)×x%硫酸アンモニウム/(1-x%硫酸アンモニウム)=上清へと添加される4.1M飽和硫酸アンモニウムのml。氷上で攪拌しながら硫酸アンモニウムを滴下し、そして溶液を氷上で10分間攪拌した。溶液を17700×gで30分間、4で遠

50

心分離し、そしてペレットを保持し、そして2 ～ 8 で48時間まで保存した。

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

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

【0148】

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

【0149】

(実施例4)

(競合研究)

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

【0150】

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

イングしたプレートに移し、そして37 で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、そして以下のようにしてアッセイした。

【0151】

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

10

【0152】

結果を表7に示す。4列目に示される%阻害結果は、3列目 - { (2 列目 / 3 列目) $\times$ 1 0 0 } として算出する。見られ得る通り、これらのデータは、N S 3 4 a が、初期セロコンバージョン抗体により中和され、そして c 2 0 0 は中和されないことを示す。P H V 9 1 4 - 5 c 3 3 c 初期セロコンバージョンパネルのメンバーにおける抗体が、プレート上にコーティングされた N S 3 4 a と反応する場合、強いシグナルを達成した。c 2 0 0 抗原は、これらの抗体により中和されなかった。このことは、表7の上パネルに示される。N S 3 4 a を P H V 9 1 4 - 5 サンプルと混合した場合、それは中和され、従って、マイクロプレート上にコーティングされた N S 3 4 a と反応する抗体は、サンプル中に存在しなかった。これらのデータは、N S 3 4 a が、c 2 0 0 により検出される抗体とは異なるクラスの抗体を検出し得ることを示す。

20

【0153】

【表7】

c200抗原と比較した、初期c33cセロコンバージョンパネルにおけるNS3/4a抗原検出の差を示す競合研究

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

表 7

(実施例5)

(NS3/4aコンホメーションエピトープの安定性の研究)

アッセイの性能に対するNS3/4aエピトープの安定性の役割を評価するために、以下の研究を実施して、室温での時間に対するNS3/4aの免疫反応性を決定した。小アリコートストックNS3/4aを、表8に示される間隔で、室温に静置し、次いで凍結させた。全てのバイアルを同時にコーティングし、そして2つの初期NS3セロコンバージョンパネルに対して試験した。

【0154】

表8に見られる通り、NS3/4aストックは安定ではなく、そして時間と共に免疫反応性が減少する。さらに、NS3/4aのコンホメーションを維持することは、免疫反応性のために必須である。

【0155】

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

【 0 1 5 6 】

【表 8】

時間(時間)	0	6	21.4	29	35.5	46	52	コントロール 参照 s/co
PHV 904-1	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 904-2	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 904-3	s/co 0.0	s/co 0.3	s/co 0.1	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 904-4	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.2	s/co 0.1	s/co 0.1	s/co 0.1	s/co 0.1	0.1
PHV 904-5	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.7	s/co 0.6	s/co 0.3	s/co 0.2	s/co 0.3	0.3
PHV 904-6	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.6	s/co 0.5	s/co 0.6	0.6
PHV 904-7	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.5	s/co 0.7	0.7
PHV 914-1	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 914-2	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 914-3	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 914-4	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 914-5	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 914-6	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 914-7	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
PHV 914-8	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	s/co 0.0	0.0
酵素 RFU/分	8.75	4.14	3.08	1.88	1.75	1.75	0.75	

表 8

(実施例 6)

(変性 NS 3 / 4 a に対する NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープの免疫反応性)

上記のように生成された NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープの免疫反応性を、 NS 3 / 4 a コンホメーションエピトープ調製物に最終濃度 2 % で SDS を添加することにより変性させた NS 3 / 4 a と比較した。変性 NS 3 / 4 a および立体構造性の NS 3 / 4 a を、上記のようにマイクロタイタープレート上にコーティングした。c 2 0 0 抗原 (H e p a t o l o g y (1 9 9 2) 1 5 : 1 9 - 2 5 、 O R T H O H C V V e r s i o n 3 . 0 E L I S A T e s t S y s t e m , O r t h o - C l i n i c a l D i a g n o s t i c s , R a r i t a n , N e w J e r s e y において利用可能) もまた、マイクロタイタープレート上にコーティングした。処方物中の還元剤 (D T T) および界面活性剤 (S D S) の存在に起因して非立体構造性であると推測される c 2 0 0 抗原を、比較として用いた。

【 0 1 5 7 】

免疫反応性を、 2 つの初期 H C V セロコンバージョンパネル P H V 9 0 4 および P H V 9 1 4 (B o s t o n B i o m e d i c a , I n c . , W e s t B r i d g e w a t e r , M A から市販されているヒト血液サンプル) に対して試験した。これらの結果を表 9 に示す。これらのデータは、変性または直鎖形態の NS 3 / 4 a (および c 2 0 0) が、

10

20

30

40

50

表 10				
プレート				
		NS3/4a	dNS3/4a	c200
モノクローナル		OD	OD	OD
4B9/E3	1:100	1.820	0.616	0.369
	1:1000	1.397	0.380	0.246
	1:10000	0.864	0.173	0.070
	1:20000	0.607	0.116	0.085
5B7/D7	1:100	2.885	0.898	0.436
	1:1000	2.866	0.541	0.267
	1:10000	1.672	0.215	0.086
	1:20000	1.053	0.124	0.059
1A8/H2	1:100	1.020	0.169	0.080
	1:1000	0.921	0.101	0.043
	1:10000	0.653	0.037	0.013
	1:20000	0.337	0.027	0.011

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

【図面の簡単な説明】

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

【図2】 図2は、本発明の代表的な抗体／抗原組合せアッセイの模式図である。

【図3】 図3は、本発明のアッセイにおける使用のための代表的なNS3/4aコンホメーション抗原のアミノ酸配列を示す。182位の太文字のアラニンは、この位置に通常存在するネイティブなセリンに置換される。

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

【図5】 図5は、pd.HCV1a.ns3ns4aPIの構築の模式図である。

【図6】 図6は、MEFA 12の模式的表現である。

【図7】 図7A～7Fは、MEFA 12のDNAおよび対応するアミノ酸配列を示す。

【図8】 図8は、MEFA 12を使用する、本発明の代表的なイムノアッセイの模式図である。

【 ㄨ 4 B 】

200															
P	P	V	V	P	Q	S	F	Q	V	A	H	L	H	A	
CCA	CCA	GTA	GTG	CCG	CAC	AGC	TTC	CAG	GTG	GCT	CAC	CTC	CAT	GCT	
210															
P	T	G	S	G	K	A	S	T	K	V	C	A	Y	A	
CCC	ACA	GGC	AGC	GGC	AAA	AGC	ACC	AAG	GTC	GCT	CCT	GCA	TAT	GCA	
220															
A	Q	G	Y	K	V	L	V	L	N	P	S	V	A	A	
GCT	CAG	GCT	TAT	AGC	GTA	CTA	GTA	CTC	AAC	CCC	TCT	GTT	GCT	GCA	
230															
A	C	L	G	F	G	A	Y	M	S	K	A	H	G	I	D
ACA	CTG	GCT	TTT	GGT	GCT	TAC	ATG	TCC	AAG	GCT	CAT	GGG	ATC	GAT	GAT
240															
P	N	I	R	T	G	V	R	T	I	T	T	G	S	P	
CCT	AAC	ATC	AGC	ACC	GGG	GTG	AGA	ACA	ATT	ACC	ACT	GGC	AGC	CCC	
250															
I	T	Y	S	AC	Y	G	K	F	L	A	D	G	G	C	
ATC	ACG	TAC	TCC	AAC	TAC	GGC	ATG	TTC	CTT	GCC	GAC	GGG	GGC	TGC	
260															
270															
A	C	T	Y	S	AC	Y	G	K	F	L	A	D	G	G	C
ATC	ACG	TAC	TCC	AAC	TAC	GGC	ATG	TTC	CTT	GCC	GAC	GGG	GGC	TGC	
280															
290															
S	G	G	A	Y	D	X	I	I	I	D	E	C	H	L	
TGG	GGG	GGC	CTT	TAT	GAC	ATA	ATA	ATT	TGT	GAC	GAG	TGC	CAC	TCC	
300															
T	D	A	T	S	I	L	G	T	G	T	V	L	D	O	
ACG	GAT	GCC	ACA	TCC	ATC	TTG	GGC	ATT	GGC	ACT	GTC	CTT	GAC	CNA	
310															
320															
A	R	T	A	G	A	R	L	V	V	L	C	T	A	T	
GCA	GAG	ACT	GCA	GGG	GCG	AGA	CTG	GTT	GTG	CTC	GCC	ACC	GAT	ACC	
330															
P	P	G	S	V	T	V	P	H	P	N	I	R	E	V	
CCT	CCG	GGC	TGC	TTG	ACT	GTG	CCC	CAT	CCC	ACC	ATC	GAG	GAG	GTT	
340															
350															
A	L	S	T	T	G	E	I	F	P	F	Y	G	K	A	I
GCT	CTG	ACC	ACC	AGC	GGG	AGG	ATC	CCT	TTT	TGC	GAG	AGC	GCT	ATC	
360															
P	L	E	V	I	K	G	G	R	H	L	I	F	C	H	
CCC	CTC	GAA	GTA	ATC	AAG	GCG	GGG	AGA	CAT	CTC	ATC	TTC	TGT	CAT	
370															
380															
S	K	A	K	K	C	D	E	L	A	A	K	L	V	A	T
TCA	AAG	AAG	AAG	TGC	GAC	GAA	CTC	GCC	GCA	AAG	CTG	GTC	GCA	TTC	

FIG. 4B

【 図 4 C 】

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

410
I C P P I G D V V V V A G A C T D A L
ATC CGC CCC ATC GGC GAT GTT CTC GTC GTG GCA ACC GAT GCG CTT

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

440
A C G T C Q S V D F A S L D T P F
ACG TGT GTC ACC CAG GCA GTC GAT TTC GAC CAC GCT ACC TTC

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

470
Q R R G R G R T G C G G G K P G I Y R
CAA CGT CCG GCG AGG ACT GCG AGC GGG AAG CCA GCG ATC TAC AGA

490
F V A P G E R P S G M F P D S S
TTT GTG GCA CCG GGG GCG CCG CCG TCC GGC ATT GTG GAC TCG TCC

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

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

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

540
G T T T G L T H I D A H F L S Q
GTC TTT TCA GGC CTC ACT CAT ATA GAT GCC CAC TTT CTA CCG CAG

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

570
A C C V C A R A Q A P P C S W D
GCC ACC GTG TGC GCG ACG GCT CAA GCC CCT CCC CCA TCG SGT GAC

580

FIG. 4C

【 ㊦ 4 D 】

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

FIG. 4D

【 図 5 】

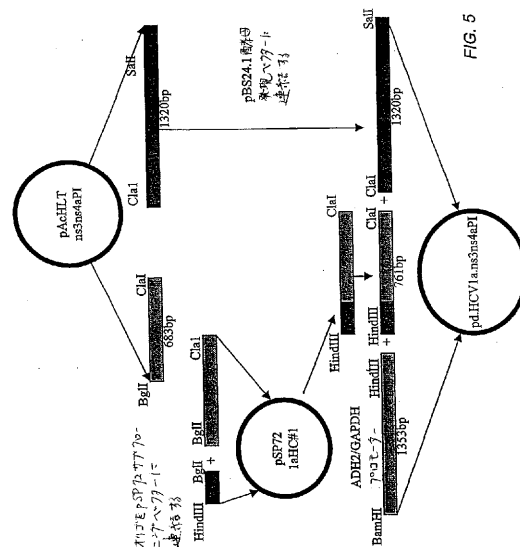


FIG. 5

【図 6】

MEFA 12 抗原構築物

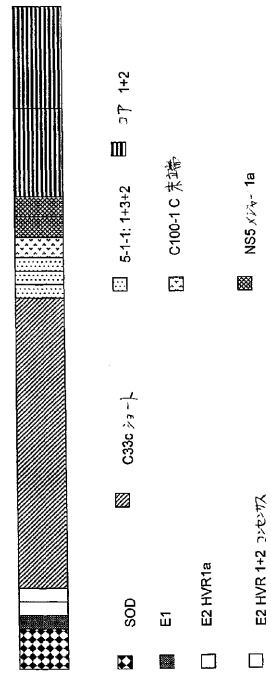


FIG. 6

【図 7 A】

1 10
M A T K A V C V L K G D G P V
ATG GCT ACA AAG GCT GTT TGT GTT TTG AAG GGT GAC GGC CCA GTT 45

20 30
Q G I I N F E Q K E S N G P V
CAA GGT ATT ATT AAC TTC GAG CAG AAG GAA AGT AAT GGA CCA GTG 90

40
K V W G S I K G L T E G L H G
AAG GIG TGG GGA AGC ATT AAA GGA CTG ACT GAA GGC CTG CAT GGA 135

50 60
P H V H E F G D N T A G C T S
TTC CAT GTT CAT GAG TTT GGA GAT AAT ACA GCA GGC TGT ACC AGT 180

70
A G P H F N P L S T R G C N C
GCA GGT CCT CAC TTT AAT CCT CTA TCC ACG CGT GGT TGC AAT TGC 225

80 90
S I Y P G H I T G H R M A W K
TCT ATC TAT CCC GGC CAT ATA ACG GGT CAC GGC ATG GCA TGG AAG 270

100
L G S A A R T T S G F V S L F
CTT GGT TCC GCC GCC AGA ACT ACC TCG GGC TTT GTC TCC TTG TTC 315

110 120
A P G A K Q N E T H V T G G A
GCC CCA GGT GCC AAA CAA AAC GAA ACT CAC GTC ACG GGA GGC GCA 360

130
A A R T T S G L T S L F S P G
GCC GCC CGA ACT ACG TCT GGG TTG ACC TCT TTG TTC TCC CCA GGT 405

FIG. 7A

【図 7 B】

140 150
A S Q N I O L I T S T D N S S
GCC AGC CAA AAC ATT CAA TTG ATT ACT AGT ACG GAT AAC TCC TCT 450

160
P P V V P Q S F Q V A H L H A
CCA CCA GTA GTG CCC CAG AGC TTC CAG GTG GCT CAC CTC CAT GCT 495

170 180
P T G S G K S T K V P A A Y A
CCC ACA GGC AGC GGC AAA AGC ACC AAG GTC CCG GCT GCA TAT GCA 540

190
A Q G Y K V L V L N P S V A A
GCT CAG GGC TAT AAG GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GTT GCT GCA 585

200 210
T L G F G A Y M S K A H G I D
ACA CTG GGC TTT GGT GCT TAC ATG TCC AAG GCT CAT GGG ATC GAT 630

220
P N I R T G V R T I T T G S P
CCT AAC ATC AGG ACC GGG GTG AGA ACA ATT ACC ACT GSC AGC CCC 675

230 240
I T Y S T Y G K F L A D G G C
ATC ACG TAC TCC ACC TAC GGC AAG TTC CTT GCC GAC GGC GGG TGC 720

250
S G G A Y D I I I C D E C H S
TCG GGG GGC GCT TAT GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CAC TCC 765

260 270
T D A T S I L G I G T V L D Q
ACG GAT GCC ACA TCC ATC TTG GGC ATC GGC ACT GTC CTT GAC CAA 810

280
A E T A G A R L V V L A T A T
GCA GAG ACT GCG GGG GCG AGA CTG GTT GTG CTC GCC ACC GCC ACC 855

290 300
P P G S V T V P H P N I E E V
CCT CCG GGC TCC GTC ACT GTG CCC CAT CCC AAC ATC GAG GAG GTT 900

FIG. 7B

【図 7 C】

310
A L S T T G E I P F Y G K A I
GCT CTG TCC ACC ACC GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AAG GCT ATG 945

320 330
P L R V I K G G R H L I F C H
CCC CTC GAA GTA ATC AAG GGG GGG AGA CAT CTC ATC TTC TGT CAT 990

340
S K K K C D E L A A K L V A L
TCA AAG AAG AAG TGC GAC GAA CTC GCC GCA AAG CTG GTC GCA TTG 1035

350 360
G I N A V A Y Y R G L D V S V
GGC ATC AAT GCC GTG GCC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GIG TCC GTC 1080

370
I P T S G D V V V V A T D A L
ATC CCG ACC AGC GGC CAT GTT GTC GTC GTG GCA ACC GAT GCC CTC 1125

380 390
M T G Y T G D F D S V I D C N
ATG ACC GGC TAT ACC GGC GAC TTC GAC TCG GTG ATA GAC TGC AAT 1170

400
T C A C S G K P A I I P D R E
ACG TGT GCA TGC TCC GGG AAG CCG GCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA 1215

410 420
V L Y R E F D E M E E C S Q H
GTC CTC TAC CGA GAG TTC GAT GAG ATG GAA GAG TGC TCT CAG CAC 1260

430
L P Y I E Q G M M L A E Q F K
TTA CCG TAC ATC GAG CAA GGG ATG ATG CTC GCC GAG CAG TTC AAG 1305

440 450
Q K A L G L S R G G K P A I V
CAG AAG GCC CTC GGC CTC TCG CGA GGG GGC AAG CCG GCA ATC GTT 1350

460
P D K E V L Y Q Q Y D E M E E
CCA GAC AAA GAG GTG TTG TAT CAA CAA TAC GAT GAG ATG GAA GAG 1395

FIG. 7C

【図 7 D】

470 480
 C S Q A A P Y I E Q A Q V I A
 TGC TCA CAA GCT GCC CCA TAT ATC GAA CAA GCT CAG GTA ATA GCT 1440
 490
 H Q F K E K V L G L I D N D Q
 CAC CAG TTC AAG GAA AAA GTC CTT GGA TTG ATC GAT AAT GAT CAA 1485
 500 510
 V V V T P D K E I L Y E A F D
 GTG GTT GTG ACT CCT GAC AAA GAA ATC TTA TAT GAG GCC TTT GAT 1530
 520
 E M E E C A S K A A L I E E G
 GAG ATG GAA GAA TGC GCC TCC AAA GCC GCC CTC ATT GAG GAA GGG 1575
 530 540
 Q R M A E M L K S K I Q G L L
 CAG CGG ATG GCG GAG ATG CTC AAG TCT AAG ATA CAA GGC CTC CTC 1625
 550
 G I L R R H V G P G E G A V Q
 GGG ATA CTG GCG CGG CAC GTT GGT CCT GGC GAG GGG GCA GTG CAG 1670
 560 570
 W M N R L I A F A S R G N H V
 TGG ATG AAC CGG CTG ATA GCC TTC GCC TCC AGA GGG AAC CAT GTT 1715
 580
 S P T H Y V P S R S R R F A Q
 TCC CCC ACG CAC TAC GTT CCG TCT AGA TCC CGG AGA TTC GCC CAG 1760
 590 600
 A L P V W A R P D Y N P P L V
 GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG 1805
 610
 E T W K K P D Y E P P V V H G
 GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAC GGC 1850
 620 630
 R S S R R F A Q A L P V W A R
 AGA TCT TCT CGG AGA TTC GCC CAG GCC CTG CCC GTT TGG GCG CGG 1895

FIG. 7D

【図 7 E】

640
 P D Y N P P L V E T W K K P D
 CCG GAC TAT AAC CCC CCG CTA GTG GAG ACG TGG AAA AAG CCC GAG 1940
 650 660
 Y E P P V V H G R K T K R N T
 TAC GAA CCA CCT GTG GTC CAT GGC AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC 1985
 670
 N R R P Q D V K P P G G G Q I
 AAC CGG CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC 2030
 680 690
 V G G V Y L L P R R G P R L G
 GTT GGT GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT 2075
 700
 V L A T R K T S P I P K A R R
 GTG CTC GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG 2120
 710 720
 F E G R T W A Q P G Y P W P L
 CCC GAG GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC 2165
 730
 Y G N K D R R S T G K S W G K
 TAT GGC AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GGT AAG TCC TGG GGT AAG 2210
 740 750
 P G Y P W P R K T K R N T N R
 CCA GGG TAC CCT TGG CCA AGA AAG ACC AAA CGT AAC ACC AAC CGG 2255
 760
 R P Q D V K F P G G G Q I V G
 CGG CCG CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGT GGC GGT CAG ATC GTT GGT 2300
 770 780
 G V Y L L P R R G P R L G V L
 GGA GTT TAC TTG TTG CCG CGC AGG GGC CCT AGA TTG GGT GTG CTC 2345
 790
 A T R K T S P I P K A R R P E
 GCG ACG AGA AAG ACT TCC CCT ATC CCC AAG GCT CGT CGG CCC GAG 2390

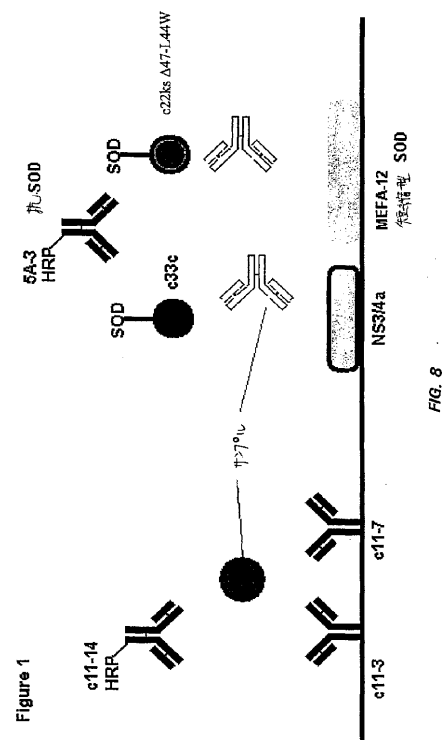
FIG. 7E

【図 7 F】

800 810
 G R T W A Q P G Y P W P L Y G
 GGC AGG ACC TGG GCT CAG CCC GGT TAC CCT TGG CCC CTC TAT GGC 2435
 820
 N K D R R S T G K S W G K P G
 AAT AAG GAC AGA CGG TCT ACA GST AAG TCC TGG GGT AAG CCA GGG 2480
 829
 Y P W P OC
 TAC CCT TGG CCC TAA TGAAGTCGAC

FIG. 7F

【図 8】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/280,867

(32)優先日 平成13年4月2日(2001.4.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 チェン, デイビッド ワイ.

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

(72)発明者 アーカンジェル, フィリップ

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

(72)発明者 タンデスク, ローラ

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

(72)発明者 ジョージ - ナスシェメント, カルロス

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

(72)発明者 コイト, ドリス

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

(72)発明者 メディナ - セルビー, アンジェリカ

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

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第00/007023(WO, A1)

国際公開第97/044469(WO, A1)

特表平07-509060(JP, A)

国際公開第99/015898(WO, A1)

国際公開第00/07023(WO, A1)

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

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

C07K 14/18

C07K 19/00

C12M 1/34

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 15/09

专利名称(译)	HCV抗原/抗体组合测定		
公开(公告)号	JP4834279B2	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	JP2002510953	申请日	2001-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华Bakushinzu和诊断公司		
[标]发明人	チェンデイビッドワイ アーカンジェルフィリップ タンデスクローラ ジョージナスシエメントカルロス コイトドリス メディナセルビーアンジェリカ		
发明人	チェン, デイビッド ワイ. アーカンジェル, フィリップ タンデスク, ローラ ジョージ-ナスシエメント, カルロス コイト, ドリス メディナ-セルビー, アンジェリカ		
IPC分类号	G01N33/576 C07K14/18 C07K19/00 C12M1/34 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/00 C12N2770/24222 G01N33/5767 G01N2333/18 G01N2469/10 G01N2469 /20		
FI分类号	G01N33/576.ZNAZ		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/212082 2000-06-15 US 60/280811 2001-04-02 US 60/280867 2001-04-02 US		
其他公开文献	JP2004506878A JP2004506878A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

根据本发明，提供了HCV核心抗原和NS3 / 4a抗体的组合测定。该组合的HCV核心抗原和NS3 / 4a抗体测定可以使用单个固体基质检测样品中存在的HCV抗原和HCV抗体。此外，根据本发明，还提供了用于HCV核心抗原和NS3 / 4a抗体的该组合测定的免疫测定固体支持物。

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