

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-513390

(P2018-513390A)

(43) 公表日 平成30年5月24日(2018.5.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576 Z	4B064
CO 7 K 14/18 (2006.01)	CO 7 K 14/18 ZNA	4H045
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 D	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-501133 (P2018-501133)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月22日 (2015. 6. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月26日 (2017. 9. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/036941
 (87) 国際公開番号 W02016/160046
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016. 10. 6)
 (31) 優先権主張番号 62/139, 183
 (32) 優先日 平成27年3月27日 (2015. 3. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511093409
 オーソークリニカル・ダイアグノスティック
 クス・インコーポレイテッド
 Ortho-Clinical Diag
 nostics, Inc.
 アメリカ合衆国、ニュージャージー州 O
 8869、ラリタン、ユー・エス・ルート
 202 1001
 1001 U. S. Route 202
 , Raritan, New Jers
 ey 08869, United St
 ates of America

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCV NS4A/改変されたNS3ポリペプチド及びその使用

(57) 【要約】

改変されたC型肝炎ウイルスポリペプチドが説明される。ポリペプチドは、HCV NS4aドメイン及び改変されたNS3ドメインを含む。ポリペプチドは、立体構造エピトープを保持する。ポリペプチドを含むHCVイムノアッセイも説明される。

【選択図】 図7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ポリペプチドであって、配列番号 3 を有する C 型肝炎ウイルス NS 4 a ドメインと、配列番号 4 を有する改変された C 型肝炎ウイルス NS 3 ドメインであって、前記改変のない配列番号 4 を有する C 型肝炎ウイルス NS 3 ドメインのプロテアーゼ活性と比較して、前記改変された C 型肝炎ウイルス NS 3 ドメインのプロテアーゼ活性を阻害するように、配列番号 4 の 1 つ又は 2 つ以上のアミノ酸残基が改変されている、ドメインと、前記改変された NS 3 ドメインのアミノ末端に前記 NS 4 a ドメインのカルボキシ末端を接続する介在領域と、を含む、ポリペプチド、又は前記ポリペプチドに対して少なくとも 90% のアミノ酸相同性を有するポリペプチド、又は前記ポリペプチドに対して少なくとも 90% のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、を含む、イムノアッセイ試薬。

10

【請求項 2】

前記改変が、配列番号 4 のアミノ酸残基 55、79、及び 137 のうち 1 つ又は 2 つ以上の置換を含む、請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬。

【請求項 3】

前記改変が、アラニン又はグリシンの置換を含む、請求項 2 に記載のイムノアッセイ試薬。

【請求項 4】

前記改変が、アラニンによるアミノ酸残基 137 の置換を含む、請求項 3 に記載のイムノアッセイ試薬。

20

【請求項 5】

前記ポリペプチドの前記介在領域が、アミノ酸配列 S G S を有する、請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬。

【請求項 7】

固体担体に結合される、請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬。

【請求項 8】

生体サンプル内の C 型肝炎ウイルスに対する抗体を検出する方法であって、(a) 請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬を提供する工程と、(b) H C V 抗体が前記生体サンプル内に存在する場合に H C V 抗体を前記ポリペプチドに結合させて第 1 の免疫複合体を形成することを可能にする条件下で生体サンプルを前記イムノアッセイ試薬と混合する工程と、(c) 標識ディテクターを工程 (b) から得た前記第 1 の免疫複合体に追加する工程であって、前記標識ディテクターが前記第 1 の免疫複合体に反応性である工程と、(d) 前記生体サンプル内の C 型肝炎ウイルスに対する前記抗体の存在の指標として、前記標識ディテクターと前記第 1 の免疫複合体との間に形成された第 2 の免疫複合体を、存在する場合に検出する工程と、を含む方法。

30

【請求項 9】

前記標識ディテクターが、標識抗体又は標識抗原である、請求項 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記イムノアッセイ試薬が、固体担体に結合している、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

生体サンプル内の C 型肝炎ウイルスに対する抗体及び / 又は C 型肝炎ウイルス抗原を検出する方法であって、(a) 請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬を提供する工程と、(b) 生体サンプルと、前記イムノアッセイ試薬及び 1 つ又は 2 つ以上の抗 H C V 抗体とを、H C V 抗体が前記生体サンプル内に存在する場合に H C V 抗体を前記ポリペプチドに結合させて第 1 の免疫複合体を形成することを可能にする条件下、及び H C V 抗原が前記生体サンプル内に存在する場合に H C V 抗原を前記抗 H C V 抗体に更に結合させて第 2 の免疫複合体を形成することを可能にする条件下で混合する工程と、(c) 第 1 の標識ディテ

50

クターを工程 (b) から得た前記第 1 の免疫複合体に追加する工程であって、前記第 1 の標識ディテクターが前記第 1 の免疫複合体に反応性である工程と、第 2 の標識ディテクターを工程 (b) から得た前記第 2 の免疫複合体に追加する工程であって、前記第 2 の標識ディテクターが前記第 2 の免疫複合体に反応性である工程と、(d) 前記生体サンプル内の H C V に対する抗体及び / 又は H C V 抗原の存在の指標として、前記第 1 の標識ディテクターと前記第 1 の免疫複合体との間に形成された第 3 の免疫複合体を、存在する場合に検出する工程と、前記第 2 の標識ディテクターと前記第 2 の免疫複合体との間に形成された第 4 の免疫複合体を、存在する場合に検出する工程と、を含む方法。

【請求項 1 2】

前記第 1 の標識ディテクター及び前記第 2 の標識ディテクターが、それぞれ標識抗体又は標識抗原である、請求項 1 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記イムノアッセイ試薬の 1 つ又は 2 つ以上及び 1 つ又は 2 つ以上の抗 H C V 抗体が、同じ又は異なる固体担体に結合している、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬と、免疫診断テストを実施する手順と、を含む、免疫診断テストキット。

【請求項 1 5】

1 つ又は 2 つ以上の抗 H C V 抗体を更に含む、請求項 1 4 に記載の免疫診断テストキット。

20

【請求項 1 6】

前記 1 つ又は 2 つ以上の抗 H C V 抗体が、抗 H C V コア抗体である、請求項 1 5 に記載の免疫診断テストキット。

【請求項 1 7】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、単離ポリペプチド。

【請求項 1 8】

配列番号 2 のアミノ酸配列からなる、単離ポリペプチド。

【請求項 1 9】

ヒト生体サンプルの供給から、請求項 1 に記載のイムノアッセイ試薬を用いて抗原抗体複合体を形成する抗体を含むサンプルを選択することを含む、ヒト生体サンプルの供給から生体サンプルを選択する方法。

30

【請求項 2 0】

前記選択することが、前記供給から除去するための H C V 陽性サンプルを同定することである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記生体サンプルが血液である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

血液関連製品の調製に選択されない生体サンプルを使用することを更に含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

ヒト生体サンプルの供給から、請求項 1 に記載の前記イムノアッセイ試薬を用いて抗原抗体複合体を形成する抗体を含まないサンプルを選択することを含む、ヒト生体サンプルの供給から生体サンプルを選択する方法。

40

【請求項 2 4】

前記選択することが、血液関連製品の調製に有用な生体サンプルを同定することである、請求項 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

(関連出願の相互参照)

本願は、2015年3月27日出願の米国特許仮出願第62/139,183号の利益を主張するものである。

(合衆国政府の助成による研究又は開発に関する陳述)

該当なし。

【0002】

本発明は、概ね、C型肝炎ウイルス(HCV)構築物及びこれを使用するための方法に関する。より具体的には、本発明は、NS4a及び改変されたNS3ドメインを有する免疫原性かつ免疫反応性のHCVポリペプチドに関する。改変されたポリペプチドは、立体構造エピトープを保持するので、HCV感染を診断するためのイムノアッセイで有用である。

10

【背景技術】

【0003】

C型肝炎ウイルス(HCV)は、主に身体輸血及び体液交換によって感染する非経口的な非A非B型肝炎(NANBH)の主原因である。このウイルスは、米国内で一般集団の0.4~2.0%に存在する。慢性肝炎は、感染の約50%において発症し、これらのうち、感染した個人の約20%は、時として肝細胞癌につながる肝硬変を発症する。したがって、この病気の研究及び抑制は、医学的重要性がある。

【0004】

HCVは、HoughtenらによってNANBHの原因であると初めて同定され、特許化された。HCVのウイルスゲノム配列は、周知であり、その配列を得るための方法も周知である。例えば、国際公開第89/04669号、同第90/11089号、及び同第90/14436号を参照されたい。HCVは、9.5kbのプラスセンスの一本鎖RNAゲノムを有し、Flaviridae科のウイルスのメンバーである。少なくとも6つの異なる、ただし、系統発生解析に基づいて関連した遺伝子型のHCVが同定されている(Simmonds et al., J. Gen. Virol. (1993) 74: 2391~2399)。ウイルスは、3000超の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 et al., Science (1989) 244: 359~362; Choo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451~2455; Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 1711~1715)。ポリタンパク質は、共翻訳的に及び翻訳後に、構造タンパク質及び非構造(NS)タンパク質の両方にプロセッシングされる。

20

30

【0005】

特に、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ポリタンパク質の開裂産物の順序及び命名法は次の通りである: NH₂ - C - E1 - E2 - P7 - NS2 - NS3 - NS4a - NS4b - NS5a - NS5b - COOH。ポリタンパク質の初期開裂は、3つの構造タンパク質、つまりN末端ヌクレオカプシドタンパク質(いわゆる「コア」)並びに2つのエンベローブ糖タンパク質「E1」(Eとしても知られる)及び「E2」(E2/NS1としても知られる)、並びにウイルス酵素を含む非構造(NS)タンパク質を遊離させる、宿主プロテアーゼによって触媒される。NS領域は、NS2、NS3、NS4、NS4a、NS4b、NS5a、及びNS5b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、単独又はNS3との組み合わせのいずれかで、NS2-NS3の切断しやすい結合を開裂し、次にNS3のN末端を生成し、セリンプロテアーゼ活性及びRNAヘリカーゼ活性の両方を含む大きなポリタンパク質を放出する。NS3プロテアーゼは、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。具体的には、HCV NS3タンパク質は、3つの機能ドメインを含む630アミノ酸タンパク質である。セリン様プロテアーゼドメインが、アミノ末端に位置する一方で、ヘリカーゼ及びNTPase活性は、カルボキシ末端にある。NS3のセリンプロテアーゼは、NS3/4a、NS4a/b、NS4b/5a、及びNS5a

40

50

/ bの接合部における開裂に關与している。

【0006】

HCVポリタンパク質由来の、HCV用の免疫学的試薬及び診断的試薬として有用な、多数の一般的及び特異的ポリペプチドが説明されてきた。例えば、Houghtonら、欧州特許第318,216号及び同第388,232号; Choo et al., Science (1989) 244: 359~362; Kuo et al., Science (1989) 244: 362~364; Houghton et al., Hepatology (1991) 14: 381~388; Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011~10015; Chien et al., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33~39; Chienら、国際公開第93/00365号; Chien, D. Y., 国際公開第94/01778号を参照されたい。これらの刊行物は、通常HCV並びにHCVポリペプチドの免疫学的試薬の製造及び使用について幅広い知識を提供する。したがって簡潔にするために、これらの刊行物の開示は、参照により本明細書に援用される。

10

【0007】

HCVのキャリア及びHCV汚染血液又は血液製剤をスクリーングし、同定するための高感度の特異的な方法は、医薬品に重要な進歩をもたらす。輸血後肝炎(PTH)は、輸血された患者の約10%で発生し、HCVは、これらの症例の最大90%を占めている。患者の治療、並びに血液及び血液製剤による、又は緊密な個人的接触によるHCVの予防及び伝染は、信頼できる診断ツール及び予後ツールを必要とする。したがって、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た。例えば、Choo et al., Science (1989) 244: 359~362; Kuo et al., Science (1989) 244: 362~364; Choo et al., Br. Med. Bull. (1990) 46: 423~441; Ebeling et al., Lancet (1990) 335: 982~983; van der Poel et al., Lancet (1990) 335: 558~560; van der Poel et al., Lancet (1991) 337: 317~319; Chien, D. Y., 国際公開第94/01778号; Valenzuelaら、同第97/44469号; 及びKashiwakumaraら、米国特許第5,871,904号を参照されたい。

20

【0008】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,630,298号は、HCV抗体を検出するためにHCVコア抗体を使用してHCV抗原及びNS3/4aエピトープを検出するHCV抗原/抗体組み合わせアッセイについて説明する。NS3/4aエピトープは、アミノ末端上にNS3、及びカルボキシ末端上にNS4aを有する。NS3ドメインのプロテアーゼ活性は、このエピトープ内に保持され、安定性は、プロテアーゼ活性の存在によってマイナスの影響を受ける。

30

【0009】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,632,601号は、複数エピトープ融合抗原(MEFA)との組み合わせでNS3/4a立体構造エピトープを使用するイムノアッセイについて説明する。アッセイは、早期のHCVセロコンバージョンを検出するための方法を提供する。米国特許第6,632,601号に記載されるように酵母で発現させ、非変性条件下で精製されたNs3/4aは、プロテアーゼ及びヘリカーゼの両方の機能を含む。なぜなら、この様式で精製されたNS3/4aは、天然の立体構造を保持するからであり、早期セロコンバージョン抗体検出においてc200又はc33c抗原より高感度であることがわかっている。抗原としてNS3/4a及びMEFA7.1を使用する抗体アッセイにおいて、セロコンバージョン抗体は、当時存在した市販のHCVアッセイより2~14日早く検出された。しかしながら、NS3/4aタンパク質は、自己加水分解を受け、NS3プロテアーゼ活性によりMEFA7.1を開裂する。

40

【0010】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7,491,808号は、M

50

E F Aとの併用でタンパク質分解活性の減少を伴って変異したNS3プロテアーゼドメインを含むNS3/4a立体構造エピトープについて説明する。

【0011】

参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,211,338号は、天然のHCV NS4aペプチドの中央疎水性ドメイン、リンカー、及びHCV NS3セリンプロテアーゼドメインを含む共有結合性のHCVのNS4a/NS3複合体について説明する。NS4a/NS3複合体は、NMR分光法によるHCV阻害物質の構造決定、及び結合方式の決定に有用である。

【0012】

適切な患者の治療を提供するため、並びに血液及び血液製剤による又は緊密な個人的接触によるHCVの伝染を予防するために、高感度で正確な診断ツール及び予後ツールの必要が残り続ける。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、NS4a/改変されたNS3のHCVポリペプチドの使用が、HCV感染を検出するための優れた試薬を提供するという研究結果の一部に基づいている。NS4a/改変されたNS3ポリペプチドは、立体構造エピトープ、したがって免疫反応性を保持するので、HCV感染の存在を正確かつ効率的に検出するため、特にHCV特異抗体の早期検出のために、単独又は他のHCV試薬との組み合わせで使用することができる。本明細書に記載されたアッセイを使用して、HCVの6個の既知の遺伝子型のいずれかによって生じたHCV感染を検出することができる。

【0014】

したがって、一実施形態では、本発明は、配列番号3を有するC型肝炎ウイルス(HCV)NS4aドメインと、配列番号4を有する改変されたHCV NS3ドメインであって、改変のない配列番号4を有するC型肝炎ウイルスNS3ドメインのプロテアーゼ活性と比較して、改変されたC型肝炎ウイルスNS3ドメインのプロテアーゼ活性を阻害するように、1つ又は2つ以上の配列番号4のアミノ酸残基が改変されているドメインと、改変されたNS3ドメインのアミノ末端にNS4aドメインのカルボキシ末端を接続する介在領域と、を含むポリペプチド、又はかかるポリペプチドに対して少なくとも90%のアミノ酸相同性を有するポリペプチド、又はかかるポリペプチドに対して少なくとも90%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、を含むイムノアッセイ試薬を目的とする。NS3ドメインは、配列番号4においてアミノ酸残基15及び16がイソロイシン(I)の代わりにリシン(K)であるという点において、天然のHCV NS3ドメインに対して改変されている。好ましくは、プロテアーゼ活性を阻害するための改変は、配列番号4のアミノ酸残基55、79、及び137のうち1つ又は2つ以上の置換、好ましくはアラニン又はグリシンの置換を含む。好ましい実施形態では、プロテアーゼ活性を阻害するための改変は、アラニンによる配列番号4のアミノ酸残基137の置換を含む。

【0015】

本発明のポリペプチドの好ましい実施形態では、介在領域は、アミノ酸トリプレットSGSであり、配列番号2を含む又はより具体的には配列番号2からなるポリペプチドをもたらす。介在領域、好ましくはトリペプチドの可撓性リンカーは、「ターン」配列と呼ばれる。ターン配列は、NS4aドメインをNS3ドメインのプロテアーゼ領域内のポケットの中への折り畳みを可能にする。

【0016】

更なる実施形態では、本発明のイムノアッセイ試薬は、固体担体に結合している。

【0017】

更なる実施形態では、発明は、生体サンプル内のHCVに対する抗体を検出する方法を目的とする。方法は以下を含む：(a)上述のようなイムノアッセイ試薬を提供すること；(b)HCV抗体が生体サンプル内に存在する場合にHCV抗体をポリペプチドに結合

10

20

30

40

50

させて第1の免疫複合体を形成することを可能にする条件下で生体サンプルをイムノアッセイ試薬と混合すること；

(c) 標識ディテクターを工程(b)から得た第1の免疫複合体に追加することによって、この標識ディテクター免疫複合体に反応性であること；及び(d) 生体サンプル内のHCV抗体の存在の指標として標識ディテクターと第1の免疫複合体との間に形成された第2の免疫複合体を検出すること(存在する場合)。好ましくは、標識ディテクターは、抗体又は抗原である。好ましくは、イムノアッセイ試薬は、固体担体に結合している。

【0018】

更なる実施形態では、発明は、生体サンプル内のC型肝炎ウイルスに対する抗体及び/又はC型肝炎ウイルス抗原を検出する方法(「組み合わせ」又は「コンボ」アッセイ)を目的とする。方法は以下を含む：(a) 上述のようなイムノアッセイ試薬を提供すること；(b) HCV抗体が生体サンプル内に存在する場合にHCV抗体をポリペプチドに結合させて第1の免疫複合体を形成することを可能にする条件下、及びHCV抗原が生体サンプル内に存在する場合にHCV抗原を抗HCV抗体に更に結合させて第2の免疫複合体を形成することを可能にする条件下で、生体サンプルをイムノアッセイ試薬及び1つ又は2つ以上の抗HCV抗体と混合すること；(c) 第1の標識ディテクターを工程(b)から得た第1の免疫複合体に追加することによって、第1の標識ディテクターが前記第1の免疫複合体に反応性であること、及び第2の標識ディテクターを工程(b)から得た第2の免疫複合体に追加することによって、第2の標識ディテクターが第2の免疫複合体に反応性であること；(d) 生体サンプル内のHCVに対する抗体の存在及び/又はHCV抗原の存在の指標として、第1の標識ディテクターと第1の免疫複合体との間に形成された第3の免疫複合体を検出すること(存在する場合)、及び第2の標識ディテクターと第2の免疫複合体との間に形成された第4の免疫複合体を検出すること(存在する場合)。好ましくは、第1の標識ディテクター及び第2の標識ディテクターは、それぞれ標識抗体又は標識抗原である(その任意の組み合わせにおいて；すなわち両方が標識抗体であり得る；両方が標識抗原であり得る；1つが標識抗体であり得る一方、他方が標識抗原である)。好ましくは、イムノアッセイ試薬の1つ又は2つ以上及び1つ又は2つ以上の抗HCV抗体が、同じ又は異なる固体担体に結合している。

【0019】

更なる実施形態では、発明は、上述のようなイムノアッセイ試薬を含む免疫診断テストキット及び免疫診断テストを実施する手順を目的とする。

【0020】

追加の実施形態では、発明は、1つ又は2つ以上の抗HCV抗体、好ましくは抗HCVコア抗体を更に含む免疫診断テストキットを目的とする。

【0021】

追加の実施形態では、発明は、配列番号2のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを目的とする。特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなる。

【0022】

更なる実施形態では、発明は、本発明によるイムノアッセイ試薬を用いて抗原抗体複合体を形成する抗体を含むサンプルを、ヒト生体サンプルの供給から選択することを含む、ヒト生体サンプルの供給から生体サンプルを選択する方法を提供する。これは、供給が血液供給であるとき特に関連のある、供給から除去するHCV陽性サンプルを同定するのに有用である。それらの選択されないサンプルを、血液関連製品の調製に使用することができる。HCV陽性サンプルを同定することによって、本方法は、陽性サンプルの付加においても有用であり得る。

【0023】

発明は、本発明によるイムノアッセイ試薬を用いて抗原抗体複合体を形成する抗体を含まないサンプルを、ヒト生体サンプルの供給から選択することを含む、ヒト生体サンプルの供給から生体サンプルを選択する方法を更に提供する。これは、血液関連製品の調製に有用な生体サンプルを同定するのに有用である。

10

20

30

40

50

【0024】

本発明のこれらの態様及び他の態様は、以下の詳細な説明及び添付の図面を参照すると顕著となるであろう。加えて、より詳細に特定の手順又は組成物を説明する様々な参考文献が本明細書で示されており、したがって参照によりそれら全体が組み込まれる。

【0025】

本発明の追加的な特徴及び利点は、添付図面と共に考慮される際に伴う説明から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】本アッセイ試薬（タンパク質及び抗体）が由来するポリタンパク質の様々な領域を示しているHCVゲノムの図表示である。 10

【図2】酵母発現ベクターpBS24.1の環状マップである。

【図3】本発明によるターン変異体HCV発現カセットの図表示である。

【図4】本発明によるターン変異体発現プラスミドpd.4a.t.ns3.1165.KKの環状マップである。

【図5】ターン変異体発現プラスミドpd.4a.t.ns3.1165.KKのクローニング法を図示している。

【図6】イムノアッセイ試薬が固体担体に固定化される、本発明によるイムノアッセイ試薬を使用した代表的なイムノアッセイの概略図である。

【図7】イムノアッセイ試薬及び抗HCV抗体が固体担体に固定される、本発明によるイムノアッセイ試薬及び抗HCV抗体を使用した代表的なイムノアッセイの概略図である。 20

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明の実施は、別途記載のない限り、当業者の技能の範囲内の化学、生化学、DNA組み換え技術、及び免疫学の従来の方法を利用するだろう。そのような技術は、文献内で完全に説明されている。例えば、Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I & II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.); Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods in Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.)を参照されたい。 30

【0028】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、上記であろうと下記であろうと、本明細書の全体にわたり参照により組み込まれる。 40

【0029】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上別途明らかに示されない限り、複数の指示対象を含むことに留意される必要がある。したがって、例えば、「抗原」への言及は、2つ又はそれ以上の抗原の混合物などを含む。

【0030】

以下のアミノ酸の略語を、本文全体を通して使用する：

【表 1】

アラニン:Ala(A)	アルギニン:Arg(R)
アスパラギン:Asn(N)	アスパラギン酸:Asp(D)
システイン:Cys(C)	グルタミン:Gln(Q)
グルタミン酸:Glu(E)	グリシン:Gly(G)
ヒスチジン:His(H)	イソロイシン:Ile(I)
ロイシン:Leu(L)	リシン:Lys(K)
メチオニン:Met(M)	フェニルアラニン:Phe(F)
プロリン:Pro(P)	セリン:Ser(S)
スレオニン:Thr(T)	トリプトファン:Trp(W)
チロシン:Tyr(Y)	バリン:Val(V)

10

【0031】

I. 定義

本発明の記述において、以下の用語を利用し、それらは以下のように定義されることを意図している。

20

【0032】

用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指し、生産物の最小長に制限されない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体などがこの定義内に含まれる。全長タンパク質及びそのフラグメントの両方は、この定義により包含されている。用語はまた、ポリペプチドの発現後の改変、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化なども含む。更に、本発明の目的に関して、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対する欠失、付加、及び置換などの改変を含むタンパク質を指す（通常は本質的に保存的）。これらの改変は、部位特異的突然変異誘発を通じて意図的であってもよいが、又はタンパク質を産生する宿主の突然変異若しくはPCR増幅による誤差などを通じて偶発的であってもよい。

30

【0033】

HCVポリペプチドは、上記で定義されたようなHCVポリタンパク質由来のポリペプチドである。ポリペプチドは、物理的にHCV由来である必要はないが、合成的に又は組み換え的に産生されてもよい。更に、ポリペプチドは、例えばHCVの1、2、3、4、5又は6の株からの単離株のいずれかであるがこれらに限定されない、様々なHCVの株及び単離株のいずれかに由来してもよい。多数の保存領域及び可変領域は、これらの株間で既知であり、一般的には、これらの領域由来のエピトープのアミノ酸配列は、高い配列相同性、例えば、2つの配列を整列させたとき30%超、好ましくは40%超のアミノ酸配列相同性を有するだろう。したがって、例えば、用語「NS4a/3」ポリペプチドは、様々なHCV株、並びに更に以下に定義されるようにNS4a/3類似体、突然変異タンパク質、及び免疫原性フラグメントのいずれかから得たNS3と組み合わせたNS4を指す。これらの株の多くの完全な遺伝子型は既知である。例えば、米国特許第6,150,087号並びにGenBankアクセッション番号AJ238800及びAJ238799を参照されたい。

40

【0034】

HCVポリタンパク質「由来の」ポリペプチドは、参照HCVポリタンパク質の1つ又は2つ以上の領域若しくは領域の部分の配列を含むポリペプチドを意味する。典型的には、ポリペプチドは、エピトープを含む領域又は領域の部分からなり、通常以下に定義されるような、参照ポリペプチドに実質的に相同のアミノ酸配列を有する。したがって、用語「由来の」は、分子の本来の供給源を同定するために使用されるが、例えば、化学合成手

50

段又は組み換え手段であってもよい分子を作製する方法を制限することを意味するものではない。

【0035】

用語「類似体」及び「突然変異タンパク質」は、本明細書に記載のアッセイにおいて免疫反応性など所望の活性を保持する参照分子の、生物学的に活性の誘導体又はそのような誘導体のフラグメントを指す。一般的に、用語「類似体」は、改変が免疫原性活性を破壊しない限り、天然の分子に対して1つ又は2つ以上のアミノ酸の付加、置換（通常は本質的に保存的であるか、又は改変されたNS3の様々な実施形態の場合、活性なタンパク質分解部位において本質的に非保存的である）及び/又は欠失のある天然のポリペプチド配列及び構造を有する化合物を指す。用語「突然変異タンパク質」は、アミノ及び/又はイミノ分子だけを含む化合物、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸などを含む）の1つ又は2つ以上の類似体を含むポリペプチド、置換された結合を有するポリペプチド、並びに当該技術分野において周知の他の改変、つまり天然型及び非天然型（例えば、合成）両方の、環化された、分枝状分子などが挙げられるがこれらに限定されない、1つ又は2つ以上のアミノ酸様分子を有するポリペプチドを指す。この用語はまた、1つ又は2つ以上のN置換グリシン残基（「ペプチド」）及び他の合成アミノ酸若しくはペプチドを含有する分子も含む。（ペプチドの説明については、例えば、米国特許第5,831,005号、同第5,877,278号、及び同第5,977,301号；Nguyen et al., Chem Biol. (2000) 7:463~473；並びにSimon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:9367~9371を参照されたい）。好ましくは、類似体又は突然変異タンパク質は、少なくとも天然の分子と同じ免疫反応性を有する。ポリペプチド類似体及びポリペプチド突然変異タンパク質を作製する方法は、当該技術分野において周知であり、更に後述される。

10

20

30

40

50

【0036】

上述のように、類似体は、通常、本質的に保存的である置換、すなわち、アミノ酸のファミリー内で生じる、それらの側鎖に関連する置換を含む。具体的には、アミノ酸は、一般に4つのファミリーに分類される：（1）酸性 - - アスパルテート及びグルタメート；（2）塩基性 - - リシン、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；並びに（4）非電荷極性 - - 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、及びチロシンは、時として芳香族アミノ酸に分類される。例えば、ロイシンからイソロイシン若しくはバリン、アスパルテートからグルタメート、スレオニンからセリンへの孤立置換、又はアミノ酸から構造的に関連するアミノ酸への類似の保存的置換は、生物活性に大きな影響を与えないであろうことは、合理的に予想可能である。例えば、目的のポリペプチドは、分子の所望の機能がそのまま残される限り、最大約5~10個の保存的若しくは非保存的なアミノ酸置換、又は更には最大約15~25個の保存的若しくは非保存的なアミノ酸置換、又は5~25の任意の整数の保存的若しくは非保存的なアミノ酸置換を含み得る。当業者は、当該技術分野において周知であるHopp/Woodsプロット及びKyte-Doolittleプロットを参考として、目的の分子の変化を許容できる領域を容易に決定することができる。

【0037】

「改変されたNS3」によって、配列番号4においてアミノ酸残基15及び16がイソロイシン（I）の代わりにリシン（K）であるという点において天然のHCV NS3ドメインに対して改変されたNS3ポリペプチドを意味し、配列番号4の1つ又は2つ以上のアミノ酸残基は、改変のない配列番号4を有するC型肝炎ウイルスNS3ドメインのプロテアーゼ活性と比較して、改変されたC型肝炎ウイルスNS3ドメインのプロテアーゼ活性を阻害するように、改変されている。好ましくは、プロテアーゼ活性を阻害するための改変は、配列番号4のアミノ酸残基55、79、及び137のうち1つ又は2つ以上の置換、好ましくはアラニン又はグリシンの置換を含む。好ましい実施形態では、プロテア

ーゼ活性を阻害するための改変は、アラニンによる配列番号4のアミノ酸残基137の置換を含む。

【0038】

「フラグメント」によって、無傷の全長ポリペプチド配列及び構造の一部だけからなるポリペプチドを意図する。フラグメントは、天然のポリペプチドのC末端欠失及び/又は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、一般的に、エピトープを定義する全長分子の少なくとも約5~10個の隣接するアミノ酸残基、好ましくは、全長分子の少なくとも約15~25個の隣接するアミノ酸残基、及び最も好ましくは、全長分子の少なくとも約20~50個以上の隣接するアミノ酸残基、又は5個のアミノ酸と全長配列との間の任意の整数の隣接するアミノ酸残基を含むが、ただし問題のフラグメントが本明細書に記載のアッセイにおいて免疫反応性を保持することを条件とする。

10

【0039】

用語「エピトープ」は、本明細書で使用する時、少なくとも約3~5、好ましくは、約5~10又は15、及び約1,000以下(又はその間の任意の整数)のアミノ酸であって、それ自体で又はより大きな配列の一部として、そのような配列に対応して生成された抗体に結合する配列を定義するアミノ酸の配列を指す。フラグメントの長さに対する重要な上限はなく、フラグメントは、タンパク質配列のほぼ全長、又は更にはHCVポリタンパク質から2つ以上のエピトープを含む融合タンパク質を含んでもよい。本発明で用いるエピトープは、由来する親タンパク質の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。実際には、ウイルスゲノムは、常に変化している状態であり、単離株間で比較的高い可変性を呈するいくつかの可変ドメインを含む。したがって、用語「エピトープ」は、天然配列と同一である配列、並びに欠失、付加、及び置換など(通常、本質的に保存的である)の天然配列に対する改変を包含する。

20

【0040】

エピトープを含む所与のポリペプチドの領域は、当該技術分野において周知である任意の数のエピトープマッピング技術を用いて同定することができる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, N.J.を参照されたい。例えば、線形エピトープは、例えば、タンパク質分子の部分に対応している多数のペプチドを固体担体上に同時に合成すること、及びペプチドが担体に結合されているうちにペプチドと抗体を反応させることによって、決定され得る。そのような技術は、当該技術分野において周知であり、例えば、米国特許第4,708,871号; Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998~4002; Geysen et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178~182; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709~715に記載されており、それら全てを本明細書に全体にわたり参照により組み込む。そのような技術を使用して、多数のHCVのエピトープが同定されている。例えば、Chien et al., Viral Hepatitis and Liver Disease (1994) pp. 320~324、及び更に以下を参照されたい。同様に、立体構造エピトープは、例えば、X線結晶学及び2次元核磁気共鳴によってなど、アミノ酸の空間立体構造を決定することによって容易に同定される。例えば、上記Epitope Mapping Protocolsを参照されたい。タンパク質の抗原性領域はまた、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るものなど標準の抗原性プロット及び疎水性プロットを用いて同定され得る。このコンピュータプログラムは、抗原性プロファイルを決定するためにHopp/Woods法(Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78:3824~3828)、及び疎水性プロット用にKyte-Doolittle

30

40

50

e 技術 (K y t e e t a l . , J . M o l . B i o l . (1 9 8 2) 1 5 7 : 1 0 5 ~ 1 3 2) を使用する。

【 0 0 4 1 】

本明細書において使用するとき、用語「立体構造エピトープ」は、全長天然タンパク質内のエピトープをコードするアミノ酸配列特有の構造的特徴を有する、全長タンパク質、又はその類似体若しくは突然変異タンパク質の一部を指す。天然の構造的特徴としては、グリコシル化及び三次元構造が挙げられるが、これらに限定されない。これらのエピトープが抗原の三次元形状 (例えば、折り畳み) によって形成されると考えられるので、エピトープ定義配列の長さには、大きなばらつきが生じやすい場合がある。したがって、エピトープを定義するアミノ酸は、比較的少ない数であり得るが、分子の長さに沿って広く分散され、折り畳みを介して正しいエピトープの立体構造がもたらされる。エピトープを定義する残基の間の抗原の部分は、エピトープの立体構造に対して重要でない場合がある。例えば、これらの介在配列の欠失又は置換は、エピトープの立体構造に重要な配列が維持されている場合 (例えば、ジスルフィド結合に関するシステイン、グリコシル化部位など)、立体構造エピトープに影響を及ぼさない場合がある。

10

【 0 0 4 2 】

N S 4 a / 3 領域内に存在する立体構造エピトープは、上述の方法を使用して容易に同定される。更に、所与のポリペプチドにおける立体構造エピトープの有無は、抗体 (立体構造エピトープに対するポリクローナル血清又はモノクローナル抗体) を用いて目的の抗原をスクリーニングすること、及びその反応性を、線形エピトープ (該当する場合) だけを保持する抗原の変性した変形例のものと比較することによって容易に判定することができる。ポリクローナル抗体を使用したそ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まず変性した抗原で吸収し、目的の抗原に対する抗体を保持するかどうかを調べるのが有利な場合がある。

20

【 0 0 4 3 】

好ましくは、立体構造エピトープは、組み換えによって産生され、所望の構造的特徴、(例えば、エピトープの変性がないなど) を保存する条件下で抽出可能である細胞内で発現する。そのような細胞は、細菌、酵母、昆虫、及び哺乳類の細胞を含む。H C V ポリタンパク質からの組み換え立体構造エピトープの発現及び単離は、例えば、国際公開第 9 6 / 0 4 3 0 1 号、同第 9 4 / 0 1 7 7 8 号、同第 9 5 / 3 3 0 5 3 号、同第 9 2 / 0 8 7 3 4 号に記載され、その出願は、本明細書に全体にわたり参照により組み込まれる。あるいは、抗原を発現し、回収後タンパク質を更に復元することが可能である。化学合成はまた、天然の抗原の立体構造エピトープと交差反応する、立体構造抗原のミモトープを提供し得ることも理解される。

30

【 0 0 4 4 】

「抗体」(「A b」) は、抗原内に存在する目的のエピトープに特異的に結合する分子を意図する。「特異的に結合する」ことによって、抗体と、例えば試験基質との間に生じ得る非特異的な結合ではなく、抗体がエピトープを認識し、相互作用の「鍵と鍵穴」型でエピトープと相互作用して、抗原と抗体との間に複合体を形成することが意味される。したがって、例えば、H C V コア抗体は、H C V コアタンパク質に特異的に結合する分子である。用語「抗体」は、本明細書で使用するとき、ポリクローナル及びモノクローナル調製物の両方、並びに以下から得られた抗体を含む。ハイブリッド(キメラ)抗体分子 (例えば、W i n t e r e t a l . (1 9 9 1) N a t u r e 3 4 9 : 2 9 3 ~ 2 9 9 ; 及び米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号を参照されたい) ; F (a b ') 2 及び F (a b) フラグメント ; F v 分子 (共有結合性のヘテロ二量体、例えば、I n b a r e t a l . (1 9 7 2) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 6 9 : 2 6 5 9 ~ 2 6 6 2 ; 及び E h r l i c h e t a l . (1 9 8 0) B i o c h e m 1 9 : 4 0 9 1 ~ 4 0 9 6 を参照されたい) ; 単鎖 F v 分子 (s F v) (例えば、H u s t o n e t a l . (1 9 8 8) P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 5 : 5 8 7 9 ~ 5 8 8 3 を参照されたい) ; 二量体及び三量体の抗体フラグメント構築物 ; ミニボディ

40

50

(例えば、Pack et al. (1992) Biochem 31:1579~1584; Cumber et al. (1992) J Immunology 149B:120~126を参照されたい); ヒト化抗体分子(例えば、Riechmann et al. (1988) Nature 332:323~327; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534~1536; 及び1994年9月21日に公開された英国特許出願公開第2,276,169号を参照されたい); 並びに、そのような分子から得られた任意の機能性フラグメントであって、親抗体分子の免疫学的結合特性を保持するフラグメント。

【0045】

本明細書において使用するとき、用語「モノクローナル抗体」は、均質の抗体集団を有する抗体組成物を指す。この用語は、抗体の種又は起源に関して限定されず、それが作製される方法によって限定されることも意図しない。したがって、この用語は、マウスハイブリドーマから得られた抗体、並びにマウスではなくヒトのハイブリドーマを使用して得られたヒトモノクローナル抗体を包含する。例えば、Cote, et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, p. 77を参照されたい。

10

【0046】

ポリペプチドを指す場合、「単離された」ことによって、指示された分子が、その分子が自然界で見出される生物全体とは分離した別個のものである又は同じタイプの他の生体高分子の実質的非存在下で存在することが、意味される。

20

【0047】

「等価の抗原決定基」によって、HCVの株1、2、又は3からのようなHCVの異なる亜種又は株からの抗原決定基が意味される。より具体的には、エピトープは、例えば、HCV-1ポリタンパク質配列(配列番号1を参照)に対して番号が付された、大体1694~1735位で生じる、「5-1-1」のように周知であり、そのようなエピトープは株1と、2と、3との間で変化する。したがって、3つの異なる株からのエピトープ5-1-1は、等価の抗原決定基であり、したがってそれらの配列が同一でなくても「コピー」である。一般的には、等価の抗原決定基のアミノ酸配列は、高い配列相同性、例えば、2つの配列を整列させたとき30%超、好ましくは40%超のアミノ酸配列相同性を有するだろう。

30

【0048】

「相同性」は、2つのポリヌクレオチド部分又は2つのポリペプチド部分の間の類似性パーセントを指す。2つのDNA又は2つのポリペプチド配列は、その配列が、分子の所定の長さにわたり少なくとも約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%、及び最も好ましくは、少なくとも約95%~98%の配列類似性を呈するとき、互いに「実質的に相同」である。本明細書において使用するとき、実質的に相同はまた、指定のDNA又はポリペプチド配列に対する完全同一性を示す配列も指す。

【0049】

一般に「同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列の、それぞれ正確なヌクレオチド対ヌクレオチド、又はアミノ酸対アミノ酸対応を指す。同一性パーセントは、配列の位置を合わせることによって2つの分子(参照配列と、その参照配列に対する未知の%同一性を有する配列と)の間の配列情報を直接比較すること、2つの整列した配列の間の一致の正確な数を集計すること、参照配列の長さで割ること、及びその結果に100を掛けることによって、決定することができる。

40

【0050】

ペプチド解析用の、Smith and Waterman Advances in Appl. Math. 2:482~489, 1981の局所的相同性アルゴリズムに適合する、例えば、ALIGN, Dayhoff, M.O. in Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff

50

ed., 5 Suppl. 3: 353~358, National biomedical Research Foundation (Washington, D.C.)などの直ぐに利用できるコンピュータプログラムを使用して、相同性及び同一性の解析の助けとすることができる。ヌクレオチド配列の相同性を決定するためのプログラムは、Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group (Madison, Wis.)より入手可能)において利用可能であり(例えば、BESTFIT、FASTA、及びGAPプログラムなど)、これらもまた、Smith and Watermanアルゴリズムを利用している。これらのプログラムは、メーカーによって推奨され、上で参照されたWisconsin Sequence Analysis Packageに記載されるデフォルトのパラメーターで容易に利用される。例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列の相同性パーセントは、6個のヌクレオチド位置のデフォルトのスコアリングテーブル及びギャップペナルティを用いて、Smith and Watermanの相同性アルゴリズムを使用して決定することができる。

【0051】

本発明の文脈において相同性パーセントを確率する別の方法は、University of Edinburghに著作権があり、John F. Collins及びShane S. Sturrokが開発し、IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, Calif.)により流通されているMPSRCHプログラムパッケージを使用することである。このパッケージ一式から、デフォルトパラメーターをスコアリングテーブルに使用すると、Smith-Watermanアルゴリズムを使用することができる(例えば、ギャップオープンペナルティが12、ギャップ伸長ペナルティが1、及びギャップが6)。生成されたデータから、「一致」値は、「配列相同性」を示す。配列間の同一性パーセント又は類似性パーセントを計算するための他の好適なプログラムは、当該技術分野において概ね周知である。例えば、別の整合プログラムは、デフォルトパラメーターと共に使用されるBLASTである。例えば、BLASTN及びBLASTPは、次のデフォルトパラメーターを用いて使用され得る: genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR。これらのプログラムの詳細は、容易に入手可能である。

【0052】

あるいは、相同性は、相同領域間に安定した二本鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続いて一本鎖特異的ヌクレアーゼ(複数可)消化、及び消化されたフラグメントのサイズ決定によって、決定することができる。実質的に相同であるDNA配列は、例えば、その特定のシステムについて規定されるストリンジентな条件下でのサザンハイブリダイゼーション試験で同定することができる。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当業者の技能の範囲内である。例えば、上記Sambrookら;上記DNAクローニング;上記核酸ハイブリダイゼーションを参照されたい。

【0053】

「コード配列」又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置かれたときインピトロ又はインピボで転写され(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)末端の開始コドン及び3'(カルボキシ)末端の翻訳終止コドンによって決定される。転写終結配列は、コード配列に対して3'に位置され得る。

【0054】

「操作可能に連結された」ことは、そのように記載される構成要素が、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指す。したがって、コード配列に操作可能に連結された所与のプロモーターは、適切な転写因子などが存在するときコード配列の発現をもたらすことができる。プロモーターは、その発現を導くように機能する限り、コード配列に隣接している必要はない。したがって、例えば、介在する、翻訳されないが転写される配列は、転写されるイントロンが存在し得るようにプロモーター配列とコード配列との間に存在し得、プロモーター配列は、なおコード配列に対し「操作可能に連結される」と考えられる。

【0055】

核酸分子を説明するために本明細書で使用される場合、「組み換え」は、その由来又は処置のせいで、天然で結び付けられるポリヌクレオチドの全部又は一部と結び付けられないゲノム由来、cDNA由来、ウイルス由来、半合成由来、又は合成由来のポリヌクレオチドを意味する。用語「組み換え」は、タンパク質又はポリペプチドに関して使用される場合、組み換えポリヌクレオチドの発現によって産生されたポリペプチドを意味する。一般に、目的の遺伝子は、更に後述されるように、クローン化され、次に形質転換された生物内で発現する。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。

10

【0056】

「制御エレメント」は、それが結合されるコード配列の発現を助けるポリヌクレオチド配列を指す。この用語は、プロモーター、転写終結配列、上流制御ドメイン、ポリアデニル化シグナル、非翻訳領域(5'-UTR及び3'-UTR、並びに適切な場合、リーダー配列及びエンハンサーを含む)を含み、宿主細胞内のコード配列の転写及び翻訳を共同して提供する。

20

【0057】

本明細書で使用するとき、「プロモーター」は、宿主細胞内でRNAポリメラーゼを結合すること、及びそこに操作可能に連結された下流(3'方向)コード配列の転写を開始することが可能なDNA制御領域である。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又はエレメントを含む。プロモーター配列内にあるのは、転写開始部位、並びに、RNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)である。真核細胞プロモーターは、多くの場合、ただし常にではないが、「TATA」ボックス及び「CAT」ボックスを含む。

30

【0058】

RNAポリメラーゼがプロモーター配列に結合し、コード配列をmRNAに転写するとき、コントロール配列は、細胞内のコード配列の「転写を指向し」、次にこのmRNAは、コード配列によってコードされたポリペプチドに翻訳される。

【0059】

「発現カセット」又は「発現構築物」は、目的の配列(複数可)又は遺伝子(複数可)の発現を指向することができる集団を指す。発現カセットは、上述のような、目的の配列(複数可)又は遺伝子(複数可)に(それらの転写を指向するように)操作可能に連結されたプロモーターなどの制御エレメントを含み、多くの場合、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、本明細書に記載された発現カセットは、プラスミド構築物内に含まれ得る。発現カセットの構成要素に加えて、プラスミド構築物はまた、1つ又は2つ以上の選択可能なマーカー、プラスミド構築物を一本鎖DNAとして存在させるシグナル(例えば、M13複製起点)、少なくとも1つの多重クローニング部位、及び「哺乳類」複製起点(例えば、SV40又はアデノウイルス複製起点)も含み得る。

40

【0060】

本明細書で使用するとき、「形質転換」は、挿入に使用される方法に関係なく宿主細胞への外因性ポリヌクレオチドの挿入を指す：例えば、直接取り込み、トランスフェクション、感染などによる形質転換。トランスフェクションの特定の方法については、以下を更

50

に参照されたい。外因性ポリヌクレオチドは、非組込型ベクター（例えば、エピソーム）として維持され得るか、又はあるいは宿主ゲノムの中へ組み込まれ得る。

【0061】

「宿主細胞」は、外因性DNA配列によって、変換された細胞、又は形質転換できる細胞である。

【0062】

本明細書で使用する時、「生体サンプル」は、被験体から単離された組織又は流体のサンプルを指し、一般的に被験体又は被験体内に存在する抗原によって産生された抗体を含む。このような抗体及び/又は抗原を含む典型的なサンプルは、当該技術分野において周知であり、血液、血漿、血清、排泄物、尿、骨髄、胆汁、脊髄液、リンパ液、皮膚のサンプル、皮膚、呼吸器、腸、及び尿生殖路の分泌物、涙、唾液、母乳、血液細胞、臓器、生検、並びにまたインビトロ細胞培養構成成分（培地内の細胞及び組織の増殖から得られる条件培地が挙げられるがこれに限定されない）のサンプル（例えば、組み換え細胞及び細胞構成要素）が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0063】

「固体担体」は、目的のイムノアッセイで用いられるHCVポリペプチド（及び/又は本発明の組み合わせアッセイにおけるHCV抗原）が共有結合される、又は疎水性吸着などの非共有結合的手段により結合される固体マトリックスを意図する。

【0064】

「免疫学的に反応性である」又は「免疫反応性」は、問題の抗原が、HCV感染した固体からの生体サンプル内に存在する抗HCV抗体に特異的に反応すること、及び/又は問題の抗HCV抗体が、HCV感染した固体からの生体サンプル内に存在するHCV抗原に特異的に反応することを意味する。

20

【0065】

「免疫原性」は、問題の抗原が固体に投与されたとき、免疫反応を誘発することを意図する。

【0066】

「免疫複合体」は、抗体が抗原上のエピトープに結合するときに形成される結合体を意図する。

【0067】

本明細書で使用する時、用語「標識」及び「検出可能な標識」は、検出することができる分子を指し、放射性同位元素、蛍光剤、化学発光剤、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、発色団、染料、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えば、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン、又はハプテン）などが挙げられるが、これらに限定されない。用語「蛍光剤」は、検出可能な範囲の蛍光を呈することができる物質又はその一部を指す。本発明のもとで使用され得る標識の特定の実施例は、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 red、ルミノール、NADPH及び - 、 - ガラクトシダーゼが挙げられるがこれらに限定されない。

30

【0068】

II. 発明を実施する形態

本発明を詳細に説明する前に、本発明が特定の処方又は処理パラメーターに限定されないこと、したがって当然ながら変化し得ることが理解されるべきである。本明細書で用いられる専門用語が、本発明の特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。

40

【0069】

本明細書で説明されたものと同様又は同等の多数の組成物及び方法が本発明の実施に使用され得るが、好ましい材料及び方法が本明細書に記載される。

【0070】

上述したように、本発明は、NS4a/改変されたNS3のHCVポリペプチドの使用

50

が、HCV感染を検出するための優れた試薬を提供するという発見に基づいている。NS4a/改変されたNS3ポリペプチドは、立体構造エピトープ、したがって免疫反応性を保持するので、HCV感染の存在を正確かつ効率的に検出するため、単独又は他のHCV試薬との組み合わせで使用することができる。本明細書に記載されたアッセイを使用して、HCVの6個の既知の遺伝子型のいずれかによって生じたHCV感染を検出することができる。NS4a/改変されたNS3ポリペプチドは、早期HCV感染を正確に検出するための診断方法で特に有用である。この方法を使用して、HCVセロコンバージョンの初期の間にHCV感染を検出ことができ、これにより検出精度を向上させ、誤った結果の発生率を低減する。

【0071】

NS4a/改変されたNS3ポリペプチドを、イムノアッセイにおいて単独で、又は同じ若しくは異なるHCV遺伝子型及び単離株（例えば、HCVコア、E1、E2、NS3、5-1-1、c100-3、及びNS5配列の主要エピトープ）からの他のHCV抗原と組み合わせて使用することができる。この方法は、限定するものではないが、例えば、HCV抗原（及び/又は抗HCV抗体）が結合される固体担体を利用するアッセイ形式など後述のいくつかのアッセイ形式のいずれかを用いる単一のアッセイで簡便に実施され得る。

【0072】

発明の更なる理解のために、より詳細な議論が、NS4a/改変されたNS3ポリペプチド、並びにタンパク質の産生、及びタンパク質を使用する方法に関して以下に提供される。

【0073】

HCVタンパク質

HCV株のゲノムは、約9,000~12,000ヌクレオチドの単一のオープンリーディングフレームを含み、これは、ポリタンパク質に転写される。図1及び表1に示されるように、HCVポリタンパク質は、開裂時、次の順序で少なくとも10個の異なる生成物を産生する：NH₂-コア-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。コアポリペプチドは、HCV-1に対して番号が付された、配列番号1の1~191位で生じる（HCV-1ゲノムについては、Choo et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451~2455を参照されたい）。このポリペプチドは、更にプロセシングされて、ほぼ配列番号1のアミノ酸1~173を有するHCVポリペプチドを産生する。エンベロープポリペプチド、E1及びE2は、大体、配列番号1の192~383位及び配列番号1の384~746位でそれぞれ発生する。P7ドメインは、大体、配列番号1の747~809位で見出される。NS2は、タンパク質分解活性を有する内在性膜タンパク質であり、大体、ポリタンパク質の配列番号1の810~1026位で見出される。NS2は、NS3（大体、配列番号1の1027~1657位で見出される）との組み合わせで、NS2-NS3の切断しやすい結合を開裂し、次にNS3のN末端を生成し、セリンプロテアーゼ活性及びRNAヘリカーゼ活性の両方を含む大きなポリタンパク質を放出する。NS3プロテアーゼ（大体、配列番号1の1027~1207位で見出される）は、残りのポリタンパク質をプロセシングするために役立つ。ヘリカーゼ活性は、大体、配列番号1の1193~1657位で見出される。NS3は、NS3補因子（大体、配列番号1の1658~1711位で見出されるNS4a）、2つのタンパク質（大体、配列番号1の1712~1972位で見出されるNS4b、及び大体、配列番号1の1973~2420位で見出されるNS5a）、及びRNA依存性RNAポリメラーゼ（大体、配列番号1の2421~3011位で見出されるNS5b）を遊離させる。ポリタンパク質成熟の完了は、NS3セリンプロテアーゼによって触媒されたNS3-NS4a接合部での自己触媒的開裂によって開始される。

【0074】

本発明の改変されたNS3ポリペプチドは、配列番号4においてアミノ酸残基15及び

10

20

30

40

50

16がイソロイシン(I)の代わりにリシン(K)であるという点において、天然のHCV NS3ドメインに対して変異されている。この親水性アミノ酸残基による疎水性アミノ酸残基の置換は、本発明に従い、より可溶性かつ安定した形態のイムノアッセイ試薬を生成する。

【0075】

本発明の改変されたNS3ポリペプチドはまた、プロテアーゼ活性を阻害するように変異されていて、その結果、改変されたNS3ドメインを含むポリペプチド(例えば、NS4a/3ポリペプチド)の更なる開裂、並びに改変されたNS3ポリペプチドとの組み合わせで使用される追加のHCVタンパク質の触媒的開裂が阻害される。NS3ポリペプチドは、NS3プロテアーゼドメインの全て又は一部の欠失によって改変され得る。あるいは、タンパク質分解活性は、プロテアーゼドメインの活性領域内でのアミノ酸の置換によって阻害され得る。最終的に、触媒部位が改変されるようなドメインの活性領域へのアミノ酸の付加も、タンパク質分解活性の阻害を助けるだろう。好ましくは、プロテアーゼ活性を低減又は除去するようになされた改変は、天然のNS3又はNS4a/3タンパク質において立体構造エピトープを破壊しない。

10

【0076】

上述のように、プロテアーゼ活性は、全長のHCV-1ポリタンパク質に対して番号が付された、大体、配列番号1のアミノ酸1027~1207位で見出される(Choo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88: 2451~2455を参照されたい)。NS3プロテアーゼ及び活性部位の構造は、周知である。例えば、Lin, 「Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology」, Ed. S. L. Tan, Horizon Bioscience (2006)の「HCV NS3-4A Serine Proteases」; Kim et al., Cell (1996) 87: 343~355; Tomei et al., J. Virology (1993) 67(7): 4017~4026; De Francesco et al., Antivir. Ther. (1998) 3: 99~109; Koch et al., Biochemistry (2001) 40: 631~640を参照されたい。したがって、天然配列に対する欠失又は改変は、典型的にはその分子の活性部位で、又はその近くで生じるだろう。好ましい改変は、プロテアーゼの活性部位での触媒トライアド、すなわちH、D及び/又はS残基に対するプロテアーゼ不活性化のためのものである。これらの残基は、全長のHCVポリタンパク質に対して番号が付された、配列番号1の触媒トライアドのHis¹⁰⁸³、Asp¹¹⁰⁷、及びSer¹¹⁶⁵位でそれぞれ生じる(配列番号4のそれぞれ55、79、及び137位)。そのような改変は、免疫反応性を維持しながら、NS3プロテアーゼのタンパク質分解性の開裂活性を抑制する。特に好ましい置換は、本質的に保存的でなく、かつ中性であり、例えば、Ala又はグリシンによる、プロテアーゼドメインの配列番号1の1083、1107、及び1165位(配列番号4のそれぞれ55、79、及び137位)で通常見出されるアミノ酸残基の1つ又は2つ以上の置換などである。当業者は、NS3プロテアーゼの部分容易に判定して、活性を妨害するために除去することができる。

20

30

40

【0077】

更に、これらの部位における他の適切なアミノ酸改変は、当業者によって、例えば、De Francesco et al., Antivir. Ther. (1998) 3 (Suppl 3): 99~109; 及びSchechter and Berger, Biochim. Biophys. Res. Commun. (1967) 27: 157~162に記載されるように、周知のHCV NS3プロテアーゼの構造及び機能に基づき容易に判定することができる。特に、NS3プロテアーゼがセリンプロテアーゼであり、タンパク質分解機構が、セリンにより標的されたペプチド結合の求核攻撃に基づいていることは、周知である。多くの場合において、基の求核的性質は、アスパルテートによって「プロトンアクセプター状態」に保持されたヒスチジンの存在によって改善される。整列し

50

たセリン、ヒスチジン及びアスパルテートの側鎖は、ほとんどのセリンプロテアーゼに共通の触媒トライアドを構築する。セリンプロテアーゼの活性部位は、ポリペプチド基質が結合する裂溝として形成される。Schechter and Berger, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (1967) 27: 157~162では、ポリペプチド基質 (P_i, . . . , P₃, P₂, P₁, P₁', P₂', P₃', . . . , P_j) 及びそれらの対応する結合サブ部位 (S_i, . . . , S₃, S₂, S₁, S₁', S₂', S₃', . . . , S_j) のN末端からC末端までアミノ酸残基に標識が付けられ、開裂がP₁とP₁'との間で触媒されることが見出された。NS3プロテアーゼは、キモトリプシン様の折り目を示し、非常に長いペプチド基質 (P₆~P₄') の必要条件と一致する非常に長い溶媒曝露の基質結合部位を含む。NS3プロテアーゼは、基質P₁位におけるシステイン残基の優先傾向を有する。したがって、上述のような、及び当該技術分野において既知の構造及び機能に基づいて、当業者は、NS3プロテアーゼのタンパク質分解活性を妨害する働きをする他のアミノ酸の置換、付加、及び欠失を容易に決定することができる。

【0078】

NS3タンパク質分解活性の有無は、当業者らに周知の方法を用いて判定することができる。例えば、プロテアーゼ活性又はその欠如は、実施例に後述された手順を使用して、並びに当該技術分野において周知のアッセイを使用して、決定され得る。例えば、Takehita et al., *Anal. Biochem.* (1997) 247: 242~246; Kakiuchi et al., *J. Biochem.* (1997) 122: 749~755; Sali et al., *Biochemistry* (1998) 37: 3392~3401; Cho et al., *J. Virol. Meth.* (1998) 72: 109~115; Cerretani et al., *Anal. Biochem.* (1999) 266: 192~197; Zhang et al., *Anal. Biochem.* (1999) 270: 268~275; Kakiuchi et al., *J. Virol. Meth.* (1999) 80: 77~84; Fowler et al., *J. Biomol. Screen.* (2000) 5: 153~158; 及びKim et al., *Anal. Biochem.* (2000) 284: 42~48を参照されたい。

【0079】

HCVポリタンパク質の様々な領域の核酸及びアミノ酸配列を含み、コア、NS2、p7、E1、E2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a、NS5b遺伝子及びポリペプチドを含む、多数のHCV株及び単離株の核酸並びにアミノ酸配列が判定されている。例えば、単離株HCV J1.1は、Kubo et al. (1989) *Japan. Nucl. Acids Res.* 17: 10367~10372; Takeuchi et al. (1990) *Gene* 91: 287~291; Takeuchi et al. (1990) *J. Gen. Virol.* 71: 3027~3033; 及びTakeuchi et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 4626に記載される。2つの独立した単離株、HCV-J及びBKの完全なコード配列は、Kato et al., (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9524~9528及びTakamizawa et al., (1991) *J. Virol.* 65: 1105~1113によってそれぞれ記載される。

【0080】

HCV-1単離株を記載する刊行物としては、Choo et al. (1990) *Brit. Med. Bull.* 46: 423~441; Choo et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2451~2455、及びHan et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1711~1715が挙げられる。HCV単離株HC-J1及びHC-J4は、Okamoto et al. (1991) *Japan J. Exp. Med.* 60: 167~177に記載される。HCV単離株HCT 18 (およそ)、HCT 23、Th、HC

10

20

30

40

50

T 27、EC1及びEC10は、Weiner et al. (1991) *Virology* 180: 842~848に記載される。HCV単離株Pt-1、HCV-K1、及びHCV-K2は、Enomoto et al. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 1021~1025に記載される。HCV単離株A、C、D、及びEは、Tsukiyama-Kohara et al. (1991) *Virus Genes* 5: 243~254に記載される。

【0081】

本発明に従いNS4a/改変されたNS3ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2に示される。配列は、N末端からC末端の方向で、N末端Metを含み、アミノ酸2~14は、NS4aであり、介在するアミノ酸SGSが続き、改変されたNS3であるアミノ酸18~646が続く(アミノ酸32及び33はリシンであり、アミノ酸154はアラニンである)。

10

【0082】

抗HCV抗体

抗HCV抗体(同じ又は異なるHCVドメインエピトープに対して指向される)は、例えば、HCV抗コア抗体を含み得る。本発明において有用な特定の抗コア抗体の実施例は、抗体分子、例えば、配列番号1のアミノ酸10~53、配列番号1のアミノ酸10~45、配列番号1のアミノ酸67~88、配列番号1のアミノ酸120~130の間で見出されるコア領域内のエピトープに対して指向されるモノクローナル抗体、又は、例えば、米国特許第6,630,298号;米国特許第6,150,087号;米国特許第6,346,375号;Houghtonら、米国特許第5,350,671号;Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 10011~10015;Chien et al., *J. Gastroent. Hepatol.* (1993) 8: S33~39;Chienら、国際公開第93/00365号;及びChien, D.Y.、国際公開第94/01778号(これらの開示は、本明細書に全体にわたり参照により組み込まれる)で同定されるコアエピトープのいずれかに対して指向される抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0083】

図6に示される本発明の一実施形態では、迅速な捕捉リガンドイムノアッセイが、NS4a/改変されたNS3ポリペプチドを使用して実行される。サンプルは、抗原と混ぜ合わされ、この抗原は、更に後述されるように固体担体上に存在し得る。サンプルがHCVに感染している場合、固体担体上に存在するそれらのエピトープに対するHCV抗体は、固体担体成分に結合する。検出は、検出可能なマーカー(図6に示されるように西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)など)の抗原/抗体複合体のメンバーへの接着による。接着は、共有結合的手段によってもよく、若しくはその後の標準サンドイッチアッセイにおけるような検出可能に標識された抗体の結合によってもよく、又は酵素反応によってもよく、この反応の生産物は検出可能である。検出可能なマーカーとして、発色団、抗体、抗原、酵素、その開裂生成物が検出可能である酵素反応性化合物、ローダミン若しくはローダミン誘導体、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、蛍光剤化合物、化学発光化合物(ジメチルアクリジニウムエステル(DMAE)など)、これらのマーカーの誘導体及び/又は組み合わせを挙げることができるがこれらに限定されない。ヒトIgG分子の存在を検出することができる、検出可能に標識された抗ヒト抗体は、都合よく使用することができる。

30

40

【0084】

図7に示される本発明の更なる実施形態では、迅速な捕捉リガンドイムノアッセイが、NS4a/改変されたNS3ポリペプチド及び抗HCV抗体を使用して実行される。サンプルは、ポリペプチド及び抗HCV抗体と混ぜ合わされ、これらは、更に後述されるように固体担体上に存在し得る。サンプルがHCVに感染している場合、固体担体上に存在するそれらのエピトープに対するHCV抗体は、固体担体成分に結合し、固体担体上の抗体エピトープに免疫学的に反応性であるHCV抗原もまた固体担体成分に結合する。検出は

50

、検出可能なマーカー（図7に示されるように西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）などの抗原/抗体複合体のメンバーへの接着による。接着は、共有結合的手段によってもよく、若しくはその後の標準サンドイッチアッセイにおけるような検出可能に標識された抗体の結合によってもよく、又は酵素反応によってもよく、この反応の生産物は検出可能である。検出可能なマーカーとして、発色団、抗体、抗原、酵素、その開裂生成物が検出可能である酵素反応性化合物、ローダミン若しくはローダミン誘導体、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、蛍光剤化合物、化学発光化合物（ジメチルクリジニウムエステル（DMAE）など）、これらのマーカーの誘導体及び/又は組み合わせを挙げることができるがこれらに限定されない。ヒトIgG分子の存在を検出することができる、検出可能に標識された抗ヒト抗体は、都合よく使用することができる。

10

【0085】

そのようなアッセイは、HCVに感染した個体の生体サンプルに存在し得る、HCV抗原及びHCV抗体の両方を検出することができるHCV組み合わせアッセイである。

【0086】

HCV抗原の産生

上述のように、本発明の分子は、一般に、組み換え的に産生される。したがって、本発明で使用するHCV抗原をコードするポリヌクレオチドは、分子生物学の標準技術を使用して作製され得る。例えば、上述の分子をコードするポリヌクレオチド配列は、例えば、その遺伝子を発現する細胞からcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、又はその遺伝子を含むことが知られているベクターからその遺伝子を誘導することによってなど、組み換え法を使用して得ることができる。更に、所望の遺伝子は、Houghtonら、米国特許第5,350,671号などで、当該技術分野において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することができる。目的の遺伝子はまた、クローン化されるのではなく合成的にも産生され得る。この分子を、特定の配列用に適切なコドンで設計することができる。次に完全な配列は、標準手法によって調製された重複オリゴヌクレオチドからアセンブリされ、完全なコード配列にアセンブリされる。例えば、Edge (1981) Nature 292:756; Nambair et al. (1984) Science 223:1299; 及びJay et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:6311を参照されたい。

20

【0087】

したがって、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を有するベクターから得ることができる、又は適切な場合、例えば、部位特異的突然変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術などの当該技術分野において周知の様々なオリゴヌクレオチド合成技術を使用して完全に若しくは部分的に合成することができる。例えば、上記Sambrookを参照されたい。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、従来の核酸自動合成装置で産生された重複合成オリゴヌクレオチドの補集合をアニールし、続けて適切なDNAリガーゼによるライゲーション、及びPVRを介してライゲーションされたヌクレオチド配列の増幅を行うことによるものである。例えば、Jayaraman et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4084~4088を参照されたい。加えて、オリゴヌクレオチド指向性合成（Jones et al. (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性突然変異誘発（Riechmann et al. (1988) Nature 332:323~327及びVerhoeyen et al. (1988) Science 239:1534~1536）、及びT. sub. 4 DNAポリメラーゼを用いるギャップの付いたオリゴヌクレオチドの酵素的充填（Queen et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029~10033）を本発明の下で使用して、変化した若しくは強化された抗原結合能力及び/又は低減した免疫原性を有する分子を提供することができる。

30

40

【0088】

NS3、又は他のHCV抗原などの所望のヌクレオチド配列の突然変異体又は類似体を

50

産生する方法は、周知である。例えば、Dasmahapatraら、米国特許番号第5,843,752号、及びZhangら、同第5,990,276号を参照されたい。イムノアッセイで用いる改変されたNS3及び他のHCVタンパク質は、目的のポリペプチドをコードする配列の一部の欠失により、配列の挿入により、及び/又は配列内の1つ又は2つ以上のヌクレオチドの置換により、調製され得る。ヌクレオチド配列を改変するための技術(例えば、部位特異的突然変異誘発など)は、当業者に周知である。例えば、上記Sambrookら; Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoder et al. (1987) BioTechniques 5:786; Zoller and Smith (1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbiec-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409を参照されたい。

10

【0089】

ひとたびコード配列が調製されるか又は単離されると、そのような配列を、任意の好適なベクター又はレプリコンの中にクローン化することができる。多くのクローニングベクターは、当業者らに周知であり、適切なクローニングベクターの選択は、選択できる問題である。好適なベクターとしては、適切な制御エレメントと関連付けられたときに複製することができるプラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、又はウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0090】

次にコード配列を、発現に使用される系に依存して好適な制御エレメントの制御下に置く。したがって、目的のDNA配列が好適な形質転換体によってRNAに転写されるように、コード配列を、プロモーター、リボソーム結合部位(細菌発現のため)、及び所望により作動因子、の制御下に置くことができる。コード配列は、翻訳後プロセッシングにおいて、後で宿主によって除去することができるシグナルペプチド又はリーダー配列を含んでも含まなくてもよい。例えば、米国特許第4,431,739号;同第4,425,437号;同第4,338,397号を参照されたい。

20

【0091】

コントロール配列に加えて、宿主細胞の増殖に対して配列の発現の調整を可能にする調節配列を追加することが望ましい場合がある。調節配列は、当業者らに周知であり、例として、制御化合物の存在を含む化学的又は物理的刺激に応答して遺伝子の発現をオンオフさせる調節配列が挙げられる。他のタイプの制御エレメントもまたベクター内に存在してもよい。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向上させるために本明細書で使用され得る。例として、SV40初期遺伝子エンハンサー(Dijkema et al. (1985) EMBO J. 4:761)、Rous Sarcoma Virusの長末端反復(LTR)由来のエンハンサー/プロモーター(Gorman et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:677)及びヒトCMV由来のエレメント(Boshart et al. (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など(米国特許第5,688,688号))が挙げられる。発現カセットは、好適な宿主細胞における自律複製のための複製起点、1つ又は2つ以上の選択可能マーカ、1つ又は2つ以上の制限部位、高いコピー数の潜在能力、及び強力なプロモーターを更に含み得る。

30

40

【0092】

発現ベクターは、特定のコード配列が適切な調節配列と共にベクター内に位置するように構築され、コード配列の位置及び向きは、コード配列がコントロール配列の「制御」下で転写されるようなものである(すなわち、コントロール配列で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が、この結果を得るために望ましい場合がある。例えば、場合によっては、適切な向きでコントロール配列に接着することができるように(すなわち、読み枠を維持するために)、配列を改変することが必要な場合がある。コントロール配列及び他の調節配列は、ベクター

50

への挿入の前にコード配列にライゲーションされてもよい。あるいは、コード配列は、コントロール配列及び適切な制限部位を既に含む発現ベクター内に直接クローン化することができる。

【0093】

分子は、昆虫、哺乳類、細菌、ウイルス、及び酵母の発現系を含む、広範な種類の系で発現することができ、これらは全て当該技術分野において周知である。例えば、バキュロウイルス系などの昆虫細胞発現系は、当業者らに周知であり、例えば、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)に記載されている。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系の材料及び方法は、キット形式で、とりわけ、Invitrogen (San Diego, Calif.)から市販されている(「MaxBac」キット)。同様に、細菌及び哺乳類の細胞発現系は、当該技術分野において周知であり、例えば、上記Sambrookらに記載されている。酵母発現系もまた、当該技術分野において周知であり、例えば、Yeast Genetic Engineering (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, Londonに記載されている。

10

【0094】

上記の系で使用するための多数の適切な宿主細胞もまた周知である。例えば、哺乳類細胞株は、当該技術分野において周知であり、American Type Culture Collection (ATCC)から入手可能な不死化細胞株を含む(例えば、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎培養細胞(COS)、ヒト胎児由来腎臓細胞、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、メイディングービーウシ腎臓(「MDBK」)細胞、並びにその他であるが、これらに限定されない)。同様に、細菌宿主(例えば、E. coli、Bacillus subtilis、及びStreptococcus spp)は、本発現構築物との使用を見出すだろう。本発明における有用な酵母宿主としては、とりわけ、Saccharomyces cerevisiae、Candida albicans、Candida maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、Pichia guillierimondii、Pichia pastoris、Schizosaccharomyces pombe、及びYarrowia lipolyticaが挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターと共に使用する昆虫細胞としては、とりわけ、Aedes aegypti、Autographa californica、Bombyx mori、Drosophila melanogaster、Spodoptera frugiperda、及びTrichoplusia niが挙げられる。

20

30

【0095】

目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、当該技術分野において周知の様々な遺伝子送達技術を用いて、宿主細胞ゲノムの中に安定的に組み込むことができ、又は好適な宿主細胞内で安定したエピソームエレメント上に維持することができる。例えば、米国特許第5,399,346号を参照されたい。

40

【0096】

選択された発現系及び宿主に応じて、分子は、上述の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を成長させることによってタンパク質が発現する条件下で産生される。発現したタンパク質を次に宿主細胞から単離し、精製する。発現系が、増殖培地中にタンパク質を分泌する場合、生産物を培地から直接精製することができる。分泌しない場合、これを細胞可溶化物から単離することができる。適切な増殖条件及び回収方法の選択は、当業者の技能の範囲内である。

【0097】

様々なHCV抗原の組み換え産生が、説明されている。例えば、国際公開第94/01

50

778号、同第93/00365号、同第04/00547号、及び同第01/38360号；米国特許第5,350,671号、同第5,683,864号、同第6,346,375号、同第6,150,087号、同第6,514,731号、同第6,428,792号、及び同第6,632,601号；Chien et al., J. Gastroent. Hepatol. (1993) 8: S33~39；Chien, D.Y., 国際公開第94/01778号；Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011~10015；(それらの全ての開示を全体にわたり参考として引用し、本明細書に組み込む)を参照されたい。NS4a/改変されたNS3ポリペプチドを産生する好ましい方法を以下に説明する。

【0098】

免疫診断アッセイ

ひとたび産生されると、そのHCV抗原を、周知の抗原を使用する実質的に任意のアッセイ形式で使用して、抗体を検出することができる。これらのアッセイ全ての共通の特徴は、サンプル中に存在する任意のそのような抗体に、抗原が結合することを可能にする条件下で、抗原を、HCV抗体を含むと疑われる生体サンプルと接触させることである。そのような条件は、典型的には、過剰の抗原を使用した、生理的な温度、pH、及びイオン強度であろう。抗原の検体によるインキュベーションの後に、抗原からなる免疫複合体の検出が続く。

【0099】

イムノアッセイの設計は、大きな変動の対象であり、多くの形式が当該技術分野において周知である。プロトコルは、例えば、固体担体、又は免疫沈降を使用してもよい。ほとんどのアッセイは、標識された抗体又はポリペプチドの使用を伴う；この標識は、詳細に上述されたように例えば、酵素分子、蛍光分子、化学発光分子、放射能分子、又は色素分子であってもよい。免疫複合体からのシグナルを増幅するアッセイも周知である；その例は、ビオチン及びアビジンを利用するアッセイ、並びに酵素標識及び酵素媒介イムノアッセイ(例えば、ELISAアッセイなど)である。

【0100】

イムノアッセイは、制限なしに、不均一形式若しくは均一形式で、かつ標準型又は競合型のものであってもよい。不均一形式では、ポリペプチドは、典型的に固体マトリックス又は固体担体に結合されて、インキュベーション後のポリペプチドからのサンプルの分離を促進する。固体担体は、この発明の目的のために、不溶性マトリックスである任意の材料であり得、剛体面又は半剛体面を有し得る。代表的な固体担体として、ニトロセルロースのような基質(例えば、膜又はマイクロタイターウェル形態で)；ポリ塩化ビニル(例えば、シート又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、ビーズ又はマイクロタイタープレート)；ポリビニリデンフルオリド；ジアゾ化紙；ナイロン膜；活性化ビーズ、磁気応答性ビーズなどが挙げられるが、これらに限定されない。特定の担体としては、プレート、ペレット、ディスク、毛管、中空繊維、針、ピン、中実繊維、セルロースビーズ、細孔ガラスビーズ、シリカゲル、必要に応じてジビニルベンゼンで架橋されたポリスチレンビーズ、グラフトコポリビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、必要に応じてN-N'-ビス-アクリロイルエチレンジアミンで架橋されたジメチルアクリルアミドビーズ、及び疎水性ポリマーでコーティングされたガラス粒子が挙げられる。

【0101】

必要に応じて、固体担体に追加されるべき分子を、容易に官能化して、スチレン部分又はアクリレート部分を作製することができ、このようにしてポリスチレン、ポリアクリレート若しくは他のポリマー、例えばポリイミド、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリビニル、ポリジアセチレン、ポリフェニレン-ビニレン、ポリペプチド、多糖類、ポリスルホン、ポリピロール、ポリイミダゾール、ポリチオフエン、ポリエーテル、エポキシ、シリカガラスシリカゲル、シロキサン、ポリホスフェート、ハイドロゲル、アガロース、セルロースなどへのこの分子の取り込みを可能にする。

10

20

30

40

50

【0102】

アッセイにおいて、例えば、NS4a / 改変されたNS3ポリペプチド及び別のHCV抗原など1種より多いHCV抗原が使用される場合、抗原を、同じ固体基質又はアッセイで組み合わせられる異なる固体基質上に提供することができる。したがって、例えば、抗原は、別個の実体として、例えばプレート上に存在し得、又は、例えば目的のアッセイで使用するために共に追加される個々のマイクロビーズ上に存在し得る。

【0103】

1つの状況では、図6に示されるように、固体担体は、分子が担体に十分に固定されるような好適な結合条件下で最初にNS4a / 改変されたNS3ポリペプチド（本明細書では集合的に「固相成分」と呼ばれる）などのHCV抗原と反応する。時として、担体への固定は、抗原のより良好な固相結合特性を有するタンパク質への最初のカップリングによって強化することができる。好適なカップリングタンパク質として、マクロ分子、例えばウシ血清アルブミン（BSA）を含む血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシニアン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミン、及び当業者に周知である他のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。分子を担体に結合するために使用され得る他の試薬は、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどが挙げられる。そのような分子及びこれらの分子を抗原にカップリングする方法は、当業者に周知である。例えば、Brinkley, M. A. (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 2 ~ 13; Hashida et al. (1984) *J. Appl. Biochem.* 6: 56 ~ 63; 及びAnjaneyulu and Staros (1987) *International J. of Peptide and Protein Res.* 30: 117 ~ 124を参照されたい。

10

20

【0104】

固体担体を固相成分と反応させた後、任意の非固定化固相成分は、洗浄によって担体から除去され、担体に結合した成分を、次に好適な結合条件下で、HCV抗体を含むと疑われる生体サンプル（本明細書では集合的に「リガンド分子」と呼ばれる）と接触させる。HCV抗体がサンプル中に存在する場合、これらは、HCV抗原と共に複合体を形成するだろう。任意の非結合リガンド分子を除去するために洗浄した後、抗HCV抗体上のエピトープを認識する抗異種（例えば、抗ヒト）抗体など、検出可能に標識された抗体を追加する。これらの抗体は、複合体形成によって結合する。

30

【0105】

当該技術分野において周知である、更なるアッセイ形式では、ストレプトアビジンでコーティングされた固体担体は、改変されたNS3に結合するビオチン標識抗体と反応する。生体サンプルを、好適な結合条件下で追加する。HCV抗体がサンプル中に存在する場合、これらは、HCV抗原と共に複合体を形成するだろう。任意の非結合リガンド分子を除去するために洗浄した後、検出可能に標識された抗体を上述のように添加する。

【0106】

均一形式では、テストサンプルを、溶液中の抗原の組み合わせと共にインキュベートする。例えば、形成される任意の抗原抗体複合体を沈降させる条件下にあってもよい。均一アッセイに関する標準形式及び競合形式の両方が、当該技術分野において周知である。

40

【0107】

標準形式では、抗体抗原複合体を形成するHCV抗体の量を直接監視する。これは、抗HCV抗体上のエピトープを認識する標識された抗異種（例えば、抗ヒト）抗体が、複合体形成が原因で結合するかどうかを決定することによって達成され得る。競合形式では、サンプル内のHCV抗体の量が、複合体における既知の量の標識抗体（又は他の競合するリガンド）の結合で競合効果を監視することによって推定される。

【0108】

より具体的には、抗HCV抗体（又は、競合アッセイの場合、競合する抗体の量）を含んで形成される複合体は、形式に依存して、多数の周知の技術のいずれかによって検出さ

50

れる。例えば、複合体における未標識HCV抗体は、標識（例えば、酵素標識）と複合された抗異種Igの抱合体を使用して検出することができる。免疫沈降又は凝集アッセイの形式において、HCV抗原と抗体との間の反応は、溶液又は懸濁液から沈降するネットワークを形成し、沈降物の可視層又は薄膜を形成する。生体サンプル中に抗HCV抗体が存在しない場合は、可視の沈降物は形成されない。結合された抗体及び抗原を有するイムノアッセイ固体担体、並びに捕捉したサンプルと反応することになる抗体及び抗原を含む上述のアッセイ試薬は、上述のようにイムノアッセイを行うために好適な指示書及び他の必要な試薬と共にキットで提供され得る。そのキットは、通常、抗原及び/又は抗体の組み合わせ（固体担体に結合されていても、固体担体に結合するための試薬と別でもよい）、コントロール抗体及び/又は抗原の処方物（陽性及び/又は陰性）、アッセイ形式が標識抗体及び/又は抗原を要求する場合の標識抗体及び/又は抗原、並びに標識がシグナルを直接生成しない場合のシグナル生成試薬（例えば、酵素基質）を別個の容器で含む。アッセイを実行するための指示書（例えば、文書、テープ、VCR、CD-ROMなど）は、通常キットの中に含まれるであろう。キットは、使用される特定のイムノアッセイに応じて、他のパッケージ試薬及び材料（すなわち洗浄緩衝液など）も含む場合がある。上述されたような標準イムノアッセイは、これらのキットを使用して実行することができる。

【0109】

同様に、抗HCV抗体はまた、抗体を検出するための周知の抗原と組み合わせ、抗原を検出するための周知の抗体を使用する実質上任意のアッセイ形式で使用され得る。図7に示されるように、固体担体は、HCV抗原（NS4a/改変されたNS3ポリペプチドとして示される）と反応し、また抗HCVコア抗体とも反応する。

【0110】

III. 実験

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の実施例である。実施例は、例示の目的のみで提供され、いかなるようにも本発明の範囲を限定することを意図しない。

【0111】

使用された数字（例えば、量、温度など）に対する精度を確保する努力がなされたが、ある程度の実験誤差及び偏差は、当然ながら許容されるべきである。

【0112】

C型肝炎ウイルス特異抗体の早期発見のためにイムノアッセイの感度を向上させるためのNS4a/改変されたNS3ポリペプチド立体構造抗原のクローニング、発現、及び精製。

【0113】

S. cerevisiae (AD3株)における直接発現のためにHCV NS4a/NS3. KK変異体セリンプロテアーゼの遺伝子組み換えを行った。発現カセットを、pBS24.1酵母発現ベクター内にクローン化した(図2)。pBS24.1酵母シャトルベクターは、酵母における自律複製のための2µ配列、並びに選択可能マーカーとして酵母遺伝子leu2-d及びURA-3を含む。ラクタマーゼ遺伝子及びColE1複製起点は、細菌におけるプラスミド複製に必要である。抗原/タンパク質は、ハイブリッドADH2/GAPDHプロモーターの制御下で発現する。NS4a/NS3. KK変異体抗原(図3参照)は、可撓性SGS(Ser-Gly-Ser)配列を通してNS3のN末端に接着されるNS4aタンパク質の13aaセグメント(最小ドメインと呼ばれる)を利用する。この配列は、NS4aを、プロテアーゼ内部のポケットの中に折り畳み、酵素的に活性な分子を作製することができるようにする。NS3プロテアーゼ活性による自己加水分解を回避するために、プロテアーゼの触媒トライアドの(配列番号1の)Ser1165を、米国特許第7,491,808B2で以前に説明されたように、Alaに変異させた。加えて、1組の帯電したLys残基を、プロテアーゼのN末端上に導入し(配列番号1のHCV aa1043及び1044)、Ile残基を置換して、精製されたNS4a/NS3分子の可溶性を向上させた。米国特許第7,491,808B2号に記載されるNS3ドメインは、Tyr1428Pro及びSer1429Ile(配列番号

10

20

30

40

50

1を基準として)に突然変異を有する(P I突然変異と省略され、プロテアーゼ開裂部位を除去するために導入された)。これらのP I突然変異は、セリンプロテアーゼの活性が除去されているので、本明細書では、NS 4 a / NS 3 . K K変異体内で除去され、天然のH C V 1 a配列、T y r 1 4 2 8及びS e r 1 4 2 9に戻される。配列番号1の1 4 2 8位でのP r o置換は、NS 4 a / NS 3分子の立体構造の不安定化効果を及ぼした恐れがある。

【0114】

図4は、発現プラスミドp d . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K (配列番号2)の環状マップを示す。

【0115】

クローニング。

3つの突然変異(I l e 1 0 4 3 L y s、I l e 1 0 4 4 L y s、S e r 1 1 6 5 A l a)を有するNS 4 a - ターン - NS 3をコードするプラスミドp d . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K Kを以下のように4工程の手順で生成した。

【0116】

最初に、次のDNA断片を共にライゲーションした：(a)米国特許第7,491,808号に記載されるように、p S P 7 2 . H i n d I I I - C l a . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 # 1 4から調製されたA v r 2 - C l a I脱リン酸化ベクター、(803bpのH i n d I I I - C l a I挿入は、配列番号5：A C A A A C A A Aの配列、イニシエーターA T G、引き続きNS 4のa a 1 6 7 8 ~ 1 6 9 0のためのコドン、S e r - G l y - S e rターン配列及びNS 3 a a 1 0 2 9 ~ 1 2 7 4(配列番号1を基準として)を提供する。アミノ酸1165を、S e rからA l aに変異させた。p S P 7 2は、P r o m e g a (M a d i s o n , W I), G e n B a n k / E M B Lアクセッション番号X 6 5 3 3 2から入手される市販のベクターである)；(b)A v r 2 - B g l I制限末端を有し、H C V a a 1 0 4 0 ~ 1 0 4 6をコードする、かつ所望のI l e 1 0 4 3 L y s及びI l e 1 0 4 4 L y s突然変異を導入する合成オリゴヌクレオチド、A B - 1及びA B - 2；(c)p S P 7 2 . H i n d I I I - C l a . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 # 1 4からゲル精製した683bpのB g l I - C l a I DNAフラグメント；B g l I - C l a Iフラグメントは、H C V N S 3 a a 1 0 4 6 ~ 1 2 7 4をコードする。

【0117】

A B - 1

配列番号6：C T A G G G T G C A A G A A G A C C A G C C T A A C

【0118】

A B - 2

配列番号7：A G G C T G G T C T T C T T G C A C C

【0119】

ライゲーション混合物をH B 1 0 1コンピテントセルに形質転換し、100ug/mLアンピシリンを含むL u r i a寒天プレート上に平板培養した。個々のクローンのM i n i p r e p解析は、推定される陽性の同定を導き、それらは増幅され、配列決定された。正しい配列を有するクローンは、p S P 7 2 . H i n d I I I - C l a . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K # 1と命名された。プラスミドのアリコートをし、続いてE . c o l i株S C S 1 1 0に形質転換して、後続のクローニング工程で必要とされるC l a I制限部位をブロックするd a mメチル化を回避した。(p T 7 H C Vは、C h o oらのH C Vの配列番号1とは、アミノ酸残基9が、Kの代わりにRであり、アミノ酸残基11が、Nの代わりにTであるという点だけが異なる。)

【0120】

2番目に、天然のH C V 1 a配列(配列番号1)のNS 3 a a 1 2 7 4 ~ 1 6 5 7のためのコドンを提供するC l a I - S a l Iフラグメントをクローニングする目的のために次のDNA断片を共にライゲーションした：(a)p S P 7 2から調製されたH i n

10

20

30

40

50

d I I I - S a l I 脱リン酸化ベクター；(b) p S P 7 2 . H i n d I I I - C l a . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 # 1 4 から調製された 8 0 3 b p の H i n d I I I - C l a I 制限フラグメント；(c) 米国特許第 7 , 4 4 9 , 5 6 6 (B 2) 号に記載されるように、N S 3 a a 1 2 7 4 ~ a a 1 6 4 7 をコードする、p T 7 H C V から調製された、H C V 1 a ゲノム全体（配列番号 1 を参照）を包含する p U C 1 8 構築物である、1 1 2 1 b p の C l a I - A v a I I I 制限フラグメント（以下もまた参照されたい：M i c h a e l V a j d y e t a l . , J o f G e n e r a l V i r o l o g y , 2 0 0 6 : 8 7 , p . 2 2 5 3 ~ 2 2 6 2 ; (d) a a 1 6 5 7 までの N S 3 配列を完成させ、また 2 つの終止コドンにコードする、2 つの A v a I I I - S a l I オリゴヌクレオチド、a v s a l - 1 及び a v s a l - 2) 。

10

【0121】

a v s a l - 1

配列番号 8 : T G T C G G C C G A C C T G G A G G T C G T C A C G T G A T A A G

【0122】

a v s a l - 2

配列番号 9 : T C G A C T T A T C A C G T G A C G A C C T C C A G G T C G G C C G A C A T G C A

【0123】

ライゲーション混合物を H B 1 0 1 コンピテントセルに形質転換し、1 0 0 u g / m L アンピシリンを含む L u r i a 寒天プレート上に平板培養した。個々のクローンの M i n i p r e p 解析は、推定される陽性の同定を導き、それらは増幅され、配列決定された。正しい配列を有するクローンは、p S P 7 2 . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 # 2 と命名された。プラスミドのアリコートをし、続いて E . c o l i 株 S C S 1 1 0 に形質転換して、C l a I 制限部位をブロックする d a m メチル化を回避した。

20

【0124】

3 番目に、酵母発現ベクターの中に直接クローニングする試みが失敗したので、サブクローニングベクターの中に 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K コード配列全体をクローニングする目的のために次の DNA 断片を共にライゲーションした：(a) p S P 7 2 から調製された H i n d I I I - S a l I 脱リン酸化ベクター；(b) p S P 7 2 . H i n d I I I - C l a . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K # 1 からの 8 0 3 b p の H i n d I I I - C l a I フラグメント；(c) p S P 7 2 . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 # 2 からの 1 1 5 8 b p の C l a I - S a l I フラグメント。ライゲーション混合物を H B 1 0 1 コンピテントセルに形質転換し、1 0 0 u g / m L アンピシリンを含む L u r i a 寒天プレート上に平板培養した。個々のクローンの M i n i p r e p 解析は、p S P 7 2 . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K # 3 と命名された陽性クローンの同定を導いた。

30

【0125】

最後に、酵母発現プラスミドを作製するために次の DNA 断片を共にライゲーションした：(a) B a m H I - S a l I 脱リン酸化 p B S 2 4 . 1 酵母発現ベクター；(b) 酵母ハイブリッドプロモーター A D H 2 / G A P D H のための 1 3 6 6 b p の B a m H I - H i n d I I I フラグメント；(c) p S P 7 2 . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K # 3 からの 1 9 6 1 b p の H i n d I I I - S a l I フラグメント。ライゲーション混合物を、H B 1 0 1 コンピテントセルに形質転換した。ミニスクリーン解析後、予想される 3 3 2 5 b p の B a m H I - S a l I 制限フラグメントを有するクローンは、p d . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K # 7 として同定された（図 4）。

40

【0126】

酵母形質転換。

S . c e r e v i s i a e 株 A D 3 (M A T a , l e u 2 , u r a 3 - 5 2 , p r b 1 - 1 1 2 2 , p e p 4 - 3 , p r c 1 - 4 0 7 , g a l 2 , [c i r 0] , : p D M 1 5 (p G A P / A D R 1 : G 4 1 8 R) , : Y i p 5 l e u A D) を、S . c . E a s y C o m p T r a n s f o r m a t i o n K i t (I n v i t r o g e n , (C a r l

50

s b a d , C A) より入手される) を使用して、p d . 4 a . t . n s 3 . 1 1 6 5 . K K # 7 によって形質転換した。ウラシルを含まない寒天プレートで増殖された形質転換体(8%グルコースを用いた U r a - 寒天プレート)を、単一のコロニーについて画線し、L e u - 8 % グルコース寒天プレート上にパッチして、プラスミドコピー数を増加させた。7 . 1 % グルコースを含有する L e u - 液体スターター培養物を 3 0 で 2 4 時間にわたり増殖させ、次に、Y E P D (1 % 酵母抽出物、2 % バクトペプトン、2 % グルコース) 培地に 1 : 2 0 に希釈した。細胞を 3 0 で 4 8 時間及び 2 5 で増殖させた。発現をテストするために、細胞のアリコートをし、溶解緩衝液中でガラスビーズを用いて溶解した。組み換えタンパク質は、クマシーブルー染色によって検出され、モノクローナル抗体の抗 C 3 3 C 4 D - 1 を使用した免疫ブロット解析によって確認されたように酵母において高レベルで発現した。(この抗体は、S a n s a n L i n e t . a l , J o u r n a l o f C l i n i c a l M i c r o b i o l o g y , A u g . 2 0 0 5 , p . 3 9 1 7 ~ 3 9 2 4 に記載されている。)

10

【0127】

組み換え H C V 4 a . t . N S 3 . 1 1 6 5 . K K タンパク質の精製(ターン変異体 K K を「T M K K」とする)。

【0128】

T M K K タンパク質(N S 4 a / 改変された N S 3 ポリペプチド)を次のように精製した: N S 4 a . t . N S 3 . 1 1 6 5 K K ターン変異体を発現する S . c e r e v i s i a e 細胞を、回収し、溶解緩衝液中(50 mM T r i s - C l p H 8 . 0、10 mM E D T A、R o c h e C o m p l e t e プロテアーゼ阻害剤錠剤)に懸濁させ、D y n o - M i l l (W a b W i l l y A . B a c h o f o n (B a s e l , S w i t z e r l a n d)) 又は同等の装置内で、ガラスビーズを、細胞: 緩衝液: 0 . 5 mm ガラスビーズを 1 : 1 : 1 の比で使用して溶解した。35 分間の溶解後、可溶化物のサンプルを顕微鏡法によって視覚的に検査して、細胞破損が少なくとも 95 % 完了したことを確認した。可溶化物を採取して、17,700 x g で 30 分間 4 にて遠心分離し、可溶性タンパク質を含むペレットを、抽出緩衝液(50 mM T r i s - C l p H 8 . 0、1 M N a C l、10 mM E D T A; 2 mL / 初期細胞ペレットの重量 g) に追加し、ビーカー内で 30 分間室温にて攪拌した。この懸濁液を、30,100 x g で 30 分間 4 にて遠心分離し、可溶化された T M K K を含む上澄を、更なる精製のために採取した。

20

30

【0129】

固体硫酸アンモニウムをこの上澄に 30 % の濃度まで追加して、氷上で 3 時間攪拌した。沈降物を、30,100 x g で 30 分間 4 での遠心分離によって採取した。ペレットを 1 x P B S (0 . 5 mL / gm 開始ペレット重量) に再懸濁し、30 分間室温で攪拌し、次に希釈緩衝液 # 1 (50 mM T r i s - C l p H 7 . 5、50 mM N a C l、5 mM D T T、10 % グリセロール) で 4 倍に希釈した。希釈された懸濁液を静かに一晚 4 にて攪拌した。

【0130】

一晚の攪拌後、この懸濁液を、30,100 x g で 4 にて遠心分離した。上澄を採取し、希釈緩衝液 # 2 (50 mM M E S p H 6 . 0、5 mM D T T、0 . 0 2 % T w e e n - 2 0、10 % グリセロール) で 2 倍に希釈し、S P S e p h a r o s e F a s t F l o w i o n e x c h a n g e c o l u m n (G E H e a l t h c a r e) に適用した。ローディングが完了すると、カラムを S P カラム緩衝液(50 mM M E S p H 6 . 0、37 . 5 mM N a C l、5 mM D T T、0 . 0 2 % T w e e n - 2 0、10 % グリセロール) で洗浄し、カラム緩衝液中で最大 0 . 7 M まで増加する N a C l 勾配を用いて T M K K をカラムから溶出した。画分を、クマシー染色された S D S P A G E ゲルの目視検査に基づきプールした。

40

【0131】

S P S e p h a r o s e 精製した T M K K を含むプールを、希釈緩衝液 # 3 (50 mM T r i s - C l p H 8 . 0、5 mM D T T、10 % グリセロール) で 2 倍に希釈

50

し、pHを8.0に調節した。サンプルを、カラム緩衝液(50mM Tris-Cl pH8.0、150mM NaCl、5mM DTT、0.02% Tween-20、10%グリセロール)中で平衡化されたhydroxyapatite type I column (Bio-Rad)に適用した。ローディングが完了すると、カラムを200mM NaClを含むカラム緩衝液で洗浄した。280nmで測定された吸光度が基準に戻るまでロード及び洗浄の画分を採取した。カラムは、再生緩衝液(500mM NaPO₄ pH7.0、150mM NaCl、5mM DTT、0.02% Tween-20、10%グリセロール)で剥離された。画分を、SDS-PAGEによって解析し、精製されたTMKKタンパク質を含む流れる画分及び洗浄の画分をプールした。30kDのカットオフコンセントレーターを使用してプールを1~2mg/mLに濃縮し、-80で保存した。

10

【0132】

試薬の調製(1)

精製水に、リン酸水素二ナトリウムを1.627g/L、リン酸二水素二ナトリウムを1.162g/L、塩化ナトリウムを29.22g/L、エデト酸二ナトリウムを0.336g/L、カゼインナトリウムを1.0g/L、及びProClinを0.5mL/L添加して、pHを約7.3に調節することによって、ベース緩衝液を調製した。好適な量の上記ベース緩衝液に、TWEEN20(商標)を5mL/L、SDS溶液(1%)を20mL/L、酵母抽出物を0.5g/L、及びBSA溶液(30%)を10g/L添加して、pHを6.4に調節し、結果として得られた溶液を、0.22µmのメンブランフィルタを通過させることによって、サンプル希釈剤を調製した。

20

【0133】

同じ方法で、精製水に、リン酸二水素ナトリウムを3.28g/L、リン酸カリウムを13.28g/L、塩化ナトリウムを17.56g/L、エデト酸二ナトリウムを0.372g/L、Dextran T2000を10g/L、スクロースを10g/L、PVP(k=30)を10g/L、ProClinを0.5mL/L、BSAを20g/L、カゼインナトリウムを3g/L、不活性化ウマ血清を20mL/L、不活性化マウス血清を10mL/L、TRITON X-100(商標)を10mL/L、C14APSを3g/L、及びC16TABを2g/L添加して、pHを約7.2に調節し、結果として得られた溶液を、0.22µmのメンブランフィルタを通過させることによって、マーカー緩衝液を調製した。

30

【0134】

精製水に、無水クエン酸を4.936g/L、及びリン酸水素二ナトリウムを6.895g/L溶解して、pHを約4.9に調節し、結果として得られた溶液を、0.22µmのメンブランフィルタを通過させることによって、基質緩衝液を調製した。13mg錠剤のo-フェニレンジアミン二塩酸塩を、6mLの基質緩衝液に溶解することによって、基質試薬を調製した。

【0135】

反応停止試薬として、4N硫酸を使用した。

【0136】

精製水に、リン酸二水素ナトリウムを1.09g/L、リン酸水素カリウムを0.31g/L、塩化ナトリウムを8.2g/L、Tween20を1mL/L、及びProClinを0.5mL/L添加して、結果として得られた溶液を、0.22µmのメンブランフィルタを通過させることによって、洗浄緩衝液を調製した。

40

【0137】

精製水に、リン酸二水素ナトリウムを5.45g/L、リン酸水素カリウムを1.55g、及びエデト酸二ナトリウムを0.744g/L添加することによって、抗原の固相化のためのコーティング緩衝液を調製した。このコーティング緩衝液を、HCV TMKK組み換え抗原又はc200組み換え抗原別に添加した(それぞれ2.0µg/mL)。

【0138】

50

精製水に、リン酸緩衝液を好適な量、カゼインナトリウムを10g/L、及びスクロースを30g/L添加することによって、ブロッキング緩衝液を調製した。

【0139】

マーカーとして、「(LK11) Peroxidase Labeling Kit NH2 (Dojin Kagaku Kenkyusho)」を使用してHRPでマークされた、Institute of Immunology (Tokushu Meneki Kenkyusho) から購入されたマウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体(2AHIGG2)を使用した。

【実施例】

【0140】

10

(実施例1)

HCV TMKK組み換え抗原を含む抗原の固相化のためのコーティング緩衝液を200μL/ウェルの量で分注し、一晚4で静置した。ウェル内の液体を除去した後、リン酸緩衝液で1回ウェルを洗浄した。次に、ブロッキング緩衝液を300μL/ウェルの量で分注し、4時間超室温で静置した。ウェル内の液体を除去した後、洗浄緩衝液で1回ウェルを洗浄して、その後固相プレートを作製するために乾燥させた。

【0141】

サンプル希釈剤を175μL/ウェル、及び各サンプルを25μL(U.S.PromedDxの市販のヒト血清)を固相プレート内にそれぞれ分注し、それらをプレートミキサーで攪拌し、37で1時間インキュベートした。ウェル内の液体を除去した後、洗浄緩衝液で5回ウェルを洗浄した。次に、マーカー希釈緩衝液で5,000倍に希釈されたマーカーを有する液体(すなわち、HRP有識マウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体)を200μL/ウェルの量で分注し、それを37で30分間インキュベートした。ウェル内の液体を除去した後、洗浄緩衝液で5回ウェルを洗浄した。次いで、基質緩衝液中に0.1%の量で過酸化水素(30%)を添加することによって調製された基質液体を、200μL/ウェルの量で分注し、30分間室温で反応させた。50μL/ウェルの量で反応停止溶液を分注した後、プレートリーダー(Molecular DevicesのSpectraMax 340PC)を用いた主波長490nm及び副波長650nmの二波長測光を使用して吸光度を測定した。測定された値を表2に示す。

20

【0142】

30

比較実施例1

抗原の固相化のためのコーティング緩衝液としてHCV TMKK組み換え抗原を使用する代わりにc200組み換え抗原を含む液体を用いることを除き、実施例1と同じ手順で光度計測を実行する。測定された値を表2に示す。

【0143】

比較実施例2

指示書に従い、上記サンプルから抗体を検出するためにRIBA3(Ortho Diagnostic Systems)を使用した。結果を表2に示す。表中、丸かっこ内のサンプル番号は、PromedDxによって割り当てられたサンプル番号である。「NHS」は、正常なヒト血清であり、陰性対照として使用された。

40

【0144】

表2に示されるように、実施例1におけるTMKKを使用するC型肝炎ウイルスの検出又は定量は、比較実施例1におけるc200の使用よりも高い感度を示した。具体的には、比較実施例2のサンプル4~23によってC型肝炎ウイルス抗体の検出を確認した。しかしながら、比較実施例1におけるc200を用いた定量は、特にサンプル4、5、及び14に関して不合理に低い感度を示したが、一方で実施例1におけるTMKKを用いた定量は、高い検出感度を示した。サンプル1~3のようなC型肝炎ウイルス抗体が存在しないサンプルは、実施例1においてさえもより低い定量値を呈した。検出又は定量の精度に問題はない。サンプル10に関するRIBAのc33c陽性結果が、恐らく交差反応のためであったことに留意されたい。

50

【0145】

(実施例2)

C型肝炎ウイルス感染が遺伝子スクリーニングによって確認されているセロコンバージョンパネル(ZeptoMatrix)のパネル「6212」、「6215」、及び「9058」内のサンプルを使用することを除き、実施例1と同じ手順で光度計測を実行した。測定された値を表3~5に示す。サンプルの枝番(例えば、「-1」、「-2」)が増加するにつれて、サンプルの血液採取日の遅いことを意味する、すなわちC型肝炎ウイルス感染がより進行したことを示す。各サンプルに対するRIBA3測定値の周知の結果もまた、表3~5に示す。

【0146】

比較実施例2

セロコンバージョンパネル(ZeptoMatrix)のパネル「6212」、「6215」、及び「9058」内のサンプルを使用することを除き、比較実施例1と同じ手順で光度計測を実行した。測定された値を表3~5に示す。

【0147】

感染の初期におけるサンプルに関して、表3に示されるパネル6212-02及び6212-03の場合、抗体の検出は、実施例2においてTMKKを使用して成功したが、比較実施例2においてc200を使用して、及びRIBA3を用いて失敗した。加えて、パネル6212-04及び6212-05での抗体の検出は、実施例2においてTMKKを、及び比較実施例2においてc200を使用して成功したが、検出感度は、実施例2においてTMKKでより高かった。

【0148】

表4に示されるように、パネル6215-04での抗体の検出は、実施例2においてTMKKを使用して成功したが、比較実施例2においてc200を使用して失敗した。本発明の試薬の感度は、比較的高い検出感度を有することが周知であるコア抗原(C22)以上であったので、本発明の試薬を使用する場合は、コア抗原と組み合わせた使用が必ずしも必要ではないことが確認された。

【0149】

表5に示されるように、パネル9058-04のような感染の初期のサンプルでの抗体の検出は、実施例2においてTMKKを使用して、及びRIBA3を用いて成功したが、比較実施例2においてc200を使用して失敗した。サンプルは、RIBA3結果によって示されるようにコア抗体セロコンバーターであり、比較的高い検出感度を有することが周知であるコア抗原(C22)との組み合わせの使用の適切性を示唆している。加えて、パネル9058-05での抗体の検出は、実施例2におけるTMKKの使用及び比較実施例2におけるc200の使用の両方で成功した。しかしながら、その感度は、実施例2におけるTMKKの使用でより高かった。

【0150】

試薬の調製(2)

上述した「試薬の調製(1)」で調製された試薬を、後述の試薬を除き、使用する。

【0151】

適切な量の上述のベース緩衝液に、TWEEN20(商標)を5mL/L、SDS溶液(1%)を20mL/L、酵母抽出物を0.5g/L、BSA溶液(30%)を10g/L、LDAOを5g/L、及びDTT 1mMを添加して、pHを7.3に調節し、結果として得られた溶液を、0.22µmのメンブランフィルタを通過させることによって、サンプル希釈剤を調製した。

【0152】

精製水に、塩化ナトリウムを5.85g/L、無水酢酸ナトリウムを5.18g/L、酢酸を2.2mL/L、及び硫酸アンモニウムを114g/L、添加し、pHを約4.8に調節することによって、抗体の固相化のためのコーティング緩衝液を調製した。このコーティング溶液を、c11-3モノクローナル抗体及びc11-7モノクローナル抗体別

10

20

30

40

50

に添加した（それぞれ $1.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

【0153】

マーカーとして、「HCV core Ag ELISA Kit (Ortho Diagnostic Systems)」に含まれる標識抗体を、抗原検出のために使用したが、一方「(LK11) Peroxidase Labeling Kit NH2 (Dojin Kagaku Kenkyusho)」を使用することによってHRPでマークされたHCV TMKK組み換え抗原を、抗体検出のために使用した。

【0154】

実施例3

抗原の固相化のための上記コーティング緩衝液を $200 \mu\text{L}$ / ウェルの量で、96ウェルマイクロプレート (Corning high-bind type) に分注し、6時間室温で静置した。ウェル内の液体を除去した後、リン酸緩衝液で3回ウェルを洗浄した。次に、抗原の固相化のための上記コーティング緩衝液を $200 \mu\text{L}$ / ウェルの量で分注し、一晚4℃で置いた。ウェル内の液体を除去した後、リン酸緩衝液で1回ウェルを洗浄した。次に、ブロッキング緩衝液を $300 \mu\text{L}$ / ウェルの量で分注し、4時間超室温で静置した。ウェル内の液体を除去した後、洗浄緩衝液で1回ウェルを洗浄して、その後固相プレートを作製するために乾燥させた。

【0155】

$150 \mu\text{L}$ / ウェルの量でサンプル希釈剤、並びに $50 \mu\text{L}$ の量でサンプルとしてセロコンバージョンパネル (ZeproMatrix) の「6212」及び「6224」を、固相プレート内にそれぞれ分注し、それらをプレートミキサーで攪拌し、37℃で1時間インキュベートした。ウェル内の液体を除去した後、洗浄緩衝液で5回ウェルを洗浄した。次に、マーカー（すなわち、HRP有識HCV TMKK組み換え抗原）がマーカー希釈緩衝液で40,000倍に希釈された液体、及びマーカー（すなわち、HRP有識抗HCVコア抗体）がマーカー希釈緩衝液で100倍に希釈された液体、を $200 \mu\text{L}$ / ウェルの量で分注し、それを37℃で30分間インキュベートした。ウェル内の液体を除去した後、洗浄緩衝液で5回ウェルを洗浄した。次いで、基質緩衝液中に0.1%の量で過酸化水素（30%）を添加することによって調製された基質液体を、 $200 \mu\text{L}$ / ウェルの量で分注し、30分間室温で反応させた。 $50 \mu\text{L}$ / ウェルの量で反応停止溶液を分注した後、プレートリーダー (Molecular DevicesのSpectraMax 340PC) を用いた主波長 490nm 及び副波長 650nm の二波長測光を使用して吸光度を測定することによって、光度計測を実行した。結果を表6及び7に示す。各サンプルに対するRIBA3測定値の周知の結果もまた、表6及び7に示す。表中のCOIは、OD平均値が1.0SDずつ追加されるカットオフ値を適用して、1.0単位のHCV抗体陰性サンプルを測定することによって計算された値である。

【0156】

比較実施例3として、以下の点を除き、実施例3と同じ手順で光度計測を実行した：本発明の定量試薬の代わりに市販のHCV抗原-抗体検出キットである「Monolisa HCV Ag - Ab (Bio-Rad)」を使用すること；キットの指示書に従いテストを実施すること；及びOD及びCOIを決定すること。比較実施例4として、各サンプルに対する「HCV Ag / Ab Combo (ABBOTT) の既知のCOIを、表6及び7に示す。更に、比較実施例5として、指示書に従い「LUMIPULSE (商標) Ortho HCV antigen (Ortho Diagnostic Systems)」を使用した各サンプルにおける抗体量の測定の結果を、表6及び7に示す。各サンプルに対するRIBA3測定値の周知の結果もまた、表6及び7に示す。

【0157】

表6に示されるように、パネル6212-01及び6212-02のような感染の初期でのサンプルについて、HCVの検出は、実施例3において抗HCVコアAbs及びTMKKを使用して成功し、比較実施例4で失敗し、比較実施例3に比べて比較実施例4では成功したが低い感度であった。加えて、パネル6212-05及び6212-06に示さ

10

20

30

40

50

れるように、抗原量が減少する段階でのサンプルにおけるHCV検出は、比較実施例5で失敗であったが、HCV検出は、実施例3における抗HCVコアAbs及びTMKKを使用して可能であった。

【0158】

表7に示されるように、パネル6224-01～6224-03のような感染の初期でのサンプルについて、HCVの検出は、実施例3において抗HCVコアAbs及びTMKKを使用して、比較実施例3におけるより高い感度で成功した。加えて、パネル6224-04に示されるように、抗原量が減少する段階でのサンプルにおけるHCV検出は、比較実施例4で失敗であったが、HCV検出は、実施例3における抗HCVコアAbs及びTMKKを使用して成功であった。

10

【0159】

本発明の特定の実施形態が示されてきたが、当然ながら、特に前述の技術を考慮すれば、当業者により改変がなされ得るため、本発明がそれらに限定されないことは理解されるであろう。合理的な変形及び修正が、本発明の趣旨から逸脱することなく本発明の前述の開示の範囲内で可能である。

【0160】

【表2】

表1

ドメイン	近似の境界*
C(コア)	配列番号1の1～191
E1	配列番号1の192～383
E2	配列番号1の384～746
P7	配列番号1の747～809
NS2	配列番号1の810～1026
NS3	配列番号1の1027～1657
NS4a	配列番号1の1658～1711
NS4b	配列番号1の1712～1972
NS5a	配列番号1の1973～2420
NS5b	配列番号1の2421～3011

20

30

* HCV-1に対して番号が付されている。Choo et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451～2455 参照。

【0161】

【表 3】

表2

TMKK

c200

サンプル番号	比較実施例2(RIBA3)					実施例1	比較実施例1
	c100p	c33c	c22p	NS5	SOD		
1(NHS)						0.017	0.020
2(007)	-	-	-	+	-	0.015	0.017
3(011)	-	+	-	-	-	0.066	0.019
4(053)	-	-	2+	-	-	0.785	0.060
5(077)	±	±	3+	-	-	0.760	0.020
6(057)	+	+	3+	-	-	2.049	0.175
7(037)	±	±	4+	-	-	2.220	0.357
8(059)	1+	±	4+	-	-	3.254	3.090
9(034)	-	±	4+	3+	-	3.200	0.515
10(006)	-	3+	-	±	-	0.042	0.145
11(093)	2+	1+	±	-	-	2.007	0.324
12(026)	±	1+	±	1+	-	1.785	0.129
13(048)	-	1+	1+	-	-	2.495	0.295
14(064)	±	1+	4+	1+	-	1.574	0.093
15(088)	-	3+	1+	-	-	2.183	0.830
16(004)	1+	3+	4+	-	-	3.953	3.156
17(076)	±	4+	-	-	-	0.961	0.495
18(012)	-	4+	-	4+	-	3.562	3.569
19(025)	±	4+	-	4+	-	2.640	2.586
20(033)	2+	4+	-	4+	-	3.332	1.939
21(031)	4+	4+	+	+	-	3.048	2.586
22(094)	4+	4+	4+	-	-	3.954	3.956
23(002)	4+	4+	4+	4+	-	3.550	3.356

10

20

【0162】

【表 4】

表3

TMKK

c200

30

パネル番号	採血日	実施例2	比較実施例2	RIBA3.0				
		OD	OD	C100	C33	C22	NS5	SOD
6212-01	11/16/95	0.004	0.006	-	-	-	-	-
6212-02	11/28/95	0.237	0.026	-	+/-	-	-	-
6212-03	11/30/95	0.270	0.034	-	+/-	-	-	-
6212-04	12/09/95	0.416	0.238	-	1+	-	-	-
6212-05	12/12/95	0.828	0.476	-	1+	-	-	-
6212-06	12/18/95	1.111	0.688	-	1+	-	-	-
6212-07	12/23/95	1.158	1.081	-	1+	-	-	-
6212-08	01/08/96	3.615	3.946	-	4+	-	-	-
6212-09	01/10/96	3.946	3.936	-	4+	-	-	-

40

【0163】

【表 5】

表4 TMKK c200

パネル番号	採血日	実施例2	比較実施例2	RIBA3.0				
		OD	OD	C100	C33	C22	NS5	SOD
6215-01	01/19/96	0.006	0.015	-	-	-	-	-
6215-02	01/22/96	0.007	0.014	-	-	-	-	-
6215-03	01/29/96	0.008	0.016	-	-	-	-	-
6215-04	02/08/96	0.131	0.038	-	+/-	4+	-	-

【0164】

10

【表 6】

表5 TMKK c200

パネル番号	採血日	実施例2	比較実施例2	RIBA3.0				
		OD	OD	C100	C33	C22	NS5	SOD
9058-01	3/06/98	0.026	0.014	-	-	+/-	-	-
9058-02	3/09/98	0.029	0.013	-	-	+/-	-	-
9058-03	3/13/98	0.058	0.015	-	+/-	+	-	-
9058-04	3/16/98	0.142	0.027	-	1+	1+	-	-
9058-05	3/20/98	0.228	0.081	-	1+	2+	-	-

【0165】

20

【表 7】

表6 コンボ: 抗HCVコアAbs+TMKK

	実施例3		比較実施例3 Bio-Rad Monolisa HCV Ag-Ab		比較実施例4 ABBOTT HCV Ag/Ab Combo	比較実施例5 Lumi HCV Ag	RIBA3.0				
	OD	COI	OD	COI	COI	fmol/l	c100p	c33c	c22p	NS5	SOD
6212-01	0.127	2.3	0.107	0.38	0.81	2198.5	-	-	-	-	-
6212-02	0.704	12.9	0.218	0.78	0.53	166.5	-	+/-	-	-	-
6212-03	0.849	15.5	0.290	1.03	0.61	108.5	-	+/-	-	-	-
6212-04	1.687	30.8	1.065	3.79	0.66	129.5	-	1+	-	-	-
6212-05	1.591	29.1	1.360	4.85	0.63	0.5	-	1+	-	-	-
6212-06	1.616	29.5	1.478	5.27	0.59	27.5	-	1+	-	-	-
6212-07	1.453	26.6	1.490	5.31	0.64	271.0	-	1+	-	-	-
6212-08	2.207	40.3	2.096	7.47	2.25	276.0	-	4+	-	-	-
6212-09	1.980	36.2	2.140	7.63	2.44	401.0	-	4+	-	-	-

30

【0166】

【表 8】

表7 コンボ: 抗HCVコアAbs+TMKK

	実施例3		比較実施例3 Bio-Rad Monolisa HCV Ag-Ab		比較実施例4 ABBOTT HCV Ag/Ab Combo	比較実施例5 Lumi HCV Ag	RIBA3.0				
	OD	COI	OD	COI	COI	fmol/l	c100p	c33c	c22p	NS5	SOD
6224-01	0.209	2.4	0.077	0.27	1.565	1951.6	-	-	-	-	-
6224-02	0.140	1.6	0.091	0.32	1.732	2361.2	-	-	-	-	-
6224-03	0.287	3.3	0.097	0.34	1.388	2184.0	-	-	-	-	-
6224-04	0.153	1.7	0.072	0.26	0.866	943.8	-	+/-	-	-	-
6224-05	0.469	5.3	0.536	1.90	4.137	2175.4	-	1	-	-	-
6224-06	0.558	6.4	0.818	2.91	4.599	1959.2	-	2	-	-	-

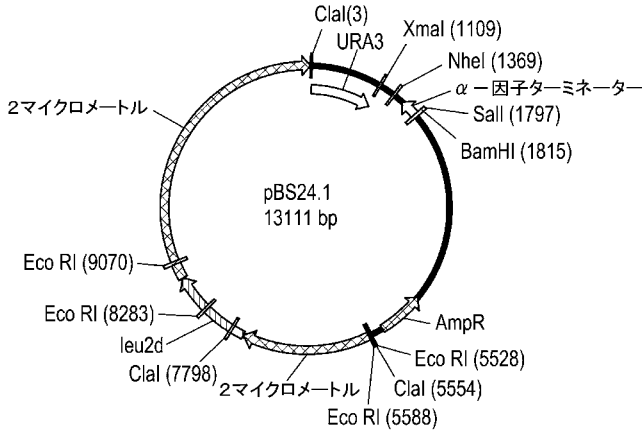
40

【 図 1 】

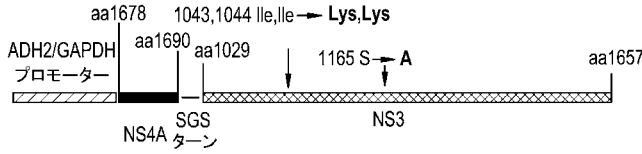
HCV1									
C	E1	E2	P7	NS2	NS3	NS4a	NS4b	NS5a	NS5b
1~191	192~383	384~746		810~1026	1027~1657		1712~1972	1973~2420	2421~3011

*配列番号1を基準とする

【 図 2 】

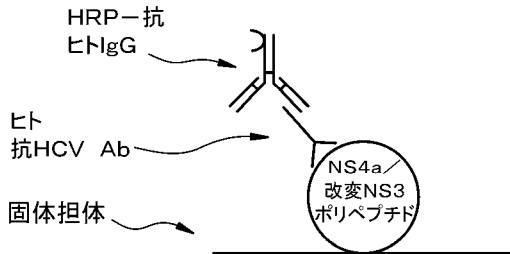


【 図 3 】

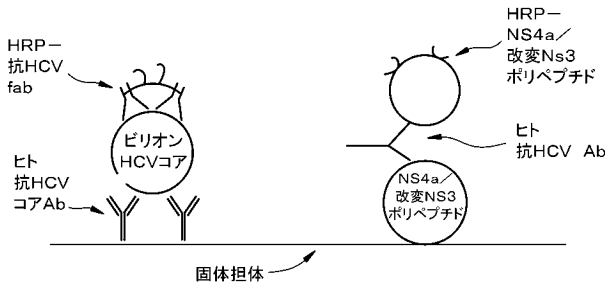


*配列番号1を基準とする

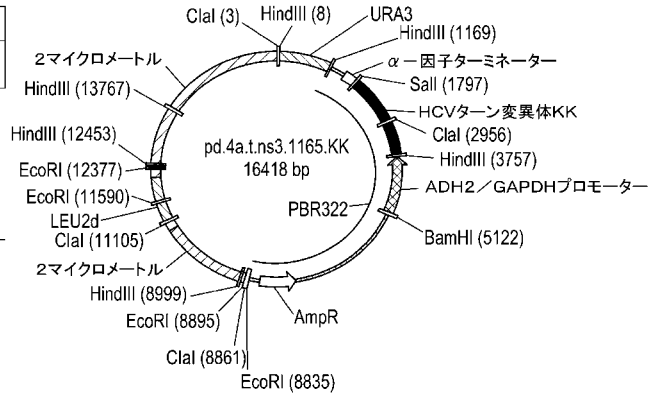
【 図 6 】



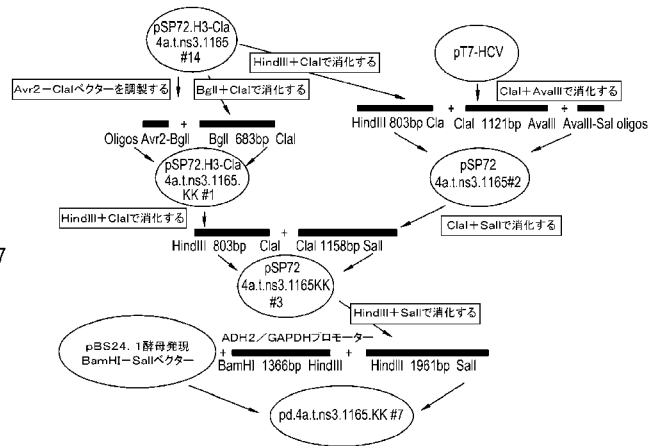
【 図 7 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2018513390000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 15/36941
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/70, G01N 33/53, G01N 33/567, G01N 33/00, C07H 21/04 (2015.01) CPC - C07K 14/005, A61K 39/00, A61K 38/00, C12N 7/00, C07K 14/705, C07K 16/18, C07K 2319/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12Q 1/70, G01N 33/53, G01N 33/567, G01N 33/00, C07H 21/04 (2015.01) CPC - C07K 14/005, A61K 39/00, A61K 38/00, C12N 7/00, C07K 14/705, C07K 16/18, C07K 2319/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - G01N 33/56983, G01N 33/566, G01N 33/564, G01N 33/54386, G01N 33/54366, G01N 33/54306, G01N 2333/726 USPC - 435/5, 435/7.2, 435/7.92, 530/350 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); PatBase, Google/Scholar; Hepatitis C Virus, HCV, the NS3/4a, self-hydrolysis, NS3 protease, Ite15, Ite16, nonstructural protein 3, Hepatitis C virus type 1, HCV-1, immunoreactivity GenCore 6.4.1: SEQ ID NO: 2, 4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y - A	WO 2006/024020 A2 (CHIRON CORP) 02 March 2006 (02.03.2006) claim 1; SEQ ID NO:6, Fig 2, Fig 4A-C; para [0017], [0025]-[0028], [0128], [0141]	1, 5, 7, 14-18 <hr/> 2, 3 <hr/> 6
Y	Rimmerta, et al. A 3D structural model and dynamics of hepatitis C virus NS3/4A protease (genotype 4a, strain ED43) suggest conformational instability of the catalytic triad: implications in catalysis and drug resistivity. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics 2014, 32(6):950-958; Abstract; pg 953, Fig 1 and its legend; pg 955, 2nd col	2, 3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 06 November 2015 (06.11.2015)		Date of mailing of the international search report 08 DEC 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/36941

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/36941

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.
Group I: claims 1-7, 14-16, directed to an immunoassay reagent (claims 1-7), and a kit comprising the immunoassay reagent (claims 14-16). The immunoassay reagent will be searched to the extent that the polypeptide encompasses a substitution of amino acid residue 55 of SEQ ID NO:4. It is believed that claims 1-3, 5-7, 14-16 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass the immunoassay reagent having a substitution of amino acid residue 55 of SEQ ID NO:4. Additional specific substitution(s) in SEQ ID NO:4 will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected substitution(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an immunoassay reagent encompassing a substitution of amino acid residue 137 of SEQ ID NO:4, i.e. claims 1-7, 14-16.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 5-7, 14-16, limited to the substitution of amino acid residue 55 of SEQ ID NO:4

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/36941

Supplemental Sheet

In Continuation of Box IV. Lack of unity of invention:

Group II: claims 8-13, 19-24, directed to a method of detecting antibodies to hepatitis C virus in a biological sample by combining the immunoassay reagent of claim 1 and the biological sample.

Group III: claims 17, 18, directed to an amino acid sequence SEQ ID NO:2.

The inventions listed as Groups I+ through III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The special technical feature of each invention of Group I+ is a specific substitution in the amino acid sequence SEQ ID NO:4, because an amino sequence with at least 90% identity to SEQ ID NO: 4 was known in the art at the time of the invention (see WO 2006/024020 A2 to Chien, et al. (hereinafter "Chien"); SEQ ID NO:4, 98.8% identity), and thus no significant structural similarities can readily be ascertained among said substitutions.

The inventions of Groups I+ and II do not include the shared or common technical feature of an amino acid sequence SEQ ID NO:2, as required by Group III.

The inventions of Group III do not include the shared or common technical feature of a reagent of claim 1, as required by Groups I+ and II.

The inventions of Group I+ do not include the shared or common technical feature of a method of using the reagent of claim 1, as required by Group II.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of an immunoassay reagent of claim 1. Some inventions of Group I+ share the technical feature of a kit comprising the reagent of claim 1. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being anticipated by Chien, as above.

Chien discloses an immunoassay reagent comprising a polypeptide having at least 90% amino acid identity to a polypeptide (claim 9, SEQ ID NO:8, 99.2% identity to SEQ ID NO:2; Fig 4C, claim 1, "An immunoassay solid support comprising a polypeptide comprising a modified hepatitis C virus (HCV) NS3 protease domain such that protease activity of the modified NS3 polypeptide is inhibited relative to protease activity of a corresponding HCV NS3 polypeptide lacking the modification"), the polypeptide comprising:

a hepatitis C virus NS4a domain having SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO: 6, amino acids 1-14, 100% identity);

a modified hepatitis C virus NS3 domain (para [0141], "Modified NS3 Antigens with Mutations in the Protease Domain. Modified NS3 antigens, with a mutation to the NS3 protease domain were produced using site-directed mutagenesis of the NS3aPI sequence described above. In particular, the codon for Ser-1165, in the protease catalytic triad, was mutated to an Ala codon. A diagram of the NS3aPI construct including a substitution of Ala for Ser at position 1165 is shown in Figure 4A. The nucleotide and corresponding amino acid sequence of this construct is shown in Figures 5A-5C. This construct was termed "NS3aPI.1165"; para [0027], "In Figures 4A-4C, the Ser normally present at position 1165 is substituted with Ala. Additionally, all of the mutants depicted in Figures 4A- 4C include a substitution of Pro for Thr normally present at position 1428, and Ile for Ser normally present at position 1429) having SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO: 8, amino acids 18-648, 96% identity); and

an intervening region connecting the carboxy terminus of the NS4a domain to the amino terminus of the modified NS3 domain (Fig 4C, SGS; para [0026], Ser-Gly-Ser." In Figure 4C, the protein includes In N-terminal to C-terminal direction, an N-terminal Met, amino acids 1678-1690 of NS4a, followed by the amino acid sequence Ser-Gly-Ser, then amino acids 1029 to 1657 of NS3. [0028] Figures 5A-5C (SEQ ID NOs :1 and 2) depict the nucleotide sequence and corresponding amino acid sequence of the protein from Figure 4 A, termed "NS3aPI.1165").

wherein one or more amino acid residues of SEQ ID NO:4 are modified such that protease activity of the modified hepatitis C virus NS3 domain is inhibited relative to protease activity of the hepatitis C virus NS3 domain having SEQ ID NO:4 lacking the modification (para [0141], "Modified NS3 Antigens with Mutations in the Protease Domain. Modified NS3 antigens, with a mutation to the NS3 protease domain were produced using site-directed mutagenesis of the NS3aPI sequence described above. In particular, the codon for Ser-1165, in the protease catalytic triad, was mutated to an Ala codon. A diagram of the NS3aPI construct including a substitution of Ala for Ser at position 1165 is shown in Figure 4A. The nucleotide and corresponding amino acid sequence of this construct is shown in Figures 5A-5C. This construct was termed "NS3aPI.1165"; claim 1, "An immunoassay solid support comprising a polypeptide comprising a modified hepatitis C virus (HCV) NS3 protease domain such that protease activity of the modified NS3 polypeptide is inhibited relative to protease activity of a corresponding HCV NS3 polypeptide lacking the modification").

Chien also discloses a kit comprising the reagent of claim 1 (Chien, claim 17). As said technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ through III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 P 21/00 C
 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 596057549
 オーン・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社
 東京都品川区大崎1丁目1番2号

(71)出願人 517338386
 グライフォルス・ワールドワイド・オペレーションズ・リミテッド
 アイルランド国 ダブリン 4 ボールズブリッジ エンバシー ハウス

(74)代理人 100120891
 弁理士 林 一好

(74)代理人 100131705
 弁理士 新山 雄一

(72)発明者 チェン デイヴィッド ワイ .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 0 7 アラモ ダグラス コート 1 1 2 1

(72)発明者 コイト ドリス グエンツィ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 5 2 ベタルマ ランチョ リンド ドライブ 1 0 5 8

(72)発明者 藤原 稔也
 千葉県浦安市富岡2-2-4-405

(72)発明者 ジェンズ アレクサンダー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 0 サンフランシスコ アラバマ ストリート 5 4 0

(72)発明者 ホール ジョン アンドリュウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 2 8 ローナート パーク ラケット クラブ サークル 7 2 5

(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 カリフォルニア州 9 4 1 3 1 サンフランシスコ ゲールウッド サークル 1 3 6

(72)発明者 チェン ジアン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 8 8 6 9 ラリタン レンツィ ロード 7

Fターム(参考) 4B064 AG33 CA06 CA19 CC06 CC24 CE11 DA13
 4H045 AA11 AA30 BA09 BA10 CA02 DA86 EA50 FA73 FA74 GA15
 GA23

专利名称(译)	HCV NS4A /修饰的NS3多肽及其用途		
公开(公告)号	JP2018513390A	公开(公告)日	2018-05-24
申请号	JP2018501133	申请日	2015-06-22
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司 潜育假的全球运营有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断公司 邻临床诊断公司 潜育假的全球运营有限公司		
[标]发明人	チエンデイヴィッドワイ コイトドリスグエンツイ 藤原 稔也 ジエンズアレクサンダー ホールジョンアンドリユー メディナセルビーアンジェリカ チェンジャン		
发明人	チエン デイヴィッド ワイ. コイト ドリス グエンツイ 藤原 稔也 ジエンズ アレクサンダー ホール ジョン アンドリユー メディナ-セルビー アンジェリカ チェン ジアン		
IPC分类号	G01N33/576 C07K14/18 G01N33/53 G01N33/15 C12P21/00 C12N15/09		
CPC分类号	C07K14/005 C07K2319/00 C12N2770/24222 C12Q1/70 G01N33/5767 G01N2469/20 C07K14/02 G01N2333/186		
FI分类号	G01N33/576.Z C07K14/18.ZNA G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/15.Z C12P21/00.C C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B064/AG33 4B064/CA06 4B064/CA19 4B064/CC06 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/DA13 4H045 /AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA10 4H045/CA02 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA23		
代理人(译)	和义林		
优先权	62/139183 2015-03-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了修饰的丙型肝炎病毒多肽。该多肽包含HCV NS4a结构域和修饰的NS3结构域。该多肽保留构象表位。还描述了涉及该多肽的HCV免疫测定。[选择]图7

(5) Int. Cl.	F I	テームコード (参考)
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576 Z	4 B 0 6 4
CO 7 K 14/18 (2006.01)	CO 7 K 14/18 Z N A	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-501133 (P2018-501133)	(71) 出願人	511093409
(86) (22) 出願日	平成27年6月22日 (2015. 6. 22)		オーソークリニカル・ダイアグノスティック クス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年9月26日 (2017. 9. 26)		Ortho-Clinical Diag nostics, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/036941		アメリカ合衆国、ニュージャージー州 O 8869、ラリタン、ユー・エス・ルート 202 1001
(87) 国際公開番号	W02016/160046		1001 U. S. Route 202 , Raritan, New Jers ey 08869, United St ates of America
(87) 国際公開日	平成28年10月6日 (2016. 10. 6)		
(31) 優先権主張番号	62/139, 183		
(32) 優先日	平成27年3月27日 (2015. 3. 27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCV NS4 A / 変更された NS3 ポリペプチド及びその使用