

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 2 4 N 4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/395		A 6 1 P 31/12	4 B 0 6 5
		C 1 2 N 7/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/12		C 1 2 Q 1/68	A 4 H 0 4 5
審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 20数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 213219(P2001 - 213219)	(71)出願人	302000254 ガヴァメント オブ ザ リパブリック オブ シンガポール シンガポール国 シンガポール 169854 カレッジ ロード 16 カレッジ オブ メディシン ビルディング ミニストリ オブ ヘルス
(22)出願日	平成13年7月13日(2001.7.13)	(72)発明者	チョン・ジン・オン シンガポール 266914 プリンセス オブ ウェールズ ロード 14エイ
(31)優先権主張番号	200004041 - 0	(74)代理人	100077827 弁理士 鈴木 弘男
(32)優先日	平成12年7月18日(2000.7.18)		
(33)優先権主張国	シンガポール(SG)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 診断アッセイ

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 B型肝炎ウイルスの存在を検出する方法の提供。

【解決手段】 B型肝炎ウイルスの存在を検出するための核酸をベースとしたアッセイに関する。より特定すると、本発明は、 B型肝炎ウイルス核酸配列を検出するための1段階増幅アッセイを提供する。本発明のアッセイは、容易に自動化に適応でき、試験すべきサンプルの速やかな処理を可能とする。本発明はさらに、 B型肝炎ウイルス用の核酸をベースとした検出アッセイを実施するに有用な因子および前記因子を含むキットを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のHBV由来核酸標的配列を検出する方法であって、前記方法は、サンプルを変性条件にかけ、一本鎖形の前記標的配列を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、そして、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物の存在について検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記HBV由来核酸標的配列を示す、ことを含む、前記方法。

【請求項2】 プライマーは、HBsAgをコードするヌクレオチド配列内または一部のヌクレオチド配列に対応するまたはフランキングする領域にハイブリッドする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 プライマーは、HBsAgをコードするヌクレオチド配列の一部内の保存ヌクレオチド配列に対応するまたはフランキングする領域にハイブリッドする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 最初に、サンプルを、逆転写条件にかけ、HBV由来mRNAからの一本鎖または二本鎖cDNA分子を生成することをさらに含む、請求項1または2または3に記載の方法。

【請求項5】 前記プライマーの1つを、同定可能なシグナルを与えることができるリポーター分子で標識し、前記プライマーの他方を捕獲可能な部分で標識する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 サンプル中のHBV由来DNA標的配列を検出する方法であって、前記方法は、前記サンプルを、固相支持体に固定したプライマーおよび溶液相中の第二プライマーを有する反応容器に導入し、ここでの両方のプライマーが、HBVゲノム上の保存領域内、近位または隣接の領域のHBV由来DNAの相補的一本鎖上の相補的ヌクレオチド配列にハイブリッドでき、ここでの溶液相プライマーは、同定可能なシグナルを与えることができるリポーター分子で標識され、反応容器を、増幅を促進する条件にかけ、次いで、同定可能なシグナルの存在を検出し、ここでの前記シグナルの存在は、HBV由来DNAの存在を示す、ことを含む、前記方法。

【請求項7】 HBVの同じまたは異なる株または変異形からの1つ以上のHBV由来DNA標的配列を検出する方法であって、前記方法は、一本鎖形のHBV由来DNAを推定上含むサンプルを、反応容器の固相支持体に個々にまたはアレイで固定した2つ以上のプライマーと接触させ、ここでの反応容器は、さらに、固相支持体に

固定した対を有する溶液相プライマーを含み、ここでの固定プライマーおよびその溶液相プライマーは、HBV由来DNAの領域を増幅条件下で増幅でき、ここでの溶液相プライマーは、同定可能なシグナルを与えることのできるリポーター分子を有し、よって固相支持体上の規定された領域でのシグナルの存在は、特定のHBV単離株または変異形の同定を可能とする、ことを含む、前記方法。

【請求項8】 固相支持体に固定した2つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのアレイであって、前記プライマーは、HBV由来DNAからの相補的ヌクレオチド配列にハイブリッドできる、前記アレイ。

【請求項9】 アレイは、マトリックス上の座標 (x_1, y_1) 、 (x_2, y_2) 、...、 (x_n, y_n) を有する、式 $a_1 a_2 \dots a_n$ により定義され、ここでの $a_1 a_2 \dots a_n$ は、計 n 個のオリゴヌクレオチドの同じまたは異なるオリゴヌクレオチドを示し、各オリゴヌクレオチドは、格子座標 (x_1, y_1) 、 (x_2, y_2) 、...、 (x_n, y_n) により定義でき、ここでのオリゴヌクレオチドは、 $b_1 b_2 \dots b_n$ により定義される増幅対を有し、よって、オリゴヌクレオチド $a_1 b_1$ 、 $a_2 b_2$ 、...、 $a_n b_n$ は、HBV由来DNAの相補鎖にハイブリッドでき、ここでの介在DNAは、HBsAg変異形などの2つ以上のHBV変異形間に保存されたヌクレオチド配列を含み、ここでの前記マトリックスは、前記HBV由来DNAの保存増幅領域を有することにより定義される特定のHBV因子を検出するのに有用である、請求項8に記載のアレイ。

【請求項10】 プライマーは、 $<400>1$ および $<400>2$ またはそれに少なくとも70%の類似性をもつプライマーまたは厳密度の低い条件下で $<400>1$ または $<400>2$ にハイブリッドできるプライマーから選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 一般に単離形である、HBV変異形であって、前記HBV変異形は、HBV由来核酸標的配列を検出する方法により同定され、前記方法は、サンプルを、変性条件にかけ、一本鎖形の前記標的配列を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、そして、サンプルを増幅産物の生成を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物の存在を検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記HBV由来核酸標的配列を示し、次いでかくして検出した前記HBVを単離することを含む、前記HBV変異形。

【請求項12】 免疫マーカーとして有用なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質などの発現産物を同定するための、および/または、診断および/または治療法に使用するための免疫グロブリンを生成するための手段。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に、ウイルス病原体、特にB型肝炎ウイルスの存在を検出するための核酸をベースとしたアッセイに関する。より特定すると、本発明は、B型肝炎ウイルス核酸配列を検出するための1段階増幅アッセイを提供する。本発明のアッセイは、容易に自動化に適応でき、試験すべきサンプルの速やかな処理を可能とする。本発明はさらに、B型肝炎ウイルス用の核酸をベースとした検出アッセイを実施するに有用な因子および前記因子を含むキットを提供する。

【0002】

【従来の技術】本明細書に数字で参照した刊行物の書誌詳細は、明細書の最後に集めてある。

【0003】B型肝炎ウイルス(以後「HBV」と称する)は、衰弱疾病状態を引き起こすことがあり、急性肝不全、肝硬変による出血および原発性肝癌に至ることがある。HBVは、年間、数百万の個体に感染し、少なくとも毎年百万人の死亡の一因である。

【0004】HBVは、RNA中間体を介して複製するDNAウイルスであり、その複製戦略に逆転写を使用する。HBVゲノムは、様々なウイルスタンパク質をコード化する重複オープンリーディングフレームと共に部分的に二本鎖DNA構造を有する、複雑な性質である。

【0005】HBVワクチンを利用できるにも関わらず、数億人の個体がウイルスの保因者である。HBVは、一般に、HBV表面抗原(HBsAg)、ウイルスコア抗原(HBcAg)およびHBeAgに対する抗体(抗HBeAg)の検出により同定される。

【0006】HBVによる感染またはHBsAgによるワクチン接種後、HBsAgに対する血清抗体(抗HBs)が出現する。これは、免疫をベースとしたHBsAgの検出の基礎である。この検出系で、HBsAgまたは抗HBsをスクリーニングする。アッセイを使用して、HBVのために輸血する前に血液をスクリーニングし、急性および慢性肝炎、肝硬変および原発性肝癌の患者のHBV関連肝疾患、を検出し、移植レシピエントおよびドナーなどにおけるHBV保因者についてスクリーニングする。

【0007】HBsAgは、「a」決定基と称される抗原性領域を含む(1)。「a」決定基は、複雑で、高次構造的で、高度に保存されたシステイン残基の間のジスルフィド結合に依存する。「a」決定基の変化をもたらす遺伝子変異が、従来のワクチンに対して生じる免疫応答を回避する、HBV変異体に関与する(2~6)。1

つの特に共通した変異は、HBsAgのアミノ酸位置145(G145F)でのグリシン(G)からアルギニン(R)への置換である。この変異は「a」エピトープ領域に影響を及ぼす。

【0008】HBV感染の処置または予防における化学的および免疫学的介入の確実性の向上により、介入的治療に耐性であるHBV変異形の出現の淘汰圧は上昇する。HBVの重複ゲノム構造のため、HBV変異形は、化学試薬またはワクチンの使用により直接的または間接的に淘汰し得る。

【0009】結果として、HBsAg用の従来の抗体をベースとしたアッセイは、偽の陰性結果をもたらし得る。これは、疾病の拡大の制御および患者の管理の点で非常に深刻な意味を有し得る。

【0010】本発明に導く研究において、発明者は、HBV用の代替アッセイを探索した。本発明に従って、発明者は、HBV(これは免疫的に検出可能なウイルスマーカーを示しても示さなくてもよい)からのHBV核酸配列についてスクリーニングするための、1段階核酸増幅アッセイを開発した。本発明の核酸をベースにしたアッセイは、HBV因子についての診断アッセイを、特に、かかる因子が、従来の免疫をベースとした診断試験により検出できないかもしれない場合に提供する。さらに、本発明のアッセイは、特異的免疫グロブリン(例えばIgG)およびHBV変異形間の保存領域に基づいたワクチンの開発を可能とする。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本明細書の全体を通じて、脈絡が他を要求しない場合、「含む(comprise)」なる語、または「含む(comprise)」または「含んでいる」などの変形は、記述したエレメントまたは整数或いはエレメントまたは整数の群の封入を意味すると理解し、任意の他のエレメントまたは整数或いはエレメントまたは整数の群の除外ではない。

【0012】本発明の1つの態様は、サンプル中のHBV由来核酸標的配列を検出する方法を提供し、前記方法は、サンプルを変性条件にかけ、一本鎖形の前記標的配列を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、そして、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物の存在について検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記HBV由来核酸標的配列を示す、ことを含む。

【0013】本発明の別の態様は、サンプル中のHBV

由来核酸標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、サンプルを変性条件にかけ、一本鎖形の前記標的配列を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、ここでのプライマーは、H B s A gをコードするヌクレオチド配列内または一部の保存ヌクレオチド配列に対応するまたはフランキングする領域にハイブリッドするように選択され、そして、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物の存在について検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記H B V由来核酸標的配列を示す、ことを含む。

【0014】本発明のさらに別の態様は、サンプル中のH B V由来DNA標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、所望により、前記サンプルを逆転写条件にかけ、H B V由来mRNAからの一本鎖または二本鎖cDNA分子を生成し、サンプルを変性条件にかけ、前記標的配列に対応する一本鎖DNA分子を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つのDNA鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、そして、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物を検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記H B V由来DNA標的配列を示す、ことを含む。

【0015】本発明のさらに別の態様は、サンプル中のH B V由来DNA標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、所望により、前記サンプルを逆転写条件にかけ、H B V由来mRNAからの一本鎖または二本鎖cDNA分子を生成し、サンプルを変性条件にかけ、前記標的配列に対応する一本鎖DNA分子を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つのDNA鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、ここでの前記プライ

マーの1つは、同定可能なシグナルを与えることができるリポーター分子で標識され、前記プライマーの他方は捕獲可能な部分で標識され、そして、前記サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、1つの鎖に同定可能なシグナルを提供できるリポーター分子および他方の鎖に固相支持体の捕獲可能な部分を有する、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、増幅産物を、その捕獲可能な部分を介して固定し、次いで、検出可能なシグナルをスクリーニングし、ここでのシグナルの存在は、増幅産物を示し、よってH B V由来標的DNA配列を示す、ことを含む。

【0016】本発明のさらにまた別の態様は、サンプル中のH B V由来DNA標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、前記サンプルを、固相支持体に固定したプライマーおよび溶液相中の第二プライマーを有する反応容器に導入し、ここでの両方のプライマーは、H B Vゲノム上の保存領域内、近位または隣接の領域のH B V由来DNAの相補的一本鎖上の相補的ヌクレオチド配列にハイブリッドでき、ここでの溶液相プライマーは、同定可能なシグナルを与えることができるリポーター分子で標識され、反応容器を、増幅を促進する条件にかけ、次いで、同定可能なシグナルの存在を検出し、ここでの前記シグナルの存在は、H B V由来DNAの存在を示す、ことを含む。

【0017】本発明のさらにまた別の態様は、H B Vの同じまたは異なる株または変異形からの1つ以上のH B V由来DNA標的配列を検出する方法に関し、前記方法は、一本鎖形のH B V由来DNAを推定上含むサンプルを、反応容器の固相支持体に個々にまたはアレイで固定された2つ以上のプライマーと接触させ、ここでの反応容器は、さらに、固相支持体に固定した対を有する溶液相プライマーを含み、ここでの固定プライマーおよびその溶液相対プライマーは、H B V由来DNAの領域を増幅条件下で増幅でき、ここでの溶液相プライマーは、同定可能なシグナルを与えることのできるリポーター分子を有し、よって固相支持体上の規定された位置でのシグナルの存在は、特定のH B V単離株または変異形の同定を可能とする、ことを含む。

【0018】本発明の別の態様は、固相支持体に固定した2つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのアレイを提供し、前記プライマーは、H B V由来DNAからの相補的ヌクレオチド配列にハイブリッドできる。

【0019】本発明のさらに別の態様は、マトリックス上の座標 (x_1, y_1) 、 (x_2, y_2) 、...、 (x_n, y_n) を有する、式 $a_1, a_2, \dots, a_n$ により定義されるオリゴヌクレオチドのアレイを含むマトリックスの使用を提供し、ここでの $a_1, a_2, \dots, a_n$ は、計n個のオリゴヌクレオチドの同じまたは異なるオリゴヌクレオチドを示し、各オリゴヌクレオチドは、格子座標 (x_1, y_1) 、 (x_2, y_2) 、...、 (x_n, y_n) により定義

でき、ここでのオリゴヌクレオチドは、 $b_1 b_1 \dots b_n$ により定義される増幅対を有し、よって、オリゴヌクレオチド $a_1 b_1, a_2 b_2, \dots, a_n b_n$ は、HBV由来DNAの相補鎖にハイブリッドでき、ここでの介在DNAは、HBsAg変異形などの2つ以上のHBV変異形間に保存されたヌクレオチド配列を含み、ここでの前記マトリックスは、前記HBV由来DNAの保存増幅領域を有することにより定義される特定のHBV因子を検出するのに有用である。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明は、一部、HBV変異形間に保存されるヌクレオチド配列の同定、並びに、HBVの増幅をベースとした診断アッセイ用のプライマーの開発のためのその使用に基づく。

【0021】数個の用語を明瞭化の目的で以下に定義する。

【0022】「増幅混合物」は、標的ウイルス由来核酸配列を増幅するに必要な様々な試薬を含む水溶液を意味する。これらは、酵素、緩衝水、塩、標的核酸およびデオキシヌクレオシド三リン酸を含む。

【0023】「増幅系」は、核酸の標的配列のコピーを増幅するための任意のインピットロの手段を意味する。

【0024】「増幅試薬」は、増幅に必要な、様々な緩衝液、酵素、プライマーおよびデオキシヌクレオシド三リン酸を意味する。

【0025】「核酸」は、一本鎖または二本鎖形の、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドポリマーを意味する。

【0026】「ポリメラーゼ」は、ヌクレオシド三リン酸前駆体からDNAの合成を触媒できる酵素を意味する。本発明のPCR増幅において、ポリメラーゼは、好ましくは、鋳型依存性で、熱安定性であり、典型的には、伸長するDNAポリマーの3'末端にヌクレオチドを加える。

【0027】「オリゴヌクレオチド」は、2つ以上のリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドからなる分子を意味する。

【0028】「プライマー」は、標的核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下で、DNA合成の開始点として作用できる、天然または合成の、オリゴヌクレオチドを意味する。これらの条件は、適切な緩衝液中および適切な温度での、4つの異なるヌクレオシド三リン酸およびポリメラーゼを含む。プライマーは、好ましくは、一本鎖オリゴデオキシヌクレオチドである。プライマーの適切な長さは、プライマーの使用の目的および条件（標的核酸の配列保存、PCRサイクル条件およびプライマーの組成物を含む）に依存する。

【0029】本発明は、サンプル中のHBV由来核酸標的配列を検出する方法を提供し、前記方法は、サンプルを変性条件にかけ、一本鎖形の前記標的配列を生成し、

変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、そして、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物の存在について検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記HBV由来核酸標的配列を示す、ことを含む。

【0030】1つの実施形態において、標的配列は、HBV変異形、特に、変化したHBsAgを有するHBV変異形間に保存されたHBVゲノム上の領域に相当する。変化したHBsAgは、HBsAgをコードするヌクレオチド配列の、単一または複数のヌクレオチド置換、欠失および/または付加により生じた、単一または複数のアミノ酸置換、欠失および/または付加を含み得る。HBVゲノム内および特にHBsAgをコードするヌクレオチド配列内の保存領域は、HBsAgの免疫学的変化にも関わらず、比較的安定に留まると提唱される。結果として、免疫をベースとしたHBsAgアッセイにもはや検出されないHBV変異形は、本発明に従って、HBsAg遺伝子の保存領域を介して依然として検出可能であると提唱される。しかし、本発明は、修飾または新規エピトープ（例えばHBsAg上）が得られるものなどの、HBVゲノムの可変領域の同定における主題の方法の使用によぶ。

【0031】HBsAg変異形の言及は、DNAポリメラーゼなどの他の重複遺伝子の変異形も包含する。

【0032】本発明のこれおよび他の態様は、「コードする核酸」、「コードするヌクレオチド配列」および「コードする遺伝子配列」などの用語により包含される、「遺伝子」なる語により限定されない。

【0033】「遺伝子」なる語は、その広義の意味で使用され、遺伝子のエキソンに対応するcDNAを含む。従って、本明細書の「遺伝子」の言及は：（i）転写および/または翻訳調節配列および/またはコード配列および/または非翻訳配列（すなわち、イントロン、5'および3'非翻訳配列）からなる、古典的ゲノム遺伝子；または（ii）コード領域（すなわちエキソン）に対応するmRNAまたはcDNAおよび遺伝子の5'および3'非翻訳配列を含むと捉えられる。

【0034】「遺伝子」なる語はまた、発現産物の全てまたは一部をコードする合成または融合分子を記載するために使用される。特定の実施形態において、「核酸分子」および「遺伝子」なる語は、同義語として使用し得る。

【0035】従って、本発明の別の態様は、サンプル中

10

20

30

40

50

の H B V 由来核酸標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、サンプルを変性条件にかけ、一本鎖形の前記標的配列を生成し、変性サンプルを、少なくとも 2 つのプライマーを含む 1 セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも 1 つのプライマーは、前記標的配列の 1 つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも 1 つの他のプライマーは、前記の最初の鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その 3' 末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、ここでのプライマーは、H B s A g をコードするヌクレオチド配列内または一部の保存ヌクレオチド配列に対応するまたはフランキングする領域にハイブリッドするように選択され、そして、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物の存在について検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記 H B V 由来核酸標的配列を示す、ことを含む。

【0036】サンプルは、一般に、しかし専らではないが、組織または組織抽出物、血液および排出物を含む液体、或いは潜在的に H B V 粒子または H B V DNA、mRNA または RNA 複製中間体を含む任意の他の物質を含む生物学的サンプルである。第一段階は、一般に、それ故、好ましい実施形態において、ヒト被検者を含む哺乳動物被検者からサンプルを単離することを含む。サンプルはまた、環境的サンプルまたは可能性ある H B V 汚染源からのサンプルであり得る。

【0037】本発明は、特に、「回避」H B V 変異形、すなわち、少なくとも 1 つの形の H B s A g に対する抗体が実質的にもはや相互作用しない変異形に関するが、本発明はさらに、H B V 変異形、特に臨床関連 H B V 変異形間で保存され、有用な標的配列として作用する、H B V ゲノムの任意の領域に及ぶ。H B V ゲノム上で考えられる特に有用な領域は、新規エピトープまたは H B s A g をコードするものである。かかる領域は、診断目的の組換えペプチドを作成するのに有用である。

【0038】本発明は、それ故、H B V 由来核酸配列を検出することにより、H B V を検出する手段を提供する。「H B V 由来」核酸配列は、H B V ゲノムそれ自体、その一本鎖 DNA 形、RNA 複製中間体、並びに、逆転写酵素を使用して調製した c DNA 一本鎖または二本鎖分子を含む。後者に関して、H B V 由来ヌクレオチド配列からの mRNA 転写物を、逆転写反応にかけて、相補的 DNA 鎖を生成し得る。次いで、後者の鎖および/またはその DNA 相補物は、増幅反応の主題であり得る。RNA 複製中間体および/または H B V 由来 mRNA に対応する c DNA の検出もまた、活発なウイルス複製を示す。

【0039】ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ライゲーション連鎖反応、核酸配列をベースとした増幅、Qレ

プリカーゼをベースとした増幅、鎖置換法、ローリングサークル増幅、および再循環対立遺伝子特異的プライマー伸長を含むがこれに限定されない、任意の形の増幅反応を、本発明の実施に使用し得る。しかし、好ましくは、PCR を使用する。

【0040】従って、本発明の別の態様は、サンプル中の H B V 由来 DNA 標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、所望により、前記サンプルを逆転写条件にかけ、H B V 由来 mRNA から的一本鎖または二本鎖 c DNA 分子を生成し、サンプルを変性条件にかけ、前記標的配列に対応する一本鎖 DNA 分子を生成し、変性サンプルを、少なくとも 2 つのプライマーを含む 1 セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも 1 つのプライマーは、前記標的配列の 1 つの DNA 鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも 1 つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その 3' 末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、そして、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物を検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、H B V 由来 DNA 標的配列を示す、ことを含む。

【0041】特に好ましい実施形態において、プライマーは、H B s A g をコードするヌクレオチド配列内から選択される。最も好ましくは、プライマーは、< 400 > 1 [センスプライマー] および < 400 > 2 [アンチセンスプライマー] である。本発明はまた、< 400 > 1 または < 400 > 2 に少なくとも約 70% の類似性を有するオリゴヌクレオチドプライマー、並びに、厳密度の低い条件下で < 400 > 1 または < 400 > 2 またはその相補物にハイブリッドできるプライマーにおよぶ。

【0042】本明細書に使用した「類似性」なる語は、ヌクレオチドレベルでの比較配列間の正確な同一性を含む。ヌクレオチドレベルで同一でない場合、「類似性」は、異なっているにも関わらず、互いに、構造的、機能的、生化学的および/またはコンフォメーションレベルに関連した、異なるアミノ酸をもたらす、配列間の差異を含む。特に好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列比較は、類似性よりも同一性レベルで行う。

【0043】2 つ以上のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列関係を記載するために使用した用語は、「参照配列」、「比較窓」、「配列類似性」、「配列同一性」、「配列類似性%」、「配列同一性%」、「かなりの類似性」および「かなりの同一性」を含む。「参照配列」は、少なくとも 12、しかし頻繁には 15 ~ 18、しばしば少なくとも 25 またはそれ以上、例えば 30 モノマー単位のヌクレオチドおよびアミノ酸残基長を含む。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類似した配列 (すなわち、完全ポ

リヌクレオチド配列の一部)、および(2)2つのポリヌクレオチド間で異なる配列を含み得、2つ(またはそれ以上)のポリヌクレオチド間の配列比較は、典型的には、「比較窓」上での2つのポリヌクレオチドの配列の比較により実施され、配列類似性の局所領域を同定および比較する。「比較窓」は、参照配列と比較される、典型的には12の連続した残基の概念的セグメントを意味する。比較窓は、2つの配列を最適にアラインメントさせると、参照配列(これは付加または欠失を含まない)に比較して、約20%またはそれ以下の付加または欠失(すなわちギャップ)を含み得る。比較窓をアラインする上での最適の配列のアラインメントは、コンピューターによるアルゴリズムの実行(ウィスコンシン・ジェネティクス・ソフトウェア・パッケージ・リリース7.0、ジェネティクスコンピューターグループ、575サイエンスドライブマジソン、WI、米国の、GAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または、選択した任意の様々な方法により作成された検査および最善のアラインメント(すなわち、比較窓上で最も高い相同性%が得られる)により実施され得る。例えばAltshul等(8)により開示されたBLASTプログラムファミリーも参照し得る。配列解析の詳細な議論は、Ausubel等(9)のユニット19.3に見出し得る。

【0044】本明細書に使用した「配列類似性」および「配列同一性」なる語は、比較窓上で、ヌクレオチド毎に、同一或いは機能的または構造的に類似している程度を意味する。従って、「配列同一性%」は、例えば、比較窓上で、2つの最適にアラインさせた配列を比較し、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、I)が両方の配列に存在する位置数を決定し、一致した位置の数を出し、一致した位置の数を、比較窓の位置の全数(すなわち窓サイズ)で割り、その結果を100倍して、配列同一性%を出すことにより決定する。本発明の目的では、「配列同一性」は、ソフトウェアに付属の参考マニュアルに使用されるような標準的デフォルトを使用して、DNASISコンピュータープログラム(ウィンドウ用バージョン2.5;日立ソフトウェアエンジニアリング社、南サンフランシスコ、カリフォルニア、米国から入手可能)により計算した「一致%」を意味すると理解する。類似の解説を配列類似性に関しても適用する。

【0045】本明細書の低い厳密性の言及は、ハイブリダイゼーションにおいて、少なくとも約0から少なくとも約15%v/vホルムアミドおよび少なくとも約1Mから少なくとも約2Mの塩、並びに、洗浄条件において、少なくとも約1Mから少なくとも約2Mの塩を含むおよび包含する。一般に、低い厳密性は、約25~30から約42である。温度は変化し得、ホルムアミドを取り替えるためにおよび/または別の厳密度条件を与えるために、より高い温度を使用し得る。ハイブリダイ

ゼーションにおいて、少なくとも約16%v/vから少なくとも約30%v/vのホルムアミドおよび少なくとも約0.5Mから少なくとも約0.9Mの塩、並びに、洗浄条件において、少なくとも約0.5Mから少なくとも約0.9Mの塩を含むおよび包含する中程度の厳密度、或いは、ハイブリダイゼーションにおいて、少なくとも約31%v/vから少なくとも約50%v/vのホルムアミドおよび少なくとも約0.01Mから少なくとも約0.15Mの塩、および洗浄条件において少なくとも約0.01Mから少なくとも約0.15Mの塩を含むおよび包含する高い厳密度などの、別の厳密度条件も、必要であれば適用し得る。一般に、洗浄は、 $T_m = 69.3 + 0.41(G + C)\%$ で実施する(10)。しかし、二重鎖DNAの T_m は、ミスマッチ塩基対の数が1%増加する毎に、1%減少する(11)。ホルムアミドは、これらのハイブリダイゼーション条件で随意である。従って、特に好ましい厳密度レベルは、以下のように定義される:低い厳密度は $6 \times SSC$ 緩衝液、0.1%w/v SDSで25~42度;中程度の厳密度は、 $2 \times SSC$ 緩衝液、0.1%w/v SDSで20から65度の範囲の温度で;高い厳密度は、 $0.1 \times SSC$ 緩衝液、0.1%w/v SDSで少なくとも65度の温度である。

【0046】本明細書の「プライマー」の言及は、構造、サイズまたは機能に関して、任意の限定とは捉えない。プライマーは、増幅分子として使用しても、ハイブリダイゼーションの目的のプライマーとして使用してもよい。好ましい分子の形は、増幅用の核酸プライマーである。

【0047】本明細書の「核酸プライマー」の言及は、少なくとも3つのヌクレオチドを含む、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの配列の言及を含む。一般に、核酸プライマーは、約3から約100のヌクレオチド、好ましくは約5から約50のヌクレオチド、さらにより好ましくは約5から約25のヌクレオチドを含む。50以下のヌクレオチドを有するプライマーも、本明細書で「オリゴヌクレオチドプライマー」と称し得る。本発明のプライマーは、例えば、ヌクレオチドの段階的付加により合成的に製造しても、または、他のヌクレオチド酸分子の断片、部分、一部または伸長産物でもよい。「プライマー」なる語は、最も一般的な意味において使用され、増幅目的に使用する場合に、DNAポリメラーゼによるDNA合成の開始のための遊離3'ヒドロキシル基を提供できる、任意の長さのヌクレオチドを含む。DNA合成により、プライマーが伸長され、プライマーがハイブリッドした核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物が生成する。

【0048】伸長産物を生成するハイブリッドしたプライマーの伸長は、本明細書で「増幅」なる語に含まれる。増幅は、一般に、変性、次いでプライマーハイブリ

ダイゼーションおよび伸長のサイクルで起こる。本発明は、約 1 サイクルから約 120 サイクル、好ましくは約 2 から約 70 サイクル、さらにより好ましくは、約 10、15、20、25 および 30 サイクルを含む約 5 から約 40 サイクルを包含する。

【0049】増幅産物（アンプリマーとも称する）は、任意の慣用的な手段により検出し得る。1つの実施形態において、増幅産物は、電気泳動により分離し、次いで、例えば、臭化エチジウム染色後に紫外線光を使用して可視化する。別法として、増幅産物を、HPLC などの様々な形のクロマトグラフィー或いはMALDI-TOF などの分光法および質量分析を使用して分解し得る。さらに別の選択肢は、リポーター分子で標識したプライマーを使用する。後者に関して、プライマーの1つを、リポーター分子で標識し得、一方、他のプライマーを、捕獲部分で標識し得、アンプリマーを固相支持体にアンカーさせ、次いでそれをリポーターシグナルを介して同定する。この実施形態は、増幅に使用されるプライマーのセットを用いて、または第二のひとそろいの1セットのプライマーを用いて実施し得る。しかし、好ましい実施形態においては、単に1セットのプライマーを使用し、よって、アッセイは1段階の増幅アッセイである。

【0050】従って、本発明の別の態様は、サンプル中のHBV由来DNA標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、所望により、前記サンプルを逆転写条件にかけ、HBV由来mRNAからの一本鎖または二本鎖cDNA分子を生成し、サンプルを変性条件にかけ、前記標的配列に対応する一本鎖DNA分子を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つのDNA鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライマーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、前記プライマーの1つは、同定可能なシグナルを与えることができるリポーター分子で標識され、前記プライマーの他方は捕獲可能な部分で標識され、前記サンプルを増幅を促進する条件にかけ、1つの鎖に同定可能なシグナルおよび他方の鎖の固相支持体に捕獲可能な部分を提供できるリポーター分子を有する、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、増幅産物を、その捕獲可能な部分を介して固定し、次いで、検出可能なシグナルをスクリーニングし、ここでのシグナルの存在は、増幅産物を示し、よってHBV由来標的DNA配列を示す、ことを含む。

【0051】上記のアッセイの多くの変形が当業者には明らかである。例えば、増幅反応は、容器の壁またはウェルに固定した捕獲分子を有する、容器またはマイクロ

タイターウェルで起こり得る。捕獲分子は、例えば、アンプリマー内のヌクレオチド配列、または、プライマーの1つの捕獲部分上の捕獲分子に相補的なヌクレオチド配列にハイブリッドおよび捕獲できるプライマーであり得る。別に、捕獲分子は、プライマーの1つの捕獲部分を特異的に認識できるDNA結合タンパク質でもよい。捕獲分子は、増幅反応に関与し得る。

【0052】捕獲分子は、任意の慣用的な手段により固相に固定し得る。固相は、核酸プライマーまたは他の捕獲分子をアンカーするように誘導化できる表面を有する任意の構造であり得る。好ましくは、固相は、マイクロタイターウェル面またはディップスティック面などの平面物質である。

【0053】本明細書で考える固相支持体は、典型的には、ガラス、或いは、セルロース、セラミック材料、ニトロセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレンおよびその誘導体、ポリビニルピリジンフルオライド(PVDF)、メタクリレートおよびその誘導体、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンなどのこれに限定されない、ポリマーである。ニトロセルロースが特に有用である。固相支持体はまた、ガラスまたはポリマーマトリックス上に支持された、ニトロセルロースフィルムなどのハイブリッドでもよい。「ハイブリッド」の言及は、上記に列挙した2つ以上のガラスまたはポリマー表面の重層配置の言及を含む。固相支持体は、膜、チューブ、ビーズ、ディスク、またはマイクロプレート、ディップスティック、マイクロタイターレイウェルの形またはアッセイの実施に適した任意の他の表面であり得る。

【0054】1つの実施形態において、アンカーした核酸は、ハイブリダイゼーションにより標的核酸分子を捕獲し、随意、増幅反応に関与する。別に、アンカーした核酸分子は、増幅した核酸分子を捕獲する。

【0055】核酸分子を固相支持体に連結する方法は当分野で公知である。プライマーを固相支持体に連結するプロセスは、アミド結合、アミデート結合、チオエーテル結合、および固相へのアミノ基の導入を含む。固相への結合の例は、国際特許出願PCT/AU92/00587[WO93/09250]に見出し得る。

【0056】アンカーしたプライマーは、増幅反応において溶液相プライマーと共に関与し得る。別に、標的配列を含む核酸分子を増幅するために、「ジェネリック」プライマーを固相支持体にアンカーする。次いで、標的配列の特異的増幅は、溶液相プライマーにより達成できる。

【0057】検出可能なシグナルを与える一連の標識を使用し得る。標識は、特定の核酸分子またはヌクレオチドに会合していても、または、核酸分子またはヌクレオチドに続けて結合する中間体に付着していてもよい。

【0058】標識は、発色源、触媒、酵素、フルオロフ

ォア、発光分子、化学発光分子、ユーロビウム (Eu³⁺) などのランタニド、放射性同位体および直接的可視標識を含む群から選択され得る。直接的可視標識の場合、使用は、コロイド状金属または非金属粒子、色素粒子、酵素または基質、有機ポリマー、ラテックス粒子、リポソーム、または、シグナル発生基質等を含む他のベヒクルからなり得る。標識として使用するに適した多くの酵素が、米国特許第 4,366,241 号、第 4,843,000 号および第 4,849,338 号に開示されている。本発明で有用な適切な酵素標識は、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ等を含む。酵素標識は、単独で使用しても、溶液中の第二酵素と組合せて使用してもよい。別に、本発明に従って適切な標識として使用し得るフルオロフォアは、フルオレsein、ローダミン、テキサスレッド、ルシファーイエローまたは R-フィコエリトリンを含むがこれに限定されない。

【0059】別の実施形態において、プライマーの 1 つを、容器の壁またはマイクロタイターウェルなどの固相支持体にアンカーし、他方のプライマーは溶液相にある。溶液相プライマーは、一般に、リポーター分子で標識する。増幅反応後、検出可能なシグナルの存在は、アンプリマーを示す。

【0060】従って、本発明の別の態様は、サンプル中の H B V 由来 DNA 標的配列を検出する方法を考え、前記方法は、前記サンプルを、固相支持体に固定したプライマーおよび溶液相中の第二プライマーを有する反応容器に導入し、ここでの両方のプライマーは、H B V ゲノム上の保存領域内、近位または隣接の領域の H B V 由来 DNA の相補的一本鎖上の相補的ヌクレオチド配列にハイブリッドでき、ここでの溶液相プライマーは、同定可能なシグナルを与えることができるリポーター分子で標識され、反応容器を、増幅を促進する条件にかけ、次いで、同定可能なシグナルの存在を検出し、ここでの前記シグナルの存在は、H B V 由来 DNA の存在を示す、ことを含む。

【0061】さらに別の実施形態において、本発明は、H B V ゲノム上の保存領域または保存および可変領域などの、H B V ゲノムの異なる領域にプライマーのアレイを使用する。これは、H B V を「分類」またはその可変領域を同定する必要がある場合に特に有用である。1 つの有用な実施形態において、H B V ゲノムの異なる領域に指向された複数のプライマーを、マイクロチップ、反応容器壁、ディップスティック、スライドまたは他のマトリックスなどの固相支持体に固定する。プライマーは、一般に、プライマーの同定のために特定の配座でアレイに並べる。しかし、「アレイ」なる語は、任意の特定の順序を意味せず、「アレイ」はまた、全体のパター

ン内のランダムな点も含み得る。

【0062】いずれにしても、固定した各プライマーは、一般に、溶液相第二プライマーを有し、よって、H B V ゲノムの特定の領域を増幅のために標的化できる。溶液相プライマーは、一般に、同定可能なシグナルを与えることのできるリポーター分子を有する。増幅時に、アレイ上の一定の位置内でのシグナルの存在は、特定の H B V を分類するために使用できる。

【0063】従って、本発明の別の態様は、H B V の同じまたは異なる株または変異形からの 1 つ以上の H B V 由来 DNA 標的配列を検出する方法に関し、前記方法は、一本鎖形の H B V 由来 DNA を推定上含むサンプルを、反応容器の固相支持体に個々にまたはアレイで固定された 2 つ以上のプライマーと接触させ、ここでの反応容器は、さらに、固相支持体に固定した対を有する溶液相プライマーを含み、ここでの固定プライマーおよびその溶液相対プライマーは、H B V 由来 DNA の領域を増幅条件下で増幅でき、ここでの溶液相プライマーは、同定可能なシグナルを与えることのできるリポーター分子を有し、よって固相支持体上の規定された位置でのシグナルの存在は、特定の H B V 単離株または変異形の同定を可能とする、ことを含む。

【0064】上記したように、好ましいプライマーは、 $<400>1$ および $<400>2$ 或いは $<400>1$ または $<400>2$ に少なくとも約 70% の類似性を有するプライマー、並びに、厳密度の低い条件下で $<400>1$ または $<400>2$ またはその相補体にハイブリッドできるプライマーに示される。好ましくは、これらは、化学合成により調製されるが、しかし、それらは制限断片などの (しかしこれに限定されない) 核酸分子の断片として生成され得る。プライマーは、H B s A g の主要親水性ループに変異を有するものなどの変異形を含む、既知の H B V 株の配列アラインメントに従って簡便に選択される。約 20 の連続したヌクレオチドが保存されると示され、次いで、これらは H B V ゲノムの保存領域のプライマー候補として選択される。

【0065】本発明のさらに別の態様は、それ故、固相支持体に固定した 2 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのアレイを提供し、前記プライマーは、H B V 由来 DNA からの相補的ヌクレオチド配列にハイブリッドできる。

【0066】好ましくは、プライマーがハイブリダイズする領域は、2 つ以上の H B s A g 変異形間に保存された約 10 から約 50 ヌクレオチドまでのヌクレオチド配列内、近位または隣接である。

【0067】好ましくは、アレイは、バイオチップまたは他のマイクロ-マトリックス、マイクロタイターウェルの壁、スライド、ディップスティックまたは他の適切なマトリックスの形である。

【0068】アレイはまた、検出可能なシグナルを提供

する固定アンプリマーの存在を検出できる、コンピュータープログラムによる解析に適応し得る。

【0069】従って、本発明の別の態様は、HBV由来核酸配列を検出または同定するための、コンピュータープログラムで補佐した方法を考え、前記方法は、(i) 少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーを使用した、増幅反応を実施するための手段(ここでの、少なくとも1つのプライマーは、標的配列の1つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドできる); および(ii) 同定可能なシグナルの存在を記録するためのデータプロセッシング手段を含む。

【0070】本発明のさらに別の態様は、マトリックス上の座標 $(x_1 y_1)$ 、 $(x_2 y_2) \dots (x_n y_n)$ を有する、式 $a_1 a_2 \dots a_n$ により定義されるオリゴヌクレオチドのアレイを含むマトリックスの使用を提供し、ここでの $a_1 a_2 \dots a_n$ は、計 n 個のオリゴヌクレオチドの同じまたは異なるオリゴヌクレオチドを示し、各オリゴヌクレオチドは、格子座標 $(x_1 y_1)$ 、 $(x_2 y_2) \dots (x_n y_n)$ により定義でき、ここでのオリゴヌクレオチドは、 $b_1 b_2 \dots b_n$ により定義される増幅対を有し、よって、オリゴヌクレオチド $a_1 b_1$ 、 $a_2 b_2 \dots a_n b_n$ は、HBV由来DNAの相補鎖にハイブリッドでき、ここでの介在DNAは、HBsAg変異形などの2つ以上のHBV変異形間に保存されたヌクレオチド配列を含み、ここでのマトリックスは、HBVゲノムの保存増幅領域を有することにより定義される特定のHBV因子を検出するのに有用である。

【0071】本発明のプライマーオリゴヌクレオチドは、標的HBV核酸のPCRなどの増幅反応と共に使用される。増幅プロセスは当分野で公知であるが、本発明に従って使用するPCR手順に関するいくつかの一般的情報が、明瞭化の目的で以下に強調されている。

【0072】試験サンプル中の標的HBV核酸配列を増幅するために、配列は、増幅系の成分に到達できることが必要である。これは、PCR増幅の前に、サンプルからHBV標的核酸を単離することにより達成される。生物学的サンプルから核酸分子を抽出する技術は、十分に確立され広く使用されている(12)。

【0073】各PCR増幅サイクルの第一段階は、例えば、サンプルを95などの適切な温度で加熱することによる、核酸二重鎖の分離を含む。一旦、鎖が分離すると、PCRの次の段階は、分離した鎖を、標的配列にフランキングするプライマーとハイブリッドさせることを含む。次いで、プライマーを伸長して、相補的な標的鎖のコピーを形成する。PCR増幅のために、各プライマーが二重配列に沿ってハイブリッドする位置が、1つのプライマーから合成された伸長産物が、鋳型から分離し

た場合に、他のプライマーの伸長の鋳型として作用するように設計する。変性、ハイブリダイゼーションおよび伸長のサイクルは、1サイクルから約120サイクルまで、しかし一般には約35サイクル反復し、PCR増幅により増幅産物に導入された変異の数を最小限にする。

【0074】PCR増幅における鋳型依存的プライマーの伸長は、適切な量の4つのデオキシリボヌクレオシド三リン酸(典型的には、dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP)の存在下で、適切な塩、金属カチオンおよびpH緩衝系を含む反応媒体中で、重合剤により触媒される。適切な重合剤は、鋳型依存的DNA合成を触媒することが知られる酵素である。これらは、Taqポリメラーゼ、*Thermus aquaticus*から単離される熱安定性DNAポリメラーゼ、および高忠実度Pfuポリメラーゼを含む。後者の酵素は、高い正確度の増幅に広く使用される。PCR増幅は、通常、熱安定酵素を用いて自動プロセスとして実施される。このプロセスでは、反応混合物の温度は、変性相、プライマーアニリング相および伸長反応相を通じて循環する。

【0075】他の反応および非特異的増幅からの増幅核酸によるPCR増幅の汚染を回避するために、実験測定を行う。他の反応からの汚染を回避するために、適切な塩、金属カチオンおよびpH緩衝系、適切な量の4つのデオキシリボヌクレオシド三リン酸(典型的には、dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、DNAポリメラーゼおよびプライマーオリゴヌクレオシドを含むが、生物学的サンプルから単離されたウイルス標的核酸は除外した、各反応混合物を、5分間、260nmのUV照射にかける。この処理により、前増幅反応混合物中の全ての潜在的な二本鎖DNA分子は排除され、一方で、一本鎖プライマーオリゴヌクレオチドおよび他の上記の反応混合物の成分は無傷を維持する。一方、増幅ウイルス核酸の配列解析は、非特異的増幅による汚染例を排除するだけでなく、増幅産物の性質、特に、現在の免疫をベースとした診断アッセイを使用した検出からのウイルス回避をもたらす、主要親水性ループ上のあり得る変異も決定する。

【0076】それ故、本発明は、本発明の方法に従って同定したものなどの新規HBV変異形を包含する。

【0077】従って、本発明の別の態様は、一般に単離形の、HBV変異形を提供し、このHBV変異形は、HBV由来核酸標的配列を検出する方法により同定され、前記方法は、サンプルを変性条件にかけ、一本鎖形の前記標的配列を生成し、変性サンプルを、少なくとも2つのプライマーを含む1セットのプライマーと接触させ、ここでの、少なくとも1つのプライマーは、前記標的配列の1つの鎖にハイブリッドでき、ここでの少なくとも1つの他のプライマーは、前記の最初に記載した鎖に相補的な鎖にハイブリッドでき、ここでの前記プライマーは、その3'末端から伸長可能であり、前記の各プライ

マーがハイブリッドした鎖に相補的な伸長産物を形成し、サンプルを、増幅を促進する条件にかけ、相補的伸長産物を含む増幅産物を生成し、次いで、増幅産物の存在について検出し、ここでの前記増幅産物の存在は、前記HBV由来核酸標的配列を示し、次いでかくして検出した前記HBVを単離することを含む。

【0078】本発明のさらに別の態様は、免疫学的マーカーとして有用なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質などの発現産物を同定するための、および/または、診断および/または治療法に使用する免疫グロブリン 10 を作成するための手段を提供する。

【0079】本発明により同定されるHBVのヌクレオチド配列は、様々な組換え発現系で使用できる。かかるヌクレオチド配列は、保存されていても可変でもよい。後者の例は、HBsAg上の修飾または新規エピトープである。かかる発現系により、所望の遺伝子、特に、HBsAgまたはその変異形をコードする遺伝子の適切な発現が可能となる。原核生物および/または真核生物宿主でのヌクレオチド配列の組換え発現は十分に確立されて 20 あり、これらの発現されたタンパク質は、特定のHBsAgに特異的な免疫グロブリンを産生するのに使用される。次いで、免疫グロブリンは、ウイルスの存在を検出するためのアッセイに使用できる。タンパク質はまた、HBVに感染した患者における抗体の存在の検出にも使用できる。

【0080】所望のウイルス配列は、簡便には、発現用の哺乳動物、酵母または昆虫細胞系に、標準的な技術を使用して形質転換/トランスフェクションする前に、適切なベクターに挿入する。原核生物が、好ましくは、中間クローニング段階に使用されるが、所望のウイルス配 30 列の高レベルの誘導発現にも効率的に使用できる。

【0081】変化した遺伝子物質を、ウイルス配列の発現のために宿主細胞に導入するために使用する具体的な手順は、特に重要ではない。外来ヌクレオチド配列を宿主細胞に導入する公知の手順のいずれかを使用し得る。これらは、リン酸カルシウムトランスフェクション、電気穿孔法、リボソーム、プラスミドベクター、ウイルスベクターおよびクローン化ウイルスDNA、特に、試験サンプル（これはウイルスマーカーを示しても示さなく 40 てもよく、免疫をベースとした診断試験により検出されてもされなくてもよい）中で本発明により同定されるものの任意の他の十分に確立された導入法を含む。

【0082】遺伝子情報を細胞に輸送するに使用される具体的なベクターは、特に重要ではない。真核細胞での組換えタンパク質の発現に使用される慣用的なベクターのいずれかを使用し得る。

【0083】発現ベクターは、真核細胞でウイルス核酸配列の発現に必要な全てのエレメントを含む、真核生物転写単位または発現カセットを含む。典型的な発現カセットは、ウイルスタンパク質をコードするDNA配列に 50

作動可能に連結したプロモーターおよび転写mRNAの効率的なポリアデニル化に必要なシグナルを含む。

【0084】本発明の発現ベクターは、典型的には、細菌（例えばE.コリ）でのベクターのクローニングを容易にする原核生物の配列、並びに、哺乳動物細胞などの真核細胞でのみ発現される1つ以上の真核生物転写単位の両方を含む。ベクターは、真核生物レプリコンを含んでも含まなくてもよい。かかるレプリコンが存在する場合、次いで、ベクターを、適切な選択マーカーを使用して真核細胞で増幅できる。ベクターが真核生物レプリコンを含まない場合、エピソード的増幅は不可能である。この条件下で、トランスフェクトされたDNAは、宿主細胞のゲノムに取込まれ、ウイルス遺伝子発現が、発現ベクター上の同時に取り込まれた哺乳動物プロモーターにより駆動される。

【0085】発現ベクターが細胞に導入された後、トランスフェクトされた細胞を、ウイルスタンパク質の発現に好ましい条件下で培養し、タンパク質を標準的な技術を使用して培養液から精製する。例えば、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなどの、多くの標準的なタンパク質精製手順が使用できる。

【0086】所望のウイルスゲノムによりコードされるタンパク質の使用に加えて、ウイルスに特異的なエピトープを模倣したペプチドもまた、ウイルスに特異的な抗体の産生に使用できる。

【0087】次いで、上記で議論した精製ポリペプチドまたは合成ペプチドは、標準的な手順を使用して、抗体の産生に使用される。免疫グロブリンは、様々な適用に使用し得る。例えば、それらを使用して、試験サンプル中のウイルスの存在をアッセイできるか、または例えば、アフィニティークロマトグラフィーを使用して、ウイルス抗原を精製できる。またそれらを使用して、全ウイルスの感染性の阻害を含む、対応するウイルスタンパク質を中和し得る。従って、様々な免疫グロブリンの製造および操作に利用できる多くの技術が、試験サンプル（これはウイルスマーカーを示しても示さなくともよく、免疫をベースとした診断試験により検出されてもされなくてもよい）中の特定のHBV株の診断および検出に有用な分子を産生するために容易に適用できる。

【0088】所望のHBV株に特異的なエピトープに結合する抗体は、様々な手段により産生し得る。非ヒトモノクローナル抗体（例えばネズミ）の産生は公知であり、動物をウイルスまたはその断片を含む調製物で免疫化することにより達成され得る。免疫化動物から得られた抗体産生細胞を不死化させ、標準的な技術を使用してスクリーニングする。

【0089】次いで、上記のように産生した免疫グロブリンは、試験サンプル（これはウイルスマーカーを示しても示さなくともよく、免疫をベースとした診断試験に

より検出されてもされなくてもよい)中のHBV株の存在についての様々な診断アッセイに使用できる。例えば、標識免疫グロブリンは、免疫グロブリンを、HBV株(これはウイルスマーカーを示しても示さなくてもよく、免疫をベースとした診断試験により検出されてもされなくてもよい)を含むことが疑われる試験サンプルと接触させ、複合体が形成されたかを検出することを含むアッセイに使用できる。様々な標識を使用して免疫グロブリンに結合させ得る。一般的な検出法は、¹²⁵Iまたは³⁵Sを用いたオートラジオグラフィーの使用である。非放射性標識も使用し得る。かかる標識は、化学発光剤および酵素を含む。これらの非放射性標識は、しばしば、間接的な手段により付着させる。一般に、リガンド分子(例えばビオチン)は、分子に共有結合する。次いで、リガンドを、本来検出可能であるかまたはシグナル系、例えば検出可能な酵素、蛍光化合物または化学発光化合物などに共有結合した抗リガンド(例えばストレプトアビジン)に結合する。

【0090】分子はまた、例えば酵素とコンジュゲートさせることにより、シグナル発生化合物に直接的にコンジュゲートできる。標的としての目的の酵素は、ホスファターゼまたはペルオキシダーゼであり得る。

【0091】複合体の存在を検出するために、混合物を、二次抗体、プロテインAまたはプロテインGなどの、免疫グロブリンのFc領域に結合できるタンパク質と接触させる。タンパク質は、好ましくは、固相表面に固定し、固相表面を洗浄して、所望のウイルスに特異的な非結合免疫グロブリンを除去する。生体分子を固定する多くの方法を使用できる。例えば、固相表面は、膜(例えばニトロセルロース)、マイクロタイター皿(例えばポリスチレン)またはビーズであり得る。所望の成分は、非特異的な結合を介して、共有結合または非共有結合し得る。次いで、標識を標準的な技術を使用し指向する。

【0092】組換え発現および精製ウイルスタンパク質またはウイルス溶解液も、診断手順に使用し得る。これらの手順は、典型的には、HBVに対する抗体を含むことが疑われる生物学的サンプル(例えば血清)に接触させ、免疫反応を検出することを含む。反応は、好ましくは、上記の標識タンパク質を使用して検出する。

【0093】それ故、本発明の方法は、HBsAgなどのHBVタンパク質の保存領域に対応し得る、HBVゲノムの保存領域の同定に有用である。この方法はまた、可変領域も同定し得る。結果として、保存領域に対応するペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、ワクチン組成物としておよび診断試験に有用である。同様に、可変領域を網羅するペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質は、特定のHBV変異形に特異的なワクチンにまたは診断剤として有用であり得る。

【0094】それ故、本発明は、2つ以上のHBV単離

株の間の保存アミノ酸配列を包含する、またはHBV野生型とは異なる、アミノ酸配列を含む、組換えまたは化学合成ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質または誘導体、その相同体または類似体を提供する。HBV野生型は、HBV遺伝子型EおよびAからFの、複合体または共通ヌクレオチドまたはアミノ酸配列を含むと考えられる(13)。

【0095】「誘導体」は、単一または複数のアミノ酸置換、付加および/または欠失を含むポリペプチドを含むポリペプチドの一部、部分、断片、区分または領域を含む。簡潔には、ペプチドおよびタンパク質は、「ポリペプチド」なる語により包含される。

【0096】本発明は、側鎖が修飾されたものおよび/または非天然アミノ酸を取り込んだものを含む、主題ポリペプチドの化学的類似体に及ぶ。かかる化学的に修飾されたまたは合成のポリペプチド類似体は、診断剤として使用するのにまたは治療に使用するのに、より安定であり得る。

【0097】本発明により考えられる側鎖修飾の例は、アルデヒドとの反応、次いでNaBH₄での還元による還元的アルキル化;メチルアセトイミデートを用いたアミド化;無水酢酸を用いたアシル化;シアネートを用いたアミノ基のカルバモイル化;2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いたアミノ基のトリニトロベンジル化;無水コハク酸および無水テトラヒドロフタル酸を用いたアミノ基のアシル化;およびピリドキサル-5-リン酸を用いたリジンのピリドキシル化、次いでNaBH₄による還元などのアミノ基の修飾を含む。

【0098】アルギニン残基のグアニジン基は、2,3-ブタンジオン、フェニルグリオキサルおよびグリオキサルなどの試薬によるヘテロ環縮合生成物の形成により修飾し得る。

【0099】カルボキシル基は、O-アシルイソ尿素形成を介したカルボジイミド活性化、続く、例えば対応するアミドへの誘導体化により修飾し得る。

【0100】スルフヒドリル基は、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化;過ギ酸のシステイン酸への酸化;他のチオール成分による混合ジスルフィドの形成;マレイミド、無水マレイン酸または他の置換マレイミドとの反応;4-クロロメルクリ安息香酸、4-クロロメルクリフェニルスルホン酸、フェニルメルクリクロリド、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノールおよび他の水銀を使用した水銀誘導体の形成;アルカリ性pHでのシアネートによるカルバモイル化などの方法により修飾し得る。

【0101】トリプトファン残基は、例えば、N-ブロモスクシンイミドによる酸化またはインドール環の2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミドまたはスルフェニルハロゲン化物によるアルキル化により修飾し得

る。一方、チロシン残基は、テトラニトロメタンによるニトロ化により、3-ニトロチロシン誘導体を形成することにより変化させ得る。

【0102】ヒスチジン残基のイミダゾール環の修飾は、ヨード酢酸誘導体によるアルキル化またはジエチルピロカーボネートによるN-カルベトキシ化により達成し得る。

【0103】ペプチド合成中の非天然アミノ酸および誘導体の取込み例は、ノルロイシン、4-アミノ酪酸、4

-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、6-アミノヘキサン酸、t-ブチルグリシン、ノルバリシン、フェニルグリシン、オルニチン、サルコシン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-6-メチルヘプタン酸、2-チエニルアラニンおよび/またはアミノ酸のD-異性体の使用を含むがこれに限定されない。本明細書で考えられる非天然アミノ酸のリストを表1に示す。

【0104】

【表1】

非慣用的アミノ酸	コード	非慣用的アミノ酸	コード
α -アミノ酪酸	Abu	L-N-メチルアラニン	Nmala
α -アミノ-メチル β -チレート	Mgab	L-N-メチルアルギニン	Nmarg
アミノシクロ β -ロハ β -カルボキシレート	Cpro	L-N-メチルアスパラギン	Nmasn
		L-N-メチルアスパラギン酸	Nmasp
アミノイソ酪酸	Aib	L-N-メチルシステイン	Nmcys
アミノノル β -ルニル-カルボキシレート	Norb	L-N-メチルグルタミン	Nmgln
		L-N-メチルグルタミン酸	Nmglu
シクロヘキシルアラニン	Chexa	L-N-メチルヒスチジン	Nmhis
シクロペンチルアラニン	Cpen	L-N-メチルイソロイシン	Nmile
D-アラニン	Dal	L-N-メチルロイシン	Nmleu
D-アルギニン	Darg	L-N-メチルリジン	Nmlys
D-アスパラギン酸	Das	L-N-メチルメチオニン	Nmmet
D-システイン	Dcys	L-N-メチルノルロイシン	Nmnle
D-グルタミン	Dgln	L-N-メチルノルハリン	Nmnva
D-グルタミン酸	Dglu	L-N-メチルオルニチン	Nmorn
D-ヒスチジン	Dhis	L-N-メチルフェニルアラニン	Nmphe
D-イソロイシン	Dile	L-N-メチルプロリン	Nmpro
D-ロイシン	Dleu	L-N-メチルセリン	Nmser
D-リジン	Dlys	L-N-メチルトレオニン	Nmthr
D-メチオニン	Dmet	L-N-メチルトリプトファン	Nmtrp
D-オルニチン	Dorn	L-N-メチルチロシン	Nmtyr
D-フェニルアラニン	Dphe	L-N-メチルハリン	Nmval
D-プロリン	Dpro	L-N-メチルエチル β -リジン	Nmetg
D-セリン	Dser	L-N-メチル- ϵ -ブチル β -リジン	Nmtbug
D-トレオニン	Dthr	L-ノルロイシン	Nle
D-トリプトファン	Dtrp	L-ノルハリン	Nva
D-チロシン	Dtyr	α -メチル-アミノイソ β -チレート	Maib
D-ハリン	Dval	α -メチル- γ -アミノ β -チレート	Mgab
D- α -メチルアラニン	Dmala	α -メチルシクロヘキシルアラニン	Mchexa
D- α -メチルアルギニン	Dmarg	α -メチルシクロペンチルアラニン	Mcpen
D- α -メチルアスパラギン	Dmasn	α -メチル- α -ナフチルアラニン	Manap
D- α -メチルアスパラギン酸	Dmasp	α -メチル β -ニシラミン	Mpen
D- α -メチルシステイン	Dmcys	N-(4-アミノ β -チル)グルタミン	Nglu
D- α -メチルグルタミン	Dmgln	N-(2-アミノエチル)グルタミン	Naeg
D- α -メチルヒスチジン	Dmhis	N-(3-アミノ β -ロヒル)グルタミン	Norn
D- α -メチルイソロイシン	Dmile	N-アミノ- α -メチル β -チレート	Nmaabu
D- α -メチルロイシン	Dmleu	α -ナフチルアラニン	Anap
D- α -メチルリジン	Dmlys	N-ベンジル β -リジン	Nphe
D- α -メチルメチオニン	Dmmet	N-(2-カルバミルエチル)グルタミン	Ngln
D- α -メチルオルニチン	Dmorn	N-(カルバミルメチル)グルタミン	Nasn
D- α -メチルフェニルアラニン	Dmphe	N-(2-カルボキシエチル)グルタミン	Nglu
D- α -メチルプロリン	Dmpro	N-(カルボキシメチル)グルタミン	Nasp
D- α -メチルセリン	Dmser	N-シクロ β -チル β -リジン	Ncbut
D- α -メチルトレオニン	Dmthr	N-シクロ β -チル β -リジン	Nchep

D- α -メチルトリプトファン	Dmtrp	N-シクロヘキシルグ* リシン	Nchex
D- α -メチルチロシン	Dmtty	N-シクロテ* シルグ* リシン	Ncdec
D- α -メチルハ* リン	Dmval	N-シクロト* テ* シルグ* リシン	Ncdod
D-N-メチルアラニン	Dnmala	N-シクロオクチルグ* リシン	Ncoct
D-N-メチルアルギ* ニン	Dnmarg	N-シクロフ* ロヒ* ルグ* リシン	Ncpro
D-N-メチルアスパ* ラキ* ン	Dnmasn	N-シクロウンテ* シルグ* リシン	Ncund
D-N-メチルアスパ* ルテ-ト	Dnmasp	N-(2, 2-ジ* フェニルエチル)グ* リシン	Nbhm
D-N-メチルシステイン	Dnmcys	N-(3, 3-ジ* フェニルフ* ロヒ* ル)グ* リシン	Nbhe
D-N-メチルグ* ルタミン	Dnmglu	N-(3-グ* アニジ* ノフ* ロヒ* ル)グ* リシン	Narg
D-N-メチルグ* ルタメ-ト	Dnmglu	N-(1-ヒト* ロキシエチル)グ* リシン	Nthr
D-N-メチルヒスチジ* ン	Dnmhis	N-(ヒト* ロキシエチル)グ* リシン	Nser
D-N-メチルイソロイシン	Dnmile	N-(イミタ* ソ* リルエチル)グ* リシン	Nhis
D-N-メチルロイシン	Dnmleu	N-(3-インド* リルエチル)グ* リシン	Nhtrp
D-N-メチルリジ* ン	Dnmlys	N-メチル- γ -アミノフ* チレ-ト	Nmgabu
N-メチルシクロヘキシルアラニン	Nmchexa	D-N-メチルメチオニン	Dnmmt
D-N-メチルオルニチン	Dnmorn	N-メチルシクロヘ* ンチルアラニン	Nmcpn
N-メチルグ* リシン	Nala	D-N-メチルフェニルアラニン	Dnmphe
N-メチルアミノソフ* チレ-ト	Nmaib	D-N-メチルフ* ロリン	Dnmpro
N-(1-メチルフ* ロヒ* ル)グ* リシン	Nile	D-N-メチルセリン	Dnmser
N-(2-メチルフ* ロヒ* ル)グ* リシン	Nleu	D-N-メチルトレオニン	Dnmthr
D-N-メチルトリプトファン	Dmtrp	N-(1-メチルエチル)グ* リシン	Nval
D-N-メチルチロシン	Dnmttyr	N-メチラ-ナフチルアラニン	Nmanap
D-N-メチルハ* リン	Dnmval	N-メチルヘ* ニシラミン	Nmpen
γ -アミノ酪酸	Gabu	N-(p-ヒト* ロキシフェニル)グ* リシン	Nhtyr
L-t-フ* チルグ* リシン	Tbug	N-(チオメチル)グ* リシン	Ncys
L-エチルグ* リシン	Etg	ヘ* ニシラミン	Pen
L-ホモフェニルアラニン	Hphe	L- α -メチルアラニン	Mala
L- α -メチルアルギ* ニン	Marg	L- α -メチルアスパ* ラキ* ン	Masn
L- α -メチルアスパ* ルテ-ト	Masp	L- α -メチル- γ -アミノ* チルグ* リシン	Mtbug
L- α -メチルシステイン	Mcys	L-メチルエチルグ* リシン	Metg
L- α -メチルグ* ルタミン	Mglu	L- α -メチルグ* ルタメ-ト	Mglu
L- α -メチルヒスチジ* ン	Mhis	L- α -メチルホモフェニルアラニン	Mhphe
L- α -メチルイソロイシン	Mile	N-(2-メチルチオエチル)グ* リシン	Nmet
L- α -メチルロイシン	Mleu	L- α -メチルリジ* ン	Mlys
L- α -メチルメチオニン	Mmet	L- α -メチルノルロイシン	Mnle
L- α -メチルノルハ* リン	Mnva	L- α -メチルオルニチン	Morn
L- α -メチルフェニルアラニン	Mphe	L- α -メチルフ* ロリン	Mpro
L- α -メチルセリン	Mser	L- α -メチルトレオニン	Mthr
L- α -メチルトリプトファン	Mtrp	L- α -メチルチロシン	Mtyr
L- α -メチルハ* リン	Mval	L-N-メチルホモフェニルアラニン	Nmhphe
N-(N-(2, 2-ジ* フェニルエチル)カル ハ* ミルメチル)グ* リシン	Nnbhm	N-(N-3, 3-ジ* フェニルフ* ロヒ* ル)カル ハ* ミルメチル)グ* リシン	Nnbhe
1-カルボ* キシ-1-(2, 2-ジ* フェニル -エチルアミノ)シクロフ* ロハ* ン	Nmbc		

【0105】本発明のポリペプチドは、HBVまたはHBV変異形に対してワクチン接種するために医薬組成物に使用し得る。医薬組成物は、主題ポリペプチド並びに1つ以上の医薬的に許容される担体および/または希釈剤を含む。

【0106】医薬的に許容される担体および/または希釈剤は、任意および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤等を含む。医薬活性物質用のかかる媒体および薬剤の使用は、当分野で公知である。任意の慣用的な媒体また

は薬剤が活性成分と適合性である限り、その治療組成物における使用が考えられる。補助活性成分も、組成物に取込むことができる。

【0107】医薬組成物はまた、標的細胞をトランスフェクトできるベクターなどの遺伝分子を含み得、ここでのベクターは、主題ポリペプチドをコードするまたはリボザイムをコードする核酸分子、或いは、HBV由来遺伝子配列に対するアンチセンス分子を有する。ベクターは、例えば、ウイルス性、細菌性または真核生物ベクターであり得る。

【0108】上記のように、本発明はさらに、主題ポリペプチドに対する抗体におよぶ。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。かかる抗体は、治療および診断アッセイに有用である。

【0109】本発明の別の態様は、被検者からの生物学的サンプル中のHBVを検出する方法を考え、前記方法は、前記生物学的サンプルを、HBVに特異的な抗体またはその変異形と、抗体-HBV複合体が形成するに十分な時間および条件下で接触させ、次いで前記複合体を検出することを含む。

【0110】HBVの存在は、ウェスタンブロットおよびエリザ手順により任意の数の方法で達成され得る。米国特許第4,016,043号、第4,424,279号、および第4,018,653号を参照して分かるように、多種多様なイムノアッセイ技術が利用可能である。これらは、非競合型の単一点および二点の両方または「サンドイッチ」アッセイ、並びに、伝統的な競合結合アッセイを含む。これらのアッセイはまた、標的への標識抗体の直接的結合も含む。

【0111】サンドイッチアッセイは、最も有用で一般的に使用されるアッセイの1つであり、本発明の使用に好ましい。サンドイッチアッセイ技術の多くの変形が存在し、全て本発明により包含されると捉える。簡潔には、典型的な正アッセイにおいて、非標識抗体を、固相基質に固定し、試験すべきサンプルを結合分子と接触させる。抗体-抗原複合体が形成されるに十分な期間、適切な期間インキュベートした後、次いで、検出可能なシグナルを発生できるリポーター分子で標識した、抗原に特異的な第二抗体を加え、抗体-抗原標識抗体の別の複合体が形成されるに十分な期間、インキュベートする。任意の非反応物質を洗浄して除去し、抗原の存在を、リポーター分子により発生するシグナルの観察により決定する。結果は、可視シグナルを単に観察することにより定量し得るか、または、既知量のハプテンを含む対照サンプルと比較することにより定量し得る。正アッセイの変形は、サンプルおよび標識抗体の両方を同時に結合抗体に加える、同時アッセイを含む。これらの技術は、当業者には公知であり、任意の小さな変形も含まれることは容易に理解される。本発明に従って、サンプルは、HBVまたはHBV由来ポリペプチドを含み得るものであり、細胞抽出物、組織生検またはおそらく血清、唾液、粘膜分泌物、リンパ、組織液および呼吸器液を含む。それ故、サンプルは、一般に、生物学的液体を含む生物学的サンプルであるが、細胞培養液などからの発酵液および上澄み液にもおよぶ。

【0112】典型的な正サンドイッチアッセイにおいて、HBVに特異性を有する第一抗体またはその抗原性部分は、固相表面に共有結合的にまたは受動的に結合している。固相表面は、典型的には、ガラスまたはポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーはセルロー

ス、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンである。固相支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートのディスク、またはイムノアッセイの実施に適した任意の他の表面の形であり得る。結合プロセスは、当分野で公知であり、一般に、架橋の共有結合的な結合または物理的吸着からなり、試験サンプルの調製物中のポリマー-抗体複合体を洗浄する。次いで、試験すべきサンプルのアリコート、固相複合体に加え、十分な期間（例えば、2~40分間またはより簡便であれば一晩）および適切な条件下（例えば、室温から約37℃、例えば約25℃）でインキュベートし、抗体に存在する全てのサブユニットを結合させる。インキュベート期間後、抗体サブユニット固相を洗浄し、乾燥させ、ハプテン部分に特異的な第二抗体と共にインキュベートする。第二抗体は、ハプテンへの第二抗体の結合を示すために使用される、リポーター分子に連結している。

【0113】代替の方法は、生物学的サンプル中の標的分子を固定し、次いで、固定した標的を、特異的な抗体（これはリポーター分子で標識してもしていなくてもよい）に曝露することを含む。標的の量およびリポーター分子シグナルの強度に応じて、結合した標的は、抗体で直接的に標識することにより検出可能であり得る。

【0114】別法として、第一抗体に特異的な第二標識抗体を、標的-第一抗体複合体に曝露し、標的-第一抗体-第二抗体三次複合体を形成する。複合体は、リポーター分子により放出されるシグナルにより検出される。

【0115】本明細書に使用したような「リポーター分子」により、その化学的性質により、抗原に結合した抗体の検出を可能とする分析的に同定可能なシグナルを提供する、分子を意味する。検出は定性的でも定量的でもよい。この型のアッセイで最も一般的に使用されるリポーター分子は、酵素、フルオロフォアまたは放射性核種含有分子（すなわち放射性同位体）および化学発光分子である。

【0116】酵素イムノアッセイの場合、酵素は、一般に、グルタルアルデヒドまたはペリオデートにより、第二抗体にコンジュゲートする。しかし、容易に認識されるように、多種多様な異なるコンジュゲート技術が存在し、当業者には容易に利用できる。一般的に使用される酵素は、とりわけ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む。特定の酵素と共に使用される基質は、一般に、対応する酵素による加水分解時に、検出可能な色変化を発生するものについて選択される。適切な酵素の例は、アルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼを含む。また、上記の化学原生基質ではなく蛍光産物を生じる、蛍光原生基質も使用できる。全ての場合において、酵素-標識抗体を第一抗体ハプテン複合体に加え、結合させ、次いで、過剰の試薬を洗浄し除

去する。次いで、適切な基質を含む溶液を、抗体 - 抗原 - 抗体の複合体に加える。基質は、第二抗体に連結した酵素と反応し、可視シグナルを与え、これは、さらに、通常、分光光学的に定量すると、サンプル中に存在したハプテンの量の指標が得られ得る。「リポーター分子」はまた、ラテックスビーズ上の赤血球などの細胞凝集または凝集阻害の使用にもおよぶ。

【0117】別法として、フルオレセインおよびローダミンなどの蛍光化合物は、その結合能を変化させることなく、抗体に化学的に結合させ得る。特定の波長の光で照射して活性化すると、蛍光色素標識抗体は、光エネルギーを吸収し、分子を励起状態に誘導し、次いで、特徴的な色の発光を、光学顕微鏡で可視的に検出できる。EIAのように、蛍光標識抗体を、第一抗体 - ハプテン複合体に結合させる。非結合試薬を洗浄して除去した後、次いで、残りの三次複合体を適切な波長の光に曝露し、観察された蛍光は、目的のハプテンの存在を示す。免疫蛍光およびEIA技術は、両方共、当分野で十分によく確立されており、本発明の方法に特に好ましい。しかし、放射性同位体、化学発光分子または生物発光分子などの、他のリポーター分子も使用し得る。

【0118】本発明は、以下の非制限的な実施例によりさらに説明される。

【0119】

【実施例】実施例1

シンガポール人の成人および高い抗HBsレベルを有するが表面抗原については陰性であるワクチン接種した小児における、HBV表面抗原変異体の検出および同定
シンガポール人の成人およびHBsAgは陰性のワクチン接種した小児における、HBV DNAの存在を、本発明に提供されるプライマーオリゴヌクレオチドを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅により調べる。63人の成人、並びに、4つの独立的な市販の免疫をベースとした診断キットによりHBsAgについて試験して陰性であった、異なる民族グループからの15人のワクチン接種した小児(15歳以下の年齢で、組換えワクチンを接種された)を選択する(表2)。彼等は全員、HBVコア抗原に対する全抗体(抗HBc)について陽性である(Corzyme、アボット・ラボラトリーズ、米国)。全員が、抗HBsにも陽性である(Ausab、アボット・ラボラトリーズ、米国)(表2)。100μlの血清からのDNAを、プロテインナーゼK処

理し、次いでクロロホルム/フェノール抽出およびエタノール沈降により抽出する。本発明で提供されるオリゴヌクレオチドを、PfuDNAポリメラーゼ(ストラタジーン、米国)を用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅に利用する。増幅は、35サイクル実施し、それらの各々は、94 (1分間)の変性、50 (2分間)のアニーリング、および73 (3分間)の伸長からなる。結果により、HBV DNAは、本発明で提供されるプライマーオリゴヌクレオチドを使用して、15人中3人の小児(20%)および63人中8人(13%)の成人において増幅されることが示される。このHBsAg陰性小児のグループにおけるHBsAg変異体の同定は、試験してHBsAg陽性であったワクチン接種したシンガポールの小児におけるHBsAg変異体の検出に関する我々の以前の報告と比較して、異なる状況を示した。HBV DNAは、このワクチン接種した小児のグループにおいて、全サンプル中で本発明に提供されるプライマーオリゴヌクレオチドを使用して増幅される。

【0120】増幅DNA断片の直接的シーケンスにより、これらのサンプル中のMHRの様々な位置の変異が判明した(表2)。これらは、6例において、最も一般的なワクチン回避G145Rを含む。また、一例の報告においてラミブジン療法に関連していると近年判明した、G130D変異(表2)が3例ある。さらに、T131N変異は、4例に同定される。HBsAg上に同時にT114Sを常に有する、報告された遺伝子型関連T131N変異とは異なり、本発明で提供されるプライマーオリゴヌクレオチドを使用して同定したT131N変異は、残基114に野生型S(セリン)を有する。これは、次いで、それが欠失を回避できる変異形であり得ることを示唆する。

【0121】当業者は、本明細書に記載した本発明は、具体的に記載したもの以外の変形および修飾を受けることができることを理解するだろう。本発明は、全てのかかる変形および修飾を含むと理解される。本発明はまた、個々にまたはまとめて、本明細書に言及したまたは示した全ての段階、特徴、組成物および化合物、並びに、任意の2つ以上の前記段階または特徴の任意および全ての組合せを含む。

【0122】

【表2】

HBsAg陰性／抗HBc陽性HBVのシンガポール人の成人およびワクチン接種した小児におけるHBsAg変異体

患者	性／年齢（歳）／人種	HBsAgの市販のアッセイ				抗HBc IgG	抗HBs	抗HAV IgG	抗HCF	抗HEV IgG	HBsAg変異
		A	B	C	D						
1	M／10ヶ月／マレー人	—	—	—	—	+	6.0	—	—	—	G130D, M133T, G145R
2	F／3／中国人	—	—	—	—	+	14.0	—	—	—	T131N, G145
3	M／9ヶ月／中国人	—	—	—	—	+	3150.0	—	—	—	G145
4	F／60／中国人	—	—	—	—	+	72.0	—	—	—	T131N

【0123】（参考文献）

1. Carmen et al. Gastroenterology 102:711-719, 199
2. Carmen et al. Lancet 336:325-329, 1990.
3. Okamoto et al. Paediatric Research 32:264-268, 1992.
4. McMahon et al. Hepatology 15:757-766, 1992.
5. Fujii et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184:1152-1157, 1992.
6. Harrison et al. Hepatol. 13:5105-5107, 1991.
7. Chen et al. FEBS Lett. 453:237-242, 1999.

8. Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389. 1997.
9. Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15.
10. Bonner and Laskey Eur. J. Biochem. 46: 83, 1974.
11. Marmur and Doty J. Mol. Biol. 5: 109, 1962.
12. Oon et al. Vaccine 13: 699-702, 1999

10 【0124】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> GOVERNMENT OF THE REPUBLIC OF SINGAPORE

<120> DIAGNOSTIC ASSAY

<130> SFP-5684

<140>

<141>

<150> SG 200004041-0

<151> 2000-7-18

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

caaggtatgt tgcccgtttg t

21

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

tggctcagtt tactagtgcc att

23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:primer
 <400> 3 33

34

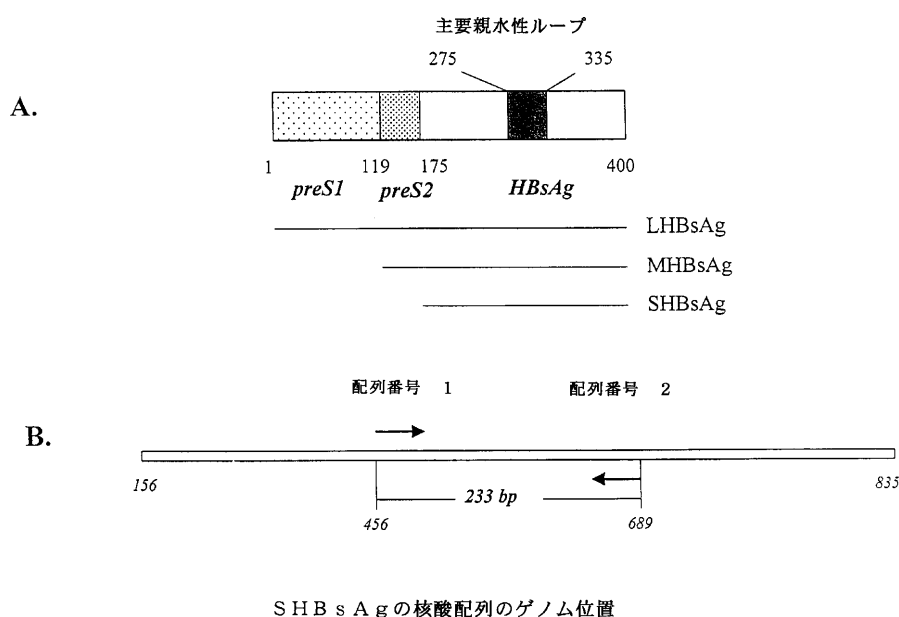
【図面の簡単な説明】aattc

【図1】図1は、HBV表面抗原の構造組織を示す概略図である。(A)保存「a」決定基を網羅する主要親水性ループの位置(Chen等(7)から適応)。アミノ酸残基の全長HBsAgのサイズが示される(1~400)。preS1(1~118)、preS2(119~174)および主要HBsAg(175~400)の位置はボックスの下に示される。全長HBsAgに関連した主要親水性ループの位置も示す。主要HBsAg内の主要親水性ループの対応する位置(SHBsAg) 10は、アミノ酸100~160であり、保存「a」決定基はSHBsAg内の124~147である。(B)SHBsAgをコードする領域のゲノム位置。コード領域の5'および3'末端の位置はボックスの下に示す(HBVゲノムのそれぞれnt156および835、位置1は、GenBank寄託番号Z35717の野生型HBVのEcoRI部位-GAATTC(<400>3)の最初のAヌクレオチドとして定義する)。本発明で提供されるプライマーオリゴヌクレオチドの位置(<400>1および<400>2)も、ボックスの下に示す(H*20 3、5、7および8には増幅産物は見られない。

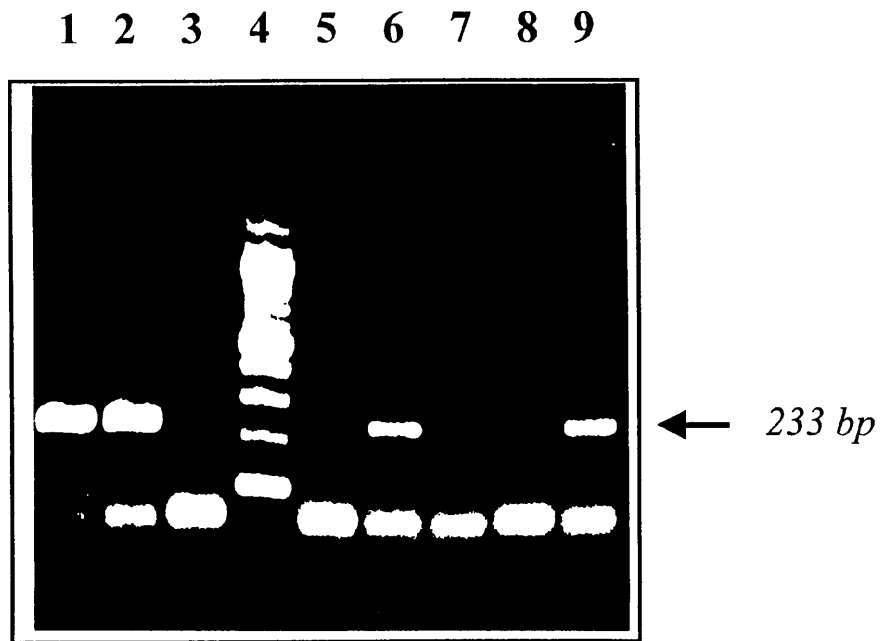
*BVゲノムのそれぞれnt456および689から始まる)。本発明のプライマーオリゴヌクレオチドを使用したPCR増幅DNA断片のサイズ(<400>1および<400>2)は、ボックスの下に示したように、233塩基対(bp)である。

【図2】図2は、本発明に提供されるプライマーオリゴヌクレオチド(<400>1および<400>2)を使用して、免疫をベースとした診断キットによりHBsAgについては陰性であるが、抗HBcおよび抗HBsについては陽性である、試験サンプルからのPCR増幅HBV断片の電気泳動パターンを示す写真図である。レーン4に示されるのは、分子サイズマーカーの移動位置である(100bpラダー、MBI Fermentas)。レーン1は、表1の最初の試験サンプルに対応し；レーン2は、表1の第二の試験サンプルに対応する。レーン6および9は、表1のそれぞれ第三および第四の試験サンプルに対応する。類似のウイルスマーカー(HBsAgについては陰性、抗HBcおよび抗HBsについては陽性)を示す試験サンプルを示す、レーン

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード ⁷ (参考)	
C 1 2 N	7/00	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 Q	1/68		33/566	
G 0 1 N	33/53		33/576	B
	33/566	C 0 7 K	16/08	
	33/576	C 1 2 R	1:93	
// C 0 7 K	16/08	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(C 1 2 Q	1/68			F
C 1 2 R	1:93)			

(72)発明者 ウェイ・ニン・チェン
シンガポール 080104 スポッティスウッ
デ パーク ロード ナンバー 22 - 114
ブロック 104

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA20 HA11 HA20
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ10 QQ34
QQ43 QR32 QR62 QR82 QS11
QS12 QS25 QS36
4B065 AA96Y CA46
4C085 AA13 AA14 CC32 DD62 EE01
GG01
4H045 AA11 AA20 DA75 EA53 FA72

要解决的问题：提供一种检测乙型肝炎病毒存在的方法。解决方案：该诊断分析是基于其核酸检测乙型肝炎病毒的存在，并且更具体地提供用于检测乙型肝炎病毒的核酸序列的一阶段扩增分析。该测定可以容易地适应自动化并且能够快速处理测试样本。该测定还提供了基于其核酸进行乙型肝炎病毒检测测定的有用因子，以及包括上述因子的试剂盒。

[illegible]