

(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2017-521654

(P2017-521654A)

(43) 公表日 平成29年8月3日 (2017. 8. 3)

|                                      |                       |             |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                        | F I                   | テーマコード (参考) |
| GO 1 N 33/569 (2006. 01)             | GO 1 N 33/569 L       | 4 B O 6 3   |
| C 1 2 N 15/09 (2006. 01)             | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 H O 4 5   |
| C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)              | C 1 2 Q 1/68 A        |             |
| CO 7 K 14/18 (2006. 01)              | CO 7 K 14/18          |             |
| GO 1 N 33/53 (2006. 01)              | GO 1 N 33/53 N        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 167 頁) 最終頁に続く |                       |             |

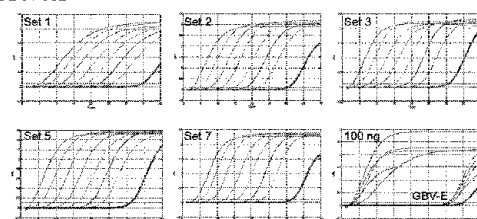
|               |                              |          |                      |
|---------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2016-575478 (P2016-575478) | (71) 出願人 | 391008788            |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年6月26日 (2015. 6. 26)     |          | アボット・ラボラトリーズ         |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成29年2月24日 (2017. 2. 24)     |          | ABBOTT LABORATORIES  |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2015/038067            |          | アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット   |
| (87) 国際公開番号   | W02015/200833                |          | パーク アボット パーク ロード 100 |
| (87) 国際公開日    | 平成27年12月30日 (2015. 12. 30)   |          | O                    |
| (31) 優先権主張番号  | 62/018, 282                  | (71) 出願人 | 507127440            |
| (32) 優先日      | 平成26年6月27日 (2014. 6. 27)     |          | ザ・リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシ  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | ティー・オブ・カリフォルニア       |
| (31) 優先権主張番号  | 62/107, 782                  |          | アメリカ合衆国、カリフォルニア・946  |
| (32) 優先日      | 平成27年1月26日 (2015. 1. 26)     |          | 07-5200、オークランド、フランク  |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | リン・ストリート・1111、トゥエルブ  |
|               |                              |          | ス・フロアー               |
|               |                              | (74) 代理人 | 110001173            |
|               |                              |          | 特許業務法人川口国際特許事務所      |
|               |                              |          | 最終頁に続く               |

(54) 【発明の名称】 ヒトペギウイルス2 (HP g V-2) を検出するための組成物および方法

## (57) 【要約】

本明細書に、ヒトペギウイルス2 (HP g V-2) を検出するための組成物、方法およびキットを提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に、HP g V-2 特異的核酸プローブおよびプライマー、ならびにHP g V-2 核酸を検出するための方法を提供する。他の実施形態において、本明細書に、HP g V-2 免疫原性組成物、免疫原性HP g V-2 ペプチドで対象を処置する方法、および試料中のHP g V-2 対象抗体を検出する方法を提供する。

FIG. 5A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象におけるヒトペギウイルス 2 (H g V-2) 感染を検出する方法であって、

a) H P g V-2 に対する対象抗体を含むことが疑われる対象からの試料をペプチドと接触させるステップであって、前記ペプチドが対象抗体に特異的に結合して複合体を形成するステップ、および

b) 複合体の存在を検出し、それによって対象における過去または現在の H P g V-2 感染の存在を検出するステップを含む方法。

## 【請求項 2】

ペプチドが、配列番号 2-11、76-85 または 304-353 のいずれか 1 つの部分に少なくとも 75% の同一性を有し、一部分が少なくとも 10 アミノ酸の長さである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

ペプチドが標識され、ペプチドが配列番号 86-99 および 100-218 の群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

ペプチドが、S タンパク質、E1 タンパク質、E2 タンパク質、X タンパク質、NS2 タンパク質、NS3 タンパク質、NS4A タンパク質、NS4B タンパク質、NS5A タンパク質および NS5B タンパク質からなる群から選択される、H P g V-2 の少なくとも一部分を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

ペプチドが標識を含み、試料を、前記標識に結合している部分を含む固体支持体と接触させるステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

i) ペプチドが患者抗体に特異的に結合して複合体を形成し、ii) 標識が少なくとも 1 つの前記部分に結合することによって、複合体が固体支持体に結合するような条件下で、試料をインキュベートするステップをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

固体支持体を洗浄するステップをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

複合体中の患者抗体に結合することができる、検出可能に標識されている 2 次抗体を試料に添加するステップをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

実質的に精製された組換えペプチドを含む組成物であって、組換えペプチドが、以下の少なくとも 1 つ：

a) H P g V-2 NS3 タンパク質からの少なくとも 17 個の連続したアミノ酸を含む、第 1 のアミノ酸配列；

b) H P g V-2 NS5B タンパク質からの少なくとも 13 個の連続したアミノ酸を含む、第 2 のアミノ酸配列；

c) H P g V-2 NS2 タンパク質からの少なくとも 11 個の連続したアミノ酸を含む、第 3 のアミノ酸配列；

d) H P g V-2 NS4B タンパク質からの少なくとも 8 個の連続したアミノ酸を含む、第 4 のアミノ酸配列；

e) H P g V-2 NS4a タンパク質からの少なくとも 5 個の連続したアミノ酸を含む、第 5 のアミノ酸配列；

f) H P g V-2 S タンパク質からの少なくとも 6 個の連続したアミノ酸を含む、第 6 のアミノ酸配列；

g) H P g V-2 E1 タンパク質からの少なくとも 6 個の連続したアミノ酸を含む、第 7 のアミノ酸配列；

10

20

30

40

50

h) H P g V-2 Xタンパク質からの少なくとも8個の連続したアミノ酸を含む、第8のアミノ酸配列；

i) H P g V-2 E2タンパク質からの少なくとも8個の連続したアミノ酸を含む、第9のアミノ酸配列；および

j) H P g V-2 NS5Aタンパク質からの少なくとも8個の連続したアミノ酸を含む、第10のアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項10】

実質的に精製された組換えペプチドを含む組成物であって、組換えペプチドが、配列番号2-11、76-85または304-353のいずれか1つの一部分に少なくとも75%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記一部分が少なくとも10アミノ酸の長さである、組成物。

【請求項11】

磁性ビーズをさらに含む、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

前記一部分が少なくとも15アミノ酸の長さである、請求項10に記載の組成物。

【請求項13】

合成核酸分子を含む組成物であって、

合成核酸分子が、ストリンジェントな条件下で、i) 配列番号299-303、またはi i) ヒトペギウイルス2 (H P g V-2) のゲノム配列の領域1、領域2、領域3もしくは領域4にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列またはその相補体を含み、

H P g V-2 のゲノム配列は配列番号1または75に示されるものであり、

領域1は配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778である、組成物。

【請求項14】

合成核酸分子が、i) 検出可能な標識を含み、i i) 少なくとも1つの修飾された塩基を含み、i i i) DNAを含み、および／または、i v) 異種性の核酸配列に連結している、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

合成核酸分子が、5' UTR、S遺伝子、E1遺伝子、E2遺伝子、X遺伝子、およびNS2遺伝子からなる群から選択されるH P g V-2ゲノムの一部分にハイブリダイズする、請求項13に記載の組成物。

【請求項16】

合成核酸分子を含む組成物であって、合成核酸分子が、i) ストリンジェントな条件下で、1402-1430、4778-4817および8135-8166から選択される配列番号1または75の3つの領域にハイブリダイズせず、i i) ストリンジェントな条件下で、

a) 配列番号1のヌクレオチド1-103、配列番号75のヌクレオチド1-110、配列番号299-301のヌクレオチド1-327、配列番号302のヌクレオチド12-327または配列番号303のヌクレオチド24-327に示される核酸配列を有する、ヒトペギウイルス2 (H P g V-2) の5' 非翻訳領域 (5' UTR) またはその相補体；

b) 配列番号2、76、304、314、324、334または344に示されるアミノ酸配列を有するH P g V-2 Sタンパク質をコードする、第1の核酸配列またはその相補体；

c) 配列番号3、77、305、315、325、335または345に示されるアミノ酸配列を有するH P g V-2 E1タンパク質をコードする、第2の核酸配列またはそ

10

20

30

40

50

の相補体；

d) 配列番号 4、78、306、316、326、336 または 346 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 E2 タンパク質をコードする、第 3 の核酸配列またはその相補体；

e) 配列番号 5、79、307、317、327、337 または 347 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 X タンパク質をコードする、第 4 の核酸配列またはその相補体；

f) 配列番号 6、80、308、318、328、338 または 348 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 NS2 タンパク質をコードする、第 5 の核酸配列またはその相補体；

g) 配列番号 7、81、309、319、329、339 または 349 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 NS3 タンパク質をコードする、第 6 の核酸配列またはその相補体；

h) 配列番号 8、82、310、320、330、340 または 350 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 NS4A タンパク質をコードする、第 7 の核酸配列またはその相補体；

i) 配列番号 9、83、311、321、331、341 または 351 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 NS4B タンパク質をコードする、第 8 の核酸配列またはその相補体；

j) 配列番号 10、84、312、322、332、342 または 352 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 NS5A タンパク質をコードする、第 9 の核酸配列またはその相補体；

k) 配列番号 11、85、313、323、333、343 または 353 に示されるアミノ酸配列を有する H P g V-2 NS5B タンパク質をコードする、第 10 の核酸配列またはその相補体；

l) 配列番号 1 のヌクレオチド 9410-9778、配列番号 75 のヌクレオチド 9417-9431 または配列番号 299-303 のヌクレオチド 9499-9867 に示される核酸配列を有する、ヒトペギウイルス 2 (H P g V-2) の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) である第 11 の核酸配列またはその相補体

にハイブリダイズする、少なくとも 12 ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列を含む、組成物。

#### 【請求項 17】

合成核酸分子が、i) 検出可能な標識を含み、ii) 少なくとも 1 つの修飾された塩基を含み、iii) DNA を含み、および/または iv) 異種性の核酸配列に連結している、請求項 16 に記載の組成物。

#### 【請求項 18】

合成核酸分子を含む組成物であって、

合成核酸分子が、i) 配列番号 299-303 の一部分、または ii) 配列番号 1 もしくは 75 の領域 1、領域 2、領域 3 もしくは領域 4 の一部分に少なくとも 75% の同一性を有するヌクレオチド配列またはその相補体を含み、前記一部分が少なくとも 15 ヌクレオチドの長さであり、

領域 1 が配列番号 1 または 75 のヌクレオチド 1-1401 であり、領域 2 が配列番号 1 または 75 のヌクレオチド 1431-4777 であり、領域 3 が配列番号 1 または 75 のヌクレオチド 4818-8134 であり、領域 4 が配列番号 1 または 75 のヌクレオチド 8167-9778 である、組成物。

#### 【請求項 19】

ヌクレオチド配列が、前記一部分に少なくとも 90% の同一性を有し、または前記一部分が少なくとも 24 ヌクレオチドの長さである、請求項 18 に記載の組成物。

#### 【請求項 20】

合成核酸分子が、i) 検出可能な標識を含み、ii) 少なくとも 1 つの修飾された塩基

10

20

30

40

50

を含み、i i i) DNAを含み、および／または、i v) 異種性の核酸配列に連結している、請求項18に記載の組成物。

【請求項21】

ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) 核酸を検出するための方法であって、

a) HPgV-2 核酸を含むことが疑われる試料を、ストリンジェントな条件下で、i) 配列番号299-303、またはi i) ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) のゲノム配列の領域1、領域2、領域3もしくは領域4にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列またはその相補体を含む核酸分子と接触させるステップであって、

HPgV-2 のゲノム配列は配列番号1に示されるものであり、

10

領域1は配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778であるステップ；および

b) 核酸分子のHPgV-2 核酸に対するハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出するステップであって、ハイブリダイゼーションの存在の検出が、試料中のHPgV-2 核酸の存在を示すステップを含む方法。

【請求項22】

ヌクレオチド配列が少なくとも15ヌクレオチドの長さであり、核酸分子が、長さ75ヌクレオチド以下の長さである、請求項21に記載の方法。

20

【請求項23】

ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) 核酸を検出するための方法であって、

a) HPgV-2 核酸を含むことが疑われる試料を、HPgV-2 増幅生成物が生成されるように、第1のプライマーと接触させるステップであって、第1のプライマーが、ストリンジェントな条件下で、i) 配列番号299-303、またはi i) ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) のゲノム配列の領域1、領域2、領域3もしくは領域4にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列またはその相補体を含み、

HPgV-2 のゲノム配列は配列番号1または75に示されるものであり、

30

領域1は配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778であるステップ；および

b) HPgV-2 増幅生成物を検出し、それによって試料中のHPgV-2 核酸の存在を検出するステップを含む方法。

【請求項24】

試料を、配列番号1、75、または299-303にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列またはその相補体を含む第2のプライマーと接触させるステップをさらに含む、請求項23に記載の方法。

40

【請求項25】

試料中のヒトペギウイルス2 (HPgV-2) を検出するための方法であって、

a) ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) を含むことが疑われる試料を、HPgV-2 の一部分に特異的に結合してHPgV-2 /抗体複合体を形成する抗体と接触させるステップであって、抗体が、完全な抗体または完全な抗体の抗原結合性部分であるステップ；および

b) HPgV-2 /抗体複合体の存在を検出し、それによってHPgV-2 の存在を検出するステップを含む方法。

50

## 【請求項 26】

HPgV-2 が、配列番号 1、75 または 299-303 に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 27】

弱毒化もしくは不活化された HPgV-2 粒子、および／または HPgV-2 の抗原性部分を含む組成物を含む、対象に投与するのに適する免疫原性組成物。

## 【請求項 28】

HPgV-2 の抗原性部分がペプチドを含み、ペプチドが、S タンパク質、E1 タンパク質、E2 タンパク質、X タンパク質、NS2 タンパク質、NS3 タンパク質、NS4A タンパク質、NS4B タンパク質、NS5A タンパク質および NS5B タンパク質からなる群から選択される、HPgV-2 の少なくとも一部分を含む、請求項 27 に記載の組成物。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、両方ともその全体を参照により本明細書に組み込む、2014 年 6 月 27 日出願の米国仮出願第 62/018,282 号および 2015 年 1 月 26 日出願の米国仮出願第 62/107,782 号の優先権を主張するものである。

## 【0002】

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与される助成金番号 R01-HL105704 の下に政府支援で行われた。政府は本発明において一定の権利を有する。

20

## 【0003】

本明細書に、ヒトペギウイルス 2 (HPgV-2) を検出するための組成物、方法およびキットを提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に、HPgV-2 特異的核酸プローブおよびプライマー、ならびに HPgV-2 核酸を検出するための方法を提供する。他の実施形態において、本明細書に、HPgV-2 免疫原性組成物、HPgV-2 の免疫原性部分で対象を処置する方法、および試料中の HPgV-2 特異的対象抗体を検出する方法を提供する。

## 【背景技術】

## 【0004】

30

フラビウイルス (Flaviviridae) 科内の、ヘパシウイルス (Hepacivirus) 属に属するウイルスは、肝炎を引き起こすことが示されている (C 型肝炎ウイルス (HCV) および GB ウイルス (GBV-B))。新たに規定されたペギウイルス (Pegivirus) 属は、ゲノム構成においてヘパシウイルスに類似するが、向性および随伴する病原性において異なるウイルスを含んでいる (Stapleton ら、J Gen Virol、2011:92:233-246)。フラビウイルス科のメンバーは全て、約 10 kb のポジティブセンス鎖の一本鎖 RNA ゲノムを含んでおり、このゲノムは、アミノ酸約 3000 個の、単一の長いオープンリーディングフレーム (ORF) のポリタンパク質をコードする (Lindenbach ら、Flaviviridae: The Viruses and Their Replication、第 33 章「Fields Virology 第 5 版 (Knipe ら編集)」Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Williams、Philadelphia PA、1101-1152 頁)。ポリタンパク質は、宿主およびウイルスのプロテアーゼの組合せによって、小型の機能的な構造成分および非構造 (NS) 成分に切断される。ウイルスの構造タンパク質は、ゲノムのアミノ末端部分でコードされ、エンベロープの糖タンパク質およびヌクレオカプシドを含む。HCV および GBV-B はヌクレオカプシドタンパク質をコードするが、HPgV-1 はポリタンパク質におけるヌクレオカプシドタンパク質をコードしないと思われる。系統発生分析は、NS3 ヘリカーゼ、および NS5 RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの酵素機能に關与する保存されているアミノ酸モチーフ以外は、属間で別個の進化系統を示す。ゲノムは、高度に保存され、ゲノ

40

50

ムの翻訳および複製の両方に関与する、5'および3'非翻訳領域(UTR)とともに組織化される。

#### 【0005】

ペギウイルス属は、特定の病原性に関連しない持続性の(p e)GBウイルス(g)感染に対して命名される。1995-1996年、最初のヒトペギウイルスであるGVBC(HPgV-1)が、非A非B肝炎を有する患者からの血清中に、2群によって独立に検出された。HPgV-1は、もともと慢性肝炎患者において発見されたが、フォローアップの臨床試験および実験的試験において、リンパ指向性であり、肝臓指向性ではないと思われ、肝炎またはあらゆる他の臨床的疾患に関連していなかった。しかし、いくつかの試験は、HPgV-1との同時感染は、HIV疾患の進行を緩徐化し得ることを示唆していた(Her i n g l a k e S、J I n f e c t D i s、1998;177:1723-1726)。HCVおよびHPgV-1の発生率是一緒にすると、全世界人口の2-5%の間であることが推定される(S t a p l e t o n ら、J G e n V i r o l、2011:92:233-246)。

#### 【0006】

ペギウイルスは、それだけには限定されないが、チンパンジー、新世界霊長類、コウモリ、齧歯動物およびウマである、広範囲の哺乳動物に感染する。最近、新規なヘパシウイルス属およびペギウイルスが齧歯動物において同定され、コウモリはフラビウイルスのこれらの属にとって天然のリザーバーであり得ることを示すウイルス発見報告が存在する(Qu a n ら、P N A S 110:8194-8199、2013:D r e x l e r ら、P L o S P a t h o g、9(6)e1003438、2013:K a p o o r ら、m B I o、4(2)e000216-13、2013)。ヒトに感染することが以前に知られていた唯一のペギウイルスは、HPgV-1である。ペギウイルスのバリエーション間には、構造タンパク質、ならびに非構造のNS3およびNS5B遺伝子内の保存において、かなりの配列の相違が存在する(K a p o o r A、m B i o、2013年3月-4月;4(2):e000216-13)。異なる大陸からのコウモリの試料採取は、いくつかの別個のコウモリ由来のペグウイルス系統を示し、コウモリがペギウイルスにとって天然のリザーバーであることを示唆している(Qu a n P、P r o c N a t l A c a d S c i U S A、2013年5月14日;110(20):8194-8199)。本特許に記載するHPgV-2の特徴付けは、ウイルスのバリエーションが、他のヒト向性HPgV-1ウイルスと別個であることを示す。

#### 【0007】

最近、ウマにおける急性肝炎の最も一般的な原因であるタイラー病は、GBウイルスに系統学的に関係があり(C h a n d r i a n a ら、P N A S、110(15):E1407-1415、2013)、ペギウイルスと分類される、新たに記載されるウマフラビウイルスである、TDAV(タイラー病関連ウイルス)によって引き起こされる可能性があることが提唱されている。よって、疾患との明らかな関連が存在しなかった、HPgV-1に対する症例と異なり、TDAVはウマにおける肝炎の症例に必然的に関係があると思われる。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【非特許文献1】S t a p l e t o n ら、J G e n V i r o l、2011:92:233-246

【非特許文献2】L i n d e n b a c h ら、F l a v i v i r i d a e : T h e V i r u s e s a n d T h e i r R e p l i c a t i o n、第33章「F i e l d s V i r o l o g y 第5版(K n i p e ら編集)」W o l t e r s K l u w e r / L i p p i n c o t t W i l l i a m s a n d W i l l i a m s、P h i l a d e l p h i a P A、1101-1152頁

【非特許文献3】H e r i n g l a k e S、J I n f e c t D i s、1998;1

10

20

30

40

50

77:1723-1726

【非特許文献4】Quanら、PNAS 110:8194-8199、2013

【非特許文献5】Drexlerら、PLoS Pathog、9(6)e1003438、2013

【非特許文献6】Kapoorら、mBio、4(2)e000216-13、2013

【非特許文献7】Chandrianaら、PNAS、110(15):E1407-1415、2013

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

10

(発明の要旨)

本明細書に、ヒトペギウイルス1に対するある種の相同性に基づいて、「ヒトペギウイルス2」(HPgV-2)と命名されているヒトウイルスを検出するための組成物、方法およびキットを提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に、HPgV-2特異的核酸プローブおよびプライマー、ならびにHPgV-2核酸を検出するための方法を提供する。他の実施形態において、本明細書に、HPgV-2免疫原性組成物、免疫原性HPgV-2ペプチドで対象を処置する方法、および試料中のHPgV-2特異的対象抗体を検出する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

20

一部の実施形態において、本明細書に、ヒトペギウイルス2(HPgV-2)から少なくとも12個の(例えば、少なくとも12...15...25...35...45もしくは55個の)連続したヌクレオチドを含む合成核酸分子、ならびに/またはUC0125. US(別名「指標例」)、ABT0070P. US、ABT0096P. US、ABT0029A、ABT0239AN、ABT0055A、ABT0030P. US、ABT0041P. US、ABT0188P. US、および/もしくはABT0128AUS型のような、このような核酸からコードされるペプチドを含む組成物を提供する。

【0011】

ある特定の実施形態において、本明細書に、合成核酸分子を含む組成物を提供し、前記合成核酸分子は、ストリンジェントな条件(例えば、高度にストリンジェントな条件)下で、ヒトペギウイルス2(HPgV-2)のゲノム配列の領域1、領域2、領域3または領域4にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さ(例えば、少なくとも12...15...18...27...35個...など)のヌクレオチド配列またはその相補体を含み、HPgV-2のゲノム配列は配列番号1、75および299-303に示されるものであり、領域1は配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778である。

30

【0012】

特定の実施形態において、合成核酸分子は、少なくとも15ヌクレオチドの長さであり、75ヌクレオチド以下の長さである。さらなる実施形態において、合成核酸分子は、検出可能な標識(例えば、蛍光標識、化学発光、酵素的など)を含む。さらなる実施形態において、合成核酸分子は、少なくとも1つの修飾された塩基(例えば、ヌクレアーゼ耐性、高結合効率などのための)を含む。ある特定の実施形態において、全てまたはほぼ全てのヌクレオチドが修飾されている。特定の実施形態において、少なくとも1つの修飾された塩基は、ホスホロチオエート、ボラノホスフェート、4'-チオリボース、ロックド核酸、2'-O-(2'-メトキシエチル)、2'-O-メチル、2'-フルオロ、2'-デオキシ-2'-フルオロ-b-D-アラビノ核酸、ホスホノ酢酸、2'-3'-seco-RNA、モルホリノ核酸類似体、ペプチド核酸類似体、ホスホロジチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-

40

50

メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュードウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、5-アミノアシルウラシル、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ヨードウラシル、5-ニトロインドール、5-プロピニルシトシン、5-プロピニルウラシル、ヒポキサンチン、N3-メチルウラシル、N6, N6-ジメチルアデニン、プリン、C-5-プロピニルシトシン、C-5-プロピニルウラシルおよびジフルオロトウシルからなる群から選択される。

10

#### 【0013】

20

特定の実施形態において、合成核酸分子はDNAを含む（例えば、核酸分子の全体またはほぼ全体がDNAである。）。さらなる実施形態において、組成物は、ハイブリダイゼーションおよび／または増幅バッファーをさらに含む。他の実施形態において、合成核酸分子は、異種性の核酸配列（例えば、発現ベクター、シーケンシングタグ、プロモーターなど）に連結している。

#### 【0014】

ある特定の実施形態において、合成核酸分子は、5' UTR、S遺伝子、E1遺伝子、E2遺伝子、X遺伝子およびNS2遺伝子からなる群から選択されるHPgV-2ゲノムの一部分にハイブリダイズする。特定の実施形態において、5' UTRは、配列番号1のヌクレオチド1-103、配列番号75のヌクレオチド1-110、配列番号299-301、419および430のヌクレオチド1-327、配列番号302のヌクレオチド12-327、ならびに配列番号303のヌクレオチド24-327であり；前記S遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド104-475、配列番号75のヌクレオチド111-482または配列番号299-303、419および430のヌクレオチド328-564であり；前記E1遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド476-1048、配列番号75のヌクレオチド483-1055または配列番号299-303のヌクレオチド565-1137であり；前記E2遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド1049-2110、配列番号75のヌクレオチド1056-2117または配列番号299-303、419および430のヌクレオチド1138-2199であり；前記X遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド2111-2821、配列番号75のヌクレオチド2118-2828または配列番号299-303、419および430のヌクレオチド2200-2910であり；前記NS2遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド2822-3541、配列番号75のヌクレオチド2829-3548または配列番号299-303、419および430のヌクレオチド2911-3630である。ある特定の実施形態において、核酸分子は、NS3遺伝子、NS4A遺伝子、NS4B遺伝子、NS5A遺伝子、NS5B遺伝子および3' UTR（例えば、あらゆる図においてこのような配列とともに示される通り）からなる群から選択される、前記HPgV-2ゲノムの一部分にハイブリダイズする。一部の実施形態において、NS3遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド3542-5425、配列番号75のヌクレオチド3549-5432または配列番号299-303、419および430のヌクレオチド3631-5514であり；前記NS4A遺伝子は、配列番号1

30

40

50

のヌクレオチド 5 4 2 6 - 5 5 4 8、配列番号 7 5 のヌクレオチド 5 4 3 3 - 5 5 5 5 または配列番号 2 9 9 - 3 0 3、4 1 9 および 4 3 0 のヌクレオチド 5 5 1 5 - 5 6 3 7 であり；前記 NS 4 B 遺伝子は、配列番号 1 のヌクレオチド 5 5 4 9 - 6 3 3 4、配列番号 7 5 のヌクレオチド 5 5 5 6 - 6 3 4 1 または配列番号 2 9 9 - 3 0 3、4 1 9 および 4 3 0 のヌクレオチド 5 6 3 8 - 6 4 2 3 であり；前記 NS 5 A 遺伝子は、配列番号 1 のヌクレオチド 6 3 3 5 - 7 7 0 8、配列番号 7 5 のヌクレオチド 6 3 4 2 - 7 7 1 5 または配列番号 2 9 9 - 3 0 3、および 4 3 0 のヌクレオチド 6 4 2 4 - 7 7 9 7 または、配列番号 4 1 9 の 6 4 2 4 - 7 7 9 4 であり；前記 NS 5 B 遺伝子は、配列番号 1 のヌクレオチド 7 7 0 9 - 9 4 0 9、配列番号 7 5 のヌクレオチド 7 7 1 6 - 9 4 1 6 または配列番号 2 9 9 - 3 0 3 および 4 3 0 のヌクレオチド 7 7 9 8 - 9 4 9 8 または配列番号 4 1 9 の 7 7 9 5 - 9 4 9 5 であり；前記 3' UTR の少なくとも一部分は、配列番号 1 のヌクレオチド 9 4 1 0 - 9 7 7 8、配列番号 7 5 のヌクレオチド 9 4 1 7 - 9 4 3 1 または配列番号 2 9 9 - 3 0 3 および 4 3 0 のヌクレオチド 9 4 9 9 - 9 8 6 7 または配列番号 4 1 9 の 9 4 9 6 - 9 8 6 4 である。

#### 【0015】

ある特定の実施形態において、本明細書に、合成核酸分子を含む組成物を提供し、合成核酸分子は、i) 1 4 0 2 - 1 4 3 0、4 7 7 8 - 4 8 1 7 および 8 1 3 5 - 8 1 6 6 から選択される配列番号 1 または 7 5 の 3 つの領域に、ストリンジェントな条件（例えば、高度にストリンジェントな条件）下でハイブリダイズせず、ii) ストリンジェントな条件（例えば、高度にストリンジェントな条件）下で、a) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 - 1 0 3 または配列番号 7 5 のヌクレオチド 1 - 1 1 0 に示される核酸配列を有する、ヒトペギウイルス 2 (HPgV-2) の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) またはその相補体、b) 配列番号 2、7 6、3 0 4、3 1 4、3 2 4、3 3 4 または 3 4 4 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 S タンパク質をコードする、第 1 の核酸配列またはその相補体、c) 配列番号 3、7 7、3 0 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5 または 3 4 5 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 E1 タンパク質をコードする、第 2 の核酸配列またはその相補体、d) 配列番号 4、7 8、3 0 6、3 1 6、3 2 6、3 3 6 または 3 4 6 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 E2 タンパク質をコードする、第 3 の核酸配列またはその相補体、e) 配列番号 5、7 9、3 0 7、3 1 7、3 2 7、3 3 7 または 3 4 7 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 X タンパク質をコードする、第 4 の核酸配列またはその相補体、f) 配列番号 6、8 0、3 0 8、3 1 8、3 2 8、3 3 8 または 3 4 8 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 NS2 タンパク質をコードする、第 5 の核酸配列またはその相補体、g) 配列番号 7、8 1、3 0 9、3 1 9、3 2 9、3 3 9 または 3 4 9 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 NS3 タンパク質をコードする、第 6 の核酸配列またはその相補体、h) 配列番号 8、8 2、3 1 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0 または 3 5 0 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 NS4 A タンパク質をコードする、第 7 の核酸配列またはその相補体、i) 配列番号 9、8 3、3 1 1、3 2 1、3 3 1、3 4 1 または 3 5 1 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 NS4 B タンパク質をコードする、第 8 の核酸配列またはその相補体、j) 配列番号 1 0、8 4、3 1 2、3 2 2、3 3 2、3 4 2 または 3 5 2 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 NS5 A タンパク質をコードする、第 9 の核酸配列またはその相補体、k) 配列番号 1 1、8 5、3 1 3、3 2 3、3 3 3、3 4 3 または 3 5 3 に示されるアミノ酸配列を有する HPgV-2 NS5 B タンパク質をコードする、第 1 0 の核酸配列またはその相補体、ならびに l) 配列番号 1 のヌクレオチド 9 4 1 0 - 9 7 7 8、配列番号 7 5 のヌクレオチド 9 4 1 7 - 9 4 3 1 または配列番号 2 9 9 - 3 0 3 のヌクレオチド 9 4 9 9 - 9 8 6 7 に示される核酸配列を有する、ヒトペギウイルス 2 (HPgV-2) の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) またはその相補体にハイブリダイズする、少なくとも 1 2 ヌクレオチドの長さ（例えば、少なくとも 1 2 . . . 1 5 . . . 2 5 . . . または 3 5 ヌクレオチドの長さ）のヌクレオチド配列を含む。

#### 【0016】

ある特定の実施形態において、合成核酸分子は、少なくとも15ヌクレオチドの長さであり、75ヌクレオチド以下の長さである。さらなる実施形態において、合成核酸分子は検出可能な標識を含む。他の実施形態において、組成物は、ハイブリダイゼーションおよび／または増幅バッファーをさらに含む。一部の実施形態において、合成核酸分子は、異種性の核酸配列に連結している。他の実施形態において、異種性の核酸配列は発現ベクターを含む。付加的な実施形態において、合成核酸分子は、少なくとも1つの修飾された塩基を含む。さらなる実施形態において、合成核酸分子はDNAを含む。

#### 【0017】

特定の実施形態において、本明細書に、合成核酸分子を含む組成物を提供し、前記合成核酸分子は、配列番号1もしくは75の領域1、領域2、領域3もしくは領域4の一部、または配列番号299-303もしくは354-356の一部に、少なくとも75%の同一性（例えば、少なくとも75%・・・85%・・・95%・・・99%または99.5%）を有するヌクレオチド配列またはその相補体を含み、前記一部分は、少なくとも15ヌクレオチドの長さ（例えば、少なくとも15・・・25・・・37・・・48・・・57・・・または65ヌクレオチドの長さ）であり、領域1は配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778である。ある特定の実施形態において、一部分は少なくとも15ヌクレオチドの長さであるが、75ヌクレオチド以下の長さである。他の実施形態において、合成核酸分子は、検出可能な標識を含む。付加的な実施形態において、組成物は、ハイブリダイゼーションおよび／または増幅バッファーをさらに含む。他の実施形態において、合成核酸分子は、異種性の核酸配列に連結している。ある特定の実施形態において、異種性の核酸配列は発現ベクターを含む。

#### 【0018】

一部の実施形態において、本明細書に、実質的に精製された組換えペプチドを含む組成物を提供し、組換えペプチドは、配列番号2-11、76-85、304-353、420-429または431-440のいずれか1つの一部分に少なくとも75%の同一性（例えば、少なくとも75%・・・85%・・・95%または99%の同一性）を有するアミノ酸配列を含み、前記一部分は少なくとも10アミノ酸の長さ（例えば、少なくとも10・・・15・・・25・・・または35アミノ酸の長さ）である。特定の実施形態において、組換えペプチドは、標識（例えば、検出可能な標識またはハプテン）にコンジュゲートしている。他の実施形態において、ペプチドはグリコシル化されている（例えば、E2グリコシル化ペプチド）。さらなる実施形態において、組成物は、哺乳動物中に注射するのに適する、生理学的に耐容されるバッファーをさらに含む。

#### 【0019】

一部の実施形態において、本明細書に、ヒトペギウイルス2（HPgV-2）核酸を検出するための方法であって、a）HPgV-2核酸を含むことが疑われる試料を、ストリンジェントな条件（例えば、高度にストリンジェントな条件）下で、配列番号299-303またはヒトペギウイルス2（HPgV-2）のゲノム配列の領域1、領域2、領域3もしくは領域4にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さ（例えば、少なくとも12・・・18・・・25・・・35ヌクレオチドもしくはそれを超える）のヌクレオチド配列またはその相補体を含む核酸分子と接触させるステップであって、HPgV-2のゲノム配列は配列番号1または75に示されるものであり、領域1は、配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778であるステップ、およびb）核酸分子のHPgV-2核酸に対するハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出するステップであって、前記ハイブリダイゼーションの存在の検出が、前記試料中のHPgV-2核酸の存在を示すステップを含む方法を記載する

。

## 【0020】

ある特定の実施形態において、ヌクレオチド配列は、少なくとも15ヌクレオチドの長さであり、核酸分子は75ヌクレオチド以下の長さ（例えば、15・・・25・・・39・・・54・・・68・・・75ヌクレオチド）である。他の実施形態において、核酸分子は検出可能な標識を含む。さらなる実施形態において、核酸分子は、5' UTR、S遺伝子、E1遺伝子、E2遺伝子、X遺伝子およびNS2遺伝子からなる群から選択されるHPgV-2ゲノムの一部分にハイブリダイズする。

## 【0021】

付加的な実施形態において、本明細書に、a) HPgV-2核酸を含むことが疑われる試料を、HPgV-2増幅生成物が生成されるように第1のプライマーと接触させるステップであって、第1のプライマーは、ストリンジェントな条件（例えば、高度にストリンジェントな条件）下で配列番号299-303、またはヒトペギウイルス2（HPgV-2）のゲノム配列の領域1、領域2、領域3、もしくは領域4にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列またはその相補体を含み（または、第2のプライマーが使用される場合、第1のプライマーはストリンジェントな条件（例えば、高度にストリンジェントな条件）下で、配列番号1または75のあらゆる一部分にハイブリダイズし）、HPgV-2の前記ゲノム配列は、例えば、配列番号1または75に示されるものであり、領域1は、配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778であるステップ、ならびにb) 前記HPgV-2の増幅生成物を検出し、それによって前記試料中のHPgV-2核酸の存在を検出するステップ（例えば、UC0125. US、ABT0070P. US、ABT0096P. US、ABT0029A、ABT0239AN、ABT0030P. US、ABT0041P. US、ABT0188P. US、および／またはABT0128A. US型の検出）を含む、ヒトペギウイルス2（HPgV-2）核酸を検出するための方法を提供する。ある特定の実施形態において、方法は、試料を、配列番号1、75、299-303、419、430にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列またはその相補体を含む第2のプライマーと接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態において、第1のプライマーおよび第2のプライマーは一緒に、長さ50から400塩基対の間である単位複製配列を産生する。ある特定の実施形態において、増幅した核酸を配列決定する（例えば、アダプターを、増幅した核酸上にライゲートし、これをシーケンシングプロトコールにかける。）。

## 【0022】

他の実施形態において、検出は、HPgV-2の増幅生成物のシーケンシングを含む。付加的な実施形態において、第1および／または第2のプライマーは、少なくとも15ヌクレオチドの長さであり、75ヌクレオチド以下の長さである。ある特定の実施形態において、第1および／または第2のプライマーは検出可能な標識を含む。さらなる実施形態において、第1のプライマーは、5' UTR、S遺伝子、E1遺伝子、E2遺伝子、X遺伝子およびNS2遺伝子からなる群から選択される、HPgV-2ゲノムの一部分にハイブリダイズする。

## 【0023】

ある特定の実施形態において、本明細書に、試料中のヒトペギウイルス2（HPgV-2）を検出するための方法であって、a) ヒトペギウイルス2（HPgV-2）を含むことが疑われる試料を、HPgV-2の一部分に特異的に結合してHPgV-2／抗体複合体を形成する抗体（例えば、ビオチン標識化抗体）と接触させるステップであって、抗体が完全な抗体または完全な抗体の抗原結合性部分（FabフラグメントまたはFcフラグメント）であるステップ、およびb) HPgV-2／抗体複合体の存在を検出し、それによってHPgV-2の存在を検出するステップを含む方法を提供する。

## 【0024】

ある特定の実施形態において、H P g V-2は、配列番号1、75、299-303、419または430に示される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。さらなる実施形態において、H P g V-2の一部分は、Sタンパク質、E1タンパク質、E2タンパク質、Xタンパク質、NS2タンパク質、NS3タンパク質、NS4Aタンパク質、NS4Bタンパク質、NS5Aタンパク質およびNS5Bタンパク質からなる群から選択されるH P g V-2タンパク質の一部である。一部の実施形態において、Sタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号2、76、304、314、324、334、334、420もしくは431に示される通りであり、または配列番号2、76、304、314、324、334、344、420もしくは431と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、E1タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号3、77、305、315、325、335、345、421もしくは432に示される通りであり、または配列番号3、77、305、315、325、335、345、421もしくは432と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。さらなる実施形態において、E2タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号4、78、306、316、326、336、346、422もしくは433に示される通りであり、または配列番号4、78、306、316、326、336、346、422もしくは433と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。他の実施形態において、Xタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号5、79、307、317、327、337、347、423、434に示される通りであり、または配列番号5、79、307、317、327、337、347、423もしくは434と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS2タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号6、80、308、318、328、338、348、424、435に示される通りであり、または配列番号6、80、308、318、328、338、348、424もしくは435と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS3タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号7、81、309、319、329、339、349、425、436に示される通りであり、または配列番号7、81、309、319、329、339、349、425もしくは436と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS4Aタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号8、82、310、320、330、340、350、426、437に示される通りであり、または配列番号8、82、310、320、330、340、350、426もしくは437と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。一部の実施形態において、NS4Bタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号9、83、311、321、331、341、351、427、438に示される通りであり、または配列番号9、83、311、321、331、341、351、427もしくは438と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。さらなる実施形態において、NS5Aタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号10、84、312、322、332、342、352、428、439に示される通りであり、または配列番号10、84、312、322、332、342、352、428もしくは439と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS5Bタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号11、85、313、323、333、343、353、429、440に示される通りであり、または配列番号11、85、313、323、333、343、353、429もしくは440と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。一部の実施形態において、抗体は標識されている。ある特定の実施形態において、完全な抗体の抗原結合性部分はF a bフラグメントを含む。

## 【0025】

一部の実施形態において、本明細書に、対象におけるヒトペギウイルス2（H P g V-2）感染を検出する方法であって、a）H P g V-2に対する患者抗体を含むことが疑われる対象からの試料を、ペプチド（またはH P g V-2抗体に特異的な抗体）と接触させ

10

20

30

40

50

るステップであって、ペプチド（またはH P g V－2 抗体に特異的な抗体）は患者抗体に特異的に結合して複合体を形成するステップ、およびb）複合体の存在を検出し、それによって対象における過去または現在のH P g V－2 感染の存在を検出するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態において、ペプチドは、配列番号8 6－9 9または1 0 0－2 1 8、4 2 0－4 2 9、4 3 1－4 4 0に示されるペプチド、または1もしくは2個の保存的アミノ酸変化を有し、または1もしくは2個の非保存的アミノ酸変化を有し、または4個もしくはそれを超えるアミノ酸変化を有するこれらのバリエーションの少なくとも一部を含み、またはそれらからなる。ある特定の実施形態において、ペプチドはグリコシル化されている（例えば、E 2グリコシル化ペプチド）。

#### 【0 0 2 6】

他の実施形態において、ペプチドは、配列番号2－1 1、7 6－8 5、8 6－9 9、1 0 0－2 1 8、3 0 4－3 5 3、4 2 0－4 2 9または4 3 1－4 4 0のいずれか1つの一部分に、少なくとも7 5%の同一性（例えば、少なくとも7 5%・・・・8 5%・・・・9 5%・・・・または9 9%の同一性）を有し、一部分は、少なくとも1 0アミノ酸の長さ（例えば、少なくとも1 0・・・・1 5・・・・2 5・・・・3 0または3 5アミノ酸の長さ）である。さらなる実施形態において、ペプチドは標識されている。ある特定の実施形態において、ペプチドは標識されており、溶液中で自由に対象抗体に結合して複合体を形成する。ある特定の実施形態において、この複合体は、次いで、ペプチド上の標識によって、標識に結合（例えば、ストレプトアビジン－ビオチン結合）している部分を有する固体支持体に結合する。特定の実施形態において、複合体中で患者抗体に結合することができる2次抗体が添加される。他の実施形態において、ペプチドは標識され、溶液中に含まれずに、1）固相上に提供される非標識ペプチドもしくは他の抗原に次いで結合することができる、抗体不含溶液、2）ビオチン結合性分子（例えば、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン（neutravidin）、ビオチンに対する抗体など）を含む固相に対して次いで複合体形成することができる、ビオチン分子（もしくは他の部分）だけを含む固体溶液中にやはり含まれない非標識のペプチドに次いで結合し得る、溶液中に含まれない抗体、または3）固相上に存在する抗体／ペプチド複合体に結合する。

#### 【0 0 2 7】

ある特定の実施形態において、本明細書に、対象におけるヒトペギウイルス2（H P g V－2）感染を検出するための方法であって、a）H P g V－2に対する患者抗体を含むことが疑われる対象からの試料を、ペプチドおよび固体支持体と接触させるステップであって、前記ペプチドは標識を含み、前記固体支持体は前記標識に結合している部分を含むステップ、ならびにb）前記試料を、以下のような条件下、すなわち、i）前記ペプチドが前記患者抗体に特異的に結合して複合体を形成し、i i）前記複合体が、少なくとも1つの前記部分に結合している前記標識によって前記固体支持体に結合する、条件下でインキュベートするステップ、c）前記固体支持体を洗浄するステップ、d）前記複合体中の前記患者抗体に結合することができる、検出可能に標識されている2次抗体を添加するステップ、e）前記固体支持体を洗浄するステップ、ならびにf）前記複合体の前記存在を検出し、それによって対象における過去または現在のH P g V－2感染の存在を検出するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態において、前記ペプチド上の標識はビオチンを含む。さらなる実施形態において、前記固体支持体上の部分はアビジン分子を含む。他の実施形態において、固体支持体はビーズを含む。

#### 【0 0 2 8】

ある特定の実施形態において、ペプチドは、Sタンパク質、E 1タンパク質、E 2タンパク質、Xタンパク質、N S 2タンパク質、N S 3タンパク質、N S 4 Aタンパク質、N S 4 Bタンパク質、N S 5 Aタンパク質およびN S 5 Bタンパク質からなる群から選択される、H P g V－2の少なくとも一部を含む。一部の実施形態において、Sタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号2、7 6、3 0 4、3 1 4、3 2 4、3 3 4もしくは3 3 4に示される通りであり、または配列番号2、7 6、3 0 4、3 1 4、3 2 4、3 3 4もしくは3 4 4と9 0－9 9%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実

10

20

30

40

50

施形態において、E1タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号3、77、305、315、325、335もしくは345に示される通りであり、または配列番号3、77、305、315、325、335もしくは345と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。さらなる実施形態において、E2タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号4、78、306、316、326、336もしくは346に示される通りであり、または配列番号4、78、306、316、326、336もしくは346と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。他の実施形態において、Xタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号5、79、307、317、327、337もしくは347に示される通りであり、または配列番号5、79、307、317、327、337もしくは347と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS2タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号6、80、308、318、328、338もしくは348に示される通りであり、または配列番号6、80、308、318、328、338もしくは348と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS3タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号7、81、309、319、329、339もしくは349に示される通りであり、または配列番号7、81、309、319、329、339もしくは349と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS4Aタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号8、82、310、320、330、340もしくは350に示される通りであり、または配列番号8、82、310、320、330、340もしくは350と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。一部の実施形態において、NS4Bタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号9、83、311、321、331、341もしくは351に示される通りであり、または配列番号9、83、311、321、331、341もしくは351と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。さらなる実施形態において、NS5Aタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号10、84、312、322、332、342もしくは352に示される通りであり、または配列番号10、84、312、322、332、342もしくは352と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実施形態において、NS5Bタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号11、85、313、323、333、343もしくは353に示される通りであり、または配列番号11、85、313、323、333、343もしくは353と90-99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。一部の実施形態において、抗体は標識されている。ある特定の実施形態において、完全な抗体の抗原結合性部分はFabフラグメントを含む。

#### 【0029】

ある特定の実施形態において、本明細書に、HPgV-2核酸をシーケンシングする方法であって、a) 試料を処理して単離されたHPgV-2RNAを産生するステップ、b) 前記単離されたHPgV-2RNAをランダムプライマーまたは前記HPgV-2RNAの領域に特異的なプライマーと接触させ、cDNAライブラリーが産生されるように増幅するステップ、c) 前記cDNAライブラリーを、アダプターがコンジュゲートしているライブラリーが産生されるような条件下、シーケンシングアダプターと接触させるステップ、およびd) 前記アダプターがコンジュゲートしているcDNAライブラリーをシーケンシングして、前記単離されたHPgV-2RNAの核酸配列を少なくとも部分的に決定するステップを含む方法を提供する。

#### 【0030】

一部の実施形態において、本明細書に、対象におけるヒトペギウイルス2 (HPgV-2) 感染を処置または防止するための方法であって、弱毒化もしくは不活化されたHPgV-2粒子、および/またはHPgV-2抗原の一部を含む組成物を対象に投与し、それによって対象におけるHPgV-2に対する免疫応答を産生するステップを含む方法を提供する。他の実施形態において、免疫応答は、HPgV-2による感染を防止または処置するのに十分である。一部の実施形態において、HPgV-2の抗原一部分はペプチド

を含み、ペプチドは、Sタンパク質、E1タンパク質、E2タンパク質、Xタンパク質、NS2タンパク質、NS3タンパク質、NS4Aタンパク質、NS4Bタンパク質、NS5Aタンパク質およびNS5Bタンパク質からなる群から選択されるHPgV-2の少なくとも一部分を含む。

#### 【0031】

他の実施形態において、本明細書に、弱毒化もしくは不活化されたHPgV-2粒子、および／またはHPgV-2抗原の一部分を含む組成物を含む、対象に投与するのに適する免疫原性組成物を提供する。さらなる実施形態において、HPgV-2抗原の一部分はペプチドを含み、ペプチドは、Sタンパク質、E1タンパク質、E2タンパク質、Xタンパク質、NS2タンパク質、NS3タンパク質、NS4Aタンパク質、NS4Bタンパク質、NS5Aタンパク質およびNS5Bタンパク質からなる群から選択されるHPgV-2タンパク質の少なくとも一部分を含む。

#### 【0032】

さらなる実施形態において、本明細書に、少なくとも1つの以下の構成成分を含む、ヒトペギウイルス2（HPgV-2）を検出するためのキットまたはシステムを提供する：

a）ストリンジェントな条件下で配列番号209-303、419、430もしくはヒトペギウイルス2（HPgV-2）のゲノム配列の領域1、領域2、領域3もしくは領域4にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さのヌクレオチド配列またはその相補体を含む、第1の合成核酸分子を含む第1の組成物であって、HPgV-2のゲノム配列は配列番号1または75に示されるものであり、領域1は、配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778である、第1の組成物、およびb）配列番号209-303、または配列番号1もしくは75の領域1、領域2、領域3もしくは領域4の一部分に少なくとも75%の同一性を有するヌクレオチド配列またはその相補体を含む、第2の合成核酸分子を含む第2の組成物であって、一部分は少なくとも15ヌクレオチドの長さであり（例えば、少なくとも15・・・24・・・37ヌクレオチドなど）、領域1は配列番号1または75のヌクレオチド1-1401であり、領域2は配列番号1または75のヌクレオチド1431-4777であり、領域3は配列番号1または75のヌクレオチド4818-8134であり、領域4は配列番号1または75のヌクレオチド8167-9778である、第2の組成物。一部の実施形態において、キットおよびシステムは、増幅バッファー、シーケンシング用の試薬、PCR用の試薬、第1または第2の合成核酸分子を使用するための書面の指示書、第1および／または第2の組成物を保持するための液体容器、ならびに液体容器を保持するための輸送容器からなる群から選択される付加的な構成成分をさらに含む。

#### 【0033】

ある特定の実施形態において、本明細書に、実質的に精製された組換えペプチドを含む組成物を含む、ヒトペギウイルス2（HPgV-2）を検出するためのキットおよびシステムを提供し、組換えペプチドは、配列番号2-11、76-85、86-99、100-218、304-353、420-429および431-440のいずれか1つの一部分に少なくとも75%の同一性（例えば、少なくとも75%・・・85%・・・95%・・・99%の同一性）を有するアミノ酸配列を含み、前記一部分は少なくとも10アミノ酸の長さ（例えば、少なくとも10・・・15・・・25または35アミノ酸の長さ）である。他の実施形態において、キットは、患者のHPgV-2抗体に特異的な抗体（例えば、ビオチン標識化抗体）を含む。一部の実施形態において、キットおよびシステムは、イムノアッセイバッファー；イムノアッセイビーズ、化学発光微粒子、組換えペプチドがそれに付着している、ビーズのような、固体支持体（例えば、ビオチンに結合することができる固体支持体、例えばアビジン標識化固体支持体）、サンドイッチアッセイのための試薬、患者抗体を検出するための組成物を使用するための書面の指示書；組成物を保持するための液体容器；ならびに液体容器を保持するための輸送容器からなる群から選択され

る付加的な構成成分をさらに含む。

【0034】

一部の実施形態において、本明細書に、抗HPgV-2化合物に対してアッセイするための方法であって、a) ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) を含む試料を試験化合物と接触させるステップ、およびb) 試験化合物がHPgV-2複製を阻害するか否かを検出するステップであって、HPgV-2複製の阻害は、試験化合物が抗HPgV-2化合物であることを示すステップを含む方法を提供する。

【0035】

ある特定の実施形態において、本明細書に、実質的に精製された組換えペプチドを含む組成物を提供し、前記組換えペプチドは、以下の少なくとも1つを含む： a) HPgV-2 NS3タンパク質からの少なくとも17個（例えば、少なくとも17・・・24・・・35個・・・またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第1のアミノ酸配列、 b) HPgV-2 NS5Bタンパク質からの少なくとも13個（例えば、少なくとも13・・・17・・・25・・・35個またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第2のアミノ酸配列、 c) HPgV-2 NS2タンパク質からの少なくとも11個（例えば、少なくとも11・・・15・・・19・・・25・・・35個またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第3のアミノ酸配列、 d) HPgV-2 NS4Bタンパク質からの少なくとも8個（例えば、少なくとも8・・・11・・・15・・・23・・・35個またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第4のアミノ酸配列、 e) HPgV-2 NS4aタンパク質からの少なくとも5個（例えば、少なくとも5・・・10・・・18・・・25・・・35個またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第5のアミノ酸配列、 f) HPgV-2 Sタンパク質からの少なくとも6個（例えば、少なくとも6・・・12・・・18・・・25・・・35個またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第6のアミノ酸配列、 g) HPgV-2 E1タンパク質からの少なくとも6個（例えば、少なくとも6・・・12・・・17・・・25・・・35個またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第7のアミノ酸配列、およびh) HPgV-2 Xタンパク質からの少なくとも8個（例えば、少なくとも8・・・14・・・25・・・35個またはそれ以上）の連続したアミノ酸を含む第8のアミノ酸配列。特定の実施形態において、HPgV-2 NS3タンパク質は、配列番号7、81、309、319、329、339および349において示す通りである。他の実施形態において、HPgV-2 NS5Bタンパク質は、配列番号11、85、313、323、333、343または353において示す通りである。付加的な実施形態において、HPgV-2 NS2タンパク質は、6、80、308、318、328、338または348において示す通りである。付加的な実施形態において、HPgV-2 NS4Bタンパク質は、配列番号9、83、311、321、331、341または351において示す通りである。さらなる実施形態において、HPgV-2 NS4aタンパク質は、配列番号8、82、310、320、330、340または350において示す通りである。他の実施形態において、HPgV-2 Sタンパク質は、配列番号2、76、304、314、324、334または344において示す通りである。さらなる実施形態において、HPgV-2 E1タンパク質は、配列番号3、77、305、315、325、335または345において示す通りである。付加的な実施形態において、HPgV-2 Xタンパク質は、配列番号5、79、307、317、327、337または347において示す通りである。

【0036】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載するペプチドおよびタンパク質は、原核細胞において組換え発現される。他の実施形態において、本明細書に記載するペプチドおよびタンパク質（例えば、E1およびE2）は、哺乳動物細胞において組換え発現される。

【0037】

一部の実施形態において、本明細書に、a) 以下の試薬： i) ビオチンに結合することができる固相、 ii) 前記試験試料に存在するHPgV-2抗原を捕捉するためのビオチ

10

20

30

40

50

ン化抗H P g V－2抗体、i i i) 前記試験試料中の抗H P g V－2抗体を捕捉するためのビオチン化H P g V－2抗原、およびi v) (i i i) のビオチン化H P g V－2抗原によって捕捉される抗H P g V－2抗体に対する結合のために、検出可能に標識されたH P g V－2抗原を提供するステップ、ならびにb) ステップ(a) の試薬を、以下：(i) (a) (i i) のビオチン化抗H P g V－2抗体が前記固相に、前記ビオチンを介して結合し、前記試験試料中に存在するH P g V－2抗原に特異的に結合して、前記固相上に捕捉された抗H P g V－2抗体－H P g V－2抗原複合体を生成し、(i i) (a) (i i i) のビオチン化抗原が前記固相に、前記ビオチンを介して結合し、前記試験試料中に存在する抗H P g V－2抗体に特異的に結合して、前記固相上に捕捉されたH P g V－2抗原－抗H P g V－2抗体複合体を生成し、(a) (i v) の前記検出可能に標識されたH P g V－2抗体が、前記固相上に捕捉された前記H P g V－2抗原－抗H P g V－2抗体複合体における抗H P g V－2抗体に特異的に結合する、反応混合物を生成するための条件下でインキュベートするステップ、c) 付着している捕捉された抗体、および未反応の試験試料および試薬からの捕捉されたH P g V－2抗原を含む固相を単離するステップ、d) 単離された固相を、(b) (i i) の抗H P g V－2抗体－H P g V－2抗原複合体において捕捉された前記H P g V－2抗原に結合する、検出可能に標識されたコンジュゲート抗体と接触させるステップ、ならびにe) 前記シグナルのトリガリングの際、検出可能な標識部分から産生されたシグナルを検出するステップであって、前記シグナルの存在は、前記試験試料中のH P g V－2の存在を示すステップを含む、試験試料中のH P g V－2抗原およびH P g V－2抗体を検出するための方法（および列挙する構成成分を有する対応するキット）を提供する。

10

20

#### 【0038】

ある特定の実施形態において、方法（および対応するキット）は、(v) 第2のH P g V－2抗原がステップ(a i i i) におけるH P g V－2抗原と別個である、前記試験試料中の抗H P g V－2抗体を捕捉するための第2のビオチン化H P g V－2抗原、および(v i) (v) のビオチン化H P g V－2抗原によって捕捉された抗H P g V－2抗体に対する結合のための検出可能に標識されたH P g V－2抗原を提供するステップをさらに含み、(b) (i i i) (a) (v) のビオチン化抗原は、前記ビオチンを介して前記固相に結合し、前記試験試料中に存在する抗H P g V－2抗体に特異的に結合して、前記固相上に捕捉されたH P g V－2抗原－抗H P g V－2抗体複合体を生成し、(a) (v i) の前記検出可能に標識されたH P g V－2抗原は、前記固相上に捕捉された前記H P g V－2抗原－抗H P g V－2抗体における抗H P g V－2抗体に特異的に結合する。ある特定の実施形態において、方法は、(a) (v i i) 第3のH P g V－2抗原が、ステップ1(a) (i i i) またはステップ2(a) (v) におけるH P g V－2抗原と別個である、前記試験試料中の抗H P g V－2抗体を捕捉するための第3のビオチン化H P g V－2抗原、および(v i i i) (v i i) のビオチン化H P g V－2抗原によって捕捉された抗H P g V－2抗原に対する結合のために検出可能に標識されたH P g V－2抗原を提供するステップをさらに含み、(b) (i v) (a) (v i i) のビオチン化抗原は前記ビオチンを介して前記固相に結合し、前記試験試料中に存在する抗H P g V－2抗体に特異的に結合して、前記固相上に捕捉されたH P g V－2抗原－抗H P g V－2抗体複合体を生成し、(a) (v i i) の前記検出可能に標識されたH P g V2抗原は、前記固相上に捕捉された前記H P g V－2抗原－抗H P g V2抗体複合体における抗H P g V－2抗体に特異的に結合する。

30

40

#### 【0039】

ある特定の実施形態において、本明細書に、試験試料中のH P g V－2抗原およびH P g V－2抗体の両方を同時に検出するための方法を提供し、前記組合せアッセイは、a) タンパク質；第1のH P g V－2のペプチド配列を含む第1の捕捉抗原、b) 第1のH P g V－2タンパク質のペプチド配列を含み、検出可能な標識をさらに含む、第1の検出抗原、c) 第2のH P g V－2タンパク質からの抗原配列を含む、第2の捕捉抗原、d) 第2のH P g V－2タンパク質からの抗原配列を含み、検出可能な標識をさらに含む、第2

50

の検出抗原、e) 第3のHPgV-2タンパク質からの抗原配列を含む、第3の捕捉抗原、f) 第3のHPgV-2タンパク質からの抗原配列を含み、検出可能な標識をさらに含む、第3の検出抗原、g) 第1の捕捉抗体、h) 検出可能な標識を含むコンジュゲート抗体を含み、前記捕捉抗体および前記コンジュゲート抗体は、前記試験試料からの第4のHPgV-2タンパク質に特異的に結合し、前記組合せアッセイは、(i) 前記試験試料を前記捕捉抗原、前記検出抗原、前記捕捉抗体、および前記コンジュゲート抗体と、a) 前記試験試料中に存在する、前記第1の捕捉抗原と前記検出抗原と第1の抗HPgV-2抗体との間のサンドイッチ複合体の形成、b) 前記試験試料中に存在する、前記第2の捕捉抗原と前記第2の検出抗原と前記第2のHPgV-2タンパク質に対する抗HPgV-2抗体との間のサンドイッチ複合体の形成、c) 前記試験試料中に存在する、前記第3の捕捉抗原と前記第3の検出抗原と前記第3のHPgV-2タンパク質に対する抗HPgV-2抗体との間のサンドイッチ複合体の形成、およびd) 前記試験試料中に存在する、前記捕捉抗体と前記コンジュゲート抗体とHPgV-2抗原との間の複合体の形成を可能にする条件下で、接触させるステップ；ならびに(ii) 前記複合体が形成した結果、前記検出可能な標識から産生されたシグナルを測定し、それによって前記試料中に存在するHPgV-2抗原およびHPgV-2抗体を同時に検出するステップにより行われる。

10

#### 【0040】

ある特定の実施形態において、本明細書随所に記載する組成物およびキットは、微粒子（例えば、ペプチド上の標識に結合するよう構成される）、ピロリン酸Na（例えば、pH 6.3）、NaCl（例えば、約0.9M）、EDTA、ショ糖、Tergitol 15-S-40、BME、Tergitol 15-S-9、Azide（例えば、0.08%）、Korasilon Antifoam（例えば、1ppm）、Bis-Trisバッファー（例えば、pH 6.3）、ソルビトール、デキストラン、PVSA、BSA、塩化ベンゼトニウム、ヘパリンナトリウム塩、フッ化ナトリウム、Triton X-100、ゲンタマイシン（Gentamycin）、A56620、グリシン、ラウリルスルホベタイン、パルミチルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、C16TAB、C18TAB、CHAPS、サポニン、メチルセルロース、亜硫酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、尿素、HCl、C12TAB、パルミチルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、マルトース、クエン酸、2-ジエチルアミノエタンチオール、NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、ラウリルスルホベタイン、CHAPS、NaOH、MESバッファーw/Triton X-405、NaCl、BSA、Nipasept、キノロン、TRISバッファーw/CKSタンパク質、イーストSOD、Triton X-405、ヤギ血清、EDTA、キノロン、消泡剤、デントラン（Dentrane）硫酸塩、Proclin、硫酸ゲンタマイシン、標識（例えば、アクリジニウム標識）抗ヒトIgGまたはIgMモノクローナル抗体、ストレプトアビジン標識化微粒子、NFDm、SB3-14、PVSA（例えば、0.8%）、ACD、CPDA-1、CPD、CP2D、シュウ酸カリウム、EDTAナトリウム、EDTAカリウムクエン酸ナトリウム、ヘパリン、ヘパリンリチウム、ヘパリンナトリウムおよびクエン酸ナトリウムからなる群から選択される少なくとも1つの試薬をさらに含む。

20

30

#### 【0041】

一部の実施形態において、本明細書に、対象におけるヒトペギウイルス2（HPgV-2）およびヒトペギウイルス1（HPgV-1、別名GVC-C）両方の感染を検出する方法であって、a) HPgV-2に対する対象抗体およびHPgV-1に対する対象抗体を含むことが疑われる対象からの試料を、HPgV-2由来のペプチドおよびHPgV-1由来のペプチドと接触させるステップであって、前記ペプチドは前記対象抗体に特異的に結合して複合体を形成するステップ、ならびにb) 前記複合体の存在を検出し、それによって前記対象における過去および現在のHPgV-2およびHPgV-1感染の存在を検出するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に、ヒトペギウイルス2（HPgV-2）核酸およびヒトペギウイルス1（HPgV-1；別名GBV-C）核酸を検出するための方法であって、a) HPgV-2およびHPgV-1

40

50

の核酸を含むことが疑われる試料を、i) ストリンジェントな条件下でHPgV-2 核酸配列にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さの第1の核酸分子、およびii) ストリンジェントな条件下でHPgV-1の核酸配列にハイブリダイズする、少なくとも12ヌクレオチドの長さの第2の核酸分子と接触させるステップ、ならびにb) 前記第1および第2の核酸分子の、前記HPgV-2およびHPgV-1核酸に対するハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出するステップであって、前記ハイブリダイゼーションの存在の検出は、前記試料中の前記HPgV-2およびHPgV-1核酸の存在を示すステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態において、HPgV-1およびHPgV-1対象抗体を検出するためのペプチドおよびアミノ酸配列は、米国特許第6,870,042号、およびSouzara, J. Clin. Microbiol.、2006、44(9):3105-3113に見出される。

10

#### 【0042】

ある特定の実施形態において、本明細書に、抗HPgV-2抗体を含む組成物を提供する。このような抗体は、HPgV-2に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が産生されるように、宿主動物（例えば、マウス、ウサギなど）における免疫原として本明細書に記載されるあらゆるペプチドを使用して産生され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0043】

【図1A】配列番号1で示される、UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号1は、ウラシルをチミンとして示している。

20

【図1B】配列番号1で示される、UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号1は、ウラシルをチミンとして示している。

【図1C】配列番号1で示される、UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号1は、ウラシルをチミンとして示している。

【図2A】アミノ酸配列を示し、HPgV-2指標例であるUC0125. USの核酸配列を記載する図である。1) HPgV-2のSタンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）を示し、HPgV-2のSタンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド104-475）を記載する；2) HPgV-2のE1タンパク質のアミノ酸配列（配列番号3）を示し、HPgV-2のE1タンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド476-1048）を記載する；3) HPgV-2のE2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号4）を示し、HPgV-2のE2タンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド1049-2110）を記載する；4) HPgV-2のXタンパク質のアミノ酸配列（配列番号5）を示し、HPgV-2のXタンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド2111-2821）を記載する。

30

【図2B】アミノ酸配列を示し、HPgV-2指標例であるUC0125. USの核酸配列を記載する図である。1) HPgV-2のNS2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号6）を示し、HPgV-2のNS2タンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド2822-3541）を記載する；2) HPgV-2のNS3タンパク質のアミノ酸配列（配列番号7）を示し、HPgV-2のNS3タンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド3542-5425）を記載する；3) HPgV-2のNS4Aタンパク質のアミノ酸配列（配列番号8）を示し、HPgV-2のNS4Aタンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド5426-5548）を記載する；4) HPgV-2のNS4Bタンパク質のアミノ酸配列（配列番号9）を示し、HPgV-2のNS4Bタンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオチド5549-6334）を記載する。

40

【図2C】アミノ酸配列を示し、HPgV-2指標例であるUC0125. USの核酸配列を記載する図である。1) HPgV-2のNS5Aタンパク質のアミノ酸配列（配列番号10）を示し、HPgV-2のNS5Aタンパク質の核酸配列（配列番号1のヌクレオ

50

チド 6 3 3 5-7 7 0 8) を記載する; 2) H P g V-2 の N S 5 B タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 1 1) を示し、H P g V-2 の N S 5 B タンパク質の核酸配列 (配列番号 1 のヌクレオチド 7 7 0 9-9 4 0 9) を記載する; 3) H P g V-2 の 5' U T R 核酸配列 (配列番号 1 のヌクレオチド 1-1 0 3) を示す; および 4) H P g V-2 の 3' U T R の核酸配列 (配列番号 1 のヌクレオチド 9 4 1 0-9 7 7 8) を示す。

【図 3 A】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 B】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 C】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 D】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 E】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 F】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 G】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 H】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 I】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 J】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 K】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 L】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 M】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 3 N】配列番号 1 の核酸配列の注釈付きバージョンを示し、対応するコードされたアミノ酸配列を下に示す図である。

【図 4】実施例 3 の q P C R に使用される 7 組のプライマーおよびプローブ (下線) とともに、配列番号 1 のヌクレオチド 3 2 5 3-4 5 1 2 を表す H P g V-2 ゲノムのクローニング部分を示す図である。

【図 5 A】以下の実施例 3 における q P C R T a q M a n ベースの検出アッセイの結果を示す図である。H P g V-2 プライマー/T a q M a n プローブセット (1-2-3-5-7; 配列および位置については図 4 参照) を用いて、N S 2 3 E x のインビトロ転写物の 1 0 倍段階希釈物を検出し、H P g V-2 指標例 (U C 0 1 2 5. U S) の R N A (太字で強調) の 1 0 倍希釈物を検出した。右下のパネルは、各プライマー/プローブセットについて 1 0 0 n g の N S 2 3 E x および H P g V-2 R N A の検出を示す。

【図 5 B】以下の実施例 3 における q P C R T a q M a n ベースの検出アッセイの結果を示す図である。指標例に存在する H P g V-2 R N A の量を推定するために、1 \_ 1 0 0 n g の結果を設定するために正規化し、ログスケールでプロットした C t 値を示す。実験に含まれる陰性対照は、1) 水、2) p T R I (無関係なインビトロ転写物)、3) C H U 2 7 2 5 (H I V+ / G B V-C+ 試料)、および 4) N-5 0 5 (H I V+ / G B V-C- 試料) であり、他の感染 (H I V、G B V-C) との交差反応がないことを示す。

【図 6】プローブおよびプライマーセット 1、2、3、4、5、7 および 1 5 および 4 4

10

20

30

40

50

F（配列番号12）ならびに342R（配列番号13）を用いて行ったSYBRグリーンqPCRアッセイの結果を示す図である。上記プローブおよびプライマーセットは、NS23Exインビトロ転写物（図6、曲線A、B、C）およびHPgV-2指標（UC0125. US）ケースのRNA（図6、曲線D）から作製されたcDNAの10倍段階希釈物を検出するために使用された。陰性対照（図6、曲線EおよびF）、N-505（HIV（+）/GBV-C（-））および水は増幅されなかった。各々のグラフは、使用されたプライマーセットで標識される。

【図7A】HCV（+）プラズマフェレーシスドナーの血漿試料中の単離物ABT0070P. USおよびABT0096P. USを検出したプライマー／プローブセット3（上段パネル）およびプライマー／プローブセット2（下段パネル）を用いたTaqMan qPCRアッセイの結果を示す図である。

【図7B】American Red Cross血液ドナー血漿（HCV RNA+／抗体+）試料から抽出されたRNAをTaqManプライマー／プローブセット2および3を用いてスクリーニングしたアッセイの結果を示す図である。ABT0128A. USは検出されたが、セット2（太字）のみであった。

【図8】試料中のHPgV-2に対する対象とする抗体を検出するために使用され得る例示的な溶液相捕捉アッセイの概略図を提供する図である。試料とビオチン化ペプチド（単数または複数）の両方を一緒にインキュベートし、続いて、ストレプトアビジンで被覆された固相支持体とともにインキュベートする。免疫複合体は、ペプチド上のビオチン結合によって固相支持体に捕捉される（ステップ1）。免疫複合体は、化学発光標識されたヒトIgGを用いて間接的に検出される（ステップ2）。

【図9A】配列番号75で示される、ABT0070P. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号75は、ウラシルをチミンとして示している。

【図9B】配列番号75で示される、ABT0070P. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号75は、ウラシルをチミンとして示している。

【図9C】配列番号75で示される、ABT0070P. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号75は、ウラシルをチミンとして示している。

【図10A】HPgV-2バリエントであるABT0070P. USに由来する種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）HPgV-2のSタンパク質のアミノ酸配列（配列番号76）を示し、HPgV-2のSタンパク質の核酸配列（配列番号75のヌクレオチド111-482）を記載する；2）HPgV-2のE1タンパク質のアミノ酸配列（配列番号77）を示し、HPgV-2のE1タンパク質の核酸配列（配列番号75のヌクレオチド483-1055）を記載する；3）、HPgV-2のE2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号78）を示し、HPgV-2のE2タンパク質の核酸配列（配列番号75のヌクレオチド1056-2117）を記載する；4）HPgV-2のXタンパク質のアミノ酸配列（配列番号79）を示し、HPgV-2のXタンパク質の核酸配列（配列番号75のヌクレオチド2118-2828）を記載する。

【図10B】HPgV-2バリエントであるABT0070P. USに由来する種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）HPgV-2のNS2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号80）を示し、HPgV-2のNS2タンパク質の核酸配列（配列番号75のヌクレオチド2829-3548）を記載する；2）HPgV-2のNS3タンパク質のアミノ酸配列（配列番号81）を示し、HPgV-2のNS3タンパク質の核酸配列（配列番号75のヌクレオチド3549-5432）を記載する；3）HPgV-2のNS4Aタンパク質のアミノ酸配列（配列番号82）を示し、HPgV-2のNS4Aタンパク質の核酸配列（配列番号75のヌクレオチド5433-5555）を記載する；4）HPgV-2のNS4Bタンパク質のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

(配列番号 83) を示し、HPgV-2 の NS4B タンパク質の核酸配列 (配列番号 75 のヌクレオチド 5556-6341) を記載する。

【図 10C】HPgV-2 バリエントである ABT0070P、US に由来する種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) HPgV-2 の NS5A タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 84) を示し、HPgV-2 の NS5A タンパク質の核酸配列 (配列番号 75 のヌクレオチド 6342-7715) を記載する；2) HPgV-2 の NS5B タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 85) を示し、HPgV-2 の NS5B タンパク質の核酸配列 (配列番号 75 のヌクレオチド 7716-9416) を記載する；3) HPgV-2 の 5' UTR 核酸配列 (配列番号 75 のヌクレオチド 1-110) を記載する；4) HPgV-2 の 3' UTR の一部分の核酸配列 (配列番号 75 のヌクレオチド 9417-9431) を記載する。

10

【図 11A】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

【図 11B】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

【図 11C】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

20

【図 11D】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

【図 11E】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

30

【図 11F】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

【図 11G】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

【図 11H】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

40

【図 11I】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) とのアラインメントを示す図である。

【図 11J】HPgV-2 バリエントである UC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US (配列番号 354) および ABT0128A、US (配列番号 355) のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 356) と

50

【図 1 1 W】 H P g V - 2 バリエントである U C 0 1 2 5 , U S , A B T 0 0 7 0 P , U

50

S、ABT0096P、US（配列番号354）およびABT0128A、US（配列番号355）のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列（配列番号356）とのアラインメントを示す図である。

【図11X】HPgV-2バリエーションであるUC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US（配列番号354）およびABT0128A、US（配列番号355）のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列（配列番号356）とのアラインメントを示す図である。

【図11Y】HPgV-2バリエーションであるUC0125、US、ABT0070P、US、ABT0096P、US（配列番号354）およびABT0128A、US（配列番号355）のゲノムまたは部分ゲノムと大部分のコンセンサス配列（配列番号356）とのアラインメントを示す図である。

【図12A】Jukes-Cantorモデルを用いてGeneiousで構築された29個の代表的なフラビウイルス（図に列挙されるGenBankアクセッション番号）とともに、HPgV-2（UC0125、US；配列番号1）およびABT0070P、US（配列番号75）の系統樹、およびブランチサポートを計算するために使用される10,000個のブートストラップ・レプリケートを使用した近隣結合アルゴリズムを示す図である。次に、これらのツリートポロジーは、MrBayes V3.2ソフトウェア（1,000,000個の試料ツリー、バーンインとして廃棄された10%のツリー、平均標準偏差<0.01で定義されたコンバージェンス）で最尤ベイズアプローチを使用して精緻化された。各ツリーは、アウトグループとして1型デング熱ウイルス（DENV1）および黄熱病ウイルス（YFV）に根ざしていた。ポリタンパク質配列全体に対して個別に行われた分析を示す図である。

【図12B】Jukes-Cantorモデルを用いてGeneiousで構築された29個の代表的なフラビウイルス（図に列挙されるGenBankアクセッション番号）とともに、HPgV-2（UC0125、US；配列番号1）およびABT0070P、US（配列番号75）の系統樹、およびブランチサポートを計算するために使用される10,000個のブートストラップ・レプリケートを使用した近隣結合アルゴリズムを示す図である。次に、これらのツリートポロジーは、MrBayes V3.2ソフトウェア（1,000,000個の試料ツリー、バーンインとして廃棄された10%のツリー、平均標準偏差<0.01で定義されたコンバージェンス）で最尤ベイズアプローチを使用して精緻化された。各ツリーは、アウトグループとして1型デング熱ウイルス（DENV1）および黄熱病ウイルス（YFV）に根ざしていた。NS3に対して個別に行われた分析を示す図である。

【図12C】Jukes-Cantorモデルを用いてGeneiousで構築された29個の代表的なフラビウイルス（図に列挙されるGenBankアクセッション番号）とともに、HPgV-2（UC0125、US；配列番号1）およびABT0070P、US（配列番号75）の系統樹、およびブランチサポートを計算するために使用される10,000個のブートストラップ・レプリケートを使用した近隣結合アルゴリズムを示す図である。次に、これらのツリートポロジーは、MrBayes V3.2ソフトウェア（1,000,000個の試料ツリー、バーンインとして廃棄された10%のツリー、平均標準偏差<0.01で定義されたコンバージェンス）で最尤ベイズアプローチを使用して精緻化された。各ツリーは、アウトグループとして1型デング熱ウイルス（DENV1）および黄熱病ウイルス（YFV）に根ざしていた。NS5Bタンパク質に対して個別に行われた分析を示す図である。

【図13A】配列番号299で示される、HPgV-2コンセンサス配列のゲノム核酸配列を提供する。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号299は、ウラシルをチミンとして示している。

【図13B】配列番号299で示される、HPgV-2コンセンサス配列のゲノム核酸配列を提供する。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号299は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 1 3 C】配列番号 2 9 9 で示される、H P g V-2 コンセンサス配列のゲノム核酸配列を提供する。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 2 9 9 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 1 4 A】H P g V-2 コンセンサス配列に由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) 5' U T R 配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 1-3 2 7) を記載する; 2) H P g V-2 の S タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 0 4) を示し、H P g V-2 の S タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 3 2 8-5 6 4) を記載する; 3) H P g V-2 の E 1 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 0 5) を示し、H P g V-2 の E 1 タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 5 6 5-1 1 3 7) を記載する; 4) H P g V-2 の E 2 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 0 6) を示し、H P g V-2 の E 2 タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 1 1 3 8-2 1 9 9) を記載する; 5) H P g V-2 の X タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 0 7) を示し、H P g V-2 の X タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 2 2 0 0-2 9 1 0) を記載する。

【図 1 4 B】H P g V-2 コンセンサス配列に由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) H P g V-2 の N S 2 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 0 8) を示し、H P g V-2 の N S 2 タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 2 9 1 1-3 6 3 0) を記載する; 2) H P g V-2 の N S 3 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 0 9) を示し、H P g V-2 の N S 3 タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 3 6 3 1-5 5 1 4) を記載する; 3) H P g V-2 の N S 4 A タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 1 0) を示し、H P g V-2 の N S 4 A タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 5 5 1 5-5 6 3 7) を記載する; 4) H P g V-2 の N S 4 B タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 1 1) を示し、H P g V-2 の N S 4 B タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 5 6 3 8-6 4 2 3) を記載する。

【図 1 4 C】H P g V-2 コンセンサス配列に由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) H P g V-2 の N S 5 A タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 1 2) を示し、H P g V-2 の N S 5 A タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 6 4 2 4-7 7 9 7) を記載する; 2) H P g V-2 の N S 5 B タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 1 3) を示し、H P g V-2 の N S 5 B タンパク質の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 7 7 9 8-9 4 9 8) を記載する; 3) H P g V-2 の 3' U T R の少なくとも一部分の核酸配列 (配列番号 2 9 9 のヌクレオチド 9 4 9 9-9 8 6 7) を記載する。

【図 1 5 A】配列番号 3 0 0 で示される、A B T 0 0 7 0 P と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 0 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 1 5 B】配列番号 3 0 0 で示される、A B T 0 0 7 0 P と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 0 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 1 5 C】配列番号 3 0 0 で示される、A B T 0 0 7 0 P と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 0 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 1 6 A】A B T 0 0 7 0 P と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) 5' U T R 配列 (配列番号 3 0 0 のヌクレオチド 1-3 2 7) を記載する; 2) H P g V-2 の S タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 1 4) を示し、H P g V-2 の S タンパク質の核酸配列 (配列番号 3 0 0 のヌクレオチド 3 2 8-5 6 4) を記載する; 3) H P g V-2 の E 1 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 1 5) を示し、H P g V-2 の E 1 タンパク質の核酸配列 (配列番号 3 0 0 のヌクレオチド 5 6 5-1 1 3 7) を記載する; 4) H P g V-2 の E 2 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 3 1 6) を示し、H P g V-2 の E 2 タン

パク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド1138-2199）を記載する；5）HPgV-2のXタンパク質のアミノ酸配列（配列番号317）を示し、HPgV-2のXタンパク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド2200-2910）を記載する。

【図16B】ABT0070Pと呼ばれるHPgV-2単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）HPgV-2のNS2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号318）を示し、HPgV-2のNS2タンパク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド2911-3630）を記載する；2）HPgV-2のNS3タンパク質のアミノ酸配列（配列番号319）を示し、HPgV-2のNS3タンパク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド3631-5514）を記載する；3）HPgV-2のNS4Aタンパク質のアミノ酸配列（配列番号320）を示し、HPgV-2のNS4Aタンパク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド5515-5637）を記載する；4）HPgV-2のNS4Bタンパク質のアミノ酸配列（配列番号321）を示し、HPgV-2のNS4Bタンパク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド5638-6423）を記載する。

10

【図16C】ABT0070Pと呼ばれるHPgV-2単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）HPgV-2のNS5Aタンパク質のアミノ酸配列（配列番号322）を示し、HPgV-2のNS5Aタンパク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド6424-7797）を記載する；2）HPgV-2のNS5Bタンパク質のアミノ酸配列（配列番号323）を示し、HPgV-2のNS5Bタンパク質の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド7798-9498）を記載する；3）は、HPgV-2の3'UTRの少なくとも一部分の核酸配列（配列番号300のヌクレオチド9499-9867）を記載する。

20

【図17A】配列番号301で示される、ABT0029Aと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号301は、ウラシルをチミンとして示している。

【図17B】配列番号301で示される、ABT0029Aと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号301は、ウラシルをチミンとして示している。

【図17C】配列番号301で示される、ABT0029Aと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号301は、ウラシルをチミンとして示している。

30

【図18A】ABT0029Aと呼ばれるHPgV-2単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）5'UTR配列（配列番号301のヌクレオチド1-327）を記載する；2）HPgV-2のSタンパク質のアミノ酸配列（配列番号324）を示し、HPgV-2のSタンパク質の核酸配列（配列番号301のヌクレオチド328-564）を記載する；3）HPgV-2のE1タンパク質のアミノ酸配列（配列番号325）を示し、HPgV-2のE1タンパク質の核酸配列（配列番号301のヌクレオチド565-1137）を記載する；4）HPgV-2のE2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号326）を示し、HPgV-2のE2タンパク質の核酸配列（配列番号301のヌクレオチド1138-2199）を記載する；5）HPgV-2のXタンパク質のアミノ酸配列（配列番号327）を示し、HPgV-2のXタンパク質の核酸配列（配列番号301のヌクレオチド2200-2910）を記載する。

40

【図18B】ABT0029Aと呼ばれるHPgV-2単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）HPgV-2のNS2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号328）を示し、HPgV-2のNS2タンパク質の核酸配列（配列番号301のヌクレオチド2911-3630）を記載する；2）HPgV-2のNS3タンパク質のアミノ酸配列（配列番号329）を示し、HPgV-2のNS3タンパク質の核酸配列（配列番号301のヌクレオチド3631-5514）

50

を記載する；3) H P g V-2 の N S 4 A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 0）を示し、H P g V-2 の N S 4 A タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 1 のヌクレオチド 5 5 1 5-5 6 3 7）を記載する；4) H P g V-2 の N S 4 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 1）を示し、H P g V-2 の N S 4 B タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 1 のヌクレオチド 5 6 3 8-6 4 2 3）を記載する。

【図 1 8 C】A B T 0 0 2 9 A と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) H P g V-2 の N S 5 A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 2）を示し、H P g V-2 の N S 5 A タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 1 のヌクレオチド 6 4 2 4-7 7 9 7）を記載する；2) H P g V-2 の N S 5 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 3）を示し、H P g V-2 の N S 5 B タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 1 のヌクレオチド 7 7 9 8-9 4 9 8）を記載する；3) H P g V-2 の 3' U T R の少なくとも一部分の核酸配列（配列番号 3 0 1 のヌクレオチド 9 4 9 9-9 8 6 7）を記載する。

【図 1 9 A】配列番号 3 0 2 で示される、A B T 0 2 3 9 A N. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 2 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 1 9 B】配列番号 3 0 2 で示される、A B T 0 2 3 9 A N. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 2 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 1 9 C】配列番号 3 0 2 で示される、A B T 0 2 3 9 A N. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 2 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 2 0 A】A B T 0 2 3 9 A N. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) 5' U T R 配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 1-3 2 7）を記載する；2) H P g V-2 の S タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 4）を示し、H P g V-2 の S タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 3 2 8-5 6 4）を記載する；3) H P g V-2 の E 1 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 5）を示し、H P g V-2 の E 1 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 5 6 5-1 1 3 7）を記載する；4) H P g V-2 の E 2 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 6）を示し、H P g V-2 の E 2 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 1 1 3 8-2 1 9 9）を記載する；5) H P g V-2 の X タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 7）を示し、H P g V-2 の X タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 2 2 0 0-2 9 1 0）を記載する。

【図 2 0 B】A B T 0 2 3 9 A N. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) H P g V-2 の N S 2 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 8）を示し、H P g V-2 の N S 2 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 2 9 1 1-3 6 3 0）を記載する；2) H P g V-2 の N S 3 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 3 9）を示し、H P g V-2 の N S 3 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 3 6 3 1-5 5 1 4）を記載する；3) H P g V-2 の N S 4 A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 0）を示し、H P g V-2 の N S 4 A タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 5 5 1 5-5 6 3 7）を記載する；4) H P g V-2 の N S 4 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 1）を示し、H P g V-2 の N S 4 B タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 5 6 3 8-6 4 2 3）を記載する。

【図 2 0 C】A B T 0 2 3 9 A N. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) H P g V-2 の N S 5 A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 2）を示し、H P g V-2 の N S 5 A タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 6 4 2 4-7 7 9 7）を記載する；2) H P g V-2 の N S 5 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 3）を示

し、H P g V-2 の N S 5 B タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 7 7 9 8-9 4 9 8）を記載する；3）H P g V-2 の 3' U T R の少なくとも一部分の核酸配列（配列番号 3 0 2 のヌクレオチド 9 4 9 9-9 8 6 7）を記載する。

【図 2 1 A】配列番号 3 0 3 で示され、図 1 で提供される U C 0 1 2 5（配列番号 1）の伸長バージョンである（例えば、5' U T R が伸長した）、U C 0 1 2 5. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 3 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 2 1 B】配列番号 3 0 3 で示され、実施例 1 で提供される U C 0 1 2 5（配列番号 1）の伸長バージョンである（例えば、5' U T R が伸長した）、U C 0 1 2 5. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 3 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 2 1 C】配列番号 3 0 3 で示され、実施例 1 で提供される U C 0 1 2 5（配列番号 1）の伸長バージョンである（例えば、5' U T R が伸長した）、U C 0 1 2 5. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。H P g V-2 ゲノムはプラス鎖 R N A 配列であることが理解される。配列番号 3 0 3 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 2 2 A】U C 0 1 2 5. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）5' U T R 配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 1-3 2 7）を記載する；2）H P g V-2 の S タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 4）を示し、H P g V-2 の S タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 3 2 8-5 6 4）を記載する；3）H P g V-2 の E 1 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 5）を示し、H P g V-2 の E 1 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 5 6 5-1 1 3 7）を記載する；4）H P g V-2 の E 2 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 6）を示し、H P g V-2 の E 2 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 1 1 3 8-2 1 9 9）を記載する；5）H P g V-2 の X タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 7）を示し、H P g V-2 の X タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 2 2 0 0-2 9 1 0）を記載する。

【図 2 2 B】U C 0 1 2 5. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）H P g V-2 の N S 2 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 8）を示し、H P g V-2 の N S 2 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 2 9 1 1-3 6 3 0）を記載する；2）H P g V-2 の N S 3 タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 4 9）を示し、H P g V-2 の N S 3 タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 3 6 3 1-5 5 1 4）を記載する；3）H P g V-2 の N S 4 A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 5 0）を示し、H P g V-2 の N S 4 A タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 5 5 1 5-5 6 3 7）を記載する；4）H P g V-2 の N S 4 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 5 1）を示し、H P g V-2 の N S 4 B タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 5 6 3 8-6 4 2 3）を記載する。

【図 2 2 C】U C 0 1 2 5. U S と呼ばれる H P g V-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）H P g V-2 の N S 5 A タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 5 2）を示し、H P g V-2 の N S 5 A タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 6 4 2 4-7 7 9 7）を記載する；2）H P g V-2 の N S 5 B タンパク質のアミノ酸配列（配列番号 3 5 3）を示し、H P g V-2 の N S 5 B タンパク質の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 7 7 9 8-9 4 9 8）を記載する。および 3）H P g V-2 の 3' U T R の少なくとも一部分の核酸配列（配列番号 3 0 3 のヌクレオチド 9 4 9 9-9 8 6 7）を記載する。

【図 2 3 A】H P g V-2 バリエントである U C 0 1 2 5、A B T 0 0 7 0 P、A R C 2

10

20

30

40

50

【図 2 3 K】 H P g V - 2 バリエントである U C 0 1 2 5、A B T 0 0 7 0 P、A R C 2

50

【図 23 U】HPgV-2 バリエントである UC0125、ABT0070P、ARC2

50

【図 23 E E】HPgV-2 バリエントである UC0125、ABT0070P、ARC

50

29v36 (ABT0029A)、ARCNAT239 (ABT0239AN)、ARC128 (ABT0128A)、PMDx96 (ABT0096P) および ARC55 (ABT0055A) のゲノムまたは部分的ゲノムと大部分のコンセンサス配列 (配列番号 299) とのアラインメントを示す図である。

【図 24A】HPgV-2 E-2 発現プラスミドでトランスフェクトした 293F 細胞の抗 His ウェスタンブロットを示す図である。上清を回収し、濃縮した。細胞を試料バッファー (2×Laemmli 試料バッファー+2-メルカプトエタノール (BioRad、Hercules、CA、USA)) 中で溶解した。試料を 4-12% SDS-PAGE ゲル上で泳動し、PDVF 膜に転写した。Western Breeze キットおよび抗 His (C-末端) / アルカリホスファターゼ一次抗体 (Novex by Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) を用いてウェスタンブロットを実施した。

10

【図 24B】HPgV-2 E2 の精製を示す図である。濃縮した HPgV-2 E2 上清をニッケルカラムに流し、250mM イミダゾールで溶離した。β-メルカプトエタノールを含む Laemmli 試料バッファーでプレカラム濃縮物、フロースルー、洗浄および溶出したタンパク質の画分を 1:2 に希釈し、4-12% SDS-PAGE ゲル上で泳動させ、続いて、Oriole タンパク質染色 (BioRad、Hercules、CA、USA) を用いて視覚化した。矢印は、精製 HPgV-2 E2 を示す。

【図 24C】精製 HPgV-2 E2 のウェスタンブロットを示す図である。β-メルカプトエタノールを含む Laemmli 試料バッファーで 1:2 に希釈した画分を上記のように 4-12% SDS-PAGE ゲル上で泳動させ、PDVF 膜に転写した。Western Breeze キットおよび抗 His (C-末端) / アルカリホスファターゼ一次抗体 (Life Technologies、Carlsbad、CA、米国の Novex) を用いてウェスタンブロットを実施した。矢印は、精製 HPgV-2 E2 を示す。

20

【図 24D】HPgV-2 E2 グリコシル化の PNGase F 除去を示す図である。精製 HPgV-2 E2 を変性し、PNGase F とともにインキュベートし、続いて、10% SDS-PAGE ゲル上での電気泳動によって分離した。

【図 25】糖タンパク質 E2 についての HPgV-2 PCR+ 試料の血清反応性を示す図である。精製 HPgV-2 E2 をニトロセルロース膜に結合させ、血清の 1:100 希釈液 (上記の試料) でプローブした。ストリップブロットを洗浄し、ヤギ抗ヒトアルカリホスファターゼ二次抗体および BCIP / NBT クロマゲン基質を用いて可視化した。すべての試料は、メンブレン上でヒト IgG と反応性であったが、HPgV-2 PCR+ 試料だけが精製 E2 と反応性であった。試料 ABT0096P、ABT0070P、ABT0188P は ProMedDx からであり、ABT0055A は American Red Cross (ARC) からであった。

30

【図 26】異種タンパク質ではなく、同種タンパク質とのスロットブロットにおける免疫反応性のブロックを示す図である。15 μl の試料 ABT0055A は、全量が 100 μl の試料希釈液 (20mM TRIS-HCl、0.5M NaCl、0.3% Tween-20 pH 8、5% 脱脂粉乳、10% 熱不活性化新生ウシ血清) 中の PBS、10 μg の HPgV-2 E2 または 10 μg の HPgV-1 E2 とともに、回転させながら 1 時間、室温 (25℃) にてインキュベートさせた。試料を 1.4 ml の試料希釈液で希釈し、次に、ヒト IgG、HPgV-2 E2 (10 μg および 100 μg)、ならびに HPgV-1 E2 (10 μg および 100 μg) と結合させた、あらかじめ作製したスロットブロットとともにインキュベートした。結合した抗体を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートした抗ヒト IgG で検出した。

40

【図 27】試料 ABT0055A、ABT0096P、ABT0188P を、結合した NS4A タンパク質を含むニトロセルロース膜とともにインキュベートしたことを示す図である。示されたタンパク質に対する抗体は、各々の試料について暗い線として示される。

【図 28】材料および方法に記載された qPCR スクリーニングのために新たに設計され

50

た Triplex マスターミックスの結果を示す図である。ProMedDx から得られた 100 個の HIV 陽性検体のパネルを m2000sp で抽出し、RNA を m2000rt のサーモサイクリング用の Triplex マスターミックスと組み合わせた。6 つの検体は、VIC チャンネルの 5' UTR の検出により、HPGV-1 (GBV-C) RNA に対して陽性であった。4 つの同一の検体は、HPGV-2 RNA に対して陽性であり、CY5 (5' UTR) および FAM (NS2) チャンネルで検出された。これら 4 つの検体 (PMDx 30、33、35、41) は、同じ患者からの 2 つの出血を表す (例えば、30 = 33、35 = 41)。サンガー配列決定により、HPGV-2 RNA の存在および同じ患者由来の配列の同一性が確認された。

【図 29A】配列番号 419 で示される、ABT0030P. US と呼ばれる HPGV-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPGV-2 ゲノムは、プラス鎖 RNA 配列であることが理解される。配列番号 419 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 29B】配列番号 419 で示される、ABT0030P. US と呼ばれる HPGV-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPGV-2 ゲノムは、プラス鎖 RNA 配列であることが理解される。配列番号 419 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 29C】配列番号 419 で示される、ABT0030P. US と呼ばれる HPGV-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPGV-2 ゲノムは、プラス鎖 RNA 配列であることが理解される。配列番号 419 は、ウラシルをチミンとして示している。

【図 30A】ABT0030P. US と呼ばれる HPGV-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) 5' UTR 配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 1-327) を記載する; 2) HPGV-2 の S タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 420) を示し、HPGV-2 の S タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 328-564) を記載する; 3) HPGV-2 の E1 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 421) を示し、HPGV-2 の E1 タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 565-1137) を記載する; 4) HPGV-2 の E2 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 422) を示し、HPGV-2 の E2 タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 1138-2199) を記載する; 5) HPGV-2 の X タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 423) を示し、HPGV-2 の X タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 2200-2910) を記載する。

【図 30B】ABT0030P. US と呼ばれる HPGV-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) HPGV-2 の NS2 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 424) を示し、HPGV-2 の NS2 タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 2911-3630) を記載する; 2) HPGV-2 の NS3 タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 425) を示し、HPGV-2 の NS3 タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 3631-5514) を記載する; 3) HPGV-2 の NS4A タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 426) を示し、HPGV-2 の NS4A タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 5515-5637) を記載する; 4) HPGV-2 の NS4B タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 427) を示し、HPGV-2 の NS4B タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 5638-6423) を記載する。

【図 30C】ABT0030P. US と呼ばれる HPGV-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) HPGV-2 の NS5A タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 428) を示し、HPGV-2 の NS5A タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 6424-7794) を記載する; 2) アミノ酸配列 (配列番号 429) を示し、HPGV-2 の NS5B タンパク質の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 7795-9495) を記載する; 3) HPGV-2 の 3' UTR の少なくとも一部分の核酸配列 (配列番号 419 のヌクレオチド 9496-9864) を記載する。

【図 31A】配列番号 430 で示される、ABT0030P. US と呼ばれる HPGV-

2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2 ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号430は、ウラシルをチミンとして示している。

【図31B】配列番号430で示される、ABT0030P. USと呼ばれるHPgV-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2 ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号430は、ウラシルをチミンとして示している。

【図31C】配列番号430で示される、ABT0030P. USと呼ばれるHPgV-2 単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2 ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号430は、ウラシルをチミンとして示している。

【図32A】ABT0041P. USと呼ばれるHPgV-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) 5' UTR 配列 (配列番号430のヌクレオチド1-327) を記載する; 2) HPgV-2 のSタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号431) を示し、HPgV-2 のSタンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド328-564) を記載する; 3) HPgV-2 のE1タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号432) を示し、HPgV-2 のE1タンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド565-1137) を記載する; 4) HPgV-2 のE2タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号433) を示し、HPgV-2 のE2タンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド1138-2199) を記載する; 5) HPgV-2 のXタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号434) を示し、HPgV-2 のXタンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド2200-2910) を記載する。

【図32B】ABT0041P. USと呼ばれるHPgV-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) HPgV-2 のNS2タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号435) を示し、HPgV-2 のNS2タンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド2911-3630) を記載する; 2) HPgV-2 のNS3タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号436) を示し、HPgV-2 のNS3タンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド3631-5514) を記載する; 3) HPgV-2 のNS4Aタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号437) を示し、HPgV-2 のNS4Aタンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド5515-5637) を記載する; 4) HPgV-2 のNS4Bタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号438) を示し、HPgV-2 のNS4Bタンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド5638-6423) を記載する。

【図32C】ABT0041P. USと呼ばれるHPgV-2 単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1) HPgV-2 のNS5Aタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号439) を示し、HPgV-2 のNS5Aタンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド6424-7797) を記載する; 2) HPgV-2 のNS5Bタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号: 440) を示し、HPgV-2 のNS5Bタンパク質の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド7798-9498) を記載する; 3) は、HPgV-2 の3' UTRの少なくとも一部分の核酸配列 (配列番号430のヌクレオチド9499-9867) を記載する。

【発明を実施するための形態】

【0044】

定義

「試料」および「検体」の語は最も広範な意味において使用され、ヒト患者を含めたあらゆる供給源から得た試料または検体を包含する。本発明の一部の実施形態において、生物学的試料は、組織または細胞、脳脊髄液 (CSF)、漿液、尿、唾液、血液、ならびに血漿、血清などのような血液製剤を含む。しかし、これらの例は、本明細書に記載する方法および組成物との使用を見出す試料のタイプを限定するものと解釈してはならない。一部の実施形態において、試料は、HCVおよび/またはHIVに感染していることが分かっている患者からの血液、血清または血漿試料である。

【0045】

本明細書で使用される、「宿主」、「対象」および「患者」の語は、それだけには限定されないが、研究され、分析され、試験され、診断され、または処置される、ヒトおよび非ヒト動物（例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、家禽、サカナ、甲殻類など）を含めたあらゆる動物を意味する。本明細書で使用される、「宿主」、「対象」および「患者」の語は、別段の指摘がなければ交換可能に使用される。

#### 【0046】

本明細書で使用される、「投与」および「投与する」の語は、治療的処置（例えば、免疫原性組成物）を、対象（例えば、対象、またはインビボ、インビトロもしくはエクセビボの細胞、組織および器官）に対して与える行為を意味する。ヒトの身体に対する投与の例示的な経路は、脳または脊髄のくも膜下の空隙（くも膜下腔内）、眼（点眼）、口（経口）、皮膚（局所もしくは経皮）、鼻（経鼻）、肺（吸入）、口腔粘膜（頬側）、耳、直腸、膣を介して、注射などによる（例えば、静脈内、皮下、腫瘍内、腹腔内など）によるものであってよい。

#### 【0047】

本明細書で使用される、「核酸分子」の語は、それだけには限定されないが、DNAまたはRNAを含めた、あらゆる核酸含有分子を意味する。この語は、それだけには限定されないが、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシー-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、シュードイソシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルシュードウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシ-アミノメチル-2-チオウラシル、ベーター-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、2, 6-ジアミノプリン、2-アミノプリン、5-アミノ-アリルウラシル、5-ヒドロキシメチルシトシン、5-ヨードウラシル、5-ニトロインドール、5-プロピニルシトシン、5-プロピニルウラシル、ヒポキサンチン、N3-メチルウラシル、N6, N6-ジメチルアデニン、プリン、C-5-プロピニルシトシン、C-5-プロピニルウラシルおよびジフルオロトウシルを含めた、DNAおよびRNAのあらゆる公知の塩基類似体を含む配列を包含する。

#### 【0048】

「遺伝子」の語は、ポリペプチド、前駆体またはRNA（例えば、rRNA、tRNA）の生成に必要なコード配列を含む、核酸（例えば、DNA）配列を意味する。ポリペプチドは、全長もしくはフラグメントの、所望の活性もしくは機能的性質（例えば、酵素的活性、リガンド結合性、シグナル伝達、免疫原性など）が保持される限り、全長のコード配列によって、またはコード配列のあらゆる一部分によってコードされ得る。この語は、構造遺伝子および、遺伝子が全長のmRNAの長さに相当するように、いずれかの終端上に約1 kbまたはそれを超える距離に対する5'および3'終端上両方のコード領域に隣接して位置する配列の、コード領域も包含する。コード領域の5'に位置し、mRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。コード領域の3'または下流に位置し、mRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と呼ばれる。「遺伝子」の語は、cDNA、および遺伝子のゲノム形態の両方を包含する。

#### 【0049】

本明細書で使用される、「遺伝子発現」および「発現」の語は、遺伝子においてコード

10

20

30

40

50

される遺伝情報を、遺伝子の「転写」を介して（すなわち、RNAポリメラーゼの酵素作用によって）RNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNAまたはsnRNA）に変換するプロセス、ならびにタンパク質をコードする遺伝子では、mRNAの「翻訳」を介してタンパク質に変換するプロセスを意味する。遺伝子発現は、この過程における多くの段階で制御され得る。「上方制御」または「活性化」は、遺伝子発現生成物（例えば、RNAまたはタンパク質）の生成を増大および／または増強する制御を意味し、「下方制御」または「抑制（repression）」は生成を低減する制御を意味する。上方制御または下方制御に関与する分子（例えば、転写因子）はしばしば、それぞれ「アクチベータ」および「リプレッサ」と呼ばれる。

#### 【0050】

「単離された」の語は、核酸に関連して使用される場合、「単離されたオリゴヌクレオチド」または「単離されたポリヌクレオチド」におけるように、その天然の供給源において通常関連している、少なくとも1つの構成成分または汚染物質から同定および分離される核酸配列を意味する。単離された核酸は、天然に見出されるのとは異なる形態または設定において存在する。対照的に、非単離の核酸は、これらが天然に存在する状態において見出される、DNAおよびRNAのような核酸である。例えば、所与のDNA配列（例えば、遺伝子）は、隣接する遺伝子に近接する宿主細胞の染色体上に見出され、特定のタンパク質をコードする特定のウイルスRNA配列のようなRNA配列は、多数のタンパク質をコードする、多数の他の宿主mRNAとの混合物として、細胞中に一般的に見出される。単離された核酸、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖の形態において存在し得る。

#### 【0051】

「合成」の語は、核酸分子（例えば、HPgV-2のプライマーまたはプローブ）に関して使用される場合、人類によって直接的に（例えば、実験室において）、または間接的に（例えば、実験室で作製される構築物の細胞における発現から）作製される非天然の分子を意味する。

#### 【0052】

本明細書で使用される、「相補的な」または「相補性」の語は、塩基対合則によって関係づけられるポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）に関して使用される。例えば、「A-G-T」という配列は、「T-C-A」という配列に相補的である。相補性は「部分的」であってよく、核酸のいくつかの塩基だけが塩基対合則に従って適合される。または、核酸の間に「完全な」または「全体的な」相補性が存在してもよい。核酸の鎖間の相補性の度合いは、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して重大な影響がある。これは、増幅反応において、および核酸間の結合に依存する検出方法において特に重要である。

#### 【0053】

「相同性」の語は、相補性の度合いを意味する。部分的な相同性または完全な相同性（すなわち、同一性）が存在し得る。部分的に相補的な配列は、完全に相補的な配列が、標的核酸にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に阻害する配列であり、「実質的に相同」という機能的な語を使用して言及される。「結合の阻害」の語は、核酸の結合に関して使用される場合、標的配列に対する結合に相同の配列の競合によって引き起こされる、結合の阻害を意味する。完全に相補的な配列の、標的配列に対するハイブリダイゼーションの阻害は、ハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、サザンもしくはノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーションなど）を使用して、低ストリンジェンシー条件下で調べられ得る。実質的に相同な配列またはプローブは、低ストリンジェンシー条件下で、標的に対する完全な相同性の結合（すなわち、ハイブリダイゼーション）に対して競合し、結合を阻害する。これは、低ストリンジェンシー条件は、非特異的結合が許されるような条件であることを言うのではなく、低ストリンジェンシー条件は2つの配列の相互に対する結合が、特異的な（すなわち、選択的な）相互作用であることを必要とする。非特異的結合の非存在は、部分的な度合いの相補性も欠く（例えば、約30%の同一性より低い）第

10

20

30

40

50

2の標的を使用することによって試験されてもよく、非特異的結合の非存在下で、プローブは第2の非相補的な標的にハイブリダイズしない。

#### 【0054】

当業者は、低ストリンジエンシー条件を含むように、多数の同等の条件が使用され得ることを周知であり、プローブの長さおよび性質（DNA、RNA、塩基組成）のような因子、ならびに標的の性質（DNA、RNA、塩基組成、溶液中の存在、もしくは固定化など）、ならびに塩および他の構成成分（例えば、ホルムアミド、硫酸デキストラン、ポリエチレングリコールの存在または非存在）の濃度が考慮され、ハイブリダイゼーション溶液は、上記に列挙した条件と異なるが同等である、低ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションの条件を産生するように変動され得る。加えて、当業者は、高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイゼーションを促進する条件（例えば、ハイブリダイゼーションおよび／または洗浄ステップの温度の上昇、ハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの使用など）を公知である。

10

#### 【0055】

本明細書で使用される、「ハイブリダイゼーション」の語は、相補的な核酸の対形成に関して使用される。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度（すなわち、核酸間の会合の強度）は、核酸間の相補性の度合い、関与する条件のストリンジエンシー、形成したハイブリッドの $T_m$ 、および核酸内のG:C比のような因子によって影響を受ける。

#### 【0056】

本明細書で使用される、「 $T_m$ 」の語は、「融解温度」に関して使用される。融解温度は、二本鎖核酸分子の集団が、半分解離されて一本鎖になる温度である。核酸の $T_m$ を算出するための等式は、当技術分野では周知である。標準的基準によって示される通り、 $T_m$ 値の単純な推定値は等式： $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G + C)$ によって算出され得、この場合、核酸は1M NaClの水溶液中にある（例えば、AndersonおよびYoung、Quantitative Filter Hybridization、Nucleic Acid Hybridization [1985]を参照されたい。）。他の基準は、構造上および配列の特徴を $T_m$ の算出に考慮に入れる、より洗練された計算を含んでいる。

20

#### 【0057】

本明細書で使用される、「ストリンジエンシー」の語は、その下で核酸のハイブリダイゼーションが行われる、温度、イオン強度の条件、および有機溶剤のような他の化合物の存在に関して使用される。当業者であれば、「ストリンジエンシー」の条件は、個々にまたは協調していずれかによって記載されるパラメータの変動によって改変され得ることを認識されよう。「高ストリンジエンシー」条件では、核酸の塩基対形成が、高頻度の相補的な塩基配列を有する核酸フラグメント間にのみ生じる（例えば、「高ストリンジエンシー」条件下のハイブリダイゼーションは、約85-100%の同一性、好ましくは約70-100%の同一性を有する相同体間で生じ得る。）。中等度のストリンジエンシー条件では、核酸の塩基対形成が、中等度の頻度の相補的な塩基配列を有する核酸間にのみ生じる（例えば、「中等度のストリンジエンシー」条件下のハイブリダイゼーションは、約50-70%の同一性を有する相同体間で生じ得る。）。よって、相補的な配列の頻度は通常低いため、「弱」または「低」ストリンジエンシー条件が、遺伝的に多様である生物に由来する核酸に、しばしば必要とされる。

30

40

#### 【0058】

「高ストリンジエンシー条件」は、核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、約500ヌクレオチドの長さのプローブが使用される場合、 $5 \times SSPE$ （NaCl 43.8 g/l、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  6.9 g/l、およびEDTA 1.85 g/l、pHをNaOHで7.4に調節）、0.5% SDS、 $5 \times$ デンハルト試薬、および100  $\mu g/ml$  変性サケ精子DNAからなる溶液中セ氏42度での結合またはハイブリダイゼーション、引き続きセ氏42度の、 $0.1 \times SSPE$ 、1.0% SDSを含む溶液中の

50

洗浄に等しい条件を含む。

【0059】

「中等度のストリンジェンシー条件」は、核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、約500ヌクレオチドの長さのプロンプが使用される場合、5×SSPE (NaCl 43.8 g/l、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O 6.9 g/l、およびEDTA 1.85 g/l、pHをNaOHで7.4に調節)、0.5% SDS、5×デンハルト試薬、および100 μg/ml 変性サケ精子DNAからなる溶液中でセ氏42度での結合またはハイブリダイゼーション、引き続きセ氏42度の、1.0×SSPE、1.0% SDSを含む溶液中の洗浄に等しい条件を含む。

【0060】

「低ストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチドの長さのプロンプが使用される場合、5×SSPE (NaCl 43.8 g/l、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O 6.9 g/l、およびEDTA 1.85 g/l、pHをNaOHで7.4に調節)、0.1% SDS、5×デンハルト試薬 [50×デンハルトは、500mlあたり：Ficoll (タイプ400、Pharmacia) 5g、BSA (Fraction V; Sigma) 5gを含む]、および100 μg/ml 変性サケ精子DNAからなる溶液中でセ氏42度での結合またはハイブリダイゼーション、引き続きセ氏42度の、5×SSPE、1.0% SDSを含む溶液中の洗浄に等しい条件を含む。

【0061】

2つまたはそれを超えるポリヌクレオチド間の配列の関係を記載するのに、以下の語：「基準配列」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセント値」および「実質的な同一性」が使用される。「基準配列」は、配列比較に対する基本として使用される、規定された配列であり、基準配列は、例えば、配列リスト (例えば、配列番号1もしくは75) に示される全長のcDNA配列のセグメントとしての、より大型の配列のサブセットであってもよく、または遺伝子配列を含むことができる。一般的に、基準配列は、少なくとも20ヌクレオチドの長さ、頻繁に少なくとも25ヌクレオチドの長さ、しばしば少なくとも50ヌクレオチドの長さである。2つのポリヌクレオチドは各々(1) 2つのポリヌクレオチド間で同様である配列 (すなわち、完全なポリヌクレオチド配列の一部) を含み、(2) 2つのポリヌクレオチド間で相違する配列をさらに含むことができ、2つ (またはそれを超える) ポリヌクレオチド間の配列比較は典型的に、配列類似性のローカル領域を同定および比較するために、2つのポリヌクレオチドの配列を「比較ウィンドウ」にわたって比較することにより行われる。本明細書で使用される、「比較ウィンドウ」は、少なくとも20個の近接するヌクレオチドの位置の概念的なセグメントを意味し、この場合、ポリヌクレオチド配列が、少なくとも20個の近接するヌクレオチドの基準配列に対して比較され得、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の一部分は、2つの配列の最適なアラインメントに対して、基準配列 (付加もしくは欠失を含まない) に比べて20パーセントまたはそれより低い付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含むことができる。比較ウィンドウをアラインするのに最適の配列のアラインメントは、SmithおよびWatermanのローカル相同性アルゴリズム (SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)) によって、NeedlemanおよびWunschの相同性アラインメントアルゴリズムによって (NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970))、PearsonおよびLipmanの類似性方法 (similarity method) に対する検索によって (PearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 85:2444 (1988))、これらのアルゴリズムをコンピュータ処理して行うことにより (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)、または精査 (inspection) により行われてもよく、様々な方法によって産生されたベストアラインメント (す

10

20

30

40

50

なわち、比較ウィンドウにわたる相同性の最高のパーセント値をもたらし）が選択される。「配列同一性」の語は、2つのポリヌクレオチド配列が同一である（すなわち、ヌクレオチドごとのベースで）ことを意味する。「配列同一性のパーセント値」の語は、2つの最適にアラインされた配列を比較のウィンドウにわたって比較し、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、A、T、C、G、UまたはI）が生じる位置の数を決定してマッチする位置の数を、マッチする位置の数を、比較のウィンドウ（すなわち、ウィンドウサイズ）における位置の合計数によって除し、結果に100を乗じて配列同一性のパーセント値を得ることによって算出される。本明細書で使用される、「実質的な同一性」の語は、ポリヌクレオチド配列の特徴を意味し、この場合、ポリヌクレオチドは、少なくとも20ヌクレオチド位置の比較ウィンドウにわたって、頻繁に少なくとも25－50ヌクレオチドのウィンドウにわたって、基準配列に比べて少なくとも85パーセント配列同一性、好ましくは少なくとも90から95パーセントの配列同一性、より通常には少なくとも99パーセントの配列同一性を有する配列を含み、この場合、配列同一性のパーセント値は、基準配列を、比較のウィンドウにわたって基準配列の合計20パーセントまたはそれ未満の欠失または付加を含み得るポリヌクレオチド配列に対して比較することによって算出される。

#### 【0062】

ポリペプチドに適用される、「実質的な同一性」の語は、2つのペプチド配列が、GAPまたはBESTFITのプログラムなどによって、デフォルトギャップ重み付けを使用して、最適にアラインされる場合、少なくとも80パーセントの配列同一性、好ましくは少なくとも90パーセントの配列同一性、より好ましくは少なくとも95パーセントまたはそれを超える配列同一性（例えば、99パーセントの配列同一性）を共有することを意味する。同一ではない残基の位置が、保存的アミノ酸置換によって異なるのが好ましい。保存的アミノ酸置換は、同様の側鎖を有する残基の互換性を意味する。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸のグループは、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンであり、脂肪族－ヒドロキシ側鎖を有するアミノ酸のグループは、セリンおよびスレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸のグループは、アスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸のグループは、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり、塩基性側鎖を有するアミノ酸のグループは、リジン、アルギニンおよびヒスチジンであり、含硫側鎖を有するアミノ酸のグループは、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換のグループは、バリン－ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリンおよびアスパラギン－グルタミンである。ある特定の実施形態において、本明細書に、配列番号2－11または304－353に示されるアミノ酸配列の少なくとも一部分に対して実質的な同一性を有するペプチドを提供する。

#### 【0063】

本明細書で使用される、「フラグメント」または「一部分」の語は、天然のタンパク質に比べてアミノ末端および／またはカルボキシ末端の欠失を有するが、残りのアミノ酸配列が、全長のcDNA配列から推定されるアミノ酸配列における対応する位置に同一であるポリペプチドを意味する。フラグメントは典型的に、少なくとも4アミノ酸の長さ、好ましくは少なくとも20アミノ酸の長さ、通常少なくとも50アミノ酸の長さまたはそれより長い。

#### 【0064】

本明細書で使用される、「プライマー」の語は、精製された制限消化産物中など、天然に存在してもまたは合成的に生成されても、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長生成物の合成が誘導される条件下（すなわち、ヌクレオチド、およびDNAポリメラーゼのような誘発剤の存在下、適切な温度およびpHの）に置かれた場合、合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーは、増幅における最大の効率のために一本鎖であるのが好ましいが、代替的に二本鎖でもよい。二本鎖の場合、プライマーは、最初にその鎖を分離するように処理され、その後、伸長生成物を調製するよう

に使用される。プライマーがオリゴデオキシリボヌクレオチドであるのが好ましい。プライマーは、誘発剤の存在下、伸長生成物の合成を開始させるのに十分長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの供給源、および方法の使用を含めた多くの因子に依存する。

#### 【0065】

本明細書で使用される、「プローブ」の語は、精製された制限消化産物中などに天然に存在しても、または合成的に、組換えで、もしくはPCR増幅によって生成されても、目的の別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、オリゴヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を意味する。プローブは一本鎖でも、または二本鎖でもよい。プローブは、特定の核酸配列の検出、同定および単離において有用である。ある特定の実施形態において、本発明の方法および組成物において使用されるプローブは、それ

10

#### 【0066】

本明細書で使用される、「組換え核酸分子」の語は、分子生物学的技術によって一緒に繋がれている核酸のセグメントから構成される核酸分子を意味する。

#### 【0067】

本明細書で使用される、「ペプチド」は、特定の配列においてペプチド結合によって繋がれているアミノ酸の、直鎖状ポリマーを意味する。本明細書で使用される、「ペプチド」は、ポリペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質も包含する。ペプチドは、例えば、HPgV-2ウイルスからの短いアミノ酸のストレッチ（例えば、アミノ酸25個）であってもよいが、NS3タンパク質全体のアミノ酸配列のような長い配列でもよい（例えば、配列番号7）。

20

#### 【0068】

本明細書で使用される、「組換えタンパク質」または「組換えポリペプチド」の語は、組換え核酸分子から発現されるタンパク質分子を意味する。

#### 【0069】

本明細書で使用される、「抗原決定基」または「エピトープ」の語は、特定の抗体と接触する抗原の一部分を意味する。タンパク質またはタンパク質のフラグメントを使用して宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、タンパク質上の所与の領域または3次元構造に特異的に結合する抗体の生成を誘発し得、これらの領域または構造は抗原決定基と呼ばれる。抗原決定基は、抗体に対する結合に対して、インタクトな抗原（すなわち、免疫応答を誘発するのに使用される「免疫原」）と競合し得る。

30

#### 【0070】

本明細書で使用される、「固体支持体」は、それに対して、HPgV-2核酸、タンパク質または抗体のような生物学的分子が付着し得、生物学的アッセイにおいて使用され得る、あらゆる表面または材料である。本明細書に記載するアッセイにおいて利用され得る固体支持体の例は、当技術分野において周知であり、それだけには限定されないが、磁性粒子、ビーズ、微粒子、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、骨格分子、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップを含む。

40

#### 【0071】

詳細な説明

本明細書に、ヒトペギウイルス2（HPgV-2）を検出するための組成物、方法およびキットを提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に、HPgV-2特異的核酸プローブおよびプライマー、ならびにHPgV-2核酸を検出するための方法を提供する。他の実施形態において、本明細書に、HPgV-2免疫原性組成物、感染に対する耐性を発生させるために免疫原性ペプチドで対象を処置する方法、および試料中のHPgV-2対象抗体を検出する方法を提供する。

50

## 【0072】

## I. ヒトペギウイルス2

GBV-Eとも呼ばれる、ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) の完全なゲノムの核酸配列は、配列番号1および75 (図1および8)、ならびに配列番号299-303に示される。HPgV-2はポジティブの一本鎖RNAウイルスであり、以下のタンパク質をコードする：Sタンパク質 (例えば、配列番号2、76、304、314、324、334および344)、E1タンパク質 (例えば、配列番号3、77、305、315、325、335および345)、E2タンパク質 (例えば、配列番号4、78、306、316、326、336および346)、Xタンパク質 (例えば、配列番号5、79、307、317、327、337および347)、NS2タンパク質 (例えば、配列番号6、80、308、318、328、338および348)、NS3タンパク質 (例えば、配列番号7、81、309、319、329、339および349)、NS4Aタンパク質 (例えば、配列番号8、82、310、320、330、340および350)、NS4Bタンパク質 (例えば、配列番号9、83、311、321、331、341および351)、NS5Aタンパク質 (例えば、配列番号10、84、312、322、332、342および352)、ならびにNS5Bタンパク質 (例えば、配列番号11、85、313、323、333、343および353)。5' UTRのある決定された一部分は、配列番号1のヌクレオチド1-103、配列番号75のヌクレオチド1-110、配列番号299-301のヌクレオチド1-327、配列番号302のヌクレオチド12-327および配列番号303のヌクレオチド24-327を含み；3' UTRのある決定された例示的な一部分は、配列番号1のヌクレオチド9410-9778、配列番号75のヌクレオチド9417-9431および配列番号299-303のヌクレオチド9499-9867を含む。配列関連性に基づいて、HPgV-2ゲノムの機構は、ペギウイルスおよびヘパシウイルスの両方に最も類似しており、両方とも最近、フラビウイルス (Flaviviridae) 科のメンバーと分類された。最近、HCVおよびGBV-Bは、フラビウイルス科のヘパシウイルス属内に含まれるべきであり、GBV-AおよびGBV-C (HPgV-1) はフラビウイルス科のペギウイルス属内に含まれるべきであると提唱されている (Stapletonら、J Gen Virol、2011：92：233-246)。

## 【0073】

フラビウイルス科のウイルスのメンバーは全て、ポジティブ鎖の、約10kbの一本鎖RNAゲノムを有し、これはアミノ酸約3000個のポリタンパク質をコードする単一の長いオープンリーディングフレーム (ORF) を含む (Lindenbachら、Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. Chapter 33.、Fields Virology第5版 (Knipeら編集) Wolters Kluwer/Lippincott WilliamsおよびWilliams、Philadelphia PA.、1101-1152)。フラビウイルス科では、ポリタンパク質は、宿主およびウイルスのプロテアーゼを組み合わせることによって、より小型の機能的な非構造上の構成成分、および構造上の構成成分に切断される。ウイルスの構造タンパク質は、ゲノムのアミノ末端部分に位置し、HCVおよびGB両方のウイルスに対する2つのエンベロープ糖タンパク質であるE1およびE2を含む。HCVおよびGBV-Bはカプシドタンパク質を含むが、GBV-AおよびGBV-C (HPgV-1) には、典型的なカプシド様タンパク質がない。全てのフラビウイルスで、非構造タンパク質は、構造タンパク質の下流に位置し、N末端のセリンプロテアーゼおよびC末端のRNAヘリカーゼタンパク質を含むNS3タンパク質、ならびにメチルトランスフェラーゼおよびRNA依存的RNA複製活性を有する多機能的タンパク質であるNS5タンパク質を含む。ORFは、高度に保存されており、ゲノムの翻訳および複製の両方において関与する非翻訳領域によって、5' 終端および3' の両方で隣接している。

## 【0074】

ある特定の実施形態において、HCVポジティブであることが分かっている患者試料が

、H P g V－2 の存在に対して試験される（例えば、患者抗体に対して、またはP C Rにより）。特定の実施形態において、抗H C VネガティブであるがH C V R N A ポジティブである、H C Vに感染している供血者が試験される。このような試料は、「プレセロコンバージョンウィンドウ期間（p r e s e r o c o n v e r s i o n w i n d o w p e r i o d）」の試料と呼ばれる。他の実施形態において、抗H C V ポジティブでありH C V R N A ポジティブであるH C V 感染患者からの試料が試験される。ある特定の実施形態において、H I V ポジティブである試料が試験される。特定の実施形態において、高リスク群が、H P g V－2 感染の存在に対して試験される。高リスク群は、多重輸血個体、プラズマフェレーシスドナー（そのうち何人かは、H B V、H I V またはH C V にポジティブであり得る。）、静脈内薬物使用者、および性感染症を有する個体を含む。

10

#### 【0075】

図10は、H P g V－2 バリエントのゲノムまたは部分的なゲノムである、U C 0 1 2 5 . U S、A B T 0 0 7 0 P . U S、A B T 0 0 9 6 P . U S、およびA B T 0 1 2 8 A . U Sのアラインメントを、大半のコンセンサス配列と一緒に示す。U C 0 1 2 5 . U S とA B T 0 0 7 0 P . U S との間のアミノ酸類似性は以下の表16に示すものである。

#### 【0076】

##### 【表1】

表16

| タンパク質<br>ホリタンパク質 | アミノ酸 | ミスマッチ | 同一性%  |
|------------------|------|-------|-------|
|                  | 3102 | 157   | 94.94 |
| S                | 124  | 4     | 95.77 |
| E1               | 191  | 6     | 96.86 |
| E2               | 354  | 24    | 93.22 |
| X                | 237  | 13    | 94.51 |
| NS2              | 240  | 8     | 96.67 |
| NS3              | 628  | 22    | 96.50 |
| NS4A             | 41   | 3     | 92.68 |
| NS4B             | 252  | 10    | 96.18 |
| NS5A             | 458  | 43    | 90.61 |
| NS5B             | 567  | 24    | 95.77 |
|                  | 3102 | 157   |       |

20

30

#### 【0077】

##### I I . 増幅

一部の実施形態において、本明細書に、H P g V－2 核酸（例えば、D N A、R N A など）を増幅するための組成物および方法を提供する。一部の実施形態において、増幅は、核酸のバルク試料に対して行われる。一部の実施形態において、増幅は、単一の核酸標的の分子に対して行われる。一部の実施形態において、本明細書に、核酸を増幅するための組成物（例えば、プライマー、バッファー、塩、核酸標的など）および方法（例えば、デジタル液滴増幅、P C R 増幅、これらの組合せなど）を提供する。一部の実施形態において、増幅反応は、核酸の複製が経時的に繰り返し生じて、鋳型または標的の核酸分子（例えば、H P g V－2 核酸）の少なくとも1セグメントの複数のコピーを形成するあらゆる反応である。一部の実施形態において、増幅は、鋳型核酸のコピー数における、指数関数的または直線的な増大を産生する。増幅は、鋳型のコピー数および／または標的検出シグナルにおける1000倍過剰の増大を生成し得る。例示的な増幅反応は、それだけには限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）またはリガーゼ連鎖反応（L C R）を含み、これらは各々、熱サイクルによって駆動される。

40

#### 【0078】

増幅は、あらゆる適切な試薬（例えば、鋳型核酸（例えば、D N A またはR N A）、プライマー、プローブ、バッファー、複製触媒酵素（例えば、D N A ポリメラーゼ、R N A ポリメラーゼ）、ヌクレオチド、塩（例えば、M g C l<sub>2</sub>）など）で行われ得る。いくつかの実施形態において、増幅混合物は、少なくとも1つのプライマーまたはプライマー対

50

、少なくとも1つのプローブ、少なくとも1つの複製酵素（例えば、少なくとも1つのDNAおよび／もしくはRNAポリメラーゼのような少なくとも1つのポリメラーゼ）、ならびにデオキシヌクレオチド（および／もしくはヌクレオチド）三リン酸（dNTPおよび／もしくはNTP）などのあらゆる組合せを含む。

#### 【0079】

一部の実施形態において、システム、装置および方法は、連続的なラウンドの複製（例えば、PCR）を実現するために加熱および冷却の交代性のサイクル（すなわち、熱サイクル）に頼る、核酸増幅を利用する。一部の実施形態において、標的核酸（例えば、HPgV-2核酸）を増幅するのにPCRが使用される。PCRは、より高い融解（変性）温度およびより低いアニーリング／伸長温度のような、2つもしくはそれを超える温度設定点の間の、または数ある中で、より高い融解温度、より低いアニーリング温度、および中間の伸長温度のような、3つもしくはそれを超える温度設定点の間の熱サイクルによって行われ得る。PCRは、数ある中で、Taq DNAポリメラーゼ（例えば、野生型酵素、Stoffelフラグメント、FastStartポリメラーゼなど）、Pfu DNAポリメラーゼ、S-Tbrポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Ventポリメラーゼまたはこれらの組合せのような、耐熱性ポリメラーゼで行われ得る。典型的なPCR方法は、連続的なサイクルにわたって生成物の単位複製配列の量における指数関数的な増大を生成するが、直線的なPCR方法も使用を見出す。

#### 【0080】

対立遺伝子特異的PCR、アセンブリーPCR、非対称PCR、デジタルPCR、エンドポイントPCR、ホットスタートPCR、インサイチューPCR、配列間特異的PCR、逆PCR、指数関数後直線的PCR、ライゲーション媒介性PCR、メチル化特異的PCR、ミニプライマーPCR、マルチプレックスライゲーション依存的プローブ増幅法、マルチプレックスPCR、ネステッドPCR、オーバーラップ伸長PCR、ポリメラーゼサイクリングアセンブリ、定性的PCR、定量的PCR、リアルタイムPCR、RT-PCR、単一細胞PCR、固相PCR、熱非対称インターレースPCR、タッチダウンPCRまたはユニバーサルファストウォーキングPCRなどのような、あらゆる適切なPCR方法、PCR方法の組合せまたは増幅技術の組合せが利用されてもよい。

#### 【0081】

一部の実施形態において、システム、装置および方法は、RT-PCR（逆転写PCR）を使用する。一部の実施形態において、システム、装置および方法は、リアルタイムPCRを使用する。一部の実施形態において、システム、装置および方法は、エンドポイントPCRを使用する。

#### 【0082】

一部の実施形態において、システム、装置および方法は、等温核酸増幅法を利用する。転写媒介性増幅、核酸配列ベースの増幅、RNA技術のシグナル媒介性の増幅、鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、DNAのループ媒介性等温増幅、等温多重置換増幅、ヘリカーゼ依存的増幅、単一プライマー等温増幅、および環状ヘリカーゼ依存的増幅のような、あらゆる適切な等温増幅方法、または増幅技術の組合せが利用されてもよい。

#### 【0083】

#### III. 核酸検出

一部の実施形態において、本明細書に、HPgV-2核酸（例えば、単位複製配列、標識化核酸）の存在を同定するためのシステム、装置、方法および組成物を提供する。一部の実施形態において、検出は、増幅に相関する物理的、化学的、発光または電気的な側面（例えば、蛍光、pH変化、熱変化など）のような、非増幅の核酸、増幅された核酸、増幅された核酸を含む構成成分、または増幅プロセスの副生成物の特徴の測定または検出を伴う。

#### 【0084】

一部の実施形態において、増幅されたHPgV-2核酸を検出するための、および／または増幅された核酸を同定するための、蛍光検出方法を提供する。すでに論じられている

試薬、ならびに核酸の増幅および検出の技術分野の技術者には公知である試薬に加えて、蛍光および非蛍光の色素およびプローブのような様々な検出試薬が提供される。例えば、プロトコルは、TaqManプローブのような、TaqMan反応において使用するのに適する試薬、SYBRグリーン蛍光検出において使用するのに適する試薬、分子ビーコンプローブのような、分子ビーコン反応において使用するのに適する試薬、スコピオンプローブのような、スコピオン反応において使用するのに適する試薬、蛍光プローブのような、蛍光DNA-結合色素タイプの反応において使用するのに適する試薬、および／またはライトアッププローブのような、ライトアッププロトコルにおいて使用するための試薬を使用することができる。一部の実施形態において、本明細書に、増幅された標的核酸から検出可能なシグナル（例えば、蛍光）を検出および／または定量するための方法および組成物を提供する。よって、例えば、増幅された核酸を検出可能な標識で標識する（例えば、増幅の間、増幅後）ステップ、検出可能な標識に蛍光を引き起こすよう選択された波長の光源に仕切りを暴露するステップ、ならびに得られた蛍光を検出および／または測定するステップを使用することができる。標識から放射される蛍光は、増幅反応の間、反応のモニタリングを可能にするように（例えば、SYBRグリーンタイプの化合物を使用して）追跡してもよく、または蛍光は増幅後に測定してもよい。

10

#### 【0085】

一部の実施形態において、増幅された核酸の検出は、1つ以上の蛍光標識、蛍光インターカレーション色素、FRETベースの検出方法（両方ともその全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許第5,945,283号；PCT公開第WO97/22719号）、定量的PCR、リアルタイム蛍光発生方法（各々その全体を参照により本明細書に組み込む、Gel f a n dへの米国特許第5,210,015号、L i v a kらへの第5,538,848号およびH a a l l a n dへの第5,863,736号、ならびにH e i d , C. A. ら、Genome Research、6:986-994（1996）；G i b s o n , U. E. Mら、Genome Research 6:995-1001（1996）；H o l l a n d , P. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A、88:7276-7280（1991）；およびL i v a k , K. J. ら、PCR Methods and Applications、357-362（1995）、分子ビーコン（その全体を参照により本明細書に組み込むP i a t e k , A. S. ら、Nat. Biotechnol.、16:359-63（1998）；T y a g i , S. およびK r a m e r , F. R.、Nature Biotechnology、14:303-308（1996）；およびT y a g i , S. ら、Nat. Biotechnol.、16:49-53（1998）、インバーダーアッセイ（Third Wave Technologies、(Madison, Wis.)）（その全体を参照により本明細書に組み込む、N e r i , B. P. ら、Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis、3826:117-125、2000）、核酸配列ベースの増幅（NASBA；（例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、C o m p t o n , J. Nucleic Acid Sequence-based Amplification、Nature、350:91-91、1991を参照されたい。）、スコピオンプローブ（Scorpion probes）（その全体を参照により本明細書に組み込む、T h e l l w e l l ら、Nucleic Acids Research、28:3752-3761、2000）、部分的に二本鎖の直鎖状プローブ（その全体を参照により本明細書に組み込む、L u k , K. -C. ら、J. Virological Methods、144:1-11、2007）、容量性DNA検出（例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、S o h n ら（2000）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、97:10687-10690を参照されたい。）などを使用する。

20

30

40

#### 【0086】

#### IV. 核酸分析

核酸分子（例えば、増幅されたHPgV-2核酸）は、分子の存在、量または同一性を

50

決定するために、あらゆる数々の技術によって分析され得る。非限定的な例は、シーケンシング、質量決定および塩基組成の決定を含む。分析は、増幅された核酸の全てもしくは一部の配列、または1つ以上のその性質もしくは特徴を同定して、所望の情報を明らかにし得る。例えば、一部の実施形態において、多型の存在、または特定のHPgV-2の系統もしくは単離物の存在が決定される。一部の実施形態において、核酸のメチル化状態が決定される。

#### 【0087】

核酸シーケンシング技術の説明的な、非限定的な例は、それだけには限定されないが、鎖ターミネーター (Sanger) シーケンシングおよび色素ターミネーターシーケンシング、ならびに「次世代」のシーケンシング技術を含む。RNAは実験上、細胞中で安定性が低く、ヌクレアーゼの攻撃をより受けやすいため、RNAは必ずではないが、通常、シーケンシング前にDNAに逆転写されることを、当業者であれば認識されよう。

#### 【0088】

蛍光ベースのシーケンシング方法を含めた、数々のDNAシーケンシング技術が、当技術分野では知られている (例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、Birrenら、Genome Analysis: Analyzing DNA, 1, Cold Spring Harbor, N. Y. を参照されたい。)。一部の実施形態において、当技術分野では理解されている、自動化シーケンシング技術が利用される。一部の実施形態において、システム、装置および方法は、分割された単位複製配列の平行シーケンシングを使用する (その全体を参照により本明細書に組み込む、Kevin McKernanらへのPCT公開第WO2006084132号)。一部の実施形態において、DNAシーケンシングは、平行のオリゴヌクレオチド伸長によって実現される (例えば、両方ともその全体を参照により本明細書に組み込む、Maceviczらへの米国特許第5,750,341号、およびMaceviczらへの米国特許第6,306,597号を参照されたい。)。シーケンシング技術の付加的な例は、Churchのポロニー技術 (その全体を参照により本明細書に組み込む、Mitraら、2003、Analytical Biochemistry 320、55-65; Shendureら、2005 Science、309、1728-1732; 米国特許第6,432,360号、米国特許第6,485,944号、米国特許第6,511,803号)、454ピコタイターパイロシーケンシング技術 (その全体を参照により本明細書に組み込む、Marguliesら、2005、Nature、437、376-380; US20050130173)、Solexa単一塩基付加 (single base addition) 技術 (その全体を参照により本明細書に組み込む、Bennettら、2005、Pharmacogenomics、6、373-382; 米国特許第6,787,308号、米国特許第6,833,246号)、Illumina単一塩基シーケンシング技術、Lynx大規模平行シグネチャーシーケンシング技術 (その全体を参照により本明細書に組み込む、Brennerら (2000)、Nat. Biotechnol.、18:630-634; 米国特許第5,695,934号、米国特許第5,714,330号) およびAdessi PCRコロニー技術 (その全体を参照により本明細書に組み込む、Adessiら (2000) Nucleic Acid Res.、28、E87; WO 00018957) を含む。

#### 【0089】

一部の実施形態において、鎖ターミネーターシーケンシングが利用される。鎖ターミネーターシーケンシングは、修飾されたヌクレオチド基質を使用して、DNA合成反応の配列特異的な終結を使用する。伸長は、鋳型DNA上の特定部位で、短い放射性的、または他の標識された、その領域で鋳型に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用することによって開始される。オリゴヌクレオチドプライマーは、DNAポリメラーゼ、標準的な4つのデオキシヌクレオチド塩基、および低濃度の1つの鎖終結性ヌクレオチドを使用して伸長され、鎖終結性ヌクレオチドがジデオキシヌクレオチドであるのが最も一般

的である。この反応は、ジデオキシヌクレオチドとして各塩基を順番にして、4本の別々のチューブ中で繰り返される。DNAポリメラーゼによる、鎖終結性ヌクレオチドの限定組入れ (limited incorporation) は、特定のジデオキシヌクレオチドが使用される位置だけで終結される、一連の関連のDNAフラグメントをもたらす。各反応チューブに対して、フラグメントは、ポリアクリルアミドのスラブゲル、または粘稠性のポリマーで充填されているキャピラリチューブ中の電気泳動によってサイズ分離される。配列は、ゲルの上部から底部までスキャンするに従って、標識されたプライマーから可視化された印をどのレーンが生成するかを読み取ることによって決定される。

#### 【0090】

色素ターミネーターシーケンシングは、ターミネーターを代替的に標識する。ジデオキシヌクレオチド鎖ターミネーターの各々を、様々な波長の蛍光を放つ別々の蛍光色素で標識することによって、完全なシーケンシングが単一の反応で行われ得る。

#### 【0091】

「次世代シーケンシング」技術と呼ばれる1セットの方法が、Sangerおよび色素ターミネーターシーケンシング方法の代替として出現している (各々その全体を参照により本明細書に組み込む、Voelkerdingら、Clinical Chem.、55:641-658、2009; MacLeanら、Nature Rev. Microbiol.、7:287-296)。これらの技術は、HPgV-2核酸の一部分を配列決定するのに使用され得る。次世代シーケンシング (NGS) 方法は、大量平行のハイスループット戦略の一般的な特徴を共有し、古いシーケンシング方法に比べてより低いコストを目的とする。NGS方法は、鋳型の増幅を必要とするものと、必要としないものとに大ざっぱに分けられ得る。増幅を必要とする方法は、Rocheにより454技術プラットフォームとして商品化されたパイロシーケンシング (例えば、GS20およびGS FLX)、Illuminaによって商品化されたSolexaプラットフォーム、ならびにApplied Biosystemsによって商品化されたSupported Oligonucleotide Ligation and Detection (SOLiD) プラットホームを含む。単一分子シーケンシングとしても知られる、非増幅の取組みは、Helicos BioSciencesによって商品化されたHeliscopeプラットフォーム、ならびにそれぞれVisiGen、Oxford Nanopore Technologies Ltd. およびPacific Biosciencesにより商品化されたエマージングプラットフォームにより例示される。

#### 【0092】

パイロシーケンシング (各々その全体を参照により本明細書に組み込む、Voelkerdingら、Clinical Chem.、55:641-658、2009; MacLeanら、Nature Rev. Microbiol.、7:287-296; 米国特許第6,210,891号、米国特許第6,258,568号) では、鋳型DNAが、フラグメント化され、末端修復され、アダプターにライゲートされ、単一の鋳型分子を、アダプターに相補的なオリゴヌクレオチドを保有するビーズで捕捉することによってインサイチューでクローニング的に増幅される。単一の鋳型タイプを保有する各ビーズは、油中水型の微小胞中に区画化され、鋳型は、エマルジョンPCRと呼ばれる技術を使用してクローニング的に増幅される。増幅後、エマルジョンは破壊され、ビーズは、シーケンシング反応の間フローセルとして機能するピコタイタープレートの個々のウェル中に沈着される。4つのdNTP試薬各々の、秩序だった反復的な導入が、シーケンシング酵素、およびルシフェラーゼのような発光レポーターの存在下、フローセル中で生じる。好適なdNTPが、シーケンシングプライマーの3'末端に付加される場合、結果として生じるATPの生成がウェル内に発光のバーストを生じ、これがCCDカメラを使用して記録される。400塩基を超えまたは400塩基に等しいリードの長さを実現するのが可能であり、 $1 \times 10^6$ の配列リードが実現され得、最高50000万塩基対 (Mb) の配列を生じる。

#### 【0093】

S o l e x a / I l l u m i n a プラットホームでは（各々その全体を参照により本明細書に組み込む、V o e l k e r d i n g ら、C l i n i c a l C h e m . 、 5 5 : 6 4 1 - 6 5 8 、 2 0 0 9 ; M a c L e a n ら、N a t u r e R e v . M i c r o b i o l . 、 7 : 2 8 7 - 2 9 6 ; 米国特許第 6 , 8 3 3 , 2 4 6 号 ; 米国特許第 7 , 1 1 5 , 4 0 0 号 ; 米国特許第 6 , 9 6 9 , 4 8 8 号）、より短い長さのリードの形態のシーケンシングデータが生成される。この方法において、一本鎖のフラグメント化された DNA が末端修復されて 5' - リン酸化された平滑末端を産生し、フラグメントの 3' 終端に対して単一の A 塩基の K l e n o w 媒介性付加が続く。A 付加は、T オーバーハングアダプターオリゴヌクレオチドの付加を促進し、これらのオリゴヌクレオチドは引き続き、オリゴヌクレオチドアンカーが散りばめられたフローセルの表面上で鋳型-アダプター分子を捕捉するのに使用される。アンカーは PCR プライマーとして使用されるが、鋳型の長さのため、および他の近くのアンカーオリゴヌクレオチドに近接するため、PCR による伸長は、隣接のアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズしてフローセルの表面上にブリッジ構造を形成するための、分子の「アーチ形成 ( a r c h i n g o v e r ) 」をもたらす。これら DNA のループは、変性され、切断される。次いで、フォワード鎖が、可逆性の色素ターミネーターで配列決定される。組み入れられたヌクレオチドの配列は、組み入れ後蛍光を検出することによって決定され、各蛍光およびブロックが除去された後、次のサイクルで d N T P が添加される。配列リードの長さは、3 6 ヌクレオチドから 6 0 0 ヌクレオチドを超えるまでの範囲であり、全体の出力は、分析操作 1 回あたり 1 0 億ヌクレオチド対を超える。

10

20

#### 【0094】

S O L i D 技術（各々その全体を参照により本明細書に組み込む、V o e l k e r d i n g ら、C l i n i c a l C h e m . 、 5 5 : 6 4 1 - 6 5 8 、 2 0 0 9 ; M a c L e a n ら、N a t u r e R e v . M i c r o b i o l . 、 7 : 2 8 7 - 2 9 6 ; 米国特許第 5 , 9 1 2 , 1 4 8 号 ; 米国特許第 6 , 1 3 0 , 0 7 3 号）を使用した核酸分子のシーケンシングは、鋳型のフラグメント化、オリゴヌクレオチドアダプターに対するライゲーション、ビーズに対する付着、およびエマルジョン PCR によるクロンの増幅をやはり伴う。これに続き、鋳型を保有するビーズが、ガラス製フローセルの誘導体化された表面上に固定化され、アダプターのオリゴヌクレオチドに相補的なプライマーがアニーリングされる。しかし、このプライマーを 3' 伸長に利用するよりむしろ、このプライマーはその代わり、2 つのプローブ特異的塩基とそれに続く変性塩基 6 個および蛍光標識 4 個のうち 1 個を含む照合プローブに対するライゲーションに、5' ホスフェート基を提供するのに使用される。S O L i D システムでは、照合プローブは、各プローブの 3' 終端の塩基 2 個、および 5' 終端の蛍光 4 個のうち 1 個の、1 6 の可能な組合せを有する。蛍光色、よって各プローブの同一性は、特定される色-空間をコードするスキームに相当する。複数ラウンド（通常 7 回）のプローブのアニーリング、ライゲーションおよび蛍光検出に変性が続く、次いで、最初のプライマーに対して 1 個の塩基によって相殺されるプライマーを使用した、第 2 ラウンドのシーケンシングが続く。この様式では、鋳型配列はコンピュータで再構築され得、鋳型塩基は 2 回照合され、正確さの増大がもたらされる。配列リードの長さは平均 3 5 ヌクレオチドであり、全体の出力は、シーケンシング操作 1 回あたり 4 0 億塩基を超える。

30

40

#### 【0095】

ある特定の実施形態において、ナノポアシーケンシングが使用される（例えば、参照により本明細書に組み込む、A s t i e r ら、J A m C h e m S o c . 、 2 0 0 6 年 2 月 8 日 ; 1 2 8 ( 5 ) : 1 7 0 5 - 1 0 を参照されたい。）。ナノポアシーケンシングを裏付ける理論は、ナノポアが導電性流体中に浸漬され、それをまたがって電位（電圧）が適用される場合に生じるものと関係があり、これらの条件下、ナノポアを介したイオンの伝導によるわずかな電流が観察され得、電流の量はナノポアのサイズに対して極めて敏感である。ナノポアを介して DNA 分子が通過すると（または DNA 分子の一部が通過すると）、これがナノポアを介した電流の規模における変化を作り出すことができ、そ

50

れによってDNA分子の配列が決定され得る。

#### 【0096】

システム、装置および方法での使用に適用され得る、別の例示的な核酸シーケンシングの取組みは、Stratos Genomics, Inc. によって開発され、エクspandマー (Xpandomers) の使用を伴う。このシーケンシングのプロセスは、典型的に、鋳型指向性の合成によって生成される娘鎖を提供することを含む。娘鎖は、一般的に、標的核酸の全部または一部の連続したヌクレオチド配列に対応する配列においてカップリングされている複数のサブユニットを含み、標的核酸では、個々のサブユニットが、つなぎ鎖、少なくとも1つのプローブまたは核酸塩基残基、および少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む。選択的に切断可能な一又は複数の結合は切断されて、娘鎖の複数のサブユニットより長さが長いエクspandマーを生じる。エクspandマーは、典型的に、つなぎ鎖、および標的核酸の全てまたは一部分の連続したヌクレオチド配列に相当する配列において遺伝情報を解読するためのレポーターエレメントを含む。次いで、エクspandマーのレポーターエレメントが検出される。エクspandマーベースの取組みに関する付加的な詳細は、例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、2008年6月19日に出願された、「HIGH THROUGHPUT NUCLEIC ACID SEQUENCING BY EXPANSION」という表題の米国特許公開第20090035777号に記載されている。

#### 【0097】

他の新興の単一分子シーケンシング方法は、VisiGenプラットフォームを使用した合成によるリアルタイムシーケンシングを含み (各々その全体を参照により本明細書に組み込む、Voelkerdingら、Clinical Chem.、55:641-658、2009; 米国特許第7,329,492号; 米国特許出願第11/671956号; 米国特許出願第11/781166号)、この方法では、固定化され、プライミングされたDNAの鋳型を、蛍光的に修飾したポリメラーゼおよび蛍光アクセプタ分子を使用して鎖伸長にかけ、ヌクレオチドを添加すると、検出可能な蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を生じる。

#### 【0098】

本発明で使用するのに適応され得る、このようなリアルタイムシーケンシングのためのプロセスおよびシステムは、全てその全体を参照により本明細書に組み込む、例えば、以下において記載されている: 2008年7月29日発行のXuらへの「Fluorescent nucleotide analogs and uses therefor」という表題の米国特許第7,405,281号、2008年1月1日にTurnerらへ発行された、「Arrays of optical confinements and uses thereof」という表題の第7,315,019号、2007年12月25日にTurnerらへ発行された「Optical analysis of molecules」という表題の第7,313,308号、2007年11月27日にTurnerらへ発行された「Apparatus and method for analysis of molecules」という表題の第7,302,146号、および第2007年1月30日にTurnerらへ発行された「Apparatus and methods for optical analysis of molecules」という表題の第7,170,050号、2007年10月26日にLundquistらによって出願された「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」という表題の米国特許公開第20080212960号、2007年10月26日にWilliamsらによって出願された「Flowcell system for single molecule detection」という表題の第20080206764号、2007年10月26日にHanzelらによって出願された「Active surface coupled polymerases」という表題の第20080199932号、

2008年2月11日にOttoらによって出願された「CONTROLLABLE STRAND SCISSION OF MINI CIRCLE DNA」という表題の第20080199874号、2007年10月26日にRankらによって出願された「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」という表題の第20080176769号、2007年10月31日にEidらによって出願された「Mitigation of photodamage in analytical reactions」という表題の第20080176316号、2007年10月31日にEidらによって出願された「Mitigation of photodamage in analytical reactions」という表題の第20080176241号、2007年10月26日にLundquistらによって出願された「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」という表題の第20080165346号、2007年10月31日にKorlachによって出願された「Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same」という表題の第20080160531号、2007年10月26日にLundquistらによって出願された「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」という表題の第20080157005号、2007年10月31日にRankらによって出願された「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」という表題の第20080153100号、2007年10月26日にWilliamsらによって出願された「CHARGE SWITCH NUCLEOTIDES」という表題の第20080153095号、2007年10月31日Lundquistらによって出願された「Substrates, systems and methods for analyzing materials」という表題の第20080152281号、2007年10月31日にLundquistらによって出願された「Substrates, systems and methods for analyzing materials」という表題の第20080152280号、2007年10月31日Korlachによって出願された「Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same」という表題の第20080145278号、2007年8月31日にLundquistらによって出願された「SUBSTRATES, SYSTEMS AND METHODS FOR ANALYZING MATERIALS」という表題の第20080128627号、2007年10月22日にRankらによって出願された「Polymerase enzymes and reagents for enhanced nucleic acid sequencing」という表題の第20080108082号、2007年6月11日にFoquetらによって出願された「SUBSTRATES FOR PERFORMING ANALYTICAL REACTIONS」という表題の第20080095488号、2007年9月27日にDixonらによって出願された「MODULAR OPTICAL COMPONENTS AND SYSTEMS INCORPORATING SAME」という表題の第20080080059号、2007年8月14日にKorlachらによって出願された「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing and using same」という表題の第20080050747号、2007年3月29日にRankらによって出願された「Ar

ticles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」という表題の第20080032301号、2007年2月9日にLundquistらによって出願された「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」という表題の第20080030628号、2007年6月15日にLytleらによって出願された「CONTROLLED INITIATION OF PRIMER EXTENSION」という表題の第20080009007号、2006年3月30日にRankらによって出願された「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」という表題の第20070238679号、2006年3月31日にKorlachらによって出願された「Methods, systems and compositions for monitoring enzyme activity and applications thereof」という表題の第20070231804号、2007年2月9日にLundquistらによって出願された「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」という表題の第20070206187号、2006年12月21日にHanzelらによって出願された「Polymerases for nucleotide analogue incorporation」という表題の第20070196846号、2006年7月7日にLundquistらによって出願された「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」という表題の第20070188750号、2006年12月1日にEidらによって出願された「MITIGATION OF PHOTODAMAGE IN ANALYTICAL REACTIONS」という表題の第20070161017号、2006年11月3日にTurnerらによって出願された「Nucleotide Compositions and Uses Thereof」という表題の第20070141598号、2006年11月27日にKorlachによって出願された「Uniform surfaces for hybrid material substrate and methods for making and using same」という表題の第20070134128号、2005年12月2日にEidらによって出願された「Mitigation of photodamage in analytical reactions」という表題の第20070128133号、2005年9月30日にRoitmanらによって出願された「Reactive surfaces, substrates and methods of producing same」という表題の第20070077564号、2005年9月29日にXuらによって出願された「Fluorescent nucleotide analogs and uses therefore」という表題の第20070072196号、および2005年8月11日にLundquistらによって出願された「Methods and systems for monitoring multiple optical signals from a single source」という表題の第20070036511号、ならびにKorlachら(2008)「Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures」Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A.、105(4):11761181。

【0099】

一部の実施形態において、核酸は、核酸の質量および／または塩基組成を決定することによって分析される。例えば、一部の実施形態において、核酸は、各々その全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許第7,108,974号、第8,017,743号および第8,017,322号に記載される質量分析法（例えば、Abbott PLEX-IDシステム、Abbott Ibis Biosciences、Abbott Park、Illinois）を使用して独特な塩基組成シグネチャー（BCS）を同定することによって、検出され特徴付けられる。一部の実施形態において、配列を検出または分析するのにMassARRAYシステム（Sequenom、San Diego、California）が使用される（例えば、各々、参照により本明細書に組み込む、米国特許第6,043,031号、第5,777,324号および第5,605,798号を参照されたい。）。

10

#### 【0100】

ある特定の実施形態において、HPgV-2核酸を配列決定するのに、Ion Torrentシーケンシング技術が使用される。Ion Torrent技術は、DNAの重合の間に放出される水素イオンの検出に基づいたDNAシーケンシングの方法である（例えば、全ての目的でその全体を参照により本明細書に組み込む、Science、327（5970）：1190（2010）；米国特許出願公開第20090026082号、第20090127589号、第20100301398号、第20100197507号、第20100188073号および第20100137143号を参照されたい。）。

マイクロウェルは、配列決定しようとするNGSフラグメントライブラリーのフラグメントを含んでいる。マイクロウェルの層の下に、高感受性ISFETイオンセンサーがある。エレクトロニクス産業において使用されるもの同様、全ての層がCMOS半導体チップ内に含まれる。成長する相補鎖中にdNTPが組み入れられると水素イオンが放出され、この水素イオンが高感受性のイオンセンサーの引き金を引く。ホモポリマーの反復が鋳型配列に存在する場合、複数のdNTP分子が単一のサイクルに組み入れられる。これが、対応する数の放出される水素、および比例的に高い電気シグナルをもたらす。この技術は、修飾されたヌクレオチドまたは光学が使用されないという点で、他のシーケンシング技術と異なる。Ion Torrentシーケンサーの1塩基あたりの精度は、50塩基のリードに対しておよそ99.6%であり、1操作あたりおよそ100Mbが産生される。リードの長さは100塩基対である。長さ5反復のホモポリマーリピートに対する精度はおよそ98%である。イオン半導体シーケンシングの利点は、シーケンシング速度が速く、先行投資および操作の費用が安いことである。

20

30

#### 【0101】

ある特定の実施形態において、特定のタイプ、系統または単離物を識別する多型または塩基を含むHPgV-2核酸は、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて検出される。ハイブリダイゼーションアッセイでは、所与の配列、SNPまたは変異の存在または非存在が、試料からの核酸が相補的な核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ）にハイブリダイズする能力に基づいて決定される。ハイブリダイゼーションおよび検出のための様々な技術を使用する様々なハイブリダイゼーションアッセイが、当技術分野では利用可能であり、公知である。

40

#### 【0102】

##### V. HPgV-2ペプチド

他の実施形態において、本明細書に、HPgV-2ポリペプチド配列をコードするHPgV-2ポリヌクレオチド配列を提供する。HPgV-2ポリペプチド（例えば、配列番号2-11、76-85および304-353）は、図2、9、14、16、18、20および22に記載されるものである。他の実施形態は、これらHPgV-2タンパク質のフラグメント、融合タンパク質または機能的同等物を提供する。さらに他の実施形態において、好適な宿主細胞においてHPgV-2相同体および変異体の発現を指示する組換えDNA分子を産生するのに、様々なHPgV-2相同体および変異体に相当する核酸配列が使用され得る。一部の実施形態において、ポリペプチドは精製された生成物であってよ

50

く、他の実施形態において、ポリペプチドは化学合成手順の生成物であってよく、さらに他の実施形態において、ポリペプチドは、真核生物または原核生物の宿主（例えば、培地中の細菌、酵母菌、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞）を使用して組換え技術によって生成されてもよい。

【0103】

ある特定の実施形態において、遺伝子コードの固有の縮重のため、HPgV-2ペプチドをクローニングし、発現するのに、実質的に同じまたは機能的に同等のアミノ酸配列をコードする配列番号1、75または299-303のポリヌクレオチド配列以外のDNA配列が使用され得る。一般的に、このようなポリヌクレオチド配列は、上記に記載した高度から中等度のストリンジェンシー条件下、配列番号1、配列番号75または配列番号299-303にハイブリダイズする。当業者によって理解される通り、天然に存在しないコドンをもつヌクレオチド配列をコードするHPgV-2を生成するのが有利であり得る。したがって、一部の好ましい実施形態において、例えば、HPgV-2発現の速度を増大するのに、または天然に存在する配列から生成される転写物よりも長い半減期のような、所望の性質を有する組換えRNA転写物を生成するのに、特定の原核生物または真核生物の宿主によって好まれるコドン（Murrayら、Nucleic Acids Res.、17 [1989]）が選択される。

10

【0104】

ある特定の実施形態において、ペプチドは、下記の表15におけるペプチド、またはアミノ酸1、2、3もしくは4個の変化を有するこれらのバリエーションを含み、またはこれらからなる。このようなペプチドは、例えば、ペプチドおよび／または免疫原を捕捉して抗体を産生するのに使用され得る。

20

【0105】

【表 2】

表 15

| 単離物/<br>ペプチド | タンパク質 | アミノ酸配列                                        | 配列番号 |
|--------------|-------|-----------------------------------------------|------|
| ペプチド 1       | S     | GGSCRSPSRVQVARRVLQLSAFLALIGSGMSSIRSKTEGRIESGQ | 100  |
| ペプチド 1       | S     | GGSCRSPSRVQVARRVLQLSAFL                       | 101  |
| ペプチド 1       | S     | SAFLALIGSGMSSIRSKTEGRIESGQ                    | 102  |
| ペプチド 1       | S     | ARRVLQLSAFLALIGSGMSS                          | 103  |
| UC0125.US    | S     | GGSCRSPSRVQVARRVLQLCAFLALIGSGMCSIRSKTEGRIESGQ | 104  |
| UC0125.US    | S     | GGSCRSPSRVQVARRVLQLCAFL                       | 105  |
| UC0125.US    | S     | CAFLALIGSGMCSIRSKTEGRIESGQ                    | 106  |
| UC0125.US    | S     | ARRVLQLCAFLALIGSGMCS                          | 107  |
| ABT0070P.US  | S     | GGSCRSPSRVQVAGRVLRLCAFLALIGSGMCSIRSKNEGRIESGQ | 108  |
| ABT0070P.US  | S     | GGSCRSPSRVQVAGRVLRLCAFL                       | 109  |
| ABT0070P.US  | S     | MCSIRSKNEGRIESGQ                              | 110  |
| ABT0070P.US  | S     | VAGRVLRLCAFLALIGSGMC                          | 111  |
| ペプチド 2       | S     | RDGSLHWSHARHHSVQPDRAAGPPSVTSVERNMGSSSTDQT     | 112  |
| ペプチド 2       | S     | RDGSLHWSHARHHSVQPDRAAG                        | 113  |
| UC0125.US    | S     | RDGSLHWCHARHHSVQPDRAAGPPSVTSVERNMGSSSTDQT     | 114  |
| UC0125.US    | S     | RDGSLHWCHARHHSVQPDRAAG                        | 115  |
| UC0125.US    | S     | VAAGPPSVTSVERNMGSSSTDQT                       | 116  |
| UC0125.US    | S     | RHHSVQPDRAAGPPSVTSVE                          | 117  |
| ペプチド 3       | E2    | SMNSDSPFGTFTRNTERSFSPVKINS                    | 118  |
| ペプチド 3       | E2    | SMNCDCPFGTFTRNTERSFSPVKINS                    | 119  |
| UC0125.US    | E2    | SMNSDSPFGTFTRNTERSF                           | 120  |
| UC0125.US    | E2    | SMNCDCPFGTFTRNTERSF                           | 121  |
| UC0125.US    | E2    | SFSPVKINS                                     | 122  |
| UC0125.US    | E2    | FGTFTRNTERSFIPR                               | 123  |
| ABT0070P.US  | E2    | AMNCDCPFGTFTRNTERSGFTIPRCPVKLNS               | 124  |
| ABT0070P.US  | E2    | AMNCDCPFGTFTRNTERSGF                          | 125  |
| ABT0070P.US  | E2    | SGFTIPRCPVKLNS                                | 126  |
| ABT0070P.US  | E2    | FGTFTRNTERSGFTIPR                             | 127  |
| ABT0096P.US  |       | AMNCDCPFGTFTRNTERSGFSISIDSVLLKSI              | 128  |
| UC0125.US    | NS3   | QAPAVTPTYSEITYYAPTGSKGSTKYPVDLVKQGHKVLVL      | 129  |
| UC0125.US    | NS3   | QAPAVTPTYSEITYYAPTGSKGST                      | 130  |
| UC0125.US    | NS3   | GKSTKYPVDLVKQGHKVLVL                          | 131  |
| UC0125.US    | NS3   | ITYYAPTGSKGSTKYPVDLVKQG                       | 132  |
| UC0125.US    | NS3   | VKSMAPIKETIKIRPEIRAGTGPDGVTVITG               | 133  |
| UC0125.US    | NS3   | VKSMAPIKETIKIRPEI                             | 134  |
| UC0125.US    | NS3   | PEIRAGTGPDGVTVITG                             | 135  |
| UC0125.US    | NS3   | IKETIKIRPEIRAGTGPDG                           | 136  |
| ABT0070P.US  | NS3   | VKSMAPIKEKYKIRPEIRAGTGPDGVTVITG               | 137  |
| ABT0070P.US  | NS3   | VKSMAPIKEKYKIRPEI                             | 138  |
| ABT0070P.US  | NS3   | IKEKYKIRPEIRAGTGPDG                           | 139  |
| UC0125.US    | NS3   | LVDPETNLRGYAVVICDECHDTSSTLLGIGAVRMYAEKA       | 140  |
| UC0125.US    | NS3   | LVDPETNLRGYAVVICDECHDTS                       | 141  |
| UC0125.US    | NS3   | TNLRGYAVVICDECHDTSSTLLGI                      | 142  |
| UC0125.US    | NS3   | DTSSSTLLGIGAVRMYAEKA                          | 143  |
| UC0125.US    | NS3   | PETNLRGYAVVISDESHDTS                          | 144  |
| UC0125.US    | NS3   | PETNLRGYAVVISD                                | 145  |
| UC0125.US    | NS3   | VISDESHDTS                                    | 146  |

10

20

30

40

|             |      |                                          |     |
|-------------|------|------------------------------------------|-----|
| ABT0070P.US | NS3  | PETNLRGYAVVICDECHDTSS                    | 147 |
| ABT0070P.US | NS3  | PETNLRGYAVVICD                           | 148 |
| ABT0096P.US | NS3  | RRGFAVVICVECHEHIT                        | 149 |
| UC0125.US   | NS3  | PCTAALRMQRRGRTGRGRRGAYTTSPGAAPCVS        | 150 |
| UC0125.US   | NS3  | PCTAALRMQRRGRTGRGRRG                     | 151 |
| UC0125.US   | NS3  | GRRGAYTTSPGAAPCVS                        | 152 |
| UC0125.US   | NS3  | RRGRTGRGRRGAYTTSPG                       | 153 |
| ABT0070P.US | NS3  | PCTAALRMQRRGRTGRGRRGAYTTTPGAAPCV         | 154 |
| ABT0070P.US | NS3  | GRRGAYTTTPGAAPCV                         | 155 |
| ABT0070P.US | NS3  | RRGRTGRGRRGAYTTTPG                       | 156 |
| UC0125.US   | NS4B | LSERFGQQLSKLSLWRSVYHWAQAREGYTQCG         | 157 |
| UC0125.US   | NS4B | LSERFGQQLSKLSLWRSV                       | 158 |
| UC0125.US   | NS4B | RSVYHWAQAREGYTQCG                        | 159 |
| UC0125.US   | NS4B | LSKLSLWRSVYHWAQAREG                      | 160 |
| ABT0070P.US | NS4B | LTEKFGQQLSKLSLWRSVYHWAQAREGYTQCG         | 161 |
| ABT0070P.US | NS4B | LTEKFGQQLSKLSLWRSV                       | 162 |
| UC0125.US   | NS5A | NPTTTGTGTLRPDISDANKLGFRYGVADIVELERRGDKWH | 163 |
| UC0125.US   | NS5A | FNPTTTGTGTLRPDISDANKLGFR                 | 164 |
| UC0125.US   | NS5A | GFRYGVADIVELERRGDKWH                     | 165 |
| UC0125.US   | NS5A | RPDISDANKLGFRYGVADI                      | 166 |
| ABT0070P.US | NS5A | NPTTTATGTLRPDISDATKLGFRYGVAEIVELERRGNKWH | 167 |
| ABT0070P.US | NS5A | NPTTTATGTLRPDISDATKLGFR                  | 168 |
| ABT0070P.US | NS5A | GFRYGVAEIVELERRGNKWH                     | 169 |
| ABT0070P.US | NS5A | RPDISDATKLGFRYGVAEI                      | 170 |
| UC0125.US   | NS5A | QNLAARRRAEYDAWQVRQAVGDEYTRLADEDVD        | 171 |
| UC0125.US   | NS5A | QNLAARRRAEYDAWQVRQAV                     | 172 |
| UC0125.US   | NS5A | RQAVGDEYTRLADEDVD                        | 173 |
| UC0125.US   | NS5A | RAEYDAWQVRQAVGDEYTR                      | 174 |
| ABT0070P.US | NS5A | QNLEARRRAEFDAWQVREAIRDEYTRLADEDVD        | 175 |
| ABT0070P.US | NS5A | QNLEARRRAEFDAWQVREAI                     | 176 |
| ABT0070P.US | NS5A | REAIRDEYTRLADEDVD                        | 177 |
| ABT0070P.US | NS5A | RAEFDAWQVREAIRDEYTR                      | 178 |
| ABT0096P.US | NS5A | FEAWQVREAIRDEYTRLADEDVD                  | 179 |
| UC0125.US   | NS5A | RFVPPVPKPRTRVSGVLERVRMCMRTPPIKF          | 180 |
| UC0125.US   | NS5A | RFVPPVPKPRTRVSGV                         | 181 |
| UC0125.US   | NS5A | SGVLERVRMCMRTPPIKF                       | 182 |
| UC0125.US   | NS5A | KPRTRVSGVLERVRM                          | 183 |
| ABT0096P.US | NS5A | RTRVSGVLERVRMCMTT                        | 184 |
| UC0125.US   | NS5B | NTTRDHNNGITYTDLVSGRAKP                   | 185 |
| UC0125.US   | NS5B | NTTRDHNNGITYTD                           | 186 |
| UC0125.US   | NS5B | YTDLVSGRAKP                              | 187 |
| ABT0070P.US | NS5B | NTTRDHNNGITYSDLVSGRAKP                   | 188 |
| ABT0070P.US | NS5B | NTTRDHNNGITYSD                           | 189 |
| ABT0070P.US | NS5B | YSDLVSGRAKP                              | 190 |
| UC0125.US   | NS5B | DAPMRIIPKPEVFPRDKSTRKPPRFIVPGCAARV       | 191 |
| UC0125.US   | NS5B | DAPMRIIPKPEVFPRDKSTRKPPR                 | 192 |
| UC0125.US   | NS5B | DKSTRKPPRFIVPGCAARV                      | 193 |
| UC0125.US   | NS5B | IPKPEVFPRDKSTRKPPRFI                     | 194 |
| ABT0070P.US | NS5B | DAPMRIIPKPEVFPRDKSTRKPPRFIVPGCAARV       | 195 |
| ABT0070P.US | NS5B | DAPMRIIPKPEVFPRDKSTRKPPR                 | 196 |
| ABT0070P.US | NS5B | DKSTRKPPRFIVPGCAARV                      | 197 |

10

20

30

40

|             |        |                                                                 |     |
|-------------|--------|-----------------------------------------------------------------|-----|
| ABT0070P.US | NS5B   | IPKPEVFPRDKTTRKPPRFI                                            | 198 |
| UC0125.US   | NS5B   | MPLLCMLIRNEPSQTGTLVT                                            | 199 |
| UC0125.US   | NS5B   | MPLLCMLIRNEPSQT                                                 | 200 |
| UC0125.US   | NS5B   | MLIRNEPSQTGTLVT                                                 | 201 |
| ABT0070P.US | NS5B   | <u>L</u> PLLCMLIRNEPSQTGTLVT                                    | 202 |
| ABT0070P.US | NS5B   | <u>L</u> PLLCMLIRNEPSQT                                         | 203 |
| ABT0096P.US | NS5B   | <u>L</u> PLLCMLIRNEPSQTGTLVT                                    | 204 |
| UC0125.US   | S      | AEAAPKSGELDSQCDHLAWSFMEGMPTGTLIVQRDGS LH                        | 205 |
| UC0125.US   | S      | AEAAPKSGELDSQCDHLAWSFME                                         | 206 |
| UC0125.US   | S      | FMEGMPTGTLIVQRDGS LH                                            | 207 |
| UC0125.US   | S      | QCDHLAWSFMEGMPTGT                                               | 208 |
| UC0125.US   | NS4A-B | SVEVRPAGVTRPDATDETAAYAQRLYQACADSGIFASLQGTASAA<br>LGKLA          | 209 |
| UC0125.US   | NS4A-B | SVEVRPAGVTRPDATDETAAYAQRLYQACAD                                 | 210 |
| UC0125.US   | NS4A-B | ACADSGIFASLQGTASAA LGKLA                                        | 211 |
| UC0125.US   | NS4A-B | VTRPDATDETAAYAQRLYQACADSGIFASLQG                                | 212 |
| ABT0070P.US | NS4A-B | SVENGLAGVTRPDATDETAAYAQRLYQACADSGI <u>L</u> ASLQGTASAA<br>LSRLA | 213 |
| ABT0070P.US | NS4A-B | SVENGLAGVTRPDATDETAAYAQRLYQACAD                                 | 214 |
| ABT0070P.US | NS4A-B | ACADSGI <u>L</u> ASLQGTASAA LSRLA                               | 215 |
| ABT0070P.US | NS4A-B | VTRPDATDETAAYAQRLYQACADSGI <u>L</u> ASLQG                       | 216 |

10

20

## 【0106】

本明細書に記載するポリヌクレオチドは、組換え技術によってHPgV-2ポリペプチドを精製するのに使用され得る。よって、例えば、ポリペプチドは、ポリペプチドを発現させるための様々な発現ベクターのあらゆる1つに含まれていてもよい。一部の実施形態において、ベクターは、それだけには限定されないが、染色体、非染色体および合成のDNA配列（例えば、SV40、細菌のプラスミド、ファージDNAの誘導體；バキュロウイルス、酵母菌のプラスミド、プラスミドとファージDNAとの組合せに由来するベクター、ならびにワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルスおよび仮性狂犬病のようなウイルスDNA）を含む。あらゆるベクターが、宿主において複製可能であり、生存可能である限り使用され得ることが企図される。

30

## 【0107】

とりわけ、本明細書に提供する一部の実施形態は、上記に広範に記載される1つ以上の配列を含む組換え構築物である（例えば、配列番号1、75、299-303またはこれらのサブ部分）。一部の実施形態において、構築物は、フォワードまたはリバース配向の、その中に本発明の配列が挿入されている、プラスミドまたはウイルスのベクターのようなベクターを含む。さらに他の実施形態において、異種性の構造の配列が、好適な相において翻訳開始および終結の配列で組み立てられる。ある特定の実施形態において、あらゆる様々な手順を使用して、好適なDNA配列がベクター中に挿入される。一般的に、DNA配列は、当技術分野では公知の手順によって、好適な一又は複数の制限エンドヌクレアーゼ部位中に挿入される。

40

## 【0108】

多数の適切なベクターが当業者には公知であり、市販されている。このようなベクターは、それだけには限定されないが、以下のベクターを含む：1）細菌-pQE70、pQE60、pQE9（Qiagen）、pBS、pD10、ファージスクリプト（phagescript）、psiX174、pブルースクリプト（pbluescript）SK、pBSKS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（Stratagene）；ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、

50

p R I T 5 ( P h a r m a c i a ) ; p E T ベクター ( N o v a g e n ) ; および 2 ) 真核生物 - p W L N E O 、 p S V 2 C A T 、 p O G 4 4 、 P X T 1 、 p S G ( S t r a t a g e n e ) p S V K 3 、 p B P V 、 p M S G 、 p S V L ( P h a r m a c i a ) 。あらゆる他のプラスミドまたはベクターが、宿主において複製可能であり、生存可能である限り、使用され得る。

#### 【0109】

ある特定の実施形態において、発現ベクターにおける DNA 配列は、mRNA 合成を指示するのに好適な一又は複数の発現制御配列（プロモーター）に作動可能に連結されている。有用なプロモーターは、それだけには限定されないが、LTR または SV40 プロモーター、エシェリキア・コリ (E. coli) lac または trp、ファージラムダ PL および PR、T3 および T7 プロモーター、ならびにサイトメガロウイルス (CMV) 最初期、単純ヘルペスウイルス (HSV) チミジンキナーゼ、およびマウスメタロチオネイン I プロモーター、ならびに原核細胞もしくは真核細胞またはこれらのウイルスにおける遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーターを含む。他の実施形態において、組換え発現ベクターは、複製開始点、および宿主細胞の形質転換を可能にする選択マーカー（例えば、真核細胞培養物に対するジヒドロ葉酸レダクターゼもしくはネオマイシン耐性、またはエシェリキア・コリにおけるテトラサイクリンもしくはアンピシリン耐性）を含む。

#### 【0110】

さらなる実施形態において、本明細書に、上記に記載した構築物を含む宿主細胞を提供する。一部の実施形態において、宿主細胞は、高等真核細胞（例えば、哺乳動物または昆虫の細胞）である。他の実施形態において、宿主細胞は、下等真核細胞（例えば、酵母細胞）である。さらに他の実施形態において、宿主細胞は原核細胞（例えば、細菌細胞）であってよい。宿主細胞の具体的な例は、それだけには限定されないが、エシェリキア・コリ、サルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella typhimurium)、バシラス・サブティリス (Bacillus subtilis)、ならびにシュードモナス (Pseudomonas) 属、ストレプトミセス (Streptomyces) 属およびスタヒロコッカス (Staphylococcus) 属内の様々な種、ならびにサッカロミセス・セレビスシアエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、ドロソフィラ (Drosophila) S2 細胞、スポドプテラ (Spodoptera) Sf9 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、サル腎臓線維芽細胞の COS 7 系統 (Gluzman, Cell, 23:175 [1981])、C127、3T3、293、293T、HeLa および BHK 細胞系を含む。

#### 【0111】

HPgV-2 タンパク質は、好適なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母菌、細菌または他の細胞において発現され得る。本明細書に記載する DNA 構築物に由来する RNA を使用してこのようなタンパク質を生成するために、細胞不含翻訳系も使用され得る。原核生物および真核生物の宿主と使用するのに好適なクローニングおよび発現ベクターは、Sambrook ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 2 版、Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) によって記載されている。

#### 【0112】

本開示は、それだけには限定されないが、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた、組換え細胞培養物から HPgV-2 タンパク質を回収し、精製するための方法も提供する。他の実施形態において、成熟タンパク質の立体配置を完成させる上で、タンパク質再フォールディングのステップが適宜、使用され得る。さらに他の実施形態において、最終の精製

ステップに、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）が使用され得る。

#### 【0113】

本開示は、ポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列に対してインフレームで融合しているコード配列を有するポリヌクレオチド（例えば、配列番号1、75または299-303の一部分）をさらに提供する。マーカー配列の非限定的な例は、ベクター、好ましくはpQE9ベクターによって供給され得るヘキサヒスチジンタグであり、ヘキサヒスチジンタグは、細菌の宿主の場合はマーカーに融合しているポリペプチドの精製を提供し、または、例えば、哺乳動物の宿主（例えば、COS7細胞）が使用される場合、マーカー配列はヘマグルチニン（HA）タグでもよい。HAタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに相当する（Wilsonら、Cell、37:767[1984]）。

10

#### 【0114】

ある特定の実施形態において、HPgV-2ペプチド（例えば、配列番号86-218および304-353）は、保存的に修飾されている。保存的に修飾されているバリエーションは、アミノ酸および核酸両方の配列に適用する。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾されているバリエーションは、同一の、もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を意味し、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を意味する。遺伝コードの縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が、あらゆる所与のタンパク質をコードする。例えば、GCA、GCC、GCGおよびGCUのコドン全て、アミノ酸のアラニンをコードする。よって、アラニンがコドンによって特定される全ての位置で、コードされるポリペプチドを改変せずに、コドンが、記載されるあらゆる対応するコドンに改変されてもよい。ポリペプチドをコードする本明細書のあらゆる核酸配列は、核酸のあらゆる可能なサイレント変動も記載するものである。当業者であれば、核酸における各コドン（普通はメチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および普通はトリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除いて）は、機能的に同一の分子を生じるように修飾され得ることを認識されよう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のサイレント変動は各々、発現生成物に関して、記載する各配列において暗黙（implicit）であるが、実際のプローブ配列に関して暗黙ではない。アミノ酸配列に関して、当業者であれば、コードされる配列における単一のアミノ酸または低パーセント値のアミノ酸を改変、付加または欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加は、改変が化学的に同様のアミノ酸でのアミノ酸の置換をもたらす、保存的に修飾されているバリエーションであることを認識されよう。機能的に同様のアミノ酸を提供する保存的な置換の表は、当技術分野では周知である。このような保存的に修飾されているバリエーションは、本発明の、多型のバリエーション、種間の相合体、および対立遺伝子に加えて存在するものであり、これらを排除するものではない。以下の8群は各々、相互に保存的な置換であるアミノ酸を含む：1）アラニン（A）、グリシン（G）；2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4）アルギニン（R）、リジン（K）；5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；7）セリン（S）、スレオニン（T）；および8）システイン（C）、メチオニン（M）。

20

30

40

#### 【0115】

##### V I . 抗体産生およびイムノアッセイ

一部の実施形態において、HPgV-2タンパク質を検出するための抗体が使用される。抗体は、様々な免疫原を使用して調製され得る。一実施形態において、免疫原は、HPgV-2を認識する抗体を産生するための、HPgV-2ペプチド（例えば、配列番号2-11、76-218および304-353に示される通り）、またはこれらの一部分である。このような抗体は、それだけには限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fabフラグメント、およびFab発現ライブラリーを含む。

#### 【0116】

50

HPgV-2に対するポリクローナル抗体を生成するのに、当技術分野では公知の様々な手順が使用され得る。抗体を生成するために、それだけには限定されないが、ウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含む、様々な宿主動物が、HPgV-2エピトープに対応するペプチドで注射することによって免疫化され得る。ある特定の実施形態において、ペプチドは免疫原性の担体（例えば、ジフテリア毒素、ウシ血清アルブミン（BSA）、またはキーホールリンペットヘモシアニン（KLH））にコンジュゲートしている。それだけには限定されないが、フロイントの（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG（カルメットゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム・パルブム（*Corynebacterium parvum*）のような潜在的に有用なヒトアジュバント）を含めた、様々なアジュバントが、免疫学的応答を増大するために、宿主の種に応じて使用され得る。

10

#### 【0117】

ある特定の実施形態において、HPgV-2に対するモノクローナル抗体を調製するために、培養中の連続的な細胞系によって抗体分子の生成を提供するあらゆる技術が、本開示との使用を見出すことが企図される（例えば、HarlowおよびLane、*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい。）。これらは、それだけには限定されないが、KohlerおよびMilsteinによって最初に開発されたハイブリドーマ技術（KohlerおよびMilstein、*Nature*、256:495-497 [1975]）、およびトリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えば、Kozborら、*Immunol. Tod.*、4:72 [1983]を参照されたい。）、ならびにヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBVハイブリドーマ技術（Coleら、*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 [1985]）を含む。

20

#### 【0118】

ある特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、無菌動物において、PCT/US90/02545に記載されている技術のような技術を利用して生成される。さらに、ヒト抗体は、ヒトハイブリドーマによって（Coteら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、80:2026-2030 [1983]）、またはインビトロでヒトB細胞をEBVウイルスで形質転換することにより（Coleら、*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77-96 [1985]）産生され得る。

30

#### 【0119】

加えて、単鎖抗体を生成するために記載される技術（参照により本明細書に組み込む、米国特許第4,946,778号）は、HPgV-2特異的単鎖抗体の生成において使用を見出すことが企図される。本発明の付加的な実施形態は、Fab発現ライブラリーを構築するために記載された技術を利用して（Huseら、*Science*、246:1275-1281 [1989]）、HPgV-2に対する所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの速やかで容易な同定を可能にする。

40

#### 【0120】

抗体フラグメントを生成するのに適するあらゆる技術が、抗体分子のイディオタイプ（抗原結合性領域）を含む抗体フラグメントの産生において使用を見出すことが企図される。例えば、このようなフラグメントは、それだけには限定されないが、抗体分子のペプシン消化によって生成され得るF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド架橋を低減することによって産生され得るFab'フラグメント、ならびにパインおよび還元剤で抗体分子を処理することによって産生され得るFabフラグメントを含む。

50

## 【0121】

抗体の生成において、所望の抗体に対するスクリーニングは、当技術分野では公知の技術（例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫放射線測定法、ゲル拡散沈殿反応、免疫拡散アッセイ、インサイチューイムノアッセイ（例えば、コロイド金、酵素または放射性同位元素の標識などを使用して）、ウエスタンブロット、沈殿反応、凝集アッセイ（例えば、ゲル凝集アッセイ、赤血球凝集アッセイなど）、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイおよび免疫電気泳動アッセイなど）により達成されることが企図される。

## 【0122】

一実施形態において、抗体の結合は、一次抗体上の標識を検出することによって検出される。別の実施形態において、一次抗体は、二次抗体または試薬の、一次抗体に対する結合を検出することによって検出される。さらなる実施形態において、二次抗体は標識されている。当技術分野では周知である通り、免疫原性ペプチドは、あらゆる免疫化プロトコールにおいて使用される、担体分子を含まずに提供されるのが一般的である。例えば、ペプチドがKLHにコンジュゲートしていた場合、これはBSAにコンジュゲートしていてもよく、または試料中のHPgV-2を検出するためのスクリーニングアッセイにおいて直接使用されてもよい。前述の抗体は、個体（例えば、HPgV-2に感染していることが疑われる）からの生物学的試料中のHPgV-2を検出するのに使用されてもよい。生物学的試料は、それだけには限定されないが、細胞を含む、血液、血清、血漿、間質液、尿、脳脊髄液などのような生体液であってよい。

## 【0123】

生物学的試料は、次いで、好適な戦略（例えば、ELISAまたはラジオイムノアッセイ）およびフォーマット（例えば、マイクロウェル、ディップスティック（例えば、国際特許公開WO 93/03367に記載される通り））などを使用して、HPgV-2の存在に対して直接試験され得る。代替的に、試料中のタンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）の存在または非存在下で、および免疫ブロッティング（ウエスタンブロッティング）により検出されるHPgV-2の存在下で、（例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）によってサイズ分離され得る。イムノブロッティング技術は一般的に、タンパク質のエピトープの対応するペプチドに対して産生される抗体でより有効であり、よって本明細書に開示する方法および組成物に特に適する。

## 【0124】

一部の実施形態において、HPgV-2は、1）サンドイッチイムノアッセイ（例えば、モノクローナル、ポリクローナル、および／もしくはDVD-Igサンドイッチイムノアッセイ、または化学発光検出、放射性同位元素検出（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA））、および酵素検出（例えば、エンザイムイムノアッセイ（EIA）もしくは酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）（例えば、Quantikine ELISAアッセイ、R&D Systems、Minneapolis、Minn.））を含めた、これらのあらゆる変形（例えば、モノクローナル／DVD-IgもしくはDVD-Ig／ポリクローナル））、2）競合的阻害イムノアッセイ（例えば、フォワードおよびリバース）、3）蛍光偏光免疫測定法（FPIA）、4）酵素増幅免疫測定法（EMIT）、5）生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）、6）均質化学発光アッセイ、7）SELDIベースのイムノアッセイ、8）化学発光微粒子イムノアッセイ（CMIA）および9）臨床化学比色アッセイ（例えば、IMA、eGFR測定に対するクレアチニン、およびLC-MS/MS）のようなイムノアッセイで検出される（例えば、Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.、第4版、Burtis, E R AshwoodおよびD E Bruns編集、Elsevier Saunders、St. Louis、Mo.、2006を参照されたい。）。

## 【0125】

さらに、イムノアッセイが利用される場合、当技術分野では公知である、あらゆる適切

10

20

30

40

50

な検出可能な標識が使用され得る。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（ $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ および $^{33}\text{P}$ のような）、酵素標識（セイヨウワサビのペルオキシダーゼ、アルカリ性ペルオキシダーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼなどのような）、化学発光標識（アクリジニウムエステル、チオエステルまたはスルホンアミド；ルミノール、イソルミノール、フェナントリジニウムエステルなどのような）、蛍光標識（フルオレセイン（例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど）のような）、ローダミン、フィコビリタンパク質、R-フィコエリスリン、量子ドット（例えば、硫酸亜鉛でキャッピングしたセレン化カドミウム）、温度測定標識（thermometric label）またはイムノポリメラーゼ連鎖反応標識であってよい。標識の導入、標識化手順、および標識の検出は、PolakおよびVan Noorden、Introduction to Immunocytochemistry、第2版、Springer Verlag、N. Y.（1997）、およびMolecular Probes, Inc.、Eugene、Oregによって発行されたハンドブックおよびカタログが合わさったものであるHaugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals（1996）に見出される。蛍光標識は、FPIA（例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許第5,593,896号、第5,573,904号、第5,496,925号、第5,359,093号および第5,352,803号を参照されたい。）において使用され得る。アクリジニウム化合物は、均質または不均質な化学発光アッセイにおいて検出可能な標識として使用され得る（例えば、Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、16:1324-1328（2006）；Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、4:2313-2317（2004）；Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、14:3917-3921（2004）；およびAdamczykら、Org. Lett.、5:3779-3782（2003）を参照されたい。）。

10

20

#### 【0126】

好ましいアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキサミドである。アクリジニウム-9-カルボキサミドを調製するための方法は、Mattingly、J. Biolumin. Chemilumin.、6:107-114（1991）；Adamczykら、J. Org. Chem.、63:5636-5639（1998）；Adamczykら、Tetrahedron、55:10899-10914（1999）；Adamczykら、Org. Lett. 1:779-781（1999）；Adamczykら、Bioconjugate Chem.、11:714-724（2000）；Mattinglyら、Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications；Dyke, K. V. 編集；CRC Press: Boca Raton、pp. 77-105（2002）；Adamczykら、Org. Lett.、5:3779-3782（2003）；および米国特許第5,468,646号、第5,543,524号および第5,783,699号（各々その全体をこれらに関する教示に対して本明細書に組み込む）に記載されている。別の好ましいアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルである。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルの一例は、10-メチル-9-（フェノキシカルボニル）アクリジニウムフルオロスルホネート（Cayman Chemical、Ann Arbor、Mich. から入手できる）である。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルを調製するための方法は、McCapraら、Photochem. Photobiol.、4:1111-21（1965）；Razaviら、Luminescence、15:245-249（2000）；Razaviら、Luminescence、15:239-244（2000）；および米国特許第5,241,070号（各々その全体を参照によりこれらに対する教示

30

40

50

に対して本明細書に組み込む)に記載されている。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルおよびその使用に関するさらなる詳細は、米国公開出願第2008-0248493号に記載されている。化学発光アッセイ(例えば、上記に記載したアクリジニウムまたは他の化学発光剤を使用して)は、Adamczykら、Anal. Chim. Acta、579(1):61-67(2006)に記載されている方法に従って行われ得る。あらゆる適切なアッセイフォーマットが使用され得るが、マイクロプレート化学発光計(Mithras LB-940、Berthold Technologies U.S.A.、LLC、Oak Ridge、Tenn.)は、小体積の複数の試料の速やかなアッセイを可能にする。少なくとも1つの塩基性溶液を試料に対して、同時にまたは引き続き添加すると、分析物の存在を示す検出可能なシグナル、すなわち化学発光シグナルが産生される。塩基性溶液は、少なくとも1つの塩基を含み、pHは10またはそれを超え、好ましくは12またはそれを超える。塩基性溶液の例は、それだけには限定されないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよび重炭酸カルシウムを含む。試料に添加される塩基性溶液の量は、塩基性溶液の濃度に依存する。使用される塩基性溶液の濃度に基づいて、当業者であれば、試料に添加する塩基性溶液の量を容易に決定することができる。

10

#### 【0127】

産生される化学発光シグナルは、当業者には公知であるルーチンの技術を使用して検出され得る。産生されたシグナルの強度に基づいて、試料中の分析物の量が定量され得る。具体的に、試料中の分析物の量は、産生されたシグナルの強度に比例する。存在する分析物の量は、産生された光の量を、分析物に対する検量線に対して比較することによって、または参照基準に対して比較することによって、定量され得る。検量線は、既知濃度の分析物の段階希釈または溶液を使用して、質量分析法、重量法、および当技術分野では公知の他の技術によって産生され得る。上記は、化学発光剤としてアクリジニウム化合物の使用を強調して記載されるものであるが、当業者であれば、この記載を、他の化学発光剤の使用に容易に適用することができる。

20

#### 【0128】

イムノアッセイは一般的に、それだけには限定されないが、サンドイッチフォーマットのような、当技術分野では公知のあらゆるフォーマットを使用して行われてもよい。具体的に、1つのイムノアッセイフォーマットにおいて、試料中のHPgV-2またはそのフラグメントを分離および定量するために、少なくとも2つの抗体が使用される。より具体的に、少なくとも2つの抗体がHPgV-2(またはそのフラグメント)上の異なるエピトープに結合し、免疫複合体を形成し、これが「サンドイッチ」と呼ばれる。一般的に、イムノアッセイでは、試験試料中のHPgV-2(またはそのフラグメント)を捕捉するのに1つ以上の抗体が使用され得(すなわち、これらの抗体は、「捕捉」抗体(単数または複数)と頻繁に呼ばれる。)、検出可能な(すなわち、定量可能な)標識をサンドイッチに結合するのに1つ以上の抗体が使用され得る(すなわち、これらの抗体は、「検出抗体」、「検出抗体」(複数)、「コンジュゲート」または「コンジュゲート」(複数)と頻繁に呼ばれる。)。よって、サンドイッチイムノアッセイフォーマットの状況では、抗体(またはそのフラグメント、バリエーション、もしくはバリエーションのフラグメント)は捕捉抗体、検出抗体、またはその両方として使用され得る。例えば、HPgV-2(もしくはそのフラグメント)上の第1のエピトープに結合することができるドメインを有する1つのDVD-Igが、捕捉抗体として使用され得、および/またはHPgV-2(もしくはそのフラグメント)上の第2のエピトープに結合することができるドメインを有する別のDVD-Igが、検出抗体として使用され得る。これに関して、分析物(またはそのフラグメント)上の第1のエピトープに結合することができる第1のドメイン、および分析物(またはそのフラグメント)上の第2のエピトープに結合することができる第2のドメインを有するDVD-Igが、捕捉抗体および/または検出抗体として使用され得る。代替的に、第1の分析物(またはそのフラグメント)上のエピトープに結合することができる

30

40

50

第1のドメイン、および第2の分析物（またはそのフラグメント）上のエピトープに結合することができる第2のドメインを有する1つのDVD-Igは、2つまたはそれを超える分析物を検出し、任意選択的に定量するための、捕捉抗体および／または検出抗体として使用され得る。

#### 【0129】

一般的に言うと、イムノアッセイでは、HPgV-2（またはそのフラグメント）に対して試験される（例えば、含むことが疑われる）試料を、少なくとも1つの捕捉抗体（または抗体）および少なくとも1つの検出抗体（例えば、捕捉および／または検出抗体が複数の抗体を含む場合、第2の検出抗体または第3の検出抗体またはさらに連続的に番号を付けられた抗体であってよい）と、同時に、または逐次的にいずれかで、あらゆる順序で接触させてもよい。例えば、試験試料を、最初に少なくとも1つの捕捉抗体と接触させ、次いで（逐次的に）少なくとも1つの検出抗体と接触させてもよい。代替的に、試験試料を、最初に少なくとも1つの検出抗体と接触させ、次いで（逐次的に）少なくとも1つの捕捉抗体と接触させてもよい。さらに別の代替では、試験試料を、捕捉抗体および検出抗体と同時に接触させてもよい。

10

#### 【0130】

上記に記載したサンドイッチアッセイのフォーマットにおいて、HPgV-2（またはそのフラグメント）を含むことが疑われる試料を、第1の抗体／HPgV-2複合体の形成が許される条件下で、少なくとも1つの第1の捕捉抗体と最初に接触させる。1つを超える捕捉抗体が使用される場合、2つまたはそれを超える捕捉抗体を含む第1の捕捉抗体／HPgV-2複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、すなわち、好ましくは少なくとも1つの捕捉抗体が、試験試料中に予想されるHPgV-2（またはそのフラグメント）の最大量のモル過剰量において使用される。例えば、バッファー（例えば、微粒子コーティングバッファー）1mLあたり約5μgから約1mgの抗体が使用され得る。

20

#### 【0131】

対照的に、競合的阻害イムノアッセイは、たった1つの抗体による結合が必要とされるため、小型の分析物を測定するのにしばしば使用され、逐次的なフォーマットおよび古典的なフォーマットを含む。逐次的な競合的阻害イムノアッセイにおいて、目的の分析物（例えば、HPgV-2タンパク質）に対する捕捉抗体が、マイクロタイタープレートまたは他の固体支持体のウェル上にコーティングされる。目的の分析物を含む試料がウェルに添加されると、目的の分析物が捕捉抗体に結合する。洗浄後、既知量の標識された分析物（例えば、アクリジニウム、ビオチンまたはセイヨウワサビのペルオキシダーゼ（HRP））がウェルに添加される。酵素標識のための基質が、シグナルを生成するのに必要とされる。HRPに適する基質の一例は、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン（TMB）である。洗浄後、標識された分析物によって生成されたシグナルが測定され、このシグナルは試料中の分析物の量に反比例する。古典的な競合的阻害イムノアッセイにおいて、目的の分析物に対する抗体が、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）上にコーティングされる。しかし、逐次的な競合的阻害イムノアッセイと異なり、試料および標識された分析物は同時にウェルに添加される。試料中のあらゆる分析物が、捕捉抗体に対する結合に対して、標識された分析物と競合する。洗浄後、標識された分析物によって生成されたシグナルが測定され、試料中の分析物の量と反比例する。

30

40

#### 【0132】

試験試料中のHPgV-2またはそのフラグメントの濃度は、既知濃度の分析物またはそのフラグメントの段階希釈を使用して生成された検量線の使用によるような、好適な手段によって決定される。分析物またはそのフラグメントの段階希釈を使用する以外に、検量線は、重量法で、質量分析法により、および当技術分野では公知の他の技術により生成され得る。

#### 【0133】

ARCHITECT分析計を使用する化学発光微粒子アッセイにおいて、コンジュゲ

50

ト希釈液のpHは6.2±0.2であってよく、微粒子コーティングバッファーは、およそ室温（すなわち、約17から約27℃まで）で維持されてよく、微粒子コーティングバッファーのpHは約6.5±0.2であってよく、微粒子希釈液のpHは約7.8±0.2であってよい。固体は、約0.15%未満、約0.14%未満、約0.13%未満、約0.12%未満または約0.11%未満のような、約0.10%未満のような、約0.2%未満が好ましい。もちろん、これらの範囲または数は、例えば、バックグラウンド干渉の減少、感度の増大、特異性の増大などを含めた、アッセイのこのような性質を増強するために、改変されてもよい。

#### 【0134】

FPIAは、競合的結合イムノアッセイの原理に基づく。蛍光標識された化合物は、直線偏光によって励起されると、その回転率に反比例する偏光度を有する蛍光を放射する。フルオロフォアは、光が吸収される時間と光が放射される時間との間は回転することが妨げられるため、蛍光標識されたトレーサー抗体複合体が直線偏光によって励起される場合、放射される光は高度に偏光されているままである。「遊離の」トレーサー化合物（すなわち、抗体に結合していない化合物）が直線偏光によって励起される場合、その回転は、競合的結合イムノアッセイにおいて生成される、対応するトレーサー抗体コンジュゲートよりもずっと速い。FPIAは特別な取扱いおよび処分を必要とする放射性物質が存在しない限り、RIAより有利である。加えて、FPIAは、容易に、速やかに行われ得る、均質なアッセイである。

#### 【0135】

本発明の記載は、試料中の患者抗体を検出するために使用されるイムノアッセイのタイプによって限定されない。数々の例示的なフォーマットは以下の通りである。間接的なアッセイにおいて、HPgV-2ペプチドまたはタンパク質は、固相（例えば、ビーズ）上にコーティングし、次いで、試料と接触させ（例えば、18分）、洗浄ステップが続く。次いで、第2のステップにおいて、免疫複合体を、標識された「第2の」抗体と接触させて、固相に結合しているヒトIgG（またはIgM）を検出することによって、HPgV-2に対する患者抗体が検出される（例えば、4分間）。別のアッセイは2ステップの直接（サンドイッチ）アッセイである。このアッセイにおいて、HPgV-2ペプチドまたはタンパク質は、固相（例えば、ビーズ）上にコーティングし、試料と接触させ（例えば、約18分間）、次いで洗浄する。第2のステップにおいて、HPgV-2に対する抗体が、HPgV-2タンパク質を含む固相に結合しているヒトIgG（またはIgM）に結合する、標識化HPgV-2ペプチド／タンパク質で検出される（例えば、4分間）。1ステップの直接（サンドイッチ）アッセイも使用され得る。このようなアッセイにおいて、HPgV-2ペプチドまたはタンパク質は、固相上にコーティングし、試料と（例えば、約18分間）、および標識化HPgV-2ペプチド／タンパク質と、同じ時間またはおよそ同じ時間（例えば、18分間）接触させる。別のタイプのアッセイは、溶液相捕捉である。このようなアッセイにおいて、試料は、タンパク質をタグ付けしたHPgV-2ペプチドまたはタンパク質（例えば、ビオチンタグ、FLAGタグ、HAタグなど）、および標識化HPgV-2ペプチドまたはタンパク質の両方と、親和性分子（例えば、ストレプトアビジンまたはタンパク質タグ抗体）でコーティングした固相の存在下で接触させる。患者抗体が試料中に存在すれば、タグ付けしたペプチドまたはタンパク質、および標識化HPgV-2ペプチドまたはタンパク質は、複合体中の患者抗体に結合することができ、結合された患者抗体は固相支持体に関連するタンパク質タグによって捕捉され得る。これらのアッセイフォーマット全てにおいて、固相は、患者抗体および固相と関連する標識化HPgV-2からのシグナルを誘発するように、さらに処理加工される。

#### 【0136】

特定の実施形態において、本明細書に記載する抗原および抗体は、HPgV-2に感染していたことが疑われる試験試料中に見出される複数のHPgV-2の構成成分を検出するようにデザインされた組合せイムノアッセイにおける、免疫診断試薬としての使用が企図される。免疫診断試薬は、ペプチドおよび患者抗体の両方を検出する組合せアッセイに

において使用され得る。捕捉の目的で、免疫診断試薬が構成される抗原および／または抗体は、例えば、微粒子（例えば、磁性粒子）、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、骨格分子、フィルム、濾紙、ディスクまたはチップのような固体支持体上にコーティングされてもよい。これに関して、免疫診断試薬が抗原の組合せ（例えば、異なるH P g V-2タンパク質に対する、または同じH P g V-2タンパク質の異なるフラグメントに対する）を含む場合、抗原は同じ固体支持体上に同時コーティングされていてもよく、または別々の固体支持体上に同時コーティングされていてもよい。同様に、免疫診断試薬が、試験試料から1つ以上の抗原を捕捉するのに使用される1つ以上の抗体を含む場合、このような抗体は、同じ固体支持体上に同時コーティングされていてもよく、または別々の固体支持体上に同時コーティングされていてもよい。

10

#### 【0137】

とりわけ、免疫診断試薬は、検出可能な標識で標識されている、または捕捉もしくは検出を可能にする特定のパートナーで標識されている、抗原および抗体を含むことができる。例えば、標識は、フルオロフォア、放射性部分、酵素、ビオチン／アビジン標識、発色団、化学発光標識などのような検出可能な標識であってよい。なおさらに、本発明は、本明細書に記載する免疫診断試薬、およびこのような試料中の2つまたはそれを超えるH P g V-2タンパク質および／または抗H P g V-2抗体の存在を検出することによって試験試料中のH P g V-2の存在を決定するためのイムノアッセイにおける、免疫診断試薬を使用するための指示書を含む、H P g V-2診断キットの調製を企図するものである。例えば、キットは、イムノアッセイによって、試験試料を抗H P g V-2抗体（例えば、試験試料中の抗コア抗体）に対してアッセイするための指示書を含むことができる。ある特定の実施形態は、試験試料をアッセイするのに化学発光微粒子イムノアッセイを使用するが、本発明のイムノアッセイにおいて使用される抗原および抗体は、試験試料中のH P g V-2の存在を決定するための当業者には公知のあらゆる他のイムノアッセイのフォーマットにおいて使用され得ることを理解されたい。指示書は、紙の形態でも、またはディスク、CD、DVDなどのようなコンピュータで読み取ることができる形態でもよい。代替的に、または付加的に、キットは、キャリブレーターもしくは対照、例えば、精製され、任意選択的に凍結乾燥された抗H P g V-2抗体もしくは抗原、ならびに／またはアッセイを行うための少なくとも1つの容器（例えば、イムノアッセイの1つ以上の捕捉構成成分（抗原および／もしくは抗体）ですでにコーティングされているチューブ、マイクロタイタープレートもしくはストリップ）、ならびに／またはアッセイバッファーもしくは洗浄バッファーのようなバッファーを含むことができ、このうちいずれか1つは、濃縮溶液、検出可能な標識（例えば、酵素標識）のための基質溶液、または停止溶液として提供され得る。ある特定の実施形態において、キットは、アッセイを行うのに必要である、全ての構成成分、すなわち、試薬、標準、バッファー、希釈液などを含む。具体的な実施形態において、イムノアッセイがキャプチャーオンザフライ（capture-on-the-fly）タイプの組合せイムノアッセイとして行われ得るように、構成成分はキットにおいて個々に提示され、このタイプの組合せイムノアッセイでは、固体支持体が捕捉部分（例えば、33-ビオチン化抗原またはビオチン化抗体）の結合を可能にする薬剤でコーティングされており、キットは1つの容器中に個々の捕捉抗原および検出抗原の対、ならびにビオチン化捕捉抗体を各々さらに含み、第2の容器が検出抗体のコンジュゲートを提供する。アッセイを行うための指示書は、抗H P g V-2抗体を定量する目的で、検量線または参照基準を産生するための指示書も含むことができる。

20

30

40

#### 【0138】

抗I g G抗体および抗I g M抗体のような、キット中に提供されるあらゆる抗体は、フルオロフォア、放射性部分、酵素、ビオチン／アビジン標識、発色団、化学発光標識などのような検出可能な標識も組み入れることができ、またはキットは、抗体を標識するための試薬、もしくは抗体を検出するための試薬（例えば、検出抗体）、および／もしくは分析物を標識するための試薬、もしくは分析物を検出するための試薬を含むことができる。抗体、キャリブレーターおよび／または対照は、別々の容器中に提供されても、または好

50

適なアッセイフォーマット中に、例えばマイクロタイタープレート中に予め分配されてもよい。ある特定のイムノアッセイでは、2つの容器が提供される。第1の容器中に、少なくとも第1、第2および第3の対の抗原が提供され、各対における第1の抗原は、ビオチン化されている所与のH P g V-2タンパク質からの捕捉抗原であり、各対における第2の抗原は、第1の抗原と同じタンパク質からの検出抗原であるが、検出可能な標識（例えば、アクリジン化されている）、ならびに試験試料から1つ以上のH P g V-2抗原を検出するためにデザインされた1つ以上のビオチン化抗体で標識されており；第2の容器中に、第1の容器からのビオチン化抗体によって捕捉される抗原を検出するためのコンジュゲーションパートナーを形成する抗体が提供される。第1の容器中に複数のビオチン化抗体が存在する場合、コンジュゲーションパートナーを形成する複数の抗体が、単一の容器中、または各々の異なる抗原を検出するコンジュゲート抗体のための個々の容器中に存在してもよいことが企図される。

10

#### 【0139】

任意選択的に、キットは、品質管理の構成成分（例えば、感受性パネル、キャリブレーターおよび陽性対照）を含む。品質管理の試薬の調製は、当技術分野では周知であり、様々な免疫診断生成物用の挿入シート上に記載されている。感受性パネルのメンバーは、アッセイ性能の特徴を確立するために任意選択的に使用され、さらに任意選択的にイムノアッセイキットの試薬の一体性、およびアッセイの標準化の有用な指標である。

#### 【0140】

キットは、バッファー、塩、酵素、酵素の補助因子、基質、検出試薬などのような、診断アッセイを行い、または品質管理の評価を促進するのに必要とされる他の試薬も、任意選択的に含むことができる。試験試料を単離および／または処理するための、バッファーおよび溶液のような他の構成成分（例えば、前処理試薬）もキットに含まれていてよい。キットは、1つ以上の他の対照を付加的に含むことができる。キットの1つ以上の構成成分は凍結乾燥されていてよく、この場合、キットは凍結乾燥された構成成分を再構成するのに適する試薬をさらに含むことができる。

20

#### 【0141】

キットの様々な構成成分は、適宜、適切な容器、例えばマイクロタイタープレートにおいて任意選択的に提供される。キットは、試料を保持または貯蔵するための容器（例えば、試料用の容器またはカートリッジ）をさらに含むことができる。必要に応じて、キットは、反応容器、混合容器、および試薬または試験試料の調製を促進する他の構成成分も任意選択的に含むことができる。キットは、シリンジ、ピペット、ピンセット、計測スプーンなどのような、試験試料を得るのを助けるための1つ以上の器具も含むことができる。

30

#### 【0142】

好ましい実施形態において、検出可能な標識は少なくとも1つのアクリジニウム化合物である。このような実施形態において、キットは、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキシレート、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステル、またはこれらのあらゆる組合せを含むことができる。検出可能な標識が少なくとも1つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、バッファー、溶液、および／または少なくとも1つの塩基溶液のような、過酸化水素の供給源も含むことができる。免疫診断試薬において、抗体を検出するための抗原は検出可能に標識されていてよく、このような試薬と一緒に使用するためのキットにおいて提供されるあらゆる抗体は、検出可能に標識されていてよいことを理解されたい。所望により、キットは、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、骨格分子、フィルム、濾紙、ディスクまたはチップのような固体支持体相を含むことができる。

40

#### 【0143】

本開示は、試験試料中の抗H P g V-2抗体およびH P g V-2抗原の存在、量または濃度を決定するための、イムノアッセイおよび組合せイムノアッセイ方法を提供する。当技術分野では公知のあらゆる適切なアッセイが、このような方法において使用され得る。このようなアッセイの例は、それだけには限定されないが、サンドイッチイムノアッセイ

50

のようなイムノアッセイ（例えば、放射性同位元素の検出（ラジオイムノアッセイ（RIA））を含めた、モノクローナルポリクローナルサンドイッチイムノアッセイ、および酵素検出（エンザイムイムノアッセイ（EIA）または酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）（例えば、Quantikine ELISAアッセイ、R&D Systems、Minneapolis、Minn.））、競合的阻害イムノアッセイ（例えば、フォワードおよびリバーズ）、蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）、酵素増幅免疫測定法（enzyme multiplied immunoassay technique）（EMIT）、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）、および均質な化学発光アッセイなど）を含む。

#### 【0144】

イムノアッセイの具体的な実施形態において、組換え抗原（例えば、コアNS3およびNS4抗原）は、捕捉試薬として（例えば、抗原のアミノ末端もしくはカルボキシ末端がビオチンタグを含むこのような抗原を使用することにより）、または抗原がアクリジニウムで直接的もしくは間接的にいずれかで標識されている検出（コンジュゲート）試薬として使用され得る。間接的な標識化は、SMCCタイプのリンカーによってタンパク質内の不對システイン残基の遊離のチオールに共有結合性にカップリングしているアクリジン化BSAの使用を用いてもよい。このような間接的な標識化を促進するために、本発明のイムノアッセイにおいて使用されるある種の抗原が、C末端に付加的なシステイン残基を含むように、容易にさらに修飾されてもよい。

#### 【0145】

イムノアッセイは、1ステップまたは2ステップのフォーマットにおいて行われるのが典型的である。1ステップアッセイにおいて溶液中に形成される免疫複合体を捕捉するための固相試薬は、抗ビオチンモノクローナル抗体、ビオチン化部分（試験試料中の、HPgV-2抗体を捕捉するためのビオチン化抗体、またはHPgV-2タンパク質／抗原を捕捉するためのビオチン化抗体である）を捕捉するためのストレプトアビジンまたはニュートラアビジンを含む。

#### 【0146】

SELDIベースのイムノアッセイにおいて、抗HPgV-2抗体またはHPgV-2抗原に特異的に結合する捕捉試薬が、活性化前のタンパク質チップアレイのような質量分析プローブの表面に付着している。抗HPgV-2抗体または抗原が、次いで、バイオチップ上に特異的に捕捉され、捕捉された部分が質量分析法によって検出される。代替的に、抗HPgV-2抗体が、捕捉試薬から溶出され、伝統的なMALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化法）によって、またはSELOIによって検出されてもよい。化学発光微粒子イムノアッセイ、特にARCHITECT（登録商標）自動化分析計（Abbott Laboratories、Abbott Park）を使用するものは、複数の抗原の組合せ（例えば、2つまたはそれを超えるHPgV-2タンパク質からの抗原）および複数の抗HPgV-2抗体が容易に使用され得るイムノアッセイの一例である。受身血球凝集反応アッセイのような血球凝集アッセイも使用され得る。血球凝集アッセイでは、血球凝集またはクランピングによって、抗原抗体反応が検出される。受身血球凝集反応アッセイでは、赤血球が抗原でコーティングされ、コーティングされた赤血球が血球凝集アッセイにおいて使用される。HPgV-2中和抗体の測定の第2の実施形態は、HPgV-2での感染が疑われる細胞系を使用し、1つ以上の方法（例えば、免疫蛍光、プラークアッセイ法など）によって阻害を測定する、伝統的なウイルス中和試験である（参照により本明細書に組み込む、Tempertonら、Virology、10:266-213、2013を参照されたい。）。

#### 【0147】

例えば、免疫診断試薬が複数の抗原を含む場合、および／または抗HPgV-2抗体イムノアッセイキットにおいて、尿、血液、血清および血漿、ならびに他の体液を採取し、取り扱い、処理加工するための当技術分野では周知の方法が、本開示の実践において使用される。試験試料は、抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク

10

20

30

40

50

質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのような目的のポリペプチドに加えて、さらなる部分を含むことができる。例えば、試料は、対象から得た全血試料であってよい。試験試料、特に全血が、本明細書に記載するイムノアッセイの前に、例えば前処理試薬で、処理されるのが必要であり、または望ましいことがある。前処理が必要でない場合でも（例えば、殆どの尿試料）、前処理は、単に便宜上（例えば、商業上のプラットホーム上のレジメンの一部として）任意選択的に行われ得る。

#### 【0148】

前処理試薬は、本発明のイムノアッセイおよびキットで使用するのに好適なあらゆる試薬であってよい。前処理は：（a）1つ以上の溶媒（例えば、メタノールおよびエチレングリコール）ならびに塩、（b）1つ以上の溶媒、塩および洗剤、（c）洗剤、または（d）洗剤および塩を任意選択的に含む。前処理試薬は当技術分野では公知であり、このような前処理は、例えば、文献に記載されている通り（例えば、Yat s c o f f ら、- 3 7 - A b b o t t T D x M o n o c l o n a l A n t i b o d y A s s a y E v a l u a t e d f o r M e a s u r i n g C y c l o s p o r i n e i n W h o l e B l o o d 、 C l i n . C h e m . 、 3 6 : 1 9 6 9 - 1 9 7 3 ( 1 9 9 0 ) 、 および W a l l e m a c q ら、 E v a l u a t i o n o f t h e N e w A x S Y M C y c l o s p o r i n e A s s a y : C o m p a r i s o n w i t h T D x M o n o c l o n a l W h o l e B l o o d a n d E M I T C y c l o s p o r i n e A s s a y s 、 C l i n . C h e m . 、 4 5 : 4 3 2 - 4 3 5 ( 1 9 9 9 ) を参照されたい。）、ならびに／または市販されている、A b b o t t T O x 、 A x S Y M （登録商標）および A R C H I T E C T （登録商標）分析計（A b b o t t L a b o r a t o r i e s 、 A b b o t t P a r k 、 I L ）上のアッセイに使用するために使用され得る。加えて、前処理は、A b b o t t の、米国特許第 5 , 1 3 5 , 8 7 5 号、欧州特許公開第 0 4 7 1 2 9 3 号、2 0 0 6 年 1 2 月 2 9 日出願の米国仮特許出願第 6 0 / 8 7 8 , 0 1 7 号、および米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 0 2 0 4 0 1 号（前処理に関する教示に対して、その全体を参照により本明細書に組み込む）に記載されている通りに行われてもよい。前処理試薬は、不均質な薬剤でも、または均質な薬剤でもよい。

#### 【0149】

不均質な前処理試薬を使用すると、前処理試薬は、分析物の結合タンパク質（例えば、試料中に存在する、抗 H P g V - 2 抗体に結合することができるタンパク質、または抗 H P g V - 2 抗体形態に結合することができる抗原）を沈殿させる。このような前処理ステップは、沈殿した分析物の結合タンパク質から、前処理剤を試料に添加することによって形成された混合物の上清を分離することによって、あらゆる分析物の結合タンパク質を除去するステップを含む。このようなアッセイでは、あらゆる結合タンパク質が非存在である混合物の上清がアッセイにおいて使用され、抗体捕捉ステップに直接進行する。

#### 【0150】

均質な前処理試薬を使用すると、このような分離ステップは存在しない。試験試料および前処理試薬の混合物全体を、抗 H P g V - 2 抗体に特異的な標識された結合パートナー（すなわち、抗原）または H P g V - 2 抗原に特異的な標識された結合パートナー（すなわち、抗体）と接触させる。このようなアッセイに使用される前処理試薬は、第 1 の特異的な結合パートナーによる捕捉の前または間いずれかに、前処理した試験試料の混合物中で希釈されるのが典型的である。このような希釈に関わらず、ある量の前処理試薬（例えば、5 M メタノールおよび／または 0 . 6 メチレングリコール）が、捕捉の間に試験試料混合物中に依然として存在（または残存）する。

#### 【0151】

不均質なフォーマットでは、試験試料が対象から得られた後、第 1 の混合物が調製される。混合物は、抗 H P g V - 2 抗体および第 1 の特異的な捕捉結合パートナーに対して評価されている試験試料を含み、試験試料中に含まれる第 1 の特異的な捕捉結合パートナーおよびあらゆる抗 H P g V - 2 抗体が、第 1 の特異的な捕捉結合パートナー-抗 H P g V - 2 抗体複合体を形成する。第 1 の特異的な捕捉結合パートナーは、コア抗原、N S 3 抗

原もしくはN S 3、または他のH P g V－2タンパク質のあらゆるものであってよい。同様に、ある特定の実施形態において、本発明の組合せアッセイにおいて、混合物は第2および第3の特異的な捕捉結合パートナーも含み、これら第2および第3の特異的な捕捉結合パートナーは、試験試料中に存在する抗H P g V－2抗体と、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナーー抗H P g V－2抗体複合体を形成する。

#### 【0152】

加えて、組合せイムノアッセイは、試験試料中に存在する第4の抗原と抗H P g V－2抗体－4の特異的な捕捉結合パートナー複合体を形成するために、試験試料中に見出される第4の特異的な捕捉結合パートナー（すなわち、試験試料中に見出される抗原またはH P g V－2タンパク質）と特異的な複合体を形成する、少なくとも1つの抗H P g V－2捕捉抗体を含むことができる。

10

#### 【0153】

組合せイムノアッセイでは、混合物を形成するために試験試料および様々な特異的な結合パートナーが添加される順序は決定的ではない。一部の実施形態において、第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナー（すなわち、抗原）ならびに抗H P g V－2捕捉抗体が、固相上に固定化される。さらに他の実施形態において、これら4つの構成成分のどれも固定化されないが、代わりに固相上の捕捉をもたらすために、全て同時に試験試料に添加される。組合せイムノアッセイにおいて使用される固相は、それだけには限定されないが、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、骨格分子、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップのような、当技術分野では公知のあらゆる固相であってよい。

20

#### 【0154】

第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナーと試験試料中に見出されるこれらそれぞれの抗H P g V－2抗体と、ならびに第1の抗H P g V－2捕捉抗体（例えば、抗コア）と試験試料中に見出されるこれらのそれぞれのH P g V－2抗原またはH P g V－2タンパク質との間に免疫複合体が形成された後、あらゆる非結合の抗H P g V－2抗体またはH P g V－2抗原／タンパク質が、当技術分野では公知のあらゆる技術を使用して複合体から除去される。例えば、非結合の抗H P g V－2抗体または抗原が、洗浄によって除去されてもよい。しかし、試験試料中に存在する全ての抗H P g V－2抗体および抗原が、第1、第2および第3の特異的な結合パートナーおよび抗H P g V－2捕捉抗体によってそれぞれ結合されるように、第1、第2および第3の特異的な結合パートナーおよび抗H P g V－2抗体が、試験試料中にそれぞれ存在する過剰のあらゆる抗H P g V－2抗体および抗原中に存在するのが望ましい。

30

#### 【0155】

あらゆる非結合の抗H P g V－2抗体および抗原が除去された後、第1の特異的な検出結合パートナーを混合物に添加して、第1の特異的な捕捉結合パートナーー抗H P g V－2抗体－第1の特異的な検出結合パートナー複合体を形成することによって、検出が実現される。第1の特異的な検出結合パートナーが、抗I g G抗体および抗I g M抗体の組合せであるのが好ましい。さらに、第1の特異的な検出結合パートナーが、検出可能な標識で標識され、または検出可能な標識を含むのも好ましい。具体的な実施形態において、第1の特異的な検出パートナーは、代わりに、または加えて、捕捉された抗体に結合する抗原であってもよい。同様に、本発明の組合せアッセイにおいて、混合物は、第2および第3の特異的な検出結合パートナーも含み、これら第2および第3の特異的な検出結合パートナーは、試験試料中に存在する捕捉された抗H P g V－2抗体と、第2または第3の特異的な捕捉結合パートナーー抗H P g V－2抗体－第2または第3の特異的な検出結合パートナー複合体を形成する。繰り返すと、第2および第3の特異的な検出結合パートナーは、抗I g G抗体および抗I g M抗体の組合せであってよい。具体的な実施形態において、第2および第3の特異的な検出結合パートナーは、代わりに、または加えて、捕捉された抗体に結合する抗原であってよい。さらに、第2および第3の特異的な検出結合パートナーは、抗I g MまたはI g G抗体または抗原であり、検出可能な標識で標識され、また

40

50

は検出可能な標識を含む。加えて、組合せイムノアッセイは、試験試料から捕捉された第4の抗原と、抗HPgV-2抗体-第4の特異的な結合パートナー-抗HPgV-2コンジュゲート抗体複合体を形成するために、試験試料中に見出される捕捉された抗原またはHPgV-2タンパク質と特異的な複合体を形成する、少なくとも1つの抗HPgV-2コンジュゲート抗体を含むことができる。

#### 【0156】

当技術分野では公知である通り、あらゆる適切な検出可能な標識が、あらゆる1つ以上の検出可能な標識として使用され得る。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>pおよび<sup>33</sup>pのような）、酵素標識（セイヨウワサビのペルオキシダーゼ、アルカリ性ペルオキシダーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼなどのような）、化学発光標識（アクリジニウムエステル、チオエステルまたはスルホンアミド；ルミノール、イソルミノール、フェナントリジニウムエステルなどのような）、蛍光標識（フルオレセイン（例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5（6）-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど）のような）、ローダミン、フィコビリタンパク質、R-フィコエリスリン、量子ドット（例えば、硫酸亜鉛でキャッピングしたセレン化カドミウム）、温度測定標識、またはイムノポリメラーゼ連鎖反応標識であってよい。標識の導入、標識手順、および標識の検出は、PolakおよびVan Noorden、Introduction to Immunocytochemistry、第2版、Springer Verlag、N. Y.（1997）、およびMolecular Probes、Inc.、Eugene、Oregonによって発行されたハンドブックおよびカタログが合わさったものである、Haugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals（1996）に見出される。蛍光標識は、FPIA（例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許第5,593,896号、第5,573,904号、第5,496,925号、第5,359,093号および第5,352,803号を参照されたい。）において使用され得る。アクリジニウム化合物は、均質な化学発光アッセイにおいて検出可能な標識として使用され得る（例えば、Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、16:1324-1328（2006）；Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、4:2313-2317（2004）；Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、14:39173921（2004）；およびAdamczykら、Org. Lett.、5:3779-3782（2003）を参照されたい。）。

#### 【0157】

例示的なアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキサミドである。アクリジニウム-9-カルボキサミドを調製するための方法は、Mattingly、J. Biolumin. Chemilumin. 6:107-114（1991）；Adamczykら、J. Org. Chem.、63:56365639（1998）；Adamczykら、Tetrahedron 55:10899-10914（1999）；Adamczykら、Org. Lett. 1:779-781（1999）；Adamczykら、Bioconjugate Chem.、11:714-724（2000）；Mattinglyら、Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications；Dyke, K. V. 編集；CRC Press：Boca Raton、pp. 77-105（2002）；Adamczykら、Org. Lett.、5:37793782（2003）；および米国特許第5,468,646号、第5,543,524号および第5,783,699号（各々その全体を参照により、これらに関するその教示に対して本明細書に組み込む）に記載されている。

#### 【0158】

別の例示的なアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルである。式 I I のアクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルの一例は、10-メチル-9-(フェノキシカルボニル)アクリジニウムフルオロスルホネート (Cayman Chemical, Ann Arbor, Mich. から入手できる) である。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルを調製するための方法は、McC apraら、Photochem. Photobiol., 4:1111-21 (1965); Razaviら、Luminescence, 15:245-249 (2000); Razaviら、Luminescence, 15:239-244 (2000); および米国特許第5, 241, 070号 (各々その全体を参照により、これらに関するその教示に対して本明細書に組み込む) に記載されている。このようなアクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルは、シグナルの強度および/またはシグナルの迅速性の点から、少なくとも1つのオキシダーゼによって、分析物の酸化において生成される過酸化水素に対する効率的な化学発光指示薬である。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルに対する化学発光放射の経過は速やかに、すなわち1秒未満に完了されるが、アクリジニウム-9-カルボキサミドの化学発光放射は2秒を超えて延長する。しかし、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルは、タンパク質の存在下でその化学発光の性質を失う。したがって、その使用は、シグナル産生および検出の間にタンパク質が非存在であることを必要とする。試料中のタンパク質を分離または除去するための方法は、当業者には周知であり、それだけには限定されないが、限外濾過、抽出、沈殿、透析、クロマトグラフィーおよび/または消化を含む (例えば、Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies, Elsevier (2003) を参照されたい。)。試験試料から除去または分離されるタンパク質の量は、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%または約95%であってよい。さらに、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルおよびその使用に関する詳細は、2007年4月9日出願の米国特許出願第11/697, 835号、および2008年10月9日公開の、米国特許出願公開第2008/0248493号に記載されている。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルは、脱気した無水N, Nジメチルホルムアミド (DMF) または塩化ナトリウム水溶液のようなあらゆる適切な溶媒中に溶解され得る。

#### 【0159】

化学発光アッセイは、例えば、Adamczykら、Anal. Chim. Acta, 579 (1): 61-67 (2006) に記載されている方法に従って行われてもよい。あらゆる適切なアッセイフォーマットが使用され得るが、マイクロプレート化学発光計 (Mithras LB940, Berthold Technologies U. S. A., LLC, Oak Ridge, Tenn.) は小体積の複数の試料の迅速なアッセイを可能にする。化学発光計は、96ウェル黒色ポリスチレン製マイクロプレート (Coster #3792) を使用して、複数の試薬注入器が装着され得る。各試料が別々のウェル中に添加され、引き続き、使用するアッセイのタイプによって決定される他の試薬が同時に/逐次に添加されてよい。酸性化などによって、アクリジニウムアリールエステルを使用した中性または塩基性溶液中の疑似塩基の形成が回避されるのが望ましい。次いで、化学発光応答が、ウェルごとに記録される。これに関して、化学発光応答を記録するための時間は、部分的に、試薬の添加の間の遅延、および使用される特定のアクリジニウムに依存する。

#### 【0160】

上記に記載したアクリジニウム化合物の添加前、添加と同時に、または添加後、過酸化水素が、混合物中インサイチューで産生されても、または提供されても、または混合物に供給されてもよい。過酸化水素は、当業者であれば明らかであるような数々の方法において、インサイチューで産生され得る。代替的に、過酸化水素の供給源が、混合物に単に添

10

20

30

40

50

加されてもよい。例えば、過酸化水素の供給源は、過酸化水素を含むことが分かっている、1つ以上のバッファーまたは他の溶液であってよい。これに関して、過酸化水素の溶液が単に添加されてもよい。

#### 【0161】

少なくとも1つの塩基性溶液を試料に同時に、または逐次的に添加すると、抗H P g V-2抗体（捕捉が抗原である場合）または抗原（捕捉が抗体である場合）の存在を示す、検出可能な標識、すなわち化学発光シグナルが産生される。ある特定の実施形態において、塩基性溶液は少なくとも1つの塩基を含み、pHは10に等しくまたはそれを超え、好ましくは12に等しくまたはそれを超える。塩基性溶液の例は、それだけには限定されないが、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよび重炭酸カルシウムを含む。試料に添加する塩基性溶液の量は、塩基性溶液の濃度に依存する。使用される塩基性溶液の濃度に基づいて、当業者であれば、試料に添加する塩基性溶液の量を容易に決定することができる。

#### 【0162】

産生される化学発光シグナルは、当業者には公知のルーチン技術を使用して検出され得る。産生されるシグナルの強度に基づいて、試料中の抗H P g V-2抗体および／または抗原の量が定量され得る。具体的に、試料中の抗H P g V-2抗体および／または抗原の量は、産生されるシグナルの強度に比例する。存在する抗H P g V-2抗体および／または抗原の量は、産生される光の量を、抗H P g V-2抗体および／または抗原に対する検量線に比べることにより、または参照基準に対して比べることにより、定量され得る。検量線は、既知濃度の抗H P g V-2抗体の段階希釈または溶液を使用して、質量分析法、重量法、および当技術分野では公知の他の技術によって産生され得る。

#### 【0163】

抗H P g V-2抗体および／または抗原のイムノアッセイは、当技術分野では公知のあらゆる適切なフォーマットを使用して行われ得る。ある特定の実施形態において、抗H P g V-2抗体に対して試験される（例えば、含むことが疑われる）試料を、捕捉抗原、ならびに標識化抗I g Gおよび抗I g M抗体のような少なくとも1つの検出抗体（第2の検出抗体または第3の検出抗体であってよい）と、同時または逐次的のいずれかで、あらゆる順序で、接触させてもよい。同様に、抗原の存在に対する試験は、試験試料中の抗原に結合する捕捉された抗体と接触させてもよく、次いで、結合した抗原が検出抗体によって検出されてもよい。

#### 【0164】

例えば、試験試料を、最初に少なくとも1つの捕捉抗原と接触させてもよく、次いで（逐次的に）少なくとも1つの検出抗体と接触させてもよい。代替的に、試験試料を、最初に少なくとも1つの検出抗原と接触させてもよく、次いで（逐次的に）少なくとも1つの捕捉抗体と接触させてもよい。さらに別の代替において、試験試料を、捕捉抗原および検出抗体と同時に接触させてもよい。

#### 【0165】

サンドイッチアッセイのフォーマットにおいて、ある特定の実施形態において、抗H P g V-2抗体（またはそのフラグメント）を含むことが疑われる試料を、第1の捕捉抗原／抗H P g V-2抗体複合体の形成を許す条件下で、少なくとも1つの第1の捕捉抗原と、最初に接触させる。組合せアッセイでは、同じことが繰り返され、または第2、第3もしくはそれを超える捕捉抗原で同時に行われる。1つを超える捕捉抗原が使用される場合、複数の第1の捕捉抗原／抗H P g V-2抗体複合体が形成される。サンドイッチアッセイでは、一又は複数の抗原が、ある特定の実施形態において、少なくとも1つの捕捉抗原が、試験試料中に予想される抗H P g V-2抗体の最大量のモル過剰量において使用される。例えば、バッファー（例えば、微粒子コーティングバッファー）1 mLあたり約5 µgから約1 mgまでの抗原が使用され得る。

#### 【0166】

競合的阻害イムノアッセイは、小型の分析物を測定するのにしばしば使用され、連続的なフォーマットおよび古典的なフォーマットを含む。連続的な競合的阻害イムノアッセイでは、目的の抗体（すなわち、抗H P g V－2抗体）に対する1つ以上の捕捉抗原（すなわち、本明細書に記載する、ポリペプチド、および1対のポリペプチド）が、マイクロタイタープレートのウェル上にコーティングされている。目的の抗体（単数または複数）を含む試料がウェルに添加されると、目的の抗体が一又は複数の捕捉抗原に結合する。洗浄後、既知量の標識化（例えば、ビオチンまたはセイヨウワサビのペルオキシダーゼ（H R P））抗体がウェルに添加される。酵素標識に対する基質が、シグナルを産生するのに必要である。H R Pに適する基質の一例は、3, 3', 5, 5'－テトラメチルベンチジン（T M B）である。洗浄後、標識化抗体によって産生されたシグナルが測定され、試料中の抗体の量に反比例する。古典的な競合的阻害イムノアッセイでは、目的の抗体に対する抗原がマイクロタイタープレートのウェル上にコーティングされている。しかし、連続的な競合的阻害イムノアッセイと異なり、目的の抗体（すなわち、抗H P g V－2抗体）を含む試料および標識化抗体が、同時にウェルに添加される。試料中のあらゆる抗体が、捕捉抗原に対する結合に対して、標識化抗体と競合する。洗浄後、標識された分析物によって産生されたシグナルが測定され、試料中の分析物の量に反比例する。

10

#### 【0167】

任意選択的に、試験試料を少なくとも1つの捕捉抗原（例えば、第1の捕捉抗原）と接触させる前、少なくとも1つの捕捉抗原が固体支持体に結合していてもよく、これが試験試料から第1の抗原／抗H P g V－2抗体複合体の分離を促進する。捕捉抗原が結合している基質は、あらゆる適する固体支持体であってもよく、または試料から捕捉抗原－抗H P g V－2抗体複合体の分離を促進する固相であってもよい。例として、マイクロタイタープレートのようなプレートのウェル、試験管、多孔性ゲル（例えば、シリカゲル、アガロース、デキストランまたはゼラチン）、重合体のフィルム（例えば、ポリアクリルアミド）、ビーズ（例えば、ポリスチレンビーズまたは磁性ビーズ）、一片のフィルター／膜（例えば、ニトロセルロースまたはナイロン）、微粒子（例えば、ラテックス粒子）、磁化できる微粒子（例えば、酸化鉄または酸化クロムのコアを有する微粒子、およびホモまたはヘテロ重合体コーティングおよび半径約1－10ミクロン）を含む。基質は、抗原に結合するのに適する表面親和性、および検出抗体によるアクセスを許すのに十分な多孔性を有する適切な多孔性材料を含むことができる。微孔性の材料が一般的に好ましいが、水和状態のゼラチン状の材料が使用されてもよい。このような多孔性基質は、厚さ約0.01から約0.5mm、または約0.1mmを有するシートの形態であってもよい。孔サイズは大幅に変動し得るが、孔サイズが約0.025から約15ミクロンまで、または約0.15から約15ミクロンまでであるのが好ましい。このような基質の表面は、抗体の基質に対する共有結合性の連結を引き起こす化学的プロセスによって活性化され得る。一般的に、抗原の基質に対する疎水性力を介した吸着による不可逆的結合が生じ、代替的に、このような結合が、抗H P g V－2抗体に結合する抗原の能力を妨害しないのであれば、化学的カップリング剤または他の手段が、抗原の基質に対する共有結合に使用され得る。

20

30

#### 【0168】

代替的に、試験試料からの抗H P g V－2抗体が、抗原で予めコーティングされている微粒子と結合していてもよい。所望により、その各々が抗H P g V－2抗体によって結合され得る、本明細書に記載される一対のポリペプチドのような1つ以上の捕捉試薬が、物理的な、またはアドレス指定することができる位置（例えば、バイオチップの立体配置におけるような）と無関係に固相に付着してよい（－46－例えば、米国特許第6, 225, 047号、国際特許出願公開第WO99/51773号；米国特許第6, 329, 209号；国際特許出願公開第WO00/56934号および米国特許第5, 242, 828号を参照されたい。）。捕捉試薬が、固体支持体として質量分析法のプロープに付着している場合、プロープに結合している抗H P g V－2抗体の量は、レーザー脱離イオン化質量分析によって検出され得る。代替的に、単一のカラムが、様々なビーズで充填されていてもよく、このビーズは1つ以上の捕捉試薬で誘導体化されており、それによって単

40

50

一の場所において抗H P g V－2抗体を捕捉する（誘導体化した抗体、ビーズベースの技術、例えば、L u m i n e x（A u s t i n、T e x.）のx M A P技術を参照されたい。）。

#### 【0169】

抗H P g V－2抗体に対してアッセイされる試験試料を、少なくとも1つの捕捉抗原（例えば、第1の捕捉抗原）と接触させた後、第1の抗原（または複数の抗原）－抗H P g V－2抗体（またはそのフラグメント）複合体の形成を可能にするために、混合物がインキュベートされる。インキュベートは、p H約4. 5から約10. 0まで、温度約20℃から約45℃まで、および少なくとも約1分から約18時間まで、または約1分から約24分まで、または約4分から約18分までの期間行われ得る。本明細書に記載されるイム

10

#### 【0170】

（第1のまたは複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体複合体の形成後、または形成と同時に、複合体を、次いで、少なくとも1つの検出抗体と接触させる（（第1のまたは複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／第1の抗体検出複合体の形成を可能にする条件下）。少なくとも1つの検出抗体は、イムノアッセイにおいて使用される第2、第3、第4などの抗体であってよい。捕捉抗原／抗H P g V－2抗体複合体を1つを超える検出抗体と接触させる場合、（第1または複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／（複数の）検出抗体複合体が形成される。捕捉抗原（例えば、第1の捕捉抗体）同様、少なくとも第2の（および後続の）検出抗体を捕捉抗原／抗H P g V－2抗体複合体と接触させる場合、上記に記載したものと同様の条件下のインキュベーション時間が、（第1または複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／（第2または複数の）検出抗体複合体の形成に必要とされる。少なくとも1つの検出抗体が検出可能な標識を含むのが好ましい。検出可能な標識は、（第1または複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／（第2または複数の）検出抗体複合体の形成の前に、形成と同時に、または形成後に、少なくとも1つの検出抗体（例えば、第2の検出抗体）に結合され得る。当技術分野では公知のあらゆる検出可能な標識が使用され得る（P o l a kおよびV a n N o o r d e n（1997）、ならびにH a u g l a n d（1996））を含めた、上記の考察を参照されたい。）。

20

30

#### 【0171】

検出可能な標識は、直接、またはカップリング剤を介してのいずれかで、抗体（または検出可能な標識を含み得る抗原）に結合してよい。使用され得るカップリング剤の一例は、E D A C（1－エチル－3－（3－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩）であり、これはS i g m a－A l d r i c h、S t. L o u i s、M oから市販されている。使用され得る他のカップリング剤は、当技術分野では公知である。検出可能な標識を抗体に結合するための方法は当技術分野では公知である。加えて、C P S P－アクリジニウムエステル（すなわち、9－[N－トシル－N－（3－カルボキシプロピル）]－10－（3－スルホプロピル）アクリジニウムカルボキサミド）またはS P S P－アクリジニウムエステル（すなわち、N10－（3－スルホプロピル）－N－（3－スルホプロピル）－アクリジニウム－9カルボキサミド）のような、抗体に対する検出可能な標識のカップリングを促進する末端基をすでに含んでいる、多くの検出可能な標識が、購入されても、または合成されてもよい。

40

#### 【0172】

（第1または複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／（第2または複数の）検出抗体複合体は、標識の定量前に試験試料の残部から分離され得るが、必ず分離されなくてもよい。例えば、少なくとも1つの捕捉抗原（例えば、第1の捕捉抗原）が、ウェルまたはビーズのような固体支持体に結合している場合、分離は、（試験試料の）液体を固体支持体との接触から除去することによって達成され得る。代替的に、少なくとも第1の捕捉抗原が固体支持体に結合している場合、これは、抗H P g V－2抗体含有試料および少なくと

50

も1つの第2の検出抗体（または標識化検出抗原）と同時に接触させて、第1の（複数の）抗原／抗H P g V－2抗体／第2の（複数の）抗体（および／または標識化検出抗原）複合体を形成し得、引き続き液体（試験試料）を固体支持体との接触から除去する。少なくとも1つの第1の捕捉抗原が固体支持体に結合していなければ、（第1または複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／（第2または複数の）検出抗体（および／または－48－捕捉された抗体に対する検出抗原）複合体は、標識の量を定量するために試験試料から除去される必要がない。

#### 【0173】

標識化捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／検出抗原（および／または検出抗体）複合体（例えば、任意選択的にやはり第2の検出抗体と一緒に、第1の捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／第1の検出抗原複合体）が形成された後、複合体中の標識の量が、当技術分野では公知の技術を使用して定量される。例えば、酵素標識が使用される場合、標識された複合体は、色の発色のような定量可能な反応をもたらす標識に対する基質と反応する。標識が放射性標識であれば、標識はシンチレーションカウンターを使用して定量される。標識が蛍光標識であれば、標識は、標識を1つの色（「励起波長」として知られる）の光で刺激し、刺激に応答して標識によって放射される別の色（「放射波長」として知られる）を検出することによって定量される。標識が化学発光標識であれば、標識は、視覚的に、またはルミノメーター、エックス線フィルム、高速度写真フィルム、CCOカメラなどを使用することによりいずれかで、放射される光を検出することによって定量される。複合体中の標識の量が定量された後、試験試料中の抗H P g V－2抗体または抗原の濃度は、既知濃度の抗H P g V－2抗体または抗原の段階希釈を使用して産生された検量線の使用によって決定される。抗H P g V－2抗体またはH P g V－2抗原の段階希釈を使用する以外に、検量線は、重量法により、質量分析法により、および当技術分野では公知の他の技術により産生されてよい。

#### 【0174】

ARCHITECT（登録商標）分析計を使用する化学発光微粒子アッセイでは、コンジュゲート希釈液のpHは約6.0±0.2であってよく、微粒子コーティングバッファは室温（すなわち、約17から約27℃）に維持されなければならない、微粒子コーティングバッファのpHは約6.5±0.2でなければならない、微粒子希釈液のpHは約6.5±0.2でなければならない。固体は、約0.15%未満、約0.14%未満、約0.13%未満、約0.12%未満または約0.11%未満のような、約0.10%のような、約0.2%未満が好ましい。

#### 【0175】

FPIAは、競合的結合イムノアッセイの原理に基づく。蛍光標識された化合物は、直線偏光によって励起されると、その回転率に反比例する偏光度を有する蛍光を放射する。フルオロフォアは、光が吸収される時間と光が放射される時間との間は回転することが妨げられるため、蛍光標識されたトレーサー抗体複合体が直線偏光によって励起される場合、放射される光は高度に偏光されているままである。「遊離の」トレーサー化合物（すなわち、抗体に結合していない化合物）が直線偏光によって励起される場合、その回転は、競合的結合イムノアッセイにおいて生成される、対応するトレーサー抗体コンジュゲートよりずっと速い。FPIAは特別な取扱いおよび処分を必要とする放射性物質が存在しない限り、RIAより有利である。加えて、FPIAは、容易に、速やかに行われ得る、均質なアッセイである。

#### 【0176】

ある特定の実施形態において、本開示は、試験試料中の抗H P g V－2抗体または抗原の存在、量または濃度を決定する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、試験試料を抗H P g V－2抗体または抗原に対して、（i）H P g V－2抗原および少なくとも1つの検出可能な標識を含む、少なくとも単離され、または精製されたポリペプチドを含む免疫診断試薬を使用するアッセイ、ならびに試験試料中の抗H P g V－2抗体の存在、量または濃度を直接的または間接的に示す検出可能な標識によって産生されたシグナ

ルを、対照またはキャリブレーター中の抗H P g V－2抗体の存在、量または濃度を直接的または間接的に示す產生されたシグナルに比較するアッセイによってアッセイするステップを含み、対照またはキャリブレーターは任意選択的に一連のキャリブレーターの一部であり、一連のキャリブレーターにおいて、各キャリブレーターは、一連の他のキャリブレーターと、抗H P g V－2抗体の濃度が異なる。方法は、以下のステップを含むことができる：（i）試験試料中に存在し得るH P g V－2抗体と、第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナー／抗H P g V－2抗体複合体を形成させるために、試験試料を、1つ以上の組換えH P g V－2抗原を含む免疫診断試薬と接触させるステップ、（i i）第1の特異的な結合パートナー／第1、第2および第3それぞれの抗H P g V－2抗体／第2の特異的な結合パートナー複合体を形成させるために、第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナー／第1、第2および第3の抗H P g V－2抗体複合体を、少なくとも1つの検出可能に標識されている、抗H P g V－2抗体（例えば、本明細書に記載する抗I g G抗体および抗I g M抗体またはポリペプチド）に対する第2の特異的な結合パートナーと接触させるステップ、ならびに（i i i）（i i）において形成された第1の特異的な結合パートナー／抗H P g V－2抗体／第2の特異的な結合パートナー複合体において、検出可能な標識によって產生されたシグナルを検出または測定することにより、試験試料中の抗H P g V－2抗体の存在、量または濃度を決定するステップ。

10

#### 【0177】

ある特定の実施形態において、抗I g G抗体および抗I g M抗体の使用に加えて、または使用の代わりに、第2のステップは、第1の特異的な結合パートナー／抗H P g V－2抗体／第2の特異的な結合パートナー複合体を形成させるために、第1、第2および第3の捕捉抗原それぞれによって特異的に捕捉された、抗H P g V－2抗体に特異的に結合する第1、第2および第3の検出抗原の添加を含み、第3のステップは、（i i i）（i i）において形成された、第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナー／第1、第2および第3の抗H P g V－2抗体／第1、第2および第3の特異的な検出結合パートナー複合体において、検出可能な標識によって產生されたシグナルを検出または測定することによる、試験試料中の抗H P g V－2抗体の存在、量または濃度を決定するステップを含む。

20

#### 【0178】

一部の実施形態において、方法は、以下のステップを含むことができる：（i）試験試料を、1つ以上の組換え抗原を含む免疫診断試薬と接触させ、同時に、または逐次的に、いずれかの順序において、試験試料を、検出可能に標識されている少なくとも1つの第2の特異的な結合パートナーと接触させるステップであって、第2の特異的な結合パートナーは、少なくとも1対の第1の特異的な結合パートナーに対する結合に対して抗H P g V－2抗体と競合することができ、検出可能に標識されている抗H P g V－2抗体を含み、試験試料中に存在するあらゆる抗H P g V－2抗体、および検出可能に標識されている少なくとも1つの第2の特異的な結合パートナーは、相互に競合してそれぞれ、第1の特異的な結合パートナー／抗H P g V－2抗体複合体および第1の特異的な結合パートナー／第2の特異的な結合パートナー複合体を形成するステップ、ならびに（i i）（i i）において形成された第1の特異的な結合パートナー／第2の特異的な結合パートナー複合体において、検出可能な標識によって產生されたシグナルを検出または測定することにより、試験試料中の抗H P g V－2抗体の存在、量または濃度を決定するステップであって、第1の特異的な結合パートナー／第2の特異的な結合パートナー複合体における検出可能な標識によって產生されたシグナルは、試験試料中の抗H P g V－2抗体の量または濃度に反比例するステップ。免疫診断試薬が構成される組換え抗原が、微粒子上にコーティングされていてもよい。これに関して、免疫診断試薬が構成される抗原が、付加的なH P g V－2抗原として同じ微粒子上に同時コーティングされていてもよい。免疫診断試薬が構成されるポリペプチドが同じ微粒子上に同時コーティングされている場合（例えば、固体4%を含む微粒子懸濁液（4重量／体積%微粒子または4 g微粒子／100 mL微粒子懸濁液））、ポリペプチドは約1：2から約1：6の比率において同じ微粒子上にコーティ

30

40

50

ングされているのが好ましく、この場合、ポリペプチドが、約 1 : 2 の比率において同じ微粒子上にコーティングされている場合、本発明の単離または精製された抗原の濃度は少なくとも約 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、他の単離または精製されたポリペプチドの濃度は少なくとも約 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  である。試験試料が患者から得られた場合、方法は、患者の治療的／予防的処置の有効性を、診断し、予後判定し、または評価するステップをさらに含むでもよい。方法が、患者の治療的／予防的処置の有効性を評価するステップをさらに含む場合、方法は、任意選択的に、有効性を改善するのに必要とされる、患者の治療的／予防的処置を修飾するステップをさらに含むことができる。方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適用され得る。

#### 【0179】

ある特定の実施形態において、本明細書に、試験試料中の抗 H P g V - 2 抗体または H P g V - 2 抗原もしくはタンパク質の存在、量および／または濃度を決定する方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、以下のアッセイによって試験試料をアッセイするステップを含む：(i) 少なくとも 1 つの H P g V - 2 抗原（および好ましくは 2、3 またはそれを超える抗原）、少なくとも 1 つの検出可能な標識（各抗原が検出可能に標識されているのが好ましい）を含む免疫診断試薬を使用するステップ、ならびに (i i) 試験試料中の抗 H P g V - 2 抗体の存在、量または濃度の直接または間接的な指標として検出可能な標識によって産生されたシグナルを、対照またはキャリブレーター中の抗 H P g V - 2 抗体の存在、量または濃度の直接的または間接的な指標として産生されたシグナルと比較するステップであって、対照またはキャリブレーターは任意選択的に一連のキャリブレーターの一部であり、一連のキャリブレーターでは、各キャリブレーターが、一連の他のキャリブレーターと、抗 H P g V - 2 抗体の濃度が異なるステップ。方法は以下のステップを含むことができる：(i) 第 1 の特異的な捕捉結合パートナー／抗 H P g V - 2 抗体複合体を形成させるために、試験試料を、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つまたはそれを超える本発明の組換え H P g V - 2 抗原を含む免疫診断試薬と接触させるステップ (i i) 第 1 の特異的な結合パートナー／抗 H P g V - 2 抗体／第 2 の特異的な結合パートナー複合体を形成させるために、第 1 の特異的な捕捉結合パートナー／抗 H P g V - 2 抗体複合体を、抗 H P g V - 2 抗体に対する検出可能に標識されている少なくとも 1 つの第 2 の特異的な結合パートナーと（例えば、抗 I g G 抗体および抗 I g M 抗体、または抗 H P g V - 2 抗体に結合する標識されている抗原）接触させるステップ、ならびに (i i i) (i i) において形成された、第 1 の特異的な結合パートナー／抗 H P g V - 2 抗体／第 2 の特異的な結合パートナー複合体における、検出可能な標識によって産生されたシグナルを検出または測定することによって、試験試料中の抗 H P g V - 2 抗体の存在、量または濃度を決定するステップ。代替的に、方法は、以下のステップを含むことができる：(i) 試験試料を、少なくとも 1 つ、2 つ、3 つまたはそれを超える異なる H P g V - 2 抗原と、同時にまたは逐次的に、いずれかの順序で、少なくとも 1 つの検出可能に標識されている第 2 の特異的な結合パートナーと試験試料を接触させるステップであって、第 2 の特異的な結合パートナーは、少なくとも 1 対の第 1 の特異的な結合パートナーに対する結合に対して抗 H P g V - 2 抗体と競合することができ、検出可能に標識されている抗 H P g V - 2 抗体を含み、試験試料中に存在するあらゆる抗 H P g V - 2 抗体、および少なくとも 1 つの第 2 の特異的な結合パートナーは相互に競合して、それぞれ第 1 の特異的な結合パートナー／抗 H P g V - 2 抗体複合体および第 1 の特異的な結合パートナー／第 2 の特異的な結合パートナー複合体を形成するステップ、ならびに (i i) (i i) において形成された第 1 の特異的な結合パートナー／第 2 の特異的な結合パートナー複合体中の検出可能な標識によって産生されたシグナルを検出または測定することにより、試験試料中の抗 H P g V - 2 抗体の存在、量または濃度を決定するステップであって、第 1 の特異的な結合パートナー／第 2 の特異的な結合パートナー複合体における検出可能な標識によって産生されたシグナルは、試験試料中の抗 H P g V - 2 抗体の量または濃度に反比例するステップ。免疫診断試薬が構成されるポリペプチドが、微粒子上にコーティングされているもよい。これに関して、免疫診断試薬が構成されるポリペプチドが、同じ微粒子上に同時

10

20

30

40

50

コーティングされていてもよい。免疫診断試薬が構成されるポリペプチドが同じ微粒子上に同時コーティングされている場合（例えば、固体4%を含む微粒子懸濁液（4重量/体積%の微粒子または4g微粒子/100mL微粒子懸濁液））、ポリペプチドは約1:2から約1:6の比率において同じ微粒子上にコーティングされているのが好ましく、ポリペプチドが約1:2の比率において同じ微粒子上にコーティングされている場合、組換えHPgV-2抗原を含む単離または精製されたポリペプチドの濃度は、少なくとも約40μg/mLであり、他の単離または精製されたポリペプチドの濃度は少なくとも約80μg/mLである。試験試料が患者から得られた場合、方法は、患者の治療的/予防的処置の有効性を、診断し、予後判定し、または評価するステップをさらに含むことができる。方法が、患者の治療的/予防的処置の有効性を評価するステップをさらに含む場合、方法は、任意選択的に、有効性を改善するのに必要とされる、患者の治療的/予防的処置を修飾するステップをさらに含むことができる。方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適用され得る。

10

#### 【0180】

ある特定の実施形態において、キット（またはその構成成分）、ならびに本明細書に記載するイムノアッセイによって試験試料中の抗HPgV-2抗体および/またはHPgV-2抗原の濃度を決定する方法は、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載され、ならびに、例えば、Abbott Laboratories（Abbott Park, IL.）によりARCHITECT（登録商標）として市販されている、様々な自動化および半自動化システム（固相が微粒子を含むものを含む）における使用に適用され得る。

20

#### 【0181】

特定の実施形態において、非自動化システム（例えば、ELISA）と比べた、自動化または半自動化システム間の違いのいくつかは、第1の特異的な結合パートナー（例えば、抗原）が、それに付着している（サンドイッチの形成および分析物の反応性に影響を及ぼし得る）基質、ならびに捕捉の長さおよびタイミング、検出、ならびに/またはあらゆる任意選択的な洗浄ステップを含む。ELISAのような非自動化のフォーマットは、ある特定の実施形態において、試料および捕捉試薬との比較的長いインキュベーション時間を必要とする（例えば、約2時間）が、自動化または半自動化のフォーマット（例えば、ARCHITECT（登録商標）、Abbott Laboratories）は比較的短いインキュベーションタイムを有し得る（例えば、ARCHITECT（登録商標）ではおよそ18分）。同様に、ELISAのような非自動化のフォーマットは、比較的長いインキュベーション時間の間（例えば、約2時間）、コンジュゲート試薬のような検出抗体をインキュベートし得るが、自動化または半自動化のフォーマット（例えば、ARCHITECT（登録商標））は比較的短いインキュベーション時間を有し得る（例えば、ARCHITECT（登録商標）ではおよそ4分）。

30

#### 【0182】

Abbott Laboratoriesから入手できる他のプラットフォームは、それだけには限定されないが、AxSYM（登録商標）、IMx（登録商標）（例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許第5,294,404号を参照されたい。）、PRISM（登録商標）、EIA（ビーズ）およびQuantum（商標）、ならびに他のプラットフォームを含む。加えて、アッセイ、キットおよびキットの構成成分は、例えば、電気化学的または他のハンドヘルドもしくはポイントオブケア（point of care）アッセイシステム上、他のフォーマットにおいて使用され得る。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを行う、市販のAbbott Point of Care（i-STAT（登録商標）、Abbott Laboratories）電気化学的イムノアッセイシステムに適用できる。免疫センサーおよびこれらの製造方法、ならびに単回使用試験装置の操作は、例えば、その全体を参照により、それらに関する教示に対して本明細書に組み込む、米国特許第5,063,081号、米国特許出願公開第2003/0170881号、米国特許出願公開第2004/0018577号、米国特

40

50

許出願公開第2005/0054078号および米国特許出願公開第2006/0160164号に記載されている。

#### 【0183】

特に、アッセイのI-S-T-A-T（登録商標）システムへの適用に関して、以下の立体配置が例示的である。微細加工されているシリコンチップを、1対の金電流測定作用電極および銀-塩化銀基準電極で製造する。作用電極の1つの上に、捕捉抗体を固定化したポリスチレンビーズ（直径0.2mm）が、電極にわたって形作られたポリビニルアルコールのポリマーコーティングに付着している。このチップを、イムノアッセイに適する流体工学のフォーマットでI-S-T-A-T（登録商標）カートリッジに組み立てる。カートリッジの試料保持チャンバーの壁の一部分上に、アルカリホスファターゼ（または他の標識）で標識化検出抗体を含む層が存在する。カートリッジの液体パウチ内は、p-アミノフェノールホスフェートを含む水性試薬である。

10

#### 【0184】

ある特定の実施形態において、抗HPgV-2抗体および/またはHPgV-2抗原を含むことが疑われる試料が、試験カートリッジの保持チャンバーに添加され、カートリッジがI-S-T-A-T（登録商標）リーダー中に挿入される。検出抗体または検出可能に標識されている検出抗原が試料中に溶解された後、カートリッジ内のポンプエレメントが、試料を、チップを含む導管中に強制的に入れる。ここで、検出抗体または検出抗原が振動して、捕捉抗原（または捕捉抗体）、抗HPgV-2抗体（またはHPgV-2抗原）、ならびに標識された検出抗体（および/または検出抗原）間のサンドイッチの形成を促進する。アッセイの最後から2番目のステップにおいて、液体がパウチから強制的に出され、導管に入れられて、試料をチップから洗浄し出し、廃棄チャンバー中に入れる。アッセイの最終ステップにおいて、アルカリホスファターゼ標識がp-アミノフェノールホスフェートと反応してホスフェート基を切断し、遊離したp-アミノフェノールは、作用電極で電気化学的に酸化される。測定された電流に基づいて、リーダーは、埋め込まれているアルゴリズムおよび製造所で決定された検量線によって、試料中の抗HPgV-2抗体またはHPgV-2抗原の量を計算することができる。

20

#### 【0185】

本明細書に記載する方法およびキットは、イムノアッセイを行うための他の試薬および方法を包含する。例えば、当技術分野では公知であり、および/または使用するのに容易に準備もしくは最適化され得るような様々なバッファーが、例えば、コンジュゲート希釈液として、および/または標準物質希釈液として洗浄のために包含される。例示的なコンジュゲート希釈液は、ある種のキット（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）において使用され、2-（Nモルホリノ）エタンスルホン酸（MES）、塩、タンパク質ブロkker、抗微生物剤および洗剤を含む、ARCHITECT（登録商標）コンジュゲート希釈液である。例示的なキャリブレーター希釈液は、ある種のキット（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）において使用される、ARCHITECT（登録商標）ヒトキャリブレーター希釈液であり、これは、MES、他の塩、タンパク質ブロkker、および抗微生物剤を含むバッファーを含む。加えて、2008年12月31日出願の米国特許出願公開第61/142,048号、および米国特許出願公開第12/650,241号に記載される通り、例えば、I-S-T-A-T（登録商標）カートリッジフォーマットにおいて、シグナル増幅物質としてシグナル抗体に連結されている核酸配列を使用して、改善されたシグナル産生が得られることがある。

30

40

#### 【0186】

VII. HPgV-2免疫原性組成物

ある特定の実施形態において、本明細書に、HPgV-2感染症を処置または防止するための、免疫原性組成物を提供する。ある特定の実施形態において、本明細書に、1つ以上のこのような免疫原性組成物の化合物（例えば、配列番号2-11、76-218および304-353に示されるタンパク質の一部）ならびに生理学的に許容される担体を

50

含む、医薬組成物が提供される。免疫原性組成物は、1つ以上のこのような化合物、および非特異的な免疫応答増強物質を含むことができる。非特異的な免疫応答増強物質は、外来性の抗原に対する免疫応答を増強するあらゆる物質であってよい。非特異的な免疫応答増強物質の例は、アジュバント、生分解性微粒子（例えば、ポリ乳酸ガラクトド）およびリポソーム（その中に化合物が組み入れられる；例えば、米国特許第4, 235, 877号を参照されたい。）を含む。殆どのアジュバントは、水酸化アルミニウムまたは鉱油のような、速やかな異化作用から抗原を保護するようにデザインされている物質、および脂質A、ボルタデラ・パートシス（*Bortadella pertussis*）またはマイコバクテリウム・ツバーキュロシス（*Mycobacterium tuberculosis*）由来のタンパク質のような、免疫応答の刺激物質を含む。適切なアジュバントは、例えば、フロイントの不完全アジュバントおよび完全アジュバント（*Difco Laboratories, Detroit, MI*）、*Merck*アジュバント65（*Merck and Company, Inc., Rahway, NJ*）、AS-2（*Smith line Beecham*）、水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウムのようなアンモニウム塩、カルシウム、鉄または亜鉛の塩、アシル化チロシンの不溶性懸濁液、アシル化糖、陽イオン性または陰イオン性に誘導体化された多糖、ポリホスファゼン、生分解性微粒子、モノホスホリル脂質Aおよび*quil A*として市販されている。GM-CSFまたはインターロイキン-2、-7もしくは-12のようなサイトカインも、アジュバントとして使用され得る。

10

#### 【0187】

20

本開示の範囲内の医薬組成物および免疫原性組成物は、他の化合物も含むことができ、他の化合物は、生物学的に活性でも、または不活性でもよい。例えば、組成物または免疫原性組成物内の、融合ポリペプチド中に組み込まれ、または別々の化合物としていずれかの、他の抗原の1つ以上の免疫原性部分が存在してもよい。ポリペプチドは、例えば、米国特許第4, 372, 945号および第4, 474, 757号内に記載される他の巨大分子にコンジュゲートしていてもよいが、コンジュゲートしている必要はない。医薬組成物および免疫原性組成物は一般的に、予防および治療目的で使用され得る。

#### 【0188】

HPgV-2のゲノム、構造タンパク質もしくは非構造タンパク質、またはこれらのフラグメントをコードする核酸の免疫原性組成物は、HPgV-2感染を処置または防止するための免疫応答を誘発するのにも使用され得る。Rolland (1998) *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems*, 75:143-198、および本明細書に列挙する参考文献によって記載されているもののような、多数の遺伝子送達技術が当技術分野では周知である。好適な核酸発現系は、患者における発現に必要なDNA配列（適切なプロモーターおよび終結シグナルのような）を含む。ある特定の実施形態において、DNAは、非病原性の（欠陥のある）、複製適格性のウイルスの使用を伴い得る、ウイルス発現系（例えば、ワクシニア、ポックスウイルス、レトロウイルスまたはアデノウイルス）を使用して導入され得る。適切な系は、例えば、Fisher-Hochら (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55:317-321; Flexnerら (1989) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 569:86-103; Flexnerら (1990) *Immunogenic composition*, 5:17-21; 米国特許第4, 603, 112号、第4, 769, 330号、第4, 777, 127号および第5, 017, 487; WO89/01973に開示されている。

30

40

#### 【0189】

医薬として許容される担体は、一部には、投与される特定の組成物（例えば、核酸、タンパク質、調節性の化合物、または形質導入された細胞）によって、および組成物を投与するのに使用される特定の方法によって決定される。したがって、本開示の医薬組成物には広範囲の適切な製剤が存在する（例えば、Remington's *Pharmaceutical Sciences*、第17版、1989を参照されたい。）。投与は、あ

50

らゆる都合のよい様式において、例えば、注射、経口投与、吸入、経皮適用または直腸投与によってもよい。経口投与に適する製剤は、（a）水、食塩水またはPEG400のような希釈液中に懸濁されている、有効量のパッケージされた核酸のような、液体溶液剤、（b）各々が、予め決定された量の有効成分を液体、固体、顆粒またはゼラチンとして含む、カプセル剤、サシェ剤または錠剤、（c）好適な液体中の懸濁剤、および（d）適切な乳剤から構成されてよい。錠剤形態は、1つ以上のラクトース、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、微結晶性セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、香味剤、色素、崩壊剤、ならびに製薬上適合性の担体を含むことができる。トローチ剤形態は、ショ糖など、香味剤中に有効成分を含むことができ、パステル剤は、有効成分に加えて当技術分野では公知の担体を含む、ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアラビアゴム乳液、ゲルなどのような、不活性な基剤中に有効成分を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0190】

#### V I I I . 化合物のスクリーニング

ある特定の実施形態において、本開示のHPgV-2ウイルス、核酸およびタンパク質は、（1）細胞表面のウイルスの相互作用、例えば、ウイルスの形質導入（例えば、ウイルス細胞受容体の結合もしくは内部移行を阻止する）、（2）ウイルスの複製および遺伝子発現、例えば、ウイルスの複製（例えば、非構造タンパク質の活性、開始点活性、またはプライマー結合を阻害することによる）、ウイルスの転写（プロモーターまたはスプライシングの阻害、非構造タンパク質の阻害）、ウイルスタンパク質の翻訳、タンパク質のプロセッシング（例えば、切断またはリン酸化）、ならびに（3）ウイルスの組立ておよび放出、例えば、ウイルスのパッケージングおよびウイルスの放出を阻害する化合物を含めた、抗ウイルス化合物に対するアッセイに使用される。HPgV-2調節活性を有する化合物を同定するためのアッセイはインビトロで行われてもよい。このようなアッセイは、全長のHPgV-2またはそのバリエーション、またはその変異体、またはそれらのフラグメントを使用することができる。精製された組換えまたは天然に存在するタンパク質が、本発明のインビトロ方法において使用され得る。精製されたHPgV-2に加えて、組換えまたは天然に存在するタンパク質は、細胞可溶化液または細胞膜の一部であり得る。ある特定の実施形態において、結合アッセイは、固体状態または可溶性のいずれかである。ある特定の実施形態において、タンパク質または膜が、共有結合性または非共有結合性のいずれかで、固体支持体に結合している。特定の実施形態において、本発明のインビトロアッセイは、非競合性または競合性いずれかの、基質もしくはリガンド結合性、または親和性アッセイである。他のインビトロアッセイは、タンパク質に対する分光学的な（例えば、蛍光、吸光度、屈折率）、流体力学的（例えば、形状）、クロマトグラフィーの、または可溶性の性質における変化を測定することを含む。

#### 【0191】

ある特定の実施形態において、タンパク質またはそのフラグメントを、潜在的な調節物質と接触させ、適切な量の時間インキュベートする、ハイスループットの結合アッセイが行われる。一実施形態において、潜在的な調節物質が固体支持体に結合しており、タンパク質が添加される。別の実施形態において、タンパク質が固体支持体に結合している。以下に記載する通り、有機小分子、ペプチド、抗体などを含めた、広範囲の調節物質が使用され得る。HPgV-2調節物質の結合を同定するのに、標識化タンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフト、イムノアッセイ、酵素アッセイなどを含めた、広範囲のアッセイが使用され得る。いくつかの場合では、候補の調節物質の結合は、競合的結合アッセイの使用によって決定され、既知のリガンドまたは基質の結合の妨害が、潜在的な調節物質の存在下で測定される。調節物質または既知のリガンドまたは基質のいずれかが最初に結合し、次いで競合物質が添加される。タンパク質が洗浄された後、潜在的な調節物質または既知のリガンドまたは基質いずれかの結合の妨害が決定される。しばしば、潜在的な調節物質または既知のリガンドまたは基質のいずれかが標識される。

## 【0192】

多くの様々な化学化合物が、本発明のスクリーニングアッセイにおいて、潜在的な調節物質またはリガンドとして使用され得る。ある特定の実施形態において、アッセイは、アッセイのステップを自動化し、アッセイに対するあらゆる便利な供給源から化合物を提供することによって、大型の化学ライブラリーをスクリーニングするようにデザインされ、アッセイが平行して行われるのが典型的である（例えば、ロボット工学アッセイにおけるマイクロタイタープレート上のマイクロタイターフォーマットにおいて）。Sigma (St. Louis, MO)、Aldrich (St. Louis, MO)、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)、およびFluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Switzerland)を含む、多く化学化合物の供給業者が存在することが理解されよう。ある特定の実施形態において、ハイスループットのスクリーニング方法は、多数の潜在的な治療用化合物（潜在的な調節物質もしくはリガンド化合物）を含む、有機小分子またはペプチドのコンビナトリアルライブラリーを提供することを伴う。このようなライブラリーは、次いで、所望の特徴的な活性を表すライブラリーのメンバー（特に化学種またはサブクラス）を同定するために、本明細書に記載する1つ以上のアッセイにおいてスクリーニングされる。このように同定された化合物は、リード化合物として働くことができ、またはそれ自体が、潜在的なもしくは実際的な治療薬として使用され得る。

10

## 【0193】

## IX. キットおよびシステム

20

ある特定の実施形態において、本明細書に、例えば、ELISAおよび「サンドイッチ」タイプのイムノアッセイのようなイムノアッセイ、および核酸アッセイ、例えばPCRアッセイを含めた、様々な診断アッセイにおいて使用するための1つ以上の試薬を含むキットおよびシステムを提供する。このようなキットおよびシステムは、好ましくは、本発明の少なくとも第1のペプチド、または第1の抗体もしくは抗原結合フラグメント、これらの機能的なフラグメント、またはこれらのカクテル、または第1のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド対、およびシグナル産生のための手段を含むことができる。キットの構成成分が固体支持体に予め付着していてもよく、またはキットが使用されるときに固体支持体の表面に適用されてもよい。シグナル産生手段は、本発明の抗体もしくは核酸と予め会合させてもよく、または使用前に1つ以上の構成成分、例えば、バッファー、核酸、抗体-酵素コンジュゲート、酵素基質などとの組合せを必要とし得る。キットおよびシステムは、例えば、固相表面への非特異的結合を低減するためのブロック試薬、洗浄試薬、酵素基質、酵素など、付加的な試薬も含むことができる。固相表面は、マイクロタイタープレート、微粒子の形態、または核酸、タンパク質、ペプチドもしくはポリペプチドを固定化するのに適する他の材料であってよい。化学発光もしくは色素産生性生成物の形成、または化学発光もしくは色素産生性基質の低減を触媒する酵素が、シグナル産生手段の1つのこのような構成成分である。このような酵素は、当技術分野では周知である。放射標識、色素産生性、蛍光、または他のタイプの検出可能な標識または検出手段がキットまたはシステム内に含まれる場合、標識化剤は、診断もしくは治療用組成物自体と同じ容器中に提供されてもよく、または代替的に、その中にこの第2の組成物が配置され、適切にアリコートにされ得る第2の別々の容器手段中に配置されてもよい。代替的に、検出試薬および標識は、単一の容器手段中で調製されてもよく、殆どの場合、キットまたはシステムは、市販用に、ならびに／または簡便な包装用および送達用に嚴重に密閉された中に一又は複数のバイアルを含むための手段をやはり含むのが典型的である（例えば、箱もしくは他の容器）。

30

40

## 【0194】

ある特定の実施形態において、本明細書に開示するキットは、HPgV-2（またはそのフラグメント）に対して試験試料をアッセイするための少なくとも1つの構成成分、およびHPgV-2（またはそのフラグメント）に対して試験試料をアッセイするための指示書を含む。HPgV-2（またはそのフラグメント）に対して試験試料をアッセイする

50

ための少なくとも1つの構成成分は、例えば、任意選択的に固相上に固定化されている、H P g V-2に対する抗体または抗体（複数）（またはそのフラグメント、バリエーション、またはバリエーションのフラグメント）を含む組成物を含むことができる。一部の実施形態において、キットは、アッセイ、例えば、化学発光微粒子イムノアッセイによってH P g V-2に対する試験試料をアッセイするための少なくとも1つの構成成分、およびイムノアッセイ、例えば、化学発光微粒子イムノアッセイによって分析物に対して試験試料をアッセイするための指示書を含むことができる。例えば、キットは、抗分析物、モノクローナル／ポリクローナル抗体（またはH P g V-2に結合することができるそのフラグメント、H P g V-2に結合することができるそのバリエーション、またはH P g V-2に結合することができるバリエーションのフラグメント）のような、H P g V-2に対する少なくとも1つの特異的な結合パートナーを含むことができ、これらのいずれかが検出可能に標識されている。代替的に、または加えて、キットは、検出可能に標識されているH P g V-2タンパク質（または抗H P g V-2に結合することができるそのフラグメント、モノクローナル／ポリクローナル抗体もしくは抗H P g V-2 D V D-I g（もしくはそのフラグメント、バリエーション、もしくはバリエーションのフラグメント））を含むことができ、このタンパク質は、抗H P g V-2に対する結合に対する試験試料中のあらゆる抗H P g V-2抗体、モノクローナル／ポリクローナル抗体（もしくはH P g V-2に結合することができるそのフラグメント、H P g V-2に結合することができるそのバリエーション、もしくはH P g V-2に結合することができるバリエーションのフラグメント）、または抗H P g V-2 D V D-I g（もしくはそのフラグメント、バリエーション、もしくはバリエーションのフラグメント）と競合することができ、これらのいずれかが固体支持体上に固定されている。キットは、1つ以上のキャリブレーターまたは対照、例えば、単離または精製されたH P g V-2を含むことができる。キットは、アッセイを行うための少なくとも1つの容器（例えば、チューブ、マイクロタイタープレートもしくはストリップ、例えば、これらは第1の特異的な結合パートナーですでにコーティングされている。）および／またはアッセイバッファーもしくは洗浄バッファーのようなバッファー（これらのいずれか1つは濃縮溶液として提供されてよい。）、検出可能な標識（例えば、酵素標識）用の基質溶液、または停止溶液を含むことができる。キットが、アッセイを行うのに必要である構成成分を全て、すなわち、試薬、標準、バッファー、希釈液などを含むのが好ましい。指示書は、紙の形態または、ディスク、C D、D V Dなどのようなコンピュータで読み取ることができる形態であってよい。

#### 【0195】

抗バイオマーカー抗体もしくは抗H P g V-2 D V D-I gのようなあらゆる抗体、またはトレーサーは、フルオロフォア、放射性部分、酵素、ビオチン／アビジン標識、発色団、化学発光標識などのような本明細書に記載される検出可能な標識を組み入れることができ、またはキットは検出可能な標識化を行うための試薬を含むことができる。抗体、キャリブレーターおよび／または対照は、別々の容器中に提供されてもよく、または好適なアッセイフォーマット、例えばマイクロタイタープレート中に予め分配されてもよい。

#### 【0196】

任意選択的に、キットは、品質管理の構成成分（例えば、感受性パネル、キャリブレーターおよび陽性対照）を含む。品質管理の試薬の調製は、当技術分野では周知であり、様々な免疫診断生成物用の挿入文書に記載されている。感受性パネルのメンバーは、任意選択的に、アッセイ性能の特徴を確立するのに使用され、さらに任意選択的に、アッセイキット試薬の一体性、およびアッセイの標準化の有用な指標である。

#### 【0197】

キットは、バッファー、塩、酵素、酵素の補助因子、酵素基質、検出試薬などのような、診断アッセイを行い、または品質管理の評価を促進するのに必要とされる他の試薬も、任意選択的に含むことができる。試験試料を単離および／または処理するためのバッファーおよび溶液のような他の構成成分（例えば、前処理試薬）もキットに含まれてよい。キットは付加的に、1つ以上の他の対照を含むことができる。キットの1つ以上の構成成分

は凍結乾燥されてよく、その場合、キットは、凍結乾燥された構成成分を再構成するのに適する試薬をさらに含むことができる。

#### 【0198】

キットの様々な構成成分は、任意選択的に、適切な容器、例えば、マイクロタイタープレート中に適宜提供される。キットは、試料を保持または貯蔵するための容器（例えば、尿試料用の容器またはカートリッジ）をさらに含むことができる。必要に応じて、キットは、任意選択的に、反応容器、混合容器、および試薬または試験試料の調製を促進する他の構成成分も含むことができる。キットは、シリンジ、ピペット、ピンセット、計量スプーンなどのような、試験試料を得る助けをするための器具も1つ以上含むことができる。

#### 【0199】

検出可能な標識が少なくとも1つのアクリジニウム化合物である場合、キットは少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキサミド、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステル、またはこれらのあらゆる組合せを含むことができる。さらに、検出可能な標識が少なくとも1つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、バッファー、溶液、および／または少なくとも1つの塩基溶液のような、過酸化水素の供給源も含むことができる。所望により、キットは、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、骨格分子、フィルム、濾紙、ディスクまたはチップのような固相を含むことができる。

#### 【0200】

キット（またはその構成成分）、および試験試料中のHPgV-2の存在、量または濃度を本明細書に記載するアッセイのようなアッセイによって決定する方法は、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載される通り、ならびに例えば、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) によりARCHITECTとして市販される、様々な自動化および半自動化システム（固相が微粒子を含むものを含めて）において使用するために適用され得る。自動化または半自動化システムを、非自動化システム（例えば、ELISA）と比べた間の違いのいくつかは、それに対して第1の特異的な結合パートナー（例えば、抗HPgV-2モノクローナル／ポリクローナル抗体（もしくはこれらのフラグメント、これらのバリエーション、もしくはこれらのバリエーションのフラグメント）、または抗HPgV-2DVD-Ig（もしくはこれらのフラグメント、これらのバリエーション、もしくはこれらのバリエーションのフラグメント）が付着しており；いずれかの方法で、サンドイッチ形成およびHPgV-2反応性が影響を受け得る）基質、ならびに捕捉、検出および／またはあらゆる任意選択の洗浄ステップの長さおよびタイミングを含む。ELISAのような非自動化のフォーマットは、試料および捕捉試料との比較的長いインキュベーション時間を必要とし得る（例えば、約2時間）が、自動化または半自動化のフォーマット（例えば、ARCHITECT、Abbott Laboratories）は比較的短いインキュベーション時間を有し得る（例えば、ARCHITECTではおよそ18分）。同様に、ELISAのような非自動化のフォーマットは、コンジュゲート試薬のような検出抗体を、比較的長いインキュベーション時間（例えば、約2時間）インキュベートし得るが、自動化または半自動化のフォーマット（例えば、ARCHITECT）は比較的短いインキュベーション時間を有し得る（例えば、ARCHITECTではおよそ4分）。

#### 【0201】

Abbott Laboratoriesから入手できる他のプラットフォームは、それだけには限定されないが、ASYM、IMx（例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許第5,294,404号を参照されたい。）、PRISM、EIA（ビーズ）、およびQuantum. TM. II、および他のプラットフォームを含む。加えて、アッセイ、キット、およびキットの構成成分は、他のフォーマットにおいて、例えば、電気化学的または他のハンドヘルドまたはポイントオブケアのアッセイシステム上で使用され得る。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを行う、市販のAbbott Point of Care (i-STAT<sup>ED</sup>, Abbott Laborat

10

20

30

40

50

ories) 電気化学的イムノアッセイシステムに適用できる。イムノセンサー、および単回使用 (single-use) の試験装置におけるこれらの製造方法および操作方法は、例えば、その全体を参照により、それに関するこれらの教示に対して組み込む、米国特許第 5, 063, 081 号、米国特許出願公開第 2003/0170881 号、米国特許出願公開第 2004/0018577 号、米国特許出願公開第 2005/0054078 号および米国特許出願公開第 2006/0160164 号に記載されている。

#### 【0202】

特に、HPgV-2 アッセイの I-STAT システムへの適用に関して、以下の立体配置が使用され得る。微細加工されたシリコンチップが、1 対の金電流測定作用電極および銀-塩化銀基準電極で製造される。一方の作用電極上で、抗 HPgV-2、モノクローナル/ポリクローナル抗体 (もしくはこれらのフラグメント、これらのバリエーション、もしくはこれらのバリエーションのフラグメント) または抗 HPgV-2 DVD-Ig (もしくはこれらのフラグメント、これらのバリエーション、もしくはこれらのバリエーションのフラグメント) を固定化したポリスチレンビーズ (直径 0.2 mm) が、電極にわたって形作られたポリビニルアルコールのポリマーコーティングに付着している。このチップを、イムノアッセイに適する流体力学のフォーマットで、I-STAT カートリッジに組み立てる。カートリッジの試料保持チャンバーの壁の一部分上に、抗 HPgV-2、モノクローナル/ポリクローナル抗体 (もしくは HPgV-2 に結合することができるこれらのフラグメント、これらのバリエーション、もしくはこれらのバリエーションのフラグメント)、または抗 HPgV-2 DVD-Ig (もしくは HPgV-2 に結合することができるこれらのフラグメント、これらのバリエーション、もしくはこれらのバリエーションのフラグメント) のような分析物に特異的な結合パートナーを含む層が存在し、これらのいずれかが検出可能に標識され得る。カートリッジの液体パウチ内に、p-アミノフェノールホスフェートを含む水性試薬がある。

#### 【0203】

操作において、HPgV-2 を含むことが疑われる試料が、試験カートリッジの保持チャンバーに添加され、カートリッジが I-STAT リーダー中に挿入される。HPgV-2 に特異的な結合パートナーが試料中に溶解された後、カートリッジ内のポンプエレメントが、試料を、チップを含む導管中に強制的に入れる。ここで、これが振動して、サンドイッチの形成を促進する。アッセイの最後から 2 番目のステップにおいて、液体がポーチから強制的に出され、導管に入れられて、チップから試料を洗浄し出し、廃棄チャンバーに入れる。アッセイの最終ステップにおいて、アルカリホスファターゼ標識が p-アミノフェノールホスフェートと反応してホスフェート基を切断し、遊離した p-アミノフェノールが、作用電極で電気化学的に酸化される。測定された電流に基づいて、リーダーは、埋め込まれているアルゴリズムおよび製造所で決定された検量線によって、試料中の抗 HPgV-2 抗体または HPgV-2 抗原の量を計算することができる。

#### 【0204】

ある特定の実施形態において、本明細書に記載する方法およびキットは、アッセイを行うための他の試薬および方法を含むことができる。例えば、当技術分野では公知であり、ならびに/または例えば、コンジュゲート希釈液、微粒子希釈液、および/もしくはキャリブレーター希釈液として洗浄するために、使用されるために容易に調製または最適化され得る、様々なバッファーが包含される。例示的なコンジュゲート希釈液は、ある種のキット (Abbott Laboratories、Abbott Park、IL) において使用され、2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (MES)、塩、タンパク質ブロkker、抗微生物剤および洗剤を含む、ARCHITECT コンジュゲート希釈液である。例示的なキャリブレーター希釈液は、ある種のキット (Abbott Laboratories、Abbott Park、IL) において使用され、MES、他の塩、タンパク質ブロkkerおよび抗微生物剤を含むバッファーを含む、ARCHITECT ヒトキャリブレーター希釈液である。加えて、2008 年 12 月 31 日出願の米国特許出願第 61/142,048 号に記載される通り、改善されたシグナル産生が、例えば、シ

グナル増幅器としてシグナル抗体に連結している核酸配列を使用する、I - S t a t カートリッジのフォーマットにおいて得られてもよい。

# 【実施例】

## 【0205】

### [実施例1]

HPgV-2と仮称された新規ウイルスの発見

慢性肝炎を有する米国の患者から回収された105個の血清試料のコホートをそれぞれ6試料(50μl×6=300μl血清/プール)のグループにプールし、DNaseの混合物(Turbo DNase、Ambion、Foster City、CA、およびBaseline DNase、Epicentre、San Diego、CA)を用いて室温で2.5時間処理した後、QiagenのEZ1ウイルス抽出キットを製造業者のプロトコールに従って使用してビーズに基づく抽出を行った。個々のプールから抽出された核酸を2つのプール(N=12試料)にグループ分けし、次に、以前に記載されたように(Grardら、2012; PLoS Pathogens 8(9):e1002924)、変更されたTruSeq(Illumina、San Diego、CA)プロトコールを用いて次世代シーケンシングライブラリー構築およびインデックス付けのために調製した。ライブラリーは、IlluminaのHiSeq2000装置を用いて、2レーンでElim Biopharmaceuticals(Elim Biopharmaceuticals、Hayward、CA)によって配列決定された。合計で2億5,500万個の生の対合末端のリードを生じさせた。これらのリードは、配列ベースの超急速病原体同定(SURPI)と命名された、カスタマイズされたバイオインフォマティクスパイプラインを用いて処理された(Naccacheら、2014; Genome Research、印刷中)。タンパク質のアラインメントにより、3つの対合末端のリードが、3270万の生のリードからなる単一プール中で、サルペギウイルスであるGBウイルスAと遠隔相同性で同定された。確認されたサンガー配列決定後の対合末端のリードの1つを標的とするプライマー(配列番号219および220)を用いたPCRを用いて、HPgV-2を含む個々の試料を特定した。

## 【0206】

ウイルスゲノムからさらなる配列を回収するために、2つのライブラリー法:Illumina TruSeqおよびRubicon Genomics ThruPLEX(Ann Arbor、MI)を使用して、残りのプールされた核酸(N=6試料)からライブラリーを調製した。これらのライブラリーは、Illumina MiSeqを用いてインデックス付けされ、配列決定され、合計1340万の生の対合末端のリードを生じさせた。次に、新規のペギウイルスのゲノムは、(1)1×10<sup>-8</sup>のe値カットオフで既存のコンティグへのBLASTn(ヌクレオチド)アラインメントによる重複リードの同定、(2)基準としてのGBV-A(現在、ペギウイルスA、NC\_001837)の公開された配列に対する、1×10<sup>-2</sup>のe値カットオフでのBLASTx(翻訳されたヌクレオチド)アラインメントによる追加のリードの同定、および(3)それぞれPRICEアライナー(Rubyら、2013; G3 3:865-880)およびGeneious(Biomatters、Auckland、New Zealand)を用いた、既存のコンティグへの繰返しデノボアセンブリーおよび基準ベースのアセンブリーを用いて再構築された。これは、推定されるペギウイルスゲノムの約60%に及ぶ6つの連続した配列(コンティグ)の生成をもたらした。これらのコンティグを確認し、ブリッジPCR(表18に示されるプライマー)およびサンガー配列決定により得られたアンプリコンの確認を用いてギャップを閉じた。5'末端および3'末端を回収するために、製造業者の指示に従って、cDNA末端の迅速増幅(RACE)手法を実施した(First Choice RLM-RACEキット、Ambion、Foster City、CA)。3'RACEプロトコールは、RACE前にpoly-Aポリメラーゼ(New England Biolabs、Ipswich、MA)を用いて3'末端にポリ(A)テールを追加することを必要とした。最終的な9,778ntのペギウイルスのドラフトゲ

ノムは、Illumina HiSeq 実験から 604 個の配列リード、および Illumina MiSeq 実験から 2,571 個のリードを含み、組み立てられたゲノムの 87.8% が PCR およびサンガー配列決定によって確認された。

#### 【0207】

すべての確認のサンガー配列決定は、2% アガロースゲル上でアンプリコンを精製し、TOPO TA (Invitrogen、Carlsbad、CA) を用いてプラスミドベクターにクローニングし、ベクタープライマー M13F と M13R を用いた両方向におけるサンガー配列決定のために外部会社 (Elim Biopharmaceuticals、Hayward、CA) にそれらを送付することにより行われた。

#### 【0208】

#### 【表 3】

表 18

| 配列名           | 配列                                    | Tm   | 配列番号 |
|---------------|---------------------------------------|------|------|
| HPgV-2_set_1F | GAG TCA CGC GGG GTG CTT               | 60.9 | 219  |
| HPgV-2_set_1R | CTT AAT ATA AGG GGC CAT ACT TTT GA    | 52.9 | 220  |
| HPgV-2_set_2F | TGG AAC CAG TCG TGT TGG AG            | 60.5 | 221  |
| HPgV-2_set_2R | GAA CAG CAG CAG GGG TCT AG            | 62.5 | 222  |
| HPgV-2_set_3F | CTA GAC CCC TGC TGC TGT TC            | 62.5 | 223  |
| HPgV-2_set_3R | TGA CTA CAG CCA CAC TTG GT            | 58.4 | 224  |
| HPgV-2_set_4F | ATA TGG GAG CTA CCA CTG CGG T         | 64.2 | 225  |
| HPgV-2_set_4R | TAA CAG GAC AGA ATC TAG GTA TGG AG    | 64.6 | 226  |
| HPgV-2_set_5F | TGT CTA TTG CTC TAC CTC CAG GTG       | 65.2 | 227  |
| HPgV-2_set_5R | TTC CAA AGC AAC GTA ACA CGG CG        | 64.6 | 228  |
| HPgV-2_set_6F | CGC CGT GTT ACG TTG CTT TGG AA        | 64.6 | 229  |
| HPgV-2_set_6R | TTA CCA GAA CCA GTA GGG GCA TAG       | 65.2 | 230  |
| HPgV-2_set_7F | ACA GTC ACA TTC CAA CAT TGA TGA ATA C | 64.4 | 231  |
| HPgV-2_set_7R | TGC TCC CCT TCT ACC ACG ACC           | 65.3 | 232  |
| HPgV-2_set_8F | TAG GCG TGT GGT TTT CCG GTC T         | 64.2 | 233  |

|                |                                         |      |     |
|----------------|-----------------------------------------|------|-----|
| HPgV-2_set_8R  | CCA ATC CCA CAC AGC GCG TAG A           | 65.8 | 234 |
| HPgV-2_set_9F  | TCT ACG CGC TGT GTG GGA TTG G           | 65.8 | 235 |
| HPgV-2_set_9R  | GGG TCT CAA ACT TGA TTG GAG GC          | 64.6 | 236 |
| HPgV-2_set_10F | CTA TGC CCC TAC TGG TTC TGG TAA         | 65.2 | 237 |
| HPgV-2_set_10R | GTA TTC ATC AAT GTT GGA ATG TGA CTG T   | 64.4 | 238 |
| HPgV-2_set_11F | ACT TAT TGA CTG ACA CAG GCG ACG         | 65.2 | 239 |
| HPgV-2_set_11R | TGC ATG CGC AAT GCA GCA GTA CAT         | 65.2 | 240 |
| HPgV-2_set_12F | GTG CCC ATA AGT GGC TAT TAG CTA T       | 64.1 | 241 |
| HPgV-2_set_12R | TGC TTA ATT GTT GGC CAA ATC TTT CAC     | 63.7 | 242 |
| HPgV-2_set_13F | ACG ATT CCG TGT GCC TAT GAT TGG         | 65.2 | 243 |
| HPgV-2_set_13R | CTG GGT TAC ATA AGT TAG TAG ACA TGC     | 65.3 | 244 |
| HPgV-2_set_14F | TCT CCG CCT CCA GCA GTT CAA             | 63.2 | 245 |
| HPgV-2_set_14R | AGC CGC AGT AGG ATA CAT GAC AAT A       | 64.1 | 246 |
| HPgV-2_set_15F | TGT GAT ATC ACA GGA AAA GTT GTC GG      | 64.6 | 247 |
| HPgV-2_set_15R | ACA GTC ACA GCC GCA GTA GGA TA          | 64.6 | 248 |
| HPgV-2_set_16F | GAG AAA ATG ATC CTG GGC GAT CCT G       | 67.4 | 249 |
| HPgV-2_set_16R | GCC GTG ATG GTG CTA TCA AAG CA          | 64.6 | 250 |
| HPgV-2_set_17F | GGG ACA CCT CAA CCC TGA AG              | 62.5 | 251 |
| HPgV-2_set_17R | TCA CTG CGG TAC CCA TTG AC              | 60.5 | 252 |
| HPgV-2_set_18F | ATA TGG GAG CTA CCA CTG CGG T           | 64.2 | 253 |
| HPgV-2_set_18R | GGT ACA GTA TTT GAG GTA GCT TTC AG      | 64.6 | 254 |
| HPgV-2_set_19F | CTT TTT GGT GCG CAG TGT TTG CCT         | 65.2 | 255 |
| HPgV-2_set_19R | TGT CAG GGA AGA CAA CAC CAC GAT         | 65.2 | 256 |
| HPgV-2_set_20F | ACA CTC ACA GGG CGT GCT GAA A           | 64.2 | 257 |
| HPgV-2_set_20R | ACG CCA AGT TCT CAC CAG TGA TG          | 64.6 | 258 |
| HPgV-2_set_21F | GTG TGG CTG TAG TCA AAA GTA TGG C       | 65.8 | 259 |
| HPgV-2_set_21R | CAG CAG TAC ATG GCA CCA CTC G           | 65.8 | 260 |
| HPgV-2_set_22F | TTC GGT CAT CGA CTG CGG GTG T           | 65.8 | 261 |
| HPgV-2_set_22R | CCA GCC AAG TTC CTG CAA TAG CTA A       | 65.8 | 262 |
| HPgV-2_set_23F | TTC ACT GCG CTT GCT GGC TTG G           | 65.8 | 263 |
| HPgV-2_set_23R | CCG TAA GGT GCC AGT GCC TGT             | 65.3 | 264 |
| HPgV-2_set_24F | AAG CAT CAA TCT GAA AGC TAC CTC AAA     | 63.7 | 265 |
| HPgV-2_set_24R | TGA ATC TTA TAG TGT CGT CCA AGT G       | 62.5 | 266 |
| HPgV-2_set_25F | CTGTGACTGCCCTTTGGAA                     | 60.5 | 267 |
| HPgV-2_set_25R | CATGCCAACGTCCGTGTATG                    | 60.5 | 268 |
| HPgV-2_set_26F | AAC CCT TGC AAT TCT GGC CGA TGA         | 65.2 | 269 |
| HPgV-2_set_26R | AGA TCC CTG ACT GCT TGC GCC A           | 65.8 | 270 |
| HPgV-2_set_27F | CCC ACG GTC CTG ATG ATA GCA T           | 64.2 | 271 |
| HPgV-2_set_27R | GCT AAC CAG CCA AGT TCC TGC AA          | 64.6 | 272 |
| HPgV-2_set_28F | AAG TGA AAG ATT TGG CCA ACA ATT AAG CAA | 65.1 | 273 |
| HPgV-2_set_28R | CCA CGC AGG TGA GCA GCC AA              | 64.6 | 274 |
| HPgV-2_set_29F | ACA ATT ATT ACA AAA GAA GCC CCA T       | 59.2 | 275 |
| HPgV-2_set_29R | AGT CAC AGC CGC AGT AGG A               | 59.5 | 276 |
| HPgV-2_set_30F | TTG ACA TGA CAG CGT CGG TG              | 60.5 | 277 |
| HPgV-2_set_30R | AGCGCGCATCTGATCTACAA                    | 58.5 | 278 |

10

20

30

40

|                |                                    |      |     |
|----------------|------------------------------------|------|-----|
| HPgV-2_set_31F | AAC AGC GGT TGA TGT CTC C          | 57.5 | 279 |
| HPgV-2_set_31R | AAA GAT GCG CGC AAA CAC C          | 57.5 | 280 |
| HPgV-2_set_32F | AGCGCGCATCTGATCTACAA               | 58.5 | 281 |
| HPgV-2_set_32R | GCT AGT GCT ATA CTC GCT CTG CTT    | 65.2 | 282 |
| HPgV-2_set_33F | ATG ATG CAT GGC AGG TTC GCC AA     | 64.6 | 283 |
| HPgV-2_set_33R | GAT CAA TCG TGA CCT TAG CCT GC     | 64.6 | 284 |
| HPgV-2_set_34F | AAC TCG GCG ACC AGT GCC AAA AT     | 64.6 | 285 |
| HPgV-2_set_34R | TGT CTG CGC GCA AAA TGC CAG C      | 65.8 | 286 |
| HPgV-2_set_35F | GGC AAA GAC CTT CAG ACA ATC TGG    | 65.2 | 287 |
| HPgV-2_set_35R | CAC CCC GAC AAC TTT TCC TGT GA     | 64.5 | 288 |
| HPgV-2_set_36F | TTG ATC GTG CAA AGG GAT GGG TC     | 64.6 | 289 |
| HPgV-2_set_36R | CTA ACA GTC CAA GCC AAC CTG CA     | 64.5 | 290 |
| HPgV-2_set_37F | GCC ATG AGG GAT CAT GAC ACT G      | 64.5 | 291 |
| HPgV-2_set_37R | TTT GCA CGA TCA GCG TTC CCG T      | 65.2 | 292 |
| HPgV-2_set_38F | CTG TCC TGT TAC TCC ATA CCT AGA TT | 64.6 | 293 |
| HPgV-2_set_38R | CG ACA CCT GGA GGT AGA GCA A       | 63.2 | 294 |
| HPgV-2_set_39F | CCT CCA ATC AAG TTT GAG ACC C      | 62.1 | 295 |
| HPgV-2_set_39R | GTA CAC TCC AGC GCG CAT CT         | 62.5 | 296 |
| HPgV-2_set_40F | ACC AAG TGT GGC TGT AGT CA         | 58.4 | 297 |
| HPgV-2_set_40R | CCC CTG TTG TAT GCC TAG CC         | 62.5 | 298 |

10

20

## 【0209】

## [実施例2]

新規ウイルスHpgV-2の確認

この実施例は、生物学的試料中のHPgV-2ウイルスの存在を確認するために使用される方法を記載する。

## 【0210】

A. 試料の前処理およびRNA抽出

新規ウイルスを独立して検証および確認するために、指標患者（UC0125、USを有する。）から回収された血漿をAbbottラボラトリーで評価した。HPgV-2を含む血漿試料（130μl）を室温で解凍した。試料を室温で5分間、2650gで回転させ、上清を新しいチューブに移した。試料を37℃で2時間、ベンゾナーゼで前処理し、遊離DNAおよびRNAを分解させた。10×ベンゾナーゼバッファーは以下の通りであった：200mMのTris-Cl pH7.5および100mMのNaCl、20mMのMgCl<sub>2</sub>。ベンゾナーゼ反応は以下の通りであった：14μlの10×ベンゾナーゼバッファー、130μlの血漿および0.5μl（250U/μlベンゾナーゼ：892U/ml最終）（Sigma、E8263-25KU）。次に、試料を0.22μmスピンフィルター（Millipore、UFC306V00）を用いて、2650gで3分間回転させることにより濾過した。

30

## 【0211】

Qiagen Viral Mini抽出スピンプロトコールをウイルスRNA精製に使用した。あるいは、Total Nucleic Acid prepを使用して、Abbott m2000で製造元の指示書（ここには記載されない。）に従って試料を処理することができる。このプロトコールは、マイクロ遠心分離器を用いて、140μlの血漿、血清、尿、細胞培養培地または細胞不含の体液からのウイルスRNAの精製に適している。最大560μl（140μlの倍数による。）のより大きな開始容量は、プロトコールで後述するように、最初の容量を比例的に増加させ、QIAamp Minicolumnを複数回充填することにより処理することができる。

40

## 【0212】

精製プロトコールを開始する前に、i) 試料を室温（15-25℃）に平衡化し；ii

50

）後に溶出するためにA V Eバッファーを室温に平衡化し；i i i）A W 1バッファーとA W 2バッファーが指示書に従って準備されていることを確認し；およびi v）指示書に従ってA V Eバッファーで再構成された担体R N AをA V Lバッファーに添加する。

#### 【0213】

精製手順は以下の通りである。ステップ1では、 $2\mu\text{l}$ のt R N A-M a g M a x担体R N Aを含む $560\mu\text{l}$ の調製されたA V Lバッファーを $1.5\text{ml}$ のマイクロ遠心チューブに分注する。ステップ2では、 $140\mu\text{l}$ の血漿、血清、尿、細胞培養上清または細胞不含の体液をマイクロ遠心チューブ内のA V Lバッファー-担体R N Aに添加する。パルスボルテックスにより15秒間混合する。ステップ3では、室温（ $15-25^{\circ}\text{C}$ ）で10分間インキュベートする。ウイルス粒子の溶解は、室温で10分間の溶解後に完了する。より長いインキュベーション時間は、精製されたR N Aの収量または品質に影響を及ぼさない。潜在的に感染性の薬剤およびR N a s eは、A V Lバッファー中で不活性化される。

10

#### 【0214】

ステップ4では、蓋の内側から液滴を除くために、チューブを簡単に遠心分離する。ステップ5では、 $560\mu\text{l}$ のエタノール（ $96-100\%$ ）を試料に添加し、パルスボルテックスで15秒間混合する。混合後、蓋の内側から液滴を除くために、チューブを簡単に遠心分離する。ステップ6では、リムを濡らさずに、ステップ5の溶液 $630\mu\text{l}$ をQ I A a m p M i n iカラム（ $2\text{ml}$ 回収チューブ中）に注意深く注ぐ。キャップを閉め、 $6000\times g$ （ $8000\text{rpm}$ ）で1分間遠心分離する。Q I A a m p M i n iカラムを無菌の $2\text{ml}$ 回収チューブに入れ、濾液を含むチューブを廃棄する。遠心分離中のクロスコンタミネーションを避けるために各スピンカラムを閉じる。溶液が膜を完全に通過していない場合、溶液のすべてが通過するまで、より高速で再度遠心分離する。

20

#### 【0215】

ステップ7では、Q I A a m p M i n iカラムを慎重に開き、ステップ6を繰り返す。試料容量が $140\mu\text{l}$ より大きい場合、すべての溶解物がスピンカラムに充填されるまでこのステップを繰り返す。ステップ8では、Q I A a m p M i n iカラムを慎重に開き、 $500\mu\text{l}$ のA W 1バッファーを添加する。キャップを閉め、 $6000\times g$ （ $8000\text{rpm}$ ）で1分間遠心分離する。Q I A a m p M i n iカラムを無菌の $2\text{ml}$ 回収チューブ（付属）に入れ、濾液を含むチューブを廃棄する。元の試料容量が $140\mu\text{l}$ を超えたとしても、A W 1バッファーの容量を増やす必要はない。

30

#### 【0216】

ステップ9では、Q I A a m p M i n iカラムを慎重に開き、 $500\mu\text{l}$ のA W 2バッファーを添加する。キャップを閉め、最高速度（ $20,000\times g$ ； $14,000\text{rpm}$ ）で3分間遠心分離する。ステップ11を直接続行する、または可能性のあるA W 2バッファーのキャリーオーバーのいずれの機会も排除するためにステップ10を行い、次にステップ11に続ける。ステップ10では、任意選択的にQ I A a m p M i n iカラムを新しい $2\text{ml}$ 回収チューブに入れ、古い回収チューブを濾液とともに廃棄する。最高速度で1分間遠心分離する。

40

#### 【0217】

ステップ11では、Q I A a m p M i n iカラムを無菌の $1.5\text{ml}$ 微量遠心チューブに入れる。濾液を含む古い回収チューブを廃棄する。Q I A a m p M i n iカラムを慎重に開き、室温に平衡化された $60\mu\text{l}$ のA V Eバッファーを添加する。キャップを閉め、室温で1分間インキュベートする。 $6000\times g$ （ $8000\text{rpm}$ ）で1分間遠心分離する。 $60\mu\text{l}$ のA V Eバッファーを用いた1回目の溶出を行い、 $8\mu\text{l}$ または $5\mu\text{l}$ のアリコートをして $-20^{\circ}\text{C}$ または $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した。 $60\mu\text{l}$ の2回目の溶出を行い、1本のチューブで凍結した。

#### 【0218】

ステップ12では、各試料R N Aに2倍容量のR N A結合バッファーを添加し、混合し、次に、等容量のエタノール（ $95-100\%$ ）を添加することにより、R N Aストック

50

をRNA Clean & Concentrator-5カラム (Zymo Research) を用いて濃縮する。試料を2 ml回収チューブ中のZymo-Spin (商標) ICカラムに移し、30秒間遠心分離し、フロースルーを廃棄する。400  $\mu$ lのRNA Prepバッファをカラムに添加し、30秒間遠心分離し、フロースルーを廃棄し、続いて700  $\mu$ lのRNA洗浄バッファを添加し、30秒間遠心分離し、フロースルーを廃棄する。最後の400  $\mu$ l容量のRNA洗浄バッファをカラムに添加し、2分間遠心分離し、洗浄バッファの完全な除去を確認した後、カラムをRNase不含チューブに注意深く移す。7  $\mu$ lのDNase/RNase不含水をカラムマトリックスに直接添加し、30秒間遠心分離し、RNAを溶出する。

【0219】

10

#### B. 逆転写

鋳型としてHPgV-2試料RNAを用い、SS RT III (Invitrogen: 18080-051) を使用してランダムヘキサマープライミングによりcDNAを生成させた。これは、後述 (セクションC) する表1に列挙されたプライマーを用いたPCRによる検出を可能にするためであった。

【0220】

以下の容量を使用した: 7.6  $\mu$ lの試料RNA、1  $\mu$ lのランダムヘキサマー (50 ng/ $\mu$ l)、0.4  $\mu$ lのオリゴdT (50  $\mu$ M)、1  $\mu$ lのdNTPミックス (10 mM)。これを65  $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、氷に戻して、10  $\mu$ lのマスターミックスを添加した。マスターミックスは以下の通りであった: 2  $\mu$ lの10 RTバッファ、4  $\mu$ lの25 mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ lの0.1 M DTT、1  $\mu$ lのRNAse OUT (40 U/ $\mu$ l)、1  $\mu$ lのSuperscript III RT (200 U/ $\mu$ l)。25  $^{\circ}$ Cで10分間、次に50  $^{\circ}$ Cで80分間インキュベートする。85  $^{\circ}$ Cで5分間、次に4  $^{\circ}$ Cで終了する。反応液に1  $\mu$ lのRNAse H (Invitrogen, Y01220) を添加し、20分間37  $^{\circ}$ Cで、次に4  $^{\circ}$ Cでインキュベートする。cDNAをアリコートにして2  $\times$  10  $\mu$ lの試料にし、-80  $^{\circ}$ Cで凍結させた。

20

【0221】

#### C. HPgV-2プライマーの設計と試験

表1中の以下のプライマーは、HPgV-2の示された領域の一部分を増幅するために働くことが示された。

30

【0222】

【表 4】

表 1

| フォワード<br>プライマー |             |           |                             |      |  |
|----------------|-------------|-----------|-----------------------------|------|--|
| 検出される<br>領域    | プライマーの名称    | v35<br>座標 | 配列 (5'→3')                  | 配列番号 |  |
| S              | 35F         | 24        | TATTGCTACTTCGGTACGCCTAAT    | 12   |  |
| S              | 81F         | 76        | AAGGGCCTAGTAGGACGTGTGACA    | 13   |  |
| S              | 1F          | 119       | CACTGGG GTGAGCGGAG GCAGCAC  | 14   |  |
| S              | 15F         | 133       | GAG GCAGCACCGA AGTCGGGTGA A | 15   |  |
| E1             | 307F        | 702       | TGCCACCCATCCTATCTGCT        | 16   |  |
| E1             | 487F        | 882       | TATTGCTTGGTATGGCTGGGGTAT    | 17   |  |
| E1             | 804F        | 893       | ATGGCTGGGGTATACCTAARACA     | 18   |  |
| E2             | 1147F       | 1133      | TGGCGTACAAGCATCAATC         | 19   |  |
| E2             | 1392F       | 1374      | ACCGATTTCCGCTTTGTGCTAT      | 20   |  |
| E2             | 1840F       | 1819      | CCTGGGCTTGGGAAATGG          | 21   |  |
| X              | 2283F       | 2372      | CATG GGTGATTCG CGGACTACT    | 22   |  |
| X              | 2368F       | 2487      | CCTCGGGGA CATCACGGGC ATCTA  | 23   |  |
| X              | 2584F       | 2702      | CTGTTAATGCTGCGCTCAATAGAA    | 24   |  |
| NS2            | 2801F       | 2919      | GCGGGTATTTGGTCTTGAGGTTTG    | 25   |  |
| NS2            | 2978F       | 3372      | TTTGGATCACGCGGCACATACATA    | 26   |  |
| NS2            | 3028F       | 3423      | ACGGGTGGCGCAAGCAGTCAGG      | 27   |  |
| NS2            | NS23_F5     | 3478      | GAGGAGCCCACCTTTACTGA        | 28   |  |
| NS3            | プライマーセット 2  | 3601      | GAAGATCTGCCACCTGGTTT        | 29   |  |
| NS3            | プライマーセット 7  | 3668      | TCCTTCCTTAAGGCGACACT        | 30   |  |
| NS3            | 3535F       | 3929      | GAGCCGGGTTTGGGTGATGAATAA    | 31   |  |
| NS3            | プライマーセット 4  | 3940      | TGGGTGATGAATAACAACGG        | 32   |  |
| NS3            | プライマーセット 3  | 4005      | AATGACGACGTCTGTTTGA         | 33   |  |
| NS3            | 3681        | 4076      | ACGCGTTGATGCTCGGTGGTTACT    | 34   |  |
| NS3            | プライマーセット 15 | 4189      | CCAGCTGTGACACCAACATA        | 35   |  |
| NS3            | プライマーセット 1  | 4508      | AGTCATTTGCGACGAGTGTC        | 36   |  |
| NS3            | 5353F       | 5348      | GGC CCA CGG TCC TGA TGA TA  | 37   |  |
| NS3            | 5353Fv2     | 5348      | GGCCCAYGGTCCAGACGATR        | 38   |  |
| NS3            | 5353Fv128   | 5348      | GGCCCATGGTCCGGATGATG        | 39   |  |
| NS3            | 5605Fv2     | 5600      | CCGTTTGGAGYGTGAYAAC         | 40   |  |

10

20

30

|               |               |           |                                 |      |
|---------------|---------------|-----------|---------------------------------|------|
| NS4B          | 5605F         | 5600      | CTGTTTGGAGCGTTGAGGTC            | 41   |
| NS5A          | 6466F         | 6555      | TACYGGCACCTTGTTGACCACCTG        | 42   |
| NS5A          | 6383F         | 6778      | CTAGAGCGGCGGGGCGACAAA           | 43   |
| NS5A          | 6608F         | 7003      | GAGGCGGTTGAGCTGCTGGAAGAG        | 44   |
| NS5A          | 7284F         | 7279      | TAG TTC AGG CGG CTT CAC GGT TTG | 45   |
| NS5A          | 7499F         | 7588      | TGCGCCGT ACCAACAAAG             | 46   |
| NS5A          | 7661F         | 7606      | TGT CAC CCC TTG CAA ACT CCT ATT | 47   |
| NS5B          | 7783F         | 8178      | AGTGTACGACGCTCCAATG             | 48   |
| NS5B          | 8285F         | 8280      | GCA CGA GTC GCG GAG AAA ATG A   | 49   |
| NS5B          | 7886F         | 8283      | ACG AGTCGCGGAG AAAATGA          | 50   |
| NS5B          | 8385F         | 8380      | CGC GCC TAC TGG AAC AAT         | 51   |
| NS5B          | 8781F         | 8776      | ACG CGC TTGATG ACT ATG GGT TTA  | 52   |
| NS5B          | 9080F         | 9075      | TTG ACG GTC CAC GGT AAC AG      | 53   |
| NS5B/3'UTR    | 3raceo_9186F  | 9275      | TGATCAAGTYGGGCGGGTGAAT          | 357  |
| NS5B/3'UTR    | 3raceo2_9249F | 9338      | GAACACCACARCCCGAACCAA           | 358  |
| NS5B/3'UTR    | 9276F         | 9394      | CGTCCGTACGAAAATTTGCACTTGAG      | 359  |
| NS5B/3'UTR    | 9312F         | 9429      | CGCAATCGTGGTGCTAGTCGCTTACG      | 360  |
| NS5B/3'UTR    | 3racei_9380F  | 9469      | GCTAGTGCTATACTCGCTCTGCTT        | 361  |
| リハース<br>プライマー |               |           |                                 |      |
| 検出される<br>領域   | プライマーの名称      | v35<br>座標 | 逆平行の配列 (5'→3')                  | 配列番号 |
| S             | 208R          | 297       | TGATAGGGTG GCGGCGGGC            | 362  |
| S             | E5RACEin311R  | 400       | ATACCTCCTC GGGCTGCC             | 363  |
| S             | E313R         | 430       | ATGGGAGCTA CCACTGCGGT G         | 364  |
| S             | 345R          | 462       | GCCGGTCACC AAGTCGTRTG CAG       | 365  |
| S             | E5RACEo448R   | 537       | GGTATGTGTT CSATCCGGTC CAAA      | 366  |
| E2            | 1042R         | 1131      | ATCCTTCT GGCTAGTCCT ACGGTT      | 367  |
| E2            | 1227R         | 1316      | TT TATTTGTTCA TGGGGGTCGTG       | 368  |
| E2            | 957R          | 1352      | GAAAACATCA CGCGTCCATA CAC       | 369  |
| E2            | 990R          | 1385      | CACCAGCACC GATTTCGC             | 370  |
| E2            | 1558R         | 1539      | TTGTATTCTT GACCGCCGG            | 371  |
| E2            | 2009R         | 1993      | GTAATCCGAC GCCTGGCCG            | 372  |
| X             | 2331R         | 2302      | TGTGTCTGCC GGTTGCGA             | 373  |
| X             | 2628R         | 2717      | TCTCACCTGT TAATGCTGCG CT        | 374  |
| NS2           | 3015R         | 3133      | CTGTCGGTTG TGGTCCTCTC GGTC      | 375  |
| NS2           | 3317R         | 3435      | AAGTCTCGGA ACGGGTGGCG CAA       | 376  |
| NS3           | プライマーセット 5    | 3548      | TGGACAATTGCTTGGAGGTA            | 377  |
| NS3           | 3553R         | 3690      | TCCTTCCTTA AGGCGACACT           | 378  |
| NS3           | 3607R         | 3744      | ATCGTGGTGT TGTCTTCCCT           | 379  |
| NS3           | 3402R         | 3797      | CACTGTATGC GACCGGCCA            | 380  |
| NS3           | 3536R         | 3922      | TAGACCCCTG CTGCTGTTG CCGA       | 381  |
| NS3           | プライマーセット 4    | 4025      | CTGTCCCACGCACATAGATC            | 382  |
| NS3           | プライマーセット 3    | 4073      | TTTGTGTGATCACGGTCATG            | 383  |
| NS3           | プライマーセット 15   | 4372      | CCAAGTGTGGCTGTAGTCAAA           | 384  |

10

20

30

40

|       |            |          |                             |     |
|-------|------------|----------|-----------------------------|-----|
| NS3   | 4092R      | 4487     | GACGAATCTG CGGGGCTATG CTGT  | 385 |
| NS3   | 4151R      | 4446     | GCTACTCGGC ATTGGCGCAG       | 386 |
| NS3   | プライマーセット 1 | 4584     | AAAGCTGGAGTGAAGACCGT        | 387 |
| NS4   | 5325R      | 5414     | AACAACAGTAACAA AACACCCCT    | 388 |
| NS4B  | 6109R      | 6104     | CTTCCTGTTTGGGTGCCTTAC       | 389 |
| NS4B  | 6129R      | 6124     | TTACAGGTTGGGAAGCCGTGGTCG    | 390 |
| NS4B  | 6129Rv2    | 6124     | TTACAGGTTG GGAGGCCGTG GTYG  | 391 |
| NS4B  | 6129Rv128  | 6124     | TTACGGGTTG GGAAGCCGTG GTCG  | 392 |
| NS5A  | 6701R      | 6789     | WTCGTGGAKY TAGAGCGSCG G     | 393 |
| NS5A  | 6907R      | 7293     | GTAGTTCAGG CGGCTTCACG GTTT  | 394 |
| NS5A  | 7012R      | 7407     | AGTTTGAGGC CACCGCAGTA CCA   | 395 |
| NS5B  | 7850R      | 7939     | TTGAYGTCYC CGAGCGGCAG G     | 396 |
| NS5B  | 8211R      | 8606     | GTTGTCGGGG TCGTAGCTG TCG    | 397 |
| NS5B  | 8278R      | 8666     | CTCAAGGTTG GCGCAGCT         | 398 |
| NS5B  | 8080R      | 8076     | AGGATGCTGTGTCAAAGATGCGCG    | 399 |
| NS5B  | 9012R      | 9007     | TATCCTACTGCGGCTGTGACTGTC    | 400 |
| NS5B  | 9227R      | 9222     | CCTCAGCGTTGGCCTTCTTTG       | 401 |
| 3'UTR | 9616R      | 9611     | CCTATCCGAGTTGGGCAAG         | 402 |
| NS5B  | 9363R      | 9358     | GTAAGAACACCACAGCCCGAACCA    | 403 |
| 3'UTR | 9690R      | 9808     | ACCACTTAAT GGTCGTAACG CGACC | 404 |
| 3'UTR | 9749R      | 9867(末端) | GTCAACGGCC CCTTTCATT        | 405 |

10

20

## 【0223】

表1に列挙されているフォワードおよびリバースプライマーは、表に列挙された順序でプライマー対を形成する。例えば、以下は、配列番号に基づく以下のプライマー対が提供される：12：362、13：363、14：364、15：365、16：366、17：367、18：368、19：369、20：370、21：371、22：372、23：373、24：374、25：375、26：376、27：377、28：378、29：379、30：380、31：381、32：382、33：383、34：384、35：385、36：386、37：387、38：388、39：389、40：390、41：391、42：392、43：393、44：394、45：395、46：396、47：397、48：398、49：399、50：400、51：401、52：402、53：403、357：404および358：405。これらのプライマーの他の組合せを用いて、他のプライマー対を作ることができる。

30

## 【0224】

結果

UC0125. US試料中のHPgV-2の存在は、下記に見出される以下のプライマー対を用いて最初に確認された：NS3：3841Fおよび4460R（配列番号38および39）、3987Fおよび4398R（配列番号40および41）；NS5A：6689Fおよび7318R（配列番号42および43）、6914Fおよび7213R（配列番号44および45）；NS2-NS3：3334Fおよび3708R（配列番号34および35）；およびE1-E2：793Fおよび1263R（配列番号14および15）。期待されるサイズのバンドは、40サイクルのRT-PCRの1ラウンド後に検出され、サンガー法によって配列決定され、HPgV-2ウイルスの存在の決定的証拠を与えた。

40

## 【0225】

D. 次世代シーケンシングライブラリーPrep

ランダムにプライムされたライブラリーは、製造業者の推奨に従って、Ovation（登録商標）RNA-SeqV2キット（NuGen、部品番号7102）を用いて、次世代シーケンシング（NGS）のために上記で検討した試料から調製された。各々5μ

50

1 の R N A（上記の（A）に記載されるように前処理され、抽出された。）を出発材料として用いた。サーマルサイクラープログラムは以下の通りであった。

【0226】

プログラム1：第1鎖プライマーアニーリング（RNA入力が1 ngを超える場合） 65℃－5分、4℃で保持。

【0227】

プログラム2：第1鎖合成 4℃－1分、25℃－10分、42℃－10分、70℃－15分、4℃で保持。第2鎖cDNA合成。

【0228】

プログラム3：第2鎖合成 4℃－1分、25℃－10分、50℃－30分、80℃－20分、4℃で保持。

【0229】

プログラム4：S P I A（登録商標）増幅 4℃－1分、47℃－60分、80℃－20分、4℃で保持。

【0230】

第1鎖cDNA合成－第1鎖cDNA合成試薬（青色）およびヌクレアーゼ不含有水（緑色）を解凍する。A3 ver 1を短時間スピンし、氷上に置く。A1 ver 4とA2 ver 3をボルテックスし、回転させ、氷上に置く。室温でヌクレアーゼ不含有水を放置する。氷上で、0.2 μlのPCRチューブ中に2 μlのA1と5 μlの総RNA試料（500 pgから100 ng）を混合する。プログラム1（65℃－2分間、4℃または65℃－5分間保持、4℃で保持）を実行するサーマルサイクラーにチューブを入れる。サーマルサイクラーが4℃に達したら、チューブを取り外して氷上に置く。第1鎖マスターミックスを準備する。A3酵素をゆっくりとピペティングし、チップを少なくとも5回、バッファーで濯ぐ。

【0231】

試料あたり2.5 μlのバッファー混合物A2＋0.5 μlの酵素混合物A3を合わせる。3 μlの第1鎖マスターミックスを各チューブに添加し、ピペティングにより混合し、回転させ、氷上に置く。プログラム2（4℃－1分間、25℃－10分間、42℃－10分間、70℃－15分間、4℃で保持）を実行するサーマルサイクラーにチューブを入れる。サーマルサイクラーが4℃に達したら、チューブを取り出し、回転させ、氷上に置く。第2鎖cDNA合成を直ちに続ける。

【0232】

第2鎖cDNA合成－Ovation RNA-SeqシステムV2に付属したAgen court（登録商標）RNAClean（登録商標）XPビーズを再懸濁させ、室温で放置して次のステップで使用する。第2鎖cDNA合成試薬（黄色）を解凍する。簡単にB2 ver 2を回転させ、氷上に置く。B1 ver 3をボルテックスし、回転させ、氷上に置く。第2鎖マスターミックスを調製する。必ずB2酵素をゆっくりとピペティングする。

【0233】

試料あたり：9.7 μlのバッファー混合物B1＋0.3 μlの酵素混合物B2を合わせる。十分に混合する。10 μlの第2鎖マスターミックスを各反応チューブに添加し、ピペティングにより混合し、回転させ、氷上に置く。プログラム3（4℃－1分、25℃－10分、50℃－30分、80℃－20分、4℃で保持）を実行するサーマルサイクラーにチューブを入れる。サーマルサイクラーが4℃に達したら、チューブを取り出し、回転させ、ベンチ上部に置く。直ちにcDNAの精製を続ける。

【0234】

cDNAの精製－RNAClean XPビーズが室温に達していることを確認する。数回転倒することによりビーズを混合する。室温で、32 μlのRNAClean XPビーズを各反応チューブに添加し、10回ピペティングにより混合する。室温で10分間インキュベートする。チューブを磁石に移し、さらに5分間放置する。結合バッファー

のうち45  $\mu$ lのみを除く。新たに調製した70%エタノールを200  $\mu$ l添加し、30秒間放置する。ピペットを用いてエタノールを除去する。エタノール洗浄をもう2回繰り返す。最終洗浄後にすべての余分なエタノールを除去し、ビーズを15から20分間、空気が乾燥させる。チューブが完全に乾燥し、エタノールが残っていないことを確認する。乾燥したビーズに結合したcDNAを用いて、SPIA増幅を直ちに続ける。

#### 【0235】

SPIA増幅—SPIAは、DNA/RNAキメラSPIAプライマー、DNAポリメラーゼおよびRNAse Hを用いてDNAを増幅する等温鎖置換増幅プロセスである。SPIA増幅試薬（赤色）を解凍する。C3 ver 7を反転させて混合し、回転させ、氷上に置く。C1 ver 9とC2 ver 11をボルテックスし、回転させ、氷上に置く。SPIAマスターミックスを調製する。試料あたり20  $\mu$ lのバッファーミックスC2+10  $\mu$ lのプライマーミックスC1+10  $\mu$ lの酵素ミックスC3を合わせる。40  $\mu$ lのSPIAマスターミックスを各反応チューブに添加し、ピペッティングにより完全にビーズを再懸濁させる。氷上に置く。プログラム4（4℃—1分間、47℃—60分間、80℃—20分間、4℃で保持）を実行するサーマルサイクラーにチューブを入れる。サーマルサイクラーが4℃に達したら、チューブを取り出し、回転させ、氷上に置く。ビーズを磁石で取り出し、新しいチューブに移す；−20℃でSPIA cDNAを保存する。

#### 【0236】

次に、試料UC0125. USのSPIA増幅cDNAをAMP純粋磁気ビーズ（Beckman Coulter、A63880）（1.8×容量=72  $\mu$ lのビーズ）を用いて精製し、30  $\mu$ lのEBバッファー中に溶出した。試料ABT0070P. USおよびABT0096P. USのSPIA増幅cDNAを以下のようにQiagen MinEluteプロトコルを使用して精製した：（注記：これが精製の好ましい方法である。）：300  $\mu$ lのERC（酵素反応浄化）バッファーを40  $\mu$ lの試料に添加する。次に、5秒間ボルテックスし、試料全部をカラムに充填する（4℃で保存）。14K rpmで1分間回転させる。フロースルーを廃棄し、700  $\mu$ lのPEバッファー（EtOHを添加）をカラムに添加する。14K rpmで1分間回転させ、次に、フロースルーを廃棄する。同じ回収チューブでカラムを交換し、14K rpmで2分間、再度回転させる。回収チューブを廃棄し、PEバッファーからいずれの残存EtOHも除去するためにカラムチップをペーパータオルに吸い取らせる。最後に、新鮮なエペンドルフ回収チューブに置かれたカラムフィルターの中央に25  $\mu$ lのEBバッファーを添加する。1分間放置し、次に、11K rpmで1分間回転させる。溶出したライブラリーを氷上または−20℃で保存する。

#### 【0237】

E. cDNA収量およびサイズ範囲の決定

ライブラリーのサイズを推定するために、アガロースゲル上で各cDNAの1から2  $\mu$ lを泳動する。Qiagen Viral Mini抽出では、それらは、概して、長さは150–250bpである。dsDNA\_\_BR（広範囲）試薬（Molecular Probes/Life Technologies）を使用してQubit蛍光光度計で濃度を測定する。あるいは、ライブラリーは、BioAnalyzer 2200 TapeStation上で評価することができる。

#### 【0238】

F. 確認PCR

ライブラリーのウイルス特異的含有を評価するために確認PCRを行う。対象とする領域／遺伝子用のプライマーを選択する（セクションCの表1を参照されたい。）。PCR反応の鋳型として2  $\mu$ lのOvation cDNAを使用する。適切な対照を決定し、Applied Biosystems Taq試薬を使用する。2  $\mu$ lのcDNA鋳型に、15mMのMgCl<sub>2</sub>、0.5  $\mu$ lのdNTPミックス、0.5  $\mu$ lの10  $\mu$ M fwdプライマー、0.5  $\mu$ lの10  $\mu$ M revプライマー、0.2  $\mu$ lのTaq DN

Aポリメラーゼおよび18.8  $\mu$ lの水を含む2.5  $\mu$ lの10×PCRバッファーを添加する。予想に応じて30–50サイクル実行し、ライブラリーの品質／含量を決定するためにアガロースゲル上の産物を分離する。

#### 【0239】

G. Nextera タグメント化

Nextera XTを使用して、イルミナのアダプターとインデックスをライブラリーに組み込んだ。試料を多重化する場合、カラーバランスを達成するために互換性のあるバーコードを選択することが本質的である。下記のイルミナプロトコルを、Nextera XT試料Prepキット（イルミナ、#15032350）から適合させ、Nextera インデックスキットと併用した：ref #15032353。反応液を96穴プレートに集めることはできるが、しかしながら、試料を0.2 mlのPCRチューブに入れた。

10

#### 【0240】

ステップ1. 調製—ATM、TD、および入力DNAを−15℃から−25℃の保管場所から取り出し、氷上で解凍する。NTが室温になっていることを確認する。視覚的にNTを検査して、沈殿物がないことを確認する。沈殿物がある場合、すべての粒子が再懸濁するまでボルテックスする。解凍後、チューブを静かに3–5回反転させてすべての試薬が適切に混合されていることを確認した後、微量遠心分離器で簡単に回転させる。記載されるように試薬容量をアリコートにし、反応液にTDバッファー：（試料#+1）\*10  $\mu$ l、ATM：（試料#+1）\*5  $\mu$ l、NT：（試料#+1）\*5  $\mu$ l、NPM：（試料#+1）\*15  $\mu$ l、インデックス2：（試料#+1）\*5  $\mu$ l、インデックス1：（試料#+1）\*5  $\mu$ lを添加するまで氷上（NTを除く。）に置く。

20

#### 【0241】

ステップ2. 入力DNAのタグメント化—キットの性能を最適化するために、記載された順番で反応が組み立てられていることを確認する。反応は氷上で組み立てる必要はない。新しい96ウェルTCYプレートNTA（Nextera XTタグメント増幅プレート）または0.2 mlチューブを標識する。cDNAを水中で0.2 ng/ $\mu$ lに希釈する。これは、典型的には、出発cDNAの約30–300倍希釈である。最適な結果を得るに、1 ngの入力（0.2 ng/ $\mu$ lの5  $\mu$ l）が必要である。0.2 ng/ $\mu$ lの最終濃度に最も正確に到達するには、適切な容量の水中の約2  $\mu$ lのストックを使用する。このアッセイに使用される各ウェルに10  $\mu$ lのTDバッファーを添加する。試料間でチップを変更する。NTAプレート／チューブの各試料ウェルに0.2 ng/ $\mu$ lの入力DNA 5  $\mu$ l（合計1 ng）を添加する。入力DNAおよびTDバッファーを含むウェル／チューブに5  $\mu$ lのATMを添加する。試料間でチップを変更する。ゆっくりと上下に5回ピペッティングし、混合する。試料間でチップを変更する。Microseal「B」でNTAプレートを覆う。280×gで20℃で1分間遠心分離する。NTAプレート／チューブをサーモサイ클ラーに入れ、以下のプログラムを実行する：55℃で5分間；10℃で保持する。試料が10℃に達したら、すぐに中和NTAに進める。

30

#### 【0242】

ステップ3. NTAを中和する—Microseal「B」シールを慎重に除去し、NTAプレートの各ウェル／チューブに5  $\mu$ lのNTバッファーを添加する。試料間でチップを変更する。ゆっくりと上下に5回ピペッティングし、混合する。試料間でチップを変更する。Microseal「B」でNTAプレートを覆う／密閉チューブ。280×gで20℃で1分間遠心分離する。NTAプレート／チューブを室温で5分間置く。タグメント化ステップ後、下記のようにサイクリング条件を設定する。

40

#### 【0243】

ステップ4. ライブラリー増幅とバーコードの追加—TruSeq インデックスプレート固定具／チューブ中のNTAプレートを氷上で置く。15  $\mu$ lのNPM（Nextera PCRミックス）をインデックスプライマーを含むNTAプレート／チューブの各ウェルに添加する。NTAプレート／チューブの各カラムに5  $\mu$ lのインデックス2プライ

50

マー（白色キャップ）を添加する。クロスコンタミネーションを避けるにカラム間のチップを変更することが重要である。NTAプレート／チューブの各列に5 µlのインデックス1プライマー（オレンジキャップ）を添加する。インデックスのクロスコンタミネーションを避けるために各列の後にチップを変更する必要がある。

#### 【0244】

プレートをマイクロシール「A」で覆い、ゴムローラー／密閉チューブで密封する。20℃、1分間、280×gで遠心分離する。サーマルサイクラー上で以下のプログラムを使用してPCRを行う：インキュベーション中に、サーモサイクラーの蓋が加熱されていることを確認する：72℃で3分間；95℃で30秒間；95℃で10秒間、55℃で30秒間、72℃で30秒間、および72℃で5分間の16サイクルを設定する。10℃で保持する。

10

#### 【0245】

ライブラリー精製一次に、試料を1.8×AMP-PURE XPビーズ（Beckman Coulter、A63880）を用いて精製し、40 µlのRSBバッファー（Illumina提供）中に溶出した。

#### 【0246】

H. ライブラリー定量化および可視化

Agilentからの以下の試薬を使用して、BioAnalyzer 2200 TapeStationで試料（1 µl）を視覚化する：D1Kスクリーンテープ：ref #00-S019-120707-02-000084 D1Kラダー：ref #52715 90-240 試料バッファー：ref #52907 98-221。1 µlのライブラリー試料に3 µlの泳動バッファーを添加する。チューブストリップをキャップし、次に、ボルテックスし、回転して、回収する。キャップを外し、TapeStationの適切なスロットに置く。試料情報を入力し、電気泳動を実行する。濃度を決定するためにピークの積分測定ウィンドウ限界を調整する。

20

#### 【0247】

I. MiSeq実行のために準備する

MiSeq上でHPgV-2含有ライブラリーを実行するために以下の手順に従った。ステップ1. -20℃の試薬カートリッジ（例えば、300または500サイクルのV2試薬キット；イルミナ、15033625）を指定されたラインに満たされた水容器中で解凍する。HTバッファーをRTでベンチに置く。両方を1時間解凍させ、カートリッジを数回反転させた後、ベンチ上で軽く叩いて、底からいずれの気泡も除去する。試料を希釈／泳動させる準備が整うまで、カートリッジとHT1バッファーを冷蔵庫に入れて置く。4℃の試薬ボックスを室温（バッファーとフローセル）に置く。バッファーを振とう／反転させて、泡を1時間を超えて消散させる。ddH<sub>2</sub>Oでフローセルを完全に洗浄して塩を除去し、キムワイプで完全に乾燥する。

30

#### 【0248】

ステップ2. イルミナ実験マネージャー（IEM）で新しい試料シートを作製する。MiSeq→小さいゲノム→再配列決定ワークフローを選択する。実験名、試薬ID、試料IDおよびバーコード情報を記録する。

40

#### 【0249】

ステップ3. シークエンシングライブラリーの多重化のためにライブラリーを等モル量（または必要に応じて）で組み合わせる。BioAnalyzerで測定した濃度（nM）を用いて、各ライブラリーを18 µl中で1.1 nMの最終濃度にするために水で行うべき希釈を計算する。2 µlの1N NaOHを添加し、室温で5分間変性させる。

#### 【0250】

ステップ4. 最終ライブラリー濃度が20 pMとなるように、1 nMライブラリー（20 µl）を980 µlのHT1で希釈する。ボルテックスして氷上に置く。

#### 【0251】

ステップ5. 10 pMライブラリーのために1：1にHT1バッファーで2回目を希釈

50

し、1% Ph i X 対照を添加し、次にボルテックスして氷上に置く。ライブラリーは、500  $\mu$  l の 20 pM ライブラリー、10  $\mu$  l の Ph i X (希釈および変性される)、および 490  $\mu$  l の HT1 バッファーを含む必要がある。

#### 【0252】

ステップ6. 96  $^{\circ}$ C で2分間加熱することにより10 pM ライブラリー (+1% Ph i X) を変性させ、次いで氷水浴上に5分間を超えて置く。

#### 【0253】

ステップ7. Mi Seq 制御ソフトウェアに行き、「配列」を押し、機器をセットアップする。付属の説明書に従って、実験試料シートをロードする。

#### 【0254】

ステップ8. 600  $\mu$  l の10 pM ライブラリーを試薬カートリッジに分注し、「開始」を押し。

#### 【0255】

結果

Mi Seq 実行を完了し、データを実施例1で生成したコンセンサスゲノム配列とアラインさせた。HPgV-2 試料バーコードに割り当てられた合計16,306,796個のリードから、249,693 (1.53%) がHPgV-2 にマッピングされた。配列は、均一にアラインされ、ギャップはなく、ゲノムの98.4% をカバーし、平均深度が3314 X  $\pm$  426 リード / nt である。重複の領域では、この独立したNGS データセットは、すべてのミスマッチが保存されている (例えば、A  $\rightarrow$  G、C  $\rightarrow$  T) または後者において曖昧な塩基 (例えば、R  $\rightarrow$  A、G) を解明して、実施例1で作製されたドラフトゲノムと99.73% の同一性 (9290 / 9315) を有した。3' RACE によって以前に決定された3' 末端の156 bp は、このNGS 実行には存在しなかったが、しかし、デノボアセンブリーによってデータを採取して、5' 末端をさらに306ヌクレオチドに伸長させ、それにより、推定コアタンパク質 (S) および / または5' UTR 配列に添加する。実施例1および2からの組み合わせられたデータは、図1に見出される9778 bp のゲノム配列 (配列番号1) を生じさせた。HPgV-2 のさらなる株についてのその後のNGS 実行は、ゲノムの全長が現在9867 nt となるように5' UTR を伸長した。

#### 【0256】

##### [実施例3]

インビトロHPgV-2 鋳型対照の生成およびqPCR アッセイ

この実施例は、HPgV-2 鋳型陽性対照を生成するための方法およびこの鋳型を用いて実行されるqPCR アッセイを記載する。HPgV-2 中のNS2-NS3 領域は、qPCR によって検体をプローブするように選択された。本発明者らのNGS データに基づく、この領域は、最も少ない配列異種性を示した。クローニングされた領域は約1260 bp 長であり、このHPgV-2 鋳型のインビトロ転写を可能にするためにpGEM-11Zf (+) (Promega、Madison WI) に挿入した。このクローニングされた配列は、配列番号1の塩基3224から4483を表し、図4に示される。以下にさらに記載するように、HPgV-2 RNA を検出するために5セットのプライマーおよびプローブを設計した。

#### 【0257】

A. インビトロ転写鋳型として使用するためにNS23EX プラスミドを線状化する。

#### 【0258】

ステップ1-4  $\mu$  g の凍結乾燥プラスミドを20  $\mu$  l の溶出バッファー (EB) に再懸濁し、200 ng /  $\mu$  l の濃度にする。

#### 【0259】

ステップ2-1260 bp インサートの末端に見出される制限酵素 (単数または複数) XbaI およびHindIII を用いて消化する。pGEM (登録商標) -11Zf (+) ベクターは、標準的なクローニングベクターとして、およびインビトロ転写とssDN

10

20

30

40

50

Aの産生のための鋳型として用いることができる。プラスミドは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの $\alpha$ -ペプチドコード領域内にあるマルチクロニング領域に隣接するT7およびSP6

RNAポリメラーゼプロモーターを含む。以下の反応混合物を生成した：5  $\mu$ lのDNA (1  $\mu$ g)、2  $\mu$ lの10 $\times$ Mバッファー、2  $\mu$ lの0.1%BSA、1  $\mu$ lのXbaI、1  $\mu$ lのHindIIIおよび9  $\mu$ lの水。これを37 $^{\circ}$ Cにて2.25時間インキュベートした。

#### 【0260】

ステップ3-20  $\mu$ lのDNA、2  $\mu$ lのNH4停止溶液 (Ambion) および40  $\mu$ lのEtOHの反応混合物中で線状プラスミドDNAを沈殿させる。-20 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートする；最高速度で15分間回転させる；80%EtOHで洗浄し、5分間再回転する。5分間乾燥させ、10  $\mu$ lのEB中に再懸濁し、100 ng/ $\mu$ lの推定濃度にする。

10

#### 【0261】

ステップ4-NanoDrop上でDNA濃度を測定する。

#### 【0262】

ステップ5-アガロースゲルでプラスミド消化を視覚化する。未切断ベクターと切断ベクターを並べて泳動し、比較する。

#### 【0263】

B. インビトロで転写可能なNS23EXインサート

推奨されるようにAmbion Megascript T7キット (AM1334) プロトコルに従い、次にRNAを精製する。ステップ1：20  $\mu$ lのインビトロ転写反応を組み立てる。鋳型DNAの入力容量は以下の通りであった：6.3  $\mu$ lの線状NS23Ex\_\_pGEM11Zf (1  $\mu$ g) + 1.7  $\mu$ lの水；2.0  $\mu$ lの対照pTRI-Xefベクター+6  $\mu$ lの水。プレートインキュベーター (乾燥) で4時間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。1  $\mu$ lのDNaseを添加し、15分間、37 $^{\circ}$ Cで消化する。

20

#### 【0264】

ステップ2：トリゾール精製-230  $\mu$ lの水に反応液を再懸濁し、次に750  $\mu$ lのトリゾールを添加する。25  $\mu$ lの水中でpTRIペレットを、50  $\mu$ lの水中でNS23Exペレットを懸濁する。

#### 【0265】

ステップ3：R6Kスクリーンテープを用いて上記のようにNanodropおよびBioAnalyzerでRNAを定量する。

30

#### 【0266】

C. 逆転写

ランダムヘキサマープライミング用のSS RTIII (Invitrogen: 18080-051) を用いてcDNAを生成させた。NS23EX/pGEM11-Zf (+) プラスミドからインビトロで転写されたHPgV-2 RNAおよびAmbionからのpTRI-Xef対照RNAを鋳型として用いた。反応を以下の通り組み立てた：2.0  $\mu$ lのRNA (約400 ng) (NS23EX RNAの1/10希釈を使用した；pTRIについては希釈しないで使用した。)、5.6  $\mu$ lの水、1  $\mu$ lのランダムヘキサマー (50 ng/ $\mu$ l)、0.4  $\mu$ lのオリゴdT (50  $\mu$ M) および1  $\mu$ lのdNTPミックス (10 mM)。65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、氷に戻して、10  $\mu$ lのマスターミックスを添加する。マスターミックスを以下のとおりに調製する：2  $\mu$ lの10RTバッファー、4  $\mu$ lの25 mM MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ lの0.1 M DTT、1  $\mu$ lのRNase OUT (40 U/ $\mu$ l) および1  $\mu$ lのSuperscript III RT (200 U/ $\mu$ l)。

40

#### 【0267】

25 $^{\circ}$ Cで10分間、次に50 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートする。85 $^{\circ}$ Cで5分間、次に4 $^{\circ}$ Cで終了する。反応液に1  $\mu$ lのRNase H (Invitrogen、Y01220) を添加し、37 $^{\circ}$ Cで20分間、次に4 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。cDNAをアリコー

50

トにして  $2 \times 10 \mu\text{l}$  の試料にし、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結した。

#### 【0268】

E. HPgV-2 PCR

以下のプライマーを用いて HPgV-2 RNA を確認した。これらのプライマーは、HPgV-2 ゲノムの旧バージョンで命名された。それらの配列 ID 番号を参照されたい。

#### 【0269】

##### 【化1】

PCR1\_617 bp 産物

GAGCCGGGTTTGGGTGATGAATAA 3841F (配列番号 :38)

CTGCGCCAATGCCGAGTAGC 4460R (配列番号 :39)

PCR2\_412 bp 産物

ACGCGTTGATGCTCGGTGGTTACT 3987F (配列番号 :40)

ACAGCATAGCCCCGCAGATTCGTC 4398R (配列番号 :41)

#### 【0270】

以下の容量の試薬を PCR に使用した。鋳型として  $2 \mu\text{l}$  の希釈 cDNA (NS23EX、pTRI;  $1.5 \mu\text{l}$  の cDNA ストック +  $8 \mu\text{l}$  の水を添加);  $15 \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  を含む  $2.5 \mu\text{l}$  の  $10 \times$  PCR バッファー;  $0.5 \mu\text{l}$  の dNTP ミックス;  $0.5 \mu\text{l}$  の  $10 \mu\text{M}$  フォワードプライマー;  $0.5 \mu\text{l}$  の  $10 \mu\text{M}$  リバースプライマー;  $0.2 \mu\text{l}$  の Taq DNA ポリメラーゼ; および  $18.8 \mu\text{l}$  の水。以下の PCR 条件を使用する:  $94^\circ\text{C}$  で 2 分間、1 サイクル;  $94^\circ\text{C}$  で 20 秒間、 $55^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $72^\circ\text{C}$  で 40 秒間の 35 サイクル;  $72^\circ\text{C}$  で 7 分間、1 サイクル;  $4^\circ\text{C}$  で 保持、1 サイクル。 $5 \mu\text{l}$  の各試料をエチジウムブロマイドゲルで分離し、UV 光下で撮影した。

#### 【0271】

F. 7つのプライマーセットを用いた qPCR

患者検体中の HPgV-2 RNA の検出のための TaqMan ベースの qPCR アッセイを確立するために、以下を実施した。インビトロで転写された RNA (NS23EX =  $2000 \text{ng} / \mu\text{l}$ )、最初の希釈を  $1 / 100$  ( $20 \text{ng} / \mu\text{l}$ ) で開始する → 合計  $100 \text{ng}$  について  $5 \mu\text{l}$  をロードする。合計 6 回の希釈について  $18 \mu\text{l}$  の水中の  $2 \mu\text{l}$  を用いて 10 倍希釈を繰り返す。pTRI ( $200 \text{ng} / \mu\text{l}$ ) について、 $1 / 10$  で希釈する → 合計  $100 \text{ng}$  について  $5 \mu\text{l}$  をロードする。総 RNA について、各 RNA の  $3 \mu\text{l}$  をとり、 $27 \mu\text{l}$  の水でそれを希釈する ( $1 / 10$ )。この実験においては、全て同じ方法で抽出した、UC0125. US、CHU2725 [HIV (+) / GBV-C (+) 試料] および N-505 [HIV (+) / GBV-C (-) 試料] を含む。

#### 【0272】

ABI ライトサイクラー (Abbot m2000rt) 上での qPCR については以下の通り、列挙された濃度でプライマーおよびプローブを希釈し、反応液を組み合わせる:

1  $2.5 \mu\text{l}$   $2 \times$  RT-PCR バッファー

1  $\mu\text{l}$  フォワードプライマー、 $10 \mu\text{M}$

1  $\mu\text{l}$  リバースプライマー、 $10 \mu\text{M}$

1  $\mu\text{l}$  Taqman プローブ、 $3 \mu\text{M}$

1  $\mu\text{l}$   $25 \times$  RT-PCR 酵素ミックス

5  $\mu\text{l}$  RNA 試料

3.  $5 \mu\text{l}$  スクレアーゼ不含有

25  $\mu\text{l}$  ウェルあたり合計  $20 \mu\text{l}$  のマスターミックス

#### 【0273】

使用した 7 セットのプローブおよびプライマー対を以下の表 2 に示す。これらの配列の

10

20

30

40

50

結合位置を図 4 に示す。

【 0 2 7 4 】

【 表 5 】

表 2

プライマーセット 5: アンプリコンサイズ = 70

NS23Ex\_F5 GAGGAGCCACCTTTACTGA ( 配列番号 :54)

NS23Ex\_R5 TACCTCCAAGCAATTGTCCA ( 配列番号 :55)

NS23Ex\_Pr5 CACCAAACCTCATTGTGTCATCCACGA ( 配列番号 :56)

10

プライマーセット 2: アンプリコンサイズ = 89

NS23Ex\_F2 GAAGATCTGCCACCTGGTTT ( 配列番号 :57)

NS23Ex\_R2 AGTGTGCGCTTAAGGAAGGA ( 配列番号 :58)

NS23Ex\_Pr2 CCACCGGAGCACTCAGCTGG ( 配列番号 :59)

プライマーセット 7: アンプリコンサイズ = 74

NS23Ex\_F7 TCCTTCCTTAAGGCGACACT ( 配列番号 :60)

NS23Ex\_R7 AGGGAAGACAACACCACGAT ( 配列番号 :61)

NS23Ex\_Pr7 AAACACCAGGGTCCGGCCAG ( 配列番号 :62)

20

プライマーセット 4: アンプリコンサイズ = 85

NS23Ex\_F4 TGGGTGATGAATAACAACGG ( 配列番号 :63)

NS23Ex\_R4 GATCTATGTGCGTGGGACAG ( 配列番号 :64)

NS23Ex\_Pr4 CCACTCTGCCACACACCAACCC ( 配列番号 :65)

30

プライマーセット 3: アンプリコンサイズ = 88

NS23Ex\_F3 AATGACGACGTCTGTTTGGA ( 配列番号 :66)

NS23Ex\_R3 CATGACCGTGATCACACAAA ( 配列番号 :67)

NS23Ex\_Pr3 CTGGTGAGCCCGAAGCACCC ( 配列番号 :68)

プライマーセット 15: アンプリコンサイズ = 138

NS23Ex\_F15 CCAGCTGTGACACCAACATA ( 配列番号 :69)

NS23Ex\_R15 TTGACTACAGCCACACTTGG ( 配列番号 :70)

NS23Ex\_Pr15 CCAGTGGACCTAGTCAAACAGGGACA ( 配列番号 :71)

40

プライマーセット 1: アンプリコンサイズ = 96

NS23Ex\_F1 AGTCATTTGCGACGAGTGTC ( 配列番号 :72)

NS23Ex\_R1 ACGGTCTTCACTCCAGCTTT ( 配列番号 :73)

NS23Ex\_Pr1 TCGGCATACATGCGCACTGC ( 配列番号 :74)

50

## 【0275】

G. qPCRアッセイA-HPgV2のTaqManベースの検出

プローブおよびプライマー対1、2、3、5および7を用いたTaqManアッセイを実施して、NS23Exインビトロ転写物の10倍段階希釈およびUC0125. US RNAの10倍希釈を検出した。Applied Biosystemsからプライマーを注文し、HPLC精製した。プローブは5' 6FAMおよび3' TAMRA修飾を有する。Ag Path-ID One Step RT-PCRキット (Applied Biosystems、438724) をバッファーおよび酵素混合物に使用した。推奨されるように、プライマー (10 μM) およびプローブ (3 μM) 濃度を使用した。

## 【0276】

リアルタイムqPCRサイクル条件は以下に示した通りであった。

## 【0277】

## 【表6】

| ステップ                 | ステージ | 反復数     | 温度   | 時間  |
|----------------------|------|---------|------|-----|
| 逆転写                  | 1    | 1       | 45°C | 10分 |
| RT不活性化 (inact)/ 初期変性 | 2    | 1       | 95°C | 10分 |
| 増幅                   | 3    | 40 (45) | 95°C | 15秒 |
|                      |      |         | 60°C | 45秒 |

## 【0278】

5 μl の試料 (NS23Ex RNA 希釈液、対照または試料RNA) を各ウェルに分注する。任意選択的な検出増強剤は添加しなかった。20 μl のマスターミックスを各ウェルに分注する。回転して、回収し、密閉する。

## 【0279】

結果を図5に示す。図5Aは、HPgV-2プライマー/TaqManプローブセット (1-2-3-5-7; 配列および位置については図4を参照) を使用して、NS23Exインビトロ転写物の10倍段階希釈物とHPgV-2指標例 (UC0125. US) のRNA (太字で強調) の10倍希釈物を検出した。右下のパネルは、各プライマー/プローブセットについて100 ngのNS23ExおよびHPgV-2 RNAの検出を示す。図5Bは、正規化して1 \_\_ 100 ngの結果を設定し、指標例に存在するHPgV-2 RNAの量を推定するためにログスケールでプロットしたCt値を示す。実験に含まれる陰性対照は、1) 水、2) pTRI (無関係なインビトロ転写物)、3) CHU2725 (HIV+/GBV-C+試料)、および4) N-505 (HIV+/GBV-C-試料) であり、他の感染 (HIV、GBV-C) との交差反応がないことを示す。後にHCV精製ウイルス (1000プラーク形成単位) を試験し、さらに、これらのプライマーと交差反応しないことも示された (データは示さず。)。NS23Ex 鋳型は、すべてのプライマー/プローブセットによって用量依存的に検出された。いずれの陰性対照RNAもこれらのプライマーによって増幅されず、交差反応性はないことが示唆された。これらの結果に基づいて、指標例 (UC0125. US) ウイルス量は  $1.5 \times 10^6$  コピー/ml と推定される。

## 【0280】

H. qPCRアッセイB-SYBRグリーンqPCR

プローブおよびプライマーセット1、2、3、4、5、7および15ならびに44F (配列番号12) および342R (配列番号13) を用いて、SYBRグリーンqPCRアッセイを行った。これらは、NS23Exインビトロ転写物 (図6、曲線A、B、C) およびHPgV-2指標例 (UC0125. US) RNA (図6、曲線D) から作製されたcDNAの10倍段階希釈を検出するために使用された。陰性対照 (図6、曲線EおよびF)、N-505 (HIV (+)/GBV-C (-)) および水は増幅されなかった。以下の試料が各列にあった: 1) NS23Ex 1:1000 cDNA; 2) NS23Ex

10

20

30

40

50

x 1:10,000 cDNA; 3) NS23Ex 1:100,000 cDNA; 4) GBV-E cDNA; 5) N505 cDNA; および 6) 水。qPCR 反応を以下のように設定した: 2  $\mu$ l の cDNA (20  $\mu$ l の SSRTIII 反応液から 1:5 に希釈); 7. 2  $\mu$ l の水; 0. 4  $\mu$ l の Fwd プライマー (10  $\mu$ M); 0. 4  $\mu$ l の Rev プライマー (10  $\mu$ M); および 10  $\mu$ l の SYBR グリーンミックス (Applied Biosystems)。

#### 【0281】

結果を図 6 に示す。各プライマーセットは NS23Ex 転写物の用量依存的検出を示し、すべては、本質的に同じ Ct で UC0125. US cDNA を検出した。いずれも N505 または水のシグナルを生じなかった。

10

#### 【0282】

##### I. qPCR アッセイ C

プライマー/プローブセット 2 および 3 を TaqMan qPCR アッセイに用い、ドナー血漿中に 3 症例の HPgV-2 感染を明らかにした。ProMedDx HCV (+) プラズマフェレーシスドナー血漿試料 48-96 から抽出した RNA を、図 7A に記載されるように、TaqMan プライマー/プローブセット 2 (上段パネル) および 3 (下段パネル) を用いてスクリーニングした。試料 #70 および #96 (ABT0070P. US および ABT0096P. US) は両方のセットによって検出された。10 ng および 10 fg の NS23Ex インビトロ転写産物陽性対照もまた示される。図 7B は、American Red Cross 血液ドナー血漿 [HCV RNA (+) / 抗体 (+)] 試料から抽出された RNA を上記の TaqMan プライマー/プローブセット 2 および 3 を用いてスクリーニングしたアッセイの結果を示す。試料 #128 (ABT0128A. US) は検出されたが、セット 2 (太字) のみであった。10 ng および 10 fg の NS23Ex インビトロ転写産物陽性対照を緑色 (プローブ 2) および紫色 (プローブ 3) で示す。

20

#### 【0283】

##### J. 三重マスターミックス qPCR アッセイ

HPgV-2 および GBV-C (HPgV-1) 感染した検体について同時にスクリーニングするために、現在の HPgV-2 株配列アラインメント (図 23 のアラインメントを参照) に基づいて新しい qPCR アッセイを開発した。RNA を自動化 Abbott m2000sp システムを用いてドナー試料から抽出し、続いて m2000rt 機器で qPCR を行った。株 ABT0030P. US および ABT0041P. US の同定に導いた結果の例を図 28 に示す。HPgV1 の検出は、FP5'-TGTTGGCCCTACCGGTGTTA-3' (配列番号 408) および RP5'-CCGTACGTGGGCGTCGTT-3' (配列番号 409)、およびミスマッチ配列を説明するために 3 つの蛍光標識プローブ (5'-VIC-CTCGTCTGTTAAACCGAGCCCGTCA-BHQ1-3' (配列番号 410)、5'-VIC-CTCGTCTGTTAAACCGAGACCGTCA-BHQ1-3' (配列番号 411)、5'-VIC-CACGCCGTTAAACCGAGACCGTCA-BHQ1-3' (配列番号 412)) を用いて 5' UTR を標的化することによって達成された。HPgV-2 プライマー/プローブ配列は、Keysら (Keys, JRら、2014、J Med Virol、86:473-477) から適合される。HPgV2 の検出は、NS2-3 領域 (FP5'-GTGGGACACCTCAACCCCTGAAG-3' (配列番号 413)、RP5'-GGGAAGACAACACCAACGATCTGGC-3' (配列番号 414)、プローブ 5'-FAM-CCTGGTTTCCAGCTGAGTGCTCC-BHQ1-3' (配列番号 415)) および 5' UTR (FP5'-CGCTGATCGTGC AAAGGGATG-3' (配列番号 416)、RP5'-GCTCCACGGACGTCACACTGG-3' (配列番号 417)、プローブ 5'-Quasar670-GCACCACTCCGTACAGCCTGAT-BHQ2-3' (配列番号: 418)) の増幅に依存した。すべてのプライマーは、IDT (Coralville, IA) によって合成され、プロ

30

40

50

ープは、Abbott Molecular (Des Plaines, IL) で合成された。サイクリング条件は以下の通りであった：50℃、4分間（1×）；75℃、5分間（1×）；60℃、30分間（1×）；91℃、30秒間；58℃、45秒間（6×）；91℃、30秒間；60℃、45秒間（+2秒／サイクル）（4×）；91℃、30秒間；60℃、45秒間（+2秒／サイクル）（43×ーリード）。逆転写およびDNAポリメラーゼ活性は、酵素rTth (Roche) を用いて実施した。図28において、HIV陽性セットのうち合計4つの検体がHPgV-2 RNA (CY5およびFAMチャネル：それぞれ5' UTRおよびNS2) に対して反応性であったが、しかしながら、それぞれのうち2つは同じドナーからのものであった。全部で6つの検体がGBV-C陽性であった (VICチャネル：5' UTR)。

10

#### 【0284】

##### [実施例4]

HPgV-2 ペプチド／タンパク質に対する抗体の検出

この実施例は、HPgV-2 ゲノムからの潜在的な抗原ペプチドおよび組換えタンパク質の選択および評価を記載する。予測される表面曝露（親水性プロファイルおよび表面確率）および抗原性インデックススコアを考慮に入れて、20アミノ酸残基から45アミノ酸残基の長さの範囲である、表3に示される一連のペプチドを設計した。

#### 【0285】

簡潔には、HPgV-2 タンパク質 (S、E1、E2、NS3、NS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5B) は、DNASTAR Lasergene11 バージョン11.2.1 (29) Proteanソフトウェア (DNASTar, 3801 Regent Street Madison, WI 53705, USA) を用いて、予測される抗原性領域について分析された。潜在的な抗原性領域は、各アミノ酸配列についてのハイドロパシープロット、抗原性インデックスおよび予測される表面確率の組合せによって決定された。各オープンリーディングフレームについてのハイドロパシープロファイルを作成し、水溶液（親水性）中にあるときに曝露される可能性のある領域について評価した。表面確率の決定とは、配列が分子の表面上に存在しなければならないバイアスを指す。水溶媒に暴露される所定のアミノ酸の予測される確率をアミノ酸配列について決定するEmini表面確率法を用いた (Eminiら、J Virol, 1985 Sep; 55 (3): 836-9)。予測される抗原性領域は表面曝露の性質を有する。残基の表面接近可能性が予測される骨格の可撓性および二次構造と組み合わされる抗原インデックスをJameson-Wolfアルゴリズムを用いて決定した (Jameson B. AおよびWolf H. Comput Appl Biosci (1988) 4 (1): 181-186)。予想される表面曝露（親水性プロファイルおよび表面確率）および抗原性インデックススコアを考慮して、HPgV-2 タンパク質 (S、E1、E2、NS3、NS3、NS4A、NS4B、NS5AおよびNS5B) に見出される配列に対してペプチドを設計した (表3)。

20

30

#### 【0286】

アミノ末端ビオチン化修飾 (Genscript USA Inc, Piscataway, NJ) を用いてペプチド (表3) を作製した。ペプチドをビオチン化して、固相ベースのイムノアッセイに使用される固体表面 (例えば、微粒子) 上にペプチドを固定化するために使用することができるアビジンおよびストレプトアビジン被覆微粒子との強力な共有結合相互作用を可能にした。

40

#### 【0287】

【表 7】

表3

| ペプチド<br># | タンパク質  | 配列                                                 | 配列番号 |
|-----------|--------|----------------------------------------------------|------|
| 1         | S      | GGSCRSPSRVQVARRVLQLSAFLALIGSGMSSIRSKTEGRIESGQ      | 86   |
| 2         |        | RDGSLHWSHARHHSVQPDRVAAGPPSVTSVERNMGSSSTDQT         | 87   |
| 3         | E2     | SMNSDSPFGTFTRNTESRFSIPRFSPVKINS                    | 88   |
| 4         | NS3    | QAPAVTPTYSEITYYAPTGSGBKSTKYPVDLVKQGHKVLVL          | 89   |
| 5         |        | VKSMAPYIKETYKIRPEIRAGTGPDGVTVITG                   | 90   |
| 6         |        | PETNLRGYAVVISDESHDTSS                              | 91   |
| 7         |        | PCTAALRMQRRGRTGRGRRGAYTTSPGAAPCVS                  | 92   |
| 8         | NS4B   | LSERFGQQLSKLSLWRSVYHWAQAREGYTQCG                   | 93   |
| 9         | NS5A   | NPTTTGTGTLRPDISDANKLGFYRGVADIVELERRGDKWH           | 94   |
| 10        |        | QNLAARRRAEYDAWQVRQAVGDEYTRLADEDVD                  | 95   |
| 11        |        | RFVPPVPKPRTRVSGVLERVRMCMRTPPIKF                    | 96   |
| 12        | NS5B   | NTTRDHNNGITYTDLVSGRAKP                             | 97   |
| 13        |        | DAPMRIIPKPEVFPRDKSTRKPPRFIVFPGCAARV                | 98   |
| 14        |        | MPLLCMLIRNEPSQTGTLVT                               | 99   |
| 15        | S      | AEAAPKSGELDSQCDHLAWSFMEGMPTGTLIVQRDGLSH            | 217  |
| 16        | NS4A-B | SVEVRPAGVTRPDATDETAAYAQRLYQACADSGIFASLQGTASAALGKLA | 218  |

## 【0288】

## 試験される集団

以前の研究は、H P g V - 2 に最も密接に関連するヒトウイルスである G B V - C が、H C V 感染個体および市販の血液ドナー（例えば、有料プラズマフェレーシスドナー）において頻繁に検出されることを示している。H P g V - 2 は、同様に、一般の集団よりも商業的なドナーの高い罹患率で見出されることが想定された。従って、プラズマフェレーシスドナー由来の試料集団を研究のために選択した。さらに、指標例（U C 0 1 2 5 . U S）はまた H C V に感染しているため、H C V に対して抗体陽性である試料のうち追加の H P g V - 2 症例が検出される可能性があると考えられた。したがって、研究のために選択された第 1 の集団の 1 つは、血漿が H C V に対する抗体と H C V R N A の両方に陽性なものとして以前に試験されたプラズマフェレーシスドナーであった。

## 【0289】

## 試験手法

ペプチドの 3 つのプールを作製した：プール 1 は以下のペプチドを含んだ：P 1、2、4、5、7、8；プール 2 は以下のペプチドを含んだ：P 9、10、11、13、14；プール 3 は以下のペプチドを含んだ：P 3、6、12。

## 【0290】

アッセイの第 1 のステップにおいて、試料（例えば、ヒト血清または血漿）は、ビオチン化ペプチドのプールの 1 つ（それぞれ 800 ng / ml）を含む検体希釈バッファー（緩衝塩および界面活性剤を含む。）ならびにストレプトアビジン（D y n a b e a d s

M-270 ストレプトアビジン、Life Technologies 3175 Staley Road Grand Island、NY 14072) で被覆された固相を伴う反応容器に添加される。この試料を18分間インキュベートする。この間、固相は、ビオチン化ペプチドおよびペプチドと複合体化した抗体(免疫複合体)の両方を捕捉する。18分間のインキュベーションステップの後、未反応試料を除去し、反応容器にシグナル発生コンジュゲートを添加することによってアッセイの第2のステップを開始する。コンジュゲート(この場合、化学発光酵素(アクリジニウム)にコンジュゲートしたマウス抗ヒトIgGの16ng/mL)は、ペプチドに結合したヒト免疫グロブリンを認識し、固相に固定される。未反応物質を除去するための洗浄ステップ後、微粒子を洗浄し、次に、化学発光を誘発することができる基質とともにインキュベートする。その後、ルミネッセンスの量を、生物発光イメージャーを用いて相対光単位(RLU)で測定した。このアッセイのステップを図8に示す。

10

#### 【0291】

上記される3つのペプチドプールを用いて各試料を試験する。所与の試料についてのシグナルが陰性対照試料で得られたシグナルよりも10倍以上高い場合、試料は反応性である(またはカットオフ値を超える)と考えられる。陰性対照試料は、ウイルス感染のリスクが低く、HIV、HBVおよびHCVを含むいくつかの一般的なウイルスについて陰性であると試験された個体からの一連の試料をプールすることによって調製されることに留意されたい。希釈剤およびストレプトアビジンで被覆された微粒子を含むが、表3に列挙される14個のペプチドのいずれも含まない容器中で試料を反応させる第2のタイプの対照が使用される。ペプチドが存在しない場合、試料の結果は陰性でなければならないことが期待される。試料がペプチドの不存在下で反応性である場合、試料はストレプトアビジンを含む固相と非特異的に反応性であると考えられ、以下の表に提供される抗体陽性試料の様々なリストには含めなかった。

20

#### 【0292】

結果

HCVに対する抗体試験(Abbott Laboratories、Abbott Park IL 60064)およびHCV RNA試験(Bayer Versant HCV RNA 3.0アッセイ(bDNA))の両方により陽性と判定された第1回目のプラズマフェレシスドナーからの試料パネルを、ProMedDx(Norton、MA)から入手した。試料を上記のように3つのペプチドプールに対して試験した。200個の試料のうち計19個は、3つのペプチドプールのうちの1つ以上と反応性であった。1つの試料(S188)は、3つすべてのペプチドプールに対して反応性であり、一方、2つの試料(S80およびS96)は、2つのペプチドプールと反応性であった(表4)。

30

#### 【0293】

## 【表 8】

表4.HPpV-2ペプチドプールに対して抗体陽性であるProMedDx試料のリスト

| ProMedDx試料(抗HCV陽性、HCV RNA陽性<br>プラスマフェリシター) | ペプチドプール1 | ペプチドプール2 | ペプチドプール3 |
|--------------------------------------------|----------|----------|----------|
| 試料ID                                       | S/CO*    | S/CO*    | S/CO*    |
| S 188                                      | 3.01     | 2.75     | 1.52     |
| S 80                                       | 2.05     | 12.16    | NR**     |
| S 96                                       | NR       | 9.93     | 1.42     |
| S 164                                      | 1.42     | NR       | 5.25     |
| S 66                                       | 1.20     | NR       | NR       |
| S 147                                      | 1.04     | NR       | NR       |
| S 182                                      | 2.07     | NR       | NR       |
| S 70                                       | NR       | 7.61     | NR       |
| S 27                                       | NR       | 3.11     | NR       |
| S 89                                       | NR       | 2.75     | BR       |
| S 192                                      | NR       | NR       | 5.74     |
| S059                                       | NR       | NR       | 2.31     |
| S115                                       | NR       | NR       | 3.21     |
| S 5                                        | NR       | NR       | 4.70     |
| S 3                                        | NR       | NR       | 2.22     |
| S 33                                       | NR       | NR       | 1.70     |
| S 109                                      | NR       | NR       | 1.48     |
| S 148                                      | NR       | NR       | 1.45     |
| S 45                                       | NR       | NR       | 1.37     |

\*S/CO=試料対カットオフ値>1.0は、そのペプチドに対する抗体について反応性であると考えられる。

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

\*\*非反応性

## 【0294】

プールされたペプチドと反応性である試料は、以下に示されるように、反応性ペプチドプール由来の個々のペプチドで再試験された。また、全200個の試料は、個々のペプチド15とペプチド16を用いて試験された。以下のデータは、8つの試料が2つ以上の個々のペプチドと反応性であり、16個の試料が単一ペプチドのみと反応性であることを示す(表5)。計24個の試料は、評価された1つ以上の合成ペプチドと反応性であった：200個の試料のうち176個が、アッセイで使用されたペプチドに対して非反応性であった。

## 【0295】

10

20

30

40

## 【表 9】

表5. ペプチドプールと反応性であるP r oM e d D x 試料における  
個々のペプチドの結果。

| Abbott ID | 1 | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8 | 9   | 10  | 11 | 12  | 13  | 14 | 15  | 16   | PCR結果 |
|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|----|-----|-----|----|-----|------|-------|
| S188      |   |     | 1.7 | 5.2 |     |     |     |   |     | 1.9 |    |     | 4.8 |    | 1.3 |      | 陽性    |
| S182      |   | 4.2 |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| S080      |   |     |     | 4.3 |     |     |     |   | 9.6 |     |    |     |     |    |     | 16.5 | 陰性    |
| S164      |   |     | 1.5 | 1.2 | 1.9 | 3.9 | 2.6 |   | 1.1 | 3.2 |    | 5.5 |     |    |     |      | 陰性    |
| S066      |   | 4.9 |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| S147      |   | 2   |     | 1.5 |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| S096      |   |     | 1.6 | 3.5 |     | 1.1 |     |   | 1   |     |    |     |     |    |     | 20.7 | 陽性    |
| S070      |   |     |     |     |     |     |     |   | 5.3 |     |    |     |     |    |     | 1.1  | 陽性    |
| S027      |   |     |     |     |     |     |     |   | 4.3 |     |    |     |     |    |     | 4.6  | 陰性    |
| S089      |   |     |     |     |     |     |     |   | 5.4 |     |    |     |     |    |     | 2.5  | 陰性    |
| "S192"    |   |     | 4.6 |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S005"    |   |     | 4.3 |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S115"    |   |     |     |     |     | 1.5 |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S059"    |   |     |     |     |     | 2.5 |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S003"    |   |     |     |     |     | 1.3 |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S033"    |   |     | 1.2 |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S109"    |   |     | 1.3 |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S148"    |   |     | 2.1 |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| "S045"    |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    | 4.7 |     |    |     |      | 陰性    |
| S093      |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     | 16.6 | 陰性    |
| S133      |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     | 1.4  | 陰性    |
| S020      |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     | 1.1  | 陰性    |
| S123      |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     | 7.8  | 陰性    |
| S044      |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     | 2.4  | 陰性    |
| S065      |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |
| S114      |   |     |     |     |     |     |     |   |     |     |    |     |     |    |     |      | 陰性    |

\* S / C O = 試料対カットオフ値 > 1. 0 は、そのペプチドに対する抗体について反応性である  
と考えられる。カットオフは、陰性対照値のシグナルの 1 0 倍であると決定された。

## 【0 2 9 6】

任意の H P g V - 2 ペプチドに対する抗体陽性結果は、H P g V - 2 による以前または  
現在の感染と一致している；この集団における有病率は、1 2 %（2 0 0 個の試料のうち  
2 4 個の反応性試料）程度の高さであり得る。

## 【0 2 9 7】

どの結果が H P g V - 2 による過去または現在の感染を示すのか不明確な場合がある。  
確認試験は、所与の血清学的結果が研究対象の薬剤による感染と相関するという支持的な  
証拠を提供するためにしばしば利用される。多くの場合、抗体陽性個体が所与の薬剤に能  
動的に感染しているかどうかを判定するために、R T - P C R 試験が利用される。陽性の  
R T - P C R 結果は、血清学的試験が正しいという考えを支持する。しかしながら、陰性  
の R T - P C R 結果は血清学的試験を支配するものではない。これは、いくらかの血清陽  
性の個体が感染を浄化し、したがって、陰性の R T - P C R 結果を生じる可能性があるた  
めである。

## 【0 2 9 8】

R T - P C R 試験は、実施例 3 に記載されるプライマーおよびプローブセットを用いて  
、P r o M e d D x からの全 2 0 0 個の試料について実施された。3 つの試料は、R T -  
P C R（A B T 0 0 7 0 P、A B T 0 0 9 6 P、A B T 0 1 8 8 P）によって陽性であると  
判定され、続いて、次世代シーケンシングによって確認された（実施例 5）。

## 【0 2 9 9】

U C 0 1 2 5. U S 症例を用いた血清学的試験

上記のように、これらのペプチドの両方が H P g V - 2 R N A 陽性のいくつかの陽性  
予測値を示したため、指標例（U C 0 1 2 5. U S）のアリコートでペプチド 4 および 9

に対する抗体について試験した。この症例は、ペプチド4と9の両方に対する抗体について陽性であり、S/N値はそれぞれ12.5および94.7であることが見出された。したがって、選択されたペプチドに対する抗体の検出が、RT-PCRによって検出される能動的HPgV-2感染を予測し得るというさらなる支持を提供する。

### 【0300】

抗体反応性とRT-PCR結果との相関

特定のペプチドに対する抗体反応性と陽性HPgV-2 RT-PCR結果の間には相関があるようである（表6）。指標例を含む4つのHPgV-2 RNA陽性のうち少なくとも2つにおいて、ペプチド3、4、9および16に対する反応性が生じた。一方、他のペプチドに対する反応性は存在せず、またはHPgV-2 RNA陽性試料のうちの1つにのみ生じた。

### 【0301】

#### 【表10】

表6. プラズマフェレーシスドナーのProMedDxパネルについての抗体試験結果と

RT-PCR(qPCR)結果の相関

| ProMedDXからの200個のHCV RNAおよび<br>Ab陽性試料 | HPgV-2<br>PCR陽性 | HPgV-2<br>PCR陰性 | 陽性の予測値* |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| いずれかのHPgV-2ペプチドに陽性な抗体(N=24)          | 3               | 21              | 12.5%   |
| すべてのHPgV-2ペプチドに陰性な抗体(N=176)          | 0               | 176             | 0.0%    |
| HPgV-2ペプチド3に陽性な抗体(N=8)               | 2               | 6               | 25.0%   |
| HPgV-2ペプチド4に陽性な抗体(N=5)               | 2               | 3               | 40.0%   |
| HPgV-2ペプチド9に陽性な抗体(N=6)               | 2               | 4               | 33.3%   |
| HPgV-2ペプチド16に陽性な抗体(N=7)              | 2               | 5               | 28.6%   |

\*陽性の予測値は、各ペプチドについて抗体陽性試料の総数で割った、HPgV-2 RNA陽性であり、HPgV-2ペプチドについて抗体陽性である試料の数として決定された。

### 【0302】

RT-PCR陽性試料を同定するための戦略

上記の検討は、抗体反応性が、RT-PCR陽性試料を同定するための陽性の予測値を有することを示す。したがって、試料のいくつかの集団は、以下に記載されるように、以下に記載する3つのペプチドプールを用いて試験され、続いて個々のペプチド試験を行う。個々のペプチドと反応性である試料をRT-PCR試験のために選択する。RT-PCR陽性試料については、配列決定をゲノム全体で行う場合がある。

### 【0303】

継続的な試験のためのペプチドプール：

ペプチドプール組成物は、以下に示されるように改変された：

プール1は、以下のペプチドを含んだ：P1、5、7、8、10

プール2は、以下のペプチドを含んだ：P2、3、4、6、9

プール3は、以下のペプチドを含んだ：P11、12、13、14

### 【0304】

HCV RNA陽性／抗HCV陰性の血液ドナー試料

NAT収量試料（すなわち、HCVについて抗体陰性として試験されたが、ミニプールの核酸試験によってRT-PCR陽性であった試料）として同定されたAmerican Red Cross（Gaithersburg, MD）から240個の血液ドナー試料のパネルを得た。3つのペプチドプールで試験した場合、計11個の試料が反応性として検出された（表7）。

【 0 3 0 5 】

【 表 1 1 】

表7.HCV RNA陽性であるが、抗HCV抗体陰性であった240個の

ARC試料:陽性結果を示す試料ID番号のリスト。

| HCV NAT収量試料<br>(ARC) | ペプチドプール1 | ペプチドプール2 | ペプチドプール3 |
|----------------------|----------|----------|----------|
| 試料ID                 | S/CO*    | S/CO*    | S/CO*    |
| S0217                | 3.6      | NR**     | NR       |
| S0159                | 1.8      | NR       | NR       |
| S049                 | 1.5      | NR       | NR       |
| S0078                | 1.5      | NR       | NR       |
| S0226                | 1.4      | NR       | NR       |
| S0111                | NR       | 4.3      | NR       |
| S0079                | NR       | 1.8      | NR       |
| S0061                | NR       | 1.7      | NR       |
| S0177                | NR       | 1.3      | NR       |
| S0108                | NR       | NR       | 1.3      |
| S0145                | NR       | NR       | 1.0      |

\*S/CO=試料対カットオフ値>1.0は、そのペプチドに対する抗体について  
反応性であると考えられる。

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

\*\*非反応性

プールしたペプチドと反応性である試料は、以下に示されるように、反応性  
ペプチドプール由来の個々のペプチドで再試験された。

以下のデータは、1つの試料が2つ以上の個々のペプチドと反応性であり、  
11個の試料が単一のペプチドのみと反応性であることを示している(表8)。

【 0 3 0 6 】

10

20

30

## 【表 1 2】

表8.ペプチドプールと反応性であるHCV NAT収量試料における個々のペプチド結果。個々に試験した各ペプチドの陰性対照と比較したシグナル対ノイズ (S/N) 値を示す。RT-PCRを実施し、結果を示した。

|                            | Abbott ID | 1 | 2  | 3  | 4 | 5  | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | PCR 結果 |
|----------------------------|-----------|---|----|----|---|----|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|--------|
| ARCからの240個の<br>HCV RNA陽性試料 | S0111     |   |    | 28 |   |    |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0079     |   |    | 45 |   |    |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0061     |   |    | 21 |   |    |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0177     |   | 14 | 15 |   | 20 |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0217     |   |    |    |   | 38 |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0159     |   |    |    |   | 19 |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0049     |   |    |    |   | 21 |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0078     |   |    |    |   | 20 |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0226     |   |    |    |   | 18 |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0108     |   |    |    |   |    |   |   |   |   |    |    |    | 19 |    |    |    | 陰性     |
|                            | S0162     |   |    |    |   |    |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 55 |    | 陰性     |
|                            | S0145     |   |    |    |   |    |   |   |   |   |    |    |    | 26 |    |    |    | 陰性     |

10

## 【0307】

HCV RNA陽性／抗HCV陽性血液ドナー試料

米国赤十字社（Gaithersburg MD）から入手した240個の血液ドナー試料のパネルは、HCV感染（ミニプール核酸試験によってHCVについて抗体陽性であり、およびRT-PCR陽性である。）として同定され、ペプチドプールを介して試験された。計12個の試料が、表9に列挙された1つ以上のペプチドプールと反応性であった。

20

## 【0308】

## 【表 1 3】

表9.ARCからのHCV RNA陽性/抗HCV陽性血液ドナーからの  
陽性結果を含む試料ID番号のリスト

| HCV抗体陽性/HCV<br>RT-PCR陽性試料(ARC) | ペプチドプール1 | ペプチドプール2 | ペプチドプール3 |
|--------------------------------|----------|----------|----------|
| 試料ID                           | S/CO*    | S/CO*    | S/CO*    |
| S0127                          | 6.8      | NR       | NR       |
| S0104                          | 4.4      | NR       | NR       |
| S0046                          | 1.5      | NR       | NR       |
| S0128                          | NR       | 3.6      | NR       |
| S0045                          | NR       | 2.6      | NR       |
| S0178                          | NR       | 2.3      | NR       |
| S0044                          | NR       | 2.2      | NR       |
| S0220                          | NR       | 1.9      | NR       |
| S0238                          | NR       | 1.2      | NR       |
| S0141                          | NR       | 1.1      | NR       |
| S0077                          | NR       | NR       | 1.5      |
| S0202                          | NR       | NR       | 1.5      |

\*S/CO=試料対カットオフ値>1.0は、そのペプチドに対する抗体について反応性であると考えられる。

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

\*\*非反応性

## 【0 3 0 9】

プールしたペプチドと反応性である試料は、以下に示されるように反応性ペプチドプール由来の個々のペプチドを用いて再試験された。以下のデータは、5つの試料が2つ以上の個々のペプチドと反応性であり、9つの試料が単一のペプチドと反応性であることを示している（表10）。

## 【0 3 1 0】

10

20

30

## 【表 1 4】

表 1 0. ペプチドプールと反応性であるARC血液ドナー試料のHCV RNA陽性/抗HCV陽性における個々のペプチド結果。個々に試験された各ペプチドの陰性対照と比較したシグナル対ノイズ (S/N) 値を示す。RT-PCRを実施し、結果を示した。

| ARCからの240個の<br>HCV RNAおよび<br>Ab陽性試料 | Abbott ID | 1 | 2  | 3  | 4  | 5   | 6  | 7  | 8  | 9  | 10  | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | PCR 結果 |    |
|-------------------------------------|-----------|---|----|----|----|-----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|--------|----|
|                                     | S0029     | 7 | 19 | 11 | 12 | 25  | 46 | 16 | 15 | 12 | 30  |    | 35 |    | 23 |    | 28 | 陽性     |    |
|                                     | S0055     |   |    |    |    |     |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    | 15 | 陽性     |    |
|                                     | S0127     |   |    |    |    | 164 |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    | 陰性     |    |
|                                     | S0104     |   |    |    |    | 152 |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    | 陰性     |    |
|                                     | S0046     |   |    |    |    |     |    |    |    |    | 136 |    |    |    |    |    |    | 陰性     |    |
|                                     | S0128     |   |    |    |    |     |    |    |    | 69 |     |    |    |    |    |    | 24 | 陽性     |    |
|                                     | S0045     |   |    | 30 |    |     |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    | 陰性     |    |
|                                     | S0178     |   |    | 21 |    |     |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    | 陰性     |    |
|                                     | S0044     |   |    |    | 12 |     |    |    |    |    | 18  |    |    |    |    |    |    | 71     | 陰性 |
|                                     | S0220     |   | 59 |    |    |     |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    |        | 陰性 |
|                                     | S0238     |   |    |    | 30 |     |    |    |    |    | 46  |    |    |    |    |    |    |        | 陰性 |
|                                     | S0141     |   |    | 30 |    |     |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    |        | 陰性 |
|                                     | S0077     |   |    |    |    |     |    |    |    |    |     |    |    | 15 |    |    |    |        | 陰性 |
|                                     | S0202     |   |    |    |    |     |    |    |    |    | 14  |    |    |    | 21 |    |    |        | 陰性 |

## 【0 3 1 1】

1 4 個の試料について R T - P C R 試験を実施した。3 つの試料 ( S 0 2 9 、 A B T 0 0 2 9 A . U S ; S 0 0 5 5 、 A B T 0 0 5 5 A . U S ; および S 1 2 8 、 A B T 0 1 2 8 A . U S ) は、H P g V - 2 R N A 陽性であることが判明した。3 つの H P g V - 2 R N A 陽性試料は、ペプチド 1 6 に対して反応性を示し、3 つのうち 2 つはペプチド 9 に対して反応性であり、1 つはペプチド 4 に対して反応性であり、1 つはペプチド 3 に対して反応性であった。試料 A B T 0 0 2 9 A . U S は、ペプチドのうち 1 3 個に対して反応性である一方で、試料 A B T 0 0 5 5 A . U S はペプチド 1 6 のみに対して反応性であり、試料 A B T 0 1 2 8 A . U S はペプチド 9 と 1 6 の両方に反応性であった。ペプチド反応性データは、H P g V - 2 R N A 陽性の検出におけるペプチド 3 、 4 、 9 および 1 6 の有用性を支持する。これらの 1 4 個のペプチドに抗体陰性である 1 7 個の追加の試料はまた、R T - P C R によって試験された：全 1 7 個の試料は R T - P C R によって陰性であった。

## 【0 3 1 2】

タイからの血液ドナー試料

計 1 4 5 個の H I V 陽性血液ドナー試料 ( タイから得た。 ) を 3 つのペプチドプールを介して試験した。計 6 つの試料は、表 1 1 に列挙される 1 つ以上のペプチドプールと反応性であるものとして検出された。

## 【0 3 1 3】

## 【表 1 5】

表11. タイにおいて回収された145個の試料からの陽性結果を含む試料ID番号のリスト

| タイ試料  | ペプチドプール1 | ペプチドプール2 | ペプチドプール3 |
|-------|----------|----------|----------|
| 試料ID  | S/CO*    | S/CO*    | S/CO*    |
| S0116 | 17.6     | NR       | NR       |
| S0068 | NR       | 18.4     | NR       |
| S0145 | NR       | 17.0     | NR       |
| S0027 | NR       | NR       | 38.1     |
| S0136 | NR       | NR       | 16.1     |
| S0016 | NR       | NR       | 10.1     |

\*S/CO=試料対カットオフ値>1.0は、そのペプチドに対する抗体について反応性であると考えられる。

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

\*\*非反応性

## 【0 3 1 4】

プールしたペプチドと反応性である試料は、以下に示されるように、反応性ペプチドプール由来の個々のペプチドで再試験された。以下のデータは、すべての試料が単一のペプチドのみと反応性であることを示している（表 1 2）。

## 【0 3 1 5】

## 【表 1 6】

表 1 2. ペプチドプールと反応性であるタイ試料におけるこのペプチド結果  
145個のタイ試料について：

| 実施ID  | 反応性 (S/CO) |     |    |    |     |    |    |    |    |     |     |     |     |    |
|-------|------------|-----|----|----|-----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|
|       | P1         | p2  | p3 | p4 | p5  | p6 | p7 | p8 | p9 | p10 | p11 | p12 | p13 | 14 |
| S0116 |            | 2.8 |    |    |     |    |    |    |    |     |     |     |     |    |
| S0068 |            |     |    |    | 1.0 |    |    |    |    |     |     |     |     |    |
| S0145 |            |     |    |    | 1.6 |    |    |    |    |     |     |     |     |    |
| S0027 |            |     |    |    |     |    |    |    |    |     |     | 9.4 |     |    |
| S0136 |            |     |    |    |     |    |    |    |    |     |     |     | 2.1 |    |
| S0016 |            |     |    |    |     |    |    |    |    |     | 1.1 |     |     |    |

## 【0 3 1 6】

南アフリカのH I V陽性血液ドナー試料

3つのペプチドプールで試験された計73個のH I Vドナー試料（南アフリカから得た）。ほとんどの試料はH I V感染血液ドナーからであった。計4つの試料は、表 1 3 に列挙された1つ以上のペプチドプールと反応性であるものとして検出された。

## 【0 3 1 7】

## 【表 1 7】

表13.南アフリカからのHIV陽性血液ドナーの陽性結果を含む試料ID番号のリスト

| 南アフリカ血液ドナー(抗HCV陽性) | ペプチドプール1 | ペプチドプール2 | ペプチドプール3 |
|--------------------|----------|----------|----------|
| 試料ID               | S/CO*    | S/CO*    | S/CO*    |
| S0027              | 1.3      | NR       | NR       |
| S0009              | NR       | 2.2      | NR       |
| S0004              | NR       | 1.6      | NR       |
| S0008              | NR       | NR       | 3.4      |

10

\*S/CO=試料対カットオフ値>1.0は、そのペプチドに対する抗体について反応性であると考えられる。

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

\*\*非反応性

## 【0 3 1 8】

プールしたペプチドと反応性である試料は、以下に示されるように、反応性ペプチドプール由来の個々のペプチドを用いて再試験された。以下のデータは、全4つの試料が単一のペプチドのみと反応性であることを示している（表14）。

## 【0 3 1 9】

20

## 【表 1 8】

表 1 4. 個々のペプチドにおける陽性結果を含むID番号のリスト

| 73個の南アフリカ試料について: |            |    |    |     |      |    |    |    |    |     |     |      |     |    |
|------------------|------------|----|----|-----|------|----|----|----|----|-----|-----|------|-----|----|
| 実施 ID            | 反応性 (S/CO) |    |    |     |      |    |    |    |    |     |     |      |     |    |
|                  | P1         | p2 | p3 | p4  | p5   | p6 | p7 | p8 | p9 | p10 | p11 | p12  | p13 | 14 |
| S0027            |            |    |    | 2.1 |      |    |    |    |    |     |     |      |     |    |
| S0009            |            |    |    |     | 17.0 |    |    |    |    |     |     |      |     |    |
| S0004            |            |    |    |     | 3.2  |    |    |    |    |     |     |      |     |    |
| S0008            |            |    |    |     |      |    |    |    |    |     |     | 14.9 |     |    |

## 【0 3 2 0】

30

拡大した H P g V - 2 有病率研究

指標例に加えて、最初の7つの単離物（A B T 0 0 9 6 P、A B T 0 0 7 0 P、A B T 0 1 8 8 P、A B T 0 0 2 9 A、A B T 0 0 5 5 AおよびA B T 0 1 2 8 A）は、ペプチド3、4、9または16に対する抗体応答とH P g V - 2 R N Aの存在との間に正の相関を示した。異なる集団におけるH P g V - 2の存在を調べるための継続的な研究は、ペプチド3、4、9、16のプールによる抗体試験、および実施例3に記載のR T - P C Rアッセイの組合せを用いて実施された。

## 【0 3 2 1】

H C V R N AとH C V抗体に対する抗体の両方に対して、計542個の試料（200個のP r o M e d D x試料、A R C由来の240個のH C V試料およびP r o M e d D xからの100個の試料の第2セットを含む。）が陽性であった。これらの540個の試料のうち8つ（1.5%）は、K E Y S q P C R多重アッセイを用いてスクリーニングした場合、H P g V - 2 R N Aに対して陽性であった。このグループからの8つのH P g V - 2 R N A陽性試料のうち6つは、1つ以上のH P g V - 2 ペプチドと反応性であった。（2つのH P g V - 2 R N A陽性試料をH I VおよびH C Vに同時感染させた個体から得、H P G V - 2 ペプチドに対する抗体について陰性として試験された。）。540個の試料のうちの全24個（4.4%）は、1つ以上のH P g V - 2 ペプチドと反応性であった：これら24個のうちの6つ（25.0%）は、H P g V - 2 R N A陽性であり、25.0%の陽性予測値を示した。陰性予測は99.6%と計算された。542個の試料のうちの計13個（2.4%）は、2つ以上のペプチドと反応性であり、13個の試料

40

50

のうちの5つ（38.5%）は、HPgV-2 RNA陽性について陽性予測値が38.5%であり、陰性予測値が99.6%であるものとして示した。

#### 【0322】

米国赤十字社（Gaithersburg, MD）から得られた第4セットの240個のHCVRNA試料は、抗HCV陰性であり、したがって、プレ血清交換ウィンドウ期間内の最近の感染であった。HPgV-2 RNA陽性であった240個の試料のうちの1つの試料（0.4%）があった。この試料は、HPgV-2 ペプチドのいずれとも反応しなかった。全体として、240個の試料のうちの計5つ（2.1%）は、1つ以上のHPgV-2 ペプチドと反応性であったが、2つ以上のペプチドと反応性である試料はなかった。

10

#### 【0323】

計188個の試料は、HBsAgとHBVDNAの両方に対して陽性であった。これらの試料のいずれも、HPgV-2 RNAに対して陽性ではなく、188個の試料のうちの計3つ（1.6%）は、1つ以上のHPgV-2 ペプチドと反応性であった。1つの試料は、2つ以上のペプチドと反応性であった。

#### 【0324】

計298個の試料は、HIV RNAとHIVに対する抗体の両方に陽性であった。298個のうちの計4つ（1.3%）は、1つ以上のHPgV-2 ペプチドに対して反応性であり、1つの試料は、2つ以上のペプチドに対して反応性であった。1つの試料は、HPgV-2 RNAに陽性であり、HPgV-2 ペプチドに反応性であった。2つの追加の試料は、ペプチドで検出されなかったRT-PCRスクリーニングによって同定された。3つのRT-PCR陽性試料は、RT-PCRアッセイによって確認されたが、次世代シーケンシングによっては確認されなかった。さらに試験すると、HPgV-2 ペプチドに陰性であった2つのHPgV-2 RNA試料は、抗HCV（Abbot ARC HITECT 抗HCV）およびHCV抗原（Abbot ARCHITECT HCV Ag）に陽性であったことに留意されたい。したがって、これらの試料は、HCVと同時感染させたものとして分類され、この試料グループから除去され、HCV抗体陽性HCVRNA陽性グループに含まれる（以下の表15）。

20

#### 【0325】

HCVのような非経口的に伝染するウイルスのリスクが低いと考えられる、計463個の試料は、健常人の血液ドナーから得られた。463個の試料のうちの計13個（2.8%）は、1つ以上のHPgV-2 ペプチドと反応性であった。463個の試料のうちの2つ（0.4%）は、2つ以上のペプチドと反応性であった。いずれの試料もHPgV-2 RNA陽性ではなかった。（しかしながら、すべての試料が同じ方法を用いて試験されたわけではない。HPgV-2 ペプチドを用いた抗体検出について陰性であった全450個の試料は、多重RT-PCRアッセイによって陰性として試験された。ペプチドに対して反応性であった13個の試料のうち、2つだけが多重アッセイで試験され、両方とも陰性であった。残りの11個の試料はすべて、NS2/3プライマーセットを使用してHPgV-2 RNAについて試験され、11個のうちの7つはまた、他のプライマーセット（E1、5'UTR）を用いて試験された。：実施例3に記載されるように、すべての試料は、HPgV-2 RNAに対して陰性であった。）。

30

40

#### 【0326】

種々の試料グループにおいて実施された試験の要約を以下に示す。HPgV-1 RNA陽性の頻度は、試験したすべてのグループにおいてHPgV-2 RNA陽性より高かった。HPgV-2 RNAは、健常人の血液ドナー、HBV陽性個体およびHCVに同時感染していないHIV感染個体よりもHCV感染した個体において頻繁に見出された。HPgV-2 感染の頻度（HPgV-2 RNAまたはHPgV-2 ペプチドに対する抗体検出によって示される。）は、血清陰性であるHCV感染個体よりも、HCV血清陽性個体の中でより高かった。ペプチド4、9または16の2つ以上に対する反応性は、HPgV-2 RNAを有する陽性の予測値を有した。ペプチドに対する反応性の陰性の予測

50

値は、試験したすべてのグループにおいて高かった。

【 0 3 2 7 】

【表 1 9】

表15 指示された試料グループについてのペプチドプール(3、4、9、16)からの少なくとも1つのペプチドに反応性である試料の数

| グループ                     | HPgV-1 RNA<br>陽性(%) | HPgV-2 RNA<br>陽性(%) | 1つ以上のペプチドに反応である<br>抗体(%) |             |                    | 2つ以上のペプチドに反応である<br>抗体(%) |              |                    | 抗体<br>反応性<br>/PCR<br>陰性- |
|--------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|-------------|--------------------|--------------------------|--------------|--------------------|--------------------------|
|                          |                     |                     | 陽性(%)                    | 陽性の<br>予測値* | 陰性の<br>予測値**       | 陽性(%)                    | 陽性の<br>予測値*  | 陰性の<br>予測値**       |                          |
| HCV Ab+/PCR+<br>(n=542*) | 40 (7.4%)           | 8 (1.5%)            | 24 (4.4%)                | 6/24 (25%)  | 518/520<br>(99.6%) | 13 (2.4%)                | 5/13 (38.5%) | 529/531(99.6%)     | 18/534<br>(3.4%)         |
| HCV Ab-/PCR+<br>(n=240)  | nt                  | 1 (0.4%)            | 5 (2.1%)                 | 0/5 (0%)    | 239/240<br>(99.6%) | 0 (0%)                   | N/A          | 239/240<br>(99.6%) | 5/239<br>(2.1%)          |
| HIV (n=296)              | 29/275 (10.5%)      | 1 (0.3%)            | 4 (1.3%)                 | 1/4 (25.0%) | 288/292<br>(98.6%) | 1 (0.3%)                 | 0/1          | 294/295<br>(99.%)  | 1/295<br>(0.3%)          |
| HBV (n=188)              | 6 (3.2%)            | 0/0 (0%)            | 3 (1.6%)                 | N/A         | 185/188<br>(98.4%) | 0/0 (0.0%)               | N/A          | 188/188<br>(100%)  | 3/188<br>(1.6%)          |
| 血液ドナー<br>(n=463)         | 19/452 (4.2%)       | 0/0 (0%)            | 13 (2.8%)                | N/A         | 450/463<br>(97.2%) | 2 (0.4%)                 | N/A          | 461/463<br>(99.4%) | 13/463<br>(2.8%)         |
| 総計(n=1729)               | 94/1457 (6.4%)      | 10 (0.6%)           | 40 (2.3%)                |             |                    | 7/10 (70%)               |              |                    | 40/1708<br>(2.3%)        |

\*陽性の予測値は、抗体陽性試料の総数で割った、HPgV-2 RNA陽性であり、HPgV-2ペプチドについて抗体陽性である試料の数として決定された。

\*\*陰性の予測値は、HPgV-2ペプチドに対する抗体陰性試料の総数で割った、HPgV-2ペプチドについての抗体陰性である試料の数からHPgV-2 RNA陽性試料の数を控除した数として決定された。

\*\*\*同時感染させたHCV/HIV試料(n=2)を含むが、NGSによって確認されていない。

【 0 3 2 8 】

試験した1729個の試料のうち、計11個のHPgV-2 RNA陽性試料（指標例を含む。）が同定されている（表16）。1729個の試料のうちの計782個（45.2%）がHCV感染個体から得られた。11個のHPgV-2 RNA陽性試料のうちの10個がHCVに感染した個体に見出され、これは、このウイルスがHCV（非経口曝露）と同様の伝達パターンを共有し得ることを示唆した。HPgV-1について、HPgV-1 RNAの有病率は、HIV集団において最も高く（10.5%）、HCV感染したヒトにおいて相対的に高く（7.4%）、健常人の血液ドナーにおいて検出され（4.2%）、これは、HPgV-1による能動感染が、研究された集団について、HPgV-2よりも非常に一般的であることを示す。

【 0 3 2 9 】

上記のように、HPgV-2ペプチドに対する抗体に反応性である、1729個の試料のうちに40個の試料が存在した。これらの40個の試料のうちの7つはHPgV-2 RNA陽性であった。10個のHPgV-2 RNA陽性のうちの計7つ（70%）は抗体反応性であった。残りの33個の抗体反応性の結果は、1719個の試験された試料のうちに認められ、その結果、頻度は1.9%であった。以下に示されるように、HPgV-2 RNA陽性試料のいくつかは、2つ以上のペプチドに反応性である。

【 0 3 3 0 】

【表 20】

表22

| HPgV-2単離物     | HCV     |       | GBV-C RNA | HIV RNA | ペプチド反応性(S/CO) |     |      |      | HPgV-2 ウイルス量   |
|---------------|---------|-------|-----------|---------|---------------|-----|------|------|----------------|
|               | Ab/ RNA | RNAのみ |           |         | 3             | 4   | 9    | 16   | Log RNA コピー/ml |
| UC0125.US     | +       | -     | nt        | -       | nt            | 1.3 | 9.7  | nt   | 6.2            |
| ABT0096P.US   | +       | -     | -         | -       | 1.6           | 3.5 | 9.0  | 20.7 | 3.5            |
| ABT0070P.US   | +       | -     | -         | -       | -             | -   | 5.3  | 1.1  | 5.2            |
| ABT0188P.US   | +       | -     | -         | -       | 1.7           | 5.2 | -    | -    | 2.5            |
| ABT0055A.US   | +       | -     | -         | -       | 1.0           | -   | -    | 1.5  | 3.8            |
| ABT0029A.US   | +       | -     | +         | -       | -             | 1.0 | 1.2  | 2.8  | 4.6            |
| ABT0128A.US   | +       | -     | -         | -       | -             | -   | 6.9  | 2.4  | 4.5            |
| ABT0239.AN.US | -       | +     | -         | -       | -             | -   | -    | -    | 5.8            |
| ABT0100P.US   | -       | -     | -         | +       | -             | -   | 16.3 | -    | nt             |
| ABT0030P.US   | +       | -     | -         | +       | -             | -   | -    | -    | nt             |
| ABT0035P.US   | +       | -     | +         | +       | -             | -   | -    | -    | nt             |

【0331】

[実施例5]

ABT0070P.US、ABT0096P.USおよびABT0128A.USの次世代シーケンシング

実施例3. IのqPCR陽性試料は、実施例2に記載されるように、従来のRT-PCRによってプローブされた。ABT0070P.USのみがNS5A:6914Fと7213R(配列番号44と45)およびNS2-NS3:3334Fと3708R(配列番号34と35)のプライマーと反応性であり、その後、生成物はサンガー配列決定により示され、UC0125.USとアラインされた。3つの試料すべてを抽出し、実施例2に記載されたようにNGSについて調製した。複数のMiSeq実行からのリードマッピングを抽出し、合わせた。

【0332】

計98,017個のNGSは、HPgV-2ゲノムの93%をカバーする、配列番号1にマッピングされた試料ABT0070P.USから読み取る。カバレッジ深度は、1133X±1364リード/ヌクレオチドであり、5'末端に短いギャップ(>20nt)が存在し、配列番号1の2600-3400ntの領域内の4つの内部ギャップは合計約300個の欠損塩基を含み、3'末端に354ntが欠失している。欠損した5'末端は、44F-342R(配列番号12と13)反応からの生成物のPCRおよびサンガー配列決定によって満たされた。内部ギャップは、表1に列記されたプライマー(配列番号16-35)を用いて、X-NS3領域に位置する10個のオーバーラッピングアンプリコンによってカバーされた。NGSおよびサンガー法のデータを組み合わせて得られたコンセンサス配列(配列番号75)を図9に示し、図10に注釈をつけた。表16は、UC0125.USと比較したアミノ酸ミスマッチ数および同一性パーセントを報告し、これはタンパク質に依存して90-97%の範囲であった。

【0333】

計5,099個のNGSは、HPG-V2ゲノムの57%をカバーする配列番号1にマッピングされたABT0096P.US試料から読み取る。カバレッジ深度は、33X±112リード/ヌクレオチドであり、ゲノムの全長にわたってギャップが見られた。試料128だけは、主に2つの領域(740-975および2130-2270)に濃縮された116個のNGSリードを有した。UC0125.USに対するこれらの3つのさらなる症例のヌクレオチドアラインメントを図11に示す。

【0334】

HCV同時感染患者におけるHPgV-2の4つのさらなる株は、本発明者らのスクリーニング努力により明らかにされ、NGSによって配列決定された(下記参照)。伝統的

な R T - P C R およびサンガー配列決定と共同して、遺伝子特異的アプローチとランダムプライムされた N G S アプローチの両方を用いて、各株の現在のゲノム配列カバレッジを報告する。ウイルスの 5' 末端は、S M A R T e r P C R c D N A 合成によって得られた (図 2 3 A 参照)。A B T 0 0 7 0 P . U S の 3' 末端は 3' R A C E によって決定され、A B T 0 0 2 9 A . U S および A B T 0 2 3 9 A N . U S については R T - P C R を用いて決定された。ここでは、反応を 2 % D M S O で捕捉した (図 2 3 D D - E E 参照)。

【 0 3 3 5 】

【表 2 1】

表17

| HCV陽性検体      | ゲノムカバレッジ% | 長さ      |
|--------------|-----------|---------|
| UC0125.US    | 99.8      | 9847 nt |
| ABT0070P.US  | 100.0     | 9867 nt |
| ABT0029A.US  | 100.0     | 9867 nt |
| ABT0239AN.US | 100.0     | 9867 nt |
| ABT0128A.US  | 92.3      | 9109 nt |
| ABT0055A.US  | 78.3      | 7724 nt |
| ABT0096P.US  | 58.0      | 5726 nt |
| ABT0188P.US  | 4.0       | 394 nt  |
| ABT0030P.US  | 99.4      | 9812 nt |
| ABT0041P.US  | 97.7      | 9645 nt |

【 0 3 3 6 】

H C V に同時感染した患者においては、計 8 つの H P g V - 2 単離物が同定されている (上記)。P r o M e d D x からの H I V + 患者の米国人における最近のスクリーニングにより、R T - P C R およびサンガー配列決定によって確認された 6 つのさらなる株が明らかにされた: A B T 0 0 8 4 H . U S 、 A B T 0 0 8 6 H . U S 、 A B T 0 1 0 0 H . U S 、 A B T 0 1 9 8 H . U S 、 A B T 0 0 3 0 P . U S および A B T 0 0 4 1 P . U S (配列は示さない。)

【 0 3 3 7 】

計 1 0 個の H P g V - 2 単離物は、H C V に同時感染した患者において同定されている (上記)。P r o M e d D x からの H I V + 患者の米国人における最近のスクリーニングにより、R T - P C R およびサンガー配列決定によって確認された 4 つのさらなる株が明らかにされた: A B T 0 0 8 4 H . U S 、 A B T 0 0 8 6 H . U S 、 A B T 0 1 0 0 H . U S および A B T 0 1 9 8 H . U S (配列は示さない)。

【 0 3 3 8 】

【表 2 2】

表21

| HIV陽性検体     | ゲノムカバレッジ% | 長さ     |
|-------------|-----------|--------|
| ABT0084H.US | 3.3       | 325 nt |
| ABT0086H.US | 1.6       | 163 nt |
| ABT0100H.US | 4.3       | 421 nt |
| ABT0198H.US | 1.7       | 168 nt |

【 0 3 3 9 】

これにより、H P g V - 2 の計 1 4 個の単離物が得られ、このウイルスによる感染は、例えば、当初考えられていた H C V に同時感染した個体に限定されないことが実証される。完全なゲノムとほぼ完全なゲノムのいくつかのアラインメントを図 2 3 に示す。

## 【0340】

29個の代表的なフラビウイルスとともにHPgV-2 (UC0125. US) および ABT0070P. USの多重配列アラインメントは、EINS-I アルゴリズムを含むMAFFT v7. 0を用いるGeneious v6. 1 (Kearseら、2012、Bioinformatics) において、デフォルトパラメーター (Katoら、Mol Biol Evol、2013) で実施され、続いて、10回の最大反復サイクル (Edgar, Nuc Acids Res, 2004) を伴うMUSCLE v3. 8を用いて精密化を実施した。Jukes-Cantorモデルおよび隣り合う結合アルゴリズムを用いて、ブランチサポートを計算するために使用された10, 000個のブートストラップ複製を用いて、Geneiousにおいて系統樹を構築した。これらのツリーポロジーは、MrBayes V3. 2ソフトウェア (1, 000, 000個の試料ツリー、バーンインとして廃棄されたツリーの10%、平均標準偏差<0. 01で定義されるコンバージェンス) で最尤ベイズ的アプローチを使用して精密化された。各ツリーは、アウトグループとしてデングウイルス1型 (DENV1) および黄熱病ウイルス (YFV) に根ざしていた。分析は、ポリタンパク質配列の全体ならびにNS3およびNS5Bタンパク質それぞれについて実施した (図12)。2つの主要なブランチは、ペギウイルスをフラビウイルス科のヘパシウイルスと区別する。ペギウイルスブランチ内では、ABT0070P. USはUC0125. USと緊密にクラスタリングし、ブランチは100%のブートストラップ値によってサポートされる。両株とも、コウモリおよびげっ歯類のペギウイルスと遠く離れた祖先であるにもかかわらず、共通の祖先を共有し、ブートストラップ値は99. 95%である。これは、HPgV-2が、以前に哺乳動物で同定されたペギウイルスとは異なるヒトペギウイルスであることを実証する。

10

20

## 【0341】

## [実施例6]

HPgV-2 E2糖タンパク質の精製およびHPgV-2 PCR+/Ab+試料を用いた血清学

哺乳動物細胞におけるHPgV-2 E2の発現、精製、特徴付け

この実施例は、哺乳動物細胞からのHPgV-2糖タンパク質E2の設計、発現および精製を記載する。予想される膜貫通領域 (配列番号406) までのE2 ORF配列をコードする発現プラスミドは、タンパク質分泌のためのマウスIgκ軽鎖リーダー配列を含むpcDNA3. 1由来ベクターを用いて構築された。

30

## 【0342】

## 【化2】

配列番号406:E2カセットのコード配列

```
atgagagtctctgcacaattattagattattattattgttctctggatctaggtgctacaagcaccagagcgagagctacctaagattgtacaattacaaataca  
tctacaagcatgaactgcgattgcccttttggcaccctcaccaggaatacagagctagattttctattcctagattttgtccagtgaagatcaatagcagcacctcatct  
gctctggggatcttgggtgtgtgtgtgtgctgaaaattacaaagaccttatacagatgtgggaatgcctccagctccaatttctgctctgtgttacatctacagcaataatg  
atcctcctccttggatcataataaccaccatcatcctcagaactgcagaaatagcaccgttgatcctacaacagctcctgtagagataaatggggaatgctacagc  
ttgtattcttgacagaagaagcagatttgcggcgattgttatggaggatgctttacacaaatggaagccatgatagatcttgggatagatgtggaatcggtacaga  
gatggactgattgaatttgttcagtttagccagattagaccacaatcagcaatacaaccatcgaactgcttgcctggagcttcttagttattgtcttggattaaagacctg  
gatttggatgttctagagctcaggattgtgcactgctatagatgctcctcttacagagatttagaacaattggacctggacttgaaaaatgggtgcctttacctggag  
aacctgttctgaattatgttaatacctcaatgggctagaagaggattcagaatgagcaataaacctctgtctctgctgcagacatttgtgaagatatcttcttgcctcc  
tttctgtaatacctacacctggaagagtttagtgtgcaacaatacagccttttatcctagaggaggaggttgcacttattggcgaatgttcagggtctgacccctaa  
tacaggatctggatctggacatcatcatcatcatcatcactaa
```

40

## 【0343】

8×ヒスチジンタグを精製のためにE2 ORFのカルボキシ末端のフレームにクローニングした。HPgV-2 E2をコードするプラスミドは、リポフェクタミン2000トランスフェクション試薬 (Life Technologies, Carlsbad、

50

CA、USA)を用いて、HEK293-6E(ヒト胎児腎臓-6E)浮遊細胞に一過的にトランスフェクトされた。6日後、細胞培養物を遠心分離(1200rpm、10分間)し、上清を回収した。上清は、アミコンウルトラフィルター(EMD Millipore、Billerica、Massachusetts、USA)を用いて濃縮された。細胞は、1%トリトンX-100を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)を用いて氷上で30分間溶解された。細胞破片を15000rpmで10分間の遠心分離によって沈降させ、上清を回収した。細胞溶解物および濃縮した上清を4-20%のSDS-PAGE勾配ゲル(Life Technologies Carlsbad、CA、USAのNovex)上で泳動させ、WesternBreezeキット(Life TechnologiesのNovex)を抗Hisアルカリホスファターゼ(AP)結合した一次抗体(Life Technologies、Carlsbad、CA、USAのNovex)と併用してウェスタンブロットを行った。タンパク質は、BCIP/NBTクロマチン染色(Life TechnologiesのNovex)およびBio-Rad Imager(Image Lab v4.0ソフトウェアを使用するBioRad GelDoc EZ Imager)を用いて視覚化された。発現されたHPgV-2 E2構築物の予測される分子量は39.6kDaである。細胞溶解物からのHPgV-2 E2は約50kDaに泳動され、上清からの濃縮されたHPgV-2 E2は、50-75kDaの範囲の分子量に泳動され、タンパク質の分泌された形態のグリコシル化が示唆された(図24A)。これらは、電気泳動中にタンパク質をよりゆっくりと移動させる場合がある。

10

20

#### 【0344】

濃縮された上清からのHPgV-2 E2は、ニッケル(Ni<sup>+</sup>)アガロースを充填したアフィニティークラム(His Bindレジン、Novagen、EMD Millipore、Billerica、Massachusetts、USA)を用いて未変性条件下で精製された。非結合物質(フロースルー)および溶出した結合物質を4-20%のSDS-PAGEゲル上で泳動し、その後、Orioleタンパク質染色(Bio-Rad)を用いた染色または抗His-AP抗体を用いたウェスタンブロット(Life Technologies、Carlsbad CA、USAのWesternBreeze、Novex)を行った。タンパク質染色は、50-70kDaで結合および溶出された物質の複数の分子量を示し(図24B)、これは、HPgV-2 E2でトランスフェクトされた細胞上清の初期ウェスタンブロットによって検出されたサイズと一致した(図24A)。ウェスタンブロットは、60-70kDaの間の複数の分子量バンドを示した(図24C)。

30

#### 【0345】

精製されたHPgV-2 E2のPNGase F(ペプチド-N-グリコシダーゼF)処理を実施して、翻訳後グリコシル化により、精製されたタンパク質の推定分子量より大きいことを確認した。HPgV-2は、39.6kDaの予測される分子量の電気泳動移動度をシフトさせることができる10個の潜在的なアスパラギン結合グリコシル化部位を有する。PNGase Fは、N-結合糖タンパク質の最も内側のGlcNAc残基とアスパラギン残基の間を特異的に切断する酵素である。精製されたHPgV-2 E2を変性させ、37℃で1時間、PNGase F(New England Biolabs(NEB)、Ipswich、MA、USA)とともにインキュベートし、続いて、処理および未処理のタンパク質をSDS-PAGE分析した(図24D)。PNGase Fで処理していない精製HPgV-2 E2は、分子量が60-70kDaであり、PNGase Fで処理したHPgV-2 E2は、SDS-PAGEゲルにより37kDaマーカーに近い分子量を有した。PNGase Fで処理したE2は予測分子量に近づいて泳動され、これは、タンパク質の大部分が脱グリコシル化されたことを示唆した。

40

#### 【0346】

さらに、カルボキシ末端膜貫通ドメインを有さないHPgV-1(GBV-C)E2をコードするプラスミドはまた、上記のように哺乳動物発現ベクターにおいて発現された。

50

哺乳動物細胞で発現させると、タンパク質は、カルボキシ末端での8×ヒスチジンタグとの融合物として分泌される。

#### 【0347】

PCR+/Ab+試料を用いた精製HPgV-2 E2の血清学的試験

PCR+/Ab+試料中の精製HPgV-2 E2に対する抗体は、HPgV-2精製されたE2タンパク質の希釈液を含むスロットブロットを行うことによって評価された。精製タンパク質は、0.1 μg/ml、1 μg/ml、10 μg/mlおよび100 μg/mlの滴定でニトロセルロース膜に結合された。未結合タンパク質を洗い流し、膜を風乾させた。PCR+/Ab+試料のABT0096P、ABT0070P、ABT0188PおよびABT0055Aの1:100希釈物をスロットブロットとともにインキュベートした。これらの試料は、HPgV-2ペプチド(3、4、9および16)のプールに反応性であった。陰性対照は正常なヒト血漿であり、HPgV-2 RNAについて陰性な試料であり、HPgV-2ペプチド3、4、9および16のプールに対する抗体について陰性であった。アルカリホスファターゼに結合したヤギ抗ヒト二次抗体およびBCIP/NBT色素原基質を用いて抗体を視覚化した(図25)。試験したHPgV-2 PCR+/Ab+試料は、100 μgのバンドに対する強力に検出可能な抗体を有し、10 μgのE2バンドに対してわずかに反応性であった。このデータは、PCR+個体がHPgV-2 E2の天然型に対する抗体を作製することを示す。ウイルス血症後にE2抗体が存在するかどうかを決定するために、さらなる研究が必要である。また、このデータは、HPgV-2が感染の血清学的マーカーであることを示している。さらに、HCV用の抗体試験(Abbott Laboratories、Abbott Park IL 60064)とHCV RNA試験(Bayer Versant HCV RNA 3.0アッセイ(ProMedDx、Norton、MAより))の両方によって、試験が陽性である1回目のプラズマフェレーシスドナーからの試料のパネルを使用して、スロットブロットをプローブした(図25-試料ABT0045P、ABT0141P、ABT0178P、ABT0065P)。

10

20

#### 【0348】

HPgV-2 RNA陽性であり、ペプチドに対する抗体に陽性である試料を使用して、固相微粒子上にコーティングし、ARCHITECTアッセイで使用した場合の精製HPgV-2 E2の有用性を確認した(実施例4参照)。簡単に述べると、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDAC、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO 63103)を用いて、SpheroTech磁性微粒子(Lake Forest、IL、USA)を100 μg/mlの精製E2タンパク質でコーティングし、精製タンパク質を磁性微粒子に架橋させた。ABBOTT ARCHITECT装置(上記、実施例3)を用いて、間接イムノアッセイにおいて、選択されたHPgV-2 RNA陽性試料を用いてE2結合微粒子を泳動させた。この場合、試料からの結合抗体をマウス抗ヒトアクリジニウムコンジュゲート二次抗体で検出した(表18)。さらに、HPgV-2 RNAに陰性である試料および抗体応答を、E2コーティングした微粒子を用いて試験した。スロットブロット上で反応性である試料はまた、HPgV-2 E2を微粒子上にコーティングし、ARCHITECTアッセイで使用した場合に反応性であった(表18)。

30

40

#### 【0349】

## 【表 2 3】

表18.HP g V-2でコーティングされた微粒子を用いたARCHITECTアッセイ。シグナル対カットオフ(S/CO)をNCの10倍に設定した。試料は、S/CO>1である場合、HP g V-2 E2に対する抗体について陽性(反応性)であると考えられた。試料ABT0029AおよびABT0128Aは、シグナルが上昇したが、カットオフを超えていなかった。

| 試料                    | HP g V-2 RNA + | HP g V-2ペプチド-3、4、9、16に対する抗体 S/CO | 精製HP g V-2 E2に対する抗体 S/CO |
|-----------------------|----------------|----------------------------------|--------------------------|
| NC                    | Neg            | Neg                              | --                       |
| ABT0029A              | Pos            | Pos                              | 0.6                      |
| ABT0055A              | Pos            | Pos                              | 6.6                      |
| ABT0070P              | Pos            | Pos                              | 4.1                      |
| ABT0096P              | Pos            | Pos                              | 6.4                      |
| ABT0128A              | Pos            | Pos                              | 0.9                      |
| ABT0188P              | Pos            | Pos                              | 15.7                     |
| ABT0239A              | Pos            | Neg                              | .05                      |
| HP g V-2 RNA陰性/抗体陰性試料 |                |                                  |                          |
| ABT0045P              | Neg            | Neg                              | .07                      |
| ABT0141P              | Neg            | Neg                              | .004                     |
| ABT0178P              | Neg            | Neg                              | .02                      |
| ABT0065P              | Neg            | Neg                              | .007                     |

## 【 0 3 5 0】

HP g V-2 RNA陽性試料内では、ペプチドに対する抗体とE2タンパク質に対する抗体間の相関が高かった。6つのHP g V-2 RNA陽性試料のうちの4つは、E2組換えタンパク質でコーティングされた微粒子に対する陰性対照シグナルの10倍を超える検出可能な抗体応答を有した。残りの2つの試料は、バックグラウンドを超えてシグナルが上昇しており、これは、アッセイのさらなる最適化の際に検出され得る軽度の抗体応答があることが示唆した。

## 【 0 3 5 1】

正常なヒトのドナー血漿(n=100)の集団はまた、HP g V-2 E2に対する反応性についてスクリーニングされ、現在または過去の感染を示した。1より大きいカットオフ(S/CO)に対するシグナルを有する試料は検出されず、これは、米国の集団において、HP g V-2が低頻度の風土病ウイルスであることを示唆した。

## 【 0 3 5 2】

また、HP g V-2 RNA+試料の多くは、HP g V-1 E2に対する抗体を有するため、HP g V-1またはHP g V-2 E2のいずれかに対する交差反応性について評価した。精製されたHP g V-1または-2 E2が、HP g V-1 E2 Ab+およびHP g V-2 RNA+/E2 Ab+であった試料に予め結合しているブロッキング実験を実施した。HP g V-1またはHP g V-2のいずれかに予め結合した試料を使用

して、精製されたHPgV-1とHPgV-2 E2糖タンパク質の両方を含むスロットブロットをプローブした。HPgV-2 E2を用いたプレ結合は、スロットブロット上で精製HPgV-2 E2への結合を低下させ、HPgV-1 E2を用いたプレ結合は、HPgV-1 E2への試料の結合を低下させた（図26）。プレ結合に使用されない異種タンパク質への結合の最小限の減少があり、これは、スロットブロット分析によって検出された免疫反応性が特異的であることを示唆した。

### 【0353】

#### 〔実施例7〕

HPgV-2 NS4A/4B融合タンパク質を用いた発現、精製および血清学大腸菌（E. coli）におけるNS4A/4B融合物を含むプラスミドの設計、現および精製

10

この実施例は、HPgV-2タンパク質であるNS4AおよびNS4Bのドメインへのマルトース結合タンパク質融合物の設計、ならびにその後の大腸菌からの発現および精製について記載する。簡単に述べると、Protean 3Dプログラム（DNASTAR、Madison、WI、USA）を用いて、HPgV-2 NS4A-4Bの81個のアミノ酸セグメントは、細胞質局在化を有することが予測された（配列番号407）。

### 【0354】

#### 【化3】

コードされた81個のアミノ酸のHPgV-2 NS4A-4Bペプチドの核酸配列（配列番号407）:

```
ATG GCC CTT GTT CCC AGC GCT GTG TGG AGT GTT GAA GTC CGC CCC GCA GGC GTG ACG
CGC CCT GAT GCC ACC GAT GAA ACC GCT GCG TAC GCT CAA CGC TTG TAT CAG GCC TGC
GCC GAT TCA GGT ATC TTT GCG TCA CTT CAA GGA ACC GCG AGT GCG GCG TTG GGC AAG
CTG GCG GAT GCC TCG CGT GGC GCG AGT CAA TAC CTG GCA GCC GCC CCA CCA TCA CCT
GCC CCA CTG GTG CAG GTA TTA
```

20

### 【0355】

この領域は、アミノ末端マルトース結合融合を可能にするpMAL-C5Xベクターにおける発現のために選択され、6×ヒスチジンタグは、構築物のC末端に設計され、すべてはIPTG誘導性プロモーター（Genscript、Piscataway、NJ、USA）の下にあった。構築物をBL21大腸菌株において発現させ、37℃で4時間、IPTG誘導後、細胞を溶解し、可溶性タンパク質をProbondニッケル精製システム（Invitrogen、Grand Island、NY、USA）を用いて精製した。抗His抗体（Invitrogen、Grand Island、NY、USA）を用いてウェスタンブロットを実施し（WesternBreeze、Invitrogen、Grand Island、NY、USA）、溶出された物質中に50kDaの単一バンドが検出された（42kDa MBP+8kDa NS4AB）（図27A）。

30

### 【0356】

精製された物質を確認するために、既知のHPgV-2 RNA陽性試料を用いて、スロットブロットと間接ARCHITECTイムノアッセイの両方を実施した。スロットブロットについては、10μgおよび100μgの精製物質をニトロセルロース膜（Invitrogen、Grand Island、NY、USA）に受動的に結合させ、その後、未結合タンパク質を洗い流し、膜をブロッキングした。試料ABT0055A、ABT0096P、ABT0188Pについて結合したNS4ABを含むスロットブロットを用いて、精製NS4ABに対する抗体を検出し、陰性対照血漿については検出されなかった（図27B）。結合した抗体は、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトアルカリホスファターゼコンジュゲート二次抗体（SouthernBiotech、Birmingham、AL、USA）を用いて検出され、比色検出は、BCIP/NBT基質（SigmaFAST、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO 63103）によってもたらされた。

40

### 【0357】

50

自動化イムノアッセイにおいて精製NS4ABタンパク質を試験するために、Sphero ro tech 磁性微粒子 (Lake Forest、IL、USA) は、N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDAC、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO 63103) を用いて、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$  の精製NS4ABタンパク質でコーティングされ、精製タンパク質を磁性微粒子に架橋させた。NS4ABをカップリングさせた微粒子は、ABBOTT ARCHITECT 装置 (上記、実施例3) を用いて間接イムノアッセイにおいて、選択されたHPgV-2 RNA 陽性試料とともに泳動された。この場合、試料からの結合抗体をマウス抗ヒトアクリジニウムコンジュゲート二次抗体で検出した (表19)。

【0358】

10

【表24】

表19.NPgV-2 RNA陽性試料における

NS4ABに対する抗体の間接アッセイ

| 試料       | S/CO* |
|----------|-------|
| ABT0029A | 1.4   |
| ABT0055A | 0.4   |
| ABT0070P | 14.8  |
| ABT0096P | 9.8   |
| ABT0128A | 0.8   |
| ABT0188P | 1.9   |

20

\*S/CO=シグナル/カットオフ。S/CO>1は、NS4ABタンパク質に対する抗体について反応性であると考えられる。

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

30

正常なヒトのドナー血漿(n=100)の集団はまた、HPgV-2 NS4ABに対する反応性についてスクリーニングされ、現在または過去の感染を示した。1より大きいカットオフ (S/CO) に対するシグナルを有する試料は検出されず、これは、米国の集団において、HPgV-2が低頻度の風土病ウイルスであることを示唆した。

【0359】

[実施例8]

ウサギにおけるHPgV-2抗原の検出と過免疫血清の生成

約1年齢のニュージーランドウサギをHPgV-2ペプチドに対する抗体の生成のために選択した。

40

【0360】

1回目の免疫化に関して、0.5mlのアジュバントと混合した0.9%生理食塩水に可溶化した1.0mgのペプチド (表3のペプチド4、5および9、実施例4) を各ウサギに接種した。1回目の免疫化から約10週間後、ウサギから血清を得、免疫原 (immunogen) に対する抗体について試験した。ウサギを次の8カ月間にさらに5回免疫化した。

【0361】

ARCHITECTの間接的アッセイを用いて、各ウサギについて抗体産生を決定した。アッセイフォーマットは、緩衝溶液に希釈した800ng/mlのそれぞれのビオチン

50

化ペプチドとともに、 $10\mu\text{l}$ のウサギ血清、および各ペプチド上のビオチンタグを介してペプチド／抗体複合体を捕捉するためにストレプトアビジンで被覆した $0.05\%$ の微粒子を利用した。18分間のインキュベーション後、磁気微粒子を洗浄し、 $10\text{ng}/\text{ml}$ のアクリジニル化ヤギ抗ウサギIgGを含むコンジュゲート希釈液と反応させ、免疫複合体を介して固相に結合したウサギ抗体を検出した。試験前に、試料をARCHITECT洗浄緩衝溶液で $1:100$ に希釈した。陰性対照（NC）ウサギ（いずれのHPgV-2ペプチドも接種しなかった。）の相対光単位（rlu）で表したシグナル（S）は、197と251の間であった。S/N値が、HPgV-2ペプチドで免疫化した5匹のウサギについて得られ、表20に示される。ウサギ13212および13213のS/N値は、ペプチド4に対する反応性について1195および1131.1であり、ウサギ13214および13215は、ペプチド5について1056および1160であり、ウサギ13216は、ペプチド9について849であり、すべてのウサギは、免疫化されなかったペプチドについて陰性であった。ウサギは免疫原ペプチドに対する特異的抗体を示し（表20）、抗体は他のHPgV-2ペプチドに対して交差反応性ではなかった。したがって、これらの過免疫血清は、様々な組織（血液）または器官（肝臓など）におけるHPgV-2抗原の存在を決定するために利用することができ、このウイルスの細胞指向性を決定するのに有用であり得る。

【0362】

【表25】

表20

HPgV-2 ペプチドで免疫化したウサギ由来の血清は、免疫原配列に対して特異的反応性を示す。

| ウサギ番号  | 免疫原ペプチド<br>(Genscript) | 800ng/mlのBTペプチドを用いた試験 |        |       |
|--------|------------------------|-----------------------|--------|-------|
|        |                        | ペプチド4                 | ペプチド5  | ペプチド9 |
| 1回目の採血 |                        |                       |        |       |
| 13212  | PV4A (ペプチド4)           | 1195.0                | 0.7    | 0.5   |
| 13213  | PV4A (ペプチド4)           | 1131.1                | 1.5    | 1.0   |
| 13214  | PV5A (ペプチド5)           | 1.2                   | 1055.9 | 0.6   |
| 13215  | PV5A (ペプチド5)           | 1.6                   | 1160.0 | 0.8   |
| 13216  | PV9A (ペプチド9)           | 1.1                   | 1.4    | 849.4 |

【0363】

HPgV-2ペプチドで免疫化されたまたは免疫化されていないウサギ血清（NC）からの採血を、ARCHITECT間接アッセイによってペプチド特異的抗体についてアッセイした。陰性対照（免疫化されていないウサギ血清）についての相対光単位（rlus）と指定されたペプチドで免疫化された各ウサギについてのシグナル対ノイズ（S/N）を示す。

【0364】

本出願において言及される全ての出版物および特許は、参照により本明細書に組み込まれる。記載される本発明の方法および組成物の様々な修飾および変形は、当業者には、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、明らかである。本発明を、特定の好ましい実施形態に関連して記載してきたが、本発明は請求される通り、このような特定の実施形態に過度に限定されてはならないことを理解されたい。実際、当業者には明らかである、本発明を行うための記載される様式の様々な修飾は、以下の特許請求の範囲の範囲内にあ

【図 1 A】

FIG. 1A

ヒトベギウイルス 2 (UC0125, US) 核酸配列一配列番号 1

```
1 GTGTTTGACA ATGCCATGAG GGAATCATGAC ACTGGGGTGA GCGGAGCGAG CACCGAAGTC
61 GGGTGAACATC GAGCTCCAGAT GGGACCAACCT GCGTTGGTGG TTCAATGAGGG GCATGCCCCAC
121 GCGAAGCGATC ATCGTGCAGAA GGGATGGGTC CTGCACATGG TGCCATGCGGC GCGACCACTAT
181 CGTACAGCCTC TATAGGGGTGG CCGCGGGGGCCC CCCCAGTGTG AGCTGCGTGG ASCGCAACATC
241 GGGGTTGTCAA ACTGATCAAAA CCATTGTGTC TCAGAGTGTG GGGGGUGACT AIAATACCTTC
301 CTGGGGCTGCG CGGGGCTTAA ATGGGAGGCTA CCACTGCGGTG GGTGGCTCTT GCGCGTCACC
361 AAGTCGTGTGC CAGGTTCGGA GACGAGCTTT GCAGCTGTGC GCATTCTCTG CCGTGATCGG
421 ATCCGGGTATG TGTTCGATCC GGTCCAAAAC TGAAGGGCGC ATTGAGTCAG GCGCAAAATATT
481 CGAGTCTCAG CCGCGCTATT GGAATGGGTA GGGTTTTCGT TTCTTTCTA ACTGTGTGCAA
541 TCAATCTGAT ATATTATGGT GTTTGCACCG TTGGTGTGTG ACAAGACCCTG GCTGTTTAGT
601 GTGCACGGGC AATGGCACCC ATCCATATCTG CTGGGACTAT CTGGATCOG GGTGAATCGG
661 CGGGCTTGCA CGTGCAATGG GTGAGGGAGC TGAAGCGGTT CTTCGCTTGA TCGGGATPTG
721 AGGTGGCTTT GGAAGTGTAG CTGAGTCCGT TGGTAIGTCC GAAGTCTATG CAGCTATTCT
781 TTGCTTTGGT TTATTTGGTT GGTATGGGTC GGTATACCT AAACAGCTGG TTGCTGCGGT
841 CTGCGCTGCA GTGAACATTT CTCCATATAG CTCTTATCT CAGATACTA TCGCATTTGG
901 TACGTGGATA CTACAACTAC CTGGTCTTTT TGTGCAAAATG TTGTTAGCT TCCCTATPACT
961 CTACAGCTGC TGGATCTTTT GGTGTGTGCT CAGCGGACAG ACTGTGTGCT TGAATAGCAAT
1021 CCTTCTGGCT AGTCCTAGGG TTATGGGCTG TTGAAAGCTA TCTGAAAGCT ACCTCAAAATA
1081 CTGTACCATCA ACCAATATCT CAACCTCTAT GAAGCTGTAG TCGCCCTTTG GAACCTTTAC
1141 TCGCAATACT GAGTCTPCTT TCCCATACCT TAGATTCTGT CCTGTTAAAA TCAATCTTAC
1201 TACATTTTAT TGTTCATGGG GGTGCTGGTG GTGGTTTGTG GAAACATCA CCGCTCCATA
1261 CACGGAGCTT GGCATGCCAC CAGCAGCAAT TTCCGCTTTG TGCTATATCT ATTCTAACAA
1321 TCACCCACCT CTCTGTATAT ATACACGAAC TATCATACCT CAGAACTCTC CCAACTCTAC
1381 GGTGAGTCTC ATCAGACCTC CATGCGGTGA CAAGTGGGCG AAGCGAATCT CTGTATTTCT
1441 TCACCGCCGG TCGCGGTTCT GGGGGGACTG CTATGGCGGT TGTTTCTATA CTAATGTGTAG
1501 TCATGATCGA TCTTGGATC GATGCGGAGT TGGTATCCGT GATGACTCTA TAGAGTTTCT
1561 CGAGCTTGST CAGATTCCAG CATACATCTC GATAGACTCC TCGCTGGGCT
1621 CTGCTTTGTC ATGCGATCCG GTCTTGGGCG TGGGTTTGTG TCGAGCGGAG CCGATGGGCT
1681 GGTGCACTGC TATAGGTGCT CTTCATAGCT TGACCTTGA CAGTTTGTCT TCCCTGTGCT
1741 GAAATGGGGT CCAATTTCCCG GCGAGCGCTGT CCGGAGATGT TGTATGAACC CTGACTGGGG
1801 GAGGCGCGGC TTCCGGAGGT CTAATGAATC CTGAGCTTGT CTACAGACTC TCGTTGAGGA
1861 CATTTTCCCTA GGGGCTTTT GTAATCGGAG GCGTGGCGGT GTACGTGTGT GTACAAATAC
1921 CGTCTTCTAT GAGTCTPCTT TCCCATACCT TAGATTCTGT CCTGTTAAAA TCAATCTTAC
1981 CCGTAACACT GCATCTTTAC ACTCTCTGCT GAGTTTGATA TCTCTTATCT TGTGTTGGTG
2041 TGTGTTTCTT GGTCTTACAT TGTCTTCCAT AATAATCATA TTTTCTTGG GCGCGGGCCA
2101 TGTATATGCT TCTTGTATCT TAAGCTGTGA TTGGCGTGT TCGAACGATG CCGTCTGTTT
2161 CACATCTGGC TGTCTTGGCA CCTTCAATGA GCTCTGTGCT TCGCGGGTTC CCGACGGGAT
2221 ATGCTGCTGT GGTGATGCTG TGCCACCTCC CGAGCGTGGT TGGGAGGCTG CTGCGGGCAT
2281 GTCATGGGTG ATTTCTGCTG CATCTGGGCT TGGTTTCTCT TTAATAGTGA TCGTTTCTGT
2341 CTTCTCTACT GTGCTGGCA ACACAGACGA TATCATTTGC TATGGTGAAC CAGCTTCTGT
2401 CCGGAGCATC AGGGGATCT ATTGGCGCTA CTTTTTCGCT GCGCGAATCT TGTGTACTAT
2461 GACTCCCTTC CTAGGTTTAA GGTTAATGCT TCGCGGCTTC AATAATAGAT GCTTGTPTCC
2521 CATACGCGCM GCGACGGCTG CACTGAGGTT TTGCACTTCT CGTGTGACTT TGTGTPTCTG
2581 AGTGTGCTTC CTAATCTATA TATATCTCA CCGTGTAAAT GCTGCGCTCA ATAGAAATG
2641 CTATGACATC GCAAATTTAG AGATGATGAT ATCTTTTGAAT ACCTATCATG AGACTGTPTCT
2701 TATATCTCTT TGTCTATTGC TATACCTCCA GGTGTGCGCC CGTGGGGCTT TGGCGGCTAT
2761 GGTGGCCATC AAGCTATTCT GAGGCGTGT ATTCCGTGTG GTGTTGGCGC ACGGTGTGTG
2821 CCGACCTTGC GGGGTATTTC GTCTTGAAGT TCGCGCGGAC ATCTCTTGGT TGGTGGATGT
2881 TACTGGCAAT TGCATTTGGT ACATGCTCTG TATCTCTCTT TTTTGTGCG CAGTGTPTG
2941 CTTACCAATC CCACTTTGAC GACTCATATA GACTCATATA GGTGCGAGGT GGGGCGAGGT
3001 CTATGCCAGA CTCCCTCTGT CTGCTGGTGT TCGCTCTCTC GGTGCGAGGT TCCATTTTCC
3061 TGCAAGTGTG GCGTGTGCTG TGCTGTGAGC TTGCAIGTCT TGGCGCGCTG AGTGTCTGA
3121 AATCAGCGCT GTCTTCATTC TGTGTGCTCT GAGAGTGGAC ACATATAGCA CATGTTAGT
```

【図 1 C】

FIG. 1C

```
6481 GAGCACCTGT GCGTGTGGAG AAGTGTGTGT CCTTCAGTGC CTTTGCTCAA CATCTGACC
6541 AACACTCAGT GTGGGCGGCT GGTTGTGCTGT TAGTTGGAGT GTTGGGTTC CATTCACCC
6601 GAGTACAGCA GGCATCGGCA CTTCAGGCC GGACATCAGT GACGCCAACA AATTGGGTTT
6661 CCGGATATGG GTTGCAGGCA TGTGGGAGCT AGAGCGGGCG GCGCAAAAT GSCACGCTG
6721 TGACGATCAT TGTGTGTGG ACCGGGCGAC CGTGTGATCC GCTGTGAAG CCGACCGGTT
6781 CAGGCTTAAT GGTATACCTA TAAATAGGTT TTCTCCACCA CAAACTTATT GCGTATCTGT
6841 CTGTTCTTCT TAGATCACTT CAGTGTCTAC TAACCTAIGT AAGCCAGCTA AGACCTTAGT
6901 TGTGTGCCAA GAGGAGGCGG TTGAGCTGCT GGAAGAGACA GTTGACACAG CACAAGTAGT
6961 GATGAGGCCA AATCTTGGAG CCGGTAGAGC CCGTGAATAT GATGATGGC AGGTTCCGCA
7021 AGCAGTTGGC GAGGAGTACA CCGGTTTGGC AGAGGAGGAT GTTGCATGAC CAGCGTGGT
7081 GAAACCGGCA GGTGAGTGGC CTGATGGGCT TATGATAGC TTAGGATGCA TTAGCGTGT
7141 GACTGTCTTA CCGAGACCTG GCGAGGAGCT CCAAAATGCT ATCAAATTTG TATGTCAGG
7201 GCGTTCACGG TTTGTTCCAC CAGTGGCCAA GCGACGCAAG CCGTCTCGGG GTGCTTGG
7261 CCGCGTGGCG ATGCTATGCG GCAGCGCTCC AATCAAGTTC GAGGCCACCG CAGTACCAAT
7321 CTATTAATAT ATCCGAGAAG AGTGTCTATAT TGTGCTACCG TGTACCGGCT GTGCTGACCA
7381 GCGCTTGAGC GTTTCGATAGC GAGTGTGCTG TCTGACTTTA ACCAAATATT TATGTAACAA
7441 ACACAGCTGC TATATTCCAA AAGAGAGAGT AAGAGAGAGC ACAGAAATAG CTGTCAATTG
7501 CCGCTACACA ACAAGGCGAC CAGATTAAGT TATCACTTTC AGAGCAGGTT ACCGATCAGT
7561 CTCACTTTGT CACCCCTTGC AAATCTCTAT TAGGGCCCTG CTCAAAGAT ATGGGTATCC
7621 TATTGGGAAG TGTGCGAGCT GCAACGGGCG CCTTGGTGC GACGCGCAGT CTGTGAGCT
7681 CAATGGAGTG ACACCTTATG AACATGATAT GCAATGCTAC AATTTGTTCT GATCGATTTG
7741 GGCACCAACA ACCCGACCTT TACCTGCAAC CCGCAGCGTG CCGGCATTTT TCGCGCGAGA
7801 CACATGCGCG GTCTACACCA CACAGCGGCT TGAATGCTTC GAGCGGAGG CTATAGCTAC
7861 GATTGATCAA AAGTCAACCA AGTGTGACCA GTGCTTCGGA GAGCATACCA ATTCCTGCT
7921 TGCGTAGGCA AAGACCTTCA GACATTTTGG CAGGATCTGG TGTCAAGAT TGTCAAGAT
7981 GCGCGCAAC ACACCGGCTG ATCATACAA CGSCATCACT TACACAGATT TGTCTCTGG
8041 ACGCGCAAAA CCTGTGCTTC AGAAATTTGT AGATCAGATG CCGCGTGGAG TGTACGACGC
8101 TCCAATGGCG ATTATTCCAA GAGTGTAAAT GTTTCACAGA GACAAGTCAA CACGGAAGCG
8161 ACCACGGTTC ATGATTTTCC CTGGGTGTGC CCGCAGAGTC CCGGAGAAAA TGAATCTGG
8221 CGATCTGGCG GCGATTAACC AGACAGTGTCT AGGTGAATGC TACGGGTTTG CCACTCCGCG
8281 GCATGAGCGC CGCGCGTACC TGAACAATGT GTGGAACCGC GCAACGAGAC CACAAGCTAT
8341 CCGGCTTGAT GAGATCTTCT TTGATAGCAC CATCACGGCA GAGGACATGG AITGTAAGG
8401 CACATCTGCT GCTGACGCGC ATACGGACCG GGAAGGTGTT CACGCGCTAT ACAATATTG
8461 AAAAAAGAG CCAATTTGTT ATATCACAGG AAAAGTTGTC GGGGTGCGTA GCTGTCGAGC
8521 CTCAGGTAGC CTATACACAA CAGTGGGCAA CACGCTTACT TGTACTCTCA AGGTTCCGCG
8581 AGCTTGCAAG CCGCGCGGCA TTAACCAAT TGGTCTACTA TGTACTGGAG ATAGACACCT
8641 CATATTAATG CAGGATTAAG CTGATGAGCT TGGTGTGCT GGTGATGCT TGTGATGCT
8701 CTATGGGTTT ACTCAGACCA TCGAGTGTCT TGGGAGCTCT TGTCTATGCG ACTGCTGAG
8761 CCGACCTGTC CACAGCGTTT CCTCCGCGCG ACCTATGCTT CCGATCGCTC TCCCAACAC
8821 TCGACGTGCG ATTGTACGCG TTCTGCGGGA AAAGGGCAGT CCACCTGGGT TATCTAGGCT
8881 CTATATTGCT ATGTATCTTA CTGCGGCTGT GACTGTCTAC GTTCTGATCG CCGTGTGTG
8941 CATGCTCAT TGAATAGAGC CAGTGGACAT GTGACACGTT GTAACGTTGA CCGTGTGTG
9001 TAACAGTGTG AGCGTGCAGT TTGTCGTGCT TCCAACTAAT ATGCAAAAT TACATGGCG
9061 TGACGCACTA CAGTGTGCTC GTGACAGATG AGCTTCCATG GCGGAAATGC CCTCAGCGCT
9121 GCGCTTCTTT GCGATCTGAG GGTGTGACTG CTGGAGGCGG AGACCGCGTG CCACTCAGAC
9181 TGTATGATC AAGTTGGGCG GTGGAGATGC GAATTTGCGG CAGAATGAT TGTGCTTACC
9241 GAGGATTAAG ACACACAGCG CCGAACCAAA GGGCATGTGT CTCTTGCCAC CGGAATGATG
9301 GAGGCGTCCG TACGAAAAAT TGACTTTGAG ACAGATCGAG CCGAATCGTG GCTGATGCTG
9361 CTACAGGTTT TGTGTTGTTG CTAGTGTACT ACTGCTCTG CTCTGCTTGT AAATCTCAAA
9421 TCAATTAATG ACAGGACCTA CAGAGCAGGA GTGATGTCA CCGTGAACCA CCGTGGCTG
9481 AACAAGGCGG TTGACGACCC CCGCATCTCG AGTGTGGCAA GCTACACATA CCGCTGTGAC
9541 GACCCCGCCC CCGCATCTGC CCGCGAGCGC CAGGGCGAAG GCAGTGAAG TGAAGTCTG
9601 GCGACACTCT CCGTACCCCA CCGAGGCTTA CGCTCTGCTC TGGCGAGGAC CCGTAACATA
9661 CCGTCTGACG GTGTGAGCTC GAGTATCTTT GTTAACCACT TAATGGTCTGT AACTGAGCCC
9721 CCGTGGCGGG GATCTAAGCG CGGACCGCG GTAGAGAGGG TCAAGCGCCC CTTCATT
```

【図 1 B】

FIG. 1B

```
3181 AGCGTGTCTT TCCGACGGGC CGAGTGGCGC AACCCTTGCA ATTCCTGGCG ATGACATGCG
3241 GCGCATTTGT GACCACCGGG CGTTCGCGCG GGTATTACGT TGCCTTGGAT CACGCGGAC
3301 ATACATATAC AACCACATGG GCCAAGTCTC GGAAGCGGTC GCGCAAGACG TCAGGGATCT
3361 GGGCGGTTGC TTGGAACCAAC TCGGTTTGA GAGGCCACAC TTACTTGAGA TCGTGGATGA
3421 CACATAGATT TTGCTGTGTC GACATATGCT TGAAGCTAAA CCGCTTGGCG CCGCTTGGCG
3481 GCGCGTGTCT TCGGTGGGAC ACTCGAAGCT GAGCTGAGTC CCGACTGGTT TCGCATGAG
3541 TGCTCCGGTG GTTATTACCA GCGCAAGCAT TGGTATGCTG TCTTCTCTTA AGCGGACACT
3601 CACAGGCGGT GCTGAAACAC CAGGTCGCG GCGATGCTG GTGTGTCTTT CCCTGACAG
3661 TGCGTCAATG GGTACCGGAC TGAATGGCAT ACTGTATGCG ACCGCGCATG GTGCGGCGCG
3721 CCGCGCCCTA CCGACCTGCG CTGGTTTGA CACCCCATCT TACACCGCAT TATCTGATGA
3781 TGTGCTGGCC TATTCTTGCC TTCCGGGCAT GAGTTCCTTA GACCGCTGCT GTGTGTGCG
3841 GAGCGCGGTT TGGGTGATGA ATACACAGCG AGGTTTGGTG TGTGCGAGAG TGAAGAATGA
3901 CGACGCTCTG TTGGACTGTC CCACGCACAT AGGATCAACT CGGGGTGCTT CCGGCTTACC
3961 AGTTTGTGTT GATCAGCGTG ATGCATACCG GTTGAATGCT GGTGTTACT CTACAGTGG
4021 TATTGTGCA CCGCTCCGGA CCGTCCGCGC ATGCGATAAC GCTTATTCCT CCGCGGGG
4081 GCAAGCGGGA ATGACGGCGC CAGCTGTGAC ACCAACAATC TCTGAATACA CCTACTATGC
4141 CCTACTGCT TCTGTAAGT CCGTCTGTTT TGTGTAGCT TCCCTATPACT
4201 AGTATTGCTT CTFTTACCAA GTGTGGCTGT AGTCAAAAGT ATGCGCCCTT ATATTAAAGA
4261 GACATATAG ATCAGACCCC AAATTAGAGC TGGACAGGTT CTTAGCGGCT TGAACGCTAT
4321 CACTGTGAG ACCTTGCGCT ACATGAACCT TGCGCGCTT CTGTGTGATC CGAGACAGA
4381 TGTGCGGGTG TATGCTGTAG TCAATTGCGA GAGTGTGAC GACATCATCT CCAACAGCT
4441 ACTCGCAT TGGCGAGTGC GCATGTATGC GAGCAAGACT CAGGTGAAGA CCGTGTATT
4501 CCGCACAGCC ACCCTGCTCT GCATTCAAGT CAGGTCACAT TCCAAATTG ATGATACTT
4561 GACATATAG ATCAGACCCC AAATTAGAGC TGGACAGGTT CTTAGCGGCT TGAACGCTAT
4621 AACTGTGAGA CATGTTATCT TTTGCCACTC GAAGCGCAAG TGTGCGGAGC TAACGACAGA
4681 CACTTCCGCG GTTGGCATTC GTTGGCATTC TTTTGGCG GCGCTGTGCA TCAAAACCAT
4741 TCCCGGCTCA GACTCCATCT TTGTTGGTGC AACTGATGCA TTGTCACGCG GCTACACAGG
4801 AAACCTTTGAT TCGGTATCTG ACTGTGCGGTG TCGTGTGAG TACGATGCA CATTTGACAT
4861 GAGCCTTACG TTTCTCATCT CCGCGCGAGT GGTGSCATGT ACTCTGACT TGGCATGGA
4921 CCGCGCGCGA CGTACCGGTC GTGTAGAGAG GGTGTAGAGT TCCAGAGAGT CTCCAGAGG
4981 AGCACCCCTG CTCAGCGTTC CCGATGCTAA CGTCTGGCAA GCGATGGAGA GCGCATAGT
5041 CTFTTATGAT TGGAGTGTCTA CAGGATGACA ACAGTCACTC AGATTTTGGG
5101 GTGACACCA CCGATCAGCT GTGACCCACA CACTCCAGTG CCGGATGATG ACACACTGAG
5161 GCGGTACTGC GTGACAGCTG AGGTGAGCAG TCGAGCTCTG CAGAGGAGC AGTGGCGGCT
5221 CCGTTTGTGT GCGCATGTAT GCGATGCGAA CCGATGCGAA CCGAGCTGCT CTATGATAG
5281 CATCAAGTGG AAGTGTCTAC TCAACACAG TACCAAAACA CCGCTGTCTT ATGCTTAGA
5341 CAGTCTTACA CTGGAATTA CAAACCAACA TGAATGACT ATGCGTCTAG CCGGCGCTCT
5401 AGTAGGACA GTGTTGCTGT AGACAGGCTA CGCGCCCATC CTCTCTGCTG CCGCGCTCT
5461 GCTGTGCTCT TTTGCGCTTC TTGCGCTTCT CCGGCGCGAC TGGAGCTTGA CTGTTTGGAG
5521 CCGTGAAGTC AGGCTGTGCT GCGTGTGCTG TCCGAGAGC ACAGACAGA CCGCGGCTTA
5581 GCGACGCGCG TTGTACCAAG CCGTGTGACA CTCTGTGACA TTCCGCAAT TTCCGAGGAT
5641 GCGAGTGTGC CCGCTGGGCA AACTGGCCGA CCGCAGTAG GGTGCTAGTC AATATCTGCG
5701 AGCGCGGCTC ACTTCACCG CCGCCGCTGT AGAGTGTGCT GAGTCTGCTG AGACCAACTT
5761 TACTTCCAT CTGCTTTTCC GCGTGTGCTG TGTGCTGCTG CAGGCTGGCG AGTGTCTAC
5821 TGTGCTTGT GCGTGTGCTG GCGTGTGCTG CCGGTGCTAC AGTGTGCTG CCGGCTGCTC
5881 ATGAGCTAT CTGAGGAAGT GCGTGTGCTG CTTCGAGAGT GGGTCCGCT GCGGATGCTG
5941 GCGGCGGCTC TCGATCTGAT CCGGCTGTG CATCGTAGT GAGTCTGCTG GGTGCTGCTG
6001 GTTGGGTGC CTTACAGGTT GGGAGCGCT GAGTCTGCTG CCGGCTGCTG CAGAGAGAT
6061 CTGTGCTGTA TGACCATCTG GGTGAGTGTG GGTGAGTGTG TTTGCTGCT TTTGCTGCT
6121 GCGTGTGCTC ATGCTGAGA TCGCTGCTG CTTCATCTTA AGCAATTA AGTAAACAC
6181 ATGGGCTAAT CCGCTATTAT CCAATGTGTC CAAACAACAC ATTTGTGAAA ACTACTTCTT
6241 AGTGAAGA TTGCGCCACA AATTAAGCAA ATCTTCCCTG ATGCTGCTG TGTACCAATG
6301 GCGCGAGGCA CGTGAAGGAT ACACACAGTG CCGCGTATC AGCGGATCTT GAGAGCTTGC
6361 CTGTGTGATT CTACGCGCTG TGTGGGATG TGGGAGGACA CAGTGTGAC CCGTCTGCTG
6421 GCTTATGATT GCGTGTGCTC CTGCGTGGTG CCGGCGCGTG CTTGTATGCG GCACTTGTG
```

【図 2 A】

FIG. 2A

ヒトベギウイルス 2 (UC0125, US) 遺伝子および非翻訳領域

S タンパク質および遺伝子配列

S タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 2)

MEGMPITGLIVRGDSLHWCARHHSVQPDRAAGPPSVTSVERNMGCSDTGTCS PVVGADYNTSSGCRALNLSGH  
CGGSGCRSPSRVQVARRVLQLGAFALILGSGMCSIRSKTEGRISQ

S タンパク質遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 104-75

E 1 タンパク質および遺伝子配列

E 1 アミノ酸配列: (配列番号 3)

YLQSGRLACTGEGFAFFSNCCNSDINWCLHRCVTRPGCLVCTGNATHPICDWYLGSSVSRPARRMGSEGAELLR  
LIGAGWGLLLESIGMSSEVYVALLCFGLAWYGRGIPKTLVCTVCPA  
VNISPYSLFSPDTIAPGTWILQPLGLQMFVSFPILYSTWILMLLSGKTVAIVAILLASPVTMA

E 1 遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 476-1048

E 2 タンパク質および遺伝子配列

E 2 アミノ酸配列: (配列番号 4)

YKHQSESYLYKCTITNTSTSMNDCPFGTITRNTESRFSIPRFCPVKINSSTFICSWGSSWNFAENIRYPTDV3MP  
PAFISALCYIYSNDDPPFYHNHTTIPQNRNSTVDPTTAPCRDKWGNATACILDRRSRFGDCYGGCFYTNHSHDR  
SNDISGQYRDLIEFVQLGRIPRINISNTIELLAGASLVASGLRPGFGCSRAHVSVHVCRCPSYRDLQFQPSLG  
KWVPLGPEVPFELCINPQWARRGFRMSNPLSLQTFVEDIFLAPFCNPTRGVRVRCNNTAFYPRGGGFVQLIGDVQ  
VLTNPNTASLHSLTLISLILLLVCVSGARFVPLIIFWFSARHYA

E 2 遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 1049-2110

X タンパク質および遺伝子配列

X タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 5)

SCYLSCDWAVNDACFTSCTCATFNDVLCPLVATRISSCGHVAVPPDRGWEVPAAMSIVSRITGLTFDVFISFIQY  
LPTVPGNNNTIYCGEPTFLGDTIGIYRPYFLPGLAILYLPFLGLRLMLAGFINDGLFPIRHATAALRSTSRVLT  
CVVAFVYILSHPNVNAALNMFASLANLEMLSFDTYHETVLYILCLLLYLQVSPRAGLAAMVAKLSRGLLFAV  
LAHVC

X タンパク質遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 2111-2821

## 【図 2 B】

FIG. 2B

NS 2 タンパク質および遺伝子配列

NS 2 アミノ酸配列：（配列番号 6）

RPGRVFLGVACADISRLVFEFTGNCWVMSCVSEFWCAVFAFTSLGRHYKIQIYRYHAQVYARLVAVGCGPLGREF  
HFRASVGVLMGACMLHPRECCSEISLVFLCALPTVDTIDTWLVACL SAGPSARTLALADDMARIGDERALRAVLRC  
FGSRGTIYINHMGVQSERVAQAVRD LGCCJEPVLEBPFTTEIVDDTMSLVCGQLLGKFPVARCGRV L VGHNLPE  
DLPPGQLS

NS 2 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 2 8 2 2 - 3 5 4 1

NS 3 タンパク質および遺伝子配列

NS 3 アミノ酸配列：（配列番号 7）

APVVITRDSIGTMSFLKATLTGRAETPGSCQIVVLSLTGRSMCTAVNCTLVATCHGACAGLATCAGLRTPLYAL  
SDVVAYSLPGMSLDPCCCSPSRVAVMMNNGLVCGRVENDVCLDCPTFIDQLRGASGSPVLCDEGHAYALMLG  
GYSTSGICARVTVRPWNNAYSSSGGQGMQAPAVTPTYSEITYYAPTGGSKSTKYVPVDLVKQGHKVLVLPSPVAVV  
KSMAPYIKETVKIRPEIRACTGPDGVTVITGENLAYMTYGRFLVDPETNLRGYAVVLCDECHDTSTTLGIGAVEM  
YAKGAGVTVVFATATPAGIQVQSHSDIYELLTDGTGVFEYSAKIMDNIRTGHRVIFCHSKARCAELTQQLSLG  
IRAVSFWRGCDIKTIPASDSIVVATDALSTGYTGNDSDVIDGCGCVQGTVTIIMDPTEFSISARVVPTAALRMQR  
GRTCGRGRGAYYTTSPGAAPCVSPVDANVHQAVESAMFYDWSATRIQQCLAYYHDLGCTPRISCDPHTPYRVMDTL  
RAYLRRPEVTTAALAGEQWFLLYGAQLCICKETEARGPDSDIKWCLLNNRNKTPLLYALNDPTEFTTQHDLTRRI  
AGALSTTVFVET

NS 3 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 3 5 4 2 - 5 4 2 5

NS 4 タンパク質および遺伝子配列

NS 4 アミノ酸配列：（配列番号 8）

GYGFI LLAGAALASFAFAGATGALVPSAVNSVEVRPAQVT

NS 4 A 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 5 4 2 6 - 5 5 4 8

NS 4 B タンパク質および遺伝子配列

NS 4 B アミノ酸配列：（配列番号 9）

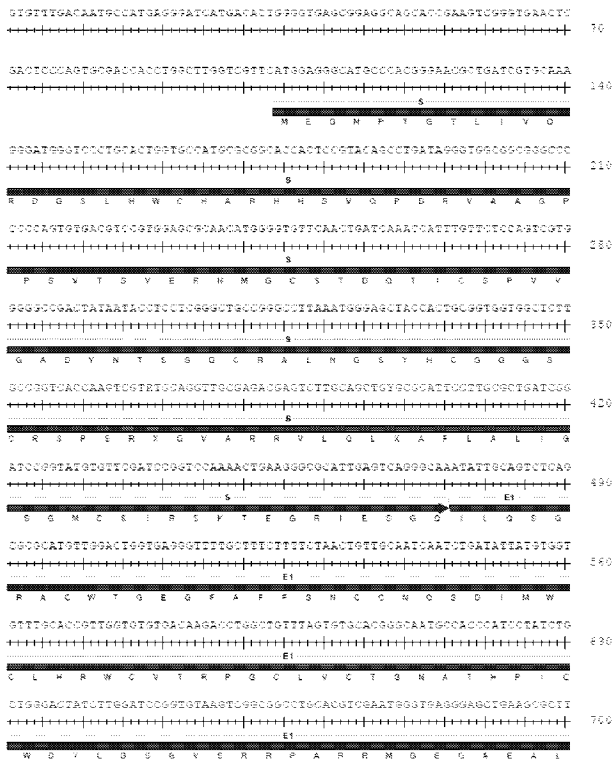
RPDATDETAAYAQRLYQACADSGIFASLOGTASAAQLKLADSPGASQVLAAPPSAPPLVQVLFQLETFNFSIASIF  
GLLCAGCQAGCEFTALAGLVSGATAGLGAKHWWLLAIACTWLVSLQTSRGGMVAGLSILAGCCIGSVTGLDFLPGC  
LTGREAVVGAATVQKILSGSADMTIIVDLLPALFSPGAGIAGIVLVFILSNSSVTTMANRLLSMCAKQTCENYPL  
SERFGQLSLSLWRSVYHQAQAREGTTCQG

NS 4 B 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 5 5 4 9 - 6 3 3 4

## 【図 3 A】

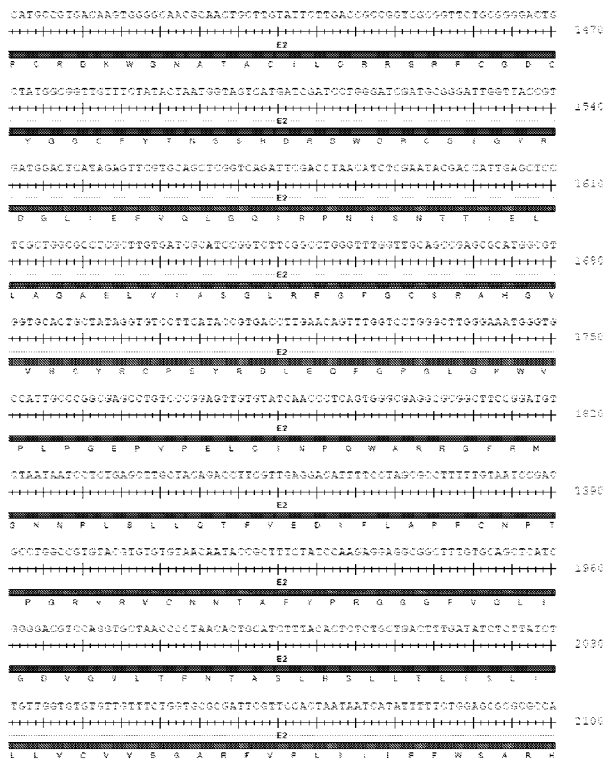
FIG. 3A

ヒトベギウイルス 2 (UC0125.US) 弱毒化ゲノム



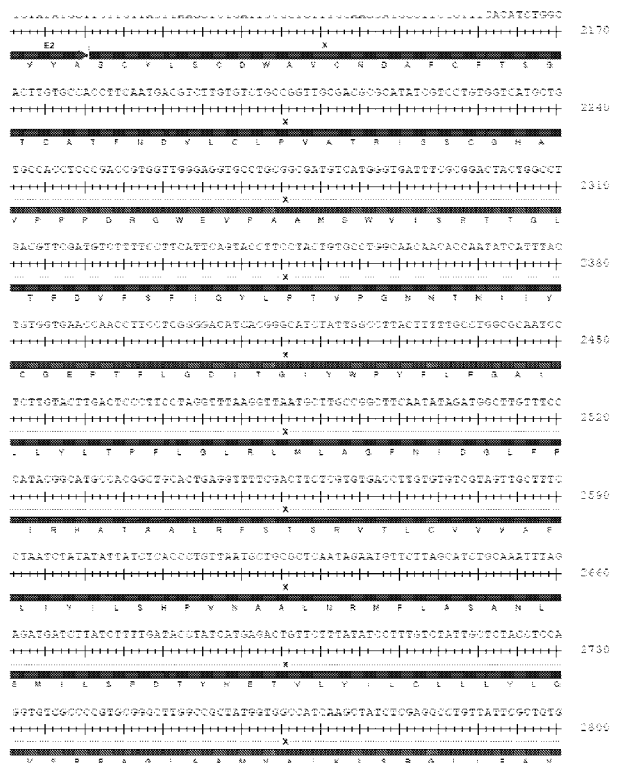
【図 3 C】

FIG. 3C



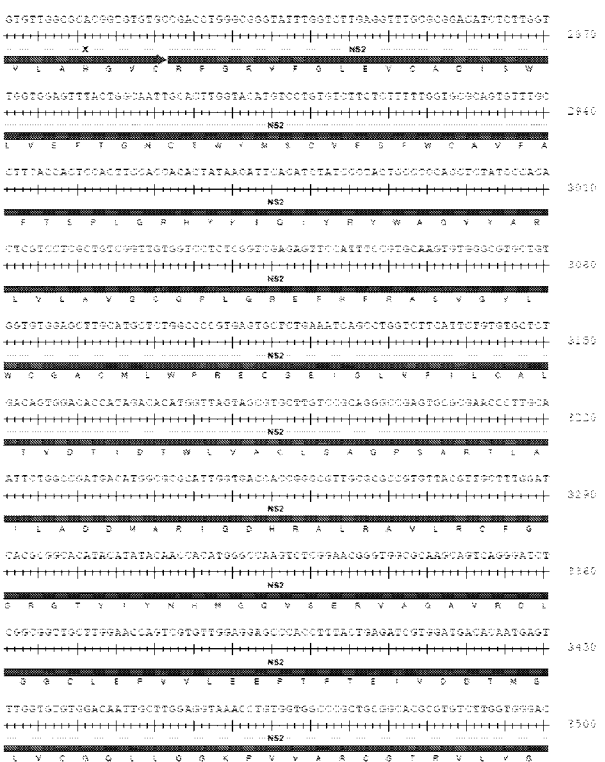
【図 3 D】

FIG. 3D



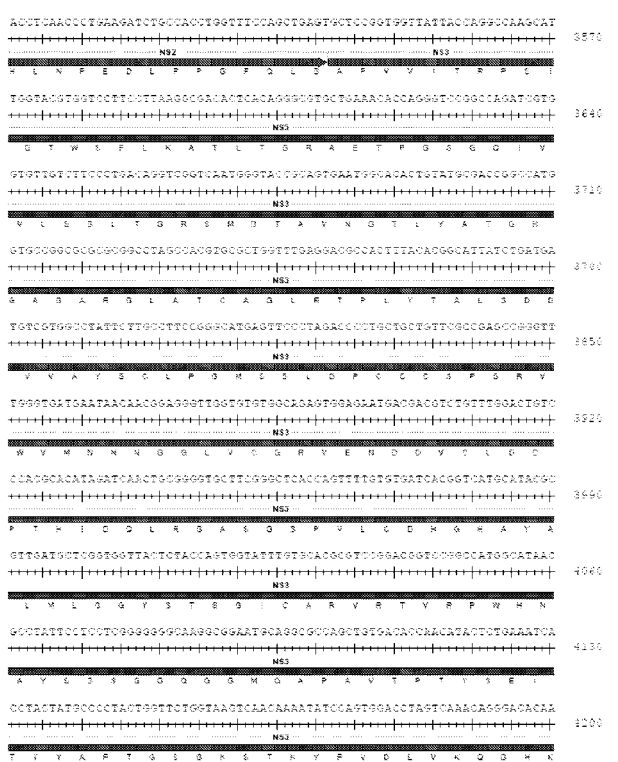
【図 3 E】

FIG. 3E



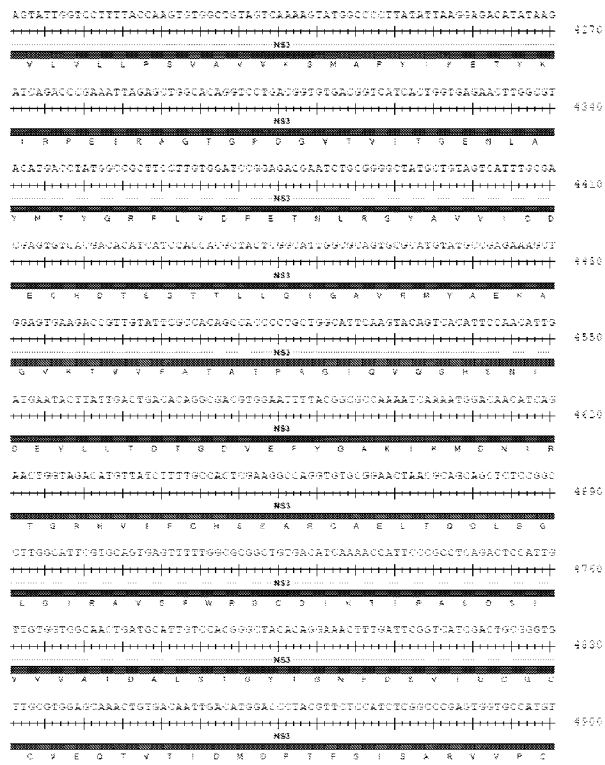
【図 3 F】

FIG. 3F



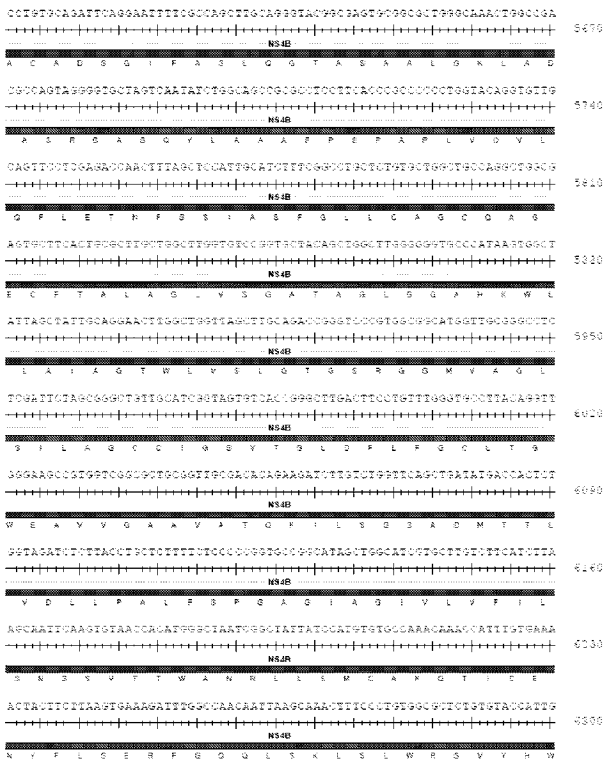
【図 3 G】

**FIG. 3G**



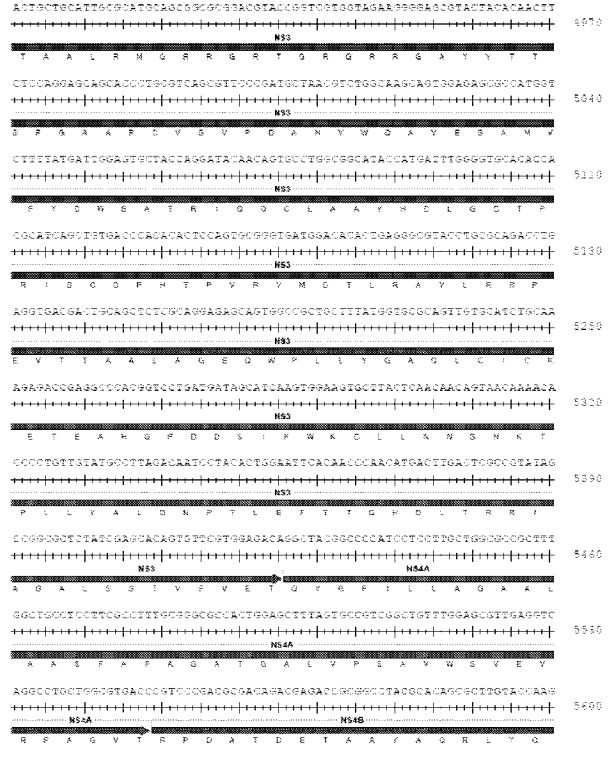
【図 3 I】

FIG. 31



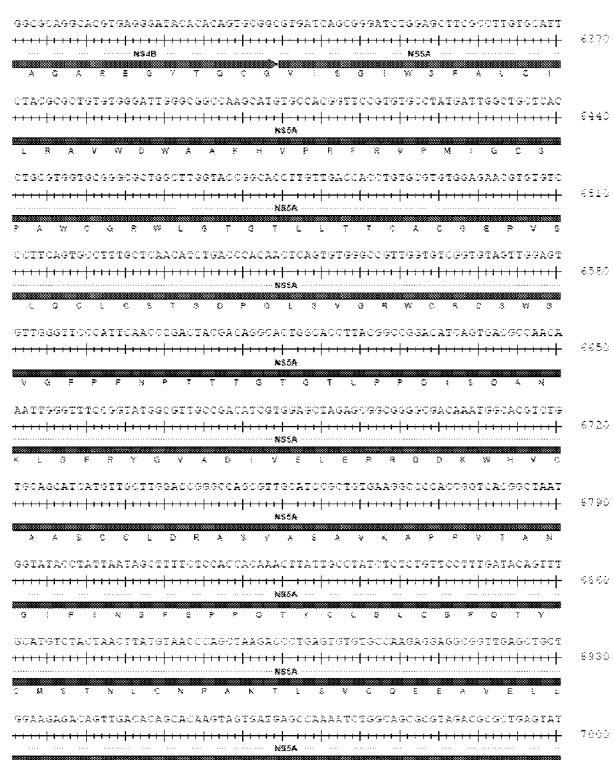
【図 3 H】

FIG. 3H



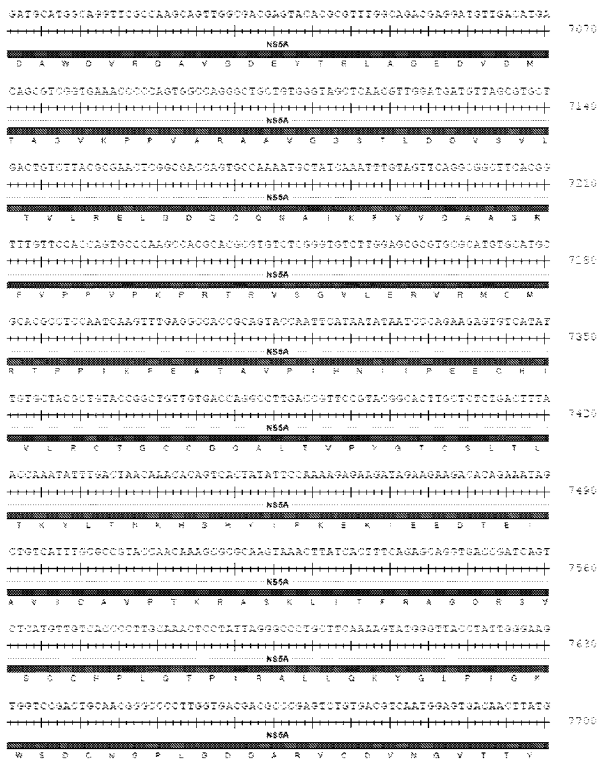
【図 3 J】

**FIG. 3J**



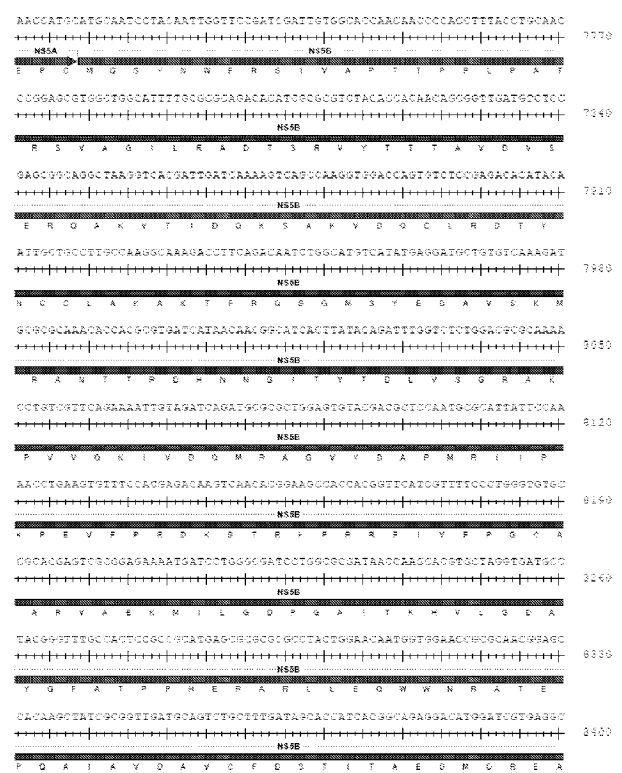
【図 3 K】

**FIG. 3K**



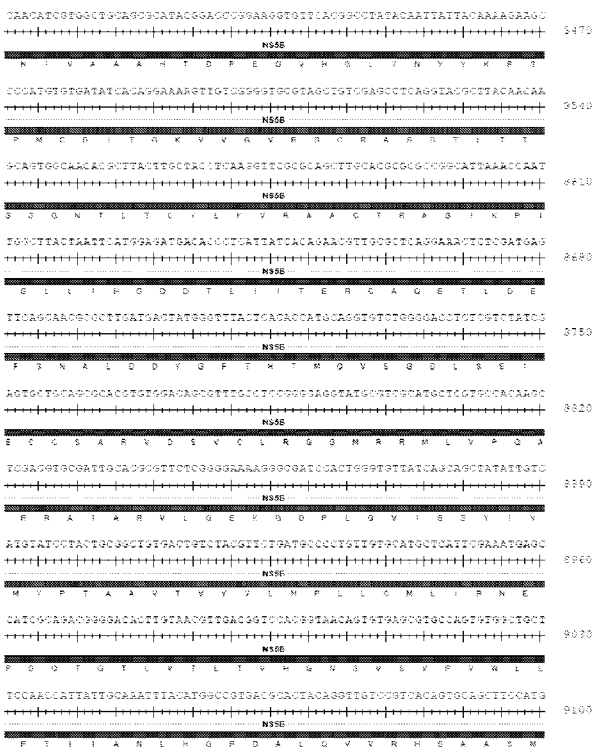
【図 3 L】

**FIG. 3L**



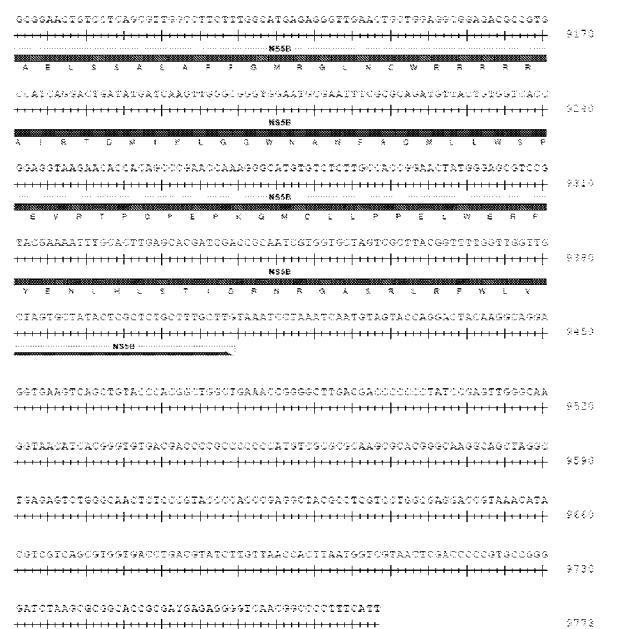
【図 3 M】

FIG. 3M



【図 3 N】

FIG. 3N



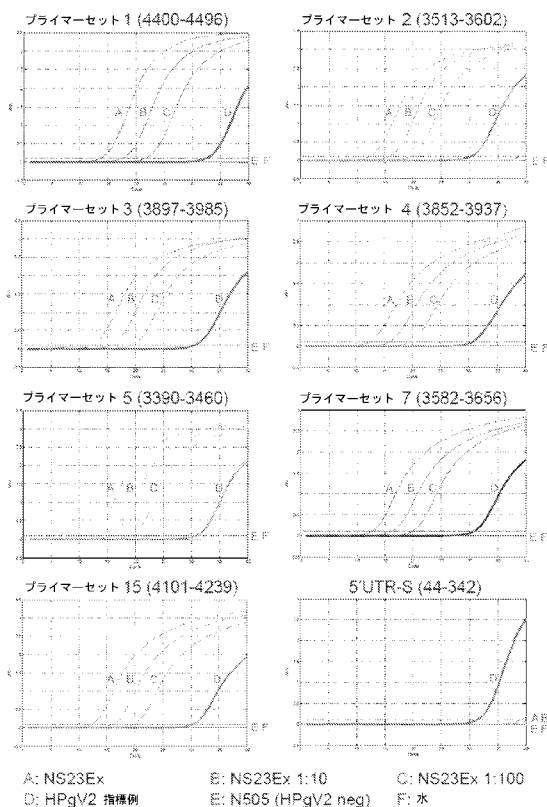
【図 4】

**FIG. 4**

CCACCGGGCGCTTGC CGCGCGGTGTTACGTTGCTTTGGATGACACGGGCACATACATATAACACACATGGGCGCAAGT  
 ← フローブ 5R ← セット 5 Rev  
 TCGGAACGGGTGCGCGAAGCAGTCAGGGAATCTCGCGGTTGCTTGGAAACAGTCGTGTGG  
 TACTGAGATCTGGGATGACACAATGAGTTTGGTGTTGGCAAAATGCTTGGAGGTAACCTGTGGTGCCCGCTG  
 ← セット 2 Fwd → ← フローブ 2 R  
 CGGCACGCGTGCTTTGTGGTGACACCTCAACCCTGAAGATCTGCACCTGGTTCCACGCTGAGTGTCTCGTGCTG  
 ← セット 2 Rev + セット 7 Fwd → ← フローブ 7F →  
 ATTACCGAGCCAAAGCATTTGTTACGTGGTCTCTCTCAAGCGCACATCACAGGGCGTGCTG  
 ← セット 7 Rev  
 CGGCATGTTGCGCGCGCGCGGCTAGCACAGTGCCTGTGTTGAGGACGCCATTACACGGCATTATCTGAT  
 GATGTCTGGGCTATTCTTGCCTCCGGGCATGAGTCCCTAGACCCTGCTGCTGTCCGCGAGCGGGTTGGG  
 セット 4 Fwd → ← フローブ 4R ← セット 3 Fwd → ← セット 4 Rev  
 TGATGAATAACACCGAGGGTTGGTGTGGGACAGATGGAGATGACGAGCTGTGTTGGATGTGCCACGCAC  
 ← フローブ 3R ← セット 3 Rev  
 ATAGATCAACTCGCGGGTCTTGGGCTCACAGTTTGTGTGATCAGCGTCATCATACGCTTGATGCTCGGTG  
 GTTACTCTACCAAGTGGTATTTGTGCACGCGTCCGGACGTCGGGCCATTGCCATAACGCCCTATCTCTCTCGGGGG  
 セット 15 Fwd →  
 GCAAGGCGGAATGCGCGCGCAGCTGTGACACCAACATCTCTGAAATCACCTACTAGCCCCCTACTGGTTCTGTG  
 セット 15 フローブ → ← セット 15 Rev  
 AAGTCAACAAAATACCAAGTGACCTAGTCAAAACAGGGACACAAAGTATGTCCTTTACCAAGTGTGGCTGTAG  
 TCAAAAGATATGGCCCCCTTATATTAAGGAGACATATAAGATCAGACCCGAAATAGAGCTGGCACAGGTCTCGACG  
 GTGTGACGCTCATCACTGGTGAACATTTGGCTATACGACTTATGGCGCTTCTCTTGGATCCGGAGACGAATCT  
 セット 1 Fwd →  
 CGCGGGGCTAGTCTGTAGTGTATTGGAGTGGAGTGCACGACACATCATCCACACGCTACTCGGCATTGGCGCAGT  
 ← フローブ 1 R ← セット 1 Rev  
 CGCGCATGTATGCCGAGAGATGGAGTGGAGTGAAGTCTGTTGATTCGCCACAGCCAC

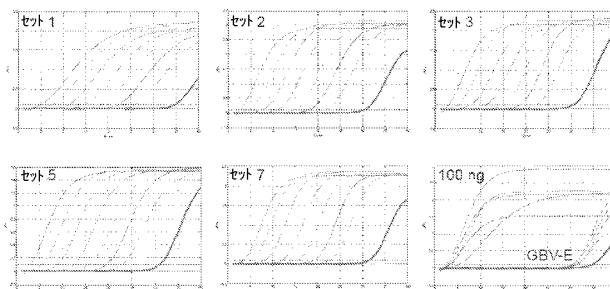
【 义 6 】

FIG. 6



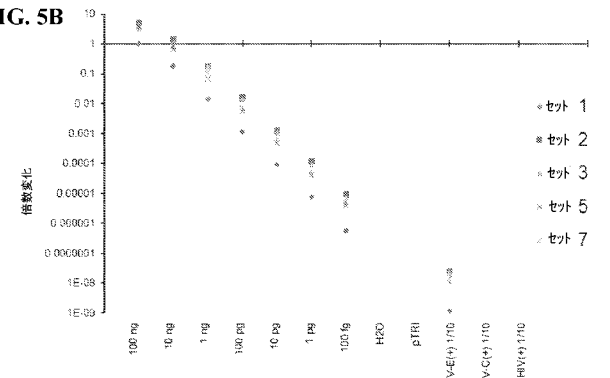
【図 5 A】

FIG. 5A



【図 5 B】

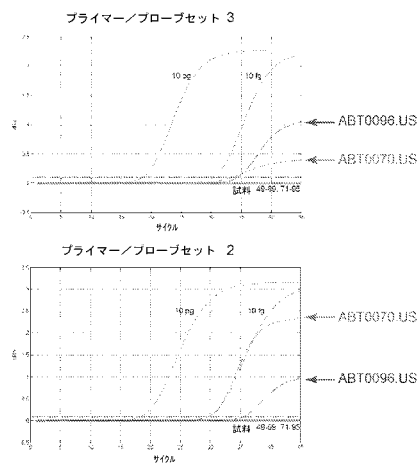
**FIG. 5B**



【图 7 A】

FIG. 7A

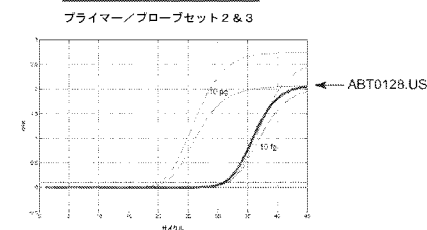
ProMedDx (HCV+) #70 &amp; #96



【图 7 B】

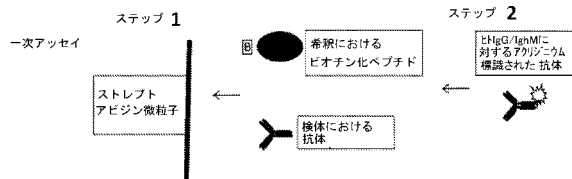
**FIG. 7B**

米国赤十字社 (HCV+) #128



【図 8】

FIG. 8



【図 9 A】

FIG. 9A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0070P, US) 核酸配列 - 配列番号 75

1 GTGTTTGACG TGTGACATG CCATGACGGA TCAATGACACT GGGGTGAGCG GAGGCGAGCA  
61 CGAAGTCGGG TGAACCTGAC TCCAGTGGG ACCACTGGG TTGGTGTTC ATGGAGGGCA  
121 TCCCCACGGG AACGCTGATC GTGCAAGGG ATGGGTCCCT GCACGTGGTG CATGCGCGGG  
181 ACCACTCCGT ACAGCTGAT AGGGTGGCGG CGGGCCCCC CAGTGTGAGC TCCGTGGAGC  
241 GCAACATGGG GTGTTCAACT GATCAACACA TTTGTCTCC AGTCGTGGAG CGCGACTATA  
301 ATACCTCCCT GGGGTGGCGG GCCTTAAAG CGAGCTACCA CTGGCTGGT GGCCTTGCC  
361 GGTCAACGAG TCGTGTGACG GTTGCGAGAG GAGTCTCGG GCTGTGCGCA TTCTTGGCG  
421 TGATCGGACT CGGTATGTGT TCAATCCGGT CCAAAAAGA AGGGCGGATT GAGTCAGGG  
481 AATATTGCA GTCTGACGGC GCATGTGGGA CTGGTGAAG TTTCTGTTT TTTTCTAAT  
541 GTTGAATCA ATCTGACATT ATGTGGTGT TGCACCGITG GTGTGTGACA AGACCTGGCT  
601 GTTTGGTGTG CACGGCGCAT GCACTGATC GTGTGTGTG GGACTATCTT GGGTCCGGTG  
661 TGAGTCGGCG GCTTGGCGGT GCAATGGGT AGGGAGCTGA AGTGTCTTCT CGCTTATGTC  
721 GCATTCGAGG TTGGCTGGGG CTCTGAGCTG AGGCTCTTGG TATGCTGAG ATCTATGCA  
781 CTTCCTCTG CTTCGATPPT ATTCTTGGT ATGGCTGGGG TATACCTAG ACATGGTGT  
841 GCACAGCTCG CCGTGCAGTG AACATTTCTT CCTATAGCT CTATCTCCA GATACATG  
901 CATTTGGTAC GTGGCTACTA CACTGGCTG GTCTTTTGT GCAAAATGTT GTACGTTCT  
961 CTATACTTTA CAGTACTTGG ATCTTTGGT TGTGTCTAG CGCAAGACT GTTGTGTGA  
1021 TAGCGATCCT TTTGGCTAGT CTAAGGTTA TGGCATACAA GCATCAAGCT GATAGCTACC  
1081 TGAAATACTG TACCATAACC AATGCTTCAA CTGCTATGAA CTGGCTAGTC CCGTTTGA  
1141 CTTCACCTCG CAATACTGAG TCTGGTTTCA CTATACCTAG ATTCTGCTCT GTTAACTAT  
1201 ATAGCTCTAC ATTTATCTGT TCAATGGGGT CGTGGTGTGT GTTGTGTGAG AACATCACA  
1261 TGCCATATCT GBACTTTGGC ATGCGCGCAG CACCGATTTC CGCTTTGTG TATATCTATT  
1321 CAAACAATGA CCACTCTTCT TGGTATCGTA ACACAACAT CATACCTCAG AACGTTTACA  
1381 ACTCTACGGT TGATCTTACC ACAGCTCCAT CGCTGACAA GTGGGGCAAT GCAACTGCTT  
1441 GTATTCTTGA CGCGCGGTG CGGTCTGCG GGGACTGCTA TGGCGGTTG TTTTACACTA  
1501 ATGGTAGTCA TGACCGATCC TGGGATCGAT GCGGAATTGG TTACCGTGTAT GGACTCATG  
1561 AGTTCTGTGA GCTCGGTGCA ATTCGACCTA ACATGCGGAA TAGGACCTAT GAGCTCTCTC  
1621 CTTCCTCTG CTTCGCTCTG GCTTCTAGCT TACCGCTGCG CTATGGTTAG ATAGAGTGT  
1681 ACAGCGTGTG GATCTCTTPT AAGTGTCTCT CATACCTGTA CTTTGAAGCG TTGAGGCTG  
1741 GCGTTGGGAA ATGGGTGCCA TTGCTGGCG AGCCTGTCCC GGAGTTGTGT ATTAACCGCG  
1801 AGTGGGCGAG CGCGCGCTCT CGGGTGTCTA ATATCTCTT AAGCGTGCTA CAGACTCTG  
1861 TTGAGGACAT TTTCTTAGCG CCTTTCTGCA ATCGGACGCG TGCGCGTGTA CBTGTGTGTA  
1921 ACAATACTG TTTCTACCGG AGAGGAGCGG GCTTTGTGCA GCTCATCGA GACGTCCAGG  
1981 TGTTAACCCC CAACCTTACA TCTTTGCACT CTCTGCTGAC TTTGATATCC CTTATCTGT  
2041 TAGTGTGTGT TGTTTCTGGC GCAGGATTGC TTCCATTGAG AATCATATTC TTCTGGAGCG  
2101 TGCGCCACGT ATATGCTTCT TGTACTTAA GCTGTGATTG GCGTGTGTC AACGATGCGT  
2161 TCTGTTTAC ATCTGGACTC TGCTGACTCT TCAACGAGCT CTTGTGTCTG CCGGTGGCG  
2221 CGCGCAATC GTCTGTGGC CATGCTGTGC CACCGCCGA CCGTGTGCG GAGGTGGCG  
2281 CAGCGATGTC ATGGGCGATT TCGCTGACTA CCGGCTTAC GTTCGATGTC TTTTCTTCA  
2341 TCGAGTACTT TCTTACTGTG CTTGCAACA ATTCTGATAT CATTACTGTG GGTGAACCAA  
2401 GCTCTGTGCA GGCATCAGG GGTATCTAT GGTCTTACT TTGCTGTGCT ATGTGCTCT  
2461 TGACTGTGAG TCTCTCTGCT GGTATAGCT TATGCTGTG GGTCTTAT ATAGAGTGT  
2521 TGTTCCTCAT ACAGCTAGCG ACAGCTGAC TAGGCTTCT CATTGCGCT GTGACTGTGA  
2581 GTGCTGAT TGTCTCTTA ATCTATATAT TATCTATCC TGTATAGCT GCGCTCAATA  
2641 GAATGTCTT AGCATCTGCA AATCTAGAG TGACTTATC CTGTATACC TATCATGAGA  
2701 CTGCTTTT TGTGCTTGT CTATGCTCT ACCTCAGGT GTGCGCCGCT GCGGCGTGG  
2761 CTTGATAGT GGCATCAAG CTATCTGAG GCTGTATTAT CTGTGTGTTG TTGGCGCAG  
2821 GAGTGTGCG ACCGTGGCGG GTATTTGCTG TTGAGGTGTC CCGCGACATC TCTTGTGTG  
2881 TGAGGTTTAC TGGCACTGCT ACTTGTGACA TGTCTGTGCT CTCTCTTTT TGGTGGCGAG  
2941 TGTTTGCTT CACCACTGCA CTGGAACGAG AGTATAAGCT TCAGATCTAT CGCTACTGCG  
3001 CGCAGGCTTA TGCGAGACTC ATCTCTGCTG TCGGTTGAG TCTCTCGG AGGAGTCTC  
3061 ATTTCCGTG GAGCGTGGCG GTGCTGTGTT GTGTGCTGT CATGCTCTG CCGCTGTAGT

【図 9 B】

FIG. 9B

3121 GCTCTGAAT CAGCTTGGT TTTATTTCT GTGCTGTGAC TGTGGACACC ATAGACACAT  
3181 GGTAGTAGC GTGCTGTGCT CGAGGGCCAA GGGCGGAAAC CCTTGAACCT CTGGCCGATG  
3241 ACATGGCGCG CATTTGGTAC CACCGGCGGT TGGCGCGCGT GTTGGGTGCT TTTGGATCAC  
3301 GTGGACATA CATTAACAC CACATGGGCG AGTCTCTAGA ACGGGTGGCG CAGCAGTCA  
3361 GGGATTCTCG CGGTGTCTTG GAACACAGTG TGTGGAGGA GCCCACTTT ACTGAGGGTCG  
3421 TGGATGATAC AATGAATTTG GTGTGTGGAC AATGCTTTGG AGGTAACACC GTGTGGGCTC  
3481 GCTGGCGCAC GCGTGTCTTA GTGGGACACC TCAACCTTGA AGACTGTGCA CCGTGTTCCT  
3541 AGCTGAGTGC TCGGTTGGT ATTACAAAC CAAGCATTTG TACGTGGGCC TTTCTTAAGS  
3601 CGACACTCAC AGGGCGTGT GAACACCGG GATCGGDCA GATCGTGGTG TGTCTTCCC  
3661 TGACAGGTG CTCATAGGT ACTGCACTGA ATGGCACTC GTATGCGACC GGGCCAGGTC  
3721 CTGGTGGCG CGGCTGAGC ACCTGCGCTG GTTGGAGGAC CCACATTTAC AGCGCATATAT  
3781 CTGAGATGT CBTGGCTAC TCTTGGCTTC GGGCATGAG CTCTCTAGAG TCTTGCAGCT  
3841 GCTCGCCGCG CGGGTTGG GTGTGACCA ACACGGAGG GTTGGTGTGT GCGAGAGTGT  
3901 AGAAGAGCA CGTCTGTTTG GACTGTCCCA CCGCATAGA TCAACTGGGG GGTGCTTGG  
3961 GGTGCGCGGT TTTGTGTGAT CAGGCTCATG CATACGCGTT GATGCTGGT GGTACTCTTA  
4021 CCASTGGTAT TGTGTGCGGT GTCCGATAG TCCGGCCATG CAGAAACGCC TATTCCTCT  
4081 CAGGGGGGCA AGGCGGATG CAGGCGCGAG CTGTGACACC AACATATCTT GAAATCACTT  
4141 ACTATGCCCT TACTGGTCTT GATTAATCAA CAAATATCCC AGTGGACCTA GTCAAGCAGG  
4201 GACACAAAGT ATTAGTCTTT TTACCAAGTG TGCTGTGCT CAAAGATATG GCTCCTTACA  
4261 TTAAGGAAA ATATAGATT AGACCTGAAT TTAGAGCTGG CACAGGGGCT GACGGTGTGA  
4321 CGGTCAATCA TGGCGAGAAC TTGGCTGACA TGACCTATGG CCGTTTCTCT GTAGATCCG  
4381 AACCAATCT CGCGGCTTAC GGTGTAGTGA TCTCGGAGCA GTCCATGAC ACATCAATC  
4441 CCACTGCTT CGGATCGCG GAGTGTGCA TGTATGTGA GAAAGTGA GTAGAGCCG  
4501 TGTATTGCG CACAGCTGCT CCGTGTGCA TTCAAGTGA GTACATATCC AACATGTAT  
4561 AATATCTATT GATGATGACA GGGGAGTGG AATCTATGG GGTCAAAAT AATTTGAGCA  
4621 ACATGAGAG TGTGATGAT GTATCTTTT GGCATGAGA GCGCTAGTGT GCGGACATTA  
4681 CGCAGAGCT CCGCGCTTCT GGTGTTCTGT CAGTGAATT TTGGCGGCGT TGTGATCTA  
4741 AGAGCATTC CCGCTAGAG TGTATTGTTG TAGTGGCAAC TGTATGATG TCCAGGCT  
4801 ACACAGGGA CTTTGAITCT GTCAATGACT GCGGGTGTG CTAGAGCAA GCTGATACAA  
4861 TTGACATGGA CCGGCTGCT TCACTCTGCG CCGGAGTGT GGCATGACTC GCTGATATG  
4921 GTATGCAAGC GCGCGGACGC ACCTGCTGTG GCAGGAGGG AGCTACTAC ACAACACTC  
4981 CAGGAGCAGC ACCCTGCTTG AGGTTTCCCG ATGTATCTG CTGGCAATCA GTGAGTCA  
5041 CCAATGCTTT TTAATATTG AGTGTGCGCA GGATAGAGCA ATGCTGTGGC GCATACCAT  
5101 ATTTAGGGTG CACACACCG ATAGTGTGT ACCACACAC TCCAGTGGCG GTGATGGACA  
5161 CACTGAGGG GTATCTGCGC AGACCTGAGG TGACGACCG GCTCTGCGA GGAAGACAGT  
5221 GCGCGCTGCT TACGCGCTG CAGTGTGCA TCTGCAAGA GACCGAGGCC CACGGTCCAG  
5281 ACGATGGCAT CAGGTGAAAT TGCTTACTCA ATAAACAAA CAAACACCC CTGTTTCTG  
5341 CTTAGACAA TCTCTACTG GAATCTACTA CCAACATGA CTGCTGCG CGTATAGCT  
5401 CCGTATGCT GACGACAGT TTCTCTGAGA CAGCTGAGG CCGCATCTCT CTGCTGGCG  
5461 CTTCTTGGC TGCCTCTCT GCTTCTGCG GCGACTGAG AGCTTGTG GCTCTGCTG  
5521 TTTGAGAGT TGAACACGGG CTGCTGCGG TGACCGCTCT GATGCGGACA GAGCAGCG  
5581 CGGCTACGC CAGCGCTTG TACCAACCT GCGGAGTTC AGGAATCTC CCGACTTGT  
5641 AGGTTACGG GAGTGGGCA CTGAGCAGC TGGCCGATGC CAGTAAAGGT CTGATCAAT  
5701 ATCTGGGAG CGCGCTCTCT TCGCGCCGCC CCGTGTGACA GGTGCTGCA TTTCTGAGA  
5761 CCAATTTTAC CTCATCTGCT CTCTTGGCTG TGTCTGTGCT CCGCTGTGAG CGCGGCTCA  
5821 GCTTCACTG CTCTGCGCG TTGCTGTGCG GTGCTACAG TGGCTTGGGA GGTGCCATA  
5881 AGTGGTGTG AGCTATGCA GGAATCTGCG TAGTATGCTT CGAGACTGCG CCGCTGCG  
5941 GCTGAGTTG GATCTGCTG GTCTTACGAG CCGTGTGCTT CCGGAGCTG GTTGCATG  
6001 ACTTCTGCT TGGTGTGCTT ACAGTGTGG AGGCGTGTG CCGTGTGCG GTTGCATG  
6061 AGAAATCTT CAGTGTGCG GTGATGACA CCACTCTGCT AGATCTCTA CTGCTCTCT  
6121 TCTCCCTG CGCGCGGATA GCTGGGCTG TGTGTGCTT TATTTAAG AACCTAAGT  
6181 TACCAATGTC GCTAATGCG CTATTGTGCA TGTGTGAAA ACAAATATT TGTGAAATAT  
6241 ACTCTTAC TGAGAAATTT GGGCACAAT TAAGCAATTT TCTCTGTG CCGCTGTG  
6301 ACATTTGGC GAGGATACA CAGAGTGGG TGTGTGAGC GGTCTGAG GGTCTGAG  
6361 GCTTGTCTT GGTATCTTA CTGCTGTGT GGTATGCGG GGTCAATG GTCGACGG  
6421 TCGGTGTGCT TATGATTTGG TGTCTACCTG CBTGGTGGC GCGCTGCTT GGTACTGCGA

【図 9 C】

FIG. 9C

6481 CTTTGTGAC CACCTGTGGG TGTGGAGAAC GTGTATCCT TCAGTGCCTT TGTGTGACAI  
6541 CTGACCCAA ACTCASTGTG GCGCGTGTGT TGTGGTGTG TGTGGTCTAT GGGTTCCTAI  
6601 TCAACCCGAG CAGCAGAGCC ACTCGGCACTT TACGCGCGA CATCACTGAC GCCACCAAI  
6661 TGGGCTTCCG GTATGGTGTG CCGGAGATGT TGGAGCTAGA GCGGCTGAG ACAAATGCG  
6721 ATGTCTGTG AGCATCATGT TGTGTGAGCC GGGCGAGCTT GCTGCTCGG GTGAGGGCG  
6781 CACCGCTGAC GCGCGATGCG ATACCTATCA GTACCTTTTC TCCACCACAA ACTTACAAG  
6841 TCTCTCTTTG TTTCTTTTGT TCACTTGTGA TGACTACTAA CTATGATTA CCGATTAAG  
6901 CCGTAGTGT GTGCTGCGAG GAGGCTGTGT AGCTACTGSA AGAAACAGT GACAGAGAC  
6961 AAGTAGTGT GTGTCAAAAT TGTGAGCGCG GAAGACGCG TGGTTTGTAT GATGTGCAAG  
7021 TCGCGAGCG AATTGCGAG GATGACGCG GTTGTGCGA CAGAGATGTT GACGCGACAI  
7081 CTTCTGTGAA ACCCGCGGTG GCGAGCGCT CTGCTGCTG CTGCGGATG GATGATGTA  
7141 GCGTGTGAG TGTCTGCGG GAGCTGCGT ACAGTGCCA AATGCTATC AATTTGTGAG  
7201 TCGAGCGCG TCGACGCTT GTTCCAGAG CTCCACAGC AGCAGCGCT GCTGCGCGT  
7261 TGTGAGCGG TGTGAGTGT TGTATGCGA CCGCAACAT CAGTGTGAG GCTTGGCGAG  
7321 TACCAATTA TGAATATAT CCGAAGAGGT GTCATATGT GCTAGCTAT ACCTGCTGA  
7381 AGCAGCAGCG CTTGACTGTT CCGTACGCGA CTCTACACIA GTTCTTAAT AAGCATTTA  
7441 CTAGTAAACA CAGTCACTAC ATTCCAAAC AGAAGATAGA AGAGGACGA GAGTACTGT  
7501 TCATTTGCG CGTACCAACA CCGCGCGGCA CCAAACTCAT CACATPCGA GCGAGTATC  
7561 GATCAGTCTC ATGTTGTGAC CCGTTGCAAA CCGCTATGAT GCGCTGCTT CTAAGATGAG  
7621 GCTTACTTAT CCGGAGTGTG TGTGACTGCA CCGGCGCTT TGTGAGCAT GCTGAGTGT  
7681 GTGAGCTCAA TGGAGTAACT ACTTATGAG CATGATGCA ATCCATGAGT TGGTTGCGAG  
7741 GATTTGTGAG ACCAACACCC CCACTTTTGC CCGTACCGC GACGCTGGCT GGCATTTTAC  
7801 GCGCAGACAC ATCGCGGCTT TACACACAA CCGGCGGTGA CGTCTCCGAG CCGCAGGCA  
7861 AGGTCAAAAT TGATCAACA TCAGCAGAG TGAATCAGT TTTCCGAGAC ACATACAAT  
7921 CTTGCTTGTG TAAGGCAAG ACCTTCAGAG AATCTGAGAT GTATATGAG GATGCTGTGT  
7981 CAGAGATGCG CCGAACACC AGCGGTGAGC ATACAGCGC CATCATGAT TCGATTTGT  
8041 TCTGTGAGC CCGAAGACT GTTCTGAGT CAGTGTGAG AATTTGAA TCAATGCGC GCGCGGTGT  
8101 AGCAGCTGCT GATGCGCAT ATCCAAACG CTGAAGTGT CTCTGAGAG AAGACAC  
8161 GAGAGCCACC GAGGTTTATC GTTTTCTGT GGTGCGCGCG GCAAGTGGC GAGAAATGA  
8221 TCTTGGGTGA TCTTGGCGCG ATACCAAGC AGCTGTGAG TGAATGCTAC GGGTTTGCA  
8281 TCTCGCGCGA TGAGCGCGCG CCGCTTGTG AACATGTGAG GAACCGCGA CCGGAGCCAC  
8341 AAGCTATGCG GTTGTGAGCG ATCTGTGTTG ATAGACCAT CAGCGGACAT GACATGGAT  
8401 GTAGGCTGA CATGCTGCT CAGCGCGATA GCGACCTTGA AGGTGTGAG GGCATATATA  
8461 ATTAATGAAA AAGGAGCCCC ATCTGTGACA TCACGGGAGA GGTGTGCGA GTGCTGTGCT  
8521 TCGAGCGCT GGTGAGCTT ACAACAGCA GTGCGAACAC GTTACTTTG TACTTAAAG  
8581 TCTGTGAGC TTGACGCGC CTGCGGATTA AACCAATGCT CTTACTAAT CATGAGATG  
8641 ACACCTCAT GTGACAGAA CTTTGCCTG AAGAGCATCT CGATGAGTCT AGCAGCGAC  
8701 TGTGATGATA TGGGTTTCCA CACACATCT AGGCGCTGCG GGACTCTCTG TCTATGAGT  
8761 CACTGTAGCC ACCTGTGCGC ACCTGTGCG TCGGAGGAG TATGCTGCG ATGCTGTG  
8821 CAGAGATGCG ACCTGAGAT GCGAGGCTG CCGGAGGAG CCGCTGTGAG CCGCTGTG  
8881 TGTGTGACT TGTGTGCTG TATCCACTG CCGCGCGGAG TGTGAGTCT CTAATGCGCG  
8941 TGTGTGACT GTCTATGCA AATGAGCAT CAGCAGCGG GACATGTG GAGTGTGCG  
9001 TCCAGGTTAA CAGTGTGAG GTGCGAGCT GGTGCTCTC AACCATAT GCAATTTTAC  
9061 ATGGTGTGA CCGCATPAC GTAGTCCCTG ACATGTGCG TATCTGCGG GATTTGAGT  
9121 CAGCTTGGC CTCTTTGCG ATGAGAGGCT TGAATGTG GAGCGGAGA CCGCTGTGCA  
9181 TTAGGGCTGA TATGATCAAG TCGCGCGGT GGAATGCGA TTTCCGCGAG ATGCTACTGT  
9241 GGTACCGGGA GTTAAGRACA CCAACACCG AACCAAGGCG TGTGTGCTT TGTGCGCG  
9301 AACTGTGGA GGTGCGTAC GAAATTTTGT ACTTGAAGG GATCAGCGC AATGCGTGT  
9361 CTAGTGCCTT ACGGTTTGTG TGTGTGCTA GTGCTATACT CCGCTCTGCT TGTGTGATA  
9421 TCTTAAATCA A

## 【図 10 A】

FIG. 10A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0070P-US) 遺伝子および非翻訳領域

Sタンパク質および遺伝子配列

Sタンパク質アミノ酸配列: (配列番号76)

MEGMTPTGLIVQRDGLHWCHARRHSVQPDRAAGPPSVTSVERNMGCSTQDTICSPVVEADYNTSSGCRALNGSYH  
CGGSGCRSPSRVQVAGRVRLCAFLALIGSGMCSIRSKNEGRIESGQ

Sタンパク質遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド111-82

E1タンパク質および遺伝子配列

E1アミノ酸配列: (配列番号77)

ILQSQRAQWTGEGFAFFSNCCNQSDIMKCLRHCVRTPGCLVCTGNATHPVCWDLGSGVSRPARRMGEAEVLR  
LIGIAGWGLLAEALGMSBIYAFLCFGIAMYGAGIPIKTLVCTVCPAVNISPYSLSPDTIAPGTWLLQLPGLLWQ  
MNFVSFFILYSKWLJMLLSGKTVAVIAILLASPTVMA

E1遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド483-1055

E2タンパク質および遺伝子配列

E2アミノ酸配列: (配列番号78)

YKHQADSYLKYCTITNASTAMMCCPFGTFRNTESGPTIRFCPVKLNSSTFICSGSWWFAENITRPSYDVGMP  
PAPISALCYIYSNNDPPSWYRNTTII PQNCYNSTADPTTAPCRDKGNATACILDRRSRFCGDCYGGCFYTNNGSHDR  
SNDRCGIGYRDLGIEFVQLGQIRPHNATITELLAGASLVIASGLRAGYGCRAHGVMHCFKCPSYRDLRFPGPLG  
KWVPLPGEVPVELCINPQWARGRFVSKNPLSVLTQTFVEDIFLAPFCNPTGRVFCVNNNTAFYPRGGGFVQLIGDVQ  
VLTFNSTSLHSLTLISLLLVGVSVGARFVPLGIFFWSVRHVYA

E2遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド1056-2117

## Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列: (配列番号79)

SCYLSCKAVKNDACFTTSCATENDVLCPLVAARISCCGHAVPPDRGAEVPAAMSWAISRITGLTFDFVSFIQY  
LPTVPGNNSDIYCGEPPFFGDTIGIYWFYFLPGMLLLTLPPLGLRLHLAGFNIDGLEFIRHATAALRFSTSRVIL  
SVVFAFLIYILSHFPVNAALARMFLASANKLEHISPDFTYHETVLVYVCLLLYLQVSPRAGLAAMVAIKLSRGLFAVV  
LAHGVC

Xタンパク質遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド2118-2828

## 【図 10 C】

FIG. 10C

NS5Aタンパク質および遺伝子配列

NS5Aアミノ酸配列: (配列番号84)

VVSGINSEVLCILRAVWDAAKHVPREFVPMIGCSPANCGRWLGTGTLLTTCGGERVSLQCICSTSPDTLSVGRWC  
WCSRWVGFPPNPTTATGTLRPDISDATIKLGRFYGVAEIVELERRGNKHVCAASCCLDPRASVASAVRAPVYTDGII  
PISFSPPTTKYLSLCFSFDSVCMITNLCNPAKTLVSCVQEAELLEETVDRAQVVMQNLKARRRAEFDAWQVREAI  
RDEYTRLADEVDATTSVXPVKAAGVSGSTLDDVSVLTVLRELGDQCONAKFVVOAASRFVPPVPEFRTRVSGVL  
ERVNMCNRTFPIKFEAAAVPIHDIPEECHIVLRCTGCNDQALTVPYGTCTQSLIKHLTSKSHSYPKQKIEEDTEV  
TVICAVPTTRASKLITFRAGDRSVSCCHPLQTPIRALLKYGLPIGKWSDCNGLPGDARVCVNVGVTTYEPC

NS5A遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド6342-7715

## NS5Bタンパク質および遺伝子配列

NS5Bアミノ酸配列: (配列番号85)

MQSYSRFPPIVAPPTPLPATRTVAGILRADTSRVYTTTAVDVSRQAKVTIIDQTSKAVDQCFRDPTYNCCILAKAKTF  
RQSGMSYEDAVSKMPRANTRDHNNGITYSDLVSGRAKPVQKIVNQMRAGVYDAPNRILPKPEVFRPRDKTRKPPRF  
IYFPGCAARVAEKMIIGDPGATIKHVLGDAVGPATPPHPRARILPQNMNRATPQAIYVAIDAFNSTITATFDMNDEFA  
NIVAAAHATDPGCVHGLIYNYKRSPHMDIGKVGVRCCRASGTLTSSGNILCYLKVRAACTRSRGIKPIGLLIHGD  
DTLIVTERCAQETLDEFSNALDDYGFPHITQASGDLSSIECCSARVDSVCLRGMMRMLVQORRAIRAVLGKGD  
LGITIGSYVWYFTAATVTVYVLLPCLMLIRNEPSQTGIVTLTVHGNSSVSPWALLPTIIANLHGRDAIQVVRHSAA  
SMAELSSALAFFGMRGLNCKRRRRRAIRADMIKSGGMNANFAQMLNSPEVTRPQPEFRGLCLLPPELWIERPYENLH  
LSTIDNRNGASRLRFWLVASAIIAALLCL

NS5B遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド7716-9416

## 5' UTR配列

5' UTR配列: 配列番号75のヌクレオチド1-110

## 3' UTR配列

3' UTR配列: 配列番号75のヌクレオチド9417-9431

## 【図 10 B】

FIG. 10B

## NS2タンパク質および遺伝子配列

NS2アミノ酸配列: (配列番号80)

RPGRVFGLVFCADISWLVETGNCCTWYMSCVFSFACVFAFTSPLGRQYKQLIYRVWQAQYARLILAVGCGPLGREF  
HFRASVGLVCAGMCLWPRECSEISLVFILCALTVDTIDTWLACL SAGPSARTLATLADDMHIGDERALRAVLRC  
FGSGTYIYNHMGQVSERVAQAVRDGCGLEPVVLEEPTTFEVVDTHNLVCGQLLGKGPVVAQCGTRVVGHLNPE  
DLPPGFQLS

NS2遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド2829-3548

## NS3タンパク質および遺伝子配列

NS3アミノ酸配列: (配列番号81)

APVVITKPSICTWFFLKATLTGRAETPGSQIVVLSLTCGRSMCTAVNGTLXATGCGACARLATCAGLRPTFLYTAL  
SEDVVAYSCLEPGMSLSECKCSFSRVWVNNNGGLVCGRVEKDDVCLDCTPEIDQLRGASGSFVLCDEGHAYALMIG  
GYSTSGICARVRIVRPQNAYSSSGGQGGMQAPVTPTYSEITYAPTGSSTKYVPDVLVKQGHVLLVLPVSVAVV  
KSMAPYIKERYIKRPEIRAGTGPDGVTVITGENLAYMTYGRFLVDETNLRGYAVVICDECHDTSSTTLGIGAVRM  
YAEKAGVTVVFATAPAGIQVQSHPIDEYLLDTGDEVFYSAKIKLDMIRTRGRHVICFCHSKARCAELTQOLSGIG  
VRVSVFWRGCDIKSIPASDSIVVATDALSTGYTGNFDSVIDCGCCVEQVTVIDMDPTFSISARVVPCTAALRMQR  
GRTRGRRGAYYTTPGAAPCVSVPAKVVQSVESAMFYDWSAARIEQCLAAVHDLGCTPRISCDPETPVRVMDTL  
RAYLRPEVTTAALAGEQVPLLYGVQLCICKETEAHGGDDGKIKCLLNNNNKTPLLYALDNLTPEFTTQHDLTRRI  
AGALSTTVFVET

NS3遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド3549-5432

## NS4Aタンパク質および遺伝子配列

NS4Aアミノ酸配列: (配列番号82)

GYGPILLAGAAALASFAGATGALVPSAVWSVENLAGVTT

NS4A遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド5433-5555

## NS4Bタンパク質および遺伝子配列

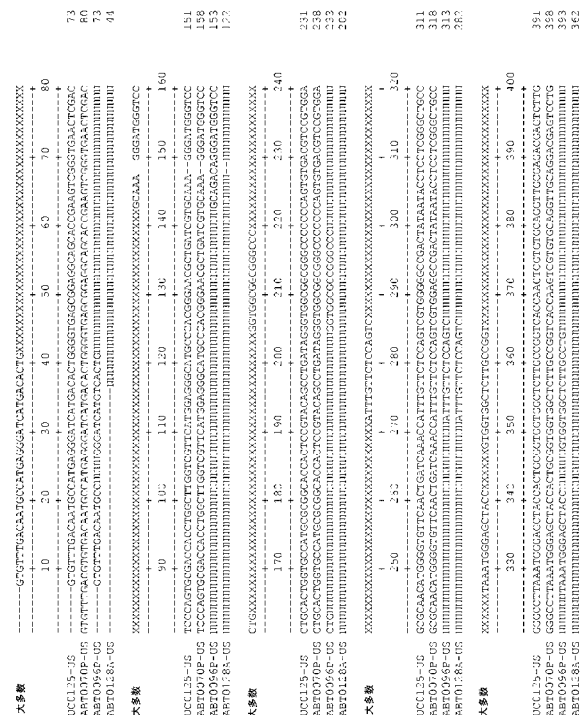
NS4Bアミノ酸配列: (配列番号83)

RPDATDETAAYAQRLVQACADSGILASLQGTASAALSRLADASEGASQYLAAAPPSPAPLVQVQLFLETNFFSSIASF  
GLLCAGCQAGCEFTALAGLVSGATAGLGAHKKWLLAIAGTWLVSLQGTGPRGGMVAGLSVLACGCGISVGTGLDFLPGC  
LTGKEAVVGAAVATQKILSGSADMTTLDVLLPALFSPGAGIAGVVLVFLINSSTVTHWANRLLSMCAKQTCICENYFL  
TEKFGQQLSKLSLHRSVYHQAQAREGYTQCG

NS4B遺伝子配列: 配列番号75のヌクレオチド5556-6341

## 【図 11 A】

FIG. 11A















【図 1 2 A】

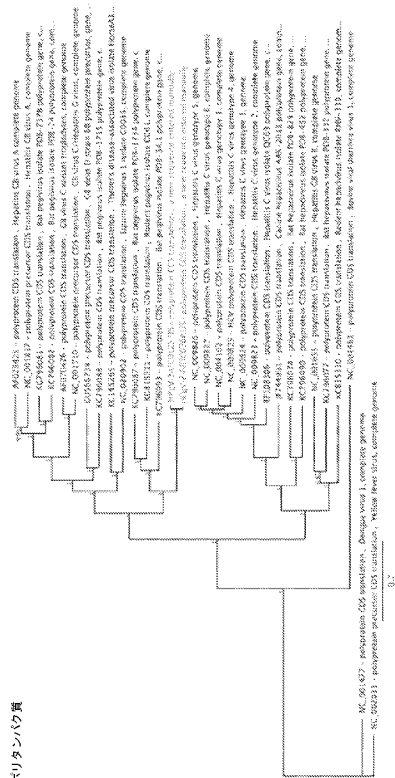


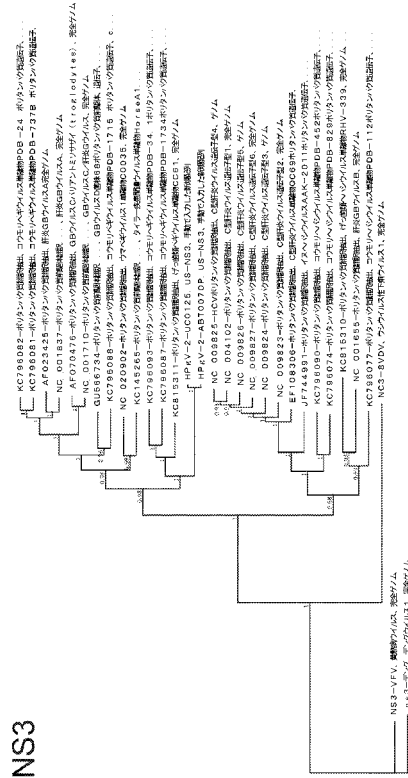
FIG. 12A

ポリタンパク質

31 個のフラビウイルスポリタンパク質の系統発生分析

FIG. 12B

NS3



31 個のフラビウイルス NS3 タンパク質の系統発生分析

【図 1 2 C】

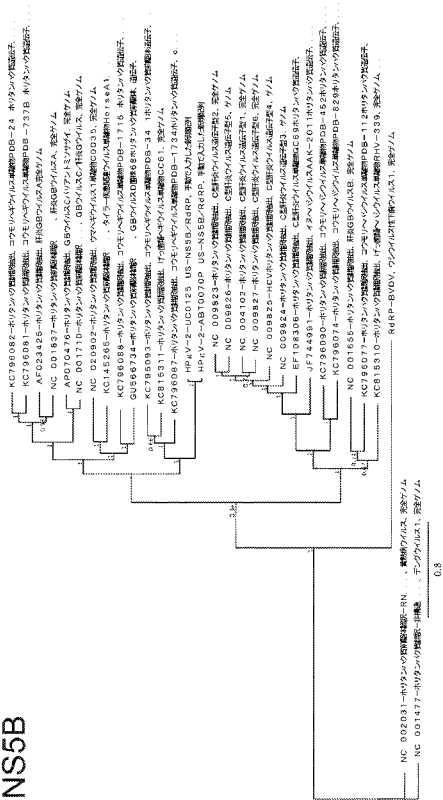


FIG. 12C

NS5B

31 個のフラビウイルス NS5B タンパク質の系統発生分析

【図 1 3 A】

FIG. 13A

ヒトベゾウイルス 2 (コンセンサス配列) 核酸配列一配列番号 2 9 9

1 AACTGTGTTGT GTAGCAATGC GCATATTGCT ACTTCGGTAC GCGTCAATTG TAGGCGCGCCG  
2 GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
121 CTGGGGTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
181 GCTTGGTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
241 CTGCACTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
301 CCGCACTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
361 CCGCACTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
421 CCGCACTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
481 CCGCACTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
541 GAGGCGGCTG TTGAGTGGG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
601 GGTGTTGCTG TCTTCTTCTA CTGTTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
661 TGTTGTTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
721 TGTTGTTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
781 GAGTGGTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
841 GGTATGCTGC AAATCTATGC AGCTATGCT TCGTTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
901 GGTATGCTGC AAATCTATGC AGCTATGCT TCGTTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
961 TCTTATGCTG CAGATCTATG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1021 TGCGCACTGCT TTGTTGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1081 AGCGCGGCTG CTGTTGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1141 AGCGCGGCTG CTGTTGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1201 AACTGTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1261 AGTTGCTGCT CTGTTGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1321 TGTTGTTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1381 TCGGCTTGTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1441 ATCATATGCT AGAAGTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1501 AGTTGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1561 TATGCGGCTG GTTCTATGCT TAATGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1621 GGTATGCTGCT ATGAGTGGT AGAAGTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1681 AATGAGCTGCT TTGAGTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1741 GGTGTTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1801 GAGTGGTGGT AGTGGTGGT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1861 GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1921 CTGAGCTGCT TACAGACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
1981 CTTGCGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2041 CAGCTCATGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2101 ATCATATGCT TTTCTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2161 ATCATATGCT TTTCTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2221 TGCGGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2281 GTCTTGTGCT TCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2341 GAGGCTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2401 AGCTTGTGCT TCTTCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2461 ATCATATGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2521 TTTTGGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2581 GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2641 TCGAGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2701 CTTGTTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2761 TCTTGTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2821 GTGCTGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2881 TCGGCTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
2941 TCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
3001 GTCTTGTGCT TTTGCTGCTG GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
3061 CTTGAGTCTG ATCGGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
3121 GTGCTGCTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
3181 TGCATGCTCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
3241 ACAGTGGCTG CCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT  
3301 ACCCTTGCTG CCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT GCGGCACTGCT

## 【図 1 3 B】

FIG. 13B

```
3361 GTGTTCGGTTC GCTTCGGATC ACGTGGCACA TACATATACA ACCACATGGG CCAAGTCTCA
3421 GAACCGGCTGG CGCAAGCACT CAGGAGATTC GGGGCTTGGT TGGAAACAGT CGTATTGGAG
3461 GAGCGCCACT TTACCGCACT CGGACAGATG ACATATGAGAT TGGCTGTGTA ACATATGGGT
3541 GAGAGTAAAC CCGTGTGGTC CCGCTCGGGC AGCGGTGTCT TGGTGGGACA CCTCAACCCCT
3601 GAAGATCTGC CACCCTGGTT CCAGTCAAGT GTCCTGGGTG TTATACCAAA CCAAGACATT
3661 GGTACGTGCT CTTTCCCTTAA GGGCAGCACTC ACAGGCGGTG CTGAACAACC XGGATCCGGC
3721 CAGATCGTGG TGTTCTCTTC CTTGACAGGT CGGTCAATGG GTACTCGAGT GAATGGGACA
3781 CTGTATGGCA CGGCGCATGG TGGCGGTGGG CCGCGGCTAG CCACTCGGGC TGGTTTGGAG
3841 ACGCACTTTC ACACGGCTTC ATCTGATGAT GTCCTGGGCT ACTCTTGGCT TCGGGGACAG
3901 AGTTCCTTAG AGCCTCGCXG CTGTTTCCGG ACACGGGTTC GGGTATGGA CAACAACGGG
3961 GGGTGTGGTT GGGGCAAGT GGAAGAAGAC GAGCTTGTT TGGACTGTCC CACGACACA
4021 GATCAACTGC GGGGCGTTC GGGGTCAACG GTTTTGTGTG ATCAACGGTCA TGCATACCGG
4081 TTGATGCTCG GTGGTACTC TACCACTGGT ATTGTGCGG GTGTCCGGAT AGTCCCGCCA
4141 TGGAGAACG CTAATTCTCT CTCAGGGGGG CAAGCGGGA TCGAGCGGCC AGCTGTGACA
4201 CACACATACT CTGAATGAC CTACTATGCT CTTACTGGTT CTGTATAGTG ACGAAATAT
4261 CCACTGGACC TAGTCAACAA GGGACAGAAA GTATTGGTCC TTATACCAAG TGTGGCTGTC
4321 GTCAAAAGTA TGGCCCTTCA CATTAAAGAG ACATATAAGA TTAGACCTGA TGAATAGAGCT
4381 GGCACAGGXC CTGACGGTGT GAGCGCTATC ACTGTGAGA ACTTGGCGTA CATGACCTAT
4441 GCGCGCTTCC TTGTGGTCTC GGAGACGAA GTCGCGGTTT ATGCCGTAGT CATTTGGGAC
4501 GAGTGGCAG CACATATCAT CACACAGCTA CTCGCGATTG GCGCATGTGG CATSTATGCC
4561 GAGAAGCTG GATGAGAGC CTTGTATTTC GGCACAGCA CTCCTCGTGG CATTCAGTA
4621 CAGCACAATC CCAAAATTGA TGAATATTTA TTGACTGACA CAGCGAGCTT GGAATCTTAC
4681 GCGCCACAAA TCAAAATTGA CAACATCAGA ACTGTGAGAC ATGTATCTTT TTGCACTCTG
4741 AAGGCGAGT GTCGGAACCT AACGACGAC ACTTCCGGCC TTGTTGTTCG TGCAGTGAAT
4801 TTTTGGCGCG GCTGTGACAT CAAAACCATT CCGGCTCTAG ACTCTATTGT TGTAGTGGCA
4861 ACTATGACAT TGTCCACAG CTACACAGX AACTTGTATT CGGTCTACA CTGCGGTGT
4921 TGTCTAGAGC AAACCTGAGC AATTCATGCT GACCTTACGT TCTCCATCTC GTCGCGGATG
4981 GTGCCATGTA CTGCTGCAIT GCGTATGAC CCGCGCGGAC GTACCGGTGC TGGCAGAAGG
5041 GAGCGTACT ACACAACTAC TCCAGAGACA GCAACTTGCG TCAGCGTCCC CGATGCTAAC
5101 GTCTCGCAAG CAGTGGAGAG CGCACAAGTC TTTTATGATT GAGTGTCTCG CAGGATACAX
5161 CAGTCCCTGG CGCATACCA GTATTAAAGG TGCACAACG CACATAGTTC TGAACCCACAC
521 ACTCGAGTGG GGTGTATGGA CACTGTAGG ACTACTCTGG CCAAGCTTGA GGTGACATG
5281 CGGCTCTGG CAGGAGACA GTGCGCGCTC CTATAGGTG TGTAGTGTG CATCTCGAAA
5341 GAGACGAGG CCAACGGTCC AGACATYXC ATCAAGTGA AGTGTCTTAT CAACAACAGT
5401 AACAAAACAC CCTGTGTGTA TGCTTATGAC AATCTTACAC TGAATATCAC TACCACAAT
5461 GACTTGTGCT CGCGGTMAGC GGGCGCTGTC TCGAGCAGAG TGTCTGGGA GACAGGTAC
5521 GCGCCATCAT TCTTGTGTGG GCGCGCTTGG GTCTCTCTCT TCGCTTTTGC GGGCGGCACT
5581 GAGACTTTAG TCCGCTGGC GTTGTGAGC GTTGACAGG GATCTGCTGG GTGAGACCT
5641 CUXAGGGA UAGAGGAGAC GTGCGCGCTC CTATAGGTG TGTAGTGTG CATCTCGAAA
5701 TCAGAGTXX TCCGCACTT CAGAGGAGC GCGAGTGCAG CCGTGGKACA ACTSGCGCAT
5761 GCGCATAGGG GTGCGAGTCA ATATCTGGCA CGCGCGCTC CTTGCGCCGC CCGCCTGTGA
5821 CAGGTGCTGC AGTTCCTXGA GACCAACTTT AGCTCCATTC CATCTTCCG TCTGCTCTGT
5881 GCTGCTGTG AGGCTGGGGA GTGCTTCACT TTAGCTATTC CAGGACTTC GCTAGTATAC
5941 GCTGCTGTG GAGCTGCCA TAAGTGGTT TTAGCTATTC CAGGACTTC GCTAGTATAC
6001 TTGCAAGCTG GCGCCCGTGG TCGACTATGT GCGGCGCTCT CGGTCTAGC AGGCTGTTCG
6061 ATGCGTAGTG TCACCGGGCT TGACTCTGTT TTGTGGTGGC TTACAGGTTG GAGGCGCGTG
6121 GCTGCGTGTG CGGTGCGAC ACAGAGAGAT TTGCTGGTT CGGCTGATAT GACCACTCTG
6181 GTAGATCTCT TACCCTGCTCT CTCTCTCCCT GAGCGCGGA TAgCTGGCAT CGTGGTTGC
6241 TTTATTTCAA CAACTCAAG TGTAAACAGC TGGGCTAATC GGCATTGTGC CATGTGTGCA
6301 AAGCAACATA TTGTGTGCC ATCTCTCTTA ACTGAGATAT TTGCGCACA ATTAAGCAAA
6361 CTTTCTCTGT GAGTCTCTCT GTACCATTGG CGCAGGACG GTGAGGATA AACACAGAT
6421 GSGTGTGTCA GCGGGATCTG GAGCTTTGTC TTGTGCATTC TACGCGCTGT GTGGGATTGG
6481 GCGCGXAAAC ATGTGCGACG GTTCCGTGTG CTTATGATTG GCTGCTCAC TCGCTGTGCT
6541 GCGCGCTGGC TTGGTACCGG CACCTTGTGT ACCACTGTGT GTGTGGAGA ACGTGTGTCTC
6601 CTTGAGTGGC TTGTGCTGAC ATTCAGCCA AACTCAGTGT TGGCGCGTGT GTGTGCGTGT
6661 AOTTGAGTA TTGTGTGCC ATTCACCGG ACTACAGAC CACCGCGACC TTACGCGCG
6721 GACATCAGTG ACGCACAATA ATTGGGTTTC CGATGTGTGT TTGCGGAGAT COTGAGACA
6781 GAGCGCGGGG GCGACAATAA GCATCTCTGT GCGACATCAT GTTGTGGA CCGAGCCACG
```

## 【図 1 4 A】

FIG. 14A

ヒトベギウイルス 2 (コンセンサス配列) 遺伝子および非翻訳領域

## 5' UTR 配列

## 5' UTR 配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 1-327

## S タンパク質および遺伝子配列

## S タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 304)

MGSTGDTTCGPPVSGADYVTSQGRALNGSVYCGGQJGSRGPPVQARVVLQCAPLALIGSGCIRSGTEGRIGESGQ

## S タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 328-564

## E 1 タンパク質および遺伝子配列

## E 1 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 305)

ILQSGRACWQGEFAFPHQICQSDINHCNHRGCVCFQCDLVCTGWHVHFVYKDYLSGVGRSRPRRHQEGAEVLRILCTAGCGLLALBALG  
NDEIYAAILCGFIANYGIGIFRLVCTVCFANVIGSVSLPSTQIAPGIXILQLPLQNLQNHVEFFILYGTILKALLLGGTAVAILLAS  
PTYRA

## E 1 タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 565-1137

## E 2 タンパク質および遺伝子配列

## E 2 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 306)

YKHQKSYLYLCTFLIHASTANLDCPPGPPFPHHLSAFSLPRPCKRXLSLFFICNGSGKXWAKHUTRYGDDGXPPAPILGALYLYLHLP  
PPYHGTITTLIPQICHTSVPTTAPCRKHGIIATACILDRSRPGCDYGGXPYTIHGSRSDRCSTGVRCGLIEFVLQGITPHISHTICE  
LLAGGLVIALGRLGXGCRANDVHCRCPSYSDLEKXGPGKXVPLPGEVPELCLIPCXARPGFPHGILHLSLLQTFVDEIFLAPFC  
PTGRCVRYCTTAFVPPGGGFIQITSDQVLTPTAIGIHSITLIGLTLIVVSGAPVPLITTFNSARHVA

## E 2 タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 1138-2199

## X タンパク質および遺伝子配列

## X タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 307)

SCYLSGQWVNDAPFPSTGATPDLVCLLPVATRLSCGGRHVPFPRGKVEPRAMHGVISGPTGLTFQVGSFYLYLPTVPHNITLIVCGE  
PTTFYGLDITVYPTPLRGVLLLYLFPFGILNHLGAGHLGKFPRIHMAARFSTSRVTLGVAFKAYILGHPVIALHMLHNSAGANEMH  
LSVDYHMLVLYLVCALYLVSPFRAGLAAHMLKLMGMLFAVLRHGV

## X タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 2200-2910

## 【図 1 3 C】

FIG. 13C

```
6841 GTTGCACTCG CGGTGAAGGC CCCACCGGTC ACGGCCAATG GTACACTATC CAGTACCTTT
6901 TCTCGGCGAC AAATCTACAG GCTCTCTCTC TGTTCTCTTG ATTGACTTTG CATGTATGCT
6961 AACTTATGTA ACCGACATA GACCTCGAGT GTGHTGCTXC AGGAGGCTGT TGAAGTACTG
7021 GAAGAARACG TTGACACAGC ACAAGTAATG ATGTGTCAA ATTCGAGGCG GCGAAGACGC
7081 GCXGAGTATG ATGCAATGGA AGTTCCGCAA GCAGTTGGCG ACGAGTACAC GCGTTTGGCA
7141 GACGAGGATG TTGACAGGAC AAGCTCGGTG AAACCCCCGG TGGCGAGGCG TGCTGTGGGT
7201 AGCTTCAAGT TGAATGATGT TACGCTGCTG ACTGTCTTGG GCGACTCTGG CAGCAATTCG
7261 CAABAATGTA TCAAAATTGT AGTTCAGGCG GCTTCAAGGT TTGTTCCAC AGTGGCCAT
7321 CCACGCGACG GTGTCTCGGG TGTGTTGGAG GGTGTCGCGA TGTGCTAGCG CACGQCAACA
7381 ATCAAGTTTG AGGCCACCGC AGTACCAATT CATACACATA TCCCAAGAAG GTGTCAACTT
7441 GTGCTACGCT GTACCGGCTG TAAACGACAG GCTTGTAGCT TTCGCTAGCG CACTTGCATC
7501 CAGACTTTAA TCAAACTATT GACTAACAAA CAGCGAGACT ACATTCGAAA AAGAGAAGCA
7561 GAGAGAAGCA CAGAAGTAAC TGTCAATTGC GCGCTACCAA CAAGCGCGCG AAGTAAAGCT
7621 ATGACTTTGA GAGAGAGTGA TCGATGCTG TCHTGTGTG ACCCTTSCGA ACTGCTATT
7681 AGGCGGCTGC TTCTAAAGTA CGGTTTACCT ATCGGGAAGT GGTCCGACTC CAACGGGCGC
7741 CTTGTGTGAC AGCGCGGAGT CTGTGAGCTG AATGGAGTAA CAATCATGTA ACCATGGAAG
7801 CAATCTTACA GTTGGTTUUG ACUGATTGTG GCACCAACAA CCCCACTTTT ACTCGAACCT
7861 GCGAGCGTGG CTGGCATTTT ACGCGCAGAC ACATCGCGCG TTTCACACAC AACGCGGGTT
7921 GAGCTCTCTG AGCGGACGCG TAGGTCACA ATTGATCAA CATCAACCAA GTTGGATCAG
7981 TGTTCCTGAG AGCATACATA TTGCTGCTTT GCTAAGGCA AAGCTCTCAG ACANVTGGG
8041 ATGTCATATG AGGATGCTGT GTCAAGAATG CCGCGAAGAC CACCGGICGA CCAATACAAK
8101 GGCATCACTT ATTCAGATTG GTGCTCTGGA GGTCTCTGGA CGCGCAAAAC ACAGAATTGA
8161 GATCAATAGT GCGCTGGAGT GTACGACGCT CCAATGCGCA TTACTCCAAA ACCTGAAGTG
8221 TTCCCTCTGAG ACAAGTCAAC ACGGAAGCCA CCXCGGTTCA TCTTTTCCC TGGGTGCGCC
8281 GCGCAGCTCG CGAGAAGAT GAGTCTGAGC GATCTGGGCG GATCTACACA GCGAGTGA
8341 GTGTATGCTT ACGGCTTTGC CATCTCGGCG CATGACGGCG CGCGCTATT GGAATAATG
8401 TGGAGCGCG CACGCGAGCC ACAAGCTATC GCGGTTGATG CGATCTGCT TGAATGACAC
8461 ATCAGCGGAC AGGACATGGA TCGTGAGGCC AACTCTATG CTGCAAGCCA TXCGAGACCT
8521 GAASTGGTTC ACGGCTATA CAATTATTAC AAAAGAGGCC CCACTGTGTA CATCACAGGA
8581 AAGTGTGTG GGGTGGTGTG CTGTGAGCG CTGAGTACCG TTACACACAG CAGTGGACAC
8641 AGCTTACTT GCTACTTACC GGTGTGGA GCTTGCAGCT GCGCGGAGC ATGCAACATG
8701 GCTTACTTAA TTGATGGA GAACACCTTA ATTATGACAT AAGCTGTGCG TCAAGAAACT
8761 CTGATGAGT TCAGCAACGC ACTTGTGAC TATGGGTTCC CTCACACACT CAGGTGTGCT
8821 GGGGAGCTCT GGTCTGTGGA TGTGTTAGC GACAGGTTG ACAGCGTTG CACTCGGGGA
8881 GTATGCTGCT GCATGCTGCT GCGACAAGCT CGAGCTGGGA TTGACCGGCT TCTCGGGGAA
8941 AAGGCGGATC CAGTGGTGTI CATCGACAC TATATTGCTA TGATCTTAC TGGCGGXTG
9001 AGTGTGACT GCTATTTACC GGTGTGGA GCTTGCAGCT GCGCGGAGC ATGCAACATG
9061 GCGACACTTG TACGCTGAG GTGCAAGCT GAGCTAGGTA AACGTTGATA GCGTGTGCT
9121 CCAACCATCA TTGAAATTT ACATGGCTGT GAGGACACT CACAGTCCG TCACAGTGCA
9181 GCTTCTATGG GGAAGTGTG ATCAGCGTTG GCTTCTTTG GATGAGAGG GTTGAATCTG
9241 TGGAGCGGGA GAGCGCGTGC CATAGGACT GATATGATCA AGTGGCGCG GTGGAATGCG
9301 AATTTGCGCG AGATGTACT GTGGTCAAGC GAGGTAGAGA CACACACAC CAGACCAAG
9361 GGAATGTGTC TCTTGCACC GBAATATG GAGCTCGGT ACAGAAATTT GCATTTGAGC
9421 AGCATAGCG CAAATGTGG TGTATGCGC TTACGTGCTT GGTGTGTTGC TAGTGTGATA
9481 CTGCTCTGTC TTGCTTGT TAATCCTAAT CAAATGATGA CACGAGACT AAGCAGGAG
9541 GTGAAGTCAG CTGTACCCAC GGTGCGTGA AACCGGGCT TGAAGACCC CCTTATGCG
9601 GTTGGCAGAG GTACATCAC GGGTGTGAC AGCCCCCGCT CCGATCTGCG GGTAAAGCG
9661 ACGGCGAGG CAGTATGCT GAGGTCTGCG GCMATCTCC GCTACCCAC CCGAGGCTAC
9721 GCTCTGCTCT GCGAGGAGC GTAAACACT GTGCTACGCG TGGTACACT ACGTACTG
9781 TTAACCACTT AATGTGCTA ATCGAGGCC GTTCCCGGGG ATCTAAGCC GGCACCGCA
9841 TGAAGGGGGT CAACGCCCC TTTCATT
```

## 【図 1 4 B】

FIG. 14B

## NS 2 タンパク質および遺伝子配列

## NS 2 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 308)

RGR/PGLEVADIGLVETGICTWYMGCVFSEKCAVFAFTPLGFRQVILQIYRYAQVYARLILAVGCGELGRFIFRAGVGVLCAGMIL  
NPEDEEISLVITLALITTEICFVWALCLASCPARTLALVIRHNGQVLRGCTGGRGTIYHNGQVGRVAGAVRLGCGLEP  
VLEGGPTTETXVQTHLEVCGLGGSPVAKSGIRLVGHILPELPPFSL

## NS 2 タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 291-3630

## NS 3 タンパク質および遺伝子配列

## NS 3 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 309)

APVITKPGIGTWSFLATLGRAGTFFSGGCVVLSLTLGRSMGTAVITLVAHQHAGARGLATCAGLRTFLYALSDEWAVYSLPGMSL  
FPXCKSPERVAMIRHIGVCRGVXNDVCLDPIHIDLRAGGSPVILCHGHAYAIMGGYTSIGICARVRVVPKWYAYSSSSGQSGHQA  
ZAVPTFSEITYIAPTUSGRTKTFVLDLRGGRHVLVILPGVATVGHAPITRETVLRPEIRAGTGGPGVTVTTEILATYTGRLVDEPT  
HLRQAVVTCBIRGCTGPTLLCGLVRAHACTVYVYVAPRAGGICQVHNVLDLITGGRVFEVYDGLIHLHGRHGVTFCHYA  
RCABETQGLVGLVAFSGROCDIETPACDEIVVATDALQCTVYHGFSDVDDCCOYEVGTIMDETFESCARVETCAALMGRBRCG  
GRORQAVYTTTFGAACVGVPAWVQAVESHMVYKSNARIXQCLAYHDLQCTPRIGCDPHTPVRMOTLRVLRFEVITNALCEQW  
PLDVTGVLCKETGASGPDXLERFKLHLISIKIPLLYALDIPTEFTTQHLTPHLAGALSSTVVFAT

## NS 3 タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 3631-5514

## NS 4 A タンパク質および遺伝子配列

## NS 4 A タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 310)

GYGPILLAGAALAGFAPAGAGALVPSAVKSVDEGLASVT

## NS 4 A タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 5515-5637

## NS 4 B タンパク質および遺伝子配列

## NS 4 B タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 311)

RPACTAAAYACRLVYACAGGKXALQGIASALKLADASRAGQVLAAPCPDAPVNOVLFSETHFGSADGOLLGACGAGBCTPAL  
ADLVGNTALGGRHMLIANLKLVLGIGRPGHVLGSLVACCIYSGVLDPLFCGLTGAEVVGAVATQKILSGADMTLVDLLP  
ALFPGAGLAGLVLEILSGUSVTEWMLLSGAKQTIKHNFLKRFQQLSKLWSRYSRAQAPSVTQCG

## NS 4 B タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 5638-6423

## 【図 1 4 C】

FIG. 14C

NS 5 A タンパク質および遺伝子配列

NS 5 A タンパク質アミノ酸配列：(配列番号 3 1 2)

VVGGKDPVLCILNDVDAAGVPEPPEPMHIGSGFPAHGRKWLSTGELLCTCGGSGPVQLCLCTSDPTLGVGRKCGSGVGFPEUPTTTA  
TTLRDPDSATKLGFGVYAKLVYPRKGGKHYVCAAGCTLDRAAGVACAKPPYTAHGIPTSTFPPQTYSLGLSPDSGVSTLIDLPK  
TLCVQDQAEVLEELGVDAQVHQQLEARRPAPYKAWPQAGEVETPLADEOVTTGTVKPPVAPAAVGGSTLDELGVLTVLELSDQ  
QDAIKFVDAASRFVPEVPEPPTKSGVLEVRHMKPPTPFETAAPVPHILIPBECCHVLACTGIDQALTYVGTCTQLIKLSTURSH  
YTPRQKIEBDETEVTCVPTPRASKLITERRAGKVSQCHPLTTPRALGLKYLPGKSGSDGKPLSDGKRVQVNSHTYERK

NS 5 A タンパク質遺伝子配列：配列番号 2 9 9 のスクレオチド 6 4 2 4 - 7 7 9 7

NS 5 B タンパク質および遺伝子配列

NS 5 B タンパク質アミノ酸配列：(配列番号 3 1 3)

HQGVXKPEVPAPITPELPATGCVAGILRADTSRYVYTTAVDVGRQAKVTIDQGTGAEVQCFEPTVYHCLAKAMTPEGCGHVSQDAVGRMRA  
UTTRUHDNGTTLGULVGRHAKFVQKLVGMAGVYLAIRPGLIPKPVYPRKSTKPPHIVFPGCAARVAEEMLGSLGALTKVJGDAYG  
FATPHFARLLELQKWRATISQIAJAVRICEPDITAEGRDRAHNGAABNDQBOVHGLYHYKRPDHDITGQVYVRCRRAQDTLZTSG  
GUTLTYLVKPAACITPACITFPGSLHUBDFLLITSEKAUELLDFHKLDDVYFPHYTGVDLQVVECCARQVQVLEKGRMVAIPQAR  
KATVAVLGRGDPGLGVISYVYPTAVVYVLLVCLDMLRIBEPGQTYLTCTVVRGIVGVSVVPLCLPTIIMLHGRDLQVVRHCAAGHA  
ELGALAPFNSGRNLKRRRRRAIRTOHKLKGSWALIFAKQLLAKSPGVXDFPEPVGKCLXPFELMRPEYHILHLSITDRINGASLRFLVLA  
SALLALLCL

NS 5 B タンパク質遺伝子配列：配列番号 2 9 9 のスクレオチド 7 7 9 8 - 9 4 9 8

3' UTR 配列

3' UTR コンセンサス配列：配列番号 2 9 9 のスクレオチド 9 4 9 9 - 9 8 6 7

## 【図 1 5 A】

FIG. 15A

ヒトベギウイルス 2 (A B T O O 7 0 p) 核酸配列—配列番号 3 0 0

1 AACTGTGTTCT GTAGCAATGC GCATATTGCT ACTTCGTAAT GCTCAATTGG TAGGGCCCGG  
61 GCCGACCCGG CCGGCAAGGG CCTAGTAGGA CGTGTGACAA TGCCATGAGG GATGTGTGCA  
121 CTGSGGCTGAG CGGAGGCGAG ACCGAGGTGC GGTGACCTGC ACTCCOAGTG CCAACCACTG  
181 GCTTGGTGGT TCATGTAGGG CATGCCACGG GGAACCGTGA TGGTGCAGAA GGAATGGGTC  
241 CTGCACGTGT GCCATGGGCG GCACCACTCC GTACAGCTTG ATAGAGGTGG GGGCGGCCCG  
301 CCGAGTGTGA CGTCGTGGA GCGCAAGATG GGGGTGTCAA CTGATCAACG GATTGTGTTCT  
361 CAGGTGGTGG AGGCGGACTA TAATACTCC TCGGCGTGGC GGGCGTTTAA TGGAGGACTAC  
421 CAGTGGGTGG GTGGGTTTGG CGGTGCACA AGTGTGTGAG AGTGTGTGAG AGGATGTGCT  
481 CGGCTGTGCG CATTCGTGCG GCTGATCGGA TCGGTATGAT GTTCCATCCG GTCCAAAAT  
541 GAAGGGCGCA TTGAGTCAGG GCAATATATT CAGTCTCAGC GCGCATGTGT GACTGGTGAG  
601 GGTITCGGCT TCITTTCTTA CTGTTGCAAT CAATCTGACA TATAGTGGTG TTTCACGCTG  
661 TGGTGTGTGA CAAGACTCGG CTGTTTGGTG TGCACGGGCA ATGCCACTCA TCGTGTGTGC  
721 TGGGACTATC TTGGGTCGGG TCGAGTGGG GCGGCTGAGC GTGCGAATGG TGAAGGAGCT  
781 GAAGTGTGAT TTGCGTAT CGGATATGCA GGTTCGTCTG GGTCTTATAG TAAAGTCTCT  
841 GTATATGTCG AGATCTATGC AGTTCCTCT TGGTITGAT TATATGCTTG GTATGGCTGG  
901 GGTATACCTA AGACATTGGT GTGCACATGC TCGCCCTGAG TGAACNTTTC TCGTATTAAG  
961 TCTTATCTCC CAGATACTAT CGCATTTGGT ACGTGGCTAC TACAATGCCG TGGTCTTTTG  
1021 TGGCAAAATG TTGTGAGCTT CCCTATACTT TACAGTACTT GGAATCTTTG GTTGTGGCTC  
1081 AGCGGCAAGA CTGTGCTGT GACAGCGATC CTITTGATTA GTCCCTAGCT TATGACTATC  
1141 AAGATCAAG CTGTAGCTA CTTCAATAC TGTACATAA CGATGCTTC AACTGCTATG  
1201 AACTGTGACT CGCCTTTGGG AACTTTCATC CGCAATATGT AGTCTGGTTT CATGAGCTG  
1261 AGATTCTGCT CTGTAAATCT TAATAGTCTT ACAITTTACT GTTCATGGGG GTGTGGTGAG  
1321 TGGTITGCTG AGAACATCAC ACCTCATACT TCGGACGTCT GCAATGCCCG ACACCACTAT  
1381 TCCGCTTTGT GCTATATCTA TTCAACAAT GACCCACCTT CTGTGTATCG TAACACAACT  
1441 ATCATACTCT AGAATGTSTA CAACCTTAGG CGTGATCTTA CGTACAGTCC ATGCGGTGAG  
1501 AAGTGGGACA ATCTATCTG TGTATCTCT GACCCGCGAT CGCGGTTCTG CGGAGGATGC  
1561 TATGGCGGTT GCTTCTACAC TAATGTAGT CATACCGAT CTTGGGATCG ATGCGGAATT  
1621 GGTATCCGCG ATGAGCTACT AGATTCGTG CAGCTGTGTC AGATTGTGAC TAATATCGGG  
1681 AATACGACCA TTGAGCTOCT CGCTGGCGCC TCGCTTGTGA TCGCATCCGG TCTTCGGGCT  
1741 GGGTATGTTT CGACGCGAGC GCACGCGCTG GTGCACTGCT TTAAGTGTCC TTCAATCGGT  
1801 GACCTTGAACT GGTTCGGGCC CGGCTTTGGG AATAGGTGTC CATGCTGCTG GAGACCTGCT  
1861 CGGAGTGTGT GTATTAACC CGAGTGGGCG AGCGCGGTGT TCCGGTGTCT TAAATATGCT  
1921 TTAAGGTGTC TACAGACTAT CCGTGAGGAC ATTTCITTAG CCCTTTCTTG CATCATCGAG  
1981 CTTGGCCGCT TACGTGTGTG TAACAATACT GCTTCTTACC CAGAGAGAGG CGGTGTTGCG  
2041 CAGCTCATCG GAGAGCTGCA GGTGTAAACC CCGCACTCTA CATCTTTGCA CTCCTCTGCT  
2101 ACTTTGATAT CCTTATCTTT GTATAGTGTG GTTGTTCGTG GCGCGCGAMT TGTCCGATTG  
2161 GBAATCATAT CTCTTATGAG CGTGGCGUAC GTATATGTTT TCTGTATGTT AAGCTGTGAT  
2221 TGGGCTGTGT GTATTTGCTT ACATCTGGCA CTGTGCTGAC CTTCAGTACG TTAATATGCT  
2281 GTCTTGTGCT TCGCGGTGTC GGGCGGCTAA TCGCTCTGTG GGCATGTGCT GGCACCGGCC  
2341 GACCGTGGTT GGGAGGTGCC CGCAGCGATG TCAIGGGGCA TTTTGGGTAC TATGSGCTTG  
2401 AGCTTCTGAT TCTTTCCTT CATCCAGTAC CTTCCTACTG TCGCTGGGCA CAATTCGAT  
2461 ATCAITTAAT GGGTGAACC AAGCTCTTC GGGGACAICA GGGGAIACIA TGGCGCTIAC  
2521 TTTTGGCTCG GATGTGTGCT CTGAGCTTGA ACTCCCTCCG TGGGTTTAAg GTTAAATGCT  
2581 GCGGGTTTGA ATGATCTGTA ATGACGATG CCGAGGTGTC ACTAGAGTAC TATGATGCT  
2641 TCGACTTCGG GTGTGACTTT GAGTGTGCTA TTGTCTTTCC TAATCTATAT ATTATGCTAT  
2701 CCGTGTAACT GTCCGCTCAA TAGAATGTTT CTAGACTGTG CAATCTAGA GATGATCTA  
2761 TCTTTTGATA CCTATCATGA GACTTTCTT TACGTGTGTT GTCAATTGCT CTACCTCCAG  
2821 GTGCGGCCCG GTGCGGGCTT GGTGTGTATG GTGGCCATCA AGCATCTCG ABGCTGTCTA  
2881 TCGCTGTGCT TTGTTGGGCA CGAGTGTGAC GCGACTGGGC GGGATTGCT GTTTAGGTT  
2941 TCGCGGTTGA GTGATGTTT ACTGSCACT GCGATGTGTA CATSTCCGCT  
3001 GTCTTCTCTT TTGCGTGGCG AGCTTTGGC TTACCATGCT CACTTGGACG ACATATAG  
3061 CTTGAGATCT ATCGGTACTG GGGCAGGGCC TATCGACAGT TCACTCTCGC TGTGGTGTGT  
3121 GGTCTCTCTG GGGAGGGAGT CCATTTCCGT GCGAGCGGTGG GCGTGTCTGT GTGTGGTGTCT  
3181 TGCATGCTCT GGGCCCGTGA GTGCTCTGAA ATCAGCTTGG GTTCTTATCT GTGTGCTCTG  
3241 ACTGTGGACA CCTAGAGACC ATGTTTAGTA GCGTGTGTT GTCGAGAGCG AAGCGCGGCA  
3301 ACCCTTGACA CTCTGGCGGA TGACATGGCG CGCATTTGGT ACCACGGGCT

## 【図 1 5 B】

FIG. 15B

3361 GTGTGCGGTT GCTTTGGATC ACCTGGGACA TACATATACA ACCACATGGG CCAGGTCTCA  
3421 GAACGGGGTG CGCAACGAGT CAGGGATTTC GCGGCTTGCT TGGAACCACT CGTGTGAGG  
3481 GAGCGCACTC TTAGTGAGGT CGTGATGAT ACATAGGAT TTGGTGTGTTG ACAATTGCTT  
3541 GGAAGTAAAC CAGCTGGTGG CAGCTGTGCG AGCGCTGTCT TNGTGGACA CTTCAACGAT  
3601 GAAGACCTCG CAGCTGGTTT CCAAGTGGGT GCTCGGGTGG TTAATACCAA ACCAGACCTT  
3661 GGTACGTGGC CTTTCTTAA GCGGCACTC ACAGGGCGTG CTGAACACCC GGGATCCGGC  
3721 CAGATCGTGG TGTTGCTCTT CTTGACAGGT GGTCTGATGG GTACTGCACT GAATGGGACA  
3781 CTGTATGCGA CGGGCACGG TCGTGTGGCG CGCGCGCTAG CCACTGCGCG TGGTITGAGG  
3841 AGCGCACTT ACACGGCAAT ATCTGAAGT TGTGTGGCTT ACTTTGCTCT TCGGGCACG  
3901 AGCTCCCTAG AGCTCTGAA CTGCTGCAAT AGCGGAGTTT GGTGTGGAA CACAGACGA  
3961 GGTGTGGTGT GTGCGAGGT GAGGAAGAG CTGCTCTGTT TGGACGTGTC CAGCGCACT  
4021 GATCACTGCG GGGGTGCTT GGGGTGCCGG GTTITGTGTG ATCACGGTCA TGCATACCGG  
4081 TTGATGCTCG GTGGTCTCT TACAGTGAGT ATTTGTGCG GTGTCGGAT AGTCGGGCGCA  
4141 TCGCAGAAC CCATTTCTCT CTTACGGGCG CAACGGCGAG TCGAGCGGCC AOCTGTGAT  
4201 CCAACATAC CTGAATACAC CTACTATGCC CTGCTGTTT CTGTATAACT AACAAAATAT  
4261 CAGTGGACCT TACTCAGCA GGAACACAAA GTATTAGCTT TTTCACAGG TGGGCTGCT  
4321 CTGAATAAGA CTGACTCTTS CATTAAGGA AATATAGG TTAGACCTTA AATTAGAGCT  
4381 GGCACAGGGC CTGACGGTGT CAGCGTCAAT ACTGCGSAGA ACTTGGGCTA CATGACCTAT  
4441 GCGCGTTTCC TTGTAGATCC GGAAGACGAT GTCGCGGGTT AGCTGTAGT CATCTGGCAC  
4501 GAGTGCCATG ACACATCAIC CACACGGCTA CTGCGCATCG CGCGAGTGGC CATCTATGCT  
4561 GAGAAAGCTG GAGTAAGAGC GGTGTATTC GGCACAGGCA CTCTGTGTTG CATTCAGGTG  
4621 CAGTCACTCT CCAAGATGTA TGAATATCTA TGGCTGATA CAGGCGAGCT GGAATTGAT  
4681 GCGCTTAAA TPAATTTGA CAACATGGA ACTGTAGAG ATGTATCTT TTGCACTCG  
4741 AAGGCGAGGT GTGCGGACT ACAGGAGGAC CTCTCGCGCT TTGGTGTGTT TGCATGATG  
4801 TTTTGGCGCG GCTGTGACT CAAGAGCAT CCCCGCTCAG ACTCTATTG TGTAGTGGCA  
4861 ACTGATGCT TGCTCAGAG CTACACAGG AACITTTGAT CAGTATTGA CTGCGGTGTG  
4921 TGGTATAGAG AARTGTAGC AATTAGATG GACCCAGCT CTCTCATCT GGGCGAGTG  
4981 TGCCATGCA CTGCTGCAIT GGTATGCGG GCGCGCGGAC CAGCCGCTCG CGATGTAGC  
5041 GAGAGCTACT ACACACACG TCCAGAGGCA GACCGCTCG TCACTGCTCG CGATGTAGC  
5101 GTCTGCAAT CAGTGGCTCG AGCGATGGTG TTTATGATG GAGTGTCTCC CAGGATAGAG  
5161 CAATGCTGG GCGCATACCA TGAATTAGG TGACACCCAC GCATCGATTG TGACCCACAC  
5221 ACTCCAGTGC GGGTATGGA CACATGAGG GGTATCTCG CGACAGCTGA GGTGACGACC  
5281 CGCGCTCTCG CAGGAGGCA GTGCGCGTG TTTACGGCG TCGATTTGTG TATGTCGAA  
5341 GAGACGAGG CCGACGGTCC AGACATGGG ATGCTATGGA AATGTTACT CATATACAC  
5401 AACAAAGAC CCTCTGTA TGTCTTAGG AATCTTAC TGGATATCC TACAGGCTAC  
5461 GACTTGACT CCGGTATAGC TGCGCTTTA TCGAGACAG GTTCTGGTGA GACAGGCTAC  
5521 GCGCCATCC TCGCTGCTGG CGGTGCTTGG GTCGCTCTCT TTGCTTTTGC GGGCGGCACT  
5581 GGAGCTTTAG TGGCTCGGCG CGTITGGAG CTCTACAGG AACITTTGAT CAGTATTGA CTGCGGTGTG  
5641 CCGATGCGCA CAGACGAGC CCGCGGCTAC GCGCAGCGCT GTATCAACG CTGCGAGAT  
5701 TGAAGATCT TGGCAGCTT CAGAGGTAG CCGAGTGGG CACGAGCAG ACTAGCGAT  
5761 GCGATATGAG GTCTGTGCA ATCTTAGG CCGCGGCTCT CTTCGCGCG CCGCTGTGA  
5821 CAGGCTGTC AGTCTCTGGA GACAAATTT AGTCCATCT CATCTTTCG TCTGCTGCT  
5881 GCGCGTCTG AGCGCGGCA GTGCTACAT GGTCTTGGG GGTGTGGTGC GAGTGTGAT  
5941 GCTGGCTTGG GAGGTGGCCA TAAGTGTGT TTACTATTG CAGGAACTTG GCTAGTATG  
6001 TTGACAGACT GCGCCCTGCG GCGCATGTT GCGTCTCTC CAGTCTAAG AGGCTGTTCG  
6061 ATCGTATGTC TCACGGGCT TGAATCTG TTTGGTGCT TTACAGTGTG GAGGCGGCG  
6121 GTGCGTGTG CCGTCTGAG CAGAGAAAT TTGCTGTGTT CCGTGTGCT GACCTATG  
6181 GTAGATCTCC TACTGCTCTT CTCTCCGCT GCGCGCGGCA TACTGGGCT GGTGCTGTG  
6241 TTTATTTCAA GCACTCAAG TGTAACTAAT TGCGCTAAT GGCATTGCT CATGTGTGA  
6301 AAACAACTA TTGTGTGATA TACTTATTA ACTCAGAAAT TTGGCCAACTA ATTAAGCAAT  
6361 CTTCCTCCGT GCGCTCTGTT GTACATTTG GCGCAGGCA GGTAAAGATA CACACAGTGC  
6421 GGTGTGTGTA CGGGAGTGT GAGCTTGTG TGTGTGATTT TACGTGCTGT GTGGAGTGG  
6481 GCGATTAAC ACTGCTGAG CTCTGTGTTG CTATGATG CTGCTACG GTGTGTGCT  
6541 GCGCGCTGCT TACTGATG CACTGTGTT GCGCGCGGCA TACTGGGCT GGTGCTGTG  
6601 CTTCACTGAC TTGCTCTGAC ACTGTACCCA ACATCAAGT TGCGCGCTTG GTGTGGTGT  
6661 AGTTGGCGTG TTGGTTFCCC ATTCACCGC AGCAGCAGC CACCGGCACT TTACGCGCGC  
6721 GACATCATG AGCGCACCAA ATTTGGCTTC CGGTATGGTG TCGCCAGAGT CCGTAGCTG  
6781 GAGCGCGCGG GCAACAAAT GATGTCTGT CAGCATCAT GTTCTGTGA CCGCGCGCAG  
6841 GTTGATCTCG CCGTGAAGG CCGACCGTGC AGCGCGAGT GCACTACTAT CAGTACTCTT

## 【図 1 5 C】

FIG. 15C

6901 TCTCCACCAC AACTATACAA ACTCTCTCTT TGTCTTTTGT ATTGAGTTTG CATGACTACT  
6961 AACTATATGA ATCCAGCTAA GACCTCGAGT GTGTGCTCGC AGGAGGCTGT TGAGTACTAC  
7021 GAGAAACAG TTGACAGAGC ACAAGTACTG ATGTGTCAAA CTCTGGAGGC CGAGAGACCG  
7081 CTGATGTTTG ATGATAGCA GCAATACGCA GCAATACGCG ACAGAGACG CATGAGTCTG  
7141 GACGAGGATG TTGACGCGAC AAGCTCGGTG AATCCCCCGG TGCGCAGGCT TGCTGTGGT  
7201 AACTGTAGCT TGAATGATGT TAGCTGTGCT ACTCTTGGC GCGAATCTGC TGAATGCTG  
7261 CAAATGTCTA TCAAAITTTT AGTTCAGGCG GCTTCAAGCT TTGTCCACC AGTGGCCAAG  
7321 CACGCGACG GTGATCTGGG TGTGTGTGAG CTGTGCGCA GTGTGATGCG CACGACACCA  
7381 ATCAAGTTTG AGGTGGGCGC AGTACCAAT CATGATATTA TCCGAGAGGA GTGTCAACT  
7441 GTTCACTGAT GTGATGCTT GGTGGGCTG CAGGCTGCTG TTTGCGGCG CATGAGTCTG  
7501 CAGCTTTTAA TCAAGATTTT GACTATGATA CAGACTCACT ACATCTAGAA ACAGAGACTA  
7561 GAAGAGGACA CAGAAGTAA TGTCAITTTG GCGTACCCA CACGCGGCGC AAGCAAACTC  
7621 ATCACATTA CAGCAGGTGA TCGATCACTT GCGATTTGTC ACCCTGTGCA AGCCCTACTT  
7681 AGGGCCCTCG TTCTAAAGTA CCGGTTACCT TCGTGGAGAT GCGTGTAGTG CACGCGGCC  
7741 TTTGGTGAG AGTGTGAGT CAGAGTGTGC AATGCGATCA CACTATAGA ACATGATGAT  
7801 CACTCTACA GTTGTGTCG ACCAGTTGTG GCACACAA CCGCACTTT GCTGCAAGC  
7861 CCGACGTGTC TCGCAATTTT AGCGCGAGC AATGCGGCG TTTACACCA AAGCGGCTGT  
7921 CAGCTCTCG AGCGCGAGC CAGGTGCA ATGATGCAA ACTCAGCCAA GGTGTATGAC  
7981 TGTTCGAG ACACATACAA TTGCTGCTT GCTAAGGCAA AGACTCTGAG ACAATCTGCG  
8041 ATGTCAATG AGGATGGTGT GTCAAAGATG GCGCAACCA CACGCGTCCG CAAATACAA  
8101 GCAATCACT ATTCAAGATT GGTCTGTGGA CCGCGAARAC CTGCGTGA GAATTTGTA  
8161 ATCAATGCG GCGCGAGT GTACAGCTT CCGATGCGA TTACCCCAA ACTGAGCA  
8221 TCTCTTCAG CCAAAACAC ACAGAGGACA CAGTGTAGCA TCGTTTCCC TGGTGTGCGC  
8281 GCGCGAGTC GGGAGAAAT GATCTGGGT GATCTGGG CCGCATACCA GCAATGCTA  
8341 GGTGATGCTT ACGGTTTTC CACTCGCGC CATGAGCGG CCGGCTGATG GCGATGCTG  
8401 TGGAAACCG CACCGAGCG ACAAGCTACT AGGCTGTATG CAGCTGCTT TGAATGAC  
8461 ATCAGGCGAC AGGACATGGA TGGTAGGCT AAGATGTGG CTGAGCGCA TACGCACTCT  
8521 GAGGTGTCTT AGGCTATATA TAATATTAC AAAGAGGAC CCACTGTGTA CATCAGGCG  
8581 AATGTTGTC GATGTGATG CTGTGATCT TACTGTAGC GTTCAAGCA CTGAGTGTAG  
8641 ACCTTACTT GCTACTTAA GGTTCGTGCA GCTTCAGCG GCTCGGCTT TAAACCACT  
8701 GCTTACTAA TCAATGGAAG TGACACCTCT ATGCTCAGC AAGCTGGCG TCAAGAGCT  
8761 CTGATGAGT TCAAGAACCG ACTTGATGAC CAGCTGATC AGGAGGCTG CAGGCTGCT  
8821 GGGGACCTCT GCTCATGGA GTGCTGTAG CAGCTGTGG ACAGGCTTTC CTTCGCGGGA  
8881 GTATGCTCT GATGTCTT GCGCAAGCT CAGCTGCGA TTGACAGCT TATGAGCT  
8941 AAGGCGATC CAGTGGTAC ACTGSGAGC TACTTGTGA TGTATCCCA TGGGCGCTG  
9001 ACTGTCTAG TCTATFGCC CCGTGTGTG ATGCTATAC GAATGAGCC ATACAGAGC  
9061 GGGACACTTG TGACGCTGAC GGTCCAGGT CAGCATGTGA GTGCGCAG GTGGCTGCT  
9121 CCAACCTATA TTGCAAAAT ACATGCTGCT AAGCATGTG AGGAGGCTG TCAAGTGTGA  
9181 GCTTCACTG CGGAATGCTT ATCAGGCTTG GCTCTTTTGT GATGAGAGG GTTAAATGCG  
9241 TGAAGTGGG GAGCGGTGCT CATAGGCTG GCAATGTGTA ACTGAGGAG GTGGTGGG  
9301 AATTTGCTG AGTGTACTT GTGTCTGCG GAGTGTGCG GAGTGTGCG CACCAAGC GAGGAGTAC  
9361 GGTCTGTGCT TTTTGGCGC GGAATGTGG GAGTCTGCT ACGAAATTT GCACTTGTG  
9421 ACAGTGCAG CAACTGTGG TGCTAGTCTT TATGTTT GTTGGTTC TAGTGTCTA  
9481 CTGCTCTCG TTTGCTTGA AATCTTAAT ACTATGTA CAGAGTAC AAGGAGGAG  
9541 GATGAGTCA CTGTACCCAC GCGTGGCTGA CCGCGGGCT TGACGACCC CCGTATCGA  
9601 GTTGGGAGG ATACATCAC GGGTGTGAG ACCCGGCCG CCGAGTCCG GGTAGGCG  
9661 AGCGGCTAG CAGTGTGCT GAGTGTGCT GCACTCTCC CCGAGTCCG CCGAGGAG  
9721 GCGTCTGCT GCGGAGGACC GTAAACATAC GTGCTGAGG TGGGACCTG ACATGCTG  
9781 TTAACCACTT AATGTCGTA ACTGACCCG GGTCCCGGCT ATCTAGGCG GACACCGGCA  
9841 TGAAGGGGGT CACGCGGCC TTTTACT

## 【図 16 A】

FIG. 16A

ヒトベギウイルス 2 (ABT007Op) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR 配列

5' UTR 配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 1-327

Sタンパク質および遺伝子配列

Sタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 314)

MGCGTDCGTTCGTVVEADYVITGDCORALNGSRGGGCGCPDRQVAGRVRLCAFLALGGCHGSRCHNEGRISQQ

Sタンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 328-564

E1タンパク質および遺伝子配列

E1タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 315)

TLGGQRACVCGUGPAFFGQVCGQDINRCLRNCTTPEKLCVCTGQDTHPVCVDYAGQGVRRPFRHJESLSEVLRLIGTANGLLEALQ  
NEETIAYFLAFPIFAYGSGIPTLVCVCFENHIGFYZFLGPTTAPUTALRLQLLQAQNFVCFLLYSTKLLLESGRTVAIVAILNS  
PIYMA

E1タンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 565-1137

E2タンパク質および遺伝子配列

E1タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 316)

YKHAQAGYKYCTCTCTASTAMICDCPQGFQKTESSGFPIFPFCPEKLISDFWICSGSAGWFAHICRPFQVGMPPAPISALCYIYSLHP  
PERYRNITCTPQUCYIETADPTIACRCKAGIATACILDRSGFCGCTGGCFYTHGSHRQKDPGCTDPRGLTEPVQLQIIRPIIAITTE  
LWAGGLVADGLGAGGCAKATVYKESGKPLERFQGLQGRVYAFAGVYFELCLIKVQKAGGRTGIDLELQVLTVEITFLAFCTH  
PTGQVRVQINITAEYPRGGGFWLLGQVQLTRITSLKSLTLCTLLLLVCVVGASGFPLGIIFFNSVRRVYA

E2タンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 1138-2199

Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 317)

SCYISGDAVCHDAFCFTGGTCATFNIVLCTPYAARISGCGHAYPPFRDGRVFAAMSKASTRTGCTFWKTFQVTPVCRNHSIDTYCGR  
PQFFDRTGCTYKVPFLRMGLDYITPIJGIRIMLAGHITDGLFFRATAALRFGTSVTLTGVAFTLYTLSPVDAARVPLASAMIRIT  
LSPTFYHMTPLVPCVCLNLTGQVPRAGTAMPAATKLRSALAPVLAHQGC

Xタンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 2200-2910

## 【図 16 C】

FIG. 16C

NS5Aタンパク質および遺伝子配列

NS5Aタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 322)

VVSGIYFLLCIRAVKQVDAADVPRFRVPHIGCSFAKCRKXLGTGTLTTCGGGSEVCLGCLCTSDPTLSYQWKKCCSYGVFFHPTTTA  
TOTLAPDCDAITKLFRCYGVNIVELEPSRQIMHVCAGGCCDRACVAGANVAPPTADGIPITGPPQGYVKLGLCSFQVCMCTILHLEBK  
TLGVCQGEAVLELKEIVRAQVAVQVQLSARAKAFQAVQKREAIHLEVYTLAELVLAATTSVRPFAKAAAGCSLELTVQVLTVLEHLGQGC  
QHAICFVVAAGRVFPVPRFTRVSGVIRVRKCTATPTTFKFAAAVPTHDIETPRCHIVTACTGCHQALVTPKGTCTQILKHI TQKHK  
YTPQRTAKDRTVETICAVPTFRASKLTFRAGDSVSCDHPLATFTRALCLKVGTFGGSSCLGFLADDAVCGVCTVETTFPC

NS5Aタンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 6424-7797

NS5Bタンパク質および遺伝子配列

NS5Bタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 323)

HQGYKRFKFPVAPFPPPLPATHVAGLLRADTSHVYTTTAVDVSEPKAKVTDQCSKAVQCFRPUCTDCCAKAKIFPQGGCEYEAQKINHA  
UTTRONHUGTYGDLVSGRAVYVQVQVIRAGVYDAHRCIIRVEVFPKDKTRKPPREIVFEGDAARVAENHILADPGALTEHWLDAYG  
FATPFHEARLLEQAKIRATSPQIAVADACPDCTTADNRDEAHIVAAATCCDPFGWGLDVIYVRGPHCDTQAVVGVGCCRASGLTITGS  
GHTLCYKVPACATGSGKIPGLGADGTLVTERKAGLDEPHLDVDFEHWYQASDGLSIEQDAVQVCLRGQWRVILPQAR  
KALASVLEKSGPLGICSTQVWYVPAVTVYVLLPLLCILRIPSPQGTLLVLYAGIGCVYBAALLPTILMLHGRKAAQVHSCAANA  
ELGALAFVGRGLGILKRRRRRAIRACHIKGGWMAIFAGLACFPVRTQPEPFGCLLPEELWERPYENHLEMTIDNRGATRLPWCVA  
SAIALLCLL

NS5Bタンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 7798-9498

3' UTR 配列

3' UTR コンセンサス配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 9499-9867

## 【図 16 B】

FIG. 16B

NS2タンパク質および遺伝子配列

NS2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 318)

RFRGVFGLVEADISGLVSEPTGCTSNYHSCVTFKCAVFAFZSPGROVKLOIVRYKAGAYARLLAVGGFLSRSEPRFASVGV/LWAGAGML  
VRECCGSLGVTILCALVDTCTGKWCACGAGGPARILACDADHAPRIGDIRALRAVLRCFSGRGTQYKIHMQVQSERVAQVRR7GGCLSP  
VYLEPCFVEYVDTHILVCCQLLGGKPVVAROOTRVLVCHLMTEDCLPGQQLS

NS2タンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 2911-3630

NS3タンパク質および遺伝子配列

NS3タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 319)

APVVTYKESIGTWPPEKATLIGRJETFRSGQIVVLSLCSRMTAVNHTLYACCHGASARGLATCAGLTFPLYTALCEDVAYSCLNHSLS  
EDCCGCPGRVTVYNIHGGVCGEVEDDVCLDCFTTHDQLRGAAGSPVCDHSHAYALMLGGYSTGGICARVRVCFWQUNZYSGSGGGGQSYQR  
PAYTPTTG6ITYTAEPTGGGKCTKYEVDCVKGHREVLVLLCSVAVVEGNAPYIKERYKLEBIRACTGPGGVTVCTGBLAINTYGRFLVDEET  
HILGZAVVVCDECHITSGDTTLLGICAVRVHAREAGVTVFATATPACIQVQHEHIDEVLLIDTODVSEYCAKELHDIRTCRPHVFCQXZ  
KALDELQQLGGLQIRANFENKAGDLESPAGZGVTVVVDLGLTGYTHGFQVYDCCCTVGGVTTIDMDETFESGRVYPTALRLWRGRGT  
GGRGSAVYTTTSCDAPCTG7PDDLVAGVQVDSHMFVWKAHRSGLALVHLEGLCTPCTCDDHPTPRVNETLRVLEPRVETTLALAGSQ  
PLLYGQLICRKEPRAGPDUGLKFVCLLEHHHCTFLYALHKTFLKPTQLCLLRAGALSSTVFPVT

NS3タンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 3631-5514

NS4Aタンパク質および遺伝子配列

NS4Aタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 320)

GVGDTLLAGAAALAGFAFAGATCALVPGAVGVYELIAGVT

NS4Aタンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 5515-5637

NS4Bタンパク質および遺伝子配列

NS4Bタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 321)

RFDGCDFTAAVAGRLYQACACSCILASLQQTASALSLPADASGAGSQVLAAPFSPAPLHVQLTEHFSQACFLLCAGCCDAGCCCTAL  
ACLVGCGATACGGGAHWMLAICTKVLQGTGPRGHVAGLVLAGCCGCTGCLDPLFCGLTGEWVYCAVATCQKILGCGAGATTINLIDPL  
ALFPGAGAGVGVLFILHNSGVTHNRUNLISHAKQITCEIYZTEKPGQQLKLRSPVHNAQRESYTCCG

NS4Bタンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 5638-6423

## 【図 17 A】

FIG. 17A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0029A) 核酸配列—配列番号 301

1 AACGTGTGTT GTAGCAATGG GCATATTTGT ACTTCGGTAC GCCAATTGG TAGGGGCCCC  
61 GACGACGGGC CGCGCAAGGG CTTAGTAGGA CCGCTGCACAA TGCACATGAG GATCATAGCA  
121 CTGGGGGTAG CGGAGGAGAG ACCGAAATGG GGTCAACTGG ACTCCAGG CGACCACTGG  
181 GCTTGGTCTT TCATGGAGGG CATGCCACGG GGAACGCTGA TCGTGCAGAA GGATGGGCTCC  
241 CTGCACTGGT GCCATGGCGG GCACCACTCC GTACAGCTGG ATAGGGGTGG GGGGGGGCCC  
301 CCGACGTGGA CGTCGGTGGA GCGCAACATG GGGTGTTCAA CTGATCAAA CATTGTCTTC  
361 CCACTCGTGG GGGCCGACTA TAATACCTCC TCGGGCTGCC GGGGCTTAAA TGGGAGTTAC  
421 CACTGCGGTG GTGGCTTTTG CCGTGCACCA AGCTGTGTGG AGGCTGGAG ACGAGTCTTG  
481 CAGCTGTGGT CACTCTTGG CCGTAATGGA TCGGATANG GTTGSAVGG GTCCAAACT  
541 GAAGGGGCGA TTGATCGAGS GCAAAATTTG CAGTCTCAGG CGCATGTTTG GACTGGTGA  
601 GTTTCGCTTT TCTTTTCTAA CTGTTGCAAT CAATCTGATA TCAAGTGTTG TTTCGACCGT  
661 TGGTGTGGA CAAGACCTGG CTGTTTGGTG TGCACGGGCA ATGCCACTCA TCTCTCTCG  
721 TGGGACTATC TGGGTCGCG CGTAAGTCGG CGCCTGCTCC GTCGAATGG TGAAGGAGCT  
781 GAATGCTTTC TTGCTGTGAT CGGCGCTGCA GCGTGGCTTG GGCCTGTAG TGAAGCTCTT  
841 GGTATGCTAT GCTCATGCG ACCTATCTCT TCGTTGGGTT TTATTTGGTG GTATGGGCTG  
901 GGTATACCTA AGACMTTGGT GTGCGAGCTC TGCCCTGCGS TAAACMTTTC TCGCTATAGC  
961 TTCTTATCTC CAGATACTAT CGCATTTTGG ACGTGGATAC TACAACCTAC TGGGCTTTTG  
1021 TGGCAGATGT TTGCAACTT CCGTATACT TACAGCACTT GGACTTTTIG GTGTGTCCTC  
1081 AGCGGCAAGA CTGTGCTGTG GACAGCGATC CTTCCTGCTA GTCTACGGT TATGGGCTAC  
1141 AGGACATAT CAGCAAGCTA CCGCAATAC TGTACATATA CCAATGTTC ACATGCTATC  
1201 ACTGTGACT CGCCCTTGG AACCTTACT CGCAATGGA AGCTCTGTTT CCGTATACCT  
1261 AGATTCTGTC TCGTTAAAT TAAAGACTCT ACMTTACT GTCTACGGG GTGCTGGGTG  
1321 TGGTITGGGG AGAACATCAC GCGTCGATC WCRGACGTTG GCRGGCACCC AGCACCGACT  
1381 TCYGCTTTGT GCTATATCTA TCCAAACAA GACCCACCTC CTTGGTATCA TAACACACT  
1441 ATCATACCTC AGAATTTGCG CAACCTACG GTKATCTTA CCACARCTCC ATGCGGTGAC  
1501 AAGTGGGGTA ATGCAACTGC TTGTTTCTT GACCGCGKTC CGCGGTCTTG CGGGGAGTGC  
1561 TAGGGGGT GTTCTATAC TAAVGTACT CATATGAT CATGGGATC CTTGGGATG ATGTGGAT  
1621 GGTATCGGTG ATGCACTCAT AGAATTGATG CAGTCTGGTV AGAATGAC TACACTTSS  
1681 AATACGACCA TTGAGCTCTT CGWGGCGGCC TCGTITGTGA TCGCATCCGG TCTTCGGGCT  
1741 GGGTITGGTT CGAGCGGAGC GCATGGCGTG GTGCACTGCT ATAGGTGCTC TTCACTCGCT  
1801 GACCTTGAAC AGTTTGGTCC TGGGCTTGGG AATGGGTGG CATGCGCGCG GAGAGCTGTC  
1861 CGGAGCTGT GTATCAACCC TCGTGGGGG AGCGCGGGCT TCGGATGRC TAAADAAGCT  
1921 CTGAGCTTCC TAGAGACTT GPTTAGAGAC ATTCTCTAG CCGTTTTTG TAATCGGACG  
1981 CTTGGCGGTG TACGTGTGTG TAACAATACC GCTTCTATC CAGAGGAGAG CGGTTTTGCG  
2041 CAGCTCATCG GGGACGCTCA GGTGCTAAC CCTAACCTG CATCTTTACA CTCTCGGCTG  
2101 ACTTTGATAT CTTCTATCTT GTTGGTGTG GTTGTCTCTG GTGCGGGAAT CGGTCCACTA  
2161 ATATCATAT TTTTCTGAG CGCGCGCCAY GTATATGCTT CTGTGTTACT AAGTGHGAT  
2221 TGGGCTGCTT GCAACATGCT GTTGTGTTTC ACATCTGGTA CTGTGCTAC TTGCAATGAC  
2281 GTCTTCTGTC TGGCGGTTGC AAGCCACTA TCGTCTGTG GGCACCTGCT ACCGCGGACG  
2341 GACCGYGGTT GGGAGGTGGT TGGCGGGA TGTCGGGATG TTTGCGGAG TACTGGCTTG  
2401 ACGTCTGATG TCTTCTCTT CACCGAGTAC TTCCCTACTG TGGCTGGCAA TACACTGAT  
2461 ATTATCTACT GTGGGAAACC KACCTCTTT GGGGACATCA CGGCAITTA TGGGCTTAC  
2521 TTTTGGCTCG GCGGTGTGCT CTGTACTTGG ACTCCTCTCC TGGGTTTTAG GTTATGCTT  
2581 GCTGGCTTGA ATATAGATGG CTGTGCTTCC ATACGGCTG CCACGGCTGC ACGAGGCTC  
2641 TCGACTTGG GTGCAACTT GAGGTGCTA TCGCTTTG TACCTGAT ATATGCTAC  
2701 CCGTTAAAG CTGCGCTCAA TAGAATGTTT VTAGCATCTG CAACCTTAGA GATGATCTA  
2761 TCCITTGATA CCTATCACGA GACTGTTCTT TACATCTTTT GTCAATTCCT CTACCTCCAG  
2821 GTGTCGCCCC GTGCGGGCTT GGGCGCTATG GTGGCCATCA AGCATATCTG GGGCTGCTA  
2881 TTGCGCTTGG TGTTCGCGCA AGGCGTGTGC CGACTCGGG GGGGTTTGG TCTTGGAGT  
2941 TGGCGGAGC TCTCTGCTT GGTGAGTGT ACTGGCACT GCACTGGTA CATGCTGTC  
3001 ATCTTCTCTCT GCGGTGGCG AGCTTTTGGC TCGCGAGTC CACTTGGAG ACAGTATAG  
3061 CTTCAAGTCT ACCGCTACTG GGCACAGGCT TATGCCAGC TACCTCGC GTCTGGTTGT  
3121 GTGCTCTCTG GACGAGAGTT CCAATTTCCG GCAAGCGTGG CGGCGTTTTG GTGTGGTGTG  
3181 TGCATGCTCT GGCCCGGTGA GTGCTCTGAA ATCACTTTGG TCTGCTCTCT GTGCTCTCTG  
3241 TCGGTGGACA CCGATAGCAC ATGGCTAGTA CGGTCGTGT CCGCAGGCC GAGTGGCGGC  
3301 GCCCTTGCAA CGCTGGCGCA CGCATGGTG CGATCGGGT ACACCGGGC

## 【図 17 B】

FIG. 17B

3361 GTGTGGCTT GTTGTGGATC ACGTGGCACA TACATATACA ACCACATGGG CCAGGTCTCA  
3421 GAAGGGGTGG GTTGGAGTTC CAGAGGATCTC GGGGCTTGGCT TGGAGACGCT CGTGTGGAG  
3461 GAAGCCACCT TTACTGAGGT CGTGATGATG ACAATGAGTA AGAATGTGG ACAATTGCTT  
3541 GGTGGTAAAC CCGTGGTGGC CCGCTGGGCG ACGGTGTGCT TGGTGGGACA CTCTCAACCTT  
3601 GAAGATCTGC CAGCTGTGCT CCAGCTAGGT GCTCCGGTGG TTAATACCAA ACCAAGCATC  
3661 GGTAGTGGT OCTTCTCTAA GGCACACACTC ACAGGGCGCG CTGAAGACCC CGGATCCGGC  
3721 CAGATGTGG TGTGTGTTCT CCGACAGGTT CGGTGAGTGG GTACTGACGT GARTGGACAA  
3761 CTGTATGGCA CGGGCATGG TGTGTGGTGA DSGGGCGTAG CCAAGTGTGC TGGTGTGAGG  
3841 ACGGCTCTCT ACGGSGGATT ATCTGATGAT GTGGTGGGCT ACTCTTGCGT TCGGGGCAAG  
3901 AGTTCCCTAG AGCCCTGGCC CTGTTGCGCG AGCCGGGTTT GGGTATGAA CACAATGGAA  
3961 GGGTGGTGT GTGGCAGAGT GGAGATGAA GAGCTCTGTT TGGAGTGTCC CACGACACA  
4021 GATCAACTGC GGGGTGGCTT CGGTTTACCG GTTTTGTGTG ATCAGCGTCA TGCTATCGCG  
4061 TTGATGCTCG GTGGTTACTT TACCAAGTGT ATTGTGTCGG GTGTCCGGAT AGTCCGGCCA  
4141 TGGTAGAGCG CTATTGCTCT CTGAGGGGCG CAGCGCGGGA TCGAGCGGCC ACTGTGAGA  
4201 CCAACATATC CTGAATACAC CTACTACGCC CCTACVGGTT CTGGTAACTG ACAAATAAT  
4261 CCACTGGACC TAGTCAAGCA GGGACACAAAG GTATTGGTCA TCAATCAAG TGTGCTGTCT  
4321 GTCAAGAGTA AGGCCCTTCC CTGATAGGAG ACATATAAGA TTAGACTGTA AATTAGAGCT  
4381 GGCACAGGGC CTGACGGTGT GACGGTTATC ACTTGGGAGA ACTTGGCGTA CATGACCTAC  
4441 GCGCTCTTC TCGTGGATCC TCGGAGGATC CTGCGGGGTT ATGCCGTGTG CATTTGGGAC  
4501 GAGTGGCAG ACACATGATC TACACAGCTA CTGGTATG GCGGAGTGG CATGATGCC  
4561 GAGAAGCTCG GAGTGAAGAC GTTGTGATTC GCCACAGCCA CTCCTGTGCG CATTCAGTA  
4621 CAGCCACATC AGCAATTTGA TAACATTTGA TGTGCTGAGC ATGTATCTTT TTGCCACTCG  
4681 GGGGCCAAAA TCAAAATTTGA TAACATTTGA CTGCTGAGC ATGTATCTTT TTGCCACTCG  
4741 AAGGCGAGGT GTGCGGAGCT AAGCGACGAC CTCTCCGGCC TTGTTGTGCG TGCAGTGA  
4801 TTITGGCAG GTGTGATCT CAAACACATC CCGGCTGAC ACTCTGATG CATTTGGGAC  
4861 ACTGTGATC TGTCCAGGG CTACACAGG AACCTTGATC CGGTATGGA CTGGGGTGT  
4921 TGGCTAGAGC AACTGTGAC AATTGACATG GATCCACGT TCTCCATCT AGCCCGAGTG  
4981 GTGCCATGTA CTGCTGATT GGGTATGAG CCGCGGGAG GTACTGTGC CGGCAAGAG  
5041 GGGGCGTACT AGCAACACC TCCAGGAGCA GCACCTGTG TCGCGTTCC CGACGCTAAC  
5101 GTCTGGCAAG CAGTGAAGC CGCAGTGGT TTTATGATT GGAAGCGCG CAGGATACAG  
5161 CAGTGGCTGG CAGCATACA TGAATTTAGG TGATGACAC GCGTCACTG TGAATCAAG  
5221 ACTCCAGTGC GGGTATGAG CACATGAGG GCGATGAGT GCGAGCTGA CAGTGGTGT  
5281 GCGGCTCTCG CAGGAGAGCA GGGGCGGCTG CTTATAGGTT TGCAGTTGTG CATCTGCAAG  
5341 GAGACTGAGG CCACAGCTCC AGACGATGTC ACTCAAGTGA AGTGGTTACT CACAACAAT  
5401 AAYAAAAAC CCGTCTGTGA TGCTTTAGAC AATCTACAG TGGAAATCAC TACCACAAT  
5461 GACTTGCATC CGCGTATPAG CGGCGCTTTA TCGAGCACAG TGTCTGTGGA GACAGGCTAC  
5521 GCGCGAGTCC TCGTGGTGGC CTGCTGATGG TGATGACAC GCGTCACTG TGAATCAAG  
5581 GAGGCTTAG TCGGCTCGGC CGTTTGAGGC GTTATAGAG GGGTGGCTCG COTGACCGGT  
5641 CCGGACGCGA GAGGACAGCA CGCGGCTAC GCGACGCGCT TGTACCAAG CTGCGGAGAT  
5701 TCGAGACTTC TGCGCAGTCT GCGAGGGAGC GCGAGTGGCG CGTGAAGCA ATGCGCGAT  
5761 CCGAGTAGGG GTGCTAGTCA ATATCTGACA AGCGGCGCTC COTCGCGCCG CCGCTTGGTA  
5821 CAGGTGTGCG AGTTCCTGTA GACCAACTTT AGCTCATCGC CATCTCTGCG TCTGCTTCC  
5881 GTGTGTTGCT AGGCTGGGGA GTGCTCTACA GCGTGTCCG GTTGTGTCG CAGGCTTACG  
5941 CGTGGTTGG GAGGAGCCCA TTAGTGGTGT TTAGCCATTT CAGGAGACTTG CTGATTTAGT  
6001 CTGAGACAG GGGCGCGTGG CCGCATGGT GGGGCGGCTCT CGGTCTGCG AGGCTGTTGG  
6061 ATCGGTAGTG TCACTGGGCT TGACTCTCTG TTTGGGTGCG TTACAGTTTG GAGGCGCGTG  
6121 GTTGGTGGTG GGGTGTGAGC ACAGAAAAATC TTGTCTGGTT CCGCTGATAT GACCACCTCG  
6181 TTAGATCTCT TACCTGTGTT TTCTTCCCGT GGGCGCGCG TACTGGCAT COTGCTTGC  
6241 TTATTTCTTA AGACTACAA TGTAACTAGC TCGCTGATCA GCGTATGAT CATTGTTAGA  
6301 AAACAACCA TTTGTGACAA CTACTCTTTA TCTGACAAAT TTGCGCAACA ATTAAGTAAA  
6361 CTTTCTTGT GTGGCACTCT GTATGTTGG GCGGAGGCAC GTGAGGGATA CACACAGTGT  
6421 GGTGTGGTGC GCGGAGTCTG GAGCTTTGTG TGTGTGATTC TACGCGCTGT GTGGAGTTGG  
6481 GCGGCTAAAC ATGTGCCACG GTTCCGTGTG CCGATGATGG GCTGCTCAC TGGTGGTGG  
6541 GGGGCTGGC TTGGTACTGG CAGCTTGTTG ACCACTTGGG GGTGTGGGGA ACGTGTGTCT  
6601 CTGAGTGGT GTTGTGAGC TGTGATGACA TTCTCAGAG TGGGTGGTGT GTGGCGGT  
6661 AGTTGGAGCG TTGGGTTCCC ATTCAACCCG ACTACAGAC CACCGGCGAC TTTCAGGCTC  
6721 GACATTAGCG ACGCCACTAG ATTGGGTTTC CGGTATGGCA TTGCGGAGAT COTGAGCGTG  
6781 GAGCTGGGG GAGCAAAATG GCAAGCTGTG GACAGTATCAT GTTGGTTGGA CCGAGCTAGT  
6841 GTTGATCCG CTGTGAAGGC CCGACCGGTC ACAGCAATG GTATACCTAT CAGTACTT

## 【図 17 C】

FIG. 17C

6901 TCTCCACCAC AAACCTACAG CCTCTCTCTC TGTCTTTTGT ATTCAGTTTG CATGCTACT  
6961 AATCTATGTA ACCGACGCCA GACCTGAGT GTGTGCTCAC AGAGGGCGGT TGAAGCTGCT  
7021 GAAGAAACAG TTGACACGGC ACAATGATG ATGTGTGCAA ATCTGGAGGC GCGAAGAGCT  
7081 GCGGAATATG ATGATGGCA AGTTCCGCCAC GCGATCCGGG AGCAGTACAC GCGTTTGGCA  
7141 GACGAGGATG TTGACACGAC AAGCTCGGTG AAACCCCGCG CGCGCGAGGC TGCTGTGGAT  
7201 AGCTAACTGT TGGAGATGTT TAGCGTGTCT ACTCTTTTGG GCGAGCTCGG CGAACCAATG  
7261 CAAATATGTA CCAATTTGTT AGTCAAGGCG GTTCTAGGCG TTGTGCGAGC TGTGCGGAGA  
7321 CCGGCAADGG CGCTTTCGGG CGTGTGGAG COTCTGGGGA TGTGCAATGG CAGCGACAA  
7381 ATCAAGTTTG AGGCCACCGC AGTACCAATT CATACATATA TCCACAGAGA GTGTCAATC  
7441 GTGCTACGCT GTACTGGCTG TAACGACACG GCCTTGACTG TTGCGTACGG CACTTGGACT  
7501 CAGCTTTTAA TTAGACATTT GACCAACAAA CACACACACT ATATCTGAAA ACAGAGAGTA  
7561 GAGAGAGACA CAGAGGTATG TGTCAATTGG GCGTACCAA CAAAGCGGCG AAGTAAATCT  
7621 ATGACTTTCA GAGCAGGTGA TGAATGATC TCAITGTGCC ACCCTTACA AACTCTTACT  
7681 AGGCGCTTGC TTCTAAGTA CCGGTTACTT ATCCGAGCTG GGTCCGACTG CAGCGAGGCC  
7741 CTGTTGGAGC AGCCCCAGT CTGTGACGTC AATGAGTGA CAACTATGA ACCATGCACT  
7801 CAATCTACA GTTGGTTCOG ACCAATTTGT GCACCTACAA CCGCACCTTT ACCGTAAAC  
7861 CCGAGCGTGG CTGGGATTTT ACGGCGAGAC ACATGCGGUG TTACACCCAC AAGGCGGCTC  
7921 GAGCTCTCG AGCGGCACTG TAAGGTACA ATGTGATCAA CACTAGCCAA GGTGAGCCAG  
7981 TGTTCCTGT ACATATCAA CTGTTGCTT GGTAAAGCAA AACTCTTCA AACTCTTGG  
8041 ATGTCAATAG AGGATGCTGT GTCAAAAATG CCGGCAACAA CCGCGACTGA CCGTAACT  
8101 GGCATCACT ATTCAGATT GTGCTTGGG CCGGCAAAAC CTGCGTTTCA AAAAATGTA  
8161 GATCAAAATG GTGCTGAGAT GTACGAGCTT CCAATGAGTA TTAACCTTCA AACTGAAGTG  
8221 TTCCCGCCGAG CAAAGTCAAC ACGGAGCCCA CCGCGGTTCA TCGTTTTTCC TGGGTGGGCG  
8281 GCGCAGTGC CCGGAAAAAT GATCTTGGCG CATCTTGGG CATCAACCAA GCGAGTGTG  
8341 GCGTATGCT CAGCTGTTTC GATCTCGCGC CATCAAGCGG CCGGCTTCTG GCGAGTATG  
8401 TGGAACTGTG CACGAGAGCC CAAAGCTATC GCGTGTGATG CCGTCTGCTT TGAATGACCT  
8461 ATCAGACGAG AGGACATGGA TCGCGAGGCC AACATCTGCG CACTGGGCGA TCTGAGCACT  
8521 GAAGGTGTTT ACGGCGTATA CAATTATTAC AAAAGAGGCC CCGTGTGTA TATCAGAGGA  
8581 AATGTTGTG GAGTGGCTTG CTGTAGAGCC TCAGGTACCG TACAAACAA CAGTGGGAGT  
8641 ACGCTTACTT GCTACCTCAA GGTGTGTGCA GCTTGGACG GCGCGGCGAT TAAGCAACT  
8701 GCGTGTGTA TCGAGGGA TGAATGCTG ATCTGACAG AAGTGTGCG TGAAGAGAT  
8761 CTGATGAT TCGAGATGCT ACTTAATGAC TACGGTTCCT CTCACACTTC ACGAGCTCT  
8821 GGGGACCTCT GGTGAGTTGA GTGCTGTAGC GCACGTGTGG ACAGGTTTG CTTCCGGGGA  
8881 GGTATGGCTG GATGCTCGT GCGCAAGCT CCGAGTGGGA TTGACAGGAG GTTGAAGGGA  
8941 AAGGCGGATC CACTGGGTGT CATCAGCAGC TATATTGTA TGTATGCTAC TGGGCGCGTG  
9001 ACTGTTACG TGTATTGCG CCGTGTGTGC COTGTTGTC GAATGAGCC ATGCGAGCG  
9061 GCGACACTG TCGAGGGA GGTGCTGCT ATCTGACAG AAGTGTGCG GTGGCTGCT  
9121 CCAACATCA TTTGTAATTT ACATGGCGCC GACCACTGCG AGGATGTTG TCACTGTGA  
9181 GCTTCCATGG GGGAGCTGTC ATCAGCGTGG GCGTCTTTTG GCAAGAGAGG GTTGAAGGAG  
9241 TGGAGGUGGA AGGCGCTG CACGAGAT GACATGATA AGTGGGKUG GTGAGATGUG  
9301 AATTTCGCGC AGATGTTACT GTGCTCAGC GAGGTGAGGA CACCAACACC CCGAGACAG  
9361 GGTGTGTGCT TCTTACAC GGAACATGAG GAGCTCCGT ACAGAAATTT GCACTTGAAC  
9421 ACGTGTGCTG TCGAGGGA GGTGCTGCT CCGTGGGCT CCGGCTGCT CAGTGTGTA  
9481 CTGCTTCTG TTTGCTGTA AATCTAAAT CAAATGATA CAGGAGCTAC AAGGCAAGAG  
9541 GTGAAGTCA GTTATCCAC GCGTGGGCTGA AAGCGGGCT TCGAGCGCCC CCGTATCGA  
9601 GTTGGGCAAG GTAACATCAC GGGTGTGAGC ACCCGGCGCT GAGGTGCGC GCGTAAAGCG  
9661 ACGGCGAAG CAGCTAGGCT GAGAGTCTGG GCAACTCTCC CCGTACCCAC CCGAGGCTAC  
9721 GCTTCTGCTT GCGGAGGACC GTTACATCAC GTGCTAGCG TGGGAGCTG ACCTATCTTG  
9781 TTAACATCA AATGTCGTA ACTGACCT CTTGCGGGGG ATTCAGGCC GGCACCGGA  
9841 TGAAGGGGGT CAGCGGCCCC TTTCATT

## 【図 18 A】

FIG. 18A

ヒトベギウス2 (ABT0029A) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR配列

5' UTR配列: 配列番号301のヌクレオチド1-327

Sタンパク質および遺伝子配列

Sタンパク質アミノ酸配列: (配列番号324)

NGSTQITCSFVGVADVITSGGCRALNGSYHCGGGCTGFSQVQVARRVLQCALLALISGHCISGTEGRIEISGQ

Sタンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド328-564

E1タンパク質および遺伝子配列

E1タンパク質アミノ酸配列: (配列番号326)

ILGSRQACWGRGEPFSGNCTQCDIMKLEHRCVTRPGCVCTGTHATHPCWXYLGSQVREPARRKBQAEVLLRLGAGAGLGLAEELG  
NDEIYAILCFGLAWGNGIERTLVCTGCAATVHSYSEFSTZAPFTGILQLGGLAQHVFHIFLXSTLWNLGGCKVAVIALLAS  
PTVNA

E1タンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド565-1137

E2タンパク質および遺伝子配列

E2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号326)

YKHQSGLYKVFITTHAGTAMCCDCPGTFTFRUPGRFSIPFPCPVKIKSGFTICGKSGWWEALHIFPYCVKXKPPAPISALCYIYSINSP  
FPNYLITITIPONCHIEVTVOPTKPCRGKSHATACILDRSREFCGCGYGGCFYITNGIDRSFDRGIGYVRDGLISXVOLGGXKHITITIE  
LLAGAGLVLAGLREFGCGRHISVVICRCPGRILGDFGGLGKGVLPGRFVELCLPCNWRSPFHGHIPLGLTGFVEDITLAFCH  
FTPRGVVCHITAFYFGGGGTVOLGDFCVLTHPTASLILTLILSLILVCGVGARGPLLIIFKASAREVYA

E2タンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド1138-2919

Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列: (配列番号327)

SCVLYGDAWVADPCPTGTCATPILDLVATHIGSGGAGVPPDRGGVEADHGVVIGTGTGLPFDVQPIQVPTTPTGHTDIIYCGE  
PTFPDCTIGYKGVFELQVLLVITPTLPPFHCACFIDGLFIRHATAARFCTGACLOVCGAFILYLOHPIAALHPLMAGLAEH  
LQFPVHIECVLPIPLVQLVQSTRAGLAAWVILKSGELPALVAGQC

Xタンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド2200-2910

## 【図 18 B】

FIG. 18B

NS2タンパク質および遺伝子配列

NS2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号328)

PFGPFGELVCPGMLHFEPIGUCYKWCIFSPYCAVFAITSPFGQVYFQIYRYKAQVYARILANVCSFLAREPHFASVGVKCSACM  
EPEKCEIISLALLILYDITLWACLGSFARALALQANVSRVDRHARLVPCRFSGCYIYHMGQVBERVAGVRLGSCLEP  
VULREPTTFPRVDTHGKTCQGLGGKPVAVRCGRATVGRHIFPLPPFQGLS

NS2タンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド2911-3630

NS3タンパク質および遺伝子配列

NS3タンパク質アミノ酸配列: (配列番号329)

AFVVIYKPSIGTWSEFAATLIGRAETPGGCTVVLGGSLIGRMOTAVXCTIYATGHCAGARALATCACTRLFTALSGDDVAYSCFPMHSG  
EPCRCGSRWVHKLHGGVGVHIEVWCLDEPTLIDLRAGSGCYLCHSIVAYALGGYFSGIIRHRTVRRPVHYSVSGGGGQDA  
DAVPTVYSIITYALEPCKGKGTVPVGLVPGGKHWLIIIPSVGVKMAVYIEYVIRFEIIRAGTREGVTVCTGHEILAHVITKRSGLDPT  
HLRGVAVICDECHTSCITLLIGAVHVAEAGVKTVPVACMPCICQVRPHI DEYLLDTPGDFGKATKILDIHIREHPIFHEH  
RCABELTQGLSGGVAVEFVSGDITETIPASDSIYVWATDALSTGYTHGFSYIDCCGCTGVTHDHPFESGARVPCCAALRPHORRGT  
GRHSHGATHTTETGPACVYSRHHMVAQVSGHVFQDARALQCLAHADGCTPHLDCPTVFWNHILRAHLPKPVITTAALAGZQ  
SLLVQVQVQIKVESHQDDXIKKCTLLIQCINZPLLVAIQUITLETFTGQDLPRFNAISCTVFEV

NS3タンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド3631-5514

NS4Aタンパク質および遺伝子配列

NS4Aタンパク質アミノ酸配列: (配列番号330)

GYSPILLAGAALAAFAFAGATGALVPSAVGVSVNGVAGVT

NS4Aタンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド5515-5637

NS4Bタンパク質および遺伝子配列

NS4Bタンパク質アミノ酸配列: (配列番号331)

PFRATFETRYAQRIVQCAQGGMLASIQTASARASHLADSRGACQVLAQAFPPSPAPIVOVIGFQTHVFSASGPIILCAQCGACCTTA  
AGLVGATAGLGGHGLALAGTAVLVLGTGARGHAGLGLVAGCTISVTVGLDFPGCTIGAEVYGAIVATQILISGSAHTILLDLLP  
AFFOPGAGVAGIVLPIILGSLGVTVAHRLGNCAKQICDIFYLSEXTFGQCLKILMRCTVYKARARESVTQCG

NS4Bタンパク質遺伝子配列: 配列番号301のヌクレオチド5638-6423

## 【図 18 C】

FIG. 18C

NS5Aタンパク質および遺伝子配列

NS5Aタンパク質アミノ酸配列：（配列番号333）

VVGGIKSFVLCILRAVVDKAAKHVRFVRFMVIGSGFANCGRLXGTGTLTLTTCGCGGVRVGLQCLGTSOPLLRVGRKCRGCVYGFHPTTTA  
TGLTFPDSIDATRLGFFVGIABVLELREHKNVCASGCCIDRAGVAGVAFPPTAINGIFISTGSPFTVSLGLCSFSSVCHSTLCLIPAR  
TLYSGCGENVELLEITVTCGATACQILRRPAPRCDAAQVQHVAGVDETPRCADEVDITGVVPAADAGACSLGRLGVLTIVRELSDGC  
QIAIVFYQAAARSEVFPFRRTKVGQVLERVKNSTPTFEATAVRHHIIPESCHVLECTGCIDGALIVPVSTCQCLLHSLTLKHH  
YIPFQKLEEDTREVTVICAVPTERAKSLICFRAGDSVSCCHPLQTPIRALLKRYGLPCGTSGCQWPLGADARVCJNGCTVTEPC

NS5Aタンパク質遺伝子配列：配列番号301のスクレオチド6424-7797

NS5Bタンパク質および遺伝子配列

NS5Bタンパク質アミノ酸配列：（配列番号333）

HQGVYKRFVVAITTPPLPVTEVUGLLBAETURVTTAVDVEQCVYIDTCAVVCNRPQVTCCLAKACTPQGVNVEZAVVREBA  
ITTHDHPIGVTEGLDVGKAPKAYKQVQWAGGVDAKPMKLVKPVFPKPKPZYVPPKRAHVASEKLVLSHSLTKHLSDAY  
FATPHEPRALLGKWRATSEPOLAVDAICPDSTDAENDBENHILAAHSDPEGVRLVYIKRSPKDCITGVVGVRCRASULTTES  
GHTLVCKVPAACFASGIFKFGLLINGDITLLTERCAQELDREHSLHLDVGFPHCPVAGSDLVSEVCLARVDEVLGAKMRKLVQAR  
RAIDRVGKVSPLGVSGEYVAVVPTAVTVVLLPLQLLRIEPPQGTCTVLTIVNCHVNVVPPVELLPTIVVLAGRDALGVPA7ADHA  
ELLSLLAFKXRLHDKVRKRRNDIRTVQVCLKGGACFVQHLRSFVSTTGPFPFGVCLLPEELNERPFIHLLSTIDIRNGSLRFLRVA  
SALLALCL

NS5Bタンパク質遺伝子配列：配列番号301のスクレオチド7798-9498

3' UTR配列

3' UTRコンセンサス配列：配列番号301のスクレオチド9499-9867

## 【図 19 A】

FIG. 19A

ヒトベグウイルス2（ABT0239AN）核酸配列-配列番号302

1 IHHHHHHHHHH ITAGCAATGC GCATATTGCT ACTTCGGTAG GCGTGATTGG TAGCGCGCCG  
61 GCGGACCGCG CCGGCAAGGG CCTAGTAGGA CGTGTGACAA GCGTGTGACAA TGCATGTGAC  
121 CTGGGGTGAG CGGAGGCGAG ACCGAGATCG GGTGACATCG ACTCCAGTGG CGACCACTGG  
181 GCTTGGTGCT TCATGGAGGG CATGCCACAG GGAACGCTGA TGTGTCAAGG GGAATGGTCC  
241 CTGCACTGCT GCATGCGGCG GCACTACTCC GTACACCTGG ATAGGTATGG GCGGCGCCCG  
301 CCGAGTGTGA GCTCGGTGGA GCGCAACATG GGGTGTTCAC CTGATCAAG CATTTGTCTT  
361 CCGCTCTGGG GCGCGACATA TATTACTCTC TCGGCTTGCC GGGCTTAAH TGGSAAGGCG  
421 CACTGCGGTG GAAGCTCTGG CCGGTCAACA AGTGGTGTGG AGGTGCTGAG AGAGTCTGTG  
481 CAGCTGTGCG CATCTCTTGC GTTGATCGGA TCGGTATGTG GTTGATCGCG GTCCAAAATG  
541 GAAGGSGCGA TTGATCGGGG GCAAAATATT GAGTCTCAGC GCGCATGTGG GACTGGTGAG  
601 GGTTTTGTCT TCTTTCTCAA CTGTTGCATC CAATCTGATA TTATGTGTGG TTTGACAGGT  
661 TGGTGTGTGA CAGACCTGCG CTGTTTAACT TGCACAGGCA ATCCGACCTA ATCGTCTCTC  
721 TGGGATAC TTGTTGTCGG TGTAACTGCG GCGCTCGGG CCGCATTTGG CAGAGGTGCT  
781 GAATGCTCTC TTGCTTGATG CGGCAATGCA GOTTGGCTCG GCTGTAGAG TGAAGTCTCT  
841 GGTATGTCCG AAATGATGCG AGCTATCTCT TGGTTGGTGT TTATTCGTTG GTATGGTGGG  
901 GGTATACCTA AAGCATTTGT GTGCACAGTG TCGCTCGGG TAAACATTTC TCCCTA7AGC  
961 TTTTATATCT CAGACATATC CGCATTTTGG ACPHGGATAC TACAATCTAC TGCTGCTTGG  
1021 TGGCAATGTT TTGTCACTCT TCTTATATCT TACGACACTT GGA7TCTTGT GTTGTGCTCT  
1081 AGTGGCAAGA CTGTGCTGT GATGACATCT CTTTGTGATA GTCTTAGGCT TATGAGGTAC  
1141 AAGCATCCAT CTGAAAGCTA CTTCAAAATC GTATCAATAA CAAATGCTTC AGCTGTATGG  
1201 AACTGTGACT GCGCTTTTGG AACCTTTACT CGCAATAGTG AGTCTGCTTT CTCTATACCT  
1261 AAGTCTCTCT CTGTAAATAT TGAGGATCTC ACATTTATCT GCTCATGGGG GCTGTGGTGG  
1321 TGGTTTGTCT AGAATCACTG ACCTGCTATG GCA7GCGCGC AGCACCGATT  
1381 TCGCTTTGCT GATATACCTC TTCAAAATCT GAGCCACTCT CTTGGTATTA TAATACACT  
1441 ATTTATCTCC AGAATGTGCG CAACCTCTACG GTTAGCTCYA CCAACGCTCT ATGCCTGTAC  
1501 AAGTGGGGCA ATGCAACTGC TTGTATTCTT GCGCCGGCTG CGGAGTCTGC  
1561 TATGGCGGCT GCTCTATAC TAATGGTAGT CATGATCGAT CCGGGATGAT ATCGGGATTT  
1621 GGTATCCGCT ATGAGACTAT AGAGTTTGTG CAGCTTGCTG AGATTGAGC TAACATCTGT  
1681 AACACGACCA TTGAGCTCTCT CGT7TGCGCG TCGTGTGTGA TGGCATCCGG TTTCTGGGCT  
1741 GGTATGCTT GAGTTCGGCG GTATGCGGTG GCGACTCTGT ATAGGTCTGT TTGATACGCT  
1801 GACCTTGAAC AGTTCGGTCC TGGGCTCGGG AATGGTGGG TGGTCTGGT TGAAGTCTGT  
1861 CGGAGTGTGT GTATCAACCC TCAATGGGCG AGGCGGGCT TCGGGTGTCT TAAACATCTT  
1921 TTAAGCTTGA TACAGACCTT TGT7GAGGAC ATCTTCTTAG CGCTTTTGT YAMTCGAGC  
1981 CCGTGGTGCT TACGCTGTGT TAACTATAC CTTTCTATC CAGAAGGAGG CGGCTTTGTG  
2041 CAGCTGATCG GAGACCTCCA GGTGCTGAGC CTTAAGACTG CATTCTTACA GTCTCTGCTG  
2101 ACCTGTATCT CCGTCAATCT GCTATGCTGT GTTGCTCTG GCGACTCTGT CCGTCAATTA  
2161 ATCATCATAT TTCTCTGGAG CGTGGGCGCA GTAAATGCTT CCGTGTACTT GAGCTGTGAT  
2221 TGGGCTGTCT GGAAGATGCG ATTTCTGTTC ACTTCTGTGA CTTGTGCTAC CTTCAATGAC  
2281 GTCTTGTGTC TGGCGGTTCG GACGCGTATA TCGTCTGTG GCGATGCTGT GCGCCGCCCG  
2341 GAGCGTGGT GGAAGTGTGC TGGGCGCTG TCAVGGGKGA TTTGCGGAG TACVGGCTTG  
2401 AGTGTGAGTG TCTTCTTTT CATTGACATG CTTCTACTCT TCGCTCTGCA CAATTCGAT  
2461 ATCATATCT CTGTCAGACT GACCTTTTTC GCGCCGCTCT GCGACTCTCT TTGCTCTTAC  
2521 TTTTGTGCTG GTGTGTGCT TTGTGATCTG ACTCTCTCTG TGGTTTGA GGTAACTGCT  
2581 GCGGCTTTA ATATAGATGG CTTATTTGCC ATAGCGCATG CAGCGCTGCT ACTGAGTCT  
2641 TCGACTTCCG GTGTGACCTT GAGTGTGCTG GCTGCTTTC TAACTATAT ATATCCCACT  
2701 CCGTTTAATC CTGCGCTCAA TAGAATGTTC TTAGCATCTG CAAATTTAGA CATCTCTTA  
2761 TCGTTTGA CACTACATGA GACTATCTCT TATATGCTCT GCGTAATGCT CACTCTCCAG  
2821 GTGTCACTCT GAGCGGCTCT GCGCCGCTCT GAGGCATCA AACTATCTCT AGGTCTGT  
2881 TTGCTGTGTG TGTGGCGCA CGAGTGTGCG CGACCGGGCT GGGATTGCT TCTTGAGGTT  
2941 TGGCGGACA TCTCTG8TT GTTGAGT7TT ACTGGCACT GCACTTGTA TATGTCTGT  
3001 GTCTTCTCT TTGTGTGCGC AGTGT7TGGC TTCAACATCT CACTTGGAGC AAGTATAAG  
3061 CTTCAGATCT ATCGGTACTG GCGCGAGGCT TATGCCAGAG TCACTCTCG TGTGGTGTG  
3121 GCTCTCTCG GCGGAGAGTT CATTGTCCG CAGAGCTGG GCGTACTTG GTTGCGGCT  
3181 TCGATCTCT GCGCGGTA ATCGGTGTGA GTGCTGTGAT GTGCTGTG  
3241 ACAGTGGCA CAGTACACAT ATGTTAGTA SCGTGCTGT CCGGAGGGCC AAGTGGCGA  
3301 ACCCTTGCAA CGCTGGCGGA TGACATGGCG CCGATGGGTG ACACCGGGG GTTGGCGGCC

## 【図 19 B】

FIG. 19B

3361 GTGTGTGTT GCTTTGGACT ACCTGGCACA TACATATACA ACCACATGGG CCAAGCTCTCA  
3421 GAACGGGTGG GCGGACAGCT CAGGATCTCT GCGGTTGCTT TGGAAACAGT C93T7TGGAG  
3481 GAGCCCACTT TACTGAGGCT COTGAGATCT ACATGATGTT TAGCTGTGTG AACAT7TGGT  
3541 GAGAGTAACT CTTGTGGGCG CCGTCTGGCG ACAGGTGCTT TGGGAGCA COT7AACCTCT  
3601 GAAGATCTGC CAGCTGTTT CACGCTGAGT GCTCCGGTGG TTATYACCAA AACAGGACTT  
3661 GGTACOTGGT CTTCTCTTAA GCGGACATCT ACAGGGGCTE STGARACACC GGGATCCGCG  
3721 CAGATCGTGG TCGTCTCTTC COTGACAGG CCGTCAATGG GTACTGCACT GAATGRCAAC  
3781 CTGTATGCGA CCGCGCATGG CCGCGGTGCG GTGCGCTAG CCAAGTGGCG TGGT7TGGG  
3841 AGCCCACTTT ACAGGAGAT ATCTGATGAT STGTRGCTCT ATCTGCTCT TCGGGGCTG  
3901 AATTCCGCTG AGCTCTGCG CTCTAGCGCG AGCGGGT7TT GGGTGA7GHA CAATATGHA  
3961 GGGTGGTGT GCGGAGAGT AGGAGAGGAC GACCTCTGTT TGGACTGTCC CA7GCA7GHA  
4021 GATCAACTCG GGGGTGCTTT GAGGATCAGG ATTTGTGCGG GTG7CCGGAT AGTTGACGCA  
4081 TTGATGCTCG CTGATCTCT TACCAGTGGT ATTTGTGCGG GTG7CCGGAT AGTTGACGCA  
4141 TGGCAGAGCG CXTATCTCT COTCCGGGG CAGCGGCGAA TCGACGCGCC ACCTGTGACA  
4201 CCAATCACT CTGAATACG CTACTATGCT CTTACGGTAT TGGT7ANGIC AACAAATAT  
4261 CGATGCGAGC TGCTPACAL GGGGACAGAG GTATTTGGTA TCA7ACAG TGT7ACTGTG  
4321 GTTAAAGATA TGGCAATTA TATTAGSAG ACATACAGAA TCGACCTGTA AATTAGRGT  
4381 GGCAGTGGCG CTGACGGTGT GACGGTCACT ATG7GTGAAA GOTT7GGGCTA CATGACTAT  
4441 GCGCGCTTCC TTGTGATCC GGAAGAGCA C7TGCGAGGCT AGCGGTAGT CAT7TGGAC  
4501 GAGTGGCAAG ACACATCAT CACACGCTA CTGCGGATAS CCGCGGTGCG CAT7TTGCT  
4561 GAGAAAGACT GAGTGAAGG CCGTGTATT CCGACAGCA CCGGCGAGCT CAT7CAGTA  
4621 CAGCCATGCA TGCTPACAL TGGATATTA TGTACAGCA GCGGCGAGCT CAT7CAGTA  
4681 GCGCCACAAA TCAAAATGSA CAACATCAGA ATGCTAGAGC ATGCTATCT TTGCACTCG  
4741 AAGCGCAGGT TCGGGAATC AAGCGAGAG CTTCCGCGCC TTGGTGTTCG TGCAGTGAGT  
4801 TTTTGGCGCG GCTGTGACT CA7AACCAT CCGCCGCTAS ACTCTATTGT TGTAGTGGCA  
4861 ACTGATGACT TGGCACAGG CTACACAGGA AATT7TGAAT CCG7CATGGA CTGCGGTGT  
4921 TCGGTAGAAC AACTGTGAG AATTGACAT GACCTTAGT TTTCATCTC GCGCGAGGCT  
4981 GTGCACTGA CTGCTGAT CTGATGCG CCGCGGAGG GTACGCGTGT TGG7AGSAG  
5041 GGAGCGTATT ACACACCAT TATTAGSAG CACACTTGGC TCAAGGCTCC CGATGCTAAC  
5101 GTCTGCAAG CAGTGAAGG CGCATGCT TTTATGACT GGGGTGCTCG CAGSATACAA  
5161 CAATGCGTGG CGGATCTGCA TGATCTAGG TGCACACCA GCATCAGTGT YGATCCAGC  
5221 ACTCCAGTGC GGGTATGSA CACACTGCG GCGTACCTG CAGACACTGA GGT3ACGACT  
5281 GCGACTCTCT CAGAGAGCA GTGCGGCTG CTTATGCTG TCAAGTGTG CAT7TGCAA  
5341 GAACCGGAG CCATGCTCT AGAGATAG ATGAGTGA AGCTGCTT CA7ACAG  
5401 AATAAAGCAC CCGTCTGTA TGCCTTAGC AATCTACAC TGAATTTCAC TACCACACAT  
5461 GACTTGACT CCGGTATAG GCGGCTCTA ATGCGACAG TGT7GTGGA GACAGGCTAC  
5521 GCGCCCTCC TCTCTGCTG CCGCGCTTG CTTGCTCTCT TCGCTTTGCG GGGTGTACCA  
5581 GGAGCTTAG TGGCGTGGG CGTTTGGAG GTTACGCAAG GGT7AGCTG GGT3ACCGCT  
5641 CCGGAGCGCA CAGACAGAG CCGGCTCTAT GCGAGGCTT GTTACAGCG CCG7GAGAT  
5701 TCGAGAGGAG CAGAGAGGAG GCGAGTGTG GCGAGTGTG GTTACAGAG ACT7GTGAT  
5761 GCGAGTGGG GCGTGTGCTA ATATGCGCA GCGCGGCTCT CTTGCGGCGT GGG7GAGT  
5821 CAGGTGCTGC ATTTCTCTGA GACCACTTGT AGTTCGATG CATCTTTGCG TCTGCTCTGT  
5881 GCTGGTGTG TGGCTGTGCA GCTCTTCACT GCGCTTGCC GGC7GTGTC CCGTGTGCA  
5941 GCTGGCTTGG GAGGTGCCA TAAGTGGTG TTAGCTATT CAGGAACCTG GCTAGT7AGC  
6001 TCTGAGACTG GCGCGGTG CCGCATGCT GCGGCTCTCT CCG7CTACG AGG7GTGTC  
6061 ATGCTATG TCGCGGCT CAGCTTCTG TTTGGGCTC TTAGAGGTG GAG7GAGT  
6121 GTTGGCGCTG CCGTGTGCA CCGAGAGCT TTGCTGGT CAGCTGAAT GACCACTGCG  
6181 GTAGACTCT TACTCTGACT CTTCTCCCHH HHHCCHGCGA TAGCTGGCAT CCG7CTGTC  
6241 TTTATCTCAA GTACATCAAG TGTACCGAG TGGGCTAAT GGC7ACTGTC CAT7GTGCA  
6301 AAACAACATA TTGTGATPA CTACTCTTA ACTGAGAAAT TTGGCATCA ATTAAGCAA  
6361 CTTTCCCTGT GCGCGGCTGT GTACCATTGG GCGGAGGAC GTGAGGAGTA CACACAGTGC  
6421 GCGTGGGAG CAGACACTG CAGCTGCTT TGTGAGCTCT TCGGCTGCT GGG7GAGT  
6481 GCGCGCAGC ATGTGCCAG GTTCCGCTG CTAATGATG GCTGCTCAC TGAAGTGTG  
6541 GGGCGCTGGC TTGCTACCG CAGCTGTGTT ACCACTGTG GTGTGTGGA AGTGTGTGCT  
6601 CTTCACTGCC TGTGCTCAAG GTCTGACCA ACACCTAGT TGGGCGCTG GTGTGGTGT  
6661 AGTGTGCT CCGGTTTCC ATTCACCGC ACTACGACG CCAACCGCAA TTACGGCGC  
6721 GACATTTAGT ACGCACTAA ATTTGGTCTT CAGTATGTA TAGCGGAGT COT7GAGCT  
6781 GAGCGGCTG CAGACACTG CAGCTGCTT GAGCATAT GTTCTTGA CCG7GAGC  
6841 GTTGATCTCG CCGTGAAGC CCGACGCTC AGCCCAATG GTATCACTAT CCGTACTTCT

## 【図 19 C】

FIG. 19C

6901 TCTCCACCAC AAACCTACAG CCTCTCTC TGTTCTTGT ATTCACTTGT CATGTCTAGT  
6961 AACTTATGTA ACCACGATA GACCTGAGT GTGTGCTCC AGAGAGGTGT GAGGACTACG  
7021 GAAGAAGAG AGATATAGA CCAAGTATGT ATGTGTATGT AGT7GAGG CAGAGACAG  
7081 GAGAGATAT ATGAT7AGG CAGGAGTGTG GAGGAGTGTG CAGTACACAT  
7141 GACGAGGATG TTGACGGGAC AACCTGGTGT AAACCCCGG TGCCGAGGCG TGTCTGGGT  
7201 AGCTCAACGT TGGATGAGT TAGCTGTGCT ACTGTCTGCT GCGAAGCTGG CGACCAACTG  
7261 CAAATGCTA TCAAA7TGT AGT7AGGCG GCTTACGGT TGT7TCCAC GTTCCGCTAAG  
7321 CCGCGCAAGC GCGTCTGGG TG7CTGAGG CGTGTGCGA TGTGTATGCG CAGCGACCA  
7381 ATCAAA7TGT AGGCAACCG AT7ACCAAT CATACATATA TCCGAGAGT GTGTCACT  
7441 GCTGCAACT GTACGGCTG TAA7GACAG GCTGTACTG TTGCTAGG GACTGTGCT  
7501 CAGACTTAA TCAAACTATT GACTAACAAA CAGACACTC AACTTCAA AAGAGATA  
7561 GAAGAAGACA CAGAAGTAA TG7CATTTG CGGTACCAA CAGTGGCGC AAG7AGGTC  
7621 ATCACTTCA TCAAGAGTGA TCGATCAGT TCA7TGTG ACCTCTTGA AACTCTGTG  
7681 AGCACCTGCT TCTTAAAGTA TGGT7TGGT ATCCGAACT AGCTGCACT TACGCGGCT  
7741 CTTGGTAGAT ATGCGGAGT CTGTGACAT AATGGATATA CAATCTAGA ACCATGAGT  
7801 CATGCTGTA GTTGGTCTG ACATATGA GCGCACAA CCGCACTT ACTGCGAC  
7861 CGAGCGTGG CTGCAATTI ACGCGGAGC ATCGCGCG TTACACCA ACACGCGGT  
7921 GAGTGTGCG AGGCGGAGC TAAGGTACA ATGATCAA CATTGACAA GGTGATGAT  
7981 TGT7TCCGAG ACACATACAA TTGCTGCTT CTAAGGCA AGACTTCCA ACACTTGGC  
8041 ATGTCATAT AGGATGCTGT GTYAAAGAT CCGCACAA CAGCGGTGA CCA7TAAAT  
8101 GCGACACTT AT7CAGATT GGTCTTGA GCGCACAA CCGCACAA CTGCTTGA GAAAT7TGA  
8161 GATCAATG CCGTGGAT GTAGCGCT CCAATGCA TTA7TCAA ACT7AGTA  
8221 TTCCCTGCG ACAAGTCA CCGGAGCA CCGAGTCA CCGT7TCCC TGGTGTGCG  
8281 GCGCGAGTG CCGAGAAAAT GAC7TGGCG GACTGTGGG CCGAACCA GCACTGTCT  
8341 GGTGATGCT ATGGTTTGC CACTCGGCG CATGACGCG CCGTCTATT GGAACATG  
8401 TGGAAACGCT CAACGAGAG ACAAGACT GTAGTATG GAT7GCTT TGA7GACTG  
8461 ATACGCGAG AGGATAGGA TGGGAGGCG AACATATG CTTGCGGGA TCGGAGCT  
8521 GGTAGTGT ATGCGCTGA CAGTATAC AAGAGAGT CAA7GTGTA CAT7CGGA  
8581 AAGT7TGG GGGTGTGCT GTTGGAGC TCGATGAGT TACAGAGC CAGTGGCA  
8641 AGCTTACT GTATCTCAA GGT7GCGCA GCTTGCAGC GCGCGGCT TAAACAACT  
8701 GGT7TACTA TTATGGA GA7GATCCT ATTTGAGCT AAGT7TGGT TCAAGAACT  
8761 CTTGATGAT TACGACGCG ACT7AGTAC TATGGGTTCT CTACACCTT CAGGTGTCT  
8821 GGGGAGCTCT CCGTCTTGA GTGCTTAGC GCGAGTGG CAGAGCTTG TCTCGGGA  
8881 GGTAGTGT ATGCGCTGA CAGTATAC CAG7GCGA TGGAGCT TCTGGGAG  
8941 AAGGTGAT CACTGTGCT CACTGATGCA TATATGTA TGTATCYAC TGGCGTGT  
9001 ACTGTCTAG TGTATTGCG CCGT7ATG ATGCTAAT GGAATGAGC AGT7GAGC  
9061 GGGAGGATG TGA7GCTAG GGT7GCGG CATGACGCG CCGTCTATT GGAACATG  
9121 CCAACATCA TTGTAATTT ACAT7GTCG GAGCACTAC AGG7AGTGG TCAAGTGA  
9181 GTTTCATG GCGACTGCT GTACGGTGT GCGTCTTTG GAT7GAGG GTTGAATGCT  
9241 TGGAGGGA GAGGCGGCA AC7CAGAT GTATATGTA RUT7GAGG GTTGAATGCT  
9301 AATT7TGG GAGT7GAG GGTGCGTGT GTTGGAGC TCGATGAG CAG7GAG  
9361 GCGTGTGCT TT7TACAC GGAATATG GAGTCTGTT AGCAAA7TT GCA7T7GAG  
9421 ACCTGCGAC GTAATCTG TGCTATGCT TTACGGTGT GCG7GAGT AAGT7GTA  
9481 CTTGCTCTG TT7TGTGA AAC7TAAA CAAT7GAGT CAGGACTAC AAGGCAAG  
9541 GTGAACTG CTTGATCCAC GCGTGTGTA AT7TCCAGT GAGGACCC CCA7TCCGA  
9601 GTTGGGAG GTATACATC GGGT7TGA CCGGCGCC CCG7GAGT CCGTAAAGC  
9661 AGGAGTGT CAGT7GCT GAGT7GCT GAGT7GCT GAGT7GCT GAGT7GCT  
9721 GCTCTGCT GCGGAGGAC GTAAACAT GTGCTGAGT TGG7GAGT AGT7GCT  
9781 TTAACACTT AAT7GTGTA ACT7GAGC CCGTGGGG AT7TAAAGC GGCAGCGCA  
9841 TGAGGGGGT CAACGGGCC TTTCAIT



## 【図 2 1 B】

FIG. 21B

3301 ACCCTTGCAA TTCTGCCGGA TGACATGGCG CGGACTTGGTG ACCACGGGGC GTTSCGGCCG  
3361 GTGTACGGTT GCTTTGGATC AGCGGCGACA TACATATACG ACCCATAGGG CAGACTCTGC  
3421 GAATGGGGTG CGGAAGCAGT CAGGAGATCTC GCGCGTTGCT TGGAAACAGT CGTATTTGAG  
3481 GAGCGCAACT TTACTGAGAT CGTGGATGAG ACAATGAGTT TGGTGCTGTGG ACAAATTCCT  
3541 GGAGGTAAAC CTGTGGTGGC CCGCTCGGGC GCGCTGTGCT TGGTGGGACA CCTCAACCTC  
3601 GAAGATCTCG CACCTGGTTT CCAGCTAGAT GCTCGCGTGG TACTTACGAG CGCAGCAACT  
3661 GGTAAGTGAG TCCTCTCTTA GCGGACACTC ACAGGGRGTT TGAAGAACAC AGGATTCGGC  
3721 CAGATCGGCG TGTTGTCTTC CTCTGACAGT CGGCTCAATG GTACCGCATG GAATGGACAA  
3781 CTGATACGGA CCGGCGATAG TCGCGGCGCG CGCGGCTAG CAGCTGCGCC TGSTTTGAGG  
3841 ACGCCACTTT ACACGGCAT ATCTGATGAT GCTCGGGCTT ATTCTTGCTC TCGGGGACAT  
3901 AGTTCCTTAG ACCCTCTGCT CTGTTTGGCG ACCCGGGCTT GGGTATGAA TAACAAACGGA  
3961 GGGTTGGTGT GTGGCAGAGT GGAGATAGAT GACCTCTGTT TGGACTTGCC CAACGACACA  
4021 GATCAACTGC GGGGTGCTTC GGGACTACCA GTTTTGTGTT ATCAAGGTCA TGCATACAGG  
4081 TGTATGGTGC GTGGTACTTC TACGATGGCT ATTCTTGCA GCTTCGGGCA GGTCCGGGCA  
4141 TGGCATACCG CCTATTCTCT CTGCGGGGGG CAAGCGGAAA TGCAGGCGCC AGCTGTGACA  
4201 CCAACATACT CTGAATAAC CTACTATGCC CTTACTGGTT TGTGTAGTCT AACAAAATAT  
4261 CCACTGGACG TAGTCAACCA GGAACACAAA GTATTGGTCC TTTTACCAGT TGTGGCTGTA  
4321 GTCAAAAGTA TGGGCCCTTA TATTAAAGAG ACATATAAGA TCAGACCGCA AATTAGAGCT  
4381 GGCAAGAGCT CTGACGGTGT GCGGCTATC ACTGGTGAAG ACTTGGGTA CATAGCTAT  
4441 GGGCGCTCC TTGGGATCC GGAAGAGAA CTGCGGGGCT GTGCTGAGT CATTTGGGAC  
4501 GAGTGTACG ACACATCATC CACCAAGCTA CTCGGGCTG GCGCAGTGCG CATGATAGCC  
4561 GAGAAAAGTG GAGTGAAGAG CTGTGATTTG GCGACAGCA CCGCTGCTGG CATTCAGTA  
4621 CAGTCACATT CCAAGATTGA TGAATATT TAAGCATGACA CAGGCGAGCT GGAATTTTAC  
4681 GGCGCCAAAA TCFAAATAGA CAACATAGA ACTGGTAGAC ATGTAICTT TTGCACTGCG  
4741 AAGGCGAGGT CTGCGGAGCT AACCGAGCA CTCCTCGGCC TTGGCATTCG TGCAGTAGAT  
4801 TTTTGGGCGG GCTGTGACAT CAAGAACAAT CCGGCGCTAG ATCTCATTT GTGTGGGACA  
4861 ACTGATGCAT TGTCCACGGG CTACACAGGA ACCTTTGATT CGGTCATCGA CTGGCGGTGT  
4921 TGGTGGAGC AATCTGTGAC AATTGACATG GACCTACGT TCTCATCTCT GGCGGAGTG  
4981 GTGCCATGTA CTGCTGCATT GGGCATGAG GCGCGGGAC GTACCGGTGCG TGGTAGAAGG  
5041 GGAAGCTACT ACACAATCTC TCCAGAGACA GCAACCTGCG TCAGCGTTCG CGATGCTAAC  
5101 GTCTGGCAAG CAGTGGAGAG CGGATGCTG TTTATGATTT GAGTGTAC CAGGATACAA  
5161 CAGTGGCTGG GCGATACCA TGAATTTGGG TGCACACAG CAGTCAAGTG TGAACATAC  
5221 ACTCGAGTGC GGGTGAAGGA CACAGCTAGG GCGTACCTCG GCAGACCTGA GGTGAGGAT  
5281 CGACGCTCTG CAGGAGAGTG GTGGCGCTG ATCTATGGTG CGCAGTTGTG CATCTGCAAA  
5341 GAGACCGAGG CCGACCGTCT TGAATATAGC ATCAAGTGA AGTCTTACT CAACACAGT  
5401 AACAAAACAC CCGCTGTGTA TGCCTTGAAG ATCTCTACAC TGGAAATTCAC AACCCACAT  
5461 GATTTGCTC GCGCTGAGC CGGATGCTG TCGAGAGCTG GTTCTGGA GCGGCGACTC  
5521 GCGCCATCC TCCCTGTGCG GCGCTGCTTG GCTGCTCTCT TGCCTTTGCG GGGGCGACTC  
5581 GGAATTTAG TGCTCGTGGC TGTTTGAGAG TGTGAGGTGA GCGCTGCTG CGTGAACCGT  
5641 CCGCAGCGGA CAGACGAGAC CGGAGCTAC GCGACGCGCT TGTACCAAGC CTGTGAGAT  
5701 TCAAGAAATT TCGCGAGCTT GCAAGGTACG CGCAGTGGCG CCGCGGCGAA ACTGCGCGAC  
5761 GCGAGTAGGG GTGCTAGTCA ATATCTTGCA GCGCGGCTC CTTCACCGCG CCGCTCTGTA  
5821 CAGGTGTGCG AGTCTCTGCA GACCAACTT ACCCTGATG CATCTTTCG CCGTCTCTGT  
5881 GCTTGGTGC AGGCTTGGCA GTGCTTACG GCGCTGCTG GCTTGGTGC CCGTCTCTGT  
5941 GCTTGGTGG GGGGTGGCCA TAAGTGGCTA TTAGCTATTG CAGGAACTTG GCTGGTATG  
6001 TTGAGAGCCG GTCCCGTGG GCGACTGTT GCGGCGCTCT CGATCTAG GCGGTGTTG  
6061 ATCGGATGT TCACCGGACT TGAATCTCT TTTGGTGCTC TTACAGGTTG GGAAGCGCTG  
6121 GTCGCGCTG CGGTTTGGAC ACAGAGATC TGTCTGGTT CAGCTGATAT GACCACTGTC  
6181 GTAGATCTCT TACGCTGCT TTTCTGCTC GCGGCGGCA TACTGAGCT GGTGCTGTC  
6241 TTCACTTAA GCAATCTCAAG TGTAACCCAA TGGCTTAAT GGCATATAT CATGTGTGCC  
6301 AAACAACCAA TTTGTGAAA CTACTCTTA AGTGAAGAT TTGCGCAACA ATTAAGCAAA  
6361 CTTTCCCTGT GCGCGCTGTG GTACCATTGG GCGCAGGCAC GTGAGGAATA CACACATGTA  
6421 GCGCTGATCA CGGGAGTCTG GCGATTCGCC TTGTGCATTC TACGCGCTGT GTGGGATTTG  
6481 GCGGCGAAGC ATGTGCGCAG GTTCCGTGTG CCTATGATG GCTGCTACAC TGGTGTGTG  
6541 GCGGCGTGC GTTGTACGCG CAGCTGTG ACACAGCTG CCGTGGGACA AGCTGTGTC  
6601 CTTAGTGGC TTTSCTCAAC ACTTACACCA CAACTCAGTG TGGGCGGTTG GTGTGCGTGT  
6661 AGTTGGAGTG TGGGTTTCCC ATTCACCGG ACTACAGCAG GCACTGGCAC CTTACGCGCTG  
6721 GACATCAATG ACGCCAACAA ATTGGGTTT CGATATGGCG TTGCGGACAT CGTSGAGCTA  
6781 GAGCGCGGG GCGCAAAATG GCACTCTGT GCACTCATAT GTTGCITGGA CCGGCGCACG

## 【図 2 1 C】

FIG. 21C

6841 GTTGCACTCG CTGTGAAGGC CCCACGGTC ACGGCTAATG GTATACCTAT TAATAGCTTT  
6901 TCTCACACAC AAAGTTATG CCTATCTCTC TGTTCCCTTG ATACAGTTTG GATGCTTACT  
6961 AACTTATGTA ACCGAGTAA GACCTTGAGT GTTGCCAAAG AGGAGGGGT TGAAGTCTG  
7021 GAAGAGAGCAG TTGACACAGC ACAAGTAGTG ATGAGCCAAA ATCTGSCAGC GCGTAGAGCG  
7081 GCTGAGTATG ATGCATGGCA GGTTCGCCAA CGAGTGGGCG AGGAGATACAC CGGTTTGGCA  
7141 GACGAGGAGT TTGACATGAC AGGCTCGGTT AAACCCCGAC TGGCCAGGGC TGCTGTGGT  
7201 AGCTCAAAGT TGGATGATGT TAGCGTGGTG AGCTCTTAC GCGAACTCGG CGACAGTGC  
7261 CAAAATGCTA TCAAAATTTGT AGTTCAGGCG GCTTCAGGTT TGTCTCCACC AGTGGCCAGG  
7321 CAGGACAGC GTGTCTCGCG TGCTTTGGAG CCGTGGGACA TGTGAGTSCG CAGCGTCCA  
7381 ATCAAGTTTG AGGCCACCGC AGTACCAAT CATATATAA TCCGAGAGA GTGTCACT  
7441 GTGCTACGCT GTACCGGCTG TTGTGACGAG GCTTGTACCG TTCCGTACGG CACTTCTCT  
7501 CTGACTTTAA CCAAAATATT GACTAACAA CAGAGTCACT ATATCCCAA AGAGAGATA  
7561 GAAGAGAGCA CAGAAATAGC TGCTATTTGC GCGCTACCAA CAAAGCGGCC AAGTAAACT  
7621 ATCACTTTCA GAGCAGTGA CCGATCAGTC CCGATCAGTC TCAITTTTTC ACCCTTTGCA AACTCTTACT  
7681 AGGCGCTCG TTCAAAGTA TGGTTTACT ATTGGAAGT GGTGCGACTG CAACGCGGCC  
7741 CTTGTGAGC AGGCCGAGT CTGTGAGCTG AATGAGTGA CACTTATGA ACATGACAG  
7801 CAACTCTACA ATTGGTTCCG ATCGATTGTG GACACACAA CCCCACCTT ACCTGGAAC  
7861 CCGAGCGTGG CTGGCATTTT CGCGCGAGAC ACATCGCGCG TCTACACCA CACAGCGGT  
7921 GATGTCTCG AGCGCGAGC TAAGTCAAG ATAGTCAAG ATATGATCAA AGTCAGACCA AGTGGACCA  
7981 TGCTTCGAG ACACATACAA TTGTCGCTT SCCAGGCAA AGACCTTTGAG ACAATCTTGG  
8041 ATGCTATAT AGGATGCTGT GTCAAAGT GCGCAACA CCGCGCTGA TCAATAAC  
8101 GGCATCACT ATACAGATT GTCTCTGTA GCGCAAAAC CTCTGCTTCA GAAATATGA  
8161 GATCAGATG CGGCTGAGT GTACGAGCT CCAATGGCA TTAATCCAA ACCTGAAGTG  
8221 TTTCCAGGAG ACAAGTCAAC ACGGAAGCA CCGCTGCTGG CATTCAGTA GGTGTTGCC  
8281 CAGCAGATCG CCGAGAAAT GATCTGGGCG GATCTGGCG CGATACCAA AGCTGAGCA  
8341 GGTGATGCT AGGGTTFGG CACTCGCGCG CATGAGCGG CATGAGCGG CGGCGCTACT GGAACAATGG  
8401 TGGAAACCG CAGCGAGCT ACAAGTATC GCGTGTGAT CACTTCTCT TGAATGACC  
8461 ATCAAGCGAG AGGACATGGA TCGTAGGCTG AATCTGTGG CTGCAAGCGA TAGCGAGCG  
8521 GAAGGTGTT CCGCGCTATA CAATTATTAC GACACAGAA CCAATGTGTA TATCACAGA  
8581 AAAGTTGTG GGTGCTGAG CTGTCAGCG TCACTAGCG TTACAAACAG CAGTGGCAAC  
8641 ACGCTTACT GTCACTCAA GGTTCGGCA CTTGAGTGA AGTATGAAA AGTCAGACCA AGTGGACCA  
8701 GCGTACTAA TTCAATGAGA TGACACCTTC ATATACAGC CAGGTTGSCG TCAGGAACAT  
8761 CTGAGAGAT TCACACAGC GCTTGAAGC TATCGGTTA CTACACCA CCAAGTGTG  
8821 GGGGACCTCT GGTCTATCGA GTGCTGAGC GCACTGTGCG ACAGGTGTTG CCGTGGGGA  
8881 GGTATGCGT CGATGCTGTA GCGACAGT CATAGTGGCA TTGCAACGCT TCTCGGGGA  
8941 AAGGCGGACT CACTGGGTG TATCAGAGC GTATTTGTA TGTATCTAT TGGGCTGTG  
9001 ACTGTCTAG TTTGATGCC CCGTGTGTGC ATGCTGTA GAAATGAGC ATCGCAGAG  
9061 GCGACACTTG TAACTGAGC GGTCCAGCG GATGAGTGA GCGGCGACT GCGCTGCTC  
9121 CCAACACTTA TTGCAATTT ACATGCGCT GACCACTCA AGCTTGTG TCAAGTGA  
9181 GCTTCTATG CGAGATCTG CTGCAAGTTG GCTTCTTGT GCAATGAGG GTTAATCTG  
9241 TGGAGCGGA GACCGCTGC CATCAGACT GATATGACA AGTTGGGCGC GGTGATGCG  
9301 AATTTCCGCG AGATGTACT GTGTCACCG GAGGTAGAA CACCACAGC CGAACCAAG  
9361 GGCATGTGCT TCTTGCACC GGAATATGG GAGCTGTGG CAGAAATTT GCACTTACG  
9421 ACGATGACG GCAATGTTG TGCTATGCG TTACGTTTT GTTGGTTC TATGCTATA  
9481 CTGCGCTCG TTGCTGTA ATCTCTAAT CAATGAGTA CCGAGTAC CCGAGAGAG  
9541 GTGAATGAC CCGTACCCAC GCGTGGCTGA GAGCGGGCT TGAACGCT CCGATACGA  
9601 GTTGGGCAAG GTATACAC CCGGTGTGAG ACCCGCCCC CCGATSTGCG GCGAGGCG  
9661 ACGGCGAAG CAGTAGGCT GAGAGCTCG GCACTCTCC GATACCCCA CCGAGGCTAC  
9721 GCTTCTCTCT GCGAGGACT GTAACATAC GTTGTACGCG TGTGACTTG ACGTACTTG  
9781 TTAACCACT AATGTGCTA ACTGACGCC CCGTGGGCG ATCTAGSCC GCGACCGGA  
9841 TGAGAGGGGT CAJCGGCCCT TTTGATT

## 【図 2 2 A】

FIG. 22A

ヒトベギウリス 2 (UC0125) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR 配列

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

## 【図 2 2 B】

FIG. 22B

ヒトベギウリス 2 (UC0125) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR 配列

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327













FIG. 23X

【☒ 2 3 X】

|              |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 大少数          | 7370 | 7380 | 7390 | 7400 | 7410 | 7420 | 7430 | 7440 |
| UC0125 US    | T    | T    | T    | T    | T    | T    | T    | T    |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 7450 | 7460 | 7470 | 7480 | 7490 | 7500 | 7510 | 7520 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 7530 | 7540 | 7550 | 7560 | 7570 | 7580 | 7590 | 7600 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |

【☒ 2 3 Y】

|              |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 大少数          | 7690 | 7700 | 7710 | 7720 | 7730 | 7740 | 7750 | 7760 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 7770 | 7780 | 7790 | 7800 | 7810 | 7820 | 7830 | 7840 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 7850 | 7860 | 7870 | 7880 | 7890 | 7900 | 7910 | 7920 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 7930 | 7940 | 7950 | 7960 | 7970 | 7980 | 7990 | 8000 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |

【☒ 2 3 Z】

FIG. 23Z

|              |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 大少数          | 8090 | 8100 | 8110 | 8120 | 8130 | 8140 | 8150 | 8160 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 8090 | 8100 | 8110 | 8120 | 8130 | 8140 | 8150 | 8160 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 8170 | 8180 | 8190 | 8200 | 8210 | 8220 | 8230 | 8240 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 8250 | 8260 | 8270 | 8280 | 8290 | 8300 | 8310 | 8320 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |

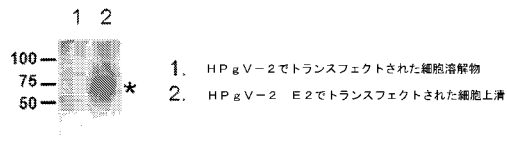
【☒ 2 3 A A】

FIG. 23AA

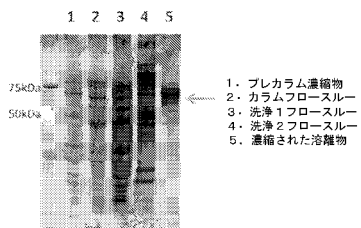
|              |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 大少数          | 8330 | 8340 | 8350 | 8360 | 8370 | 8380 | 8390 | 8400 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 8410 | 8420 | 8430 | 8440 | 8450 | 8460 | 8470 | 8480 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 8490 | 8500 | 8510 | 8520 | 8530 | 8540 | 8550 | 8560 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 大少数          | 8570 | 8580 | 8590 | 8600 | 8610 | 8620 | 8630 | 8640 |
| UC0125 US    |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0070P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0029A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0239AN US |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0128A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0055A US  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| ABT0096P US  |      |      |      |      |      |      |      |      |



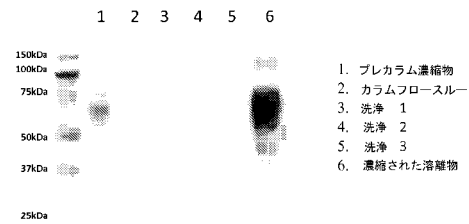
【図 2 4 A】  
FIG. 24A



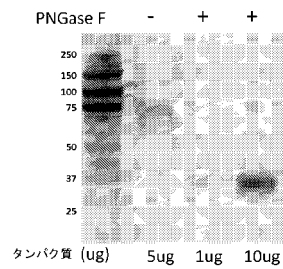
【図 2 4 B】  
FIG. 24B



【図 2 4 C】  
FIG. 24C

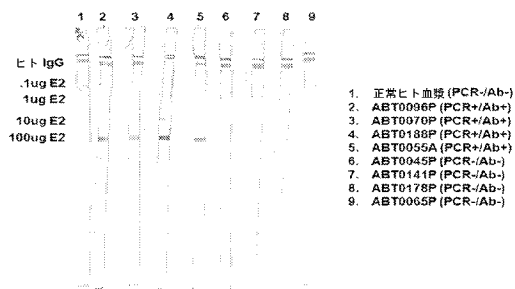


【図 2 4 D】  
FIG. 24D



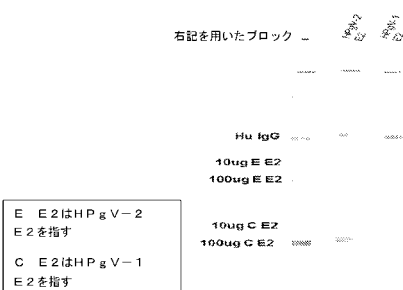
【図 2 5】

FIG. 25



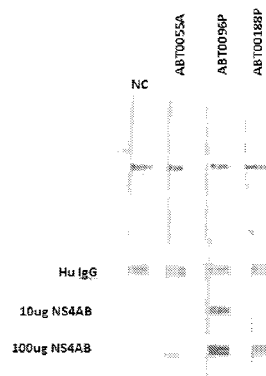
【図 2 6】

FIG. 26



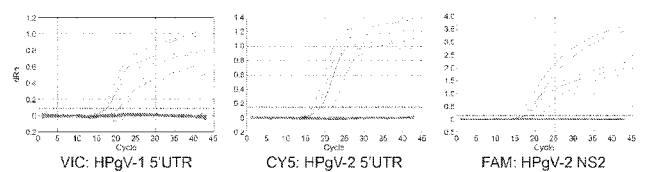
【図 2 7】

FIG. 27



【図 2 8】

Fig 28



【図 29 A】

FIG. 29A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0030P, US) 核酸配列 - 配列番号 419

```
1  AACTGTGTGTT GTAGCAATCGT GCAATATGCT ACTTCGGTAC GCCTAATTGG TAGGCGCCGG
61  CGCCGACCGGG CGCCGCAAGGG CCTAGTAGGA CGTGTGACAA TGCCATGAGG GATTATGACA
121  CTGGGGGTGAG CGAGGGGACAG ACCGAAGTGG GGTGAATCGC ACTCCAGTGG CGACCATCTG
181  GCTTGGTTCGT TCATGAGCGGG CATGCCACAG GGAACGCTGA TCGTGCAAAAG GGATGGGTCCT
241  CTGCACCTGGT GCGATCGCGCG CCACCACTCC GTACAGCTTG ATAGGGTGCC GCGCGCCCCC
301  CCGAGTGTGA GTCTCGTGGG GCGCAACATG GGGTGTTCAG CTGATCAAAAC CATTGTGTTCT
361  CGAGTGTGGT GGGCGGCACTA TAATGACTCC TCGGGCTGCC GGGCGTTAAA TGGGAGCTAC
421  CACTCGGGGTG GTGGCTCTTG CCGGTGACCA AGTGTGTGGC AGGTTGCGAG ACGAGTCTTG
481  CAGCTGAGGC CTGAGCTTGG CTGTGATGGA TCGGTGATCG GTCCAAACTC GTCCAGTACG
541  GAAGGGGCGA TGGAGCGGG GCAATATGCT GAGTGTGACG GCCTATGTTG TTTGACACCT
601  GGTGTTGCTTT TCATTGCTAA CTGTGCTAAT CAATCTGATA TCATGTAAGT TTTGACACCT
661  TGGTGTGTGA CAAAGCTCGG CTGTTTAGTG TGCACGGGCA ATGCCACTCA TCCGTGCTTG
721  TGGGACTATC TTGGGTCGCG TGTAAGCGCG CGGCTTGGCG GTCGAATGSG TGAGGGGAGCT
781  GAGCGCGCTT TTGCTTGTAT CGGCAATGCG GGTGAGCTCG GSGCTGTAAG TGAGGGTCTT
841  GGTATGTCCG AACTCTACGG AGCTATTCTT TGTCTTGGAT TTATTGCTGT GTATGTTGTG
901  GGTATACCTA AACACTTGGT GTGCACAGTG TCCCTTGCAG TAACAATTTC TCCCTATAGC
961  TTTCTATCTT CAGACACTAT CGCATTTGGT ACGTGATAC TACAACATCC TGGTCTTTTT
1021 TGGCAAAATGT TCTGACACTT TCCATACCTT TAAGCACTTT GGAATCTTTG GTTGTGCTC
1081 AGCGGCAAAA CTGTGCTGTG GATAGCAATT CTTTGTGGCA GTCTACAGGT TATGGCATAC
1141 AGGATCAATT CAGACACTAT CCGCAATATG GTTACATATA CCAATGCTTC AACTGTCTATG
1201 AACTGTGACT GCGCTTTTGG AACCTTACTT CGCAATGCTG AGTCTGCTTT CTCTATACCT
1261 AGATTCTCTG CATTAATAAT TAATGACTCT ACATTTAICT GCTCATGGGG GTCTGGTGGT
1321 TGGTTCCTG AGAATCATAC GCGTCCATAC TCGAGACTTG GATATCCAC GCGACCAATT
1381 TCTGCTTTGT GCTATCTCTA TTGAAGAATG GACCTCTCTC CTGTGTACCA TAATACAATT
1441 ATCATACCTC CAAAGCTCTG CAACTCAAG GCTGATCCCA CCACAGCCCC ATGCCGCTGAC
1501 AAGTGGGGGA ACCCAACTCG TTGTATTCTT GACGKCGGTT CGCGCTTCGT CGGGGAGTGC
1561 TATGGCGGCT TCGCTTATAC TAATGATAGT CATGTGATAT COTGGGATAG ATGCCGGATG
1621 GATTACCGGT ATGGACTCAT AGAGTCTGTC CAGCTCGGTC AGATTGCAAC CAACTCATTCG
1681 AGTACGACCA TGGAGTCTCT CGCTGGCGCC TCGCTAGTGA TTGCAATCCG TCTTGGGCTG
1741 GAGTACCGGT CGACGCGAGC GATGGCGGTG GTGCACTGCT ATAAGTGTCC TTCAATACGT
1801 GCGCTTGAAC AATTGCTGCT CGGCTCGGG AAAATGGGCT CATTGCGTGG CGAGCGCTGT
1861 CGGAGTGTGT GTATTAAACC CCGAGTGGGG AGGCGCGGCT TCCGCGTGTG TAACAATGCT
1921 TGTGACTTGA TGTGTAGGACT TGTGTAGGACT ATCTTCTAGT CACCTTTTGG CAGTCCGAGC
1981 CTTGGCGGCT TGGTGTGTG TAACAATACT GCTTTCTATC CGACAGGAAG TGGTTTTGTG
2041 GAGCTCATCG GAGAGTAAAC GGTGAGTAACT CATTACACTG CATCTTTACA CTCTCTGCTG
2101 ACTTAAATAT CTTGATGCTG CTGATGTGTT GTTCTGTGTC GCGCGGGTGT ATTACATGA
2161 ATCATCATAT TTTTCTGGAG CCGTGGACAC GTATATGCTT CTGTCTTACT AGCTGTGAT
2221 TGGGCTGTTT GCAACGATGC GTCTTGTGTC ACATCTGGCA TCTGTGTAC CTTCATGAC
2281 GTCTGTGTGC TGGGCGTGGC GCGCGGCAAT TCGCTCTGTG GCCACGCTGT CCGACCTCCG
2341 TACGCTGGTT TGGAGGTGGC TGGCGGATGC TCAITGGGGA TTTCGGGAGC TGGGCTTTTG
2401 ACGTTCGATG TCTTCTCTTT TAITTCAGAT TTCCCTACAG TGCTTGCCAA CAAACCCGAT
2461 AGTTACTTACT TGGTGTGAAC AACCTTGAAC CAGGCAATCA CAGGATCTTA TTGCGCTTAC
2521 TTTTGGCTGT GCTTGTGTCT CTGTGATCTG ACTCCTCTAC TGGGTTTTAG GTTAAATGCTT
2581 GCGGCGTTCA ATAATAGATGG CTGTGTTCCC ATAGGCGATG CCACGCGCTG GCTGAGGTTG
2641 TGCACTCTAC GTGAGSACAT GTGTGTGCTA TCTGCTTTCC TAATCTATAT ATTATCTCAT
2701 GCTTGTAAAT CTGGCTCAA TGAATGTGCT CTAGCATCTG CAAACTTAGA GATGATCTTA
2761 TCTTTGATA CTTATCATGA GACTACTCCT TACATCGCTT GTCTATTGCT CTACCTCCAG
2821 GTGTGCGCCC GCGCGGCGCTT GCGCGCTATG GTGCGCATG ACTGTGCTCG AGGCGTGCTA
2881 TTXGCTGTGT CCGTGTGGGTC GAGCTGTGGC GGGTATTTGT CTTTCACTGA
2941 TGGCGGAGCA TCTCATGCTG GTGGGAGTGT ACTGSCACTT GACTTGTGTA CATGTCTGT
3001 GTCTTCTCTT TTTGSGTGGC AGGTGTTGGC TCTACCAAGC CACTTGAAGC ACATCTATAA
3061 GTTCAGATCT ACCGCTACTG GCGCGAGCTG TATGCCAGAC TCATCTTTGC TGTGCGTGTG
3121 GCTTCTCTCG GACGAGATGT CCAATTGAGT CGAAGCGTGG GTGTGCTTTG GTGTGCTGCT
3181 TGCATGCTCT GCGCCCGTGA GTGCTCTGAA ATCAGCTTGG TCTTCACTTC GTGTGCTCTG
```

【図 29 C】

FIG. 29C

```
6601 CTTCAAGTGC TTTGCTCGAC GTCTGAGCCA ACATCTAGTG TGGGCGGTTG GTGTGGGTGC
6661 AGTTTGGAGT TTGGGTTCCC ATTAACACCG ACTACGACAG CCACCGGGAC TTACGGGCGG
6721 GACATTAGCG ACCGCACTAA ATTGGTTTTG CGGATGGGTT TTGCTGAGAT TGTGGAGTGA
6781 GATGTGGCGG CGCAAGAAAG CAGCGCTGCG GCAGCATCAT GTTGGCTGGA CCGAGCTAGT
6841 GTTGCAATCG CCGTGAAGGG CCCACCGAGT ACAGCCAATG GCATACCTAT CAGTACTTTT
6901 TCTCCACAGC AAGCTATCAA ACTCTCTCTC TGTTCTTTTG ATTCACTCTG CATGTCTTAC
6961 TCAAGTAACC CAAGTAAGAC CTGTGAGTGT TGCTCAGAGG AGGCTGTTGA GCTCGTGA
7021 GAACAGTTG ATACAGCACA AGCATGATG TGTAAAGATC TGAAGGCGCG AAGACGCGCT
7081 GATATGATG CATGGAGGTT TCGTCAAGGA GTTGGGAGC AGTACACGCG GTTGGCTGAC
7141 GAGGATGTTG ACACAAGACG GTCGGTGAAG CCGCCGCGTG CCAGGCGTGC TGTGGGTAGC
7201 TCAACGTTGG AGATGCTTAA CGTGTGACT CTCTTGGCGC AGCTCGGTGA CCAATGCCAA
7261 AATGCTATCA AATTGTAGT CAGTACCGCT TCAAGGTG TGACCACTAT GCCCAGGCGC
7321 CGCAGCGGTC TCTGAGTGT GTTGGAGGCT GTGCGACGCT CCGGACATCT GCACATATC
7381 AAGTTGAGG CACCGGAGT ACCATCTAGT AACATTAATC CAGAGAGGTT TCAATCTGTG
7441 CTACGCTGTG CCGGCTGTAG TGACAGAGCG TTGACTGTTC CGTACGGCAC TTGACACTAG
7501 ACTTTAACCA AACTTTTGTG TAACAAATGTA ACCCATTACA TTCCAAACAA GAGATAGAA
7561 GAAGACAGAG AAGTAAGTGT TATCTGGCGC GTACCAACAA CGCGCGCATC TAACTCATCT
7621 ACTTTAGAG CAGGTGTAGT ATCAGTCTCT TGTGTGACCC CTTTACAAAC TAACTTTAGG
7681 GCGCTGCTTC TAAAGTACGG GTTACCTATC GGGAGATGTT CTGACTGCAA CGGCGCCCTT
7741 GGTGACGACG CCGCAGCTGT TGACGTCAAT GGAATTAACA CTATATGACA ATGACTGCAA
7801 TCTCAGATT GGTTCGACCG GATTTGTGGCA CCAACAACCC CACCTTTGCC TGCAACCCGG
7861 AGCGTGGCTG GCATTTTAGC CGTAGACACA TCGCGCGTPT ACACCAACAC GCGCGTTTAC
7921 GTCTCGGAGA GCGACGCTAA GGTGCAATAT GATCAAAATC ACGCCAAGGT CAGTCAAGTG
7981 TTCCGAGACA CTTACATTTG TTGCTTTGCT AAGGCAAGAA CTTTCAACAA ATCTGGCATG
8041 TCATATGAGG ATGCTGTGTC AAAGATGGCG GCAAAACACA CGCTGTGATA TAACCATGGC
8101 ACTACTTATC AACTTTTGGT CTTCGCGACT CTCTTGGCGC TCGTTCAGAA AATTGTAAAT
8161 CAATAGCGG CTGAGTGTG GAGCGCTCA ATGCCAATPA TCCCAAAACC TGAGGTGTTT
8221 CTTGAGACA AGGAAGACG GTGAGGACAT CGGTCTCATP TTTTCTCTG CTGCGCCGCA
8281 CGAGTGGCGG AAAATATGAT CTTGGGCGAT CTTGGTGGGA TAACAAAGCA CTGCTAGT
8341 GATGCTTACG GGTTTGCCAC TCCGCGCCAC GAGCGCGCGC GCGCTGTGGA CAAATGGTGT
8401 AACCGCGCAA CAGAGGCCACA AGCTATCGCG GTTATGCGGA TCTGCTTTGA TAGCATATC
8461 ACGGCGAGAG ACATGGATGT TGAAGCAAC ATCGTGTGCTG CAGCGCATCG GGACCTCGAA
8521 GGTGTTACG CCGTATACAA TTATTAACA AGAAGGCCCA TGTGTGACAT CACAGGAAT
8581 ATGTGCGGG TGGCTTGTG CCGAGCTCA GGTACGCTTA CAACAAGCAG TTGCAACAGC
8641 CTTACTTGTCT ACCCTCAAGGT TCGCGCGGCT TGCAACGCGG CCGGCAATTA ACCAATTGGC
8701 TACTAATTC ATGGAGATGA CACCCCTTCA ACATCAGAAC GTTGGCGCTCA AGAACTCTCG
8761 GATGAGTTCA CAGAGGCACT TGATGACTAT GGGTTGCCCC ACACCTTCCA GCGCTCTGG
8821 GACCTCTGCT TACTCAGGTT CTGACGCGCA CACGTGCGGA GTGTTTGCTC CCGGGGAGGT
8881 ATGCTTCGCA TGGCTGTGCG ACGGACTCGA CGTGCATPTG CACGCGATTCT CCGGCAAAAG
8941 GCGATGCCAC TGGGTTGATC CAGCAGCTAT ATTGTGATGT ATCTCTACTG GCGCGTGACT
9001 GTCTATGCTG CTTGTGCGCT CAGCGCTGAT GTGCTGGA ATGAGCCATC GCAGCGGGG
9061 AACTTTGCTG GCTGTGCGCT CAGCGCGGAC AGTGTGAGG CTTGCTCTG CTGCTCTG
9121 ACCATCATTT TAATTTAGA TGGTGTGAC GCACTACAAG TAGTCCGTCA CACTGCACT
9181 TCTATGGCGG AAGTGTCTCT ACGTGTGCGC TCTTTTGGCA TGAGAGGGTT GACCTCTGTG
9241 AGCGCGAGAC CCGCTGCCAT CAGGCGCTAT ATGATCAAGT TGGCGGGTGC GAATGCGAAG
9301 TTTGCGCGAGA TGTATCTGTG GTACCGGAG GTGAGAACAC CACAGGCCGA ACCAAGGGC
9361 ATGTGTCTCT TACCACCGGA ACTATGGGAG GTGCGGTACG AAAATTTGCA TTTGAGCAG
9421 ATGACCGCA ATCGTGGTGC TAGTGTCTTA CGGTTTTGCT TGGTTGCTAG TGCTATACTC
9481 GCTCTGCTTT GCTTTGAAAT CTAATAACAA TGTAGTACCA GGACTACAAG CAGGAGGTTG
9541 AAGTCAAGCT TACCACCGG TGCGTGAAC CGGGGCTTGA GACCCCGCCC TATCNNNNN
9601 NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNCCCC ATGTGCGCGC TAAGCGCACG
9661 GCGAAGGCA AGTCTGGGCA ACTCTGCGCT ACCCCACCGC AGGCTACGCC
9721 TGTGCTGGC GAGGACGCTA ACATACAGCT CTCAGCGGTG TGACCTGAGC TATCTTGTA
9781 ACCACTTAAT GGTGCTAATC GAGCCCGGCT TAAGCGCGGCT ACCCGGATGA
9841 GAAGGCTCAA NNNNNNNNN NNNN
```

【図 29 B】

FIG. 29B

```
3241 ACAGTGGACA CCATAGACAC ATGTTAGTAT GCGTGTGTT CCGCAGGGCC GAGTGGCGGA
3301 ACCCTTTGCAA CACTGGCCGA TGACATGGCG GCGTCTGGTG ACCACCGGGC GTTGGCGGCT
3361 TGTGTGCGTT GCTTTTGGAT ACSTGGGACA TACATATACA ACCACATGGG CACGCTTCCA
3421 GAACGGGTGG CGCAACAGAT CAGGGATTTG GCGGCTGTCT TGAAGACAGT C3GTGTTGAG
3481 GAGGCCACCT TTACTGAGGT CGTGGATGAC ACAATGAATT TAGTGTGTGG ACATTTGCTT
3541 GGAGGTAAAG CTGTGTGGCG CCGTGTGGCG AC0GCGTGTCT TGGTGGGACA CTTCAACCTT
3601 GAAGATCTCG CACTTGTGTT CCAGCTGAGT GCTCGGCGTA TTATCGACAA ACCAAGCATT
3661 GATAGCTGGT CCTTCTTTAA GGTGACACTC ACAGGCGGTB CTGAAGACCC GCGATCGGCT
3721 CAGATCTGG TGTGTTCTC CCGTACAGGT CGCTACATGG GTACTGCAST GATGCGACA
3781 CTGATGSGA CCGGCGATGG TCGTGTGGCG CCGGCGCTAG CCACTGCGCG CGGTTTGAAG
3841 AGCCCACTTT ACACGGCATT ATCTGATAGT GTCTGGGCTT ACCTTTCCTT CCGGCGCATG
3901 AGTTTCCCTAG AGCCCTCCCG CTGTGCGCGG AC0CGGGTTC GGGTGTAGAA CAAACAATGA
3961 GGGTGTGGT GTGCGCAGAT GGAGATAGAG GACGTCTGTT TGGACTGTCC CACGACATA
4021 GATCAACTGC GGGGTGCTTC GGAATCGCGG GTCTTGTGTG ATCAGCGTCA TGCATACGCG
4081 CTGATGCTCG GTGGTTACTC TACAGTGGT ATTTTGGCG GTGCTCGGAT AGTCCGGGCA
4141 TGGCAGAAGC CCTATTCTCT CTCAGGGGCG CAGGCGGGA TCGACGGCGC ACCTGTGACA
4201 CCAACATACT CTGAATAAC CTACTATGCC CTTACTGGTT CTGGTAGTCT ACAAAATAT
4261 CAGTGGACCC TGGTCAACA GSGACACAAA CCAATGGTCC TTATACCAAG TGTGGCTGT
4321 GTCAAAAGCA TGGCCCTTCA CATTAAGAGC ACATAAAGA TTAGACTGCA AATTAGGATG
4381 GGCACAGGCG CTGACGGTGT GAGCTGATC AGCTGTGAGA ACTTGGGCTA CATTGACCTAI
4441 GCGCGCTTCT TGTGATCTG GAGACAGAT CTGCAAGGTT ATGCGGTAGT CATTTGGCA
4501 GAGTGTGAGT GAGTATCAT CACACCGCTA CTGCGGATG CCGGTGCGC GATGTGCGT
4561 GAGTATGCT GAGTACAGCT CCGTGTGCTT CCGCTGCTG CTCTCTGCTG
4621 CAGCCACAC CCAACTTGA TGAATATTA TTGACATATG AAGGCGGAGT GSACTTCTAC
4681 GCGGCCAAAA TCAAAATGGA CAACATCAGA ACTGATAGC ATGTATCTT TGTGCTACG
4741 AAGGCCAGGT GCGCGAATC AACGCAAGC GTCTCGCGC TTGGCGTTCA TGCATGAGT
4801 TTTTGGCGCG GGTGTGACAT CAAACCAAT CCGCGCTGAG GCTCTATTGT TGTATGAGCA
4861 AGTATGCTAT TGTCCACAGG CTTCAGAGA AATTTGATT CCGTATCGCA TCGCGGGTGT
4921 TCGGTAGAGC AACTGTGAC AATGTACAT GACCCACGT CCGTACGCTA G3CCCGAGTG
4981 GTGCGATGTA CTGCTGACT GCGTATGAC CAGCGCGGAC GCACCGGTG TGGCAGAGG
5041 GAGCGGTACT ACACAACCA TCCAGGACA TCGACCGTCC TCGACGGTCC TCGATGTAC
5101 GCTTGGCAAG CAGCGGAGAG GCGCATGTCT TTTATGATT GGAATGCTCG TAGGATACAS
5161 CAGTGGCTG GCGCATACCA TGACTTAGAG TGATACACC GATGTGGTGT TGACCCACAC
5221 ACTCCAGTGT GGGTATGGA CACACTGAGG GCGTACTGTC CGACAGCTGA GGTGACGACT
5281 GCGAGCTTGC CCGGAGAGA CTGTGCGGCT CTTATGGTG TCGAGTGTG CATCTGAAA
5341 GAGACGAGG CCGACGCGCC AGATGATGCG ATCAGATGGA AGTGTATTCT ACGATATCT
5401 AATAAGAC CCGTGTGCTA TGTGTAGAC AATCTACAC TGAATATAC TACCAAGAT
5461 GACTTGACT CCGGTATAGC GCGGCTTTA TGAAGACAT TTTCTGTTGA ACGAGCGTAC
5521 GCGCCATCTG TCTTCTGCTG CCGCGTTTG GCACTCTCTT TCGCTTTTG CCGCGCCAT
5581 GAGACTTAG TGGCGTGGC GGTTTGAGAG GTTGAACAG GTAGGCTGCT GGTGACCGT
5641 CCGGAGCGGA CAGACGAGAC TGGGGCTAG CCGCAGGCTT TGTACTAAGC CTGCGGAGAT
5701 TCAAGGAATT TCGCCACGTT CGAGGGACA GCGTGTGCG GCTCTAGCAA ACTGGCGAGT
5761 CGCAGTAGGG GTGCTAGTCA ATATCTGGCA CGCGCGGCT CTCTGCGCGC CCGCTGTG
5821 GAGTGCTGC AGTTCTCTGA GACTTAAC TT AGCTCATG CATCTCTG TGGCTGTG
5881 GCTGGTGTG AGGCTGGGA GTCTTACAC GCACTTGGC GGTGGTGTG C3GCGCTAC
5941 CAGCGCTTG GAGGTGCCA TAAGTGGTT TGGCTATTG GACAGACTGT GCTGTTTAG
6001 CTGACGACCG GCGCCGCTG GCGCATGTT TGGGCGCTCT CGGTTGTAG AGGCTGTG
6061 ATCGGAGTGT TACCGGGCT TACCGTCTG TTACGTTGCT TACGCTGCTG GAGGCGGCTG
6121 GTGCGTGTG CCGTGTGAG ACAGAAAATC TGTGCTGTT GCGGTGACAT GACACTCTG
6181 TGAAGATCT TACTGCTCAT CTGCTGTGCT GCGGCGGA CAGCTGTGCT CTGCTGCTG
6241 TTTATCTGA TGTACATGAG TGGGCTAATC TGGGCTAATC GCTTATGTTG CATGTGTGA
6301 AATCAACCA TTTGTGAAA TTACTTCTG ACTAGAGAT TGGGCAACA ATTAAGCAA
6361 ACTTCTCTT GCGCGCTGT GTACACTTGG CAGACGGCG CCGGCGGACA CAGCACTG
6421 GGTGGTGTG CCGGAGATCT GAGCTTTGCG TGTGGCTGCT TCGCAGCTGT GTGGGATG
6481 CCGGCTAGG ATGTGCCAC GCTTCCGTGT CCGATGATT GCTGCTCAC TGCATGTTG
6541 GCGCGCTGG TGTGACCG CACTTGTGT ACCACTGTG GGTGTGAGA ACTGTGTC
```

【図 30 A】

FIG. 30A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0030P, US) 遺伝子および非翻訳領域

5' タンパク質および遺伝子配列

5' タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 420)

MGSTDTDTICSPVVGADVTSGGCKALAGSYHCGGSGCSRPSRVQVARVQLQSAFLALIGSGMCSIRSKTEGRIE960

5' タンパク質遺伝子配列: 配列番号 419 のスクレオチド 328-564

5' タンパク質および遺伝子配列

5' アミノ酸配列: (配列番号 421)

YKHQSRACSTEGFAFTSYNCHQSDIMKHLRWCVTRPGWLCTGHATIPVQWYLGSGVSRPFRMHGAEALLRLIGTAS  
HIALHARALGSPFYAAITCPGFTAKYQSGTPWHTCTVCPGPAVNTSPYSFSGDPTAFGTWTLQLGSLAQMPVFPFIIYSTW  
LRLMLSGRTAVVAILLASTPYMA

5' 遺伝子配列: 配列番号 419 のスクレオチド 565-1137

5' タンパク質および遺伝子配列

5' アミノ酸配列: (配列番号 422)

YKHQSRACSTEGFAFTSYNCHQSDIMKHLRWCVTRPGWLCTGHATIPVQWYLGSGVSRPFRMHGAEALLRLIGTAS  
HIALHARALGSPFYAAITCPGFTAKYQSGTPWHTCTVCPGPAVNTSPYSFSGDPTAFGTWTLQLGSLAQMPVFPFIIYSTW  
LRLMLSGRTAVVAILLASTPYMA

5' 遺伝子配列: 配列番号 419 のスクレオチド 1138-2199

5' タンパク質および遺伝子配列

5' タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 423)

SYLHSDIAVKNCAEFTSGTCAITNDVLCLEVAARISGCGHAPPPDRGRIEVPAAHSAISRITGLTFDVFESIQYFPTVPS  
NNTDITGCGEFTFDDIYVFPFLGLLLYL7PLGFLYLAGENIDGLPFRHZAALRFSRATMCVSAFLIYLS  
HVPVLAALNPLASANLEMI7SUTYH7ILYIACLLYLQVSPHAGLAALVAKLSHGLH7AVVLAAGVC

5' タンパク質遺伝子配列: 配列番号 419 のスクレオチド 2200-2910

## 【図 30 B】

FIG. 30B

NS2タンパク質および遺伝子配列

NS2アミノ酸配列：（配列番号424）

REGRVFLGVEVCAIDLSWLVETGSGTWNMSVFSFKCAVFAFTSPGGRHYKLQYRYWAQYTAALLAVGCGPLGRPFEPKASV  
GVLAGGACMLAPRECSTSLVFLICALTVDTITWIVACLSAGSPARTLALADIMARFEDHRAIRAVIRCFGRSRETYTYNM  
GGVSERVAQAVRDFGCGLEPVVLEBEPFTEVVVDCTMGLVCOQGLGGKPVVAECGTRVAVCHLNPELDLPFGQLS

NS2遺伝子配列：配列番号419のヌクレオチド2911-3630

NS3タンパク質および遺伝子配列

NS3アミノ酸配列：（配列番号425）

AEVITKPSIGTWSFLRACTLGRADTFSGGQIVVLESLTGRSMSTAVSGTLVATGHGAGANGLATCAGIRLPLVYALGSDVVA  
YSLCPGMSLEPCPCPSPSRVVMNNNGSSVGRVRENEDVCLDCTPHIDQLRSAGSPVLCDHGHAYMLGGYSTEGICARVR  
IVREWQNAVSSSGGGGGQAPAVTPTYSBITTYAFTSGGSKSTRYPYDVKQSHKVLVLIKFSVAVVSMAPIKRETKIRFEIR  
AGGVDPGVVTITGEALLAMTYIGKFLVDPEKNLQGSAYVLCDECFDTSSTTLISLIGAVNHAEKAGVHIVVFAZAFVAGIQQVP  
HPTVTPYVITVTRGVDPVPSAKTKLQNFTRGRHVIKFSHAKARCAITQQLAGLIGVAVSPKRGDDIKTIPASGTVVATDIAAS  
TGTQTFHDSVITDOCCGVSDTYTIMDPTFSISAZVPCTAALRMQRCEGTGEGRGAYIYITTEGAAPEVSPVDANVWQALESA  
NVFYDNNAAIRIQCCLAAYHDLGCTPRKICDPHTEFVRVMDLTALYLRPEVYTAALAGEQKPLLYGVQLGICKETEAHGFDDGI  
KXKCLNNNTKTLVVALDNPTELEPTDHDTRFVADLSSTVFEVA

NS3遺伝子配列：配列番号419のヌクレオチド3631-5514

NS4タンパク質および遺伝子配列

NS4アミノ酸配列：（配列番号426）

GIGFILLAGALLAASFAFAGATGALVFSATVSVNDSGPAVT

NS4A遺伝子配列：配列番号419のヌクレオチド5515-5637

NS4Bタンパク質および遺伝子配列

NS4Bアミノ酸配列：（配列番号427）

REDRPETHALAEGLRYQACADSGSLIASLQGTACALSKLADASFASQYLAARAPFSPAPLVQVLPLETHFSSIASFGLLCAG  
CGAGCEFTLHGLVSGTAGLGGAMKALLAIACTHWSLSLOTQPGKQVAGLEVAGCCICSVTCLDPLPOCLTGHFAVVOBAR  
ATQKILSGSADNTLVLDLPAIFSPGASIAGVVLFVLSNSSVTTMNRLLSMCAKQICENTYLFITERPGQQLSKLSLWRZVY  
HKAQAREGGYTQCG

NS4B遺伝子配列：配列番号419のヌクレオチド5638-6423

## 【図 30 C】

FIG. 30C

NS5Aタンパク質および遺伝子配列

NS5Aアミノ酸配列：（配列番号428）

VVGIGHSFALCVLRAVHDMARHVPFFVYPKVGCSPAKCGRMGTGTLTTCGGGSEYVSLQCLGSTDPTLSVGRMCRCSWSV  
GFPPNPPTTIATGTREDP13DRTKGLFRYGVABIELEKRDHMKVCAASCCVRAGVASVAKPVPYANGIPISFPPEZSVK  
LSLCSFDSVCMNSNSNPAKTLVSCQSEAVLELBETVDTAQAQVCKNLEARRRAYDAQVRQAVGDEWTVLADDEVDTTASVK  
DTVPARAAGSSLTDDVNWVLCVRELGDQCCNAIKFVVOAASRFVDPVDRDRTVSGVLERVMCMYRTPKIFEPAPVPIHHII  
PBECHIVLRCTGCSQDALVYPGCTGTCTKHLTKNKSHPKQKIEEDTEFVIVCAVPTIRASKLITFRASDRSVSCCHPLQ  
TTRALLKLXGPIGK#SDCKGLPGDDRVCDVNGVCTYEDC

NS5A遺伝子配列：配列番号419のヌクレオチド6424-7794

NS5Bタンパク質および遺伝子配列

NS5Bアミノ酸配列：（配列番号429）

NQSYSHRPIVAPITPELFATRSVAGILRADCSRVCYTITAVDVSERQAKVTIDQTSAKVQCERDYNCLLAKAKTKFKQSGXS  
YZDAVSKMRANTTRDINHGTITSLVSGRAKPVVOKVGNOMRAGVDAAMRIIPKEVPVFERDEIRKPFPIFVEGCAARVAD  
KMLGDPGAIKTHVLSDAYGFATPPEFARLLEQXNRRATEPQAIADVAICFDSITIAEIMDREANIVAAHADPEGVHGLYN  
YKRFSPMGDITGHVGRVCCRASGTLTSSGNTLTCYKVRAACTRAGIKPIGLIHGDDTLIERCAGETLDEFSRALDLY  
NDEPOTGTFTVTLVHGNSVSPVWMLPTIIVNLUGSDALQVREITAAISMAGLSALAFPMRGLXCMRRRAIRRAIMDKIVS  
WNAFNAQMLLWSEFVRTPQPEPRGNCLLPELWIERPEENLHSTIDNRGASRDFWLVASAILALLCL

NS5B遺伝子配列：配列番号419のヌクレオチド7795-9495

5' UTR配列

5' UTR配列：配列番号419のヌクレオチド1-327

3' UTR配列

3' UTR配列：配列番号419のヌクレオチド9496-9864

## 【図 31 A】

FIG. 31A

ヒトベギウイルス2 (ABT0041P, US) 核酸配列—配列番号430

1 NNNNNNNNNN NNNNNNAATGC GCATATTGCT ACTTCGGTAC GCCTAATTGG TAGCGGCCGG  
61 CGCGACGCGCG CGCGCCAGAGGG CCTAGTAGGA CGTGTGACAA TGCCATGAGG GATCATGACA  
121 CTGGGGGTGAG CGGAGGAGCAG ACCGGAAGTCG GGTGAACCTCG ACTCCGAGTG CGACCAACCTG  
181 GCTGTGTCGT TCAATGGAGGG CAGTCCGCCAG GGAACCGCTGA TCGTGCGAAG GSAATGGCTCC  
241 CTGGCACTGGT GCGATCGCGCG GCACCACTCCG GTACAGCCCTG ATAGGGTGCG GCGCGCGCGCC  
301 CCCAGTGTGA CGTCCGTGGA GCGCAACATCT GGGTGTTCAA CTGATCAAACT CATTTGTCTCT  
361 CCAAGTCGTGG GCGGCGCATCA TAAATCCTCC TGCGGCTGCC GGGCTCTAAA TCGGAGCACTAC  
421 CACTGCGGGTG GTGGCTCTTG CGGGTCACCA AGTCTGTGCG AGGTGCGCGG ACCAGCTCTTG  
481 CGGCTGTGGCG CATTCCTTGG GTTGATCGGA TCCGATATGT GTTCCGATCG GTCCAAAAGCT  
541 GAAGGCGCGCA TTGAGTICAG GCAAAATATG CAGTCTCAGC GCGCATGTGT GACTCGGTGAG  
601 GGTTCGTCTT TCTTTCTCAA CTGTTCGAAI CAATCATGTA TTAGTGCTGT TTGCGACCGT  
661 TGGTGTGTA CAAGACCTCG CTGTTTAGTG TGACCGGGCA ATGCCACTCA TCTCATCTCG  
721 TGGGCACTATC TTGGGTCCGG TGTAAGTCGG CGGCTCGCAC GTCGAATGGG TGAAGGAGCT  
781 GAAGTGTCTTC TTGCTGTAGT CGGCAATGCA GGTGTGGCTCG GSGTGTAGG TGAAGACTCTT  
841 GGTATGTCCG AATTCATATG AGCTATCTTA TGCTTTGSAI TTATTCGTTG GTATGGCTGG  
901 CGCTATACCTA AATCAATTGG TCGCCACGGTC TGCCCTCGAG TGAACATTTG TCCCTATAGG  
961 TCTTATCTTC CAGATACTAT CCGATTTGGT ACGTGGATAC TACAACTACC TGGCTCTTTTG  
1021 TTGGCAAAATG TTGGCAACTT TCTTATCACT TACAGCACTT GGAATCTTTG GTTGTGGCTG  
1081 AGCGGCAAGA CTGTTGCTGT GATAGCAATC CTTTGGGTGA GTCCATACGGT TATGGCACTG  
1141 AAGCATCAAT CTGAAGAGCTA CTTCAAAATC CCAATGCTAC AACTGCTATG CAGTCACTAC  
1201 AATTGTGTACT GCCCCTTTGG AACCTTTACT CGTAACTACT AGTCTCGTTT CTCTATACCT  
1261 AGATTCTGTCT CTGTTAAATAT TGACAGCTCT ACATTAATCT CACTGTGGGG GTGCTGGTGG  
1321 TGGTTTGTGCT AGAAGCATCAC GCGTCUATAT TGCGAGCGTG GCATGCGCCG AGCAGCGGATG  
1381 TCCGCTTTGT GCTATATCTA TCGAAACAAT GAGCCACTTC CTTGGTATCA TACACAACTC  
1441 ATCATACTCT AGAACCTGCG CAATCTCTCG GGTACATCTA CCACCTGCTC ATGCGGTGAC  
1501 AAGTGGGGCA ATGCAACTCG TTGTATCTCT GACCGCGGCT CGCGGTCTCG CGGGAGCACTG  
1561 TATGGCGGGTT GTTCTATATG TATGGCACT CAGATCSAT CCTGGGATCG ATGCGGGATG  
1621 GGTATCCGTC ATGGACATCAT AGAGTTTGTG CAGCTTGCTG AGATTGCAAC CAACATCTCG  
1681 AATACGACCA CTGCAACTCGT CGCTGGCGCG TCGCTTGTA TCGCATCCGG TCTTCGGCGCT  
1741 GGCTACGGTT GCAAGCGGTG CGAGTGGCGTG GTGCATCTGT ATAGGTGTGG TTCAATATGCT  
1801 GACCTTTGAC AGTTTGTGTCC GGGTCTCGGG AATAGGCTGC CACTGCTCG CAGAGCTGTG  
1861 CGCGAGTTGT GTATTATACC TCAGTGGGCG AGACCGGCGT TCCGGGTATC TAAACAACCTC  
1921 TTAAGCTTTG CTGAAGACTT CGTGTAGGAC ATTFTTCTAG CAACCPTTTC ALACCCGACCT  
1981 CTTGGCGCGTG TACGTGTGTG TATCAATATCT GCTTTTCTAT CGAAGGGAGG CGGCTTTGTG  
2041 CAGCTCATCG GAGAGCGTCA GGTGTTTAACT CATTAACTAT CATCTTGCTG TCTCTGCTG  
2101 ACTTTAATAT CCTTTATTTT GTTAGTGTGT GTTGTGCTG GCGCGGGATT CGTCCGATTG  
2161 TTTATCATAT TTGCTGGAG GTCGGGTCAC GTATATGCTT CTGTGTACTT AAGCTGTGAT  
2221 TGGGCTGTCT GCAGAGCTGC GTTCTGTTTC ACATCTGGA CTGTGCTGAC TTTCATATAG  
2281 GTCTTGTCTG TCGGGTGTGC GACCGCGGTA TCGCTGCTGG GCGATCGTGT ACCACTCTCC  
2341 GAOCGTGGTT TGGAGSGTGC TATGGCGATG TCAATGGCGA TCTACAGAAC TACTGSGTGG  
2401 ACGTTCGATG TCTTTTCTCT CAICOCAGAT TTCTCTACTG TGCCGCGCA CAACACTGAT  
2461 ATCATTTTACT GTGGTGACCT ACCTTTCTTC GGGGACATCA CCGGCACTCA TTGGCCTGAT  
2521 TTTTTCGCTG GCATGTGTCT CTGTGACTGT ACTCTTTTC TGGGTTTAAG GTTAAATGCT  
2581 GCTGGCTTCA ATATGTGATCT TGTGTTTCCC ATACCGGACG CACGCGCTGC ACTAGAGTGC  
2641 TGCACTTCGC GTGTGACCTT GAGTGTGGA CTGTGTTCT TAACTATAT ACTATCTCAC  
2701 CCTGTTAAAT GTGCTGCTAA TGAATGATTC TACAGCATCT CAAAATTAGA GATGATCTG  
2761 TCTTTTGACA CTTATCATAT GACTATTTCT TACATTTCTT GCGTGTGCTG CTACCTCTGA  
2821 GTGTGCGCCC GCGCTGGGCT GAGCTGCTAT GGTGGCGTCA AGCTATCTCG AGGCGCTTGA  
2881 TCGCGCGTGG TGTGGCGGCA CGGAGTGTGC CGACCGGGCG GGGTATTTG TCTTGAAGGT  
2941 TCGCGGGGCA TCACTTGGAT ACTGGGATTT ACTGGCAACT GCGATTTGTA CATGTTCGAT  
3001 TTTTCTCAT TTTGGTGGCG AGTGTTCGCG TTCAACAGTC CACTGCGACG ACGGTTAAAG  
3061 CTTAGACTCT ACGGCTGTC GCGCTAGCTC TAGCCAGAA TCATCTCCG TCGCGGTGTG  
3121 GCTGCTCTCG GACGSGAGTT CCAATTCCGT TACGCGCGTG GTGCGTTTGT GGTGSGTGTG  
3181 TGCAATGCTCT GGCCTCGTGA GTGCTCTGAA ATACGACTGG TCTTCACTTC GTGTGCTCTG

## 【図 31 B】

FIG. 31B

3241 ACAGTGGACA CCATAGACAN NNNNNNNNNN KNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN  
3301 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN KNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN  
3361 GTGTGCGGTT GCTTTGGATC ACGTGGCACA TACATATACA ACCACATGGG CCAAGTCTCA  
3421 GAAACGGGTGG CGCAAGCAGT CAGGGATTTG GCGCGTTGCT TGGAACCACT CGTGTTGGAG  
3481 GAGCCCACTT TTACTGAGGT CGTGGATGAT ACAATGAGTC TGTGTGTGGG ACAATTGCTP  
3541 GAGAGGTAAAC CTGTGTGGCG CGGCTGCGCG ACGCTGTGCT TGTGTGGGCA CCAACACCTP  
3601 GAGGACTTTC CACTTGGTTT CCAGCTGAAT GCCTCGGTGG TTATCACCAA ACAAAGCATT  
3661 GGTACGTGGT CTTCTCTTAA GCGCACACTC ACAGGGCGTG CTGACAGAAC GGGATCGGCG  
3721 CAGACTGTGG TGTGTGCTTC CTGACAGGT CGGTGACTAC GGTGACGAGT GAATGTGACA  
3781 CTGTATGCGA CGGCGCATGG TGCTGGTGGG CGCGCGCTAG CGACTGGGCT TCGCTTAGG  
3841 ACCCGACTTT ACACCGCACT ATCAGATGAT ACTCTGGGCT ACTCTGGGCT TCCGGGACAT  
3901 ACTTCCCTGG AGCCCTGCTG CTGTGTGCGC AGCCCGGTTT GAGTATGAA CAACATGGA  
3961 GCGTGGTGTG CTGCGCAAGT GAGGACAGC GACGCTCTT TGGAGTCTCC CACGCGATG  
4021 GATCAGCTGC GGGTGGCTCT GGGTCCACG GTTTCTGTGT ATCAGCGTCA CGATACGGG  
4081 TTGATGCTG GTGCGTACTC TACCAGCGGT AATTGTGCGC GTGTCCGAGT ACTCGCGGCA  
4141 TGGCAGAAAG CTTATCTCTC CTCAGGCGGG CAAAGCGGAA TSCAGCGGCC ASCGTGTACA  
4201 CCAACATACT CTGAATACAC CTACTATGCG CCTACTGGTT CTGGTAAGTC AACAACAATP  
4261 CCASTGGACG TAGTCAACCA GGGACACAAG GTCTTGGTTC TTATACCAAG CGTGGCTGTC  
4321 GTCAAAAGCA TGGCGCCCTTA CATTAAGGAG ACATATAAGA TTAGACCTGA AATTAGAGCT  
4381 GAGGACAGGCG CTGACGCTGT GACGGTCACT ACTGGTGAGA ACTTGGCTGA CATGACCTAT  
4441 GCGCGTTTTC TCGTGGATCG GGAGACGAAT CTCGCGGGTT ATGCGCGATP CATTTGGCAG  
4501 GAGTGTACAG ATACATCATC CACCACTGTA CTGCGGACTG GCGCAGTGG CATGTATGCC  
4561 GAGCAAGCTG GAGTGAAGAC CGTGTATATC GCCACAGCCA CTGCTGCTGG TATCCAAGTA  
4621 CAGCCACATC CAACATTTGA TGAATATTTA TTGACTTGAC CAGGCGGAGCT GGAATTTCTAC  
4681 GCGGCCAAAA TCAAAATTGA CAACATTAGA ACTGGTAGAC ATGTTATCTT TTGTCACTCG  
4741 AAGGCCAAGT GTGCGGAATC ACGGCAGCAG CTCCTCGGCC TTGCTGTGCG TCGAGTAGT  
4801 TTTTGGCGCG GCTGTGACAT CAACACATTT CCGCGCTCAG ACTGATATGT TGTGGTGGCA  
4861 ACTGATGAT TGTCCACAGG CTACACAGGA AATTTGTAT TCGTCAATGA CTGCGGGTGT  
4921 TCGGTAGACG AACTGTGAC AATGACATG GACCCACGCT TCTCCATCTC GSCCGAGTA  
4981 GTGCCATGCA CTGCTGCAAT GCGAATGCA GCGCGCGGAC GCACCGGTGC TGGCAGAAAG  
5041 CCASTGGTACT ACACAAACAC TCCAGAGACA GCACCCCTGCG TCAAGCTTCC CGATGCTAAC  
5101 GTCTGGCAAG CAGTGGAGTC AGCCATGGTC TTCTATGATT GGAATGCTCG CAGGATACAG  
5161 CAGTGTCTGG GCGCATACCA TGAATTTAGG TGTACACCA TTACAGCTTG TACCCACCA  
5221 ACTCCAGTGC GSGTGAATGA CACACTGAAG GCGTACTTGC GCAAGCTGGA GGTGACGACT  
5281 GCGGCTCTCG CAGGAGAGCA GTGGCGCGTG CTATAGCGTG CTACAGTTGT CATCTGCAAA  
5341 GAGACCGAGG CCGCACGCTC AGATGATGAG ATCAAGTGG AATGTTTACT CAATACACAA  
5401 AATAAACAAC CCGTGTGTA TGCTTTAGAC AATCTTACAT TGGATCTCAC TACCCAACAT  
5461 GACTTGACTC GCGCTGATCG CCGCGCTCTA TCGAGAGACAG TGTTGTGGGA GAGCGCGAT  
5521 GCGCCCATCC TGTCTCGTGG GCGCGCTTCT TGTGCTCTCT TCGCTGTGCG GCGGCCACTP  
5581 GCACTTTTAG TGCGCTGCGC CGTITGGAGT GTTGACACAG GGGCTACTGG CTTGACCGGT  
5641 CCGGACCGCA CAGACAGAC CGTGCTGAC TGTGACGACT TGTACGACTG TGTGCGGCTG  
5701 TCAAGAACTC TCGCGACTCT GCGAGGACAG GCGTGTGCGS TTACAGTGTG CAGGCGCGAT  
5761 GCGAGTAGGG GTGCTAGTCA ATATCTGGCA ACGCGGCTCT CTTCCGCGCG CCGCTGTGTA  
5821 CAGAGTGTCT AGTTCCTGGA GACCACTTT ACCTGCAATG CACTTTTCGG TGTGCTCGT  
5881 GCTGGTGTG AGGCTGGTGA GTGCTTCACT GCGCTTGGCG GGTGGTGTG CGTGCTACA  
5941 GCTGGCTTGG GAGGTGGCCA TAAGTGGTTG TTAGCTATPG CAGGACCTTG CGATGATTAG  
6001 CTGACGACCG GCGCCCGTGG CCGCATGGTT GCGGCTCTCT CCGTGTAGC GGGCTGTGTC  
6061 ACTGCGGGTG TCACCGGCTT TGACTTCTGT TTTGGGTTGG TTTGGGTTGG GAGGCGCGTG  
6121 GTGCTGTCTG CBTGTGACAG ACAGAAAGATC TTGCTGTGTT GCGGTGATAT GACCACCTGC  
6181 GATGATCTCT TACCTGTCTCT CTTTTCCTCT GGTGCTGGCA TGGTGTGAT CAGTCTGTCT  
6241 TTTATTTCAA GCGACCAAG TGTACCCGA TGGGCGAATC GGCTATTTG CATGTGTGCA  
6301 AATAAAGCAA TTTTGTGAAA CTACTTCTTA CTACTGAGAA TTGCGCAAGA ATTAGCAAAA  
6361 CTTTCTTTGT GCGGTGTGCT GTACCACTTG GCGCAGGACG ATAGGGGGTA CACACAGTGC  
6421 GCGTGGTGTG CGCGGATCTG GAGCTTTGTC CTGAGCTATC TCGGACTGTC TGGGATTTGG  
6481 GCGGCAACG ATGCGCACG GTTCGTTGTC GCTGATATG CTTGCTACG TCGGCTGCTG  
6541 GCGCGCTGGC TTGTTACTGG CACTTGTGTC ACCACCTGTG GGTGTGGAGA ACGTGTATCC

## 【図 3 1 C】

FIG. 31C

```
6601 CTTCAATGCC TTTGTTCAAC ATCTGACCCA ATACTCASTG TGGGCGGTTG GTGCGGTTGT
6661 AGTTGGAGTG TTTGGGTTTC ATTCACCCCG ACCACGACAG CCACCGGCAG TTTACGGCGG
6721 GACATCGCGG AGCCACACAG ATTTGGGTTTC CGGTATG3CA TCGCCGAGAT CGTGGAGCTA
6781 GAACCGCGGG GCGACAAATG GCATGTCCTGT GCAGCATATT GTTCTTTGGA CCGAGCTAGC
6841 GTTGACATCG CTTGTGAAGG CCGTCCGGTC ACAGGCTAATG GCATACCTAT CAGTCCCTTTG
6901 TCTCCACCAC AACTTATGAA ACCTCTCTCT TCGCTTTTGG ATTACAGTTTG CATGCTCTAT
6961 AACTCATGTA ATCCATCTAA GATCCCTGAGT GTGTGCTCTAC AGGAACCGCT TCGACTCTCTC
7021 GAAGAACAAG TCGACACGGC ACAACAATG ATGTGTAAAA ATCTGGAGGC GCGAAGACGC
7081 GCGCAATTTG AGCATGGGCA AGTCCGCCAA CGAGTTG3CG ACGATACAC ACOCCTTG3CA
7141 GATGAGGATG TCGACACGAT AACGTCCGGT AAACCCCCGG TGGCCAGGGC TGTCTGTGGT
7201 ACCTCAACCT TCCATGATCT TGGCCTCGTC ACTGCTCTTC CCGACTCTCC CACCAATGCT
7261 CAAAATGCTA TCAAAATTTGT AGTTGAAGCG GCCTCACGGT TTGTTCCACC AGTGCCCAAG
7321 CCGCGCACGC GTGTCTCGGG TGTGCTGGAG CGTGTG3CA TGTGCTAGCG CACGCCACCA
7381 ATGAAGTTTG AGGCCGCCGC AGTACCAATC CACAACATAA TCCACAGAAA ATGTCAACTT
7441 GTGCTACGCT GTACCGGCTG TAGTGACACG GCCTTTGACTG TCTCGTACGG CACTTGCACCT
7501 CAGACTTTAA CAGCGCATTT GACTAACAAA CACAGTCACT ACATTCCAAA ACAGAAGATA
7561 GAAGAAGACA CAGAAGTAAC TGTCAATTTG CGCGTAC3AA CAAAGCCGCC AAGCAAACTC
7621 ATTACTTTCA GAGTAGGTGA TCGATCAGTC TCAATGTT3TC ACCCTTTGCA AACTCTGTTT
7681 AGGGCCCTGC TTCTAAAGTA CCGGTTG3CT ATCGGGAAGT GGTGCTGACTG CAACGCCCCA
7741 TTGCTGTGAG AGCTTCGAGT CTCTGAGCTC AATGAGATGA CAACTTATGA ACGATGCATG
7801 CATCTCTACG GTTGETTTTG ACGGATTTG GCACGACAAA CCGCACTTTT GCTTGTAACT
7861 CCGAGCGTGG CTGGCATTTT ACGGCGACAG ACATGCG3CG TTTACACAC AACACGCGTT
7921 GATGTCCTCG AGCCGCPAGG TAAGGTCAGT ATTGATCAA AGTCAGCCAA GGTGATCTAG
7981 TGTGTCGGAG ACACATACAA CTGTGCGCTT GCTAAGG3AA AGACTTTCAG ACAATCTGGC
8041 ATGTGCATATG AGGATGCTGT TGCAAAAGTG CCGCAAAACA CCACGCGTGA TCATACACTT
8101 GGCATCACTT ATACAGATTT GGTCCTTGGG CCGCAAAAAC CTGCTGTCTA GAAAATTTGA
8161 GATCAAAATGC GCTCTGGAGT TACAGACGCT CCAATG3CA TTATCCAAA GCTCTGAAGT
8221 TTCTCTCGAG ACAAGTCAAC ACGGAAGCCA CCACGGTTCA TCGTTTTCCT TGGGTGGCCG
8281 CGACGAGTGC CGGAGCAAAAT GATCCTGGGC CATCTG3TG CGATTAACCA CACGCTGCTG
8341 GGTGATGCTT ACGGGTTTGC CACTCCGCGC CATGAG3TG CGCCTCTATT GGAACATGCG
8401 TCGAAGCCGC CGAGCGAGCC ACAGGCTATC CGCGTTGATG CGATCTGCTT TGAATAGCAC
8461 ATCAAGCGGG AGGACATGGA TCGGAGGGCC CACATCGTGG CTGACGCGCA CCGCGACCCA
8521 GAAGGCTGTC ATGGCCTATA CAATATTATC AAAAGAAGCC CCATGTGTGA CACACAGGA
8581 AAGATTGTGC GCGTCCGCTG CTCTCGAGCC TACAGTACGG TTACACACAG CAGTGGCAAC
8641 ACCTCTACTT GCTACTCTAA GGTTCCGCGG GCTTGCACGC CGCTGCGCAT TAAACCAATT
8701 GCGTCTACTA TCTATGGAGA TGACACCGTC ATTATCACGG AACGTTGCAC TCAAGAACTT
8761 CTGATGAGT TACGACACGC ACTTGATGAC TACGGGTTTC CTCACACCTT CAGGTTGCTT
8821 GGGGACCTCT CGTCTATCGA GTGCTGTAGT CGACGTTGG ACAGCGTTTG TCTCCAGAGA
8881 CGTATGCTCT CGATCTCTCT CCGACAGCGT CCGAGCTGCA TCGCACCGCA TCTCCGACAA
8941 AAGGGTGATG CACTGGGTGT TATCAGACGC TATATTGTCA GTTACCCCTAC TGCACCGCTG
9001 ACTGCTTACG TACTACTGCC CCGTGTGTC ATGCTCATTC GGAATGAGCC ATCGCAGAGC
9061 GGGACATTGG TGACGCTGAC AGTCCACGCT AACAGTGTGA GCGTGCCAGT GTGGCTGCTT
9121 CCAACCATCA TTGCAAAATT ACATGGCCGT GACGCACTAC AGGTGTCCGC CCACAGTGGC
9181 GCTTCCATGG CGGAACTCTG CTCACGCTTG GCGTCTTTTG GCATGAGAGG GTTGAATCTG
9241 TGGCGCGGGA GACGCCGTGC CATCAGGACT GACATGATCA AATTGGGCGG GTGGAATGCG
9301 AATTTCGCGC AGATGTTACT GTGGTCACCG GAGGTAAGAA CACACAGCCG CGAACCAAG
9361 GGCATGTGTC TTTTGCACG GGAACATATG GAGCGTCTGT ACGAAATTTT GCACCTTGAAG
9421 ACGATCGACC CGGACCGCTG TGTGAGCGTG TTAGCGTTTG TACGCTGTA CCGTGTGCTA
9481 CTGCTCTGCT TTTGCTTGTG AATCCTAAAT CAATGTAGTA CAGGACTAC AAGCAGAGAG
9541 GNNNNNNNNK NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN
9601 NNNNNNNNNK NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNCC CCAATGCGC GCGTAAGCGC
9661 ACGGGCAAGG CAGCTAGGCT GAGAGTCTGG GCAACTCTCC CGTACCCAC CCGAGGCTAC
9721 GCTCTGCTCT GCGGAGGACC GTAAACATAC GTGCTCA3GG TGGTGACCTG ACGTATCTTG
9781 TTAACCACTT AATGTCGCTA ACTCGACCCC CGTGCCG3GG ATCTAAGCCG GGCACCGCGA
9841 TGAGGGGGGT CAACGNNNN NNNNNNNNN
```

## 【図 3 2 B】

FIG. 32B

NS 2タンパク質および遺伝子配列

NS 2アミノ酸配列：（配列番号 435）  
RDRVFGLEVDADITWLVETPTGCTHYHSCVFESFACAVFAFTSLPLGRYKLIQIYRWQVYARIILAVGCGPLGRSEFHERAGV  
GAFVCGACHLAFHECESISLVIICALINDTIDIXXXXXXXXKXXXXXXXKXXXXXXXKXVLACFGSGRTVIYHXY  
GQVSEKVAQVDFDGGCLFVPLEETPTTEVVDITNSVCCQLLGGKPVVAPCGTTRVLVSHINPELDLPPGQLS

NS 2遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 2911-3630

NS 3タンパク質および遺伝子配列

NS 3アミノ酸配列：（配列番号 436）  
APVYITKPSIGIWSFLKATLTGRAETFGSGQIVVLSSLTGRSMGTAVNGTLYATGEGAGARGSLACAGLRTPLYTALSDDVVA  
YSLCPGMSLSEFGCCSPSRVWNNINGGIVCGVFEFDVCLIDPHTIDQLRGASGSPVLDHGHAYALMGYSTSGICARVR  
IYRBPQHATSSVSGGGGMAEAVPTPISEIYTYAYPTSGSKSTLYPYJLVKQGHVLVLIKSVAVVXSMAPIKETKIRPELR  
ACTGPDGVYIDIGENVLYMGRLVDPENLRGYAVVICBECHDSSTLLQICAVMYAEQAQGVPT/ENATYPAQIOVOP  
HPNIDVEYLLIDIGENVLYGAKLKNIRTPGRHIVFCIHSKASCAELTQOLSLGLVRAVSPWRSCDKTIPASDSIVVATDALS  
TGVTGNFDSVLCGGCVQTVTIDNDPTFSISARVVCTAALRNQRRGRGTGRGRGAVYTTPCAACPQVNDPNAVYQAVESA  
MYFYDWRNAECQGLAAYHDLGCTPKRISCDPHTFVRVHCTLRXLYRRPEVTTAALGAEQKPELJLVGVQLCICKTEAHGFPDGGI  
KXKCLLNNNNKPIILYALDNPFLBPTQHDLTERRIAGLSSCTVFVET

NS 3遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 3631-5114

NS 4タンパク質および遺伝子配列

NS 4アミノ酸配列：（配列番号 437）  
GYGPILLASALAAAFAGATGACLVSSAVVSDVNGPTGTC

NS 4A遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 5115-5637

NS 4Bタンパク質および遺伝子配列

NS 4Bアミノ酸配列：（配列番号 438）  
RFDATDETVAQRLHACADSGILASJGTACAALEKLACASRGASQYLATAPFSPAPLVQVLQFLZTNFSSIASFGLLCAG  
CQAGRCFTIAAGIVSAGTAGIGCAHKWILATAGTALVSTIQTGPRGHWAGSVJAGCCTSGVCGIDFLPGCITGWEAVVGA  
ATQKILSSADMXLTIVDLLPALFSPGAGIAGIVLVFLSNTSVTAHNRLLSMCAKQTICENYFLTEAGFGQGLSKLSLRAVY  
HNAQAEBSYTCG

NS 4B遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 5638-6423

## 【図 3 2 A】

FIG. 32A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0041P, US) 遺伝子および非翻訳領域

Sタンパク質および遺伝子配列

Sタンパク質アミノ酸配列：（配列番号 431）  
MGQSTDTQTCPSVVGADYNTSSGCRALKNSYHCGGSGSCSPSRVQVAGRVLRLLCAFLALIGSGMCSRSKSTEGRIESGQ

Sタンパク質遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 328-564

E 1タンパク質および遺伝子配列

E 1アミノ酸配列：（配列番号 432）  
ILQSQBACHTGEGFAFTSNCCNQSDINKCLHRWCVTRPSCLVCTGNATHPIWDYLGSCVSRPARRMGEAGVLLRLIGIAS  
WLGLLAETLGMSEFYAAILCFGEAKYVGWGIKPTLVCTVC PAVNISPYSLFSEPDITAFCTWILQLPGLMQHVFNPFIYLSIW  
ILMLLSGRTVAVAILLASPTVMA

E 1遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 565-1137

E 2タンパク質および遺伝子配列

E 2アミノ酸配列：（配列番号 433）  
YKEGESYLKYCTITKASTAMNCDFPGITFRNTSERFSIPRCPVKIDSSTPICESWGSWNWFAENITRYSVDVMPAPICSA  
LCYCYANNPPPPWYHNTIIPQNCRKSSADPTTAPCRDKGNATCILLRRSPFCGDCYGGCFYINGTHDRSDRCIGIGYREG  
LLEHVLQGLQIRPILSKTITELLLAGASLVLASGLRPVQCSRAHGVSVHCYRCPSYADLEQVPLGLGAVVPLPGEVVPVLELCINPQ  
WARRGFRVSNPNISLQTFVVEDIPIAPPCHNTPGRVRYCNHTAFYPKGGGFPQITGDVQVITPHTASLHSTITLISITLILVQV  
VSGARVFLFIIFFNSVRHVYA

E 2遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 1138-2199

Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列：（配列番号 434）  
SCYLSCDAVNCDAFCPTTSGCATFKDVLCLPVATRVSSCHAVPPDRGWEPVPAKMSALSPTTGLTFVFSFIQYPTTVEG  
NNNDIIVCGDPTFGDITGIYRPPVTLPGMLLLYLPFGGLRLMLAGFNIDGLEPFRHATAAARFSTSRVTLSSVLAFLIYCLIS  
HPVLAALNRHFLASNAEMILSEPTYHETILYILCLILXYLQVSPRAGLAANVAVKLSRGLLFAVVLAKVVC

Xタンパク質遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 2200-2910

## 【図 3 2 C】

FIG. 32C

NS 5Aタンパク質および遺伝子配列

NS 5Aアミノ酸配列：（配列番号 439）  
VVGSIHSEVLVCLLAADNDVAKHVPFRFVRMHGCSBANCGRWLGTGLTTCGGERVSLQCICSTSDPILSVGRWCRCSWSV  
GLSPNPTTTATGTLRPLIGATATHLGFRYGAIRV3IRSGWKHVCNAAASCLIDRASVASAVKAPPTANGTIPSPFSPOQYK  
LFFCSDSCSVCSINSCNPSKILSVCSQEAVALLESTVDTAQTMMCKNLEARRRBAEPANQVRQAGDGYTRLADSDVCTLSV  
RPPVRAAAGSSSLDDGVLTLYRLGLDQCCNAIKFVVEAASRFVPPVFKRTVRSGVLERVRMCRFTPPMRFEAAVEENHNI  
IPEXCIIIVLRCGCSGDQAITYPMTCTQTLSLHFNKISHIYIPQKIEEDTEPVRHICAVETKRASKLITFRVGRDREVSCCPLI  
QTPVALLNRHGLTIGWSDCNCSPJSDARVCDVNGVTYTEPC

NS 5A遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 6424-7797

NS 5Bタンパク質および遺伝子配列

NS 5Bアミノ酸配列：（配列番号 440）  
MQSYSWFFPIVATPTTFLPVTRSAGLIRADTSKVVTCTTAVDVSEKQKVIIDQKSAKYDQCPRDTYWCCLAKAKATFRQSGMS  
YEDAVCSMRANTTRDHMTGITYIDLVSGRAKPAQVRLVDQMRSGVYDAPMRLIIPKPEVFRDRSTRKPPPIVFPGCAARVAE  
3MLGDGDAIKIRYLGDAYCFEAIIPHERARLLQGWNRACSTPQAIAYDAICFDSITIAEDMDREAHIVAAAHADPEGVRGLYN  
YKKSFMCDIIGKYVGVRCRASGTLTSSGNVLTCTYLRVRAACTRAGIKPILGLIHGDDTLITERTCTUETLDEFSNALDDY  
GFPZTPVQSGDLSIECCSARVDSVCLGPMRMRMLVPQARRAARVLGKGGDPLGVISYIYMPYTAATVYVVLFPLLCMLIR  
NEPSCGTGTLVLTVMGMSVSPVWALPTIIANLH3RDALQVVRSSAASMAKLSALAPFGMRGLNCHRRRRSALRTDMIKIGS  
WNAFAQMLKLSPEVTPQFEFGMKLLFPETWREPYENLHLSITDRRGASRCFVPLVASVALALLCL

NS 5B遺伝子配列：配列番号 430 のスクレオチド 7798-9498

5' UTR配列

5' UTR配列：配列番号 430 のスクレオチド 1-327

3' UTR配列

3' UTR配列：配列番号 430 のスクレオチド 9499-9867

【配列表】

2017521654000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US15/38067

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - G01N 33/576; G01N 33/53; C12Q 1/70; C12P 21/08; C07K 16/10 (2015.01)

CPC - A61K 38/08; A61K 38/162; G01N 33/576; C07K 14/005

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) Classification(s): G01N 33/576; G01N 33/53; C12Q 1/70; C12P 21/08; C07K 16/10 (2015.01)

CPC Classification(s): A61K 38/08; A61K 38/162; A61K 39/00 C07K 15/109; G01N 33/576; C07K 14/005; C12Q 1/707

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, RU, AT, CH, TH, BR, PH, Other Countries (INPADOC)); Google; Google Scholar; PubMed; EBSO; The Lens PatSeq Finder; NCBI BLAST; HPGV-2, Pegivirus-2, SEQ ID NO:86, SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 299, GB virus genotype

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No.                   |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| X<br>—<br>A | GOMARA MJ et al. 'Diagnostic Value of Anti-GBV-C Antibodies In HIV-Infected Patients'. Chem Biol Drug Des. 20 Jun 2011. Vol. 78, No. 2, pp 277-282. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01143.x                                                                      | 1, 4, 9<br>—<br>2, 3, 5-8, 13-17, 21-27 |
| Y           | STAPLETON JT. The GB Viruses: A Review and Proposed Classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in Genus Pegivirus Within The Family Flaviviridae. Journal of General Virology. 2011. Vol. 92, pp 233-246                                                  | 1, 4, 9                                 |
| Y           | FRIDHOLM H et al. Human Pegivirus Genotype 2 Isolate H40048, Complete Genome, Genbank: KP259281.1. Direct Submission. Submitted (05-Dec-2014) Virus Research and Development, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, Copenhagen 2300, Denmark                 | 1, 4, 9                                 |
| A           | WO 1998/029747 A1 (ABBOTT LABORATORIES) July 9, 1998; Abstract                                                                                                                                                                                                 | 2, 3, 5-8, 13-17, 21-27                 |
| A           | CHIVERO ET al. Human Pegivirus RNA is Found In Multiple Blood Mononuclear Cells In Vivo And Serum-Derived Viral RNA-Containing Particles Are Infections In Vitro. J Gen Virol. 2014 Jun; Vol. 95, pp 1307-1319. doi: 10.1099/vir.0.063016-0. Epub 2014 Mar 25. | 2, 3, 5-8, 13-17, 21-27                 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* 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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 November 2015 (05.11.2015)

Date of mailing of the international search report

08 DEC 2015

Name and mailing address of the ISA/

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/38067

**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:

-\*\*\*Please See Supplemental Page-\*\*\*

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.:

Group I: Claims 1-9, 13-17, 21-28

**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**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/US15/38067

---Continuation of Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

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. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-9, 13-17 and 21-27 are directed toward human Pegivirus 2 (HPgV-2), and methods and compositions relating thereto.

Groups II+: Claims 10-12 are directed toward a composition comprising a substantially purified recombinant peptide, wherein said recombinant peptide comprises an amino acid sequence that has at least 75% identity to a portion of any one of SEQ ID NOs: 2-11, 76-85, or 304-353, wherein said portion is at least 10 amino acids in length.

The composition can be searched to the extent that the peptide comprises a portion of an amino acid sequence encompassing SEQ ID NO: 2 (Human Pegivirus 2 amino acid sequence). It is believed that Claims 10 (in-part), 11 (in-part) and 12 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims can be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 2 (Human Pegivirus 2 amino acid sequence). 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/examined. An Exemplary Election would be: SEQ ID NO: 3 (Human Pegivirus 2 amino acid sequence).

Groups III+: Claims 18-20 are directed toward a composition comprising a synthetic nucleic acid molecule, wherein said synthetic nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that has at least 75% identity to: i) a portion of SEQ ID NOs: 299-303, or ii) a portion of region 1, region 2, region 3, or region 4 of SEQ ID NO: 1 or 75 or complement thereof; wherein said portion is at least 15 nucleotides in length, and wherein region 1 is nucleotides 1-1401 of SEQ ID NO: 1 or 75, region 2 is nucleotides 1431-4777 of SEQ ID NO: 1 or 75, region 3 is nucleotides 4818-8134 of SEQ ID NO: 1 or 75, and region 4 is nucleotides 8167-9778 of SEQ ID NO: 1 or 75.

The composition can be searched to the extent that the synthetic nucleic acid encompasses SEQ ID NO: 299 (Human Pegivirus 2 DNA sequence). It is believed that Claims 18 (in-part), 19 (in-part) and 20 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 299 (Human Pegivirus 2 DNA sequence). 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/examined. An Exemplary Election would be: SEQ ID NO: 300 (Human Pegivirus 2 DNA sequence).

The inventions listed as Groups I-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: the special technical features of Group I include human Pegivirus 2, which is not present in any of Groups II+ and III+, the special technical features of Groups II+ include SEQ ID NOs: 76-85, which are not present in either of Groups I or III+, the special technical features of Groups III+ include SEQ ID NOs: 300-303, which are not present in either of Groups I or II+.

No technical features are shared between the amino acid sequences of Groups I and II+ and, accordingly, these groups lack unity *a priori*. No technical features are shared between the nucleic acid sequences of Groups I and III+ and, accordingly, these groups lack unity *a priori*.

Groups I-III+ share the technical features including a composition. Groups I and II+ share the technical features including a composition comprising a substantially purified recombinant peptide, wherein said recombinant peptide comprises an amino acid sequence that has at least 75% identity to a portion of any one of SEQ ID NOs: 2-11, wherein said portion is at least 10 amino acids in length. Groups I and III+ share the technical features including a composition comprising a synthetic nucleic acid molecule, wherein said synthetic nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that has at least 75% identity to: i) a portion of SEQ ID NO: 299, or ii) a portion of region 1, region 2, region 3, or region 4 of SEQ ID NO: 1 or 75 or complement thereof; wherein said portion is at least 15 nucleotides in length, and wherein region 1 is nucleotides 1-1401 of SEQ ID NO: 1 or 75, region 2 is nucleotides 1431-4777 of SEQ ID NO: 1 or 75, region 3 is nucleotides 4818-8134 of SEQ ID NO: 1 or 75, and region 4 is nucleotides 8167-9778 of SEQ ID NO: 1 or 75. Groups II+ share the technical features including a composition comprising a substantially purified recombinant peptide, wherein said recombinant peptide comprises an amino acid sequence that has at least 75% identity to a portion of any one of SEQ ID NOs: 2-11, 76-85, or 304-353, wherein said portion is at least 10 amino acids in length. Groups III+ share the technical features including a composition comprising a synthetic nucleic acid molecule, wherein said synthetic nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that has at least 75% identity to: i) a portion of SEQ ID NOs: 299-303, or ii) a portion of region 1, region 2, region 3, or region 4 of SEQ ID NO: 1 or 75 or complement thereof; wherein said portion is at least 15 nucleotides in length, and wherein region 1 is nucleotides 1-1401 of SEQ ID NO: 1 or 75, region 2 is nucleotides 1431-4777 of SEQ ID NO: 1 or 75, region 3 is nucleotides 4818-8134 of SEQ ID NO: 1 or 75, and region 4 is nucleotides 8167-9778 of SEQ ID NO: 1 or 75.

---Continued Within the Next Supplemental Box---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US15/38067

---Continued from Previous Supplemental Page:

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2003/0170870 A1 to Xiang, et al. (hereinafter "Xiang").

Xiang discloses a composition (a vaccine composition; paragraph [0021]) comprising a substantially purified (comprising a purified; paragraph [0214]) recombinant peptide (fusion protein comprising an N-terminal insertional variant (recombinant peptide); paragraph [0214]), wherein said recombinant peptide (paragraphs [0201], [0214]) comprises an amino acid sequence that has at least 75% identity to a portion of SEQ ID NO: 9 of the instant PCT application, wherein said portion is at least 10 amino acids in length (comprises SEQ ID NO: 2 of the Xiang reference, or a portion thereof (comprises an amino acid sequence that has at least 75% identity to a portion of SEQ ID NO: 9 of the instant PCT application, wherein said portion is at least 10 amino acids in length); paragraph [0201]; SEQ ID NO: 2 of the Xiang reference, wherein amino acids 1851-1861 of SEQ ID NO: 2 of the Xiang reference are 80% identical to amino acids 198-208 of SEQ ID NO: 9 of the instant PCT application); and a composition (abstract) comprising a synthetic nucleic acid molecule (comprising a synthetic initiation codon and adjacent sequences (comprising a synthetic nucleic acid molecule); paragraph [0088]), and wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that has at least 75% identity to a portion of SEQ ID NO: 299 of the instant PCT application or complement thereof; wherein said portion is at least 15 nucleotides in length (wherein SEQ ID NO: 1 of the Xiang reference comprises the GBV-C genome and includes an ATG codon at nucleotides 2309-2311 (wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that has at least 75% identity to a portion of SEQ ID NO: 299 of the instant PCT application or complement thereof; wherein said portion is at least 15 nucleotides in length); paragraph [0020]; SEQ ID NO: 1 of the Xiang reference, wherein SEQ ID NO: 1 of the Xiang reference includes a region (nucleotides 2300-2314) which is 80% identical to nucleotides 3397-3411 of SEQ ID NO: 299 of the instant PCT application), further wherein the region includes an ATG codon); and a vector for transduction of host cells (paragraph [0216]), as well as PCR (PCR; paragraph [0319]). Since Xiang discloses a synthetic initiator codon and adjacent sequences, as well as N-terminal insertional variants, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have produced a synthetic nucleic acid comprising a nucleotide sequence that has at least 75% identity to a portion of SEQ ID NO: 299 of the instant PCT application, or complement thereof, including nucleotides 2300-2314 of SEQ ID NO: 1 of the Xiang reference, wherein said portion is at least 15 nucleotides in length, wherein the sequence included the ATG codon of the Xiang reference, for enabling the production of an N-terminal insertional variant utilizing a common and well-known method of amplifying nucleic acids, such as PCR, as previously disclosed by Xiang, for enabling the production of the N-terminal insertional variant.

Since none of the special technical features of the Groups I-III+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Xiang reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
**G 0 1 N 33/543 (2006.01)** G 0 1 N 33/543 5 0 1 A  
 G 0 1 N 33/53 M

(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

(72)発明者 フランケル, マッシュウ  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100  
 、ディー・32・エム・ピー、エイ・ピー・6・シー-1

(72)発明者 フォーベルグ, ケン  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100  
 、ディー・32・エム・ピー、エイ・ピー・6・シー-1

(72)発明者 チーウ, チャールズ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・94607-5200、オークランド、フランクリン・ストリート・1111、トゥエルブス・フロアー

(72)発明者 リー, ディアナ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・94607-5200、オークランド、フランクリン・ストリート・1111、トゥエルブス・フロアー

(72)発明者 ベルグ, マイケル  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100  
 、ディー・32・エム・ピー、エイ・ピー・6・シー-1

(72)発明者 ドーソン, ジョージ  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100  
 、ディー・32・エム・ピー、エイ・ピー・6・シー-1

(72)発明者 コラー, ケリー  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100  
 、ディー・32・エム・ピー、エイ・ピー・6・シー-1

(72)発明者 チュヨン, ケビン  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100  
 、ディー・32・エム・ピー、エイ・ピー・6・シー-1

(72)発明者 ハケット, ジョン  
 アメリカ合衆国、イリノイ・60064、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100  
 、ディー・32・エム・ピー、エイ・ピー・6・シー-1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ10 QR32 QR35 QR55 QR62 QS33 QS34 QX02  
 4H045 AA10 AA20 AA30 CA01 EA53 FA74

|                |                                                                                                                                                                                 |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | <无法获取翻译>                                                                                                                                                                        |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2017521654A5</a>                                                                                                                                                  | 公开(公告)日 | 2018-08-02 |
| 申请号            | JP2016575478                                                                                                                                                                    | 申请日     | 2015-06-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 雅培公司<br>加利福尼亚大学董事会                                                                                                                                                              |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 雅培制药<br>Rijientsu的最宇宙的DF过的，加州                                                                                                                                                   |         |            |
| [标]发明人         | フランケルマシユウ<br>フォーベルグケン<br>チーウチャールズ<br>リーディアナ<br>ベルグマイケル<br>ドーソンジョージ<br>コラーケリー<br>チュヨンケビン<br>ハケットジョン                                                                              |         |            |
| 发明人            | フランケル,マシユウ<br>フォーベルグ,ケン<br>チーウ,チャールズ<br>リー,ディアナ<br>ベルグ,マイケル<br>ドーソン,ジョージ<br>コラー,ケリー<br>チュヨン,ケビン<br>ハケット,ジョン                                                                     |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 C12N15/09 C12Q1/68 C07K14/18 G01N33/53 G01N33/543                                                                                                                    |         |            |
| CPC分类号         | A61K39/12 A61P31/14 C07K14/005 C12N2770/24021 C12N2770/24022 C12N2770/24034 C12Q1/701<br>G01N33/56983 G01N2333/183 A61K49/085 G01N2469/20                                       |         |            |
| FI分类号          | G01N33/569.L C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C07K14/18 G01N33/53.N G01N33/543.501.A G01N33/53.M                                                                                      |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA01 4H045/EA53 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权            | 62/018282 2014-06-27 US<br>62/107782 2015-01-26 US                                                                                                                              |         |            |
| 其他公开文献         | JP2017521654A                                                                                                                                                                   |         |            |

#### 摘要(译)

本文提供了用于检测人PEG病毒2 ( HPgV-2 ) 的组合物，方法和试剂盒。在某些实施方案中，本文提供了HPgV-2特异性核酸探针和引物，以及用于检测HPgV-2核酸的方法。在其他实施方案中，本文提供了HPgV-2免疫原性组合物，用免疫原性HPgV-2肽治疗受试者的方法以及检测样品中HPgV-2受试者抗体的方法。。

