

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6505076号  
(P6505076)

(45) 発行日 平成31年4月24日(2019.4.24)

(24) 登録日 平成31年4月5日(2019.4.5)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>GO 1 N</b>	<b>33/576</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/576	Z N A Z
<b>GO 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/53	U
<b>GO 1 N</b>	<b>33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/543	5 O 1 A
C O 7 K	16/10	(2006.01)	C O 7 K	16/10	
C O 7 K	14/08	(2006.01)	C O 7 K	14/08	

請求項の数 10 (全 70 頁)

(21) 出願番号 特願2016-500145 (P2016-500145)  
 (86) (22) 出願日 平成25年12月23日(2013.12.23)  
 (65) 公表番号 特表2016-516989 (P2016-516989A)  
 (43) 公表日 平成28年6月9日(2016.6.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/077504  
 (87) 国際公開番号 W02014/158272  
 (87) 国際公開日 平成26年10月2日(2014.10.2)  
 審査請求日 平成28年12月19日(2016.12.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/785, 124  
 (32) 優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/788, 136  
 (32) 優先日 平成25年3月15日(2013.3.15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391008788  
 アボット・ラボラトリーズ  
 ABBOTT LABORATORIES  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット  
 パーク アボット パーク ロード 100  
 (74) 代理人 110001173  
 特許業務法人川口国際特許事務所  
 (72) 発明者 ドーソン, ジョージ・ジェイ  
 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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCV 抗原-抗体組み合わせアッセイおよびこれに使用するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験サンプル中の HCV 抗原および HCV 抗体を合わせて検出する方法であって、

(a) 以下の試薬:

(i) ビオチンに結合することができる固相であって、該固相は、該固相に結合する、  
 ビオチン化された抗-HCV 抗体及び第1のビオチン化された HCV 抗原を含み、

第1のビオチン化された HCV 抗原は、配列番号 97、配列番号 98、配列番号 99、  
 配列番号 100、配列番号 101、配列番号 102、配列番号 103、配列番号 104、  
 配列番号 105 及び配列番号 106 から選択されるアミノ酸配列を含む、固相、及び

(ii) 第1のビオチン化された HCV 抗原によって捕捉された抗-HCV 抗体に結  
 合する、第1の検出可能に標識された HCV 抗原、

を同時に提供することと、

(b)

(i) ビオチン化された抗-HCV 抗体が、試験サンプル中に存在する HCV 抗原に  
 特異的に結合し、前記固相の上に捕捉された、ビオチン化された抗-HCV 抗体-HCV  
 抗原複合体を生成し、

(ii) 第1のビオチン化された HCV 抗原が、前記試験サンプル中に存在する抗-  
 HCV 抗体に特異的に結合し、前記固相の上に捕捉された第1のビオチン化された HCV  
 抗原-抗-HCV 抗体複合体を生成し、及び

(iii) 第1の検出可能に標識された HCV 抗原が、前記固相の上に捕捉された第

10

20

1 のビオチン化された H C V 抗原 - 抗 - H C V 抗体複合体の抗 - H C V 抗体に特異的に結合する、

条件下で工程 ( a ) の該試薬をインキュベートすることと、

( c ) 捕捉された抗 - H C V 抗体および捕捉された H C V 抗原を含む固相を、未反応の試験サンプルおよび試薬から、単離することと、

( d ) 該単離された固相と、抗 - H C V 抗体 - H C V 抗原複合体中の H C V 抗原に結合する検出可能に標識された複合抗体とを接触させることと、

( e )

( i ) 検出可能に標識された複合抗体から発生した第 1 のシグナルであって、第 1 のシグナルの存在が試験サンプル中の H C V 抗原の存在を示す、第 1 のシグナル及び

10

( i i ) 第 1 の検出可能に標識された H C V 抗原から発生した第 2 のシグナルであって、第 2 のシグナルの存在が試験サンプル中の抗 - H C V 抗体の存在を示す、第 2 のシグナル、を検出すること、

を含む方法。

#### 【請求項 2】

工程 ( a ) がさらに、

( i i i ) 第 1 のビオチン化された H C V 抗原とは別個である、固相に結合した第 2 のビオチン化された H C V 抗原であり、試験サンプル中に存在する第 2 の抗 - H C V 抗体に結合する、第 2 のビオチン化された H C V 抗原及び

( i v ) 第 2 の抗 - H C V 抗体に結合するための第 2 の検出可能に標識された H C V 抗原、

20

を提供することを含み、

工程 ( b ) がさらに、

( i v ) 第 2 のビオチン化された H C V 抗原が、前記固相に結合し、前記試験サンプル中に存在する第 2 の抗 - H C V 抗体に特異的に結合し、前記固相の上に捕捉された第 2 のビオチン化された H C V 抗原 - 第 2 の抗 - H C V 抗体複合体を生成し、及び

( v ) 第 2 の検出可能に標識された H C V 抗原が、前記固相の上に捕捉された第 2 のビオチン化された H C V 抗原 - 第 2 の抗 - H C V 抗体複合体中の第 2 の抗 - H C V 抗体に特異的に結合することを含み、及び

30

工程 ( e ) がさらに、

第 2 の検出可能に標識された H C V 抗原から発生した第 3 のシグナルであって、第 3 のシグナルの存在が、試験サンプル中の第 2 の抗 - H C V 抗体の存在を示す、第 3 のシグナル、を検出すること、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 3】

工程 ( a ) が、さらに、

( v ) 第 1 及び第 2 のビオチン化された H C V 抗原とは別個である、固相に結合する第 3 のビオチン化された H C V 抗原であり、試験サンプル中に存在する第 3 の抗 - H C V 抗体に結合する、第 3 のビオチン化された H C V 抗原及び

( v i ) 第 3 の抗 - H C V 抗体に結合するための第 3 の検出可能に標識された H C V 抗原、

40

を提供することを含み、

工程 ( b ) がさらに、

( v i ) 第 3 のビオチン化された H C V 抗原が、前記固相に結合し、前記試験サンプル中に存在する第 3 の抗 - H C V 抗体に特異的に結合し、前記固相の上に捕捉された第 3 のビオチン化された H C V 抗原 - 第 3 の抗 - H C V 抗体複合体を生成し、及び

( v i i ) 第 3 の検出可能に標識された H C V 抗原が、前記固相の上に捕捉された第 3 のビオチン化された H C V 抗原 - 第 3 の抗 - H C V 抗体複合体中の第 3 の抗 - H C V 抗体に特異的に結合することを含み、及び

工程 ( e ) がさらに、

50

第3の検出可能に標識されたHCV抗原から発生した第4のシグナルを検出することを含み、第4のシグナルの存在が、試験サンプル中の第3の抗-HCV抗体の存在を示す、第4のシグナルの検出、  
を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

試験サンプル中のHCV抗原およびHCV抗体を両方とも同時に検出するための方法であって、前記方法は、

(i) 試験サンプルを、  
(a) 配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105又は配列番号106から選択されるアミノ酸配列を含む第1の捕捉抗原、及び  
第1のHCVタンパク質のペプチド配列と、第1の検出可能な標識を含む、第1の検出抗原、

(b) 第1のHCVタンパク質と異なる第2のHCVタンパク質のペプチド配列を含む第2の捕捉抗原、及び  
第2のHCVタンパク質のペプチド配列と、第2の検出可能な標識を含む、第2の検出抗原、

(c) 第1及び第2のHCVタンパク質と異なる第3のHCVタンパク質のペプチド配列を含む第3の捕捉抗原、及び  
第3のHCVタンパク質のペプチド配列と、第3の検出可能な標識を含む、第3の検出抗原、

(d) 第1の捕捉抗体、及び第4の検出可能な標識を含む複合抗体と接触させ、

ここで、第1の捕捉抗体及び複合抗体は、試験サンプル中の第1、第2及び第3のHCVタンパク質と異なる第4のHCVタンパク質に特異的に結合し、それにより、

(1) 前記試験サンプル中に存在する前記第1の捕捉抗原、第1の検出抗原および第1の抗-HCV抗体を含む、第1のサンドイッチ複合体が生成され、

(2) 前記試験サンプル中に存在する前記第2の捕捉抗原、第2の検出抗原および第2の抗-HCV抗体を含む、第2のサンドイッチ複合体が生成され、

(3) 前記試験サンプル中に存在する前記第3の捕捉抗原、第3の検出抗原および第3の抗-HCV抗体を含む、第3のサンドイッチ複合体が生成され、及び

(4) 前記試験サンプル中に存在する前記捕捉抗体、前記複合抗体および第4のHCV抗原を含む、サンドイッチ複合体が生成され、及び

(ii) 前記第1、第2、第3及び第4のサンドイッチ複合体の生成の結果として、前記第1、第2、第3及び第4の検出可能な標識から発生する第1、第2、第3及び第4のシグナルを測定し、

これによって、前記試験サンプル中に存在する第1、第2及び第3の抗-HCV抗体および第4のHCV抗原を同時に検出する方法。

【請求項5】

(i) 第1、第2、第3および第4のHCVタンパク質は、それぞれ、コア抗原、E1、E2、NS2、NS3、NS4、NS5及びその部分から選択され、

(ii) 第1の捕捉抗体は、2又は3個の異なる抗体を含み、及び/又は

(iii) 捕捉抗原及び捕捉抗体は、固相に固定される、

請求項4に記載の方法。

【請求項6】

第1の検出抗原が、寄託番号M62321でGenBankに寄託されたアミノ酸配列からの、アミノ酸34、48および115から121の欠失を含むコアペプチドである、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記第4のHCVタンパク質が、コア抗原である、請求項4に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 8】

( i ) 第 1 の検出抗原は、寄託番号 M 6 2 3 2 1 で Gen Bank に寄託されたアミノ酸配列からの、アミノ酸 3 4、4 8 および 1 1 5 から 1 2 1 の欠失を含む、アクリジン化されたコアペプチドであり、

( i i ) 第 2 の捕捉抗原は、ビオチン化された NS 3 組換え抗原であり、前記第 2 の検出抗原は、アクリジン化された NS 3 組換え抗原であり、

( i i i ) 第 3 の捕捉抗原は、ビオチン化された NS 4 ペプチドであり、前記第 3 の検出抗原は、アクリジン化された NS 4 ペプチドであり、

( i v ) 捕捉抗体は、ビオチン化された C 1 1 - 7 モノクローナル抗体であり、及び / 又は

( v ) 検出複合抗体は、C 1 1 - 9 抗体又は C 1 1 - 1 4 抗体を含む、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 9】

試験サンプル中の H C V 抗原および抗体を同時に検出するためのキットであって、

( a ) 捕捉抗原と、第 1 の H C V タンパク質に対する第 1 の抗 - H C V 抗体を検出するための検出可能に標識されている検出抗原の第 1 の対であって、捕捉抗原は、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5 又は配列番号 1 0 6 から選択されるアミノ酸配列を含む、第 1 の対、

( b ) 捕捉抗原と、第 1 の H C V タンパク質と異なる第 2 の H C V タンパク質に対する第 2 の抗 - H C V 抗体を検出するための検出可能に標識されている検出抗原の、第 2 の対、

( c ) 捕捉抗原と、第 1 及び第 2 の H C V タンパク質と異なる第 3 の H C V タンパク質に対する第 3 の抗 - H C V 抗体を検出するための検出可能に標識されている検出抗原の、第 3 の対、及び

( d ) 捕捉抗体と、第 1、第 2 及び第 3 の H C V タンパク質と異なる第 4 の H C V タンパク質を検出するための検出可能に標識されている複合抗体の、第 4 の対、を含むキット。

## 【請求項 10】

前記捕捉抗原および前記捕捉抗体は、固体支持体に結合する、請求項 9 に記載のキット

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

本出願は、2013年3月14日に出願された米国仮特許出願第 61 / 785, 124 号および2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第 61 / 788, 136 号の優先権の利益を主張する P C T 出願として出願される。上述の出願の完全な内容が、全体的に本明細書に参照により組み込まれる。

## 【0002】

本発明は、一般的に、H C V 感染の検出および診断のためのイムノアッセイに関する。さらに具体的には、本発明は、試験サンプル中の H C V 抗原および抗 - H C V 抗体を同時に検出するための組み合わせイムノアッセイ、試薬およびキットに関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

W H O 統計によれば、世界で1億7千万人程度がC型肝炎ウイルス(H C V)に感染している(肝臓のウイルス感染)。H C Vに感染したヒトの75%から85%が、慢性感染に進行し、これらの症例の約20%が、感染から20年後の肝硬変または肝細胞癌を含め、慢性C型肝炎の合併症を発症する。H C V感染について現在推奨されている処置は、インターフェロンとリバビリン薬の組み合わせであるが、この処置は、すべての症例に有効

10

20

30

40

50

ではなく、C型肝炎に関連する末期段階の肝疾患には、肝臓移植が適応となる。現在、HCV感染を予防するために利用可能なワクチンは存在せず、従って、感染を避けるためにあらゆる警戒をしなければならない。

【0004】

従って、患者のケアおよび血液または血液産物による、または密接な個人的な接触によるC型肝炎ウイルス(HCV)の伝染予防は、感度の高い検出アッセイを用いた極度の警戒を必要とする。これにより、HCVおよびHCVが混入した血液または血液産物の担体をスクリーニングし、同定するための特定の必要性が生じる。HCV曝露の血清学的な決定は、ヒトの血漿または血清に存在するHCVの検出に依存している。このことは、ウイルスによってコードされる別個の構造的タンパク質または非構造的タンパク質の検出によって、またはHCVに対する抗体の検出によって達成することができる。

10

【0005】

HCV病原体への曝露の後、初期は、ウイルスが存在する証拠は存在しない(即ち、検出可能なウイルスRNAまたは血清学的マーカーが存在しない)。これは、「ウインドウピリオド」(WP)と呼ばれる。一般的に、HCVに曝露してから10日後、ウイルスRNAを検出することができ、一方、抗-HCV抗体は、約70日後に検出可能になる(Busch M P and Dodd R Y, Transfusion 40(10): 1157-1160, 2000)。HCV感染の広がりを予防するには、検出ウィンドウを狭めるように設計された信頼性の高い血液スクリーニング試験を有することがさらに重要である。

20

【0006】

患者の血清または血漿中のHCVポリペプチドに対するHCVコア抗原または抗体の存在を検出するための、血液の血清学的スクリーニングに基づくHCV感染を検出するための多くの方法が存在する。HCVコア抗原アッセイの検出を目的とするこのアッセイは、抗体スクリーニングアッセイに基づくHCVスクリーニングよりも40日から50日速くHCV感染を検出することが示された。HCVコアタンパク質は、ポリタンパク質の最初の191アミノ酸を含み、ゲノムRNAをキャプシド生成する内部ウイルスコートを生成するHCVの構造的タンパク質である。血清中のHCVコア抗原を検出可能な、2つの異なる種類の血清学的アッセイが開発されている。一方のアッセイフォーマットは、セロコンバージョン前の被検体のHCVコア抗原を検出し、血液ドナーのスクリーニングに利用され、一方、他方のアッセイフォーマットは、HCV抗体の状態にかかわらず、C型肝炎患者でのみコア抗原を検出し、HCVへの曝露を診断し、または抗ウイルス治療を監視するための臨床実験で利用される。

30

【0007】

しかし、典型的には、HCVコア抗原の血液スクリーニングアッセイは、セロコンバージョン前の段階または初期のセロコンバージョン後の段階でのみコア抗原を検出する。さらに、HCVコア抗原アッセイは、後期セロコンバージョン段階で抗原が抗-COA抗体と免疫複合体を生成するときは、コア抗原を検出することができない。これにより、セロコンバージョン前の段階でHCVコア抗体を検出することができ、セロコンバージョン段階で抗-HCV抗体を検出することができ、WPを顕著に狭める血清学アッセイの必要性が生じる。

40

【0008】

このような組み合わせHCVスクリーニングアッセイの有用性は、このようなアッセイが、WPを狭めるという点で現行の血清学的血液スクリーニング方法よりも顕著に向上するため、顕著である。しかし、首尾良い抗原抗体組み合わせアッセイのための課題の1つは、このようなアッセイを行うための適切な抗原および抗体を選択することである。本発明は、この需要に対処する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

50

【非特許文献1】Busch M P and Dodd R Y, Transfusion 40(10):1157-1160, 2000

【発明の概要】

【0010】

本発明は、一般的に、試験サンプル中のHCV抗原および抗-HCV抗体を同時に検出するための組み合わせ免疫アッセイ、試薬およびキットに関する。さらに具体的には、本発明は、試験サンプル中のHCV抗原およびHCV抗体を合わせて検出するための免疫アッセイであって、

(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)試験サンプル中に存在するHCV抗原を捕捉するためのビオチン化された抗-HCV抗体、

(iii)試験サンプル中の抗-HCV抗体を捕捉するためのビオチン化されたHCV抗原、および

(iv)(iii)のビオチン化されたHCV抗原によって捕捉される抗-HCV抗体に結合するための検出可能に標識されたHCV抗原

を同時に提供することと、

(b)

(i)(a)の(ii)のビオチン化された抗-HCV抗体が、ビオチンを介して固相に結合し、試験サンプル中に存在するHCV抗原に特異的に結合し、固相の上に捕捉された抗-HCV抗体-HCV抗原複合体を生成し、

(ii)(a)の(iii)のビオチン化された抗原が、ビオチンを介して固相に結合し、試験サンプル中に存在する抗-HCV抗体に特異的に結合し、固相の上に捕捉されたHCV抗原-抗-HCV抗体複合体を生成し、(a)の(iv)の検出可能に標識されたHCV抗原が、固相の上に捕捉されたHCV抗原-抗-HCV抗体複合体中の抗-HCV抗体に特異的に結合する、反応混合物を生成する条件下で工程(a)の試薬をインキュベートすることと、

(c)固相に結合した捕捉された抗体および捕捉されたHCV抗原を含む固相を、未反応の試験サンプルおよび試薬から、単離することと、

(d)単離された固相と、(b)の(ii)の抗-HCV抗体-HCV抗原複合体中に捕捉されたHCV抗原に結合する検出可能に標識された複合抗体とを接触させることと、

(e)検出可能な標識部分から発生したシグナルが引き金となると、シグナルを検出することと

を含み、シグナルの存在は、試験サンプル中のHCVの存在を示す、免疫アッセイを記述する。

【0011】

例示的な実施形態では、この免疫アッセイは、

(a)

(v)工程(a)の(iii)のHCV抗原とは別個である、試験サンプル中の抗-HCV抗体を捕捉するための第2のビオチン化されたHCV抗原、および

(vi)(v)のビオチン化されたHCV抗原によって捕捉された抗-HCV抗体に結合するための検出可能に標識されたHCV抗原

を提供することと、

(b)(iii)(a)の(v)のビオチン化された抗原が、ビオチンを介して固相に結合し、試験サンプル中に存在する抗-HCV抗体に特異的に結合し、固相の上に捕捉されたHCV抗原-抗-HCV抗体複合体を生成し、(a)の(vi)の検出可能に標識されたHCV抗原が、固相の上に捕捉されたHCV抗原-抗-HCV抗体複合体中の抗-HCV抗体に特異的に結合することと

をさらに含んでもよい。

【0012】

10

20

30

40

50

このようなイムノアッセイは、

( a )

( v i i ) 工程 1 の ( a ) の ( i i i ) または工程 2 の ( a ) の ( v ) の H C V 抗原とは別個である、試験サンプル中の抗 - H C V 抗体を捕捉するための第 3 の ( または複数のさらなる ) ビオチン化された H C V 抗原、および

( v i i i ) ( v i i ) のビオチン化された H C V 抗原によって捕捉された抗 - H C V 抗体に結合するための検出可能に標識された H C V 抗原を提供することと、

( b ) ( i v ) ( a ) の ( v i i ) のビオチン化された抗原が、ビオチンを介して固相に結合し、試験サンプル中に存在する抗 - H C V 抗体に特異的に結合し、固相の上に捕捉された H C V 抗原 - 抗 - H C V 抗体複合体を生成し、( a ) の ( v i i i ) の検出可能に標識された H C V 抗原が、固相の上に捕捉された H C V 抗原 - 抗 - H C V 抗体複合体中の抗 - H C V 抗体に特異的に結合することと

によって、第 3 の H C V 抗原または複数のさらなる H C V 抗原も検出してもよい。

【 0 0 1 3 】

本発明の別の態様は、試験サンプル中の H C V 抗原および H C V 抗体を両方とも同時に検出するためのイムノアッセイであって、この組み合わせアッセイは、

( a ) 第 1 の H C V タンパク質のペプチド配列を含む第 1 の捕捉抗原、

( b ) 第 1 の H C V タンパク質のペプチド配列を含み、さらに、検出可能な標識を含む、第 1 の検出抗原、

( c ) 第 2 の H C V タンパク質に由来する抗原性配列を含む第 2 の捕捉抗原、

( d ) 第 2 の H C V タンパク質に由来する抗原性配列を含み、検出可能な標識をさらに含む、第 2 の検出抗原、

( e ) 第 3 の H C V タンパク質に由来する抗原性配列を含む第 3 の捕捉抗原、

( f ) 第 3 の H C V タンパク質に由来する抗原性配列を含み、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複合抗体

を含み、

捕捉抗体および複合抗体は、試験サンプルに由来する第 4 の H C V タンパク質に特異的に結合し、組み合わせアッセイは、

( i )

( a ) 試験サンプル中に存在する第 1 の捕捉抗原および検出抗原および第 1 の抗 - H C V 抗体のサンドイッチ複合体の生成、

( b ) 試験サンプル中に存在する第 2 の H C V タンパク質に対し、第 2 の捕捉抗原および第 2 の検出抗原および抗 - H C V 抗体のサンドイッチ複合体の生成、

( c ) 試験サンプル中に存在する第 3 の H C V タンパク質に対し、第 3 の捕捉抗原および第 3 の検出抗原および抗 - H C V 抗体のサンドイッチ複合体の生成、および

( d ) サンプル中に存在する捕捉抗体、複合抗体および H C V 抗原の複合体の生成を可能とする条件で、試験サンプルと、捕捉抗原、検出抗原、捕捉抗体および複合抗体とを接触させることと、

( i i ) 複合体の生成の結果として、検出可能な標識から発生するシグナルを測定し、これによって、サンプル中に存在する H C V 抗原および H C V 抗体を同時に検出することと

によって行われる、イムノアッセイを記載する。

【 0 0 1 4 】

上にまとめたいずれかのイムノアッセイにおいて、第 1、第 2、第 3 および第 4 の H C V タンパク質は、独立して、コア抗原、E 1、E 2、N S 2、N S 3、N S 4 および N S 5、またはコア抗原、E 1、E 2、N S 2、N S 3、N S 4 および N S 5 のいずれか 1 つの別個の独立した部分からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

特定の実施形態では、第 1、第 2、第 3 および第 4 の H C V タンパク質の 2 つ以上が、独立して、コア抗原、E 1、E 2、N S 2、N S 3、N S 4 および N S 5 からなる群から選択される同じタンパク質の異なる部分から選択される。

## 【 0 0 1 6 】

具体的な好ましい実施形態では、本発明のイムノアッセイにおいて、第 1 の H C V タンパク質は、試験サンプル中に存在する抗 - コア抗体を検出するために設計されたコア抗原である。さらに具体的には、抗 - コア抗体を捕捉するための捕捉抗原は、アミノ酸 3 4 および 4 8 およびアミノ酸 1 1 5 から 1 2 1 の欠失を含むコアペプチドである。ある実施形態では、抗 - コア抗体を検出するための検出抗原も、アミノ酸 3 4 および 4 8 およびアミノ酸 1 1 5 から 1 2 1 の欠失を含むコアペプチドである。特定の実施形態では、組み合わせイムノアッセイは、試験サンプル中のコア抗原および抗 - コア抗体の両方を検出するように設計される。このような検出は、捕捉抗原および検出抗原として上にまとめられたコア欠失抗原の使用によって容易になる。従って、上に概説したイムノアッセイにおいて、第 1 の抗原および第 4 のタンパク質の両方は、それぞれ、コアに関連するタンパク質であり、つまり、第 1 の抗原は、試験アッセイで供給され、第 4 のタンパク質は、サンプル中の H C V の存在の結果として試験サンプル中に存在する。

## 【 0 0 1 7 】

試験サンプルに由来する抗原の捕捉を使用する特定の実施形態では、イムノアッセイは、複数の抗体を使用してもよく、複数の抗原は、それぞれ、同じ H C V 抗原の別個のエピトープに指向する（例えば、コア抗原を捕捉するための 2 つの別個の捕捉抗体として、コアの脂質結合領域に指向する抗体およびコアの D N A 結合領域に指向する抗体）。

## 【 0 0 1 8 】

本発明のイムノアッセイは、捕捉抗体および複合抗体の第 2 の対を提供することをさらに含み、第 2 の捕捉 / 複合抗体の対が、上にまとめられたイムノアッセイの第 1 の捕捉 / 複合抗体の対と同じ H C V タンパク質に特異的に結合するか、または異なる H C V タンパク質に特異的に結合する。

## 【 0 0 1 9 】

特定の実施形態では、捕捉抗原および捕捉抗体は、固体支持体に結合する。

## 【 0 0 2 0 】

他の実施形態では、第 1 の捕捉抗原は、ビオチン化されたコアペプチドであり、第 1 の検出抗原は、アクリジン化されたコアペプチドであり、それぞれのビオチン化された抗原および検出抗原は、アミノ酸 3 4 および 4 8 およびアミノ酸 1 1 5 から 1 2 1 の欠失を含むコアペプチドである。

## 【 0 0 2 1 】

さらなる具体的な実施形態は、第 2 の捕捉抗原は、ビオチン化された N S 3 組み換え抗原であり、第 2 の検出抗原は、アクリジン化された N S 3 組み換え抗原である。他の具体的な実施形態では、第 3 の捕捉抗原は、ビオチン化された N S 4 ペプチドであり、第 3 の検出抗原は、アクリジン化された N S 4 ペプチドである。

## 【 0 0 2 2 】

特定の実施形態では、捕捉抗体は、ビオチン化された C 1 1 - 7 モノクローナル抗体である。

## 【 0 0 2 3 】

他の実施形態では、検出抗体複合体は、C 1 1 - 9 および C 1 1 - 1 4 またはこれらの組み合わせからなる群から選択される抗体を含む。

## 【 0 0 2 4 】

さらに、本明細書には、試験サンプルから複数の H C V 要素を検出するためのイムノアッセイであって、

( a ) ビオチンが結合する固相を提供することと、

( b ) 固相と、

10

20

30

40

50

( i ) ビオチン化された第 1 の捕捉抗原、ビオチン化された第 2 の捕捉抗原、ビオチン化された第 3 の捕捉抗原および第 4 の H C V 抗原に特異的なビオチン化された抗体、および

( i i ) 検出可能に標識された第 1、第 2、第 3 の検出抗原を含む混合物とを、

( 1 ) それぞれ第 1、第 2 および第 3 のビオチン化された抗原と独立して免疫反応性であり、これらによって捕捉される試験サンプル中の抗体と、ビオチン化された抗体と免疫反応性であるサンプル中の H C V タンパク質との間に生成する免疫複合体、および

( 2 ) 捕捉抗体およびそれぞれの第 1、第 2 および第 3 の検出可能に標識された抗原との間に生成する免疫複合体

のために十分な条件および時間で接触させることと、

( c ) 未反応の試験サンプルおよび試薬から、接続した検出可能に標識された捕捉された抗体および捕捉された第 4 の H C V 抗原を含む固相を単離することと、

( d ) 単離された固相と、捕捉された第 4 の H C V 抗原に結合する検出可能に標識された複合抗体とを接触させることと、

( e ) 検出可能な標識部分から発生したシグナルが引き金となると、シグナルを検出することと

を含み、シグナルの存在は、試験サンプル中の H C V の存在を示す、イムノアッセイも記載される。

#### 【 0 0 2 5 】

再び、このようなアッセイでは、第 1、第 2、第 3 および第 4 の H C V タンパク質は、独立して、コア抗原、E 1、E 2、NS 2、NS 3、NS 4 および NS 5 からなる群から選択される。さらに具体的には、ある特定の実施形態では、H C V コア抗原は、アミノ酸 3 4 および 4 8 およびアミノ酸 1 1 5 から 1 2 1 の欠失を含み、第 2 の抗原は、NS 3 抗原であり、第 3 の抗原は、NS 4 抗原であり、ビオチン化された抗体が、H C V コア抗原に対するものである。具体的な実施形態では、抗 - コアモノクローナル抗体は、H C V コアの脂質結合ドメインに特異的な抗体である。これに代えて、またはこれに加えて、NS 3 抗原は、ヘリカーゼのそれぞれのドメイン I、I I および I I I を含む NS 3 ヘリカーゼ配列を含む組み換え H C V NS 3 抗原であり、この抗原は、C 3 3 抗原と比較した場合、血清由来の H C V 抗体に対する免疫反応性が高まっている。

#### 【 0 0 2 6 】

さらに、本明細書には、試験サンプルから複数の H C V 抗体を検出するためのイムノアッセイであって、

( a ) ビオチンが結合する固相を提供することと、

( b ) 固相と、

( i ) ビオチン化された第 1 の捕捉抗原、ビオチン化された第 2 の捕捉抗原、ビオチン化された第 3 の捕捉抗原、および

( i i ) 検出可能に標識された第 1、第 2 および第 3 の検出抗原を含む混合物とを、

( 1 ) それぞれ第 1、第 2 および第 3 のビオチン化された抗原と独立して免疫反応性であり、これらによって捕捉される試験サンプル中の抗体との間に生成する免疫複合体、および

( 2 ) 捕捉抗体およびそれぞれの第 1、第 2 および第 3 の検出可能に標識された抗原との間に生成する免疫複合体

のために十分な条件および時間で接触させることと、

( c ) 未反応の試験サンプルおよび試薬から、接続した検出可能に標識された捕捉された抗体を含む固相を単離することと、

( d ) 検出可能な標識部分から発生したシグナルが引き金となると、シグナルを検出することと

を含み、シグナルの存在は、試験サンプル中の H C V の存在を示す、イムノアッセイも

10

20

30

40

50

想定される。再び、このようなイムノアッセイでは、第1、第2および第3のHCVタンパク質が、独立して、コア抗原、E1、E2、NS2、NS3、NS4およびNS5からなる群から選択される。ある特定の例示的なアッセイでは、第1の抗原は、HCVコア抗原であり；第2の抗原は、NS3抗原であり；第3の抗原は、NS4抗原である。さらに具体的には、捕捉コア抗原は、必要ではないが、アミノ酸34および48およびアミノ酸115から121の欠失を含む抗原であってもよい。NS3抗原は、NS3から誘導される任意のNS3抗原であってもよい。特定の実施形態では、NS3抗原は、ヘリカーゼのそれぞれのドメインI、IIおよびIIIを含むNS3ヘリカーゼ配列を含む組み換えHCV NS3抗原であり、抗原は、C33抗原と比較した場合、血清由来のHCV抗体に対する免疫反応性が高まっている。

10

## 【0027】

本発明は、さらに、サンプル中のHCV抗原およびHCV抗体を同時に検出するためのキットであって、

検出抗原が検出可能に標識されている、第1のHCVタンパク質に対する第1の抗-HCV抗体を検出するための捕捉抗原および検出抗原の第1の対、

検出抗原が検出可能に標識されている、第2のHCVタンパク質に対する第2の抗-HCV抗体を検出するための捕捉抗原および検出抗原の第2の対、

検出抗原が検出可能に標識されている、第3のHCVタンパク質に対する第3の抗-HCV抗体を検出するための捕捉抗原および検出抗原の第3の対、

複合抗体が検出可能に標識されている、第4のHCVタンパク質を検出するための捕捉抗体および複合抗体の第1の対

20

を含む、キットを含む。

## 【0028】

このキットにおいて、第1、第2、第3および第4のHCVタンパク質は、独立して、コア抗原、E1、E2、NS2、NS3、NS4およびNS5、またはコア抗原、E1、E2、NS2、NS3、NS4およびNS5のいずれか1つの別個の独立した部分からなる群から選択される。具体的には、キットは、独立して、コア抗原、E1、E2、NS2、NS3、NS4およびNS5からなる群から選択される同じタンパク質の異なる部分から選択される第1、第2、第3および第4のHCVタンパク質の2つ以上を検出するように設計される。好ましいキットでは、第1のHCVタンパク質は、コア抗原であり、好ましくは、アミノ酸34および48およびアミノ酸115から121の欠失を含むコアペプチドである。このキットは、抗-コア抗体検出抗原を含み、検出抗原中のコアペプチドは、アミノ酸34および48およびアミノ酸115から121の欠失を含む。キットは、サンプル中のコア抗原を検出してもよく、従って、有利には、抗-コア捕捉抗体および検出抗体を含んでいてもよい。このような捕捉抗体は、2つ以上の抗体を含んでいてもよい。

30

## 【0029】

キットは、捕捉抗体および複合抗体の第2の対も含んでいてもよく、第2の捕捉/複合抗体の対が、第1の捕捉/複合抗体の対と同じHCVタンパク質に特異的に結合するか、または異なるHCVタンパク質に特異的に結合する。特定の実施形態では、捕捉抗原および捕捉抗体が固体支持体に結合する。

40

## 【0030】

本発明の抗原を使用する任意のイムノアッセイは、自動化されたシステムまたは半自動化されたシステムで使用するよう簡単に調整されるだろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0031】

【図1】図1は、本発明のHCV NS3組み換え抗原の位置を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0032】

本発明は、従来のイムノアッセイで行われるようなHCVに対する両抗体を検出することによって、さらに、HCVに対する抗体が成長する前に、感染の初期段階での個人の血

50

液中に存在し得るHCVコア抗原を検出することによって、HCVへの曝露の検出を向上させたHCV組み合わせイムノアッセイを提供する。本発明は、1つのアッセイにおいて、サンプル中のHCV抗原および抗-HCV抗体を両方とも同時に検出するための組み合わせイムノアッセイについて、当該技術分野の必要性を満たす。抗原/抗体組み合わせアッセイ方法は、HCVセロコンバージョンの初期段階中に存在する抗原性および免疫原性のHCV抗体および抗原の同定および使用に依存し、これによって、検出の正確さを高め、ウインドウピリオド中の間違っただけの結果の発生を減らす。

#### 【0033】

本発明の組み合わせアッセイを用いてHCVについて試験することができる生体サンプルとしては、HCVビリオン、抗原または抗体を含むおそれがある任意のサンプルが挙げられる。「サンプル」という用語は、本明細書で使用される場合、最も広い意味で使用される。「生体サンプル」は、本明細書で使用される場合、限定されないが、生きているものまたは以前生きていたものに由来する任意の量の物質を含む。このような生きているものとしては、限定されないが、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギおよび他の動物が挙げられる。このような物質としては、限定されないが、血液（例えば、全血液またはこの要素）、血漿、血清、尿、唾液、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単核細胞、他の細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節および脾臓が挙げられる。

#### 【0034】

組み合わせアッセイの抗-HCV抗体の検出態様では、少なくとも1つの（即ち、1つ以上の）捕捉抗原が使用され、試験サンプル中に存在する抗-HCV抗体に結合し、従って、抗-HCV抗体を捕捉する。捕捉抗原は、一般的に、HCVゲノムによってコードされるHCVタンパク質から誘導される抗原性ペプチド（1つ以上のエピトープを含む。）である。全HCVゲノムの配列およびコードされたHCVポリタンパク質の配列は、GenBankに示されており（それぞれ寄託番号M62321およびAA45676）、当業者にとって利用可能である。使用可能なある例示的なコア抗原としては、コアタンパク質のDNA結合ドメイン（アミノ酸1から125）から誘導される抗原が挙げられる。さらに他の好ましいコア抗原は、コアタンパク質のアミノ酸残基134から171に位置するコアの脂質結合ドメインから誘導される（MGYIPLVGLPLGGAAALAHGVRVLELDGVNYATGNLPG）（配列番号89）。しかし、本発明において、特に好ましいコア抗原としては、特定のモノクローナル抗体のための既知のエピトープ結合領域に特定の欠失または置換を含むコアタンパク質から誘導される抗原が挙げられ、この結果、HCVコア抗原検出に使用されるモノクローナル抗体は、これらの改変されたコア抗原を検出できない一方、試験サンプルからの完全なコア抗原を検出するだろう。従って、これらの新規の改変されたコア抗原で固相支持体をコーティングすることができ、および/またはヒト血清または血漿中に存在する捕捉抗体に溶液相で使用することができ、HCVのコア領域に指向するが、同時に、HCVコンボアッセイでコアAgの検出に使用される複合抗体による検出をせず、同時に、試験サンプル中にあると予想され、同じHCVコンボアッセイフォーマットで同定される抗-コア抗体を検出することができる。本発明のアッセイで使用するのに好ましいコア抗原は、アミノ酸34および48およびアミノ酸115から121の欠失を含む変異コアタンパク質を含む。

#### 【0035】

本明細書に記載される新規コア捕捉抗原を用いることによって、本発明は、抗-コア抗体を捕捉するために使用される現在利用可能なコア抗原を、コア抗原の血清学的検出を行うように設計された検出抗体と反応させるため、HCV組み合わせアッセイにおいてコア抗原を検出するために使用される現在利用可能な\*Ac-DBA-c11-9/c11-14複合体を用いたときにみられる顕著な問題を克服する。以前、この問題をなくすために、5アミノ酸（C11-9結合領域のアミノ酸32、33および34およびコアのC11-14結合領域に由来するアミノ酸および残基47および48）の欠失によって、構築物が作られたが、これらの構築物は、これらの残基は、抗-コア陽性の患者において非常に免疫原性であるため、抗-コア抗体の検出は良くなかった。捕捉抗原として本明細書に

10

20

30

40

50

記載されるコア抗原の使用は、\*Ac-DBA c11-9/c11-14複合体による検出をうまく避けることができるが、抗-コア反応性標本の検出を保持するか、または高めるより最低限の欠失を包含する設計であるため、この問題を克服する。本発明の組み合わせアッセイでは、抗-HCVコア抗体を捕捉し、検出するためのコア抗原は、有利には、検出コア抗原に対する捕捉抗体の結合をなくすのに十分なコアアミノ酸の欠失を含む(例えば、アミノ酸115から121が欠失している。)

【0036】

#### 定義

本発明は、試験サンプル中のHCVを検出するための試薬を提供する。好ましくは、この検出は、試験サンプル中のHCV抗原および抗-HCV抗体を両方とも同時に検出することによって達成される。明細書全体で、特定の用語が頻繁に使用され、このため、以下の章は、これらの用語のさらなる定義を与える。「抗体」(Ab)および「複数の抗体」(Abs)という用語は、モノクローナル抗体(mAb(単数形)またはmAbs(複数形))、ポリクローナル抗体(pAbs(複数形))、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体(完全または部分的にヒト化されたもの;ヒト抗体の改変された可変領域を含み、可変領域の一部が、非ヒト配列の対応する配列によって置換されており、改変された可変領域が、ヒト抗体の定常領域の少なくとも一部に連結しているポリペプチド)、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど)または非ヒト霊長類(例えば、サル、チンパンジーなど)を含む動物抗体(例えば、限定されないが、鳥(例えば、アヒルまたはガチョウ)、サメ、クジラおよび哺乳動物、組み換え抗体、キメラ抗体(cAb;別の宿主種に由来する抗体定常領域の少なくとも一部に連結した、ある宿主種に由来する抗体の重鎖および軽鎖可変領域のすべてまたは一部を含むポリペプチド)、一本鎖抗体、一本鎖ドメイン抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab'-SHフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント(「scFv」)、ジスルフィド結合したFvフラグメント(「sdFv」)、dAbフラグメント、ダイアボディ、単離された相補性決定領域(CDR)および抗-イディオタイプ(「抗-Id」)抗体、二官能または二重ドメイン抗体(例えば、二重可変ドメイン抗体、またはDVD-IgG)、ならびに上述のいずれかの機能的に活性なエピトープ結合フラグメント(または抗原的に反応性のフラグメント)を指す。特に、抗体としては、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な(または抗原的に反応性の)フラグメント、つまり、本明細書で(n)にさらに記載されるような検体結合部位を含む分子および本明細書で(ac)にさらに記載されるような改変体が挙げられる。免疫グロブリン分子は、任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)、またはサブクラスであってもよい。バイオディスプレイを用いて調製されたコンビナトリー抗体ライブラリのスクリーニングを介し、アフィニティが増加または向上した抗体(即ち、KD、kdまたはka)は、「親和性が成熟した抗体」と呼ばれる。単純化するために、検体に対する抗体は、多くは、本明細書には「抗-検体抗体」または単に「検体抗体」と呼ばれる(例えば、抗-HCV抗体またはHCV抗体)。

【0037】

本発明では、アッセイの「要素」、「複数の要素」および「少なくとも1つの要素」は、一般的に、捕捉抗体、検出抗体または複合抗体、コントロール、キャリアレーター、一連のキャリアレーター、感受性パネル、容器、バッファー、希釈剤、塩、酵素、酵素の補因子、検出試薬、前処理試薬/溶液、基質(例えば、溶液として)、停止溶液などを指し、本明細書に記載される方法および当該技術分野で既知の他の方法に従って、試験サンプル(例えば、患者の尿、血清または血漿サンプル)のアッセイのためのキットに含まれていてもよい。従って、本開示の内容において、「少なくとも1つの要素」、「要素」および「複数の要素」は、本明細書に記載されるようなポリペプチドを含んでいてもよく、場合により固体支持体に固定されている。ある要素は、溶液であってもよく、アッセイに使

10

20

30

40

50

用するために再構築するために凍結乾燥されていてもよい。

【0038】

本発明のアッセイを行う際に、コントロールを使用することが有用であろう。「コントロール」は、抗-HCV抗体を含まないことが知られている組成物（「ネガティブコントロール」）または抗-HCV抗体を含むことが知られている組成物（「ポジティブコントロール」）を指す。ポジティブコントロールは、既知の濃度の抗-HCV抗体を含んでいてもよい。「コントロール」、「ポジティブコントロール」および「キャリブレーター」は、既知の濃度の抗-HCV抗体を含む組成物を指すために、本明細書で相互に置き換え可能に用いられてもよい。「ポジティブコントロール」を使用し、アッセイの性能特徴を確立することができ、ポジティブコントロールは、試薬（例えば、検体）の一体性の有用な指標である。

10

【0039】

本発明のNS3抗原は、試験サンプル中の抗-HCV抗体を検出するための血清学アッセイに有用である。このような抗体が、本発明のNS3抗原に含まれるエピトープを認識するためである。「エピトープ」、「複数のエピトープ」および「目的のエピトープ」は、認識され、特定の結合パートナーの相補性部位（例えば、抗体またはこの抗原的に反応性のフラグメント）に結合可能な任意の分子の部位（この場合には、本明細書に記載されるNS3抗原）を指す。エピトープは、特定の結合パートナーの相補性部位に結合することが知られている抗原（またはこのフラグメント）の領域の正確なアミノ酸残基からなる。抗原性フラグメントは、1個より多いエピトープを含んでいてもよい。

20

【0040】

本明細書に記載されるアッセイにおいて、アッセイのある要素または他の要素は、検出可能な標識を含んでいてもよい。「標識」および「検出可能な標識」という用語は、特定の結合パートナー（例えば、抗体または検体）に接続し、検出可能な特異的な結合対（例えば、抗体および検体）のメンバーと、特定の結合パートナー（例えば、抗体または検体）との反応を行う部分を意味し、このような標識されたものは、「検出可能に標識された」と呼ばれる。標識は、視覚によって、または装置手段によって検出可能なシグナルを生成することができる。種々の標識としては、シグナルを生成する基質、例えば、色原体、蛍光化合物、化学発光化合物、放射性化合物などが挙げられる。標識の代表例としては、光を生成する部分（例えば、アクリジニウム化合物）および蛍光を生成する部分（例えば、フルオロセイン）が挙げられる。他の標識が本明細書に記載される。この観点で、この部分自体が検出可能に標識されていなくてもよいが、さらなる別の部分と反応したときに検出可能になってよい。「検出可能に標識された」の使用は、後者の種類の検出可能な標識を包含することを意図している。

30

【0041】

「連結配列」は、目的の1つ以上のポリペプチド配列（例えば、全長、フラグメントなど）に接続した天然または人工のポリペプチド配列を指す。「接続した」という用語は、目的のポリペプチド配列に対する連結配列の接続を指す。このようなポリペプチド配列は、好ましくは、1つ以上のペプチド結合によって接続する。連結配列は、約4アミノ酸から約50アミノ酸の長さを有していてもよい。好ましくは、連結配列の長さは、約6から約30のアミノ酸である。天然の連結配列は、人工の連結配列を作成するためにアミノ酸の置換、付加または欠失によって改変されていてもよい。例示的な連結配列としては、限定されないが、以下のものが挙げられる。(i)ヒスチジン残基(Hisタグ)、例えば、6個のヒスチジン残基を含む6xHisタグは、目的のポリペプチドおよび抗体の単離および精製を容易にするための連結配列として有用である。(ii)Hisタグのようなエンテロキナーゼ開裂部位は、目的のタンパク質および抗体の単離および精製に使用される。多くは、エンテロキナーゼ開裂部位は、目的のタンパク質および抗体の単離および精製において、Hisタグとともに使用される。種々のエンテロキナーゼ開裂部位は、当該技術分野で公知である。(iii)種々雑多な配列を使用し、一本鎖可変領域フラグメントの軽鎖および/または重鎖可変領域に連結または接続することができる。他の連結配列

40

50

の例は、Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., PNAS USA 85:5879-5883 (1988); および McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990) に見いだすことができる。連結配列は、さらなる機能（例えば、薬物の接続または固体支持体への接続）のために改変することもできる。本開示の観点で、mAb は、例えば、連結配列（例えば、ヒスタグ、エンテロキナーゼ開裂部位、またはこの両方）を含んでいてもよい。

#### 【0042】

「患者」および「被検体」は、動物、例えば、鳥（例えば、アヒルまたはガチョウ）、サメ、クジラ、ならびに非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラットおよびマウス）および霊長類（例えば、サル、チンパンジーおよびヒト）を含む哺乳動物を指すために本明細書で相互に置き換え可能に使用されてもよい。好ましくは、患者または被検体は、ヒト、例えば、HCV 感染のリスクがあるヒト、または HCV に感染したヒトである。

#### 【0043】

本明細書に記載されるイムノアッセイの結果の分析では、カットオフレベルとして特定の検出レベルを含むことが有用であろう。「所定のカットオフ」および「所定のレベル」は、一般的に、所定のカットオフ/レベルに対してアッセイの結果を比較することによって診断/予後/治療効果を評価するために使用されるアッセイのカットオフ値を指し、所定のカットオフ/レベルは、種々の臨床パラメーターとすでにつながりがあるか、または関係がある（例えば、疾患の重篤度、進行/進行しないこと/向上など）。本開示は、例示的な所定のレベルを与えてもよいが、カットオフ値は、イムノアッセイの性質（例えば、使用される抗体など）によって変わってもよいことがよく知られている。さらに、本開示に基づく他のイムノアッセイのためのイムノアッセイに特異的なカットオフ値を得るために、他のイムノアッセイに本明細書の本開示を応用することは、十分に当業者の通常の知識内である。所定のカットオフ/レベルの正確な値は、アッセイ間で変動し得るが、本明細書に記載されるような相関関係を一般的に適用することができる。

#### 【0044】

以下に記載されるように、本発明のある実施形態では、試験サンプルの前処理を行うことが望ましい場合がある。「前処理試薬」、例えば、溶解、沈殿および/または可溶化の試薬は、本明細書に記載されるような診断アッセイで用いられる場合、試験サンプル中に存在する任意の細胞を溶解したものおよび/または任意の検体を可溶化したものである。本明細書にさらに記載されるように、前処理は、すべてのサンプルに必要なわけではない。他のものの中で、検体（即ち、抗-HCV 抗体）を可溶化することは、サンプル中に存在する任意の内因性結合タンパク質からの検体の放出を伴う。前処理試薬は、均一であってもよく（分離工程を必要としない。）、または不均一であってもよい（分離工程を必要とする。）。不均一な前処理試薬を使用するとき、アッセイの次の工程に進む前に、試験サンプルから、任意の沈殿した検体に結合するタンパク質の除去が存在する。前処理試薬は、場合により、(a) 1つ以上の溶媒および塩、(b) 1つ以上の溶媒、塩および洗剤、(c) 洗剤、(d) 洗剤および塩、または(e) 細胞溶解および/または検体の可溶化に適した任意の試薬または試薬の組み合わせを含んでいてもよい。

#### 【0045】

アッセイは、厳格な品質制御を受けてもよい。「品質制御試薬」は、本明細書に記載されるイムノアッセイおよびキットの観点で、限定されないが、キャリブレーター、コントロールおよび感受性パネルを含む。「キャリブレーター」または「標準」は、典型的には、検体（例えば、抗体または検体）の濃度の内挿のための較正（標準）曲線を確認するために使用される（例えば、1つ以上、例えば、複数で）。または、所定のポジティブ/ネガティブカットオフに近い1つのキャリブレーターを使用することができる。複数のキャリブレーター（即ち、1つより多いキャリブレーター、または種々の量のキャリブレーター）を、「感受性パネル」を含むように組み合わせ使用することができる。

## 【 0 0 4 6 】

「サンプル」、「試験サンプル」および「患者サンプル」という用語は、本明細書で相互に置き換え可能に使用されてもよい。サンプル、例えば、尿、血清、血漿、羊水、脳脊髄液、胎盤細胞または組織、内皮細胞、白血球または単核細胞のサンプルを、患者から得られたまま直接使用してもよく、または例えば、本明細書に記載される幾つかの様式、または当該技術分野で知られるような他の様式でサンプルの特徴を変えるために、濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、妨害要素の不活性化、試薬の添加などによって前処理してもよい。好ましくは、サンプルは、尿、血清または血漿である。

## 【 0 0 4 7 】

あるアッセイでは、アッセイの較正を行うことが望ましいだろう。「一連の較正組成物」は、既知の濃度の抗 - H C V 抗体を含む複数の組成物を指し、それぞれの組成物は、一連の他の組成物とは抗 - H C V 抗体の濃度が異なる。

10

## 【 0 0 4 8 】

本明細書全体で、N S 3 抗原および/または他の試薬が、固体支持体または固相に結合してもよく、両方の用語は、相互に置き換え可能に使用されることを注記する。「固相」という用語は、不溶性の任意の材料を指すか、またはその後の反応によって不溶性になってもよい。固相は、捕捉剤を引きつけ、固定する固有の能力について選択することができる。または、固相は、捕捉剤を引きつけ、固定する能力を有する固定された連結剤を有していてもよい。連結剤は、例えば、捕捉剤自体または捕捉剤に接合した帯電した物質と反対に帯電した、帯電した物質を含んでいてもよい。一般的に、連結剤は、固相に固定（接

20

## 【 0 0 4 9 】

本明細書に記載されるアッセイの特定の記載では、特定の結合パートナーとして、N S 3、N S 4 またはコア抗原、または H C V 抗体のいずれかを指すことが有用であろう。「特定の結合パートナー」は、特異的な結合対の 1 つである。特異的な結合対は、2 つの異なる分子を含み、化学的手段または物理的手段によって互いに特異的に結合する。従って、共通のイムノアッセイの抗原および抗体に特異的な結合対に加え、他の特異的な結合対は、ピオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）、炭水化物およびレクチン、相補的なヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補因子および酵素、酵素阻害剤および酵素などを含んでいてもよい。さらに、特異的な結合対は、元々の特定の結合メンバーのアナログであるメンバーを含んでいてもよい（例えば、検体 - アナログ）。免疫反応性の特定の結合メンバーとしては、単離されているか、または組み換えによって作られたかによらず、抗原、抗原フラグメントおよび抗体（モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む。）およびこの複合体、フラグメントおよび改変体（改変体のフラグメントを含む。）が挙げられる。「特異的な」および「特異性」の用語は、特異的な結合対（例えば、抗原（またはこのフラグメント）および抗体（またはこの抗原的に反応性のフラグメント））のメンバー間の相互作用の観点で、相互作用の選択的な反応性を指す。「...に特異的に結合する」の句および類似の句は、抗体（またはこの抗原的に反応性のフラグメント）が所与の抗原（またはこのフラグメント）に特異的に結合し、他の部分には特異的に結合しない能力を指す。

30

40

## 【 0 0 5 0 】

本発明で使用するための抗原

本明細書に記載される場合、本発明は、アッセイされる試験サンプルの H C V の感受性が高く、選択的な検出を有利に与えるために、1 つのアッセイにおける H C V 抗原の組み合わせの検出を記載する。特定の好ましい実施形態では、組み合わせアッセイは、さらに

50

、抗 - H C V 抗体の存在を検出する。さらに具体的には、H C V 抗原は、典型的には H C V アッセイで観察される任意の抗原であってもよい。このような抗原としては、限定されないが、コア抗原、E 1、E 2、N S 2、N S 3、N S 4 および N S 5、または、コア抗原、E 1、E 2、N S 2、N S 3、N S 4 および N S 5 の任意のいずれかの別個の独立した部分である。このような抗原を検出するためのイムノアッセイは、個々に、当業者にとって商業的に入手可能であり、このような市販のアッセイで使用される任意の抗原は、本発明のイムノアッセイで捕捉抗原または検出抗原として容易に使用されてもよい。例えば、H C V N S 3 タンパク質およびこの変異体は、主に、2つの主要なタンパク質部分を含む必要があり、第1の部分は、P 2 6 6 6 4 ( G e n b a n k、本明細書では、配列番号2として再現される；C h o o e t a l . , P N A S 1 9 9 1 ) として番号が付けられている、C 3 3 ( C h i r o n によって元々記載されている。)として、または「9 N B 4 9 H」として知られているH C V ポリタンパク質のアミノ酸1 1 9 2 から1 4 5 7 に対応する。N S 3 タンパク質の第2の部分は、N S 3 ヘリカーゼまたは「N S 3 h」としても知られるアミノ酸1 1 9 2 から1 6 5 7 に対応する。これら2つのタンパク質のすべてまたは一部を含む抗原は、試験サンプル中の抗 - H C V 抗体の検出に簡単に使用することができる。例えば、C 3 3 は、H C V の N S 3 タンパク質から誘導されるよく知られた抗原であり、本発明の組み合わせイムノアッセイで N S 3 抗体を検出するための捕捉抗原または検出抗原として本明細書で簡単に使用されるだろう。

#### 【0051】

他の N S 3 から誘導される抗原としては、名称「H C V N S 3 R e c o m b i n a n t A n t i g e n s a n d M u t a n t s T h e r e o f f o r I m p r o v e d A n t i b o d y D e t e c t i o n」、代理人整理番号03946-26530US01の同時に出願された米国仮出願第61/784,822号に記載されるものが挙げられる。このような抗原は、C 3 3 の改変体であり、N 末端配列または C 末端配列が改変された N S 3 ヘリカーゼタンパク質の改変体である。ある実施形態では、システインからセリンへの突然変異を含む抗原が作られた。これらの突然変異は、抗原の酸化に対する耐性を高め、これによって、エピトープの提示を保持し、従って、免疫反応性を保持する。システインからセリンへの突然変異は、例えば、免疫反応性の維持のために重要ではないと考えられる選択されたシステイン残基のみを変異することによって、(マレイミド試薬を用いた化学接合によって)タンパク質の部位特異的な改変も可能にした。さらに、システインからセリンへの置換された変異の少なくとも一部は、全長ヘリカーゼ酵素 ( H C V a a 1 1 9 2 - 1 6 5 7 ) が、ヌクレオチド三リン酸 ( 例えば、A T P ) に結合する能力を破壊する。これは、開いた構造または伸長した構造にタンパク質を維持し ( G u & R i c e , P N A S , 2 0 1 0 , 1 0 7 : 5 2 1 - 5 2 8 およびこの中の参考文献を参照)、本発明で向上した免疫反応性を生成することが示される。

#### 【0052】

本発明で使用可能な例示的な N S 3 抗原を本明細書で以下の表1に示す。一般的に、これらの N S 3 抗原は、ヘリカーゼのそれぞれのドメイン I、II および III を含む N S 3 ヘリカーゼ配列を含む組み換え H C V N S 3 抗原として記載されてもよく、この抗原は、C 3 3 抗原と比較した場合、血清由来の H C V 抗体に対する免疫反応性が高まっており、前記組み換え H C V N S 3 抗原は、野生型 N S 3 ヘリカーゼの A T P - 結合活性と比較して、A T P - 結合活性の低下；野生型 N S 3 ヘリカーゼの A T P - 結合活性と比較して、野生型 N S 3 と比較して、A T P a s e 活性の低下および野生型 N S 3 ヘリカーゼの酸化還元安定性と比較して、酸化還元安定性の増加からなる群から選択される1つ以上の特徴を有する。さらに具体的には、本発明の内容において、野生型 H C V N S 3 は、配列番号87の配列を含み、本発明の組み換え抗原は、配列番号87の配列と比較して、少なくとも1つの突然変異を含む。これらの抗原の製造および試験の詳細な記載は、名称「H C V N S 3 R e c o m b i n a n t A n t i g e n s a n d M u t a n t s T h e r e o f f o r I m p r o v e d A n t i b o d y D e t e c t i o n」、代理人整理番号03946-26530US01を有する同時に出願された米国仮

出願第 6 1 / 7 8 4 , 8 2 2 号に与えられる。

【 0 0 5 3 】

【 表 1 】

表1:

抗原記号	抗原	配列	
A	K210N	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgNstkv paayaaqgyk vvlvnpvsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvirtittgsp itystygkfl adggcsggay diii <u>dechs</u> tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>chskkkc</u> delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <u>cntcvtq</u> tvdfslcptf tietitlpqd avsrtrrgr tgrgkpgiyf fvapgerpsg mfdssvl <u>cec</u> ydagcawyel tpaettvrlr aymntpglpv cqdhlefweg vftglthida hflsqtqsg enlpylvayq atvcaraqap ppswdqmwkc lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtkyimtcms adlevvt (配列番号109)	10
B	S211A	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkAtkv paayaaqgyk vvlvnpvsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvrtittgsp itystygkfl adggcsggay diii <u>dechs</u> tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>chskkkc</u> delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <u>cntcvtq</u> tvdfslcptf tietitlpqd avsrtqrrgr tgrgkpgiyf fvapgerpsg mfdssvl <u>cec</u> ydagcawyel tpaettvrlr aymntpglpv cqdhlefweg vftglthida hflsqtqsg enlpylvayq atvcaraqap ppswdqmwkc lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtkyimtcms adlevvt (配列番号110)	20 30
C	T212E	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgksEkv paayaaqgyk vvlvnpvsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvrtittgsp itystygkfl adggcsggay diii <u>dechs</u> tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>chskkkc</u> delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <u>cntcvtq</u> tvdfslcptf tietitlpqd avsrtqrrgr tgrgkpgiyf fvapgerpsg mfdssvl <u>cec</u> ydagcawyel tpaettvrlr aymntpglpv cqdhlefweg vftglthida hflsqtqsg enlpylvayq atvcaraqap ppswdqmwkc lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtkyimtcms adlevvt (配列番号111)	40
D	Y241S,	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkstk paayaaqgyk vvlvnpvsvaa tlgfgaSmsk ahgidpnirt gvrtittgsp itystygkfl adggcsggay diii <u>dechs</u> tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>chskkkc</u> delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal	



		vtkyimt <del>c</del> ms adlevvt (配列番号115)				
H	T419G	avdfipven	lettmrspvf	tdnssppvvp	qsfqvahlha	ptgsgkstkv
		paayaaqgyk	vlvlnpsvaa	tlgfgaymsk	ahgidpnirt	
		gvrtittgsp	itystygkfl	adgg <del>c</del> sggay	diii <del>c</del> de <del>c</del> hs	
		tdatsilgig	tvldqaetag	arlvvlatat	ppgsvtvphp	
		niecevalstt	geipfygkai	plevikggrh	lif <del>c</del> hskkk <del>c</del>	
		delaaklval	ginavayyrg	ldvsviptsg	dvvvvatdal	
		mtgyGgdfds	vid <del>c</del> nt <del>c</del> vtq	tvdfslcptf	tietitlpqd	
		avsrtqrrgr	tgrgkpgiyr	fvapgerpsg	mfds <del>v</del> l <del>c</del> ec	10
		ydag <del>c</del> awyel	tpaettvrlr	aymntpqlpv	c <del>q</del> dhlefweg	
		vftglthida	hflsqtkqsg	enlpylvayq	atv <del>c</del> araqap	
		ppswdqmwk <del>c</del>	lirlkptlhg	ptpllyrlga	vqneitlthp	
		vtkyimt <del>c</del> ms adlevvt (配列番号116)				
I	Q460H	avdfipven	lettmrspvf	tdnssppvvp	qsfqvahlha	ptgsgkstkv
		paayaaqgyk	vlvlnpsvaa	tlgfgaymsk	ahgidpnirt	
		gvrtittgsp	itystygkfl	adgg <del>c</del> sggay	diii <del>c</del> de <del>c</del> hs	
		tdatsilgig	tvldqaetag	arlvvlatat	ppgsvtvphp	
		niecevalstt	geipfygkai	plevikggrh	lif <del>c</del> hskkk <del>c</del>	
		delaaklval	ginavayyrg	ldvsviptsg	dvvvvatdal	20
		mtgytgdfds	vid <del>c</del> nt <del>c</del> vtq	tvdfslcptf	tietitlpqd	
		avsrtHrrgr	tgrgkpgiyr	fvapgerpsg	mfds <del>v</del> l <del>c</del> ec	
		ydag <del>c</del> awyel	tpaettvrlr	aymntpqlpv	c <del>q</del> dhlefweg	
		vftglthida	hflsqtkqsg	enlpylvayq	atv <del>c</del> araqap	
		ppswdqmwk <del>c</del>	lirlkptlhg	ptpllyrlga	vqneitlthp	
		vtkyimt <del>c</del> ms adlevvt (配列番号117)				
J	R464A	avdfipven	lettmrspvf	tdnssppvvp	qsfqvahlha	ptgsgkstkv
		paayaaqgyk	vlvlnpsvaa	tlgfgaymsk	ahgidpnirt	
		gvrtittgsp	itystygkfl	adgg <del>c</del> sggay	diii <del>c</del> de <del>c</del> hs	
		tdatsilgig	tvldqaetag	arlvvlatat	ppgsvtvphp	
		niecevalstt	geipfygkai	plevikggrh	lif <del>c</del> hskkk <del>c</del>	
		delaaklval	ginavayyrg	ldvsviptsg	dvvvvatdal	
		mtgytgdfds	vid <del>c</del> nt <del>c</del> vtq	tvdfslcptf	tietitlpqd	
		avsrtqrrgA	tgrgkpgiyr	fvapgerpsg	mfds <del>v</del> l <del>c</del> ec	30
		ydag <del>c</del> awyel	tpaettvrlr	aymntpqlpv	c <del>q</del> dhlefweg	
		vftglthida	hflsqtkqsg	enlpylvayq	atv <del>c</del> araqap	
		ppswdqmwk <del>c</del>	lirlkptlhg	ptpllyrlga	vqneitlthp	
		vtkyimt <del>c</del> ms adlevvt (配列番号118)				
K	R467K	avdfipven	lettmrspvf	tdnssppvvp	qsfqvahlha	ptgsgkstkv
		paayaaqgyk	vlvlnpsvaa	tlgfgaymsk	ahgidpnirt	
		gvrtittgsp	itystygkfl	adgg <del>c</del> sggay	diii <del>c</del> de <del>c</del> hs	
		tdatsilgig	tvldqaetag	arlvvlatat	ppgsvtvphp	40

		niecevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>ch</u> skkk <u>c</u> delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <u>ent</u> <u>cvt</u> q tvdfslcptf tietitlpqd avsrtqrrgr tgKgkpgiyr fvapgerpsg midssvl <u>ce</u> <u>c</u> ydag <u>ca</u> wyel tpaettvrlr aymntpglpv <u>c</u> qdhlefweg vftglthida hfllsqtkqsg enlpylvayq atv <u>ca</u> raqap ppswdqmwk <u>c</u> lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtskyint <u>cms</u> adlevvt (配列番号119)	
L	W501A	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkstkv paayaaggyk vlvlnpsvaa tlfgaymsk ahgidpnirt gvrtittgsp itystygkfl adgg <u>cs</u> ggay diii <u>cd</u> <u>ehs</u> tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp niecevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>ch</u> skkk <u>c</u> delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <u>ent</u> <u>cvt</u> q tvdfslcptf tietitlpqd avsrtqrrgr tgrgkpgiyr fvapgerpsg mfdssvl <u>ce</u> <u>c</u> ydag <u>ca</u> Ayel tpaettvrlr aymntpglpv <u>c</u> qdhlefweg vftglthida hfllsqtkqsg enlpylvayq atv <u>ca</u> raqap ppswdqmwk <u>c</u> lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtskyint <u>cms</u> adlevvt (配列番号120)	10
M	以下からなる群から選択される2の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A		20
N	以下からなる群から選択される3の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A		
O	以下からなる群から選択される4の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A		
P	以下からなる群から選択される5の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A		30
Q	以下からなる群から選択される6の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A		
R	以下からなる群から選択される7の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A		
S	以下からなる群から選択される8の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A		40

T	以下からなる群から選択される9の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A	
U	以下からなる群から選択される10の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A	
V	以下からなる群から選択される11の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A	10
W	以下からなる群から選択される12の変異の任意の組み合わせ K210N, S211A, T212E, Y241S, D290N, E291Q, H293A, T419G, Q460H, R464A, R467K and W501A	
X	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkstk v paayaaqgyk vvlvlnpsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvr tittgsp itystygkfl adggcsggay diii <del>c</del> de <del>c</del> hs tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <del>c</del> hskkk <del>c</del> delaaklval ginavayyrg ldsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <del>c</del> nt <del>c</del> vtq tvdfsl dptf tietitlpqd avsr t qrrgr tgrgkpgiyr fvapgerpsg mfdssvl <del>c</del> e <del>c</del> ydag <del>S</del> awyel tpaettvrlr aymntpglpv <del>c</del> qdhlefweg vftglthida hflsqt kqsg enlpylvayq atv <del>c</del> araqap ppswdqm <del>w</del> k <del>c</del> lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtkyimt <del>c</del> ms adlevvt (配列番号121)	20
Y	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkstk v paayaaqgyk vvlvlnpsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvr tittgsp itystygkfl adggcsggay diii <del>c</del> de <del>s</del> hs tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <del>c</del> hskkk <del>c</del> delaaklval ginavayyrg ldsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <del>c</del> nt <del>c</del> vtq tvdfsl dptf tietitlpqd avsr t qrrgr tgrgkpgiyr fvapgerpsg mfdssvl <del>c</del> e <del>c</del> ydag <del>c</del> awyel tpaettvrlr aymntpglpv <del>S</del> qdhlefweg vftglthida hflsqt kqsg enlpylvayq atv <del>c</del> araqap ppswdqm <del>w</del> k <del>c</del> lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtkyimt <del>c</del> ms adlevvt (配列番号122)	30
Z	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkstk v paayaaqgyk vvlvlnpsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvr tittgsp itystygkfl adggcsggay diii <del>c</del> de <del>s</del> hs tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <del>c</del> hskkk <del>c</del> delaaklval ginavayyrg ldsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <del>c</del> nt <del>c</del> vtq tvdfsl dptf tietitlpqd avsr t qrrgr tgrgkpgiyr fvapgerpsg mfdssvl <del>c</del> e <del>c</del> ydag <del>c</del> awyel tpaettvrlr aymntpglpv <del>c</del> qdhlefweg vftglthida hflsqt kqsg enlpylvayq atv <del>c</del> araqap ppswdqm <del>w</del> k <del>c</del> lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtkyimt <del>c</del> ms adlevvt (配列番号123)	40

A1	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkstkv paayaaqgyk vlvlnpsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvrtittgsp itystygkfl adggcsggay diii <u>cd</u> ehs tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>sh</u> skkkc delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <u>cnt</u> cvtq tvdfslcptf tietitlpqd avsrtrrrgr tgrgkpgiyr fvapgerpsg mfdssvl <u>cec</u> ydagcawyel tpaettvrlr aymntpglpv cqdhlefweg vftglthida hflsqtksqg enlpylvayq atv <u>car</u> aqap ppswdqmwkc lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtskyimt <u>cms</u> adlevvt (配列番号124)
A2	avdfipven lettmrspvf tdnssppvvp qsfqvahlha ptgsgkstkv paayaaqgyk vlvlnpsvaa tlgfgaymsk ahgidpnirt gvrtittgsp itystygkfl adggcsggay diii <u>cd</u> ehs tdatsilgig tvldqaetag arlvvlatat ppgsvtvphp nieevalstt geipfygkai plevikggrh lif <u>ch</u> skkk <u>s</u> delaaklval ginavayyrg ldvsviptsg dvvvvatdal mtgytgdfds vid <u>cnt</u> cvtq tvdfslcptf tietitlpqd avsrtrrrgr tgrgkpgiyr fvapgerpsg mfdssvl <u>cec</u> ydagcawyel tpaettvrlr aymntpglpv cqdhlefweg vftglthida hflsqtksqg enlpylvayq atv <u>car</u> aqap ppswdqmwkc lirlkptlhg ptpllyrlga vqneitlthp vtskyimt <u>cms</u> adlevvt (配列番号125)
A3	X、Y、Z、A1およびA2に示される1、2または3、4または5の変異の組み合わせに おける、任意のAからWの変異の組み合わせ

10

20

【 0 0 5 4 】

他の実施形態では、組み合わせイムノアッセイの別の態様は、コア抗原に対する抗体の存在を検出する。使用可能なある例示的なコア抗原としては、コアタンパク質のDNA結合ドメインから誘導される抗原（アミノ酸1から125）が挙げられる。さらに他の好ましいコア抗原は、コアタンパク質のアミノ酸残基134から171に位置するコアの脂質結合ドメインから誘導される（MGYIPLVGLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPG）（配列番号89）。しかし、本発明では、特に好ましいコア抗原としては、HCVコア抗原の検出に使用されるモノクローナル抗体は、これらの改変されたコア抗原を検出することができないが、試験サンプルから完全なコア抗原を検出するような、特異的なモノクローナル抗体のための既知のエピトープ結合領域に特定の欠失または置換を含むコアタンパク質から誘導される抗原が挙げられる。従って、これらの新規の改変されたコア抗原で固相支持体をコーティングすることができ、および/またはヒト血清または血漿中に存在する抗体を捕捉するための溶液相で使用することができ、HCVのコア領域に指向するが、同時に、HCV組み合わせイムノアッセイで試験サンプル中に存在するコア抗原の検出に使用される複合抗体による検出をしない。従って、試験サンプル中に存在するコア抗原を検出し、同時に、試験サンプル中に存在することが予想され、同じHCVコンボアッセイフォーマットで同定される抗-コア抗体を検出する組み合わせイムノアッセイを行うことができる。試験サンプルから抗-コア抗体を検出する目的のために使用可能なコア抗原は、好ましくは、コア抗原のアミノ酸34および48およびアミノ酸115から121の欠失を含む。

30

40

【 0 0 5 5 】

本明細書に示される場合、本発明の方法全体で、典型的には、イムノアッセイ方法である。例示的な実施形態では、このような方法は、目的の分子（例えば、試験サンプル中に存在する特異的な抗体、または試験サンプル中に存在し得る特異的な抗原）を単離するための方法を含む。このような単離を容易にするために、目的の分子は、精製タグを含むか、または精製タグに接続し、この精製タグは、タグ結合パートナーと接触する。従って、精製タグとタグ結合パートナーの会合を使用し、分子の混合物から目的の分子を分離してもよい。精製タグは、同じ構造または同様の構造を有する部分を含んでいてもよい。特定

50

の実施形態では、アフィニティタグのタグ化部分は、単結合によって直接的に、または、場合により、単結合、二重結合、三重結合、芳香族炭素 - 炭素結合および炭素 - 窒素結合、窒素 - 窒素結合、炭素 - 酸素結合、炭素 - 硫黄結合、リン - 酸素結合、リン - 窒素結合およびこの任意の組み合わせを含め、直鎖、分枝鎖または環状の配置で、安定な化学結合の接続によって、機能的なタグと会合することができる。特定の実施形態では、タグ化部分と機能的なタグとの会合は、エーテル、チオエーテル、カルボキサミド、スルホンアミド、尿素またはウレタン部分を含む。好ましい実施形態では、接続は、ポリアルキレン鎖（即ち、炭素 - 炭素結合の直鎖または分枝鎖の配置）を含む。他の実施形態では、接続は、ポリエチレングリコール部分を含め、ポリアルキレンオキシド鎖を含む。アフィニティタグの例としては、限定されないが、ビオチン、ジゴキシゲニン (Dig)、ジニトロフェノール (DNP)、ジンクフィンガー、フッ素化ポリマーおよびポリペプチド配列、例えば、ポリヒスチジンモチーフが挙げられる。

10

## 【0056】

アフィニティタグは、ある実施形態では、アフィニティタグと、アフィニティタグに引き寄せられる官能基またはアフィニティタグに結合する官能基の結合または引き寄せに依存することによって、目的の分子を単離するために有利に使用される。ある実施形態では、固体基質は、タグに対するアフィニティを有し、固体基質をタグ結合パートナーで誘導体化する。ある実施形態では、結合パートナーをアフィニティ基質に固定してもよい。「アフィニティ基質」という用語は、分子の精製タグとの強い、好ましくは可逆性の相互作用を生成することができる結合パートナーに結合する固定マトリックスまたは支持体を指すことができる。アフィニティ基質が、樹脂、ビーズ、粒子、膜、ゲルを含んでいてもよい。結合パートナーは、精製タグを特異的に認識するか、またはこれに結合する。特定の結合パートナーは、アフィニティタグに依存するが、帯電した部分および結合対の1つのメンバー、例えば、受容体 - リガンド、抗体 - 抗原、炭水化物 - レクチンおよびビオチン - ストレプトアビジン（またはアビジン、ニュートラアビジンまたは抗 - ビオチン抗体）を含む。

20

## 【0057】

具体的で好ましい実施形態では、組み合わせイムノアッセイで使用される抗原の任意またはすべてのC末端またはN末端は、ビオチン化されていてもよく、または、アフィニティタグとしてビオチン結合部分（例えば、アビジンまたはストレプトアビジンまたはニュートラアビジンまたは抗 - ビオチン）を含んでいてもよい。これらのペプチドは、ビオチン化されているか、またはアビジン/ストレプトアビジンが接合したペプチドであり、捕捉抗原として働くだろう。または、同様に、抗原は、検出標識で標識されてもよく、この場合には、検出抗原として働くだろう。検出抗原および捕捉抗原は、同じ基礎にあるアミノ酸配列を有していてもよく、または、異なる配列を有していてもよい。例示的な実施形態では、捕捉抗原は、ビオチン結合パートナー（即ち、アビジンまたはストレプトアビジン）を有する固体支持体への結合を容易にするために、C末端またはN末端のいずれかでビオチン化される。例示的な製造のために、ビオチン化されたペプチドは、25 でIPTG誘導システムを経て、*E. coli* BL21 (DE3) 細胞で組み換えによって発現する。C末端またはN末端でのビオチン化での系中のビオチン化は、望ましいペプチドを発現するHCV発現プラスミドと、*E. coli*由来のBirA遺伝子を含む第2のプラスミドとを用いたBL21 (DE3) 細胞の同時形質変換によって達成される (Weiss et al. (1994) Protein Expression & Purification, 14: 751 - 755; Schatz et al. (1993) Biotechnology, 11: 1138 - 1143)。組み換えタンパク質の精製は、タンパク質の金属触媒による酸化および凝集を防ぐことが示されている二価カチオンキレート化剤を用いて行われる。タンパク質の安定性は、EDTAまたは関連する二価のカチオンキレート化剤を、精製中に使用するバッファーに加えるとき、およびイムノアッセイに使用される1種類以上の最終的な保存バッファーに加えるとき、顕著に向上する。

30

40

## 【0058】

50

#### 組み合わせアッセイに使用するための抗体

本明細書で全体に記載する場合、組み合わせイムノアッセイは、有利には、試験サンプル中に存在する1つ以上のHCV抗原の存在も決定する。このような実施形態では、試験サンプルからの抗原を捕捉し、次いで、さらなる複合抗体を使用し、捕捉された抗原の存在を検出するために、モノクローナル抗-HCV抗体を使用することが望ましいだろう。この努力で使用され得る多くの市販の抗体が存在する。具体的には、このような抗体は、好ましくは、試験サンプル中のコア抗原の存在を決定する。コア抗原に対するものである抗体は、当業者に知られており、例えば、米国特許公開第20120009196号に記載されるものが挙げられる。これに加え、本発明は、さらに、同時に出願された米国特許出願第61/783,529号、名称「HCV Core Lipid Binding Domain Monoclonal Antibodies」、代理人整理番号03946-26531US01に記載されるモノクローナル抗体の使用を想定し、この抗体は、HCVコア抗原の脂質結合ドメインと特異的に免疫反応性である。さらに特定的には、HCVコア抗原は、HCVのアミノ酸残基134から171である。さらに特定的な実施形態では、抗体は、アミノ酸配列MGYIPLVGAPLGGAARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPG(配列番号89)によって作られる少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する。さらに具体的な実施形態では、抗体は、HCVコア抗原のアミノ酸141から161、134から154および151から171によって作られるエピトープと免疫反応性である。

#### 【0059】

具体的で例示的な実施形態では、組み合わせイムノアッセイで使用される抗体は、試験サンプル中のHCVコアタンパク質またはこのフラグメントを検出するように設計される。このような抗体は、DNA結合ドメイン、脂質結合ドメイン、または実際に完全なコアタンパク質を検出してもよい。ある実施形態では、イムノアッセイで使用される検出抗体は、コアペプチドの脂質結合ドメインを指向し、例示的なこのような抗体は、名称「HCV Core Lipid Binding Domain Monoclonal Antibodies」、代理人整理番号03946-26531US01の同時に出願された米国仮出願第61/783,529号に記載される。さらに他の実施形態では、組み合わせアッセイで使用される抗-HCVコア抗体は、例えば、C11-3、C11-7、C11-9およびC11-14であってもよい(米国特許第6,727,092号; Morota et al., J. Virol. Meth., 2009, 157: 8-14によって記載されるように)。

#### 【0060】

本発明の具体的なアッセイでは、組み合わせイムノアッセイは、試験サンプル中の少なくともコア抗原を検出し、コア抗体を検出する。このような実施形態では、抗-コア抗体、好ましくは、HCVコア抗原の検出に使用されるモノクローナル抗体は、これらの改変されたコア抗原を検出しないが、試験サンプルからの完全なコア抗原を検出するような、特異的なモノクローナル抗体に対する既知のエピトープ結合領域に特定の欠失または置換を含む抗-コア抗体を捕捉するように設計された捕捉抗原を確保することは必須ではないが、望ましくなる。捕捉抗体として使用される例示的な抗-コア抗体としては、米国特許第6,727,092号およびMorota et al., J. Virol. Meth., 2009, 157: 8-14に記載されるようなAOT3、C11-3、C11-7、C11-9およびC11-14抗体が挙げられる。

#### 【0061】

##### 免疫診断アッセイおよび試薬

特定の実施形態では、上に記載される抗原および抗体は、HCVに感染しているおそれがある試験サンプル中に発見される複数のHCV要素の検出のために設計された組み合わ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想定される。限定されないが、HCVのNS3領域、HCVのコア抗原、HCVのNS4領域、またはこれらの組み合わせおよびこれらの1つ以上の領域に対して指向する抗-HCV抗体を含め、HCV抗原の検

10

20

30

40

50

出のために設計された組み合わせイムノアッセイで使用することができるように、免疫診断試薬（抗体または抗原である。）は、上述の抗原ポリペプチドおよび抗体で構成されるだろう（典型的には、組み合わせで）。捕捉のために、免疫診断試薬が含まれる抗原および/または抗体を固体支持体（例えば、微粒子（例えば、磁気粒子）、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場となる分子、膜、濾紙、ディスクまたはチップ）でコーティングしてもよい。この観点で、免疫診断試薬が抗原の組み合わせ（例えば、異なるHCVタンパク質または同じHCVタンパク質の異なるフラグメントに指向する。）を含む場合、抗原で同じ固体支持体を一緒にコーティングしてもよく、または別個の固体支持体をコーティングしてもよい。同様に、免疫診断試薬が、試験サンプルから1つ以上の抗原を捕捉するために使用される1つ以上の抗体を含む場合、このような抗体で同じ固体支持体を一緒にコーティングしてもよく、または別個の固体支持体をコーティングしてもよい。

10

**【0062】**

特に、免疫診断試薬は、抗原および抗体を含み、これらは、検出可能な標識で標識されてもよく、または捕捉または検出を可能にする特異的なパートナーで標識されてもよい。例えば、標識は、検出可能な標識、例えば、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、化学発光標識などであってもよい。このような標識は、以下にさらに詳細に記載される。

**【0063】**

さらになお、本発明は、本明細書に記載される免疫診断試薬と、試験サンプル中の2つ以上のHCVタンパク質および/または抗-HCV抗体の存在を検出することによって、試験サンプル中のHCVの存在を決定するための組み合わせイムノアッセイで免疫診断試薬を使用するための指示とを含む、HCV診断キットの調製を想定する。例えば、キットは、イムノアッセイによって抗-HCV抗体（例えば、試験サンプル中の抗-コア抗体）について試験サンプルをアッセイするための指示を含んでいてもよい。好ましい実施形態は、試験サンプルをアッセイするための化学発光微粒子イムノアッセイを使用するが、本発明の組み合わせイムノアッセイで使用される抗原および抗体を、試験サンプル中のHCVの存在を決定するために、当業者に既知の任意の他のイムノアッセイフォーマットで使用してもよいことを理解すべきである。指示は、紙の形態またはコンピュータで読み取り可能な形態（例えば、ディスク、CD、DVDなど）であってもよい。これに代えて、またはこれに加えて、キットは、キャリブレーターまたはコントロール、例えば、精製された（場合により、凍結乾燥された）抗-HCV抗体または抗原および/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、組み合わせイムノアッセイの1つ以上の捕捉要素（抗原および/または抗体）ですでにコーティングされていてもよい、管、マイクロタイタープレートまたは試験片）および/またはバッファー、例えば、アッセイバッファーまたは洗浄バッファー（いずれか1つが濃縮溶液として与えられてもよい。）、検出可能な標識のための基質溶液（例えば、酵素標識）、または停止溶液を含んでいてもよい。好ましくは、キットは、アッセイを行うのに必要なすべての要素を含む（即ち、試薬、標準、バッファー、希釈剤など）。具体的な実施形態では、固体支持体を、捕捉部分（例えば、ビオチン化された抗原またはビオチン化された抗体）の結合を可能にする薬剤でコーティングするイムノアッセイがキャプチャオンザフライ（capture-on-the-fly）型の組み合わせイムノアッセイとして行われてもよいように、すべての要素がキットに個々に存在することが好ましく、キットは、さらに、それぞれの個々の捕捉抗原と検出抗原の対およびビオチン化された捕捉抗体を1つの容器に含み、第2の容器は、検出抗体複合体を与える。アッセイを行うための指示は、抗-HCV抗体を定量するための標準曲線または参照標準を作成するための指示も含んでいてもよい。

20

30

40

**【0064】**

キットに与えられる任意の抗体（例えば、抗-IgG抗体および抗-IgM抗体）は、検出可能な標識、例えば、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、化学発光標識なども組み込んでいてもよく、または、キットは、抗体（例えば

50

、検出抗体)を検出するための、および/または検体を標識するための抗体または試薬を標識するための試薬、または検体を検出するための試薬を含んでいてもよい。抗体、キャリアプレートおよび/またはコントロールは、別個の容器で与えられてもよく、または適切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)にあらかじめ分注してもよい。好ましい組み合わせイムノアッセイでは、2つの容器が提供される。第1の容器には、少なくとも第1、第2および第3の抗原の対が提供され、それぞれの対の第1の抗原は、ビオチン化された所与のHCVタンパク質に由来する捕捉抗原であり、それぞれの対の第2の抗原は、第1の抗原と同じタンパク質に由来するが、検出可能な標識で標識された(例えば、アクリジン化された)検出抗原と、試験サンプル由来の1つ以上のHCV抗原を検出するために設計された1つ以上のビオチン化された抗体であり、第2の容器には、第1の容器からビオチン化された抗体によって捕捉される抗原を検出するための接合対を生成する抗体が与えられる。第1の容器に複数のビオチン化された抗体が存在する場合、接合パートナーを生成する複数の抗体が、1個の容器または複合抗体を検出するそれぞれの異なる抗原のための個々の容器に存在してもよいことが想定される。

10

**【0065】**

場合により、キットは、品質制御要素(例えば、感受性パネル、キャリアプレートおよびポジティブコントロール)を含む。品質制御試薬の調製は、当該技術分野でよく知られており、種々の免疫診断製品のための添付シートに記載される。感受性パネルの膜は、場合により、アッセイ性能の特徴を確立するために使用され、さらに、場合により、イムノ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。

20

**【0066】**

キットは、場合により、診断アッセイを行うため、または品質制御の評価を容易にするのに必要な他の試薬(例えば、バッファー、塩、酵素、酵素の補因子、基質、検出試薬など)も含んでいてもよい。他の要素(例えば、試験サンプルの単離および/または処理のためのバッファーおよび溶液(例えば、前処理試薬))もキットに含まれていてもよい。キットは、さらに、1つ以上の他のコントロールを含んでいてもよい。キットの1つ以上の要素を凍結乾燥してもよく、この場合には、キットは、さらに、凍結乾燥した要素の再構築に適した試薬を含んでいてもよい。

**【0067】**

キットの種々の要素は、場合により、必要な場合、適切な容器(例えば、マイクロタイタープレート)中で与えられる。キットは、さらに、サンプルを保持または保存するための容器(例えば、サンプルのための容器またはカートリッジ)を含んでいてもよい。適切な場合、キットは、場合により、反応容器、混合容器および試薬または試験サンプルの調製を容易にする他の要素も含んでいてもよい。キットは、試験サンプルを得るのを助けるための1つ以上の装置(例えば、シリンジ、ピペット、鉗子、秤量スプーンなど)も含んでいてもよい。

30

**【0068】**

好ましい実施形態では、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では、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、またはこの任意の組み合わせを含んでいてもよい。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、過酸化水素源、例えば、バッファー、溶液および/または少なくとも1つの塩基性溶液も含んでいてもよい。免疫診断試薬において、抗体検出のための抗原が、検出可能に標識されていてもよく、このような試薬と共に使用するためのキットに与えられる任意の抗体も、検出可能に標識されていてもよいことを理解すべきである。

40

**【0069】**

所望な場合、キットは、固体支持体相、例えば、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場となる分子、膜、濾紙、ディスクまたはチップを含んでいてもよい。

50

## 【0070】

試験サンプル中のHCVの存在、量または濃度を決定する方法

本開示は、試験サンプル中の抗-HCV抗体およびHCV抗原の存在、量または濃度を決定するための組み合わせ免疫アッセイ方法を提供する。アッセイが、試験サンプル中のHCV抗体を検出するための1つ以上の抗原および/または1つ以上のHCV抗原を検出するための1つ以上の抗-HCV抗体を使用する限り、当該技術分野で知られている任意の適切なアッセイをこのような方法で使用してもよい。このようなアッセイの例としては、限定されないが、免疫アッセイ、例えば、サンドイッチ免疫アッセイ（例えば、放射性同位体検出（放射性免疫アッセイ（RIA））を含む、モノクローナル-ポリクローナルサンドイッチ免疫アッセイ）および酵素検出（酵素免疫アッセイ（EIA）または酵素免疫吸着アッセイ（ELISA）（例えば、Quantikine ELISAアッセイ、R&D Systems、ミネアポリス、Minn.））、競争的阻害免疫アッセイ（例えば、順方向および逆方向）、蛍光極性免疫アッセイ（FPIA）、酵素多重免疫アッセイ技術（EMIT）、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）および均一化学発光アッセイなどが挙げられる。

10

## 【0071】

組み合わせ免疫アッセイの具体的な実施形態では、組み換え抗原（例えば、コア、NS3およびNS4抗原）を捕捉試薬として（例えば、抗原のアミノ末端またはカルボキシ末端がビオチンタグを含む抗原を用いることによって）、または抗原がアクリジニウムで直接的または間接的に標識された検出（複合体）試薬として使用してもよい。間接的な標識は、SMCC型リンカーを介するタンパク質の中の対になっていないシステイン残基の遊離チオールに共有結合したアクリジン化されたBSAの使用を必要とする。このような間接的な標識を容易にするために、本発明の組み合わせ免疫アッセイに使用される特定の抗原は、C末端にさらなるシステイン残基を含むように、簡単にさらに改変されてもよい。

20

## 【0072】

典型的には、免疫アッセイは、1工程または2工程のフォーマットで行われる。1工程アッセイにおいて溶液中で生成する免疫複合体を捕捉するための固相試薬としては、ビオチン化された部分を捕捉するための抗-ビオチンモノクローナル抗体、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンが挙げられる（HCV抗体を捕捉するためのビオチン化された抗原、または試験サンプル中のHCVタンパク質/抗原を捕捉するためのビオチン化された抗体である。）。

30

## 【0073】

SELDI系免疫アッセイでは、抗-HCV抗体またはHCV抗原に特異的に結合する捕捉試薬は、質量分光用プローブ（例えば、あらかじめ活性化されたタンパク質チップアレイ）の表面に接続する。次いで、抗-HCV抗体または抗原は、バイオチップ上に特異的に捕捉され、捕捉された部分は、質量分光法によって検出される。または、抗-HCV抗体を捕捉試薬から溶出し、従来のMALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化法）またはSELDIによって検出することができる。化学発光微粒子免疫アッセイ、特に、ARCHITECT（R）自動化分析機（Abbott Laboratories、アボットパーク、III.）を使用するアッセイは、複数の抗原の組み合わせ（好ましくは、2つ以上のHCVタンパク質に由来する抗原）および複数の抗-HCV抗体を容易に使用し得る好ましい免疫アッセイの一例である。凝集アッセイ、例えば、受身赤血球凝集アッセイも使用することができる。凝集アッセイでは、抗原-抗体反応は、凝集またはクランピングによって検出される。受身赤血球凝集アッセイでは、赤血球は、抗原でコーティングされ、コーティングされた赤血球は、凝集アッセイで使用される。

40

## 【0074】

尿、血液、血清および血漿ならびに他の体液を集め、取り扱い、処理するための当該技術分野でよく知られた方法は、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-HCV抗体免疫アッセイキット内に含まれる場合、本開示の実施で使用さ

50

れる。試験サンプルは、目的のポリペプチドに加え、さらなる部分、例えば、抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、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を含んでいてもよい。例えば、サンプルは、被検体から得られる全血液サンプルであってもよい。試験サンプル、特に、全血液が、本明細書に記載されるようなイムノアッセイの前に、例えば、前処理試薬で処理されることが必要な場合があるか、または望ましい場合がある。前処理が必要ではない場合であっても（例えば、ほとんどの尿サンプル）、前処理は、場合により、単なる簡便さのために行われてもよい（例えば、商業的なプラットフォームに対する方法の一部として）。

#### 【0075】

前処理試薬は、本発明の組み合わせイムノアッセイおよびキットを用いる使用に適した任意の試薬であってもよい。前処理は、場合により、(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）および塩、(b) 1つ以上の溶媒、塩および洗剤、(c) 洗剤、または(d) 洗剤および塩を含む。前処理試薬は、当該技術分野で公知であり、例えば、文献に記載されるように（例えば、Yatscoff et al., Abbott TDx Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood, Clin. Chem. 36: 1969-1973 (1990) および Wallmacq et al., Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDx Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays, Clin. Chem. 45: 432-435 (1999) を参照）、および/または市販されているものとして、Abbott TDx、AxSYM (R) および ARCHITECT (R) 分析機 (Abbott Laboratories、アボットパーク、III) でのアッセイのために使用されるように、このような前処理が使用されてもよい。さらに、Abbottの米国特許第5,135,875号、欧州特許公開第0471293号、2006年12月29日に出願された米国仮特許出願第60/878,017号および米国特許出願公開第2008/0020401号（前処理に関する教示について、全体的に参照により組み込まれる。）に記載されるように、前処理が行われてもよい。前処理試薬は、不均一な薬剤または均一な薬剤であってもよい。

#### 【0076】

不均一な前処理試薬を使用し、前処理試薬は、検体に結合するタンパク質（例えば、抗-HCV抗体に結合することができるタンパク質、またはサンプル中に存在する抗-HCV抗体形態に結合することができる抗原）を沈殿させる。このような前処理工程は、沈殿した検体を結合するタンパク質から、サンプルに前処理剤を加えることによって生成した混合物の上澄みを分離することによって、任意の検体を結合するタンパク質を除去することを含む。このようなアッセイでは、任意の結合するタンパク質が存在しない混合物の上澄みをアッセイで使用し、抗体捕捉工程に直接進む。

#### 【0077】

均質な前処理試薬を用いるとき、このような分離工程は存在しない。試験サンプルおよび前処理試薬の全混合物を、抗-HCV抗体のための標識された特定の結合パートナー（即ち、抗原）またはHCV抗原のための標識された特定の結合パートナー（即ち、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、典型的には、第1の特定の結合パートナーによって捕捉する前または捕捉中に、前処理した試験サンプル混合物で希釈する。このような希釈にもかかわらず、特定の量の前処理試薬（例えば、5Mのメタノールおよび/または0.6メチレングリコール）が、捕捉中の試験サンプル混合物中にまだ存在する（または残留する。）。

#### 【0078】

不均一なフォーマットでは、被検体から試験サンプルが得られた後、第1の混合物が調製される。混合物は、抗-HCV抗体および第1の特異的な捕捉結合パートナーについて

10

20

30

40

50

評価される試験サンプルを含み、試験サンプル中に含まれる第1の特異的な捕捉結合パートナーおよび任意の抗-HCV抗体は、第1の特異的な捕捉結合パートナー-抗-HCV抗体複合体を生成する。第1の特異的な捕捉結合パートナーは、コア抗原、NS3抗原またはNS3のいずれかであってもよい。本発明で使用される例示的なNS3抗原は、本明細書の上の表1に示される任意の1つ以上の抗原であってもよい。同様に、本発明の組み合わせアッセイでは、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、これらの第2および第3の特異的な捕捉結合パートナーは、試験サンプル中に存在する抗-HCV抗体と、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナー-抗-HCV抗体複合体を生成する。このような第2、第3および第4の抗原は、コア抗原、NS3、NS4、NS5およびこれらの部分からなる群から選択される1つ以上の少なくとも1つのHCV抗原であってもよい。

10

## 【0079】

これに加え、組み合わせイムノアッセイは、試験サンプル中に存在する第4の抗原との抗-HCV抗体-第4の特定の結合パートナー複合体を生成するように、試験サンプル中にみられる第4の特定の結合パートナー（即ち、試験サンプル中にみられる抗原またはHCVタンパク質）との特異的な複合体を生成する少なくとも1つの抗-HCV捕捉抗体を含んでいてもよく、好ましくは、含む。好ましくは、第4の特異的な結合対は、試験サンプル中のコア抗原を検出するものであり、従って、この結合対は、試験サンプル中の第4の抗原（コア）を検出するための抗-コア抗体である。

## 【0080】

20

試験サンプルおよび種々の特定の結合パートナーを加えて混合物を生成する順序は重要ではない。ある実施形態では、第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナー（即ち、抗原）および抗-HCV捕捉抗体が、固相に固定される。さらに他の実施形態では、これら4種類の要素はどれも固定されないが、代わりに、固相に捕捉を行うために、すべてが同時に試験サンプルに加えられる。組み合わせイムノアッセイに使用される固相は、当該技術分野で知られている任意の固相であってもよく、例えば、限定されないが、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場となる分子、膜、濾紙、ディスクまたはチップであってもよい。

## 【0081】

第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナーと、試験サンプル中にみられるそれぞれの抗-HCV抗体との免疫複合体、第1の抗-HCV捕捉抗体（例えば、抗-コア）と、試験サンプル中にみられるそれぞれのHCV抗原またはHCVタンパク質との免疫複合体が生成した後、任意の結合していない抗-HCV抗体またはHCV抗原/タンパク質を、任意の当該技術分野で公知の技術を用い、複合体から除去する。例えば、結合していない抗-HCV抗体または抗原を洗浄によって除去することができる。しかし、望ましくは、第1、第2および第3の特定の結合パートナーおよび抗-HCV抗体は、過剰な任意の抗-HCV抗体および抗原中に存在し、それぞれが試験サンプル中に存在し、この結果、試験サンプル中に存在するすべての抗-HCV抗体および抗原は、それぞれ第1、第2および第3の特定の結合パートナーおよび抗-HCV捕捉抗体によって結合する。

30

## 【0082】

40

任意の結合していない抗-HCV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加え、第1の特異的な捕捉結合パートナー-抗-HCV抗体-第1の特異的な検出結合パートナー複合体を生成することによって、検出が達成される。第1の特異的な検出結合パートナーは、好ましくは、抗-IgG抗体と抗-IgM抗体の組み合わせである。さらに、好ましくは、第1の特異的な検出結合パートナーは、上述のような検出可能な標識で標識されるか、または検出可能な標識を含む。具体的な実施形態では、これに代えて、またはこれに加えて、第1の特異的な検出パートナーは、捕捉された抗体に結合する抗原であってもよい。同様に、本発明の組み合わせアッセイでは、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を含み、これらの第2および第3の特異的な検出結合パートナーは、試験サンプル中に存在する捕捉された抗-HCV抗体と

50

、第2または第3の特異的な捕捉結合パートナー - 抗 - H C V 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生成する。再び、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 抗体と抗 - I g M 抗体の組み合わせであってもよい。具体的な実施形態では、これに代えて、またはこれに加えて、第2および第3の特異的な検出パートナーは、捕捉された抗体に結合する抗原であってもよい。さらに、好ましくは、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、上述のような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。これに加えて、組み合わせイムノアッセイは、試験サンプルから捕捉される第4の抗原との抗 - H C V 抗体 - 第4の特定の結合パートナー - 抗 - H C V 複合抗体複合体を生成するように、試験サンプル中にみられる捕捉された抗原または H C V タンパク質との特異的な複合体を生成する少なくとも1つの抗 - H C V 複合抗体を含んでいてもよく、好ましくは、含む。

10

## 【0083】

任意の適切な検出可能な標識は、当該技術分野で知られるように、任意の1つ以上の検出可能な標識として使用されてもよい。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ および $^{33}\text{P}$ ）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリペルオキシダーゼ、グルコース 6 - ホスフェートデヒドロゲナーゼなど）、化学発光標識（例えば、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）、蛍光標識（例えば、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）、ローダミン、フィコビリタンパク質、R - フィコエリトリン、量子ドット（例えば、硫化亜鉛で保護されたセレン化カドミウム）、測温標識、またはイムノポリメラーゼ連鎖反応標識であってもよい。標識の導入、標識化手順および標識の検出は、Polak and Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997) および Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg. によって公開されたハンドブックとカタログを合わせたものに見いだされる。蛍光標識は、FPIAで使用することができる（例えば、全体的に本明細書に参照により組み込まれる米国特許第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）。均質な化学発光アッセイにおいて、アクリジニウム化合物を検出可能な標識として使用することができる（例えば、Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1324 - 1328 (2006); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4: 2313 - 2317 (2004); Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3917 - 3921 (2004); および Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5: 3779 - 3782 (2003) を参照）。

20

30

40

## 【0084】

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 et al., *J. Org. Chem.* 63: 5636 - 5639 (1998); Adamczyk et al., *Tetrahedron* 55: 10899 - 10914 (1999); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 1: 779 - 781 (1999); Adamczyk et al., *Bioconjugate Chem.* 11: 714 - 724 (2000); Mattingly et al., *In Luminescence Biotechnology: Instruments*

50

and Applications; Dyke, K. V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77 - 105 (2002); Adamczyk et al., 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号に記載される(それぞれが、上の方法に関する教示について、全体的に本明細書に参照により組み込まれる。)

【0085】

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。式 I I 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である(Cayman Chemical、アナーバー、Mich. から入手可能)。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、McCabra et al., Photochem. Photobiol. 4: 1111 - 21 (1965); Razavi et al., Luminescence 15: 245 - 249 (2000); Razavi et al., Luminescence 15: 239 - 244 (2000); および米国特許第5,241,070号に記載される(それぞれが、上の方法に関する教示について、全体的に本明細書に参照により組み込まれる。)。このようなアクリジニウム - 9 - カルボキシレートアリアルエステルは、シグナルの強度および/またはシグナルの迅速さの観点で、少なくとも1つのオキシダーゼによって検体の酸化で生成する過酸化水素のための有効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アルエステルの一連の化学発光は、迅速に(即ち、1秒以内に)終了し、一方、アクリジニウム - 9 - カルボキサミド化学発光は、2秒間続く。しかし、アクリジニウム - 9 - カルボキシレートアリアルエステルは、タンパク質の存在下、この化学発光特性を失う。従って、この使用は、シグナル発生および検出の間にタンパク質が存在しないことを必要とする。サンプル中のタンパク質を分離または除去するための方法は、当業者によく知られており、限定されないが、超濾過、抽出、沈殿、透析、クロマトグラフィーおよび/または消化が挙げられる(例えば、Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation, Methods and Automation Strategies, Elsevier (2003)を参照)。試験サンプル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%であってもよい。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この使用に関するさらなる詳細は、2007年4月9日に出願され、米国特許出願公開第2008/0248493号として2008年10月9日に公開された米国特許出願第11/697,835号に示される。アクリジニウム - 9 - カルボキシレートアリアルエステルは、任意の適切な溶媒、例えば、脱気した無水N,N - ジメチルホルムアミド(DMF)またはコール酸ナトリウム水溶液に溶解することができる。

【0086】

Adamczyk et al., Anal. Chim. Acta 579(1): 61 - 67 (2006)に記載される方法に従って、化学発光アッセイを行うことができる。任意の適切なアッセイフォーマットを使用することができるが、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.)によって、少ない容積の複数のサンプルを迅速にアッセイすることができる。化学発光計は、96ウェルの黒色ポリスチレンマイクロプレート(Costar 3792番)を用い、複数の試薬注入部を備えていてもよい。それぞれのサンプルを別個のウェルに加え、その後、使用されるアッセイの種類によって決定されるように、同時/逐次に他の試薬を加えてもよい。望ましくは、例えば、酸性化によって、アクリジニウムアリアルエステルを使用する中性または塩基性の溶液中の疑似塩基の生成が避けられる。次いで、化学発光応答をウェルごとに記録す

10

20

30

40

50

る。この観点で、化学発光応答を記録するための時間は、部分的に、試薬の添加と、特定の使用されるアクリジニウムの添加の遅れに依存するだろう。

【 0 0 8 7 】

試験サンプルおよび特定の結合パートナーを加え、化学発光アッセイのための混合物を生成する順序は、重要ではない。第1の特異的な捕捉結合パートナーが、アクリジニウム化合物で検出可能に標識されている場合、検出可能に標識された第1の特異的な捕捉結合パートナー - 抗 - H C V抗体複合体が生成する。または、第1の特異的な検出結合パートナーが使用され、第1の特異的な検出結合パートナーが、アクリジニウム化合物で検出可能に標識されている場合、検出可能に標識された第1の特異的な捕捉結合パートナー - 抗 - H C V抗体 - 第1の特異的な検出結合パートナー複合体が生成する（同様に、上述の組み合わせアッセイにおける第2および第3の複合体）。任意の結合していない特定の結合パートナーは、標識されているか、または標識されていないかにかかわらず、当該技術で公知の任意の技術（例えば、洗浄）を用いて混合物から除去することができる。

10

【 0 0 8 8 】

上述のアクリジニウム化合物の添加の前、添加と同時に、または添加の後に、混合物中、過酸化水素を混合物中で系中で作成することができ、混合物に提供または供給することができる。当業者に明らかなような多くの様式で、過酸化水素を系中で作成することができる。

【 0 0 8 9 】

または、過酸化水素源は、混合物に単純に加えられてもよい。例えば、過酸化水素源は、過酸化水素を含んでいることが知られている1つ以上のバッファーまたは他の溶液であってもよい。この観点で、過酸化水素の溶液を単純に加えてもよい。

20

【 0 0 9 0 】

少なくとも1つの塩基性溶液をサンプルに同時または逐次に添加すると、抗 - H C V抗体（捕捉は抗原を用いる。）または抗原（捕捉は抗体を用いる。）の存在の指標である検出可能なシグナル（即ち、化学発光シグナル）が発生する。塩基性溶液は、少なくとも1つの塩基を含有し、pHは、10以上、好ましくは、12以上である。塩基性溶液の例としては、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、炭酸水素ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよび炭酸水素カルシウムが挙げられる。サンプルに加えられる塩基性溶液の量は、塩基性溶液の濃度によって変わる。使用する塩基性溶液の濃度に基づき、当業者は、サンプルに加えるための塩基性溶液の量を簡単に決定することができる。

30

【 0 0 9 1 】

発生する化学発光シグナルは、当業者に知られている通常の技術を用いて検出することができる。発生するシグナルの強度に基づき、サンプル中の抗 - H C V抗体および/または抗原の量を定量することができる。具体的には、サンプル中の抗 - H C V抗体および/または抗原の量は、発生するシグナルの強度に比例する。発生した光の量を、抗 - H C V抗体および/または抗原についての標準曲線と比較することによって、または、参照標準と比較することによって、存在する抗 - H C V抗体および/または抗原の量を定量することができる。質量分光法、重量測定法および当該技術分野で既知の他の技術によって、既知の濃度の抗 - H C V抗体の順次希釈物または溶液を用い、標準曲線を作成することができる。

40

【 0 0 9 2 】

当該技術分野で知られる任意の適切なフォーマットを用い、抗 - H C V抗体および/または抗原イムノアッセイを行うことができる。一般的に言うと、抗 - H C V抗体について試験されるサンプル（例えば、抗 - H C V抗体を含むおそれがある。）を、捕捉抗原および少なくとも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もよい。）例えば、標識された抗 - I g Gおよび抗 - I g M抗体を同時にまたは逐次に、任意の順序で接触させてもよい。同様に、抗原の存在についての試験物を、試験サンプル中の抗原

50

に結合する捕捉された抗体と接触させることができ、次いで、結合した抗原を検出抗体によって検出してもよい。

【0093】

例えば、まず、試験サンプルを少なくとも1つの捕捉抗原と接触させ、次いで、(逐次に)少なくとも1つの検出抗体と接触させてもよい。または、まず、試験サンプルを少なくとも1つの検出抗体と接触させ、次いで、(逐次に)少なくとも1つの捕捉抗体と接触させてもよい。さらに別の代替例では、試験サンプルを、捕捉抗原および検出抗体と同時に接触させてもよい。

【0094】

サンドイッチアッセイフォーマットでは、抗-HCV抗体(またはこのフラグメント)を含むおそれがあるサンプルを、まず、第1の捕捉抗原/抗-HCV抗体複合体を生成する条件下で、少なくとも1つの第1の捕捉抗原と接触させる。組み合わせアッセイでは、同じことを第2、第3またはより多くの捕捉抗原を用いて繰り返し、または同時に行う。1種類より多い捕捉抗原を使用する場合、複数の第1の捕捉抗原/抗-HCV抗体複合体が生成する。サンドイッチアッセイでは、抗原、好ましくは、少なくとも1つの捕捉抗原を、試験サンプル中で予測される最大量の抗-HCV抗体に対しモル過剰量で使用する。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5 $\mu$ gから約1mgの抗原を使用することができる。

【0095】

競争的阻害イムノアッセイは、多くは、小さな検体を測定するために使用されるが、逐次および従来フォーマットを含む。逐次の競争的阻害イムノアッセイでは、目的の抗体(即ち、抗-HCV抗体)に対し、1種類以上の捕捉抗原(即ち、本明細書に記載されるようなポリペプチド、および好ましくは、ポリペプチド対)を、マイクロタイタープレートのウェルにコーティングする。目的の抗体/複数の抗体を含むサンプルをウェルに加えると、目的の抗体が捕捉抗原に結合する。洗浄した後、既知の量の標識された(例えば、ビオチンまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP))抗体をウェルに加える。酵素標識のための基質は、シグナルを発生させるのに必要である。HRPのための適切な基質の一例は、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)である。洗浄した後、標識された抗体によって発生したシグナルを測定し、このシグナルは、サンプル中の抗体の量に反比例する。従来競争的阻害イムノアッセイでは、目的の抗体のための抗原で、マイクロタイタープレートのウェルをコーティングする。しかし、逐次の競争的阻害イムノアッセイとは異なり、目的の抗体(即ち、抗-HCV抗体)を含むサンプルと標識された抗体をウェルに同時に加える。サンプル中の任意の抗体は、捕捉抗原に対する結合について、標識された抗体と競争する。洗浄した後、標識された検体によって発生したシグナルを測定し、このシグナルは、サンプル中の検体の量に反比例する。

【0096】

場合により、試験サンプルと、少なくとも1つの捕捉抗原(例えば、第1の捕捉抗原)とを接触させる前に、少なくとも1つの捕捉抗原を固体支持体に結合してもよく、試験サンプルからの第1の抗原/抗-HCV抗体複合体の分離が容易になる。捕捉抗原が結合する基質は、サンプルからの捕捉抗原-抗-HCV抗体複合体の分離を容易にする任意の適切な固体支持体または固相であってもよい。例としては、プレートのウェル、例えば、マイクロタイタープレート、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)、ポリマー膜(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気ビーズ)、フィルタ/膜片(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、磁性微粒子(例えば、酸化鉄または酸化クロムのコアおよびホモポリマーまたはヘテロポリマーのコーティングを有し、半径が約1ミクロンから10ミクロンの微粒子)が挙げられる。基材は、抗原に結合する適切な表面アフィニティを有し、検出抗体が近づくことができる十分な多孔性を有する適切な多孔性材料を含んでいてもよい。微多孔性材料は、一般的に好ましいが、水和した状態のゼラチン状材料を使用してもよい。このような多孔性基質は、好ましくは、厚みが約

10

20

30

40

50

0.01 mmから約0.5 mm、好ましくは、約0.1 mmのシートの形態である。孔径は、非常にさまざまであってもよいが、好ましくは、孔径は、約0.025ミクロンから約15ミクロン、さらに好ましくは、約0.15ミクロンから約15ミクロンである。このような基質の表面は、基質に対して抗体を共有結合させる化学工程によって活性化することができる。一般的に、基材に対し、抗原の疎水性力による吸着による不可逆的な結合が起こる。または、このような結合が、抗-HCV抗体に結合する抗原の能力を妨害しない限り、化学カップリング剤または他の手段を用い、基材に抗原を共有結合させることができる。

【0097】

または、試験サンプルからの抗-HCV抗体を、抗原ですでにコーティングされた微粒子に結合させてもよい。所望な場合、1つ以上の捕捉試薬、例えば、本明細書に記載されるようなポリペプチドの対は、それぞれ抗-HCV抗体に結合することができ、異なる物理的位置または割り当て可能な位置で、これを固相に接続してもよい（例えば、バイオチップの構造（例えば、米国特許第6,225,047号、国際特許公開WO99/51773；米国特許第6,329,209号；国際特許公開WO00/56934および米国特許第5,242,828号を参照）。捕捉試薬を固体支持体として質量分光用プローブに結合する場合、プローブに結合した抗-HCV抗体の量は、レーザー脱離イオン化質量分光法によって検出することができる。または、1つのカラムを異なるビーズで充填してもよく、1つ以上の捕捉試薬で誘導体化し、これによって、1つの場所で抗-HCV抗体を捕捉する（誘導体化された抗体、ビーズに基づく技術、例えば、Luminex (Austin, Tex.) のxMAP技術を参照）。

【0098】

抗-HCV抗体についてアッセイされる試験サンプルを、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-HCV抗体（またはこのフラグメント）複合体を生成させるために、混合物をインキュベートする。インキュベーションを、約4.5から約10.0のpH、約2から約45の温度で少なくとも約1分から約18時間、好ましくは、約1分から約24分間、最も好ましくは、約4分から約18分間行うことができる。本明細書に記載されるイムノアッセイを1工程で行うことができ（試験サンプル、少なくとも1つの捕捉抗体および少なくとも1つの検出抗体を、すべて、反応容器に逐次または同時に加えることを意味する。）、または1工程より多い工程で、例えば、2工程、3工程などで行うことができる。

【0099】

（第1のまたは複数の）捕捉抗原/抗-HCV抗体複合体の生成の後、または生成と同時に、複合体を少なくとも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-HCV抗体/第1の抗体検出複合体を生成する条件下で）。少なくとも1つの検出抗体は、イムノアッセイで使用する第2、第3、第4などの抗体であってもよい。捕捉抗原/抗-HCV抗体複合体を1種類より多い検出抗体と接触させると、（第1のまたは複数の）捕捉抗原/抗-HCV抗体/（複数の）検出抗体複合体を生成する。捕捉抗原（例えば、第1の捕捉抗原）を用いる場合、少なくとも第2の（およびその後の）検出抗体を捕捉抗原/抗-HCV抗体複合体と接触させるとき、上述の条件と類似の条件下でインキュベーションする期間は、（第1のまたは複数の）捕捉抗原/抗-HCV抗体/（第2のまたは複数の）検出抗体複合体の生成のために必要である。好ましくは、少なくとも1つの検出抗体は、検出可能な標識を含む。（第1のまたは複数の）捕捉抗原/抗-HCV抗体/（第2のまたは複数の）検出抗体複合体の生成の前、生成と同時に、または生成の後に、検出可能な標識を少なくとも1つの検出抗体（例えば、第2の検出抗体）に結合することができる。当該技術分野で知られている任意の検出可能な標識を使用することができる（Polak and Van Noorden (1997) および Haugland (1996) を含め、上述を参照）。

【0100】

検出可能な標識を抗体（または検出可能な標識を含んでいてもよい抗原）に直接的に、

10

20

30

40

50

またはカップリング剤によって結合してもよい。使用可能なカップリング剤の一例は、EDAC(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、Sigma-Aldrich、セントルイス、Moから市販される。使用可能な他のカップリング剤は、当該技術分野で公知である。抗体に対して検出可能な標識を結合する方法は、当該技術分野で公知である。さらに、多くの検出可能な標識は、購入することができるか、または合成することができ、抗体に対する検出可能な標識のカップリングを容易にする末端基をすでに含んでおり、例えば、CPSP-アクリジニウムエステル(即ち、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SPSP-アクリジニウムエステル(即ち、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)である。

10

## 【0101】

(第1のまたは複数の)捕捉抗原/抗-HCV抗体/(第2のまたは複数の)検出抗体複合体を、必須ではないが、標識を定量する前に試験サンプルの残りから分離してもよい。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)が固体支持体(例えば、ウェルまたはビーズ)に結合する場合、固体支持体との接触から(試験サンプルの)流体を除去することによって分離を行うことができる。または、少なくとも第1の捕捉抗原を固体支持体に結合する場合、抗-HCV抗体を含有するサンプルおよび少なくとも1つの第2の検出抗体(または標識された検出抗原)を同時に接触させ、第1の(複数の)抗原/抗-HCV抗体/第2の(複数の)抗体(および/または標識された検出抗原)複合体を生成し、その後、固体支持体との接触から、流体(試験サンプル)を除去してもよい。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ない場合、(第1のまたは複数の)捕捉抗原/抗-HCV抗体/(第2のまたは複数の)検出抗体(および/または捕捉された抗体のための検出抗原)複合体は、標識の量を定量するために試験サンプルから除去する必要はない。

20

## 【0102】

標識された捕捉抗原/抗-HCV抗体/検出抗原(および/または検出抗体)複合体(例えば、第1の捕捉抗原/抗-HCV抗体/第1の検出抗原複合体、場合により第2の検出抗体も含む。)を生成した後、複合体中の標識の量は、当該技術分野で知られる技術を用いて定量される。例えば、酵素標識が使用される場合、標識された複合体を標識のための基質と反応させ、定量可能な反応(例えば、色の発色)を与える。標識が放射性標識である場合、シンチレーションカウンターを用いて標識を定量する。標識が蛍光標識である場合、ある色の光(「励起波長」として知られる。)で標識を刺激し、刺激に対する応答で標識によって発光する別の色(「発光波長」として知られる。)を検出することによって、標識を定量する。標識が化学発光標識である場合、発光した光を視覚的に検出する、または発光計、x線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどを使用することによって標識を定量する。複合体中の標識の量を定量したら、既知の濃度の抗-HCV抗体または抗原の順次希釈物を用いて作成した標準曲線を使用することによって、試験サンプル中の抗-HCV抗体または抗原の濃度を決定する。抗-HCV抗体またはHCV抗原の順次希釈物を用いる以外に、標準曲線を重量測定で、質量分光法によって、当該技術分野で知られている他の技術によって作成することができる。

30

40

## 【0103】

ARCHITECT(R)分析機を使用する化学発光微粒子アッセイでは、複合体希釈剤のpHは、約 $6.0 \pm 0.2$ であるべきであり、微粒子コーティングバッファは、室温(即ち、約17 から約27 )に維持すべきであり、微粒子コーティングバッファのpHは、約 $6.5 \pm 0.2$ であるべきであり、微粒子希釈剤のpHは、約 $6.5 \pm 0.2$ であるべきである。固形分は、好ましくは、約0.2%未満、例えば、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、例えば、約0.10%である。

## 【0104】

50

FPIAは、競争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、線形偏光によって励起される場合、この回転率に反比例する偏光度を有する蛍光を発するだろう。蛍光標識されたトレーサー - 抗体複合体が、線形偏光した光によって励起される場合、発光した光は、フルオロフォアが、光が吸収される時間から光が発光する時間まで回転が制限されるため、高度に偏光したままである。「遊離した」トレーサー化合物（即ち、抗体に結合していない化合物）は、線形偏光した光によって励起される場合、この回転は、競争的結合イムノアッセイで作られる対応するトレーサー - 抗体複合体よりもかなり速い。FPIAは、特殊な取扱いおよび廃棄を必要とする放射性物質が存在しないという点で、RIAより有利である。これに加え、FPIAは、簡単に迅速に行うことができる均一なアッセイである。

10

## 【0105】

市販の抗-HCV抗体および抗-IgGおよび抗-IgM抗体を、アッセイ方法およびこのキットで使用することができる。市販の抗体としては、Abnova（ウォルナット、カリフォルニアおよび台湾）およびGenWay Biotech, Inc.（サンディエゴ、カリフォルニア）から入手可能なものが挙げられる。また、抗-HCV抗体の調製に関する欧州特許出願EP2099825A2も参照。

## 【0106】

抗-HCV抗体およびHCV抗原組み合わせイムノアッセイに任意の適切なコントロール組成物を使用してもよい。コントロール組成物は、一般的に、抗-HCV抗体、既知の抗原および任意の望ましい添加剤を含む。

20

## 【0107】

従って、上の観点で、試験サンプル中の抗-HCV抗体または抗原の存在、量または濃度を決定する方法が提供される。この方法は、アッセイによって、抗-HCV抗体または抗原について試験サンプルをアッセイすることを含む。

## 【0108】

(i) HCV抗原および少なくとも1つの検出可能な標識を含む単離されたポリペプチドまたは精製されたポリペプチドを少なくとも含む免疫診断試薬を使用し、試験サンプル中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度の間接的または直接的な指標として、検出可能な標識によって発生するシグナルを、コントロールまたはキャリブレーター（場合により、それぞれのキャリブレーターが、抗-HCV抗体の濃度という点で他のキャリブレーターと異なる一連のキャリブレーターの一部である。）中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度の間接的または直接的な指標として発生したシグナルと比較する。この方法は、以下の工程を含んでいてもよい。

30

## 【0109】

(i) 試験サンプル中に存在し得るHCV抗体との第1、第2および第3の特異的な捕捉結合パートナー/抗-HCV抗体複合体を生成するように、試験サンプルと、1つ以上の組み換えHCV抗原を含む免疫診断試薬とを接触させること、

(ii) 第1の特定の結合パートナー/第1、第2および第3の抗-HCV抗体、それぞれ/第2の特定の結合パートナー複合体を生成するように、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-HCV抗体複合体と、抗-HCV抗体（例えば、本明細書に記載されるような抗-IgG抗体および抗-IgM抗体またはポリペプチド）のための少なくとも1つの検出可能な標識された第2の特定の結合パートナーとを接触させることおよび

40

(iii) (ii)で作られる第1の特定の結合パートナー/抗-HCV抗体/第2の特定の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発生するシグナルを検出または測定することによって、試験サンプル中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度を決定すること。

## 【0110】

場合により、または好ましくは、抗-IgGおよびIgM抗体の使用に加えて、またはこれに代えて、第2の工程は、それぞれ第1の特定の結合パートナー/抗-HCV抗体/

50

第2の特定の結合パートナー複合体を生成するように、第1、第2および第3の捕捉抗原によって特異的に捕捉された抗-HCV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の工程は、以下のものを含む。

【0111】

(iii)(ii)に作られる第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-HCV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中の検出可能な標識によって発生するシグナルを検出または測定することによって、試験サンプル中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度を決定すること。

【0112】

または、この方法は、以下の工程を含んでいてもよい。

【0113】

(i)試験サンプルと、1つ以上の組み換え抗原を含む免疫診断試薬とを接触させ、同時または逐次に、いずれかの順序で、試験サンプルと、第1の特定の結合パートナーの少なくとも1つの対に結合することについて、抗-HCV抗体と競争することができ、検出可能に標識された抗-HCV抗体を含む、少なくとも1つの検出可能に標識された第2の特定の結合パートナーとを接触させ、試験サンプル中に存在する任意の抗-HCV抗体および少なくとも1つの検出可能に標識された第2の特定の結合パートナーが互いに競争し、それぞれ、第1の特定の結合パートナー/抗-HCV抗体複合体および第1の特定の結合パートナー/第2の特定の結合パートナー複合体を生成すること、

(ii)(ii)で作られる第1の特定の結合パートナー/第2の特定の結合パートナー複合体中の検出可能な標識によって発生するシグナルを検出または測定することによって、試験サンプル中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度を決定し、第1の特定の結合パートナー/第2の特定の結合パートナー複合体中の検出可能な標識によって発生するシグナルは、試験サンプル中の抗-HCV抗体の量または濃度に反比例する。免疫診断試薬が含まれる組み換え抗原で微粒子をコーティングしてもよい。この観点で、免疫診断試薬が含まれる抗原で、さらなるHCV抗原と同じ微粒子と一緒にコーティングしてもよい。免疫診断試薬が含まれるポリペプチドで、同じ微粒子と一緒にコーティングする場合(例えば、4%の固形分を含有する微粒子懸濁物(4%重量/体積の微粒子または4グラムの微粒子/100mLの微粒子懸濁物))、好ましくは、ポリペプチドで同じ微粒子に約1:2から約1:6の比率で一緒にコーティングし、ポリペプチドを約1:2の比率で同じ微粒子と一緒にコーティングする場合、本発明の単離された抗原または精製された抗原(例えば、表1に記載されるもの)の濃度は、少なくとも約40μg/mLであり、他の単離されたポリペプチド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。試験サンプルが患者から得られる場合、この方法は、さらに、患者の治療的/予防的な処置の効力を診断し、予後を判断し、または評価することを含んでいてもよい。この方法が、さらに、患者の治療的/予防的な処置の効力を評価することを含む場合、この方法は、場合により、効力を高めるために必要な場合、患者の治療的/予防的な処置を変えることをさらに含んでいてもよい。この方法は、自動化されたシステムまたは半自動化されたシステムで使用するように調整することができる。

【0114】

また、上の観点で、試験サンプル中の抗-HCV抗体またはHCV抗原またはタンパク質の存在、量または濃度を決定する方法が提供される。この方法は、アッセイによって試験サンプルをアッセイすることを含む。

【0115】

(i)少なくとも1つのHCV抗原(および好ましくは2つ、3つ、またはより多い抗原)、少なくとも1つの検出可能な標識(好ましくはそれぞれの抗原が、検出可能に標識されている。)を含む免疫診断試薬を使用すること、

(ii)試験サンプル中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度の間接的または直接的な指標として、検出可能な標識によって発生するシグナルを、コントロールまたはキャリブレーター(場合により、それぞれのキャリブレーターが、抗-HCV抗体の濃度という

10

20

30

40

50

点で他のキャリブレーターと異なる一連のキャリブレーターの一部である。)中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度の間接的または直接的な指標として発生したシグナルと比較すること。この方法は、以下の工程を含んでいてもよい。

【0116】

(i)第1の特異的な捕捉結合パートナー/抗-HCV抗体複合体を生成するように、試験サンプルと、少なくとも1つ、2つ、3つ、またはより多い本発明の組み換えHCV抗原を含む免疫診断試薬とを接触させること、

(ii)第1の特定の結合パートナー/抗-HCV抗体/第2の特定の結合パートナー複合体を生成するように、第1の特異的な捕捉結合パートナー/抗-HCV抗体複合体と、抗-HCV抗体(例えば、抗-IgG抗体および抗-IgM抗体または抗-HCV抗体に結合する標識された抗原)についての少なくとも1つの検出可能に標識された第2の特定の結合パートナーとを接触させること、

(iii)(ii)で作られる第1の特定の結合パートナー/抗-HCV抗体/第2の特定の結合パートナー複合体中、検出可能な標識によって発生するシグナルを検出または測定することによって、試験サンプル中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度を決定すること。または、この方法は、以下の工程を含んでいてもよい。

【0117】

(i)試験サンプルと、少なくとも1つ、2つ、3つ、またはより多くの異なるHCV抗原を含む免疫診断試薬とを接触させ、同時または逐次に、いずれかの順序で、試験サンプルと、第1の特定の結合パートナーの少なくとも1つの対に結合することについて、抗-HCV抗体と競争することができ、検出可能に標識された抗-HCV抗体を含む、少なくとも1つの検出可能に標識された第2の特定の結合パートナーとを接触させ、試験サンプル中に存在する任意の抗-HCV抗体および少なくとも1つの第2の特定の結合パートナーが互いに競争し、それぞれ、第1の特定の結合パートナー/抗-HCV抗体複合体および第1の特定の結合パートナー/第2の特定の結合パートナー複合体を生成すること、

(ii)(i)で作られる第1の特定の結合パートナー/第2の特定の結合パートナー複合体中の検出可能な標識によって発生するシグナルを検出または測定することによって、試験サンプル中の抗-HCV抗体の存在、量または濃度を決定し、第1の特定の結合パートナー/第2の特定の結合パートナー複合体中の検出可能な標識によって発生するシグナルは、試験サンプル中の抗-HCV抗体の量または濃度に反比例する。免疫診断試薬が含まれるポリペプチドで微粒子をコーティングしてもよい。この観点で、免疫診断試薬が含まれるポリペプチドで、同じ微粒子と一緒にコーティングしてもよい。免疫診断試薬が含まれるポリペプチドで、同じ微粒子と一緒にコーティングする場合(例えば、4%の固形分を含有する微粒子懸濁物(4%重量/体積の微粒子または4グラムの微粒子/100mLの微粒子懸濁物))、好ましくは、ポリペプチドで同じ微粒子に約1:2から約1:6の比率で一緒にコーティングし、ポリペプチドを約1:2の比率で同じ微粒子と一緒にコーティングする場合、組み換えHCV抗原を含む単離されたポリペプチド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、他の単離されたポリペプチド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。試験サンプルが患者から得られる場合、この方法は、さらに、患者の治療的/予防的な処置の効力を診断し、予後を判断し、または評価することを含んでいてもよい。この方法が、さらに、患者の治療的/予防的な処置の効力を評価することを含む場合、この方法は、場合により、効力を高めるために必要な場合、患者の治療的/予防的な処置を変えることをさらに含んでいてもよい。この方法は、自動化されたシステムまたは半自動化されたシステムで使用するように調整することができる。

【0118】

一般的に、抗-HCV抗体について試験サンプルをアッセイするときに得られる結果を評価するベンチマークとして、所定のレベルを使用してもよい。一般的に、このような比較をするときに、疾患、障害または状態(例えば、子癇前症または心血管系疾患)の特定の段階または終点、または特定の兆候を有する検体の存在、量または濃度の結合または会

10

20

30

40

50

合を行うことができるように十分な回数、適切な条件で特定のアッセイを行うことによって、所定のレベルが得られる。典型的には、参照被検体（または被検体の集合）のアッセイを用い、所定のレベルが得られる。

【0119】

特に、疾患の進行および/または処置を監視するために使用されるような所定のレベルに関し、抗-HCV抗体の量または濃度は、「変化しない」、「望ましい」（または「望ましく変更される」）または「望ましくない」（または「望ましくないように変更される」）であってもよい。「高まる」または「増加する」は、典型的または正常なレベルまたは範囲（例えば、所定のレベル）より高いか、または別の参照レベルまたは範囲（例えば、初期のサンプルまたはベースラインサンプル）より高い試験サンプル中の量または濃度を指す。「低下する」または「減少する」という用語は、典型的または正常なレベルまたは範囲（例えば、所定のレベル）より低い、または別の参照レベルまたは範囲（例えば、初期のサンプルまたはベースラインサンプル）より低い試験サンプル中の量または濃度を指す。「変化した」という用語は、典型的または正常なレベルまたは範囲（例えば、所定のレベル）より変えられた（増加または減少した。）か、または別の参照レベルまたは範囲（例えば、初期のサンプルまたはベースラインサンプル）より変えられた（増加または減少した。）サンプル中の量または濃度を指す。

10

【0120】

抗-HCV抗体またはHCV抗原について典型的または正常なレベルまたは範囲は、標準的な実施に従って定義される。抗-HCV抗体および/またはHCV抗原のレベルは、ある場合には、非常に低いため、典型的または正常なレベルまたは範囲と比較して正規の変化が存在する場合、または実験誤差またはサンプルの変動によって説明することができない参照レベルまたは範囲の正規の変化が存在する場合、いわゆる変化したレベルまたは変更が起こったと考えることができる。従って、特定のサンプルで測定されるレベルは、いわゆる正常な被検体からの同様のサンプルで決定されるレベルまたはレベルの範囲と比較されるだろう。この観点で、「正常な被検体」は、検出可能な肝炎を有さない個人であり、例えば、「正常な」（時に「コントロール」と呼ばれる。）患者または集合は、例えば、検出可能な肝炎を示さない被検体である。さらに、抗-HCV抗体およびHCV抗原が大部分のヒト集合において高レベルで常にみられない場合、「正常な被検体」は、抗-HCV抗体またはHCV抗原の量または濃度の検出可能な実質的な増加も上昇もない個人であると考えることができ、「正常な」（時に「コントロール」と呼ばれる。）患者または集合は、抗-HCV抗体の量または濃度の検出可能な実質的な増加も上昇も示さない。「明らかに正常な被検体」は、抗-HCV抗体またはHCV抗原が評価されていなかったか、または評価されていない被検体である。検体が、通常は検出可能ではない（例えば、正常なレベルはゼロであるか、または正常な集合の約25から約75パーセントの範囲内にある。）が、試験サンプルで検出される場合、および検体が試験サンプル中に正常なレベルより多く存在する場合、検体のレベルは、「高まる」と言われる。従って、特に、本開示は、例えば、本明細書で定義されるような肝炎を有するか、または肝炎を有するリスクがある被検体をスクリーニングする方法を提供する。

20

30

【0121】

従って、本明細書に記載される方法を使用し、被検体が肝炎を有するか、または肝炎が進行するリスクを有するかどうかを決定することもできる。具体的には、このような方法は、以下の工程を含んでもよい。

40

【0122】

(a) 被検体からの試験サンプルにおける抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量を決定すること（例えば、本明細書に記載される方法、または当該技術分野で知られる方法を用いて）、および

(b) 工程(a)で決定される抗-HCV抗体およびHCV抗原の濃度または量と、所定のレベルとを比較し、工程(a)で決定される抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量が、所定のレベルに関して望ましい場合、被検体は、肝炎を有していな

50

いか、または肝炎のリスクがないと決定される。しかし、工程（a）で決定される抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量が、所定のレベルに関して望ましくない場合、被検体は、肝炎を有しているか、または肝炎のリスクがあると決定される。

【 0 1 2 3 】

さらに、本明細書には、被検体における疾患の進行を監視する方法が提供される。最適には、この方法は、以下の工程を含む。

【 0 1 2 4 】

（ a ）被検体からの試験サンプルにおいて、抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量を決定すること、

（ b ）被検体からの後期の試験サンプルにおいて、抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量を決定すること、および

（ c ）工程（ b ）で決定されるような抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量と、工程（ a ）で決定される抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量とを比較し、工程（ b ）で決定される濃度または量が、工程（ a ）で決定される抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量と比較したとき、変化していないか、または望ましくない場合、被検体の疾患は、継続しており、進行しているか、または悪化していると決定される。比較によって、工程（ b ）で決定されるような抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量が、工程（ a ）で決定される抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量と比較したとき、望ましい場合には、被検体の疾患は、継続しておらず、回復しているか、または向上していると決定される。

【 0 1 2 5 】

場合により、この方法は、さらに、工程（ b ）で決定されるような抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量を、例えば、所定のレベルと比較することを含む。さらに、場合により、この比較が、工程（ b ）で決定されるような抗 - H C V 抗体および / または抗 - H C V 抗原の濃度または量が、例えば、所定レベルに対して望ましくないように変化することを示す場合、この方法は、被検体を 1 つ以上の医薬組成物で所定時間処置することを含む。

【 0 1 2 6 】

さらになお、この方法を使用し、 1 つ以上の医薬組成物を用いた処置を受けている被検体において、処置を監視してもよい。具体的には、このような方法は、被検体に 1 つ以上の医薬組成物を投与する前に、被検体からの第 1 の試験サンプルを提供することを含む。次いで、被検体からの第 1 の試験サンプルにおける抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量が決定される（例えば、本明細書に記載される方法または当該技術分野で知られている方法を用いて）。抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量が決定された後、場合により、抗 - H C V 抗体の濃度または量と所定のレベルとを比較する。第 1 の試験サンプルにおいて決定されるような抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量が、所定のレベルより小さい場合、被検体は、 1 つ以上の医薬組成物で処置されない。しかし、第 1 の試験サンプルにおいて決定されるような抗 - H C V 抗体および / または H C V 抗原の濃度または量が、所定のレベルより大きい場合、被検体は、 1 つ以上の医薬組成物で所定期間処置される。被検体が 1 つ以上の医薬組成物で処置される期間は、当業者によって決定することができる（例えば、この期間は、約 7 日から約 2 年、好ましくは、約 1 4 日から約 1 年であってもよい。 ）。

【 0 1 2 7 】

1 つ以上の医薬組成物を用いた一連の処置の間、第 2 およびその後の試験サンプルを被検体から得る。試験サンプルの数および試験サンプルが被検体から得られる時間は重要ではない。例えば、被検体に 1 つ以上の医薬組成物を最初に投与してから 7 日後に第 2 の試験サンプルを得ることができ、被検体に 1 つ以上の医薬組成物を最初に投与してから 2 週間後に、第 3 の試験サンプルを得ることができ、被検体に 1 つ以上の医薬組成物を最初に投与してから 3 週間後に第 4 の試験サンプルを得ることができ、被検体に 1 つ以上の医薬組成物を最初に投与してから 4 週間後に第 5 の試験サンプルを得ることができた、など。

## 【 0 1 2 8 】

それぞれの第2またはその後の試験サンプルを被検体から得た後、第2またはその後の試験サンプル中で決定される抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量を決定する(例えば、本明細書に記載される方法または当該技術分野で既知の方法を用いて)。次いで、第2またはその後のそれぞれの試験サンプル中で決定されるような抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量を、第1の試験サンプルで決定されるような抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量と比較する(例えば、元々の試験サンプルを、場合により、所定のレベルと比較する)。工程(c)で決定されるような抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量が、工程(a)で決定されるような抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量と比較したときに望ましい場合、被検体の疾患は、継続しておらず、回復しているか、または向上していると決定され、被検体は、工程(b)の1つ以上の医薬組成物の投与を継続すべきである。しかし、工程(c)で決定されるような濃度または量が、工程(a)で決定されるような抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度または量と比較したときに変化していないか、または望ましくない場合、被検体の疾患は、継続しており、進行しているか、または悪化していると決定され、被検体は、工程(b)でより高い濃度の1つ以上の医薬組成物を被検体に投与して処置されるべきであり、または、被検体は、工程(b)で被検体に投与されるものとは異なる1つ以上の医薬組成物を被検体に投与して処置されるべきである。具体的には、被検体は、被検体の抗-HCV抗体および/またはHCV抗原のレベルを減少または低下させるために被検体がすでに受けた1つ以上の医薬組成物とは異なる1つ以上の医薬組成物を投与して処置されるべきである。

10

20

## 【 0 1 2 9 】

一般的に、繰り返し試験を行ってもよいアッセイについて(例えば、疾患の進行および/または処置に対する応答を監視する)、第1の試験サンプルを被検体から得てから所定期間後に、第2またはその後の試験サンプルを得る。具体的には、被検体からの第2の試験サンプルは、第1の試験サンプルを被検体から得てから数分後、数時間後、数日後、数週間後または数年後に得てもよい。例えば、第1の試験サンプルを被検体から得てから約1分後、約5分後、約10分後、約15分後、約30分後、約45分後、約60分後、約2時間後、約3時間後、約4時間後、約5時間後、約6時間後、約7時間後、約8時間後、約9時間後、約10時間後、約11時間後、約12時間後、約13時間後、約14時間後、約15時間後、約16時間後、約17時間後、約18時間後、約19時間後、約20時間後、約21時間後、約22時間後、約23時間後、約24時間後、約2日後、約3日後、約4日後、約5日後、約6日後、約7日後、約2週間後、約3週間後、約4週間後、約5週間後、約6週間後、約7週間後、約8週間後、約9週間後、約10週間後、約11週間後、約12週間後、約13週間後、約14週間後、約15週間後、約16週間後、約17週間後、約18週間後、約19週間後、約20週間後、約21週間後、約22週間後、約23週間後、約24週間後、約25週間後、約26週間後、約27週間後、約28週間後、約29週間後、約30週間後、約31週間後、約32週間後、約33週間後、約34週間後、約35週間後、約36週間後、約37週間後、約38週間後、約39週間後、約40週間後、約41週間後、約42週間後、約43週間後、約44週間後、約45週間後、約46週間後、約47週間後、約48週間後、約49週間後、約50週間後、約51週間後、約52週間後、約1.5年後、約2年後、約2.5年後、約3.0年後、約3.5年後、約4.0年後、約4.5年後、約5.0年後、約5.5年後、約6.0年後、約6.5年後、約7.0年後、約7.5年後、約8.0年後、約8.5年後、約9.0年後、約9.5年後または約10.0年後に、第2の試験サンプルを被検体から得てもよい。疾患の進行を監視するために使用する場合、上のアッセイを使用し、急性状態を患う被検体の疾患の進行を監視することができる。急性状態(クリティカルケア状態としても知られる)は、例えば、心血管系または排泄系を含む、急性の生命を脅かす疾患または他の重要な医学的状态を指す。典型的には、クリティカルケア状態は、病院系の施設(限定されないが、救急救命室、集中治療室、外傷センター、または他の救急ケア施設)での急

30

40

50

性の医学的介入、または医療補助者または他の分野に基づく医学者による投与を必要とするこれらの状態を指す。クリティカルケア状態の場合、繰り返しの監視は、一般的に、短い時間フレームで、即ち、分、時間または日（例えば、約1分、約5分、約10分、約15分、約30分、約45分、約60分、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日または約7日）行われ、初期のアッセイは、同様に、一般的に、より短い時間フレーム内で、例えば、疾患または状態の発生の約数分間、数時間または数日間行われる。

10

#### 【0130】

アッセイを使用し、慢性または非急性の状態を患う被検体の疾患の進行を監視することもできる。クリティカルケアではない状態、または非急性の状態は、例えば、心血管系および/または排泄系を含む、急性の生命を脅かす疾患または他の重要な医学的状态以外の状態を指す。典型的には、非急性の状態は、長期間または慢性の期間の状態を含む。非急性の状態の場合、繰り返しの監視は、一般的に、より長い時間フレームで、例えば、数時間、数日間、数週間、数ヶ月間または数年間（例えば、約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、約9週間、約10週間、約11週間、約12週間、約13週間、約14週間、約15週間、約16週間、約17週間、約18週間、約19週間、約20週間、約21週間、約22週間、約23週間、約24週間、約25週間、約26週間、約27週間、約28週間、約29週間、約30週間、約31週間、約32週間、約33週間、約34週間、約35週間、約36週間、約37週間、約38週間、約39週間、約40週間、約41週間、約42週間、約43週間、約44週間、約45週間、約46週間、約47週間、約48週間、約49週間、約50週間、約51週間、約52週間、約1.5年、約2年、約2.5年、約3.0年、約3.5年、約4.0年、約4.5年、約5.0年、約5.5年、約6.0年、約6.5年、約7.0年、約7.5年、約8.0年、約8.5年、約9.0年、約9.5年または約10.0年）で行われ、初期のアッセイは、同様に、一般的に、より長い時間フレーム内で、例えば、疾患または状態の発生の約数時間、数日間、数ヶ月間または数年間行われる。

20

30

#### 【0131】

さらに、被検体から得られる第1の試験サンプルを用い、上のアッセイを行うことができ、第1の試験サンプルは、ある供給源、例えば、尿、血清または血漿から得られる。場合により、次いで、被検体から得られる第2の試験サンプルを用いて上のアッセイを繰り返してもよく、第2の試験サンプルは、別の供給源から得られる。例えば、第1の試験サンプルが尿から得られる場合、第2の試験サンプルを血清または血漿から得てもよい。第1の試験サンプルおよび第2の試験サンプルを用いたアッセイから得られた結果を比較してもよい。この比較を用い、被検体の疾患または状態の状況を評価することができる。

40

#### 【0132】

さらに、本開示は、肝炎であると前もって診断された被検体または肝炎を患う被検体が処置から利益を得るかどうかを決定する方法にも関する。特に、本開示は、HCVを伴う診断方法および製品に関する。従って、「被検体の疾患の処置を監視する」方法は、本明細書に記載される場合、さらに、最適には、治療の候補を選択または特定することも包含していてもよい。

#### 【0133】

従って、特定の実施形態では、本開示は、肝炎を有するか、または肝炎のリスクを有する患者が治療の候補であるかどうかを決定する方法も提供する。一般的に、被検体は、肝

50

炎の幾つかの症状を経験した被検体、または肝炎を有するか、または肝炎のリスクがあると実際に診断された被検体および/または本明細書に記載されるように、望ましくない濃度または量の抗-HCV抗体またはこのフラグメントおよび/またはHCV抗原を示す被検体が挙げられる。

#### 【0134】

この方法は、場合により、本明細書に記載されるようなアッセイを含み、検体は、被検体を1つ以上の医薬組成物で処置、免疫抑制治療を用いて、または免疫吸収治療によって、抗-血管新生治療する前および後に評価され(例えば、特に、HCVを伴い作用機序に医薬的に関する。)るか、または検体がこのような処置に従って評価され、検体の濃度または量を所定のレベルに対して比較する。処置後に観察される検体の望ましくない濃度または量は、被検体が、さらなる処置または継続する処置を受けても利益を受けないことを確認し、一方、処置後に観察される検体の望ましい濃度または量は、被検体が、さらなる処置または継続する処置から利益を受けることを確認する。この確認は、臨床研究の管理を用いて補助され、改良された患者のケアを与える。

10

#### 【0135】

キットおよび方法の適合

本明細書に記載されるようなイムノアッセイによって試験サンプル中の抗-HCV抗体および/またはHCV抗原の濃度を決定するキット(またはこの要素)および方法を、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号、および例えば、Abbott Laboratories (Abbott Park, III)によって ARCHITECT(R)として市販されているように、種々の自動化されたシステムおよび半自動化されたシステム(固相が微粒子を含むもの)での使用に適合させることができる。

20

#### 【0136】

自動化されていないシステム(例えば、ELISA)と比較して、自動化されたシステムまたは半自動化されたシステムの幾つかの差は、第1の特定の結合パートナー(例えば、抗原)が接続する基質(サンドイッチ生成および検体の反応性に影響を与えることがある。)、ならびに捕捉、検出および/または任意の洗浄工程の長さおよび時間調整を含む。自動化されていないフォーマット(例えば、ELISA)が、サンプルおよび捕捉試薬を用いて比較的長いインキュベーションを必要とし得る(例えば、約2時間)一方、自動化されたフォーマットまたは半自動化されたフォーマット(例えば、ARCHITECT(R)、Abbott Laboratories)は、比較的短いインキュベーション時間を有するだろう(例えば、ARCHITECT(R)について約18分)。同様に、自動化されていないフォーマット(例えば、ELISA)は、検出抗体、例えば、複合体試薬を比較的長いインキュベーション時間(例えば、約2時間)でインキュベートし得るが、自動化されたフォーマットまたは半自動化されたフォーマット(例えば、ARCHITECT(R))は、比較的短いインキュベーション時間を有するだろう(例えば、ARCHITECT(R)について約4分)。

30

#### 【0137】

Abbott Laboratoriesから入手可能な他のプラットフォームとしては、限定されないが、AxSYM(R)、IMx(R)(例えば、米国特許第5,294,404号を参照、全体的に本明細書に参照により組み込まれる。)、PRISM(R)、EIA(ビーズ)、Quantum(商標)IIおよび他のプラットフォームが挙げられる。さらに、アッセイ、キットおよびキット要素を他のフォーマットで、例えば、電気化学または他の手動のアッセイシステムまたはポイントオブケアアッセイシステムで使用してもよい。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイイムノセンサを行う商業的なAbbott Point of Care(i-STAT(R)、Abbott Laboratories)電気化学イムノアッセイシステムに適用でき、1回型の試験デバイスでの製造および操作の方法が、例えば、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2004/001857

40

50

7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、これらに関する教示について、全体的に本明細書に参照により組み込まれる。

【0138】

特に、I - S T A T ( R ) システムへのアッセイの適合に関し、以下の構造が例示である。微細加工されたケイ素チップを、金電流測定の実験電極と、銀 - 塩化銀参照電極の対を用いて製造する。実験電極の1つについて、固定された捕捉抗体を有するポリスチレンビーズ(直径が0.2mm)が、電極の上にあるパターン形成さ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する。このチップを、イムノアッセイに適した流体フォーマットで、I - S T A T ( R ) カートリッジに並べる。カートリッジのサンプルを保持するチャンバの壁の一部に、アルカリホスファターゼ(または他の標識)で標識された検出抗体を含む層が存在する。カートリッジの液体溜めの中は、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

【0139】

操作時に、抗 - H C V 抗体および/またはH C V 抗原を含むおそれがあるサンプルを、試験カートリッジの保持チャンバに加え、カートリッジをI - S T A T ( R ) リーダーに挿入する。検出抗体または検出可能に標識された検出抗原をサンプルに溶解させた後、カートリッジ内のポンプ要素が、サンプルを、チップを含む導路に向かわせる。ここで、捕捉抗原(または捕捉抗体)、抗 - H C V 抗体(またはH C V 抗原)と、標識された検出抗体(および/または検出抗原)との間のサンドイッチ生成を促進するように振動する。アッセイの2番目の工程では、流体を液体溜めから出し、導路に向かわせ、チップからサンプルを洗い流し、廃棄チャンバに送る。アッセイの最後の工程では、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、ホスフェート基を開裂させ、遊離したp - アミノフェノールを、実験電極で電気化学的に酸化させる。測定された電流に基づき、この読みから、埋め込まれたアルゴリズムおよび工場で決定される校正曲線を用い、サンプル中の抗 - H C V 抗体またはH C V 抗原の量を計算することができる。

20

【0140】

本明細書に記載され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、種々のバッファー(例えば、当該技術分野で公知なものおよび/または複合体希釈剤として、および/または例えばキャリブレーター希釈剤として洗浄するために使用するために、簡単に調製することができ、または最適化することができるもの)を包含する。例示的な複合体希釈剤は、特定のキットで使用されるARCHITECT(R)複合体希釈剤(Abbott Laboratories、Abbott Park、III)であり、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、抗菌剤および洗剤を含む。例示的なキャリブレーター希釈剤は、特定のキットで使用されるARCHITECT(R)ヒトキャリブレーター希釈剤であり(Abbott Laboratories、Abbott Park、III)、MES、他の塩、タンパク質ブロkkerおよび抗菌剤を含むバッファーを含む。さらに、2008年12月31日に出願された米国特許出願第61/142,048号および米国特許出願第12/650,241号に記載されるように、例えば、I - S T A T ( R ) カートリッジフォーマットで、シグナル増幅剤としてシグナル抗体に連結した核酸配列を用い、改良されたシグナル発生が得られてもよい。

30

40

【実施例】

【0141】

[実施例1]: H C V N S 3 9 N B 4 9 H のクローニングおよび発現

H C V - 1 のアミノ酸1192から1457(配列番号2)をコードするヌクレオチド配列(配列番号1)は、E . C o l i 発現のために最適化されたコドンであり、改変したp E T 3 2 a ベクターへとクローン化し、チオレドキシ融合タンパク質をコードする配列が除かれ、メチオニン(M)と置き換わっていた。これに加え、カルボキシ末端のヘキサヒスチジンタグは、固定化された金属アフィニティクロマトグラフィー(I M A C )で

50

の精製を容易にするために含まれていた。E. coli BL21 (DE3) 細胞を、精製されたプラスミド DNA で形質変換し、形質変換体をスクリーニングした。得られたプラスミドは、p9NB49H と命名し、このプラスミドから発現したタンパク質は、9NB49H と命名された。

#### 【0142】

p9NB49H で形質変換された E. coli BL21 (DE3) 細胞をテリフィックブロス (TB) 培地で培養することによってタンパク質発現が達成された。振とうフラスコで OD600nm が 0.50 になるまで細胞を成長させ、次いで、1mM IPTG を用いて誘導し、OD600nm 約 3.5 が得られるまで、25 から 37 で約 3 時間成長させた。遠心分離によって細胞を集め、プロテアーゼ阻害剤を追加した溶解バッファー (50mM KPO<sub>4</sub>, 300mM KCl, 5mM イミダゾール, pH 8.0) に懸濁させた。細胞懸濁物を凍結させ、解凍し、ベンゾナーゼを加え、氷の上で音波処理することによって細胞を溶解させた。遠心分離によって、溶解物を可溶性フラクションと不溶性フラクションに分けた。SDS-PAGE から、NS3 9NB49H タンパク質が可溶性フラクション中に存在することがわかった。Native IMAc Buffer Kit および Profinity IMAc カートリッジ (BioRad) を使い、製造業者のプロトコルに従って、溶解可溶性フラクションに対して IMAc 精製を行った。精製されたタンパク質のバッファーの PBS への交換は、脱塩カラムによって、または透析によって達成された。精製手順全体で使用されるすべてのバッファーは、20mM -メルカプトエタノール (ME) を含んでいた。

#### 【0143】

[実施例 2] : HCV NS3 Nbt-9NB49H のクローニングおよび発現

実施例 1 に記載される NS3 9NB49H タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、改変された pET32a プラスミドへとサブクローン化し、オープンリーディングフレームは、アミノ末端ピオチン化タグ (MSG LND I F E A Q K I E W H E) (配列番号 91) をコードし、NS3 コード配列の上流に G S G S N S M - リンカー配列 (配列番号 92)、その後、カルボキシル末端ヘキサヒスチジンタグ、その後、ストップコドン有する。得られるプラスミドは、pNbt-9NB49H と命名した。Beckett et al. (Protein Science, 8 (4) : 921 - 929, 1999) によって記載されるピオチン化タグによって、E. coli BirA 遺伝子によってコードされるピオチンリガーゼ酵素を介した部位特異的なピオチン組み込みが可能になる。E. coli BL21 (DE3) 細胞を、IPTG 誘導性プロモーターの制御下、pNbt-9NB49H 発現プラスミドおよびピオチンリガーゼを発現する第 2 のプラスミド (pBirAcm) で同時形質変換した。振とうフラスコ中、最終濃度が 0.050mM になるまでピオチンを加えたテリフィックブロス中、37 で OD600nm が 0.50 になるまで細胞を成長させ、次いで、1mM IPTG を用いて誘導し、25 で一晩成長させた。次いで、遠心分離によって細胞を集め、溶解バッファーで再懸濁させ、音波処理によって細胞を破壊した。ある場合には、高レベルの部位特異的なピオチン化をさらに確実にするために、上の溶解した細胞に ATP およびピオチンを加え (最終濃度がそれぞれ 3mM および 0.25mM)、室温で 2 時間インキュベートした。次いで、組み換えタンパク質を実施例 1 に記載されるように IMAc によって精製した。

#### 【0144】

[実施例 3] : HCV NS3 9NB49H - Cbt のクローニングおよび発現

実施例 1 に記載される NS3 9NB49H タンパク質をコードするヌクレオチド配列を、改変された pET32a ベクターへとサブクローン化し、オープンリーディングフレームは、N 末端メチオニンをコードし、その後、NS3、その後、G S G S G - リンカー (配列番号 93) およびヘキサヒスチジンタグ、その後、G G - リンカーおよびピオチン化タグ (G L N D I F E A Q K I E W H E) (配列番号 94)、最後にストップコドン有した。得られるプラスミドは、p9NB49H - Cbt を命名した。タンパク質発現およびピオチン化を実施例 1 および 2 に記載するように行った。

## 【 0 1 4 5 】

【実施例 4】：HCV NS3hおよびこの改変体のクローニングおよび発現

以下の表 2 に記載され、図 1 に示されるような HCV NS3 ヘリカーゼの種々の領域に融合した p9NB49H によって発現される同じアミノ末端（即ち、HCV ポリタンパク質のアミノ酸 1192 から 1215）を用いることによって組み換え HCV NS3 ヘリカーゼ改変体を構築した。このヘリカーゼ構築物をコードするヌクレオチド配列は、実施例 1 に記載されるようなカルボキシル末端 G S G S G - ヘキサヒスチジンタグ（配列番号 95）または実施例 2 に記載されるようなカルボキシル末端 G S G S G - ヘキサヒスチジン - G G - ビオチン化タグ（配列番号 96）のいずれかを用い、改変した pET32a ベクター（マイナスチオレドキシ融合物）へとクローン化した。ビオチン化および精製を行うか、または行わずにタンパク質発現を実施例 1 および 2 に記載されるように行った。

10

## 【 0 1 4 6 】

## 【表 2】

表 2:

HCV ポリタンパク質の領域	HCV NS3 の領域	プラスミドの記号	発現したタンパク質の記号	配列番号(ヌクレオチド、アミノ酸)
1216-1658	190-632	pNS3h(+Cbt)	NS3h (ヘリカーゼ) (+Cbt)	19, 20

## 【 0 1 4 7 】

【実施例 5】：発酵、タンパク質の発現および精製

NS3 組み換えタンパク質（例えば、9NB49H または NS3h、またはこれらの改変体）を、10L 発酵器で培養した E. coli BL21 (DE3) 細胞で発現させた。Superbroth (SB) Media（炭素源としてグリセロールを豊富に含む培地）を含む振とうフラスコで成長させた 120mL の種培地を使用し、SB 培地を含む 10L 発酵器に接種した。600nm での光学密度 8-12 に達するまで、細胞を 37 で成長させた。イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度が 1mM になるように加えることによって、タンパク質発現を誘発させた。次いで、培地を 25 から 37 でさらに 4 時間成長させた。次いで、発酵器から細胞を集め、次いで、中空繊維膜フィルタを通し、最初の体積 10L から 1 から 2 リットルになるまで収穫物を濃縮した。次いで、濃縮した細胞を遠心分離によってペレット化し、上澄みを除去し、タンパク質精製に使用するまで、得られたペレットを -80 で保存した。

20

30

## 【 0 1 4 8 】

誘導のときに最終濃度が 0.05mM になるまでビオチンを加える以外は、上に記載される発酵を行うことによって、アミノ末端またはカルボキシル末端のビオチン化タグ配列（実施例 2 および 3 を参照）を含む組み換え HCV NS3 タンパク質の in vivo ビオチン化を達成した。次いで、培養物を 25 から 37 でさらに 4 時間成長させ、上の章に記載されるように処理した。

## 【 0 1 4 9 】

発現した可溶性 HCV NS3 組み換え抗原を含む凍結した E. coli 細胞ペレットを凍結し、次いで、冷却した溶解バッファー（40mM NaPO<sub>4</sub>、300mM NaCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、5% グリセロール、5mM -メルカプトエタノール、pH 7.2）に再懸濁させ、その後、0 で 45 分間、連続的なフロー音波処理によって溶解させた。遠心分離して不溶性物質を除去した後、GE ニッケルセファロース Fast Flow 樹脂を上澄みに加え、2 から 8 で一晩インキュベートした（125rpm で振り混ぜる。）。次いで、結合した抗原を含む樹脂を、洗浄バッファー（40mM NaPO<sub>4</sub>、pH 7.2、500mM NaCl、1mM EDTA、20mM イミジゾール、5mM -メルカプトエタノール）を用いて穏和な減圧下で洗浄し、結合した抗原を、40mM NaPO<sub>4</sub>、150mM NaCl、1mM EDTA、500mM イミジゾール、10mM DTT、pH 7.2 を含むバッファーを用いて溶出させた。

40

50

以下のようにアニオン交換クロマトグラフィーによって抗原をさらに精製した。20 mM トリス pH 8.4 中、抗原を GE Q HP アニオン交換樹脂に結合させ、その後、20 mM トリス、pH 8.4、1 M NaCl、5 mM EDTA を用いた勾配溶出を行った。次いで、溶出したタンパク質を、GE Sephadex G25 カラムを用い、10 mM ホスフェート、150 mM NaCl、5 mM EDTA、pH 7.2 を含む最終バッファーへと脱塩した。精製した NS3 タンパク質を -70 で保存した。

#### 【0150】

[実施例6] : アクリジニウム - ウシ血清アルブミン (Ac r - B S A) の調製

0.1% ナトリウムアジドを防腐剤として含むウシ血清アルブミン (B S A) の 30% 溶液 (300 mg / mL) を、商業的な供給源 (P r o l i a n t B i o l o g i c a l s、A n k e n y、I A) から購入した。1 ミリリットル (300 mg) の 30% B S A 溶液を 2.0 mL の 0.1 M P B S (p H 8.0) で希釈し、0.5 から 3.0 mL S l i d e - A - L y z e r 透析カセット (T h e r m o F i s h e r、W a l t h a m、M A) に移し、0.1 M P B S (p H 8.0) に対し、2 から 8 で一晩透析した (2 回交換、600 mL / 交換)。透析した B S A 溶液の濃度は、280 nm での UV 吸収に基づき、97.1 mg / mL であった。200 ミリグラム (2.060 mL、3.0  $\mu$ mol、1.0 mol 当量) の 97.1 mg / mL B S A 溶液を、10.181 mL の 0.1 M P B S (p H 8.0) を含む褐色ガラスバイアルに加えた。この混合物に、39 mg (1.092 mL、45  $\mu$ mol、15.0 mol 当量) の S P S P - アクリジニウム活性エステルの DMF [N, N - ジメチルホルムアミド] を加えた。反応バイアルに封をし、350 rpm で 30 分間攪拌することによって溶液を混合し、次いで、室温に一晩置いた (20 から 26 時間)。インキュベーション後、遊離アクリジニウムおよび凝集物を、0.01 M P B S / 0.1% C H A P S (p H 6.3) ランニングバッファーを用いたクロマトグラフィー (S e p h a c r y l H R S - 200 カラム、G E H e a l t h s c i e n c e s、P A) によって除去した。モノマー Ac r - B S A 複合体に対応するフラクションを保存し、UV 分光法によって特性決定した (240 から 600 nm をスキャン)。280 nm および 370 nm での吸収値を使用し、タンパク質の濃度を決定し、B S A 分子あたりのアクリジニウムの組み込みを計算した。計算されたタンパク質の濃度は、6.779 mg / mL であり、平均数は、B S A 分子あたり 6.2 のアクリジニウムであった。

#### 【0151】

[実施例7] : マレイミドで活性化された Ac r - B S A の調製

マレイミドで活性化された Ac r - B S A の調製。Ac r - B S A (実施例 8 ; 13.5 ミリグラム、202 nmol e、1.0 mol 当量) 1.99 mL の P B S / 0.1% C H A P S (p H 6.3) を褐色ガラスバイアルに加え、0.254 mL の 0.4 M ホスフェート / 8 mM E D T A / 1.6% C H A P S (p H 7.4) で処理し、反応物の pH を 7.4 に調節した。均一な溶液に、0.040 mL (0.35 mg、4.0 mol e 当量) の スクシンイミジル 4 - (N マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S u l f o - S M C C、P i e r c e C h e m i c a l C o.、R o c k f o r d、I I I) の新しい 0.02 M 水溶液を加えた。反応バイアルに封をし、溶液を泡立たせることなく 20 分間攪拌し、次いで、暗室中、室温で 60 から 90 分間、静かにインキュベートした。反応混合物を脱塩し、0.1 M P B S / 0.1% C H A P S / 5 mM E D T A (p H 6.7) であらかじめ平衡状態にした Z e b a スピンカラム (P i e r c e、R o c k f o r d、I I I) にかけることによって、組み込まれていないスルホ - S M C C を除去した。溶出した Ac r - B S A - M a l 試薬の吸光度を 280 nm および 370 nm で測定し、タンパク質濃度を概算した。計算されたタンパク質濃度は、6.28 mg / mL であった。H C V NS3 抗原の接合に Ac r - B S A - M a l をすぐに使用した。

#### 【0152】

Ac r - B S A - M a l に対する組み換え 9 N B 4 9 H の接合。Ac r - B S A - M a

1 ( 5 . 6 ミリグラム、 8 4 n m o l e、 2 . 0 m o l e 当量 ) の 0 . 7 8 9 m L の 0 . 1 M P B S / 0 . 1 % C H A P S / 5 m M E D T A ( p H 6 . 7 ) をポリプロピレン管に加えた。これに、 1 . 2 m g ( 1 . 3 m L、 4 2 n m o l e、 1 . 0 m o l 当量 ) の組み換え 9 N B 4 9 H 抗原の 0 . 0 1 M P B S / 5 m M E D T A ( p H 7 . 2 ) を加えた。この溶液を泡立たせることなく 3 0 分間攪拌し、次いで、暗室中、室温で一晩、静かにインキュベートした。この段階で、または 9 N B 4 9 H 遊離システインのカルボキシメチル化の後に複合体を精製した。カルボキシメチル化の場合、未精製の複合体溶液を 0 . 2 7 0 m L の 0 . 5 M リン酸バッファー ( p H 1 1 . 0 ) で処理し、pH を 8 . 0 に調節した。混合物を 5 分間攪拌し、次いで、 0 . 9 4 m g ( 0 . 0 2 0 m L、 1 2 0 m o l e 当量 ) の新しい 1 N N a O H の 0 . 2 5 M ヨード酢酸 ( I A A ) 溶液または 0 . 2 5 M ヨードアセトアミド水溶液 ( I A M ) を混合しながら加え、 9 N B 4 9 H 遊離 C y s - カルボキシメチル化を行った。暗室中、室温で 6 0 分間、混合物を静かに反応させ、次いで、 0 . 0 1 M P B S / 0 . 1 % C H A P S / 5 m M E D T A ( p H 6 . 3 ) で平衡状態にした P D 1 0 カラムを通した ( 溶出容積 3 . 0 m L ) 。

10

## 【 0 1 5 3 】

A c r - B S A - 9 N B 4 9 H 複合体のタンパク質濃度は、複合体の 2 8 0 n m での吸光度から、A c r - B S A が寄与する 2 8 0 n m での吸光度を引き算した後、決定された。9 N B 4 9 H の 1 % ( w / v ) 溶液の吸光度 0 . 5 2 を使用し、タンパク質濃度を計算した。上述のように計算された 9 N B 4 9 H 濃度は、 0 . 4 0 6 m g / m L であった。

20

## 【 0 1 5 4 】

[ 実施例 8 ] : アクリジニウム - B S A - N S 3 h 複合体の調製

( L C ) マレイミドで活性化された A c r - B S A の調製。A c r - B S A ( 実施例 8 ; 3 . 0 m g、 0 . 4 4 3 m L、 4 5 n m o l、または 1 . 0 m o l 当量 ) の P B S / 0 . 1 % C H A P S ( p H 6 . 3 ) を褐色ガラスバイアルに加え、 0 . 0 5 8 m l の 0 . 4 M ホスフェート / 8 m M E D T A / 1 . 6 % C H A P S ( p H 7 . 4 ) バッファーで処理し、反応物の pH を 7 . 4 に調節した。均一な溶液に、 0 . 0 1 8 m L ( 0 . 0 8 0 m g、 1 8 0 n m o l e、 4 . 0 m o l 当量 ) のスクシンイミジル 4 - ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 - カルボキシ - ( 6 - アミドカプロエート ) ( L o n C h a i n または L C - S M C C、 P i e r c e C h e m i c a l C o .、 R o c k f o r d、 I I I ) のジメチルスルホキシド ( D M S O、 S i g m a A l d r i c h、 S t L o u i s、 M O ) の新しい 0 . 0 1 M 溶液を加えた。反応バイアルに封をし、溶液を泡立たせることなく 2 0 分間攪拌し、次いで、暗室中、室温で 6 0 分間、静かにインキュベートした。反応混合物を脱塩し、 0 . 1 M P B S / 0 . 1 % C H A P S / 5 m M E D T A ( p H 6 . 7 ) であらかじめ平衡状態にした Z e b a スピンカラム ( P i e r c e、 R o c k f o r d、 I I I ) にかけることによって、組み込まれていない L C - S M C C を除去した。溶出した A c r - B S A - M a l 試薬の吸光度を 2 8 0 n m および 3 7 0 n m で測定し、タンパク質濃度を概算した。計算されたタンパク質濃度は、 5 . 2 5 m g / m L であった。A c r - B S A - ( L C ) M a l を次の接合工程にすぐに使用した。

30

## 【 0 1 5 5 】

A c r - B S A - ( L C ) M a l に対する組み換え N S 3 h の接合。 1 . 2 0 m L ( 3 . 1 2 m g ) の N S 3 h の 0 . 0 2 5 M ホスフェート / 0 . 2 5 M N a C l / 5 m M - メルカプトエタノール / 5 m M E D T A ( p H 8 . 0 ) の 2 . 6 m g / m L 溶液を P D 1 0 脱塩カラムに通し、 - メルカプトエタノールを除去した。N S 3 h タンパク質を、 2 . 5 m L の 0 . 0 1 M P B S / 5 m M E D T A ( p H 7 . 2 ) で溶出させ、溶出液の濃度は、 2 8 0 n m での吸光度によって 2 . 9 m g / m L であると決定された。ポリプロピレン管に、 1 . 5 6 m g ( 0 . 2 9 7 m L、 2 3 . 4 n m o l e、 2 . 0 m o l 当量 ) の A c r - B S A - ( L C ) M a l の 0 . 1 M P B S / 0 . 1 % C H A P S / 5 m M E D T A ( p H 6 . 7 )、次いで、 0 . 6 0 m g ( 0 . 5 1 8 m L、 1 1 . 7 n m o l e、 1 . 0 m o l 当量 ) の組み換え N S 3 h 抗原の 0 . 0 1 M P B S / 5 m M

40

50

EDTA (pH 7.2) を加えた。この溶液を泡立たせることなく30分間攪拌し、次いで、暗室中、室温で一晩静かにインキュベートした。この複合体溶液に、0.093 mLの0.5 Mリン酸バッファ (pH 11.0) を加え、混合物のpHを8.0に調節した。混合物を5分間攪拌し、次いで、0.56 mg (0.012 mL、120 μmol 当量) の新しい0.25 M ヨード酢酸 (IAA、ThermoFisher Scientific、Waltham、MA) の1 N NaOH溶液を混合しつつ加え、NS3遊離Cys-カルボキシメチル化を行った。混合物を暗室中、室温で60分間静かに反応させ、0.080 mLの0.01 M PBS / 0.1% CHAPS / 5 mM EDTA (pH 6.3) を用いて最終容積を1.0 mLになるように調整し、0.01 M PBS / 0.1% CHAPS / 5 mM EDTA (pH 6.3) で平衡状態にしたPD10カラムを通した (溶出容積2.5 mL)。脱塩した複合体を、次にSECクロマトグラフィー (TosoHaas G3000SWx1カラム、Toso Bioscience LLC、King of Prussia、PA) によって精製し、望ましくない凝集物を除去した。Acr-BSA-NS3h複合体タンパク質濃度は、複合体の280 nmでの吸光度から、Acr-BSAが寄与する280 nmでの吸光度を引き算した後、決定された。NS3hの1% (w/v) 溶液の吸光度0.95を使用し、タンパク質濃度を計算した。

10

#### 【0156】

[実施例9] : 自動化された磁気微粒子に基づくイムノアッセイ

HCV NS3に由来するタンパク質を、常磁性微粒子および化学発光複合体を利用する自動化された免疫分析機を用い、抗-HCV NS3抗体を検出する能力について試験した (ARCHITECT (R) システム; Abbott Laboratories; 「Bulk Reagent Random-Access Analyzer: ARCHITECT i2000」 Frank A. Quinn、363から367ページを参照。Immunoassay Handbook、第3版、David Ward編集、Nature Publishing Group、London、UK; 米国特許第5,795,784号および米国特許第5,856,194号)。試験されるアッセイフォーマットは、2工程フォーマットまたは1工程フォーマットを含んでいた。アッセイは、一般的に、2工程および1工程の2つのフォーマットを含むものとして記載することができる (「疑似」1工程としても記載される。)。2工程フォーマットでは、ヒトサンプル、アッセイ特異的な希釈剤バッファおよび組み換え抗原でコーティングされた常磁性微粒子を反応容器内で混合し、ボルテックスで攪拌し、18分間インキュベートし、組み換え抗原に指向する抗体は、微粒子によって捕捉される。このインキュベーションの後、微粒子/免疫複合体は、磁石を用いて反応容器の側面に捕捉され、反応上澄みを除去する。次いで、微粒子を水/洗剤溶液で洗浄する。第2の工程では、微粒子に結合したサンプル由来の抗体は、アクリジニウム-標識された複合体を含むバッファ中の粒子の懸濁物およびインキュベーション (4分間) によって検出される。複合体は、ヒト免疫グロブリンまたはアクリジニウム-標識された組み換え抗原に指向するアクリジニウム-標識された抗体であってもよい。複合体と共にインキュベーションし、その後、第2の洗浄工程、最後に、アクリジニウムの活性化および光出力の同時測定を行い、光出力は、微粒子に結合した複合体の量に比例している。

20

30

40

#### 【0157】

1工程フォーマットでは、ヒトサンプル、組み換え抗原コーティングされた常磁性微粒子およびアクリジニウム-標識された組み換え抗原で構成される複合体を含むアッセイ特異的な希釈剤バッファを反応容器内で混合した。18分間インキュベートした後、組み換え抗原に指向する抗体は、磁気微粒子によって同時に捕捉され、アクリジニウム-標識された組み換え抗原に結合した。その後、微粒子/免疫複合体は、磁石を用いて反応容器の側面に捕捉され、水/洗剤混合物で洗浄した。次いで、粒子を容器の壁から離れさせ、希釈剤に懸濁させ、4分間インキュベートした。インキュベーションの後、第2の洗浄工程を行い、最後に、アクリジニウムの活性化および光出力の同時測定を行い、光出力は、

50

微粒子に結合した複合体の量に比例していた。

【0158】

ビオチン-捕捉イムノアッセイ。Architect分析機でのビオチン捕捉が介在するイムノアッセイは、ビオチン化されたNS3タンパク質（例えば、実施例2から6に記載されるようなNbtまたはCbt、または非部位特異的な様式でビオチンが化学的手段によってカップリングしたNS3タンパク質）およびビオチン捕捉タンパク質（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、または抗-ビオチン抗体）コーティングされた磁気粒子を使用した。このフォーマットでは、サンプル中に存在するNS3抗体とビオチン-NS3との間に作られる免疫複合体は、微粒子表面に固定されたビオチン捕捉タンパク質を介して微粒子表面に捕捉された。アクリジン化されたNS3組み換え抗原からなる複合体を、第1の工程または第2の工程に加え（即ち、捕捉工程の後）、捕捉された抗-NS3を検出してもよい。または、抗-ヒト抗体アクリジニウム複合体を第2の工程に加え、捕捉された抗-NS3を検出することができる。

10

【0159】

[実施例10]：イムノアッセイフォーマット

以下のヒト標本を使用した。

【0160】

ネガティブコントロールサンプルは、再石灰化された非反応性ヒト血漿（HBsAgについて非反応性、抗-HCV、HIV-1 RNAまたはHIV-1 Ag、抗-HIV-1/HIV-2および抗-HTLV-I/HTLV-IIについてネガティブ）である。

20

【0161】

「パネルB」として知られるポジティブコントロールサンプルは、Chiron RIBA HCV 3.0 SIA（2+またはより大きなc33バンド強度および他のバンドについて非反応性）によって決定される場合、単一の抗-HCVマーカーについて反応性のヒトの再石灰化されたヒト血漿サンプルである。このパネルを、二ナトリウム-EDTAおよびナトリウムアジドを含む再石灰化された非反応性ヒト血漿（HBsAgについて非反応性、抗-HCV、HIV-1 RNA、またはHIV-1 Ag、抗-HIV-1/HIV-2および抗-HTLV-I/HTLV-IIについてネガティブ）で希釈する。

30

【0162】

血液サンプル：市販のヒト血液サンプルのパネル（セロコンバージョンパネルと呼ばれる。）をSeraCare（Gaithersburg, MD）およびZeptomatrix（Franklin, MA）から得た。セロコンバージョンパネルは、初期の出血日においてHCV抗体にネガティブであるが、後の出血日には抗体に反応性の個人から得た順次希釈の血液サンプルからなる。セロコンバージョンパネルを利用し、種々の抗体試験および抗原/抗体試験の感度を決定した。感度の高い試験は、感度の低い試験よりも初期にHCVへの曝露を検出する。

【0163】

コア抗原標本ST5 1:10は、HCV RNAポジティブであり、HCV抗体ネガティブであり、二ナトリウム-EDTAおよびナトリウムアジドを含む再石灰化された非反応性のヒト血漿（HBsAgについて非反応性、抗-HCV、HIV-1 RNAまたはHIV-1 Ag、抗-HIV-1/HIV-2および抗-HTLV-I/HTLV-IIについてネガティブ）で1:10に希釈したヒト血漿である。

40

【0164】

CALは、HCVコア、NS3およびNS4に対する抗体に反応性であり、二ナトリウム-EDTAおよびナトリウムアジドを含む再石灰化された非反応性ヒト血漿（HBsAgについて非反応性、抗-HCV、HIV-1 RNAまたはHIV-1 Ag、抗-HIV-1/HIV-2および抗-HTLV-I/HTLV-IIについてネガティブ）で希釈した、再石灰化されたヒト血漿である。

50

## 【 0 1 6 5 】

[ 実施例 1 1 ] : H C V 抗原 / 抗体 ( コンボ ) アッセイフォーマット

本明細書には、Abbott Laboratoriesで開発されたARCHITECTイムノアッセイプラットフォームでの1回の反応でC型肝炎(HCV)のコア抗原および抗体を検出する方法が記載される。原型となる化学発光イムノアッセイは、血清および血漿中のHCVに対するHCVコア抗原および抗体(抗-HCV)を同時に検出するために開発された。この原型の組み合わせアッセイは、ARCHITECT装置プラットフォームでの2工程(18' / 4')、3瓶のアッセイである。HCVコンボ試験は、HCVに感染した個人の血液中に存在し得るHCVコア抗原の検出に加え、HCVのコア、NS3およびNS4タンパク質に対するヒト抗体を検出する。

10

## 【 0 1 6 6 】

第1の工程では、この装置は、110 u lの標本と、瓶1からの50 u lの反応混合物と、瓶2からの50 u lのストレプトアビジン/ニュートラアビジンまたは抗-ビオチン常磁性微粒子を、微粒子希釈剤を含む洗剤(20 mM MES、pH 6.6、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、13.6% スクロース、0.1% Nipasept、0.0005% Quinolone、5 mM DTT & 5 mM グルタチオンを含み、24.3 mM SB3-14(N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート)で希釈したものを分注する。瓶1は、ビオチンおよびアクリジニウム標識されたHCV特異的な試薬(ペプチド、タンパク質、抗体および種々の洗剤およびバッファー)の混合物を含み、血清または血漿中に存在するHCV抗体または抗原との免疫複合体生成を可能にする。具体的には、瓶1は、以下を含む。80 mM ビス-トリス、pH 6.3、0.92 M NaCl、8% スクロース、1.7% Dextran 2000、3% BSA、0.3% Triton X100、0.04% メチルセルロース、7 mM EDTA、0.04% ナトリウムアジド)中の、アクリジン化されたコアペプチド5(aa 15-68<sup>34</sup>48)、ビオチン化されたコアペプチド5(aa 15-68<sup>34</sup>48)、アクリジン化されたNS3組み換え抗原(9NB49HまたはNS3h)、ビオチン化されたNS3組み換え抗原(9NB49H-CbtまたはNS3h-Cbt)、アクリジン化されたNS4ペプチドaa 1694-1735、ビオチン化されたNS4ペプチドaa 1694-1735およびビオチン化されたc11-7モノクローナル抗体。従って、この反応の第1の工程は、110 u lの標本と、50 u lの瓶1からの反応混合物と、50 u lの瓶2からのストレプトアビジン/ニュートラアビジン/抗-ビオチン微粒子を含み、18分間延長し、種々の免疫複合体の生成を可能にする。

20

30

## 【 0 1 6 7 】

抗体検出アッセイの第1の工程は、以下のように記載される。具体的には、抗-コア検出について、1つのビオチン標識されたコアペプチドおよび1つのアクリジニウム標識されたコアペプチドが反応混合物中に存在することが必要であり、標本中に存在する抗-コア抗体によって結合することができる。次いで、この免疫複合体は、ビオチンが結合するタンパク質でコーティングされた固相に結合し、この場合はニュートラアビジンであるが、または、ストレプトアビジンまたは抗-ビオチンであってもよい。抗-NS3反応のための工程は、1つのビオチン標識されたNS3タンパク質と、1つのアクリジニウム標識されたNS3タンパク質が反応混合物中に存在する必要がある、標本中に存在する抗-NS3抗体によって結合することができる。抗-NS4と同様に、1つのビオチン標識されたNS4ペプチドおよび1つのアクリジニウムNS4標識されたペプチドが反応混合物中に存在する必要がある、標本中に存在する抗-NS4抗体によって結合することができる。

40

## 【 0 1 6 8 】

抗原検出アッセイの第1の工程は、以下のように記載される。コア抗原検出反応の場合、血清または血漿中のHCVコア抗原に結合することができるビオチン標識されたモノクローナル抗体(Mab c11-7)は、1つ目の反応中に存在する(瓶1)。次いで、この免疫複合体は、これもビオチン部分を介し、固相に結合する。

50

## 【0169】

抗体および抗原の反応の第2の工程は、以下のとおりである。18分のインキュベーション工程の後、微粒子を洗浄し、混合物から結合していない反応剤を除去する。次いで、微粒子を、種々の洗剤およびタンパク質(80mM Bis トリス、pH6.3、0.924M NaCl、3.0% スクロース、5.0% ソルビトール、7mM EDTA、1.7% Dextran 2000、0.8% PVSA(25%溶液)、3.0% BSA、0.02% 塩化ベンゼトニウム、55,000単位/L ヘパリンナトリウム、0.2% フッ化ナトリウム、0.3% Triton X-100、0.3% グリシン、0.2% SB3-12、0.4% SB3-16、0.2% SB3-18、0.15% CHAPS、0.2% サポニン、0.35% CTAB、0.02% TTAB、0.1% ナトリウムアジド、0.1% Nipasept、1% A56620、0.04% メチルセルロース)を含む緩衝化した溶液で希釈した瓶3からの複合体\*Ac-DBA c11-9/c11-14複合体と共にインキュベートする。この工程では、固相の上の任意の免疫複合体化したコア抗原が接合するだろう。第2の工程の4分のインキュベーションの後、微粒子は、標識された免疫複合体そのものと競争し、これを再び洗浄し、磁石によって未反応の要素から分離する。次いで、反応の引き金を引き、免疫複合体を介して固相に結合したアクリジニウム-標識された複合体から発生する化学発光シグナルを読み取り、この量は、試験されるサンプル中に存在した検体の量と比例している。

10

## 【0170】

[実施例12]: コアペプチドの設計

HCV感染の検出は、抗体検出のための複数のHCVタンパク質の使用を必要とする(HCVコア、NS3およびある場合には、NS4およびNS5ペプチドまたはタンパク質を含む)。HCVコア抗原の検出は、HCVコア抗原に結合する抗体の使用を必要とし、このような抗体は、HCVコンボ試験の抗体側で利用されるHCVコアタンパク質に結合してもよい。研究者は、HCVコア抗原を捕捉するために利用されるもの(このアッセイではC-11-7)およびシグナルを発生するために利用されるもの(C11-9/C11-14)の両方について、コア抗原試験で使用される抗体によって標的とされるHCVコア抗原についてのアミノ酸配列を特定している。抗体によって認識されるそれぞれの部位について、この認識部位を含むアミノ酸は、アミノ酸の置換またはアミノ酸の欠失によって改変されていなければならない。

20

30

## 【0171】

改変されたコアペプチドは、5アミノ酸(アミノ酸残基32から34および47から48)をコアタンパク質から除去することによって作られ、従って、ARCHITECT HCVコア抗原試験で使用される2つのモノクローナル(C11-14およびC11-9)による認識を避ける。これらの5アミノ酸を除去する望ましくない結果は、コアタンパク質に対するヒト抗体の応答が、これらのアミノ酸がないことによって犠牲となったことである。

## 【0172】

従って、一連のコアペプチドを作成し、コアタンパク質に最小限の改変がなされ得るかどうかを決定し、この結果、最小限改変されたペプチドは、コア抗原試験で利用される抗体によって認識されないが、コアタンパク質に対する抗体の十分な検出を可能にする。これらの改変されたペプチドは、5アミノ酸が欠失したコアペプチドで観察される反応性の消失の一部を回復するように設計された。モノクローナル抗体c11-9(aa 29-37)およびc11-14(aa 45-49)についての既知のエピトープ結合領域での特定の欠失/置換を設計することができ、この複合体による検出がなくなることが仮定された。

40

## 【0173】

コアペプチドの設計は、HCVのコア配列の別個の領域に標的とされたアミノ酸の欠失および/または置換を含み、これによって、これらの欠失/置換は、HCVコンボアッセ

50

イでのコア A g の検出のために使用される \* A c - D B A c 1 1 - 9 / c 1 1 - 1 4 複合体による検出をうまく回避する。

【 0 1 7 4 】

【 表 3 】

表 3

合成された新規HCVコアペプチド アミノ酸15から68	
ペプチド 1:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号97)
ペプチド 2:	TNRRPQDVKFPGGGQIV---YLLPRRGPRLGV--TRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号98)
ペプチド 3:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGG-YLLPRRGPRLGV--TRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号99)
ペプチド 4:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGG-YLLPRRGPRLGV-ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号100)
ペプチド 5:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGG-YLLPRRGPRLGVR-TRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号101)
ペプチド 6:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGG-YLLPRRGPRLGVIATRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号102)
ペプチド 7:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGGGYLLPRRGPRLGV--TRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号103)
ペプチド 8:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGGGYLLPRRGPRLGV-ATRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号104)
ペプチド 9:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGGGYLLPRRGPRLGVR-TRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号105)
ペプチド 10:	TNRRPQDVKFPGGGQIVGGGYLLPRRGPRLGVIATRKTSEERSQPRGRRQPIPKA (配列番号106)

10

【 0 1 7 5 】

それぞれの新しく合成されたコアペプチドで、ニュートラアビジン常磁性微粒子をコーティングし、\* A c - D B A c 1 1 - 9 / c 1 1 - 1 4 複合体でプローブ化した。以下に示すように(表4)、ペプチド1(アミノ酸15から68のインタクトな配列)は、\* A c - D B A c 1 1 - 9 / c 1 1 - 1 4 複合体と反応するとき、高いシグナルノイズ(S/N)値を与える。注釈:ネガティブコントロールは、任意のHCVコアエピトープ認識分子を固相または液相のいずれかに含まない微粒子を含む。これらのネガティブコントロールは、低いS/N(シグナルノイズ)値を生じる。ポジティブコントロール(6C37コーティングされた微粒子)は、HCV組み換えタンパク質(HCVコアタンパク質のアミノ酸1から150を含む。)を含み、\* A c - D B A c 1 1 - 9 / c 1 1 - 1 4 複合体による認識に起因して、高いS/N値を生じる。

20

【 0 1 7 6 】

【表 4】

*Ac-c11-9/c11-14 接合体による検出													
S/N まとめ	ネガティブコントロール		HCV コアペプチド										
	ニュートロラビジン	BSA parts	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
サンプル			S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	
Architect 洗浄バス フアアー	1.0	1.1	18465.9	15176.8	1.6	0.5	10.0	1.1	2456.3	1695.2	2697.6	2666.0	10030.5

表 4

【 0 1 7 7 】

上のペプチド1は、HCVコアタンパク質に対する抗体を検出するためにすでに使用されたアミノ酸15から68のインタクトなアミノ酸配列を表す。上のペプチド2は、合計

10

20

30

40

50

で5アミノ酸が欠失しており、これらのアミノ酸のうち3つ(32、33および34)は、C11-9モノクローナル抗体についてのエピトープ認識部位の一部を表し、これらのアミノ酸のうち2つ(47および48)は、C11-14モノクローナル抗体についてのエピトープ認識部位を表す。ペプチド1のシグナルは、HCVコア複合体\*Ac-DBAc11-9/c11-14によって認識されるため、大きい。ペプチド4および6から10についてのS/N値は、S/N値>3.0であり、コア複合体によっても認識されるため、HCV組み合わせアッセイでの使用の候補ではない。ペプチド2、3および5についてのS/N値は、非常に低く、ネガティブコントロールについて示されるS/N比と類似しており、従って、HCVコア抗原複合体によって認識されず、これによって、HCVコンボ試験に有用な設計を作成する。

10

【0178】

【表5】

表5. ヒト標本を用いた、コアペプチド2、3および5の免疫反応性

間接的な抗-ヒトアッセイ-S/Nまとめ								
	ネガティブコントロール		ポジティブコントロール	HCV コアペプチド				
	ニュートラビジン	BSA uparts	6C37 uparts	1	2	3	4	5
サンプル	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
CAL	2.5	2.9	205.3	24.4	9.5	21.4	15.2	13.1

20

【0179】

表5で上に示されるように、ペプチド2、3および5は、すべて、間接的なアッセイフォーマットで抗-HCVに反応性のヒト標本を用いると、免疫反応性を示す。HCVに対する抗体を含むヒトサンプルについてのS/N値は、ペプチド2でみられるよりも、ペプチド3および5でわずかに高いが、ペプチド5は、これらの2つのペプチドの中で最小の欠失を含む(aaの34および48のみが欠失している。)ため、ペプチド5は、HCVコンボ開発のために選択するペプチドとして選択された。従って、ペプチド5は、\*Ac-DBAc11-9/c11-14複合体による検出をうまく回避し、HCVに感染したヒト標本に免疫反応性であり、HCVコンボのための候補ペプチドであると考えられた。

30

【0180】

[実施例13]:モノクローナル抗体

HCVコンボ試験は、3つのモノクローナル抗体(C11-7、C11-14およびC11-9)を利用する。このモノクローナル抗体のうち2つ(C11-7、C11-14)は、Abbottの米国特許「Methods for the simultaneous detection of HCV Antigens and HCV antibodies」にすでに記載されている。2004年4月27日に登録されたShah et al.による米国特許第6,727,092号。しかし、これらの2つのモノクローナル抗体の元々の開示は、2003年9月23日に登録されたAoyagi et al.の米国特許第6,623,921号に引用された。第3のモノクローナル抗体は、刊行物に開示された(Morota et al., J. Virol. Meth 157:8(2009), Muerhoff et al.によって特許出願第20120009196号で議論されている(公開日2012-01-12)。

40

【0181】

[実施例14]:微粒子の調製

HCVコンボアッセイは、ビオチン-標識されたタンパク質(ストレプトアビジン、ニュートラアビジンおよび抗-ビオチン)を捕捉することができる1種類の磁気微粒子を使用する。簡単に言うと、Dynal M270カルボン酸の元々の粒子を、MES-Chapsバッファー、pH5.5(25mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(

50

MES)、0.1% 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート(Chaps))で2回交換して洗浄する。粒子を、0.25 mg/mLのEDAC(N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)で、固形分1%で30分間、あらかじめ活性化する。粒子を、MES-Chapsバッファー(pH 5.5)を1回交換して洗浄する。ニュートラアビジン/ストレプトアビジン/抗-ビオチンAbストック溶液を、0.40 mg/mL、固形分1%で粒子に60分間かけて加える。粒子を、PBS-Chapsバッファー、pH 7.2(リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、0.1% Chaps)を3回交換して洗浄する。最終的な粒子濃度は、PBS-Chapsバッファー(pH 7.2)中、固形分1%である。その後、これらの微粒子を、微粒子希釈剤(20 mM MES、pH 6.6、0.15 M NaCl、5 mM EDTA、13.6% スクロース、0.1% Nipasept、0.005% Quinolone、5 mM DTTおよび1.54 g/L グルタチオンと、24 mM SB3-14(N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート)を含む。)で、固形分が0.075%になるまで希釈する。

【0182】

[実施例15]: HCVコアペプチド

合成ペプチドをAnaSpec(Fremont, CA)によって製造した。純度>95%。

【0183】

1.

【化1】

Biotin-TNRRPQDVKFPGGGQIVGGYLLPRRGPRLGVRTRKTSERSQPRGRRQPIPKA

(配列番号101)

2. アクリジン化された標識されたHCVコアペプチド5を、アッセイのための複合体として使用し、以下のように表される。

【0184】

【化2】

TNRRPQDVKFPGGGQIVGGYLLPRRGPRLGVRTRKTSERSQPRGRRQPIPKA

(配列番号101)

コアペプチド5のアクリジン化工程を実施例18に記載する。

【0185】

[実施例16]: NS4ペプチド(アミノ酸1694から1735)

これらの合成ペプチドをAnaSpec(Fremont, CA)によって製造した。純度>95%。

【0186】

HCVコンボ試験は、2つの形態でHCV NS4ペプチドを利用した。

【0187】

1. ビオチン化されたNS4ペプチドは、以下のようにストレプトアビジンでコーティングされた微粒子に捕捉された。

【0188】

【化3】

Biotin-IIPDREVLVYREFDEMEECSQHLPYIEQGMMMLAEQFKQKALGL

(配列番号107)

2. アクリジン化された標識されたNS4ペプチドを、アッセイのための複合体として使用し、以下のように表される。

【0189】

【化4】

Acridinium-IIPDREVLVYREFDEMEECSQHLPYIEQGMMMLAEQFKQKALGLC

10

20

30

40

50

## (配列番号108)

NS4のアクリジン化工程を実施例17に記載する。

## 【0190】

[実施例17]: Acr-BSA-NS4ペプチド複合体の調製

13ミリグラム(2.0mL、0.196 $\mu$ mol、1.0mol当量)のAcr-BSA-Malの0.1M PBS/0.1% CHAPS/5mM EDTA(pH6.7)(実施例2から)をポリプロピレン管に加えた。この溶液に、0.100mL(4.02mg、0.784 $\mu$ mol、4.0mol当量)のC末端システインNS4ペプチド(AnaSpec、Fremont、CA)のジメチルスルホキシド(DMSO、Sigma Aldrich、St Louis、MO)の新しい41mg/mL溶液を加えた。反応バイアルに封をし、溶液を泡立たせることなく簡単にボルテックスで攪拌し、暗室中、室温で一晩インキュベートした。次に、未精製複合体を0.25MメルカプトエチルアミンHCl(MEA)水溶液で、最終的に1.14mM MEA反応濃度になるまで約30分間処理し、未反応のマレイミド基をクエンチした。複合体を、TosoHaas G3000SWカラム(Tosoh Bioscience LLC、King of Prussia、PA)で0.01M PBS/0.1% CHAPS(pH6.3)を用い、SECクロマトグラフィーによってすぐに精製した。主要な複合体ピークに対応するフラクションを保存した。複合体の保存物の吸光度を280nmおよび370nmで測定し、これを使用し、補正した280nm吸光値を決定した。複合体を使用中に-20で保存した。

10

20

## 【0191】

[実施例18]: Acr-BSA-コアペプチド複合体の調製

6ミリグラム(1.01mL、90nmol、1.0mol当量)のAcr-BSAの0.1M PBS/0.1% CHAPS(pH6.3)(実施例1から)をポリプロピレン管に加えた。この溶液に、0.431mL(4.31mg、22.5 $\mu$ mol、250mol当量)の新しい10mg/mLの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(EDAC)水溶液および0.259mL(2.58mg、22.5 $\mu$ mol、250mol当量)の新しい10mg/mLのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)水溶液を加えた。混合物を穏やかにボルテックスで攪拌し、次いで、暗室中、室温で10分間、静かに反応させた。この活性化されたAcr-BSA複合体溶液に、4.4mg(0.881mL、0.72 $\mu$ mol、8mol当量)の新しい5.0mg/mLのコアペプチド(AnaSpec、Fremont、CA)の0.01M PBS溶液(pH7.2)を加えた。この溶液を穏やかにボルテックスで攪拌し、暗室中、室温で一晩反応させた。SECクロマトグラフィーによって、TosoHaas G3000SWx1カラム(Tosoh Bioscience LLC、King of Prussia、PA)で、0.01M PBS/0.1% CHAPS(pH6.3)を用いて複合体を精製し、凝集物を除去した。主要な複合体ピークに対応するフラクションを保存した。Acr-BSA-NS4ペプチド複合体の保存物の吸光度を280nmおよび370nmで測定し、これを使用し、補正した280nm吸光値を決定した。複合体を使用中に-20で保存した。

30

40

## 【0192】

[実施例19]: ビオチン化されたC11-7モノクローナル抗体の調製

13ミリグラム(1.0mL、86.6nmol、1.0mol当量)のC11-7モノクローナル抗体(mAb)の0.01M PBS(pH7.2)の13.1mg/mLの溶液を、0.916mLの0.01M PBS(pH7.2)バッファの入った褐色ガラスバイアルに加えた。この溶液に、0.144mLの0.133Mホスフェート/0.376M NaCl/7.5% CHAPS(pH8.0)を加え、反応物のpHを7.4から7.5に調節し、混合物を泡立たせることなく5分間攪拌した。この攪拌したC11-7 mAb溶液に、0.350mg(0.100mL、433nmol、5.0mol当量)のChromalinkビオチン(CLB、SoluLink、San

50

Diego, CA)の無水ジメチルホルムアミド(DMF、Sigma Aldrich、St Louis, MO)の5.71 mg/mLの溶液を加えた。この混合物を30分間攪拌し、次いで、暗室中、室温で静かに一晚反応させた。未精製複合体混合物は、合格であった。反応混合物を脱塩し、0.01 M PBS / 0.1% CHAPS (pH 7.2)で平衡状態にしたZebaスピンカラム(Pierce, Rockford, ILL)を通すことによって、組み込まれていないCLBピオチンを除去した。溶出したC11-7 mAb-CLB複合体の吸光度を280 nmおよび354 nmで測定し、タンパク質濃度を概算し、抗体分子あたりのピオチンの組み込みを計算した。計算されたタンパク質濃度は、4.03 mg/mLであり、C11-7 mAb分子あたりのピオチンの平均数は、4.12であった。

10

## 【0193】

## [実施例20]: デキストラン-BSAの調製

蒸留水で調製した1.068 mLの過ヨウ素酸ナトリウム(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)の100 mg/mL溶液を、117.48 mgのデキストラン(150,000 MW GPC Grade, Pharmacosmos, Holbaek, Denmark)を2.1 mLの蒸留水に溶解し、暗室中、攪拌しつつ、23 °Cの水浴で120分間インキュベートすることによって調製したデキストラン溶液に加えた。120分が終了したら、150 mM HEPBS (Sigma Chemical, St. Louis, MO)バッファー(pH 8.9)で平衡化した55 mg/mLのBSA(Proliant Biologicals, Boone, IA)溶液6.408 mLを、酸化したデキストラン溶液に加え、暗室中、23 °Cでさらに120分間反応を続けた。インキュベーション終了時に、1.06 gのボラン-ジメチルアミン複合体(97%、Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を、暗室中、23 °Cで60分かけてデキストラン-BSA溶液に加え、その後、1.34 mLの0.65 M トリス-HCl (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) (pH 7.5)バッファーを23 °Cで16から20時間かけて加えた。PBS中、2.6 mL/分で平衡化したHiPrep Sephacryl S300 26/60カラム(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)を用い、得られた溶液を精製した。未精製デキストラン-BSAをカラムに入れ、280 nmで吸光度を監視しつつ、2.6 mL/分で操作した。2.6 mLのフラクションを集め、空のフラクションを保存した。次いで、Amicon Ultra-15遠心分離濃縮機(50,000 MWCO, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA)を用い、この保存されたフラクションを10 mL未満になるまで濃縮した。この濃縮したデキストラン-BSAを、ナトリウムアジドおよびCHAPS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)の溶液で、最終濃度が0.1%ナトリウムアジドおよび0.5%CHAPSになるまで増加させた。この溶液に、45 °Cのオーブンで7日間熱によるストレスを加え、さらなるHiPrep Sephacryl S400カラム精製の前に2から8 °Cで保存した。HiPrep Sephacryl S400 26/60カラム(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)を、2.6 mL/分の流速でPBSを用いて平衡化し、熱によるストレスが加えられたデキストラン-BSAをカラムに入れた。高分子量の凝集物および低分子量の分解生成物を除去するために、フラクションを保存した。

20

30

40

## 【0194】

保存したフラクションを、Amicon Ultra-15遠心分離濃縮機(上述のような)を用いて5 mg/mLより大きくなるまで濃縮し、複合体を調製するために使用されるまで、溶液を2から8 °Cで保存した。

## 【0195】

[実施例21]: C11-9 / C11-14 Dextran-BSA複合体の調製  
リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、1 mM EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、0.2% CHAPS (Sigma C

50

hemical Co., St. Louis, MO)を含む接合バッファー (pH 7.4) 中、6 mgの精製され、熱によるストレスを与えられたデキストラン - BSA溶液 (上述) を1.62 mgのアクリジニウムSPSP (9 - [ [ [ [ 4 - [ 4 - オキソ - 4 - ( 2, 3, 4, 5, 6 - ペンタフルオロフェノキシ) プチル] フェニル] スルホニル] ( 3 - スルホプロピル) アミノ] カルボニル] - 10 - ( 3 - スルホプロピル) と反応させた。暗室中、室温で反応を一晩進めた。一晩の反応が終了したら、2.7 mgのスルホスクシンイミジル - 4 - ( N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート ( sSMCC, Thermo - Fisher Scientific, Rockford, IL) を、SPSP - デキストラン - BSA溶液に加え、暗室中、室温で60分間インキュベーションを続けた。ゲル濾過によって、リン酸ナトリウム、NaCl、1mM EDTA、0.5% CHAPSを含むバッファー (pH 6.0) で平衡化したカラムを用い、未反応のSPSPおよびsSMCCを除去した。最終的な溶液を、Amicon Ultra - 4遠心分離濃縮機 (30, 000 MWCO) を用い、10 mg/mLより大きくなるまで濃縮し、280 nmおよび370 nmでの吸光度を決定した。

10

## 【0196】

リン酸ナトリウム、NaCl、1mM EDTAを含む接合バッファー (pH 6.0) 中、8.76 mgのC11 - 9 : C11 - 14 F ( a b ' ) 2フラグメントの2.5 : 1 ( mg : mg ) 混合物を水浴中、37 で平衡化した。EDTAを含むpH 6.0のリン酸ナトリウムバッファーで調製した0.39 mLのシステアミンHCl (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO) 120 mM溶液を、温度を平衡化した抗体フラグメントに加え、37 で90分間インキュベートした。フラグメントを還元した後、過剰なシステアミンHClを、リン酸ナトリウム、NaCl、1mM EDTA、0.5% CHAPSを含むバッファー (pH 6.0) で平衡化したカラムを用いたゲル濾過によって除去し、Amicon Ultra - 4遠心分離濃縮機 (10, 000 MWCO) を用い、溶液を8 mg/mLより大きくなるまで濃縮した。5 mg/mLのSPSPおよびsSMCC標識されたデキストラン - BSAおよび4 mg/mLの還元したフラグメントを含む最終的な接合反応物を、リン酸ナトリウム、NaCl、1mM EDTA、0.5% CHAPS、pH 6.0バッファー中、暗室中、2から8 で16から24時間インキュベートした。

20

## 【0197】

任意の未反応のマレイミド基を過剰なシステアミンHClで保護した後、0.1% CHAPSを含むPBS (pH 6.3) で平衡化したHiPrep Sephacryl S400カラム (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) を用い、未精製接合反応物を精製した。高分子量材料および任意の結合していない抗体フラグメントを除去するために、主要な複合体ピークからフラクションを保存した。複合体の濃度を、抗体フラグメントの量として表し、SPSPおよびsSMCC標識されたデキストラン - BSAの吸光度と比較して、280 nmおよび370 nmでの複合体の吸光度を用いて決定した。

30

## 【0198】

[ 実施例 22 ] : アッセイ希釈配合物

40

HCVコンボフォーマット中でコア抗原を検出することができるようにするために、コアプシドタンパク質の曝露が必要である。この曝露は、外側の環の瓶 ( 瓶 1 ) または中側の環の瓶 ( 瓶 2 ) のいずれかに存在する洗剤の使用を必要とし、この洗剤は、非イオン性の分類であってもよく、および/またはアミンを含むアルキル鎖基を含んでいてもよい ( Aoyagi et al., G01N 33/576, WO00/07023, 2000年2月10日)。

## 【0199】

HCVコア抗原を検出するために必要な洗剤は、抗体がHCVコンボアッセイに利用されるNS3タンパク質に結合する能力に対し、負の影響を有する。この抗 - NS3シグナルの消失は、再現可能であり、NS3に対する抗体を含むが、他のHCVタンパク質を含

50

まない抗 - NS3「のみ」のサンプルを用い、アッセイ開発工程中に監視された。本願発明者らの試験で利用されるサンプルは、パネルBと呼ばれ、反応性の高いサンプルを、NS3に対する抗体にネガティブな正常なヒト血漿で希釈することによって調製される。パネルBは、中程度の反応性を含むように希釈され、イムノアッセイによって患者サンプル中のNS3に対する抗体を検出する能力のための代用マーカーとして働く。抗 - NS3反応性を監視する際に、相対的な反応性を示すためにシグナルノイズ(S/N)比を利用し、高いS/Nが望ましい。抗 - HCVアッセイを用いた以前の経験は、実行可能な抗体アッセイが、20より大きなS/N値を与えるべきであることを示している。

【0200】

[実施例23]: HCVコンボアッセイに対する洗剤の効果

10

実施例11に記載されるコンボフォーマット(および本明細書に記載されるコンボアッセイのすべての捕捉試薬)を用い、表6のデータは、抗 - NS3の検出(パネルB)およびHCVコンボアッセイフォーマット中のコア抗原の検出における双性イオン性洗剤スルホベタイン(SB3)のさまざまな炭化水素鎖長の効果を示す。反応物中に洗剤が存在しない場合、パネルBの検出は、高い(S/N=39.6)が、コア抗原の検出は、低い(S/N=3.8)。炭化水素鎖の長さが8(SB3-8)を反応に使用する場合、パネルBおよびコア抗原の検出は、両方とも低い。炭化水素鎖の長さが増えるにつれて(特に12または14)、コア抗原の反応性は高まる。しかし、鎖長が16の場合、コア抗原の検出およびパネルBの反応性が両方とも低下し、パネルBの検出と、コア抗原の検出との適切なバランスを与えるための最適な炭化水素鎖の長さは、12から14のようであることを示唆している。

20

【0201】

表6: HCVコンボアッセイフォーマット(S/N: サンプルr1u/ネガティブ血漿r1uの比率)中の抗 - NS3およびコア抗原の検出における異なる双性イオン性洗剤の効果

【0202】

【表6】

表6:

	コントロール希釈物-洗剤なし	コントロール希釈剤+ SB3-8	コントロール希釈剤+ SB3-10	コントロール希釈剤+ SB3-12	コントロール希釈剤+ SB3-14	コントロール希釈剤+ SB3-16
サンプル	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
パネルB	39.6	9.8	36.9	26.9	26.4	15.2
コア抗原 ST5 1:10	3.8	1.5	4.2	72.1	94.9	62.0

30

【0203】

表7は、さまざまな洗剤の使用およびパネルBの検出およびコア抗原の検出に対するこれらの効果を示す。洗剤を含まないコントロール希釈剤は、パネルBの良好な検出を示す(S/N=63.9)が、コア抗原の検出は、実質的にできなかった(S/N=2.2)。他の洗剤は、パネルBおよびコア抗原の中程度の検出を示す(C7BzO)。最良の検出は、洗剤SB3-14を用いたときにみられ、パネルBおよびコア抗原の検出は、それぞれS/Nが71.7および81.9で最も高い。

40

【0204】

【表 7】

表7:

	コント ロール 希釈物 洗剤なし	コント ロール 希釈剤 +SB3-14	コント ロール 希釈剤 +CHAPS	コント ロール 希釈剤 +C7BzO	コント ロール 希釈剤+ Empigen BB	コント ロール 希釈剤 +TSP16	コント ロール 希釈剤 +ASB-16	コント ロール 希釈剤 +NDSB25 6 スル ホベタ イン	コント ロール 希釈剤 +NDSB20 1 スル ホベタ イン
サンプル	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
パネルB: 抗-NS3	63.9	71.7	46.8	56.4	32.5	58.3	35.2	46.2	26.8
コア抗原 S3ST5 1:10	2.2	81.9	5.1	56.2	40.4	10.3	43.6	1.9	1.8

10

## 【 0 2 0 5 】

試験で使用される洗剤のまとめ：洗剤 S B 3 - 1 4、C H A P S、C 7 B z O ( 3 - ( 4 - ヘブチル) フェニル - 3 - ヒドロキシプロピル) ジメチルアンモニオプロパンスルホネート)、E m p i g e n B B ( E M P I G E N ( R ) B B、S i g m a - A l d r i c h ) および A S B - 1 6 ( アミドスルホベタイン - 1 6 ) は、双性イオン性界面活性剤と分類され、これらは、中性の電荷を有し、分子内に同数の正電荷を有する化学基と負電荷を有する化学基が存在することから得られる。この群の洗剤は、膜タンパク質を可溶化する能力を有する ( S i g m a a l r i c h . c o m )。T S P - 1 6 は、非イオン性界面活性剤に分類され、帯電していない親水性頭部基を含む。スルホベタイン N D S B 2 5 6 ( ジメチルベンジルアンモニウムプロパンスルホネート ; N - フェニル - メチル - N , N - ジメチルアンモニウム - プロパン - スルホネート ) および N D S B 2 0 1 ( 3 - ( 1 - ピリジノ ) - 1 - プロパンスルホネート ) は、洗剤ではないスルホベタインに分類され、凝集を減らすことができ、タンパク質の折りたたみを補助することができる双性イオン性化合物である。凝集してミセルを生成することができないため、これらは洗剤とは考えられない。

20

## 【 0 2 0 6 】

表 8 に示されるのは、微粒子希釈剤 ( 瓶 2、中側の環 ) の中で 0 から 1 0 0 m M の洗剤 S B 3 - 1 4 の滴定である。パネル B およびコア抗原の両方の最適な検出のための S B 3 - 1 4 洗剤の濃度は、2 5 から 7 5 m M であるようであり、許容範囲のパネル B ( S / N > 2 0 ) およびコア A g ( S / N > 2 0 ) の感度を有する。

30

## 【 0 2 0 7 】

【表 8】

表 8:

	コント ロール 希 釈物-洗 剤なし	コント ロール 希 釈剤 +0.1mM SB3-14	コント ロール 希 釈剤 +1mM SB3-14	コント ロール 希 釈剤 +10mM SB3-14	コント ロール 希 釈剤 +25mM SB3-14	コント ロール 希 釈剤 +50mM SB3-14	コント ロール 希 釈剤 +75mM SB3-14	コント ロール 希 釈剤 +100mM SB3-14
サンプル	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
パネルB: 抗-NS3	28.5	32.4	33.9	33.2	27.2	25.1	22.2	8.8
コア抗原 ST5 1:10	4.1	4.5	4.4	8.1	35.8	38.3	43.7	56.8

40

## 【 0 2 0 8 】

【 実施例 2 4 】 : アッセイの性能 - 洗剤の配置

表 9 は、選択したセロコンバージョンパネルに対する H C V コンボアッセイの性能を示し、コア抗原検出に使用される洗剤は、外側の環 ( 瓶 1 ) に配置されるか、または中側の環 ( 瓶 2 ) に配置される。検出される出血の合計数が 1 9 / 2 3 であるとされ、性能はほ

50

ば同じまま維持されている。

【0209】

表9：SB3-14が外側の環の瓶(瓶1)または中側の環の瓶(瓶2)にある場合のHCVコンボアッセイ安定性

【0210】

【表9】

表9

パネル	サンプル	出血日	0からの日数	PCR	RNAコピー/ml(供給業者)	RIBA 3.0	抗-HCV抗体6C37アッセイによるデータ	HCV抗体/抗原組み合わせアッセイ(HCVコンボ)-外側の環の中の洗剤(瓶1)	HCVコンボブレンドCoF-中側の環の中の洗剤(瓶2)
							S/CO	S/CO	S/CO
PHV-912	1	1996年1月6日	0	+	40,000	-	0.23	0.6	0.8
遺伝子型2b/3	2	1996年1月10日	4	+	>500,000	-	0.16	3.4	17.6
	3	1996年1月13日	7	+	40,000	コア	7.91	15.7	18.7
PHV-919	1	1999年12月31日	0	-	BLD	-	0.32	0.8	0.6
	2	2000年1月7日	7	-	BLD	-	0.48	0.7	0.8
遺伝子型1a	3	2000年1月12日	12	-	BLD	-	0.26	0.7	0.5
	4	2000年1月25日	25	+	200,000	-	0.46	2.5	3.3
	5	2000年1月28日	28	+	20,000	コア/NS3	2.76	12.2	13.9
	6	2000年2月1日	32	+	100,000	コア/NS3	13.99	8.8	9.7
	7	2000年2月4日	35	+	100,000	コア/NS3	13.90	5.7	6.0
BCP6214	1	1996年1月13日	0	+	246,000	-	0.12	1.6	2.3
	2	1996年1月15日	2	+	181,000	-	0.12	3.2	7.1
遺伝子型1a	3	1996年1月21日	8	+	241,000	-	0.09	3.9	4.7
	4	1996年1月23日	10	+	186,000	-	0.11	3.1	2.3
	5	1996年1月29日	16	+	290,000	-	0.10	2.1	4.0
	6	1996年1月31日	18	+	177,000	-	0.08	2.2	1.8
	7	1996年2月5日	23	+	312,000	-	0.27	3.0	3.5
	8	1996年2月7日	25	+	408,000	-	0.56	6.5	7.6
	9	1996年2月12日	30	+	290,000	NS3	3.51	3.1	4.6
	10	1996年2月14日	32	+	632,000	NS3	4.44	3.5	4.6

10

20

30

40

50

	11	1996年3月2日	49	+	228,000	NS3/NS4	13.07	1.8	2.7
	12	1996年3月6日	53	+	228,000	NS3/NS4	13.21	2.5	3.9
	13	1996年3月9日	56	+	193,000	NS3/NS4	13.00	4.1	4.7

S/CO: S/CO:カットオフ計算に10NCを使用

S/CO  $\geq$  1.01.0は反応性であると考え

#### 【0211】

[実施例25]:異なる試薬瓶でのSB3-14のアッセイ安定性

10

上述のように、コア抗原の検出に必要な洗剤は、同等の性能を有する外側の環の瓶(瓶1)または中側の環の瓶(瓶2)のいずれかに配置されていてもよい。しかし、62日間の安定性試験は、NS3標本(パネルB)のRLUの保持において、洗剤が、外側の環の瓶に保持されている場合には約67%の低下を示し、一方、洗剤が中側の環の瓶に移動した場合には、RLU保持率の明らかな低下はなかった(表10)。

#### 【0212】

表10:異なる試薬瓶でのSB3-14のアッセイ安定性。試薬が2から8で保存される場合、長期間にわたるNS3パネルのRLU。

#### 【0213】

##### 【表10】

20

表10

	外側の環の瓶中のSB3-14		中側の環の瓶中のSB3-14	
	RLU	%保持率	RLU	%保持率
1日目	157668		157894	
3日目	144312	91.5%	158378	100.3%
8日目	132705	84.2%	157401	99.7%
15日目	103128	65.4%	162609	102.9%
35日目	84415	53.5%	163996	103.8%
62日目	51064	32.4%	161422	102.2%

#### 【0214】

30

[実施例26]:セロコンバージョンパネルに対するHCV組み合わせアッセイの性能合計で9のセロコンバージョンパネルPHV-907、PHV-909、PHV-912、PHV-913、PHV-914、PHV-919(SeraCareから市販されている。)およびBCP6214、BCP6229およびBCP9044(ZepetoMatrixから市販されている。)を、抗-HCVのみのアッセイ(Abbott ARCHITECT LN6C37)およびHCVコンボアッセイ(上述)によって試験した。結果は、S/CO(サンプル/カットオフ)の観点で表され、S/COが1.0以上だと反応性であると考えられる。表11に示されるように、HCVコンボアッセイは、これらのパネルにおいて、抗体のみのアッセイによって検出されるより速く、感染の証拠を検出する(6C37)。以下に示される(表12)のは、最初の一連の出血に対してRNAポジティブであったセロコンバージョンパネルについて、日数単位での平均的なウィンドウピリオドの減少である。HCVコンボアッセイは、抗体のみのアッセイよりも平均で約18.4日速い検出を示し、RNAによって検出されるのとほぼ同等の検出を示した。一連の集合(PHV-919)中にRNAポジティブになった上に示される単一のセロコンバージョンパネルは、RNAと同時にHCVコンボアッセイによる検出を示し、抗体のみのアッセイによる検出より3日速い。

40

#### 【0215】

これらのデータは、HCVへの曝露の検出において、HCV抗原/抗体コンボ試験の値が、抗体のみの試験より速いことを示す。

#### 【0216】

50

【表 1 1】

表 11

パネル	サンプル	出血日	0 からの 日数	PCR	RNA コ ピー/ml (供 給業者)	RIBA 3.0	抗-HCV 抗体 6C37 アッセ イによ るデー タ	HCV 抗体/抗原 組み合わせ アッセイ (HCV コンボ)	
							S/CO	S/CO	
PHV-907	1	1996年4月6日	0	+	> 500,000	-	0.07	14.0	
	2	1996年4月10日	4	+	> 500,000	-	0.06	24.8	
	遺伝子 型 1b	3	1996年4月13日	7	+	> 500,000	-	0.06	14.3
		4	1996年4月19日	13	+	> 500,000	コア	0.46	7.4
	5	1996年4月24日	18	+	> 500,000	コア	2.37	3.1	
	6	1996年4月27日	21	+	> 500,000	コ ア/NS3	2.55	4.1	
	7	1996年9月17日	164	+	40,000	コア, NS3, NS4	12.56	23.3	
PHV-909	1	1996年1月18日	0	+	10,000	-	0.12	8.6	
	遺伝子 型 3	2	1996年2月15日	28	+	40,000	コア	1.37	3.3
		3	1996年2月17日	30	+	20,000	コア	1.13	2.7
PHV-912	1	1996年1月6日	0	+	40,000	-	0.23	0.6	
	遺伝子 型 2b/3	2	1996年1月10日	4	+	> 500,000	-	0.16	3.4
		3	1996年1月13日	7	+	40,000	コア	7.91	15.7
PHV-913	1	1997年2月27日	0	+	> 500,000	-	0.07	13.7	
	2	1997年3月1日	2	+	> 500,000	-	0.23	15.0	
	遺伝子 型 2b	3	1997年3月6日	7	+	> 500,000	コア	2.50	10.9
		4	1997年3月8日	9	+	> 500,000	コア	1.12	6.1
PHV-914	1	1997年4月9日	0	+	> 500,000	-	0.05	7.6	
	2	1997年4月14日	5	+	> 500,000	-	0.05	11.3	
	遺伝子 型 2b	3	1997年4月18日	9	+	> 500,000	-	0.06	7.8
		4	1997年4月21日	12	+	> 500,000	-	0.10	7.7
	5	1997年4月25日	16	+	> 500,000	コア	0.75	4.6	
	6	1997年4月28日	19	+	> 500,000	コア	2.24	6.3	
	7	1997年5月3日	24	+	> 500,000	コア	3.82	3.4	
	8	1997年5月9日	30	+	> 500,000	コ ア/NS3	5.02	7.5	
	9	1997年5月12日	33	+	> 500,000	コ ア/NS3	7.84	13.7	
PHV-919	1	1999年12月31日	0	-	BLD	-	0.32	0.8	
	2	2000年1月7日	7	-	BLD	-	0.48	0.7	
	遺伝子 型 1a	3	2000年1月12日	12	-	BLD	-	0.26	0.7
		4	2000年1月25日	25	+	200,000	-	0.46	2.5
	5	2000年1月28日	28	+	20,000	コ ア/NS3	2.76	12.2	

10

20

30

40

	6	2000年2月1日	32	+	100,000	コア/NS3	13.99	8.8
	7	2000年2月4日	35	+	100,000	コア/NS3	13.90	5.7
BCP 6214	1	1996年1月13日	0	+	246,000	-	0.12	1.6
	2	1996年1月15日	2	+	181,000	-	0.12	3.2
遺伝子 型 1a	3	1996年1月21日	8	+	241,000	-	0.09	3.9
	4	1996年1月23日	10	+	186,000	-	0.11	3.1
	5	1996年1月29日	16	+	290,000	-	0.10	2.1
	6	1996年1月31日	18	+	177,000	-	0.08	2.2
	7	1996年2月5日	23	+	312,000	-	0.27	3.0
	8	1996年2月7日	25	+	408,000	-	0.56	6.5
	9	1996年2月12日	30	+	290,000	NS3	3.51	3.1
	10	1996年2月14日	32	+	632,000	NS3	4.44	3.5
	11	1996年3月2日	49	+	228,000	NS3/NS4	13.07	1.8
	12	1996年3月6日	53	+	228,000	NS3/NS4	13.21	2.5
	13	1996年3月9日	56	+	193,000	NS3/NS4	13.00	4.1
BCP 6229	1	1996年11月14日	0	+	> 5,000,000	-	0.35	31.8
	2	1996年11月17日	3	+	> 5,000,000	-	0.36	30.2
遺伝子 型 1a	3	1996年11月21日	7	+	> 5,000,000	-	0.18	23.8
	4	1996年11月24日	10	+	> 5,000,000	-	0.42	38.3
	5	1996年12月1日	17	+	> 5,000,000	-	1.22	20.9
	6	1996年12月4日	20	+	> 5,000,000	-	1.56	27.5
	7	1996年12月8日	24	+	> 5,000,000	NS3	2.65	17.3
	8	1996年12月12日	28	+	> 5,000,000	NS3	7.02	15.7
BCP 9044	1	1997年4月14日	0	+		-	0.07	26.0
	2	1997年4月18日	4	+		-	0.03	21.9
遺伝子 型 1a	3	1997年5月1日	17	+		-	0.07	30.9
	4	1997年5月5日	21	+		-	0.62	33.4
	5	1997年5月9日	25	+		NS3	3.00	29.9
	6	1997年5月13日	29	+		NS3	5.58	24.9

BLD: 検出限界未満

S/CO: カットオフ計算に 10NC を使用

S/CO  $\geq$  1.0 は反応性であると考え

【 0 2 1 7 】

[ 実施例 2 7 ]

表 1 2 H C V コンボアッセイによるウインドウピリオドの減少。1 回目の出血で検出された H C V R N A を含む H C V セロコンバージョンパネルの H C V A g または A b の検出までの時間 ( 日数 ) 。

【 0 2 1 8 】

10

20

30

40

## 【表 1 2】

表 12

パネル	遺伝子型	検出の1日目:			RNAコンボ差 (日数)	HCVコン ボ-Ab差(日 数)
		RNA	抗-HCVアッ セイ	HCVコンボ アッセイ		
PHV-907	1b	0	18	0	0	18
PHV-909	3	0	28	0	0	28
PHV-912	2b/3	0	7	4	4	3
PHV-913	2b	0	7	0	0	7
PHV-914	2b	0	19	0	0	19
BCP 6214	1a	0	30	0	0	30
BCP 6229	1a	0	17	0	0	17
BCP 9044	1a	0	25	0	0	25
平均ウインドウピリオドの減少					0.5	18.4

HCVコンボによる平均ウインドウピリオドの減少:18.4日

10

## 【 0 2 1 9】

## [ 実施例 2 8 ]

表 1 3 は、任意のフォーマットによって検出されたセロコンバージョン出血の最も高い数が、(潜在的な 2 1 の出血の中で) 検出される出血の合計数が 1 7 であるキャプチャオンザフライ HCV コンボアッセイフォーマットによることを示す。6 C 3 7 抗体のみのアッセイは、1 1 の出血を検出し、一方、Murex HCV コンボ (MIDAS Report, Health Protection Agency - Centre for Infections, Report PER06007, February, 2007) は、9 の出血を検出した。表 1 4 は、表 1 3 に示される両方のセロコンバージョンパネルについての S / C O 情報を示す。さらに、表 1 4 では、S / C O 値は、パネル B について示される (抗 - NS 3 のみのサンプル)。キャプチャオンザフライフォーマットは、より丈夫であり、S / C O が 6 . 1 9 であるのに対し、6 C 3 7 では S / C O が 3 から 4 であり、HCV コンボのためのキャプチャオンザフライフォーマットは、HCV セロコンバージョンパネルの検出に最も適したアッセイフォーマットであることを示している。

20

## 【 0 2 2 0】

表 1 3 : 2 つの鍵となるセロコンバージョンパネルのための異なるアッセイフォーマットの感度の比較

30

## 【 0 2 2 1】

## 【表 1 3】

表 13:

	6C37 抗-HCV のみ のアッセイ	Murex HCV コ ンボアッセイ	キャプチャオンザフライ フォーマットでのHCVコンボ
BCP6212	8	2	9
BCP6213	3	7	8
検出された出 血合計	11	9	17

40

それぞれのセロコンバージョンパネルからの反応性出血の数(カットオフとして 10NC を使用)

## 【 0 2 2 2】

## 【表 1 4】

表 14:S/CO 情報

	RIBA データ	抗-HCV6C37	HCV コンボ	HCV コンボ CotF フォーマット
		S/CO	S/CO	S/CO*
パネル B (抗-NS3)	NS3	3 ~ 4		6.19
BCP6212-1	-	0.07	0.795	1.18
BCP6212-2	-	1.49	0.407	2.36
BCP6212-3	-	2.12	0.417	2.24
BCP6212-4	NS3	6.48	0.499	2.69
BCP6212-5	NS3	7.97	0.489	6.96
BCP6212-6	NS3	8.13	0.529	5.18
BCP6212-7	NS3	8.17	0.509	4.95
BCP6212-8	NS3	11.80	1.071	18.5
BCP6212-9	NS3	12.23	1.245	19.5
BCP6213-1	-	0.09	0.348	0.22
BCP6213-2	-	0.09	0.371	0.22
BCP6213-3	-	0.11	0.470	0.20
BCP6213-4	-	0.09	0.532	0.30
BCP6213-5	-	0.08	0.969	1.27
BCP6213-6	-	0.09	1.110	2.11
BCP6213-7	-	0.09	2.233	3.52
BCP6213-8	-	0.08	5.609	4.69
BCP6213-9	-	0.14	2.608	5.05
BCP6213-10	-	1.47	4.489	10.30
BCP6213-11	コア/NS3	10.48	9.192	12.27
BCP6213-12	コア/NS3	10.30	6.860	6.13

S/CO\*: カットオフ計算に 10NC を使用

## 【 0 2 2 3】

[ 実施例 2 9 ] : 9 N B 4 9 H および N S 3 h のセロコンバージョン感度

H C V に感染した個人からのセロコンバージョンパネルに由来する個人血清サンプルの中で抗体を検出する能力について、N S 3 組み換え抗原 9 N B 4 9 H ( A c r - B S A - 9 N B 4 9 H および 9 N B 4 9 H - C b t ) および N S 3 h ( N S 3 h - C b t および A c r - B S A - N S 3 h ) を、H C V A g / A b コンボフォーマットで試験した。結果は、S / C O ( サンプル / カットオフ ) の観点で表され、S / C O 1 . 0 のサンプルは、反応性であると考えられ、S / C O < 1 . 0 のサンプルは、非反応性であると考えられる。N S 3 h を用いたアッセイは、大きなセロコンバージョン感度が得られ、即ち、9 N B 4 9 H および M u r e x H C V A g / A b コンボを用いたアッセイと比較して、最も高い S / C O 値で最も反応性の出血が検出された。

## 【 0 2 2 4】

10

20

30

【表 15】

表 15:

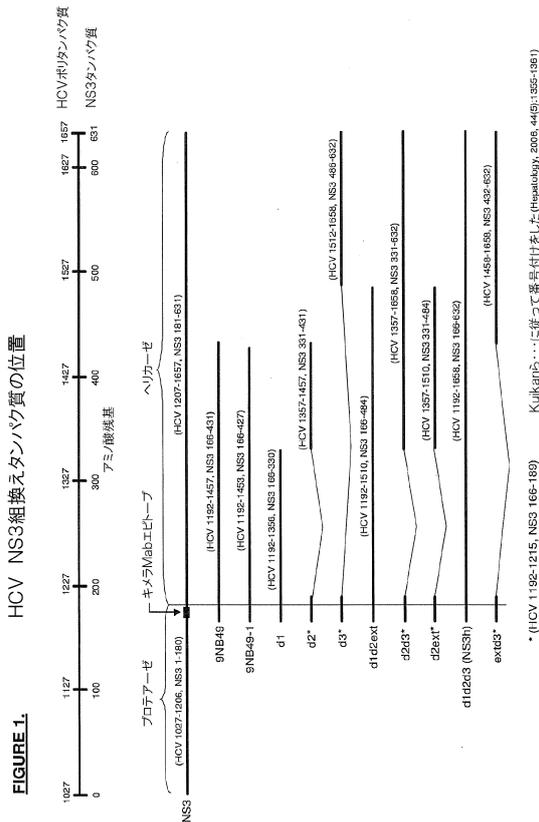
パネル番号	出血日	ARCITECT 抗-HCV S/CO	Murex HCV Ag/Ab コン ボ S/CO	HCV Ag/Ab コン ボ (9NB49H) S/CO	HCV Ag/Ab コン ボ (NS3h) S/CO
6228-1	1996年11月20日	0.03	0.58	nd	0.49
6228-2	1996年11月22日	0.03	0.42	0.19	0.23
6228-3	1996年11月27日	0.04	1.03	0.82	1.06
6228-4	1996年11月29日	0.03	0.58	0.31	0.35
6228-5	1996年12月4日	0.04	0.35	0.13	0.18
6228-6	1996年12月6日	0.03	0.30	0.08	0.11
6228-7	1996年12月11日	0.09	0.49	0.34	0.41
6228-8	1996年12月14日	0.10	0.61	0.42	0.67
6228-9	1996年12月18日	1.37	0.56	nd	3.04
6228-10	1996年12月21日	4.52	1.09	0.29	15.39
6228-11	1996年12月26日	6.62	1.67	0.39	17.01
6228-12	1996年12月28日	7.12	1.53	0.30	17.12

nd:未決定

10

20

【図 1】



**【配列表】**

0006505076000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 デサイ, フーレッシュ・エム  
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
- (72)発明者 グティエレス, ロビン・エイ  
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
- (72)発明者 ミュアー・ホッフ, エイ・スコット  
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
- (72)発明者 プロストコ, ジョン  
アメリカ合衆国、ウィスコンシン・53144、ケノーシャ、トゥエンティシックス・ストリート・5216

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2010-271313(JP, A)  
特開平08-127592(JP, A)  
米国特許出願公開第2010/0297607(US, A1)  
米国特許第07871625(US, B2)  
WAFAA M.EL-EMSHATY、外5名, Diagnostic performance of an immunoassay for simultaneous detection of HCV core antigen and antibodies among haemodialysis patients, Brazilian Journal of Microbiology, 2011年 3月 1日, Vol.42, Page.303-309

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)