

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-521654

(P2017-521654A)

(43) 公表日 平成29年8月3日 (2017. 8. 3)

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

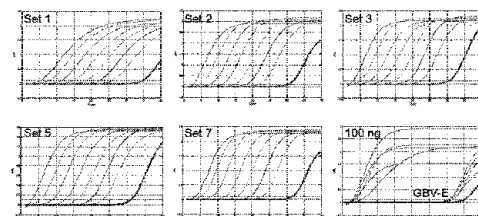
(21) 出願番号	特願2016-575478 (P2016-575478)	(71) 出願人	391008788
(86) (22) 出願日	平成27年6月26日 (2015. 6. 26)		アボット・ラボラトリーズ
(85) 翻訳文提出日	平成29年2月24日 (2017. 2. 24)		ABBOTT LABORATORIES
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/038067		アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
(87) 国際公開番号	W02015/200833		パーク アボット パーク ロード 100
(87) 国際公開日	平成27年12月30日 (2015. 12.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

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

(57) 【要約】

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

FIG. 5A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

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

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

【請求項 2】

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

【請求項 3】

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

【請求項 4】

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

【請求項 5】

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

【請求項 6】

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

【請求項 7】

固体支持体を洗浄するステップをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

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

【請求項 9】

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

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

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

j) H P g V-2 N S 5 Aタンパク質からの少なくとも8個の連続したアミノ酸を含む、第10のアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項10】

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

10

【請求項11】

磁性ビーズをさらに含む、請求項10に記載の組成物。

【請求項12】

前記一部分が少なくとも15アミノ酸の長さである、請求項10に記載の組成物。

【請求項13】

合成核酸分子を含む組成物であって、

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

20

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

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

【請求項14】

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

30

【請求項15】

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

【請求項16】

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

40

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

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

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

50

の相補体；

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【請求項 17】

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

【請求項 18】

合成核酸分子を含む組成物であって、

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

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

【請求項 19】

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

【請求項 20】

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

10

20

30

40

50

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

【請求項21】

ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) 核酸を検出するための方法であって、

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

HPgV-2 のゲノム配列は配列番号1に示されるものであり、

10

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

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

を含む方法。

【請求項22】

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

20

【請求項23】

ヒトペギウイルス2 (HPgV-2) 核酸を検出するための方法であって、

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

HPgV-2 のゲノム配列は配列番号1または75に示されるものであり、

30

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

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

を含む方法。

【請求項24】

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

40

【請求項25】

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

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

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

を含む方法。

50

【請求項 26】

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

【請求項 27】

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

【請求項 28】

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

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【0002】

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

20

【0003】

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

【背景技術】

【0004】

30

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

40

50

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

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

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

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

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

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

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

10

20

30

40

50

77:1723-1726

【非特許文献4】Quanら、PNAS 110:8194-8199、2013

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

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

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

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

10

(発明の要旨)

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

【課題を解決するための手段】

【0010】

20

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

【0011】

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

30

【0012】

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

40

50

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

10

【0013】

20

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

【0014】

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

30

40

50

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

【0015】

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

【0016】

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

【0017】

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

【0018】

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

【0019】

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

。

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

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

10

20

30

40

50

るステップであって、ペプチド（またはH P g V－2抗体に特異的な抗体）は患者抗体に特異的に結合して複合体を形成するステップ、およびb）複合体の存在を検出し、それによって対象における過去または現在のH P g V－2感染の存在を検出するステップを含む方法を提供する。ある特定の実施形態において、ペプチドは、配列番号86－99または100－218、420－429、431－440に示されるペプチド、または1もしくは2個の保存的アミノ酸変化を有し、または1もしくは2個の非保存的アミノ酸変化を有し、または4個もしくはそれを超えるアミノ酸変化を有するこれらのバリエーションの少なくとも一部を含み、またはそれらからなる。ある特定の実施形態において、ペプチドはグリコシル化されている（例えば、E2グリコシル化ペプチド）。

【0026】

他の実施形態において、ペプチドは、配列番号2－11、76－85、86－99、100－218、304－353、420－429または431－440のいずれか1つの一部分に、少なくとも75%の同一性（例えば、少なくとも75%・・・85%・・・95%・・・または99%の同一性）を有し、一部分は、少なくとも10アミノ酸の長さ（例えば、少なくとも10・・・15・・・25・・・30または35アミノ酸の長さ）である。さらなる実施形態において、ペプチドは標識されている。ある特定の実施形態において、ペプチドは標識されており、溶液中で自由に対象抗体に結合して複合体を形成する。ある特定の実施形態において、この複合体は、次いで、ペプチド上の標識によって、標識に結合（例えば、ストレプトアビジン－ビオチン結合）している部分を有する固体支持体に結合する。特定の実施形態において、複合体中で患者抗体に結合することができる2次抗体が添加される。他の実施形態において、ペプチドは標識され、溶液中に含まれずに、1）固相上に提供される非標識ペプチドもしくは他の抗原に次いで結合することができる、抗体不含溶液、2）ビオチン結合性分子（例えば、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン（neutravidin）、ビオチンに対する抗体など）を含む固相に対して次いで複合体形成することができる、ビオチン分子（もしくは他の部分）だけを含む固体溶液中にやはり含まれない非標識のペプチドに次いで結合し得る、溶液中に含まれない抗体、または3）固相上に存在する抗体／ペプチド複合体に結合する。

【0027】

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

【0028】

ある特定の実施形態において、ペプチドは、Sタンパク質、E1タンパク質、E2タンパク質、Xタンパク質、NS2タンパク質、NS3タンパク質、NS4Aタンパク質、NS4Bタンパク質、NS5Aタンパク質およびNS5Bタンパク質からなる群から選択される、H P g V－2の少なくとも一部を含む。一部の実施形態において、Sタンパク質のアミノ酸配列は、配列番号2、76、304、314、324、334もしくは334に示される通りであり、または配列番号2、76、304、314、324、334もしくは344と90－99%のアミノ酸配列同一性を有するバリエーションである。付加的な実

10

20

30

40

50

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

【0029】

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

【0030】

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

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

【0031】

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

【0032】

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

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

【0033】

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

る付加的な構成成分をさらに含む。

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

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

10

20

30

40

50

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

10

20

【0038】

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

30

40

【0039】

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

50

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

10

【0040】

ある特定の実施形態において、本明細書随所に記載する組成物およびキットは、微粒子（例えば、ペプチド上の標識に結合するよう構成される）、ピロリン酸Na（例えば、pH 6.3）、NaCl（例えば、約0.9M）、EDTA、ショ糖、Tergitol 15-S-40、BME、Tergitol 15-S-9、Azide（例えば、0.08%）、Korasilon Antifoam（例えば、1ppm）、Bis-Trisバッファー（例えば、pH 6.3）、ソルビトール、デキストラン、PVSA、BSA、塩化ベンゼトニウム、ヘパリンナトリウム塩、フッ化ナトリウム、Triton X-100、ゲンタマイシン（Gentamycin）、A56620、グリシン、ラウリルスルホベタイン、パルミチルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、C16TAB、C18TAB、CHAPS、サポニン、メチルセルロース、亜硫酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、尿素、HCl、C12TAB、パルミチルスルホベタイン、ステアリルスルホベタイン、マルトース、クエン酸、2-ジエチルアミノエタンチオール、NaHCO₃/Na₂CO₃、ラウリルスルホベタイン、CHAPS、NaOH、MESバッファーw/Triton X-405、NaCl、BSA、Nipasept、キノロン、TRISバッファーw/CKSタンパク質、イーストSOD、Triton X-405、ヤギ血清、EDTA、キノロン、消泡剤、デントラン（Dentrane）硫酸塩、Proclin、硫酸ゲンタマイシン、標識（例えば、アクリジニウム標識）抗ヒトIgGまたはIgMモノクローナル抗体、ストレプトアビジン標識化微粒子、NFDm、SB3-14、PVSA（例えば、0.8%）、ACD、CPDA-1、CPD、CP2D、シュウ酸カリウム、EDTAナトリウム、EDTAカリウムクエン酸ナトリウム、ヘパリン、ヘパリンリチウム、ヘパリンナトリウムおよびクエン酸ナトリウムからなる群から選択される少なくとも1つの試薬をさらに含む。

20

30

【0041】

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

40

50

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

10

【0042】

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

【図面の簡単な説明】

【0043】

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

20

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

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

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

30

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

40

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

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

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

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

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

40

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

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

50

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

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

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

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

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

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

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

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

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

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

し、HPgV-2のNS5Bタンパク質の核酸配列（配列番号302のヌクレオチド7798-9498）を記載する；3）HPgV-2の3'UTRの少なくとも一部分の核酸配列（配列番号302のヌクレオチド9499-9867）を記載する。

【図21A】配列番号303で示され、図1で提供されるUC0125（配列番号1）の伸長バージョンである（例えば、5'UTRが伸長した）、UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号303は、ウラシルをチミンとして示している。

【図21B】配列番号303で示され、実施例1で提供されるUC0125（配列番号1）の伸長バージョンである（例えば、5'UTRが伸長した）、UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号303は、ウラシルをチミンとして示している。

【図21C】配列番号303で示され、実施例1で提供されるUC0125（配列番号1）の伸長バージョンである（例えば、5'UTRが伸長した）、UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物のゲノム核酸配列を提供する図である。HPgV-2ゲノムはプラス鎖RNA配列であることが理解される。配列番号303は、ウラシルをチミンとして示している。

【図22A】UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）5'UTR配列（配列番号303のヌクレオチド1-327）を記載する；2）HPgV-2のSタンパク質のアミノ酸配列（配列番号344）を示し、HPgV-2のSタンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド328-564）を記載する；3）HPgV-2のE1タンパク質のアミノ酸配列（配列番号345）を示し、HPgV-2のE1タンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド565-1137）を記載する；4）HPgV-2のE2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号346）を示し、HPgV-2のE2タンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド1138-2199）を記載する；5）HPgV-2のXタンパク質のアミノ酸配列（配列番号347）を示し、HPgV-2のXタンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド2200-2910）を記載する。

【図22B】UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）HPgV-2のNS2タンパク質のアミノ酸配列（配列番号348）を示し、HPgV-2のNS2タンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド2911-3630）を記載する；2）HPgV-2のNS3タンパク質のアミノ酸配列（配列番号349）を示し、HPgV-2のNS3タンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド3631-5514）を記載する；3）HPgV-2のNS4Aタンパク質のアミノ酸配列（配列番号350）を示し、HPgV-2のNS4Aタンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド5515-5637）を記載する；4）HPgV-2のNS4Bタンパク質のアミノ酸配列（配列番号351）を示し、HPgV-2のNS4Bタンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド5638-6423）を記載する。

【図22C】UC0125. USと呼ばれるHPgV-2単離物由来の種々のタンパク質のアミノ酸配列、ならびに対応する核酸コード配列を示す図である。1）HPgV-2のNS5Aタンパク質のアミノ酸配列（配列番号352）を示し、HPgV-2のNS5Aタンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド6424-7797）を記載する；2）HPgV-2のNS5Bタンパク質のアミノ酸配列（配列番号353）を示し、HPgV-2のNS5Bタンパク質の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド7798-9498）を記載する。および3）HPgV-2の3'UTRの少なくとも一部分の核酸配列（配列番号303のヌクレオチド9499-9867）を記載する。

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

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

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

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

50

【図 23 E E】 H P g V - 2 バリエントである U C 0 1 2 5、A B T 0 0 7 0 P、A R C

50

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

【図24A】HPgV-2 E-E2 発現プラスミドでトランスフェクトした293F細胞の抗Hisウェスタンブロットを示す図である。上清を回収し、濃縮した。細胞を試料バッファー (2×Laemmli 試料バッファー+2-メルカプトエタノール (BioRad、Hercules、CA、USA)) 中で溶解した。試料を4-12% SDS-PAGEゲル上で泳動し、PDVF膜に転写した。Western Breezeキットおよび抗His (C-末端) /アルカリホスファターゼ一次抗体 (Novex by Life Technologies、Carlsbad、CA、USA) を用いてウェスタンブロットを実施した。

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

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

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

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

【図26】異種タンパク質ではなく、同種タンパク質とのスロットブロットにおける免疫反応性のブロックを示す図である。15μlの試料ABT0055Aは、全量が100μlの試料希釈液 (20mM TRIS-HCl、0.5M NaCl、0.3% Tween-20 pH8、5% 脱脂粉乳、10% 熱不活性化新生ウシ血清) 中のPBS、10μgのHPgV-2 E2または10μgのHPgV-1 E2とともに、回転させながら1時間、室温 (25℃) にてインキュベートさせた。試料を1.4mlの試料希釈液で希釈し、次に、ヒトIgG、HPgV-2 E2 (10μgおよび100μg)、ならびにHPgV-1 E2 (10μgおよび100μg) と結合させた、あらかじめ作製したスロットブロットとともにインキュベートした。結合した抗体を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートした抗ヒトIgGで検出した。

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

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

10

20

30

40

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【発明を実施するための形態】

【0044】

定義

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

【0045】

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

【0046】

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

【0047】

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

【0048】

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

【0049】

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

10

20

30

40

50

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

【0050】

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

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

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

10

20

30

40

50

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

【0054】

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

10

【0055】

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

【0056】

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

20

【0057】

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

30

40

【0058】

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

50

洗浄に等しい条件を含む。

【0059】

「中等度のストリンジェンシー条件」は、核酸ハイブリダイゼーションに関して使用される場合、約500ヌクレオチドの長さのプロンプが使用される場合、5×SSPE (NaCl 43.8 g/l、NaH₂PO₄・H₂O 6.9 g/l、およびEDTA 1.85 g/l、pHをNaOHで7.4に調節)、0.5% SDS、5×デンハルト試薬、および100 μg/ml 変性サケ精子DNAからなる溶液中でセ氏42度での結合またはハイブリダイゼーション、引き続きセ氏42度の、1.0×SSPE、1.0% SDSを含む溶液中の洗浄に等しい条件を含む。

【0060】

「低ストリンジェンシー条件」は、約500ヌクレオチドの長さのプロンプが使用される場合、5×SSPE (NaCl 43.8 g/l、NaH₂PO₄・H₂O 6.9 g/l、およびEDTA 1.85 g/l、pHをNaOHで7.4に調節)、0.1% SDS、5×デンハルト試薬 [50×デンハルトは、500mlあたり：Ficoll (タイプ400、Pharmacia) 5g、BSA (Fraction V; Sigma) 5gを含む]、および100 μg/ml 変性サケ精子DNAからなる溶液中でセ氏42度での結合またはハイブリダイゼーション、引き続きセ氏42度の、5×SSPE、1.0% SDSを含む溶液中の洗浄に等しい条件を含む。

【0061】

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

10

20

30

40

50

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

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

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

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

【0065】

本明細書で使用される、「プローブ」の語は、精製された制限消化産物中などに天然に存在しても、または合成的に、組換えで、もしくはPCR増幅によって生成されても、目的の別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、オリゴヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）を意味する。プローブは一本鎖でも、または二本鎖でもよい。プローブは、特定の核酸配列の検出、同定および単離において有用である。ある特定の実施形態において、本発明の方法および組成物において使用されるプローブは、それだけには限定されないが、酵素（例えば、ELISA、および酵素ベースの組織化学的アッセイ）、蛍光、放射性ならびに発光系を含めたあらゆる検出系において検出可能であるように、あらゆる「レポーター分子」で標識されている。方法および組成物は、あらゆる特定の検出系または標識に限定されないものとされる。

10

【0066】

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

【0067】

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

20

【0068】

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

【0069】

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

30

【0070】

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

40

【0071】

詳細な説明

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

50

【0072】

I. ヒトペギウイルス 2

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

【0073】

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

【0074】

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

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

10

【0075】

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

【0076】

【表1】

表16

タンパク質	アミノ酸	ミスマッチ	同一性%
ホリタンパク質	3102	157	94.94
S	124	4	96.77
E1	191	6	96.86
E2	354	24	93.22
X	237	13	94.51
NS2	240	8	96.67
NS3	628	22	96.50
NS4A	41	3	92.68
NS4B	262	10	96.18
NS5A	458	43	90.61
NS5B	567	24	95.77
	3102	157	

20

30

【0077】

I I . 増幅

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

40

【0078】

増幅は、あらゆる適切な試薬（例えば、鋳型核酸（例えば、D N A またはR N A）、プライマー、プローブ、バッファー、複製触媒酵素（例えば、D N A ポリメラーゼ、R N A ポリメラーゼ）、ヌクレオチド、塩（例えば、M g C l₂）など）で行われ得る。いくつかの実施形態において、増幅混合物は、少なくとも1つのプライマーまたはプライマー対

50

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

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

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

【0082】

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

【0083】

III. 核酸検出

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

【0084】

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

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

10

【0085】

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

20

30

40

【0086】

IV. 核酸分析

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

50

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

【0087】

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

【0088】

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

【0089】

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

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

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

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

10

20

【0094】

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

30

40

【0095】

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

50

れによってDNA分子の配列が決定され得る。

【0096】

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

【0097】

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

【0098】

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

10

20

30

40

50

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

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

【0099】

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

10

【0100】

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

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

20

30

【0101】

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

40

【0102】

V. HPgV-2ペプチド

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

50

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

【0103】

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

10

【0104】

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

20

【0105】

【表 2】

表 15

単離物/ ペプチド	タンパク質	アミノ酸配列	配列番号
ペプチド 1	S	GGSCRSPSRVQVARRVLQLSAFLALIGSGMSSIRSKTEGRIESGQ	100
ペプチド 1	S	GGSCRSPSRVQVARRVLQLSAFL	101
ペプチド 1	S	SAFLALIGSGMSSIRSKTEGRIESGQ	102
ペプチド 1	S	ARRVLQLSAFLALIGSGMSS	103
UC0125.US	S	GGSCRSPSRVQVARRVLQLCAFLALIGSGMCSIRSKTEGRIESGQ	104
UC0125.US	S	GGSCRSPSRVQVARRVLQLCAFL	105
UC0125.US	S	CAFLALIGSGMCSIRSKTEGRIESGQ	106
UC0125.US	S	ARRVLQLCAFLALIGSGMCS	107
ABT0070P.US	S	GGSCRSPSRVQVAGRVRLRLCAFLALIGSGMCSIRSKNEGRIESGQ	108
ABT0070P.US	S	GGSCRSPSRVQVAGRVRLRLCAFL	109
ABT0070P.US	S	MCSIRSKNEGRIESGQ	110
ABT0070P.US	S	VAGRVRLRLCAFLALIGSGMC	111
ペプチド 2	S	RDGSLHWSHARHHSVQPDRAAGPPSVTSVERNMGSSTDQT	112
ペプチド 2	S	RDGSLHWSHARHHSVQPDRAAG	113
UC0125.US	S	RDGSLHWCHARHHSVQPDRAAGPPSVTSVERNMGSSTDQT	114
UC0125.US	S	RDGSLHWCHARHHSVQPDRAAG	115
UC0125.US	S	VAAGPPSVTSVERNMGSSTDQT	116
UC0125.US	S	RHHSVQPDRAAGPPSVTSVE	117
ペプチド 3	E2	SMNSDSPFGTFTRNTERSRFSIPRFSPPVKINS	118
ペプチド 3	E2	SMNCDCPFGTFTRNTERSRFSIPRFCPPVKINS	119
UC0125.US	E2	SMNSDSPFGTFTRNTERSRF	120
UC0125.US	E2	SMNCDCPFGTFTRNTERSRF	121
UC0125.US	E2	SRFSIPRFSPPVKINS	122
UC0125.US	E2	FGTFTRNTERSRFSIPR	123
ABT0070P.US	E2	AMNCDCPFGTFTRNTERSGFTIPRFCPPVKLNS	124
ABT0070P.US	E2	AMNCDCPFGTFTRNTERSGF	125
ABT0070P.US	E2	SGFTIPRFCPPVKLNS	126
ABT0070P.US	E2	FGTFTRNTERSGFTIPR	127
ABT0096P.US		AMNCDCPFGTFTRNTERSGFSISIDSVLLKSI	128
UC0125.US	NS3	QAPAVTPTYSEITYYAPTGSKGSTKYPVDLVKQGHKVLVL	129
UC0125.US	NS3	QAPAVTPTYSEITYYAPTGSKGST	130
UC0125.US	NS3	GKSTKYPVDLVKQGHKVLVL	131
UC0125.US	NS3	ITYYAPTGSKGSTKYPVDLVKQG	132
UC0125.US	NS3	VKSMAPYIKETYKIRPEIRAGTGPDGVTVITG	133
UC0125.US	NS3	VKSMAPYIKETYKIRPEI	134
UC0125.US	NS3	PEIRAGTGPDGVTVITG	135
UC0125.US	NS3	IKETYKIRPEIRAGTGPDG	136
ABT0070P.US	NS3	VKSMAPYIKEKYKIRPEIRAGTGPDGVTVITG	137
ABT0070P.US	NS3	VKSMAPYIKEKYKIRPEI	138
ABT0070P.US	NS3	IKEKYKIRPEIRAGTGPDG	139
UC0125.US	NS3	LVDPETNLRGYAVVICDECHDTSSSTLLGIGAVRMYAEKA	140
UC0125.US	NS3	LVDPETNLRGYAVVICDECHDTSS	141
UC0125.US	NS3	TNLRGYAVVICDECHDTSSSTLLGI	142
UC0125.US	NS3	DTSSSTLLGIGAVRMYAEKA	143
UC0125.US	NS3	PETNLRGYAVVISDESHDTSS	144
UC0125.US	NS3	PETNLRGYAVVISD	145
UC0125.US	NS3	VISDESHDTSS	146

10

20

30

40

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

10

20

30

40

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

10

20

【0106】

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

30

【0107】

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

40

【0108】

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

50

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

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

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

ステップに、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）が使用され得る。

【0113】

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

10

【0114】

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

20

30

40

【0115】

VI. 抗体産生およびイムノアッセイ

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

【0116】

50

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

10

【0117】

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

20

【0118】

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

30

【0119】

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

40

【0120】

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

50

【0121】

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

【0122】

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

【0123】

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

【0124】

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

【0125】

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

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

【0126】

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

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

10

【0127】

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

20

【0128】

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

30

40

50

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

【0129】

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

【0130】

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

【0131】

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

【0132】

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

【0133】

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

10

20

30

40

50

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

【0134】

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

【0135】

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

【0136】

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

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

10

【0137】

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

20

30

40

【0138】

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

50

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

10

【0139】

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

【0140】

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

20

【0141】

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

30

【0142】

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

40

【0143】

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

50

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

【0144】

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

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

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

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

【0148】

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

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

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

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

【0152】

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

10

【0153】

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

20

【0154】

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

30

【0155】

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

40

50

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

【0156】

当技術分野では公知である通り、あらゆる適切な検出可能な標識が、あらゆる1つ以上の検出可能な標識として使用され得る。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²pおよび³³pのような）、酵素標識（セイヨウワサビのペルオキシダーゼ、アルカリ性ペルオキシダーゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼなどのような）、化学発光標識（アクリジニウムエステル、チオエステルまたはスルホンアミド；ルミノール、イソルミノール、フェナントリジニウムエステルなどのような）、蛍光標識（フルオレセイン（例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど）のような）、ローダミン、フィコビリタンパク質、R-フィコエリスリン、量子ドット（例えば、硫酸亜鉛でキャッピングしたセレン化カドミウム）、温度測定標識、またはイムノポリメラーゼ連鎖反応標識であってよい。標識の導入、標識手順、および標識の検出は、PolakおよびVan Noorden、Introduction to Immunocytochemistry、第2版、Springer Verlag、N. Y.（1997）、およびMolecular Probes、Inc.、Eugene、Oregonによって発行されたハンドブックおよびカタログが合わさったものである、Haugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals（1996）に見出される。蛍光標識は、FPIA（例えば、その全体を参照により本明細書に組み込む、米国特許第5,593,896号、第5,573,904号、第5,496,925号、第5,359,093号および第5,352,803号を参照されたい。）において使用され得る。アクリジニウム化合物は、均質な化学発光アッセイにおいて検出可能な標識として使用され得る（例えば、Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、16:1324-1328（2006）；Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、4:2313-2317（2004）；Adamczykら、Bioorg. Med. Chem. Lett.、14:39173921（2004）；およびAdamczykら、Org. Lett.、5:3779-3782（2003）を参照されたい。）。 10 20 30

【0157】

例示的なアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキサミドである。アクリジニウム-9-カルボキサミドを調製するための方法は、Mattingly、J. Biolumin. Chemilumin. 6:107-114（1991）；Adamczykら、J. Org. Chem.、63:56365639（1998）；Adamczykら、Tetrahedron 55:10899-10914（1999）；Adamczykら、Org. Lett. 1:779-781（1999）；Adamczykら、Bioconjugate Chem.、11:714-724（2000）；Mattinglyら、Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications；Dyke、K. V. 編集；CRC Press：Boca Raton、pp. 77-105（2002）；Adamczykら、Org. Lett.、5:37793782（2003）；および米国特許第5,468,646号、第5,543,524号および第5,783,699号（各々その全体を参照により、これらに関するその教示に対して本明細書に組み込む）に記載されている。 40

【0158】

10

20

30

40

50

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

【0159】

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

【0160】

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

10

20

30

40

50

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

【0161】

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

【0162】

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

【0163】

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

【0164】

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

【0165】

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

【0166】

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

10

【0167】

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

20

30

【0168】

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

40

50

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

【0169】

抗H P g V－2抗体に対してアッセイされる試験試料を、少なくとも1つの捕捉抗原（例えば、第1の捕捉抗原）と接触させた後、第1の抗原（または複数の抗原）－抗H P g V－2抗体（またはそのフラグメント）複合体の形成を可能にするために、混合物がインキュベートされる。インキュベートは、p H約4.5から約10.0まで、温度約20℃から約45℃まで、および少なくとも約1分から約18時間まで、または約1分から約24分まで、または約4分から約18分までの期間行われ得る。本明細書に記載されるイム

10

【0170】

（第1のまたは複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体複合体の形成後、または形成と同時に、複合体を、次いで、少なくとも1つの検出抗体と接触させる（（第1のまたは複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／第1の抗体検出複合体の形成を可能にする条件下）。少なくとも1つの検出抗体は、イムノアッセイにおいて使用される第2、第3、第4などの抗体であってよい。捕捉抗原／抗H P g V－2抗体複合体を1つを超える検出抗体と接触させる場合、（第1または複数の）捕捉抗原／抗H P g V－2抗体／（複数の）検

20

30

【0171】

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

40

【0172】

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

50

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

【0173】

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

【0174】

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

【0175】

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

【0176】

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

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

10

【0177】

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

20

【0178】

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

30

40

50

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

【0179】

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

10

20

30

40

50

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

10

【0180】

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

20

【0181】

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

30

【0182】

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

40

50

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

【0183】

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

10

【0184】

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

20

【0185】

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

30

40

【0186】

VII. HPgV-2免疫原性組成物

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

50

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

10

【0187】

20

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

【0188】

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

30

40

【0189】

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

50

らゆる都合のよい様式において、例えば、注射、経口投与、吸入、経皮適用または直腸投与によってもよい。経口投与に適する製剤は、(a) 水、食塩水またはPEG 400のような希釈液中に懸濁されている、有効量のパッケージされた核酸のような、液体溶液剤、(b) 各々が、予め決定された量の有効成分を液体、固体、顆粒またはゼラチンとして含む、カプセル剤、サシェ剤または錠剤、(c) 好適な液体中の懸濁剤、および(d) 適切な乳剤から構成されてよい。錠剤形態は、1つ以上のラクトース、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、微結晶性セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、および他の賦形剤、着色剤、充填剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、香味剤、色素、崩壊剤、ならびに製薬上適合性の担体を含むことができる。10
トローチ剤形態は、ショ糖など、香味剤中に有効成分を含むことができ、パステル剤は、有効成分に加えて当技術分野では公知の担体を含む、ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアラビアゴム乳液、ゲルなどのような、不活性な基剤中に有効成分を含む。

【0190】

V I I I . 化合物のスクリーニング

ある特定の実施形態において、本開示のHPgV-2ウイルス、核酸およびタンパク質は、(1) 細胞表面のウイルスの相互作用、例えば、ウイルスの形質導入(例えば、ウイルス細胞受容体の結合もしくは内部移行を阻止する)、(2) ウイルスの複製および遺伝子発現、例えば、ウイルスの複製(例えば、非構造タンパク質の活性、開始点活性、またはプライマー結合を阻害することによる)、ウイルスの転写(プロモーターまたはスプライシングの阻害、非構造タンパク質の阻害)、ウイルスタンパク質の翻訳、タンパク質のプロセッシング(例えば、切断またはリン酸化)、ならびに(3) ウイルスの組立ておよび放出、例えば、ウイルスのパッケージングおよびウイルスの放出を阻害する化合物を含めた、抗ウイルス化合物に対するアッセイに使用される。HPgV-2調節活性を有する化合物を同定するためのアッセイはインビトロで行われてもよい。このようなアッセイは、全長のHPgV-2またはそのバリエーション、またはその変異体、またはそれらのフラグメントを使用することができる。精製された組換えまたは天然に存在するタンパク質が、本発明のインビトロ方法において使用され得る。精製されたHPgV-2に加えて、組換えまたは天然に存在するタンパク質は、細胞可溶化液または細胞膜の一部であり得る。ある特定の実施形態において、結合アッセイは、固体状態または可溶性のいずれかである。ある特定の実施形態において、タンパク質または膜が、共有結合性または非共有結合性のいずれかで、固体支持体に結合している。特定の実施形態において、本発明のインビトロアッセイは、非競合性または競合性いずれかの、基質もしくはリガンド結合性、または親和性アッセイである。他のインビトロアッセイは、タンパク質に対する分光学的な(例えば、蛍光、吸光度、屈折率)、流体力学的(例えば、形状)、クロマトグラフィーの、または可溶性の性質における変化を測定することを含む。20
30

【0191】

ある特定の実施形態において、タンパク質またはそのフラグメントを、潜在的な調節物質と接触させ、適切な量の時間インキュベートする、ハイスループットの結合アッセイが行われる。一実施形態において、潜在的な調節物質が固体支持体に結合しており、タンパク質が添加される。別の実施形態において、タンパク質が固体支持体に結合している。以下に記載する通り、有機小分子、ペプチド、抗体などを含めた、広範囲の調節物質が使用され得る。HPgV-2調節物質の結合を同定するのに、標識化タンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフト、イムノアッセイ、酵素アッセイなどを含めた、広範囲のアッセイが使用され得る。いくつかの場合では、候補の調節物質の結合は、競合的結合アッセイの使用によって決定され、既知のリガンドまたは基質の結合の妨害が、潜在的な調節物質の存在下で測定される。調節物質または既知のリガンドまたは基質のいずれかが最初に結合し、次いで競合物質が添加される。タンパク質が洗浄された後、潜在的な調節物質または既知のリガンドまたは基質いずれかの結合の妨害が決定される。しばしば、潜在的な調節物質または既知のリガンドまたは基質のいずれかが標識される。40
50

【0192】

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

【0193】

IX. キットおよびシステム

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

【0194】

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

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

【0195】

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

【0196】

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

【0197】

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

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

【0198】

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

【0199】

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

【0200】

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

【0201】

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

10

20

30

40

50

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

【0202】

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

【0203】

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

【0204】

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

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

【実施例】

【0205】

[実施例1]

HPgV-2と仮称された新規ウイルスの発見

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

【0206】

ウイルスゲノムからさらなる配列を回収するために、2つのライブラリー法:Illumina TruSeqおよびRubicon Genomics ThruPLEX(Ann Arbor、MI)を使用して、残りのプールされた核酸(N=6試料)からライブラリーを調製した。これらのライブラリーは、Illumina MiSeqを用いてインデックス付けされ、配列決定され、合計1340万の生の対合末端のリードを生じさせた。次に、新規のペギウイルスのゲノムは、(1)1 $\times$ 10⁻⁸のe値カットオフで既存のコンティグへのBLASTn(ヌクレオチド)アラインメントによる重複リードの同定、(2)基準としてのGBV-A(現在、ペギウイルスA、NC_001837)の公開された配列に対する、1 $\times$ 10⁻²のe値カットオフでのBLASTx(翻訳されたヌクレオチド)アラインメントによる追加のリードの同定、および(3)それぞれPRICEアライナー(Rubyら、2013; G3 3:865-880)およびGeneious(Biomatters、Auckland、New Zealand)を用いた、既存のコンティグへの繰返しデノボアセンブリーおよび基準ベースのアセンブリーを用いて再構築された。これは、推定されるペギウイルスゲノムの約60%に及ぶ6つの連続した配列(コンティグ)の生成をもたらした。これらのコンティグを確認し、ブリッジPCR(表18に示されるプライマー)およびサンガー配列決定により得られたアンプリコンの確認を用いてギャップを閉じた。5'末端および3'末端を回収するために、製造業者の指示に従って、cDNA末端の迅速増幅(RACE)手法を実施した(First Choice RLM-RACEキット、Ambion、Foster City、CA)。3'RACEプロトコールは、RACE前にpoly-Aポリメラーゼ(New England Biolabs、Ipswich、MA)を用いて3'末端にポリ(A)テールを追加することを必要とした。最終的な9,778ntのペギウイルスのドラフトゲ

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

【0207】

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

【0208】

【表3】

表18

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

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

10

20

30

40

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

10

20

【0209】

[実施例2]

新規ウイルスH p g V - 2 の確認

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

【0210】

A. 試料の前処理およびRNA抽出

新規ウイルスを独立して検証および確認するために、指標患者（UC0125. USを有する。）から回収された血漿をA b b o t t ラボラトリーで評価した。H P g V - 2 を含む血漿試料（130 μl）を室温で解凍した。試料を室温で5分間、2650 gで回転させ、上清を新しいチューブに移した。試料を37℃で2時間、ベンゾナーゼで前処理し、遊離DNAおよびRNAを分解させた。10×ベンゾナーゼバッファーは以下の通りであった：200 mMのT r i s - C l p H 7. 5および100 mMのN a C l、20 mMのM g C l₂。ベンゾナーゼ反応は以下の通りであった：14 μlの10×ベンゾナーゼバッファー、130 μlの血漿および0. 5 μl（250 U／μlベンゾナーゼ：892 U／ml最終）（S i g m a、E 8 2 6 3 - 2 5 K U）。次に、試料を0. 22 μMスピニフィルター（M i l l i p o r e、U F C 3 0 6 V 0 0）を用いて、2650 gで3分間回転させることにより濾過した。

30

【0211】

Q i a g e n V i r a l M i n i抽出スピンプロトコールをウイルスRNA精製に使用した。あるいは、T o t a l N u c l e i c A c i d p r e pを使用して、A b b o t t m 2 0 0 0で製造元の指示書（ここには記載されない。）に従って試料を処理することができる。このプロトコールは、マイクロ遠心分離器を用いて、140 μlの血漿、血清、尿、細胞培養培地または細胞不含の体液からのウイルスRNAの精製に適している。最大560 μl（140 μlの倍数による。）のより大きな開始容量は、プロトコールで後述するように、最初の容量を比例的に増加させ、Q I A a m p M i n iカラムを複数回充填することにより処理することができる。

40

【0212】

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

50

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

【0213】

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

10

【0214】

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

20

【0215】

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

30

【0216】

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

40

【0217】

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

【0218】

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

50

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

【0219】

10

B. 逆転写

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

【0220】

以下の容量を使用した: 7.6 μ lの試料RNA、1 μ lのランダムヘキサマー (50 ng/ μ l)、0.4 μ lのオリゴdT (50 μ M)、1 μ lのdNTPミックス (10 mM)。これを65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、氷に戻して、10 μ lのマスターミックスを添加した。マスターミックスは以下の通りであった: 2 μ lの10 RTバッファー、4 μ lの25 mM MgCl₂、2 μ lの0.1 M DTT、1 μ lのRNaseOUT (40 U/ μ l)、1 μ lのSuperscript III RT (200 U/ μ l)。25 $^{\circ}$ Cで10分間、次に50 $^{\circ}$ Cで80分間インキュベートする。85 $^{\circ}$ Cで5分間、次に4 $^{\circ}$ Cで終了する。反応液に1 μ lのRNaseH (Invitrogen, Y01220) を添加し、20分間37 $^{\circ}$ Cで、次に4 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。cDNAをアリコートにして2 $\times$ 10 μ lの試料にし、-80 $^{\circ}$ Cで凍結させた。

20

【0221】

C. HPgV-2プライマーの設計と試験

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

30

【0222】

【表 4】

表 1

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

10

20

30

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

10

20

30

40

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

10

20

【0223】

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

30

【0224】

結果

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

40

【0225】

D. 次世代シーケンシングライブラリーPrep

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

50

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

【0226】

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

【0227】

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

【0228】

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

【0229】

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

【0230】

第1鎖cDNA合成－第1鎖cDNA合成試薬（青色）およびヌクレアーゼ不含有水（緑色）を解凍する。A3 ver1を短時間スピンし、氷上に置く。A1 ver4とA2 ver3をボルテックスし、回転させ、氷上に置く。室温でヌクレアーゼ不含有水を放置する。氷上で、0.2 μlのPCRチューブ中に2 μlのA1と5 μlの総RNA試料（500 pgから100 ng）を混合する。プログラム1（65℃－2分間、4℃または65℃－5分間保持、4℃で保持）を実行するサーマルサイクラーにチューブを入れる。サーマルサイクラーが4℃に達したら、チューブを取り外して氷上に置く。第1鎖マスターミックスを準備する。A3酵素をゆっくりとピペティングし、チップを少なくとも5回、バッファーで濯ぐ。

【0231】

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

【0232】

第2鎖cDNA合成－Ovation RNA-SeqシステムV2に付属したAgenccourt（登録商標）RNAClean（登録商標）XPビーズを再懸濁させ、室温で放置して次のステップで使用する。第2鎖cDNA合成試薬（黄色）を解凍する。簡単にB2 ver2を回転させ、氷上に置く。B1 ver3をボルテックスし、回転させ、氷上に置く。第2鎖マスターミックスを調製する。必ずB2酵素をゆっくりとピペティングする。

【0233】

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

【0234】

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

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

【0235】

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

【0236】

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

【0237】

E. cDNA収量およびサイズ範囲の決定

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

【0238】

F. 確認PCR

ライブラリーのウイルス特異的含有を評価するために確認PCRを行う。対象とする領域／遺伝子用のプライマーを選択する（セクションCの表1を参照されたい。）。PCR反応の鋳型として2 μ lのOvation cDNAを使用する。適切な対照を決定し、Applied Biosystems Taq試薬を使用する。2 μ lのcDNA鋳型に、15mMのMgCl₂、0.5 μ lのdNTPミックス、0.5 μ lの10 μ M fwdプライマー、0.5 μ lの10 μ M revプライマー、0.2 μ lのTaq DN

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

【0239】

G. Nextera タグメント化

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

10

【0240】

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

20

【0241】

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

30

【0242】

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

40

【0243】

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

50

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

【0244】

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

10

【0245】

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

【0246】

H. ライブラリー定量化および可視化

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

20

【0247】

I. MiSeq実行のために準備する

MiSeq上でHpgV-2含有ライブラリーを実行するために以下の手順に従った。ステップ1. -20℃の試薬カートリッジ（例えば、300または500サイクルのV2試薬キット；イルミナ、15033625）を指定されたラインに満たされた水容器中で解凍する。HTバッファーをRTでベンチに置く。両方を1時間解凍させ、カートリッジを数回反転させた後、ベンチ上で軽く叩いて、底からいづれの気泡も除去する。試料を希釈／泳動させる準備が整うまで、カートリッジとHT1バッファーを冷蔵庫に入れて置く。4℃の試薬ボックスを室温（バッファーとフローセル）に置く。バッファーを振とう／反転させて、泡を1時間を超えて消散させる。ddH₂Oでフローセルを完全に洗浄して塩を除去し、キムワイプで完全に乾燥する。

30

【0248】

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

40

【0249】

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

【0250】

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

【0251】

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

50

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

【0252】

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

【0253】

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

【0254】

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

【0255】

結果

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

【0256】

[実施例3]

インビトロ H P g V-2 鋳型対照の生成および q P C R アッセイ

この実施例は、H P g V-2 鋳型陽性対照を生成するための方法およびこの鋳型を用いて実行される q P C R アッセイを記載する。H P g V-2 中の NS 2 - NS 3 領域は、q P C R によって検体をプローブするように選択された。本発明者らのNGSデータに基づく、この領域は、最も少ない配列異種性を示した。クローニングされた領域は約1260 b p 長であり、このH P g V-2 鋳型のインビトロ転写を可能にするために p G E M - 11 Z f (+) (P r o m e g a、M a d i s o n W I) に挿入した。このクローニングされた配列は、配列番号1の塩基3224から4483を表し、図4に示される。以下にさらに記載するように、H P g V-2 R N A を検出するために5セットのプライマーおよびプローブを設計した。

【0257】

A. インビトロ転写鋳型として使用するために NS 2 3 E X プラスミドを線状化する。

【0258】

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

【0259】

ステップ2-1260 b p インサートの末端に見出される制限酵素（単数または複数）X b a I および H i n d I I I を用いて消化する。p G E M（登録商標）-11 Z f (+) ベクターは、標準的なクローニングベクターとして、およびインビトロ転写と s s D N

10

20

30

40

50

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

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

【0260】

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

10

【0261】

ステップ4-NanoDrop上でDNA濃度を測定する。

【0262】

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

【0263】

B. インビトロで転写可能なNS23EXインサート

推奨されるようにAmbion Megascript T7キット (AM1334) プロトコルに従い、次にRNAを精製する。ステップ1：20 μ lのインビトロ転写反応を組み立てる。鋳型DNAの入力容量は以下の通りであった：6.3 μ lの線状NS23Ex__pGEM11Zf (1 μ g) + 1.7 μ lの水；2.0 μ lの対照pTRI-Xefベクター+6 μ lの水。プレートインキュベーター (乾燥) で4時間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートする。1 μ lのDNaseを添加し、15分間、37 $^{\circ}$ Cで消化する。

20

【0264】

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

【0265】

30

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

【0266】

C. 逆転写

ランダムヘキサマープライミング用のSS RTIII (Invitrogen: 18080-051) を用いてcDNAを生成させた。NS23EX/pGEM11-Zf (+) プラスミドからインビトロで転写されたHPgV-2 RNAおよびAmbionからのpTRI-Xef対照RNAを鋳型として用いた。反応を以下の通り組み立てた：2.0 μ lのRNA (約400 ng) (NS23EX RNAの1/10希釈を使用した；pTRIについては希釈しないで使用した。)、5.6 μ lの水、1 μ lのランダムヘキサマー (50 ng/ μ l)、0.4 μ lのオリゴdT (50 μ M) および1 μ lのdNTPミックス (10 mM)。65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱し、氷に戻して、10 μ lのマスターミックスを添加する。マスターミックスを以下のとおりに調製する：2 μ lの10RTバッファー、4 μ lの25 mM MgCl₂、2 μ lの0.1 M DTT、1 μ lのRNase OUT (40 U/ μ l) および1 μ lのSuperscript III RT (200 U/ μ l)。

40

【0267】

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

50

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

【0268】

E. HPgV-2 PCR

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

【0269】

【化1】

PCR1_617 bp 産物

GAGCCGGGTTTGGGTGATGAATAA 3841F (配列番号 :38)

CTGCGCCAATGCCGAGTAGC 4460R (配列番号 :39)

PCR2_412 bp 産物

ACGCGTTGATGCTCGGTGGTTACT 3987F (配列番号 :40)

ACAGCATAGCCCCGCAGATTCGTC 4398R (配列番号 :41)

【0270】

以下の容量の試薬を PCR に使用した。鋳型として $2 \mu\text{l}$ の希釈 cDNA (NS23Ex、pTRI; $1.5 \mu\text{l}$ の cDNA ストック + $8 \mu\text{l}$ の水を添加); 15mM MgCl_2 を含む $2.5 \mu\text{l}$ の $10 \times$ PCR バッファー; $0.5 \mu\text{l}$ の dNTP ミックス; $0.5 \mu\text{l}$ の $10 \mu\text{M}$ フォワードプライマー; $0.5 \mu\text{l}$ の $10 \mu\text{M}$ リバースプライマー; $0.2 \mu\text{l}$ の Taq DNA ポリメラーゼ; および $18.8 \mu\text{l}$ の水。以下の PCR 条件を使用する: 94°C で 2 分間、1 サイクル; 94°C で 20 秒間、 55°C で 30 秒間、 72°C で 40 秒間の 35 サイクル; 72°C で 7 分間、1 サイクル; 4°C で保持、1 サイクル。 $5 \mu\text{l}$ の各試料をエチジウムブロマイドゲルで分離し、UV 光下で撮影した。

【0271】

F. 7つのプライマーセットを用いた qPCR

患者検体中の HPgV-2 RNA の検出のための TaqMan ベースの qPCR アッセイを確立するために、以下を実施した。インビトロで転写された RNA (NS23Ex = $2000 \text{ng} / \mu\text{l}$)、最初の希釈を $1 / 100$ ($20 \text{ng} / \mu\text{l}$) で開始する → 合計 100ng について $5 \mu\text{l}$ をロードする。合計 6 回の希釈について $18 \mu\text{l}$ の水中の $2 \mu\text{l}$ を用いて 10 倍希釈を繰り返す。pTRI ($200 \text{ng} / \mu\text{l}$) について、 $1 / 10$ で希釈する → 合計 100ng について $5 \mu\text{l}$ をロードする。総 RNA について、各 RNA の $3 \mu\text{l}$ をとり、 $27 \mu\text{l}$ の水でそれを希釈する ($1 / 10$)。この実験においては、全て同じ方法で抽出した、UC0125、US、CHU2725 [HIV (+) / GBV-C (+) 試料] および N-505 [HIV (+) / GBV-C (-) 試料] を含む。

【0272】

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

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

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

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

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

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

$5 \mu\text{l}$ RNA 試料

3. $5 \mu\text{l}$ スクレアーゼ不含有

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

【0273】

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

10

20

30

40

50

結合位置を図 4 に示す。

【 0 2 7 4 】

【 表 5 】

表 2

プライマーセット 5: アンプリコンサイズ = 70

NS23Ex_F5 GAGGAGCCACCTTTACTGA (配列番号 :54)

NS23Ex_R5 TACCTCCAAGCAATTGTCCA (配列番号 :55)

NS23Ex_Pr5 CACCAAACCTCATTGTGTCATCCACGA (配列番号 :56)

10

プライマーセット 2: アンプリコンサイズ = 89

NS23Ex_F2 GAAGATCTGCCACCTGGTTT (配列番号 :57)

NS23Ex_R2 AGTGTGCGCTTAAGGAAGGA (配列番号 :58)

NS23Ex_Pr2 CCACCGGAGCACTCAGCTGG (配列番号 :59)

プライマーセット 7: アンプリコンサイズ = 74

NS23Ex_F7 TCCTTCCTTAAGGCGACACT (配列番号 :60)

NS23Ex_R7 AGGGAAGACAACACCACGAT (配列番号 :61)

NS23Ex_Pr7 AAACACCAGGGTCCGGCCAG (配列番号 :62)

20

プライマーセット 4: アンプリコンサイズ = 85

NS23Ex_F4 TGGGTGATGAATAACAACGG (配列番号 :63)

NS23Ex_R4 GATCTATGTGCGTGGGACAG (配列番号 :64)

NS23Ex_Pr4 CCACTCTGCCACACACCAACCC (配列番号 :65)

30

プライマーセット 3: アンプリコンサイズ = 88

NS23Ex_F3 AATGACGACGTCTGTTTGGA (配列番号 :66)

NS23Ex_R3 CATGACCGTGATCACACAAA (配列番号 :67)

NS23Ex_Pr3 CTGGTGAGCCCGAAGCACCC (配列番号 :68)

プライマーセット 15: アンプリコンサイズ = 138

NS23Ex_F15 CCAGCTGTGACACCAACATA (配列番号 :69)

NS23Ex_R15 TTGACTACAGCCACACTTGG (配列番号 :70)

NS23Ex_Pr15 CCAGTGGACCTAGTCAAACAGGGACA (配列番号 :71)

40

プライマーセット 1: アンプリコンサイズ = 96

NS23Ex_F1 AGTCATTTGCGACGAGTGTC (配列番号 :72)

NS23Ex_R1 ACGGTCTTCACTCCAGCTTT (配列番号 :73)

NS23Ex_Pr1 TCGGCATACATGCGCACTGC (配列番号 :74)

50

【0275】

G. qPCRアッセイA-HPgV2のTaqManベースの検出

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

【0276】

リアルタイムqPCRサイクル条件は以下に示した通りであった。

【0277】

【表6】

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

【0278】

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

【0279】

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

【0280】

H. qPCRアッセイB-SYBRグリーンqPCR

プローブおよびプライマーセット1、2、3、4、5、7および15ならびに44F (配列番号12) および342R (配列番号13) を用いて、SYBRグリーンqPCRアッセイを行った。これらは、NS23Exインビトロ転写物 (図6、曲線A、B、C) およびHPgV-2指標例 (UC0125. US) RNA (図6、曲線D) から作製されたcDNAの10倍段階希釈を検出するために使用された。陰性対照 (図6、曲線EおよびF)、N-505 (HIV (+)/GBV-C (-)) および水は増幅されなかった。以下の試料が各列にあった: 1) NS23Ex 1:1000 cDNA; 2) NS23E

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

【0281】

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

【0282】

I. qPCR アッセイ C

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

【0283】

J. 三重マスターミックス qPCR アッセイ

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

10

20

30

40

50

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

10

【0284】

[実施例4]

HPgV-2 ペプチド／タンパク質に対する抗体の検出

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

【0285】

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

20

30

【0286】

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

40

【0287】

【表 7】

表3

ペプチド #	タンパク質	配列	配列番号
1	S	GGSCRSPPSRVQVARRVLQLSAFLALIGSGMSSIRSKTEGRIESGQ	86
2		RDGSLHWSHARHHSVQPDRAAGPPSVTSVERNMGSSSTDQT	87
3	E2	SMNSDSPFGTFTTRNTESRFSIPRFSPVKINS	88
4	NS3	QAPAVTPTYSEITYYAPTGSGBKSTKYPVDLVKQGHKVLVL	89
5		VKSMAPYIKETYKIRPEIRAGTGPDPGVTVITG	90
6		PETNLRGYAVVISDESHDTSS	91
7		PCTAALRMQRRGRTGRGRRGAYTTSPGAAPCVS	92
8	NS4B	LSERFGQQLSKLSLWRSVYHWAQAREGYTQCG	93
9	NS5A	NPTTTGTGTLRPDISDANKLGFYGVADIVELERRGDKWH	94
10		QNLAARRRAEYDAWQVRQAVGDEYTRLADEDVD	95
11		RFVPPVPKPRTRVSGVLERVRMCMRTPPIKF	96
12	NS5B	NTTRDHNNGITYTDLVSGRAKP	97
13		DAPMRIIPKPEVFPRDKSTRKPPRFIVFPGCAARV	98
14		MPLLCMLIRNEPSQTGTLVT	99
15	S	AEAAPKSGELDSQCDHLAWSFMEGMPTGTLIVQRDGLSH	217
16	NS4A-B	SVEVRPAGVTRPDATDETAAYAQRILYQACADSGIFASLQGTASAALGKLA	218

【0288】

試験される集団

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

【0289】

試験手法

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

【0290】

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

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

10

【0291】

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

20

【0292】

結果

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

30

【0293】

【表 8】

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

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

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

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

**非反応性

【0294】

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

【0295】

10

20

30

40

【表 9】

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

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

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

【0 2 9 6】

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

【0 2 9 7】

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

【0 2 9 8】

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

【0 2 9 9】

U C 0 1 2 5 . U S 症例を用いた血清学的試験

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

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

【0300】

抗体反応性とRT-PCR結果との相関

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

【0301】

【表10】

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

RT-PCR(qPCR)結果の相関

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

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

【0302】

RT-PCR陽性試料を同定するための戦略

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

【0303】

継続的な試験のためのペプチドプール：

ペプチドプール組成物は、以下に示されるように改変された：

プール1は、以下のペプチドを含んだ：P1、5、7、8、10

プール2は、以下のペプチドを含んだ：P2、3、4、6、9

プール3は、以下のペプチドを含んだ：P11、12、13、14

【0304】

HCV RNA陽性／抗HCV陰性の血液ドナー試料

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

【 0 3 0 5 】

【 表 1 1 】

表7.HCV RNA陽性であるが、抗HCV抗体陰性であった240個の

ARC試料:陽性結果を示す試料ID番号のリスト。

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

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

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

**非反応性

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

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

【 0 3 0 6 】

10

20

30

【表 1 2】

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

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

10

【0307】

HCV RNA 陽性／抗 HCV 陽性血液ドナー試料

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

20

【0308】

【表 1 3】

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

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

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

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

**非反応性

【0 3 0 9】

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

【0 3 1 0】

10

20

30

【表 1 4】

表 1 0. ペプチドプールと反応性であるARC血液ドナー試料のHCV RNA陽性/抗HCV陽性における個々の

ペプチド結果。個々に試験された各ペプチドの陰性対照と比較したシグナル対ノイズ (S/N) 値を示す。RT-PCRを実施し、結果を示した。

Abbott ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	PCR 結果
S0029	7	19	11	12	25	46	16	15	12	30		35	23			28	陽性
S0055																15	陽性
S0127					164												陰性
S0104					152												陰性
S0046										136							陰性
S0128									69							24	陽性
S0045			30														陰性
S0178			21														陰性
S0044				12					18							71	陰性
S0220		59															陰性
S0238				30					46								陰性
S0141			30														陰性
S0077													15				陰性
S0202									14				21				陰性

【0 3 1 1】

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

【0 3 1 2】

タイからの血液ドナー試料

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

【0 3 1 3】

【表 1 5】

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

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

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

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

**非反応性

【0 3 1 4】

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

【0 3 1 5】

【表 1 6】

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

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

【0 3 1 6】

南アフリカのH I V陽性血液ドナー試料

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

【0 3 1 7】

【表 1 7】

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

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

10

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

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

**非反応性

【0 3 1 8】

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

【0 3 1 9】

20

【表 1 8】

表14. 個々のペプチドにおける陽性結果を含むID番号のリスト

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

【0 3 2 0】

30

拡大したHPgV-2有病率研究

指標例に加えて、最初の7つの単離物（ABT0096P、ABT0070P、ABT0188P、ABT0029A、ABT0055AおよびABT0128A）は、ペプチド3、4、9または16に対する抗体応答とHPgV-2 RNAの存在との間に正の相関を示した。異なる集団におけるHPgV-2の存在を調べるための継続的な研究は、ペプチド3、4、9、16のプールによる抗体試験、および実施例3に記載のRT-PCRアッセイの組合せを用いて実施された。

【0 3 2 1】

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

40

50

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

【0322】

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

10

【0323】

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

【0324】

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

20

【0325】

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

30

40

【0326】

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

50

値は、試験したすべてのグループにおいて高かった。

【 0 3 2 7 】

【表 1 9】

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

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

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

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

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

【 0 3 2 8 】

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

【 0 3 2 9 】

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

【 0 3 3 0 】

【表 20】

表22

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

【0331】

[実施例5]

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

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

【0332】

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

【0333】

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

【0334】

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

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

【 0 3 3 5 】

【表 2 1】

表17

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

【 0 3 3 6 】

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

【 0 3 3 7 】

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

【 0 3 3 8 】

【表 2 2】

表21

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

【 0 3 3 9 】

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

【0340】

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

10

20

【0341】

[実施例6]

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

哺乳動物細胞におけるHPgV-2 E2の発現、精製、特徴付け

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

30

【0342】

[化2]

配列番号406:E2カセットのコード配列

```
atgagagtctctgcacaattattaggtattattattattgttctctggatctaggtgctacaagcaccagagcgagagctacctaagattgtacaattacaataca  
tctacaagcatgaactgcgattgcccttttggcaccctcaccaggaatacagagtctagattttctattctagatttttccagtgaagatcaatagcagcacctcatct  
gctcttggggatcttgggtgtgttctgtaaaattacaagaccttatacagatgtgggaatgcctccagctccaatttctgctctgtgttacatctacagcaataatg  
atcctcctccttggatcataataaccaccatcatcctcagaactgcagaatagcaccgttgatcctacaacagctcctttagagataaatggggaatgctacagc  
ttgtattcttgacagaagaagcagattttgcggcgattgtatggaggatgcttttacaaaatggaagccatgatagatcttgggatagatgtggaatcggtacaga  
gatggactgattgaatttctcagtttagccagattagaccacaatcatcagaataacacatcgaactgcttctgagagcttcttagttattgcttctgattgaagacctg  
gatttgatgttctagagctcaggtgtgtcactgctatagatgctcctcttacagagatttagaacaattggacctggacttgaaaaatgggtgcctttacctggag  
aacctgttctgaattatgttattatcctcaatgggctagaagaggattcagaatgagcaataaccctctgtctctgctgcagacattgttgaagatatcttcttcccc  
tttctgtaattcctacacctggaagagttaggtgtgcaacaatacagccttttatcctagaggaggaggtttgtcaactattggcgatgttcagggtctgacccctaa  
tacaggatctggatctggacatcatcatcatcatcatcactaa
```

40

【0343】

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

50

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

10

20

【0344】

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

30

【0345】

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

40

【0346】

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

50

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

【0347】

PCR+/Ab+試料を用いた精製HPgV-2 E2の血清学的試験

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

【0348】

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

【0349】

【表 2 3】

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

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

【 0 3 5 0】

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

【 0 3 5 1】

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

【 0 3 5 2】

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

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

【0353】

〔実施例7〕

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

10

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

【0354】

【化3】

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

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

20

【0355】

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

30

【0356】

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

40

【0357】

50

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

【0358】

【表24】

表19.NPgV-2 RNA陽性試料における

NS4ABに対する抗体の間接アッセイ

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

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

カットオフは、陰性対照値のシグナルの10倍であると決定された。

正常なヒトのドナー血漿(n=100)の集団はまた、HPgV-2 NS4ABに対する反応性についてスクリーニ

ングされ、現在または過去の感染を示した。1より大きいカットオフ

(S/CO)に対するシグナルを有する試料は検出されず、これは、米国の集団において、

HPgV-2が低頻度の風土病ウイルスであることを示唆した。

【0359】

[実施例8]

ウサギにおけるHPgV-2抗原の検出と過免疫血清の生成

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

【0360】

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

【0361】

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

10

20

30

40

50

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

【0362】

【表25】

表20

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

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

【0363】

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

【0364】

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

【図 1 A】

FIG. 1A

ヒトベギウイルス 2 (UC0125, US) 核酸配列-配列番号 1

```
1 GTGTTTGACA ATGCCATGAG GGAATCATGAC ACTGGGGTGA GCGGAGGCGAG CACCGAAATGC
61 GGGTGAACCTC GACTGCCAGT GGCAGCAACTC GGGTGGGTGG TCTATGGAGAG GCAATGCCCAAC
121 GGGAGACCTGC ATCGTGTCAA GGGATGGGTGC CTGCACTAGT TGGCATGCGC GGCACCACTAC
181 CTGATACGCTC GATAGGGGTGC GCGCGGGGCCG CCCAGTGTGT AGCTGCGTGG ACGCGCAACAT
241 GGGGTTGTGTA ACTAGTACAA CCATTGGTTCU TCAAGTCTGT GGGGCGGACT AIAAATCCTTC
301 CTGGGGCTGCG CGGGGCTTAA ATGGGAGCTTA CCACTGCGGT GGTGGCTCTT GCGCGTCACC
361 AAGTCGTGTGC CAGGTGTGGA GACGAGCTTT GCAGCTGTGC GCATTCTCTG GCGCTGATCGG
421 ATCCGGTATGC TGTTCGATCC GGTCCGAAAC TGAAGGGGCG ATTGAGTCAG GGCAGAAATATT
481 CAGATCTCAG CGCGCATGTT GGAATGGTGA GGGTTTTGCT TTCTTTCTTA ACTGTGTCAA
541 TCAATCTGAT ATTATGTGCT GTTTGCACCG TTGCTGTGTG ACAAGACCTG GCTGTTTAGT
601 GTGCACGGGC AATGGCACCT ATGCTATCTG CTGGGACTAT CTGGGATCGG GTGTAAGTGC
661 GCGGGCTGCA CGTGGAATGG GTGAGGGAGC TGAAGGCGTT CTTCGCTTGA TCGGGATATTC
721 AGGTGTGCTT GAGCTGTATG CTGAGTCCCT TGGTAATGCC GAAGTCTATG CAGCTATTCCT
781 TGTGTTTGGG TTTATGTGTT GGTATGGGTG GGTATACCTC TGGGCACTGG TGTGACCGCT
841 CTGCGCTGCA GTGAACTATT CTCCCTATAG CTCTTATCTC CAGATACTA TCGCATTTGG
901 TACGTGGATA CTACAACTAC CTGGTCTTTT GTGGCAAAAT TTGTGTAGCT TCCCTATACCT
961 CTACAGCACT TGGATTTATT GGTGTGTGCT CAGCGGCAAG ACTGTGTGCT TGAATAGCAAT
1021 CTTCTTGGCT AGTCTGACGG TTATGGGTGA CAGCACTCAA TCTGAAAGCT ACCTCTAAAT
1081 CTGTACCACTA ACCAATACCT CAACCTCTAT GAAGCTGTGAC TGGCCCTTTG GAACCTTTAC
1141 TCGCAATACCT GAGTCTCGTT TCTCCATACC TAGATTCTGT CCTGTAAAA TCAATAGCTG
1201 TACATTTTAT TGTTCATGGG GGTGCTGGTG GTGGTTTGCT GAAACATCA CCGCTCCATA
1261 CACGGAGCTT GGCATGCCAC CAGCACCGAT TTCCGCTTTG TGTATATCTT ATTCTAACAA
1321 TACCCACACT CTCTTGATCT ATACACGAAC TATCATACCT CAGCACTCTC GCAACTCTAC
1381 GGTGATGATCT ACCACAGCTC CATGCTGCTG CTGGTCTTTC TCCGCTATCT CTGATTTCTT
1441 TACCGCCCGG TCGGGGTTCT GCGGGGAGCT CTATGGGCGT TGTTCCTGTA CTAATGGTAG
1501 TCAATGATGC TCTTGCGATC GATCGCGGAT TGGTATACCT GATGCTACTA TAGAGTTAGT
1561 GAGCTCGGT CAGATTTCGAC CTACACTCTC GATACCTGCT GTTGAAGCTC TCGCTGGCGT
1621 CTGCTGTGTC ATCGCATCCG GTCTTGGGCC TGGGTTTGGT TGCAGCGGAG CCGCATGGCT
1681 GGTGCACTGC CTGATGCTGC GTTCAATGCT GACCTTGAAC CAGTGTGCTG TCCGCTTGG
1741 GAAATGGGGT CCAATTGCCCG GCGAGCGCTGT CCGGAGATGT TGTATCAACC CTGAGTGGG
1801 GAGGCGCGGC TTCCGGATGT TCTGAATATC TCTGAGCTTG CTACAGACCT TCGTTAGGGA
1861 CATTTTCTTA GGGCTTTTTT GTAATCCGAG GCGTGGCGCT GTACGTGTGT GTAAACAATAC
1921 CGCTTTCTAT CCAAGAGGAG GGGGCTTGGT GACGCTCATC GGGGAGCTGC AGATGCTAAC
1981 CCTTAACACT GCATCTTTAC ACTCTCTGCT GATCTTGATA TCTCTTATCT TGTGTTGGTG
2041 TGTGTTTCTT TGTGTTCACT TGTGTTCACT AATAATGATA TTTTCTTGGG AGCGGGGCA
2101 TGTATATGCT TCTTGTATCT TAAGCTGTGA TTGGGCGTGT TGCAGAGATG CGTCTCGT
2161 CACATCTGGC ACTTCTGAGCA CCTTCAATGA GCTCTGTGCT TGGCGGTTGT GCGAGCGGAT
2221 ATGCTGCTGT GGTCAATGCT TGCACACTCC GCAGCGTGGT TGGGAGGTGC CTGCGGGGAT
2281 GTATGCGGTC ATTCTGCGGA GACTTGGGCT GAGCTTCTAT TGTGCTGATG TCTTCTGAT
2341 CTCTGCTACT GTGGCTTGGCA ACACACCAAA CAGATTTTTC TGTGCTGAAC CAGACTTCTC
2401 CCGGGACATC ACGGGCACTT ATTGCGCTTA CTTTTGTGCT GCGCAATCC TGTGTACTAT
2461 GACTCTCCCT CTAGGTTTAA GGTTAATGCT TCGCGGCTTC AATAATGATG AGTGTGTTCC
2521 CATACGGGCM GCGACGGCTG CACTGAGGTT TTGCACTTCT CGTGTGACCT TGTGTGCTGT
2581 AGTTGCTTTC CTAATAGCTA TATATCTCA CCGTGTAAAT GCTGGGCTCA ATGAAATAGT
2641 CTATAGATCT CAGAAATATG AGATGATCTT ATCTTTTGAAT ACCTATCATG AGACTGTCTC
2701 TTATATCCPI TGTCTATTAG TCACTCTCCA GGTGTGCGCC GGTGGGGGCT TGGCGGCTAT
2761 GGTGGGCATC AAGCTCTGCT GAGGCTGTGT ATTCCGTGTG TGTGTTGGCG ACGGTGTGTG
2821 CCGACCTTGG CGGGTATTG CTGTTGAGGT TGTGCGGAC ATCTCTTGGT TGTGGGATGT
2881 TACTGGCAAT TGCATTTGGT ACATGCTCTG TATCTCTCTT TTTTGTGCG CAGTGTATG
2941 CTTCAACGAT CCATCTTGGC GACGACTTAA GACTCATATA GATCCAGATC AGGGGCTGG
3001 CTATGCGAGA CTGCTCTCTG CTGCTGGTGT GCTGCTCTCT GGTGCGAGAT TCCATTTCCG
3061 TGCAGGTGTC GGGTGTGCTG GTGTGTGAGC TTGCACTGTC TGGCCCGCTG AGTGTCTAA
3121 AATCAGGCTG GTCTTCATCT TGTGTGCTCT GAGAGTGGAC ACATATAGCA CATGTTAGT
```

【図 1 B】

FIG. 1B

```
3181 AGCGTGTCTT TCCGCAAGGG CGAGTGGCGG AACCTTTGCA ATTTTGGCG ATGACATGCG
3241 GCGCATTTGGT GACCAACGGG CGTTGGCGCG CGTGTTAGCT TGCATTGGAT CACGCGGAC
3301 ATACATATAC AACCACTATG GCCAAGTCTC GGAACCGGGT GCGCAAGACG TCAAGGATCT
3361 GGGCGGTTGG TTGGAACAGG GCGTGTGTGA GGAAGCCAGC TTATCTGAGA TCGTGGATGA
3421 CACATAGAT TTGCTGTGCT GAGCATTTGT GAGCATTTAA CCGCTTGGCG CCGCTTGGCG
3481 CAGCGGTGTC TTGTTGGGAG ACCTCAACCC TGAAGATCTC CCACTGTGTT TCAAGCTGAG
3541 TCTGTCGGGT GCTATTAACA GCGCAAGCAT TGGTATGCTG TCCTTCTCTA AGGCGACACT
3601 CAGCGGCGGT GCTGAAACAC CAGGTCGCGG CCGATGCTGT GTGTTTCTCT CCCTGACAG
3661 TCGGTCGAATG GGTACCGGAG TGAATGGCAC ACTGTATGCG ACCGCGCATG GTGCGGGCG
3721 CCGCGCCCTTA CCCACCTGCG CTGGTTTGA CAGCCCATCT TACACCGCAT TATCTGTATG
3781 TGTGTTGGCC TATTCTTGCG TTCCGGGCAT GAGTTCCTTA GACCCCTGCT GTGTGTGCG
3841 GAGCGCGGTT TGGGTGATGA ATACCAACGG AGGGTTGGTG TGTGGCAGAG TGAAGAATGA
3901 CGACGCTCTGT TTGGAATGCT CCACGACAT AGATCAACTG CCGGCTGCTT CCGGCTTACC
3961 AGTTTGTGTG GATCAGCGGT GATCATACCG GTTGAATGCT GGTGTATTCT CTACAGTGG
4021 TATTGTGCA CGCGTCCGGA CGGTCCGGCC ATGGCATAC GCTTATTCTT CCGTCGGGGG
4081 GCAAGCGGGA ATGACGGCGC CAGCTGTGAC ACCAACAAT TCTTAAATCA CCTACTATG
4141 CCTACTGGT TCTGTAAAT CAACAAAAAT TCCAGTGGAC CTAGTCAAA AGGGACACAA
4201 AGTATTGGT CTTTATACAA GTTGGGCTGT AGTCAAAAGT ATGCGCCCTT ATATTAGGA
4261 GACATATAG ATGAGACCGG AATTATGAGG GTGCAAGGT CTTGACGGT TGAAGCTAT
4321 CACTGTGAG AACTTGGCGT ACATGACCTA TGGCCGCTT TGTGTTGCT CCGGACAGAA
4381 TGTGCGGGG TATGCTGAG TCAATTGCGA CGATGCTGAC GACATCATCT CCACACGCT
4441 CCTACTGGT GCGCGAGTGC GCATGTATGC CAGCAAGACT CCGGTGAAGA CCGTGTAT
4501 GCGCACAGCC ACCCTGCTGT GCAATTCAAGT AGCGTCAAT TCCAAATTTG ATGATACTT
4561 AATTGCTGAC ACAGGCGGAG TGGAAATTTA CAGGCCCAA ATCAAATAG ACACACTGAC
4621 AAGCTGTAGA CATGTTATCT TTTGCCACTC GAAAGCGAGG TGTGCGGAC TAACCGGACA
4681 GCTCTCCGCG CTGTGGCATC GTGCAATGAG TTTTGGCG GCGCTTGACA TCAAAACCAT
4741 TCCCGGCTCA GACTGCTATG TTGTTGGTGC AACTGATGCA TTGCTCACGG GCTACACAG
4801 AAACCTTTGAT TCGGTGATCG TTGCGGGGTG TTGCGGGGTG CAAACTGTGA CATTAGACAT
4861 GGAACCTTAG TTCTCATCT CGGCGCGGAG GGTGCGATGT ACTGCTGACT CTACAGTGA
4921 CCGGCGGGGA CGTACCGGCT GTGTTAGAGG GGAAGCGTAC TACACACTTT CTTGAGAGC
4981 AGCAACCTGC GTCAGCGGTC CCGATGCTAA CGCTGCGCAA GAGTGGAGA GCGCCATCT
5041 CTTTATGATG TGGAGTGCTA CAGGATGCTA ACAGTGGCTG GCGGCTATCC ATGATTGGG
5101 GTGACACCA CCACTACGCT GTGACCCNCA CACTCCAGTG CCGGATGATG ACACACTAG
5161 GCGTGGGTC GAGTACGCT AGGTGAGGAC TGCAGTGCAG CAGAGAGAGC AGTGGCGCT
5221 CTTTATGATG GCGCACTTGT GCATCTGCAA AGACAGCGAG CCGGACGCTG CTATGATAG
5281 CATCAAGTGG AAGTGTCTAC TCAACAACAG TAACAAAAAC CCCCTTGTG ATGCTTAGA
5341 CAATCTTACA CTGGAATTCA CAACCCAAAC TGAATGACT CAGCTTGAAT CCGGCGCTCT
5401 ATGAGGACGA GTGTTGCTGT AGACAGGCTA GCGGCCCAT CTCTCTGCTG GCGCCGCTT
5461 GGTGCGCTCC TTGCGCTTGG CCGGCGCCAC TGGAGCTTGA GCGGCTGCG CTGTTTGGAG
5521 CGTTGAGGTC AGGCTGTGCT GCGTGAACCG TCCGACAGC ACAGACGAGA CCGGCGCTTA
5581 GCGACAGCGC TTGTACCAAG COTGTGACAG CTTAGGAAT TTTCCGACTG TGTGAGGAT
5641 GCGGAGTGGC GCGCTGGGCA AACTGGCCGA CGCCAGTAGG GGTGCTAGTC AATATCTGCG
5701 AGCCGCGGCT CTCTACCCG CCCCCTGTG ACAGGTATG ACAGTCTGCG AGACCAACT
5761 TACTGCTGAT GCATCTTTCG GCTGCTCTG TGTGCTGCT CAGGCTGGCG AGGTGCTAC
5821 TGGCTTGTCT GCGTGTGCTG GCGTGTGCTG CCGGTGCTAC CCGGTGGGCC ATGATGGCT
5881 ATGAGCTATG CAGGAGACTT GCGTGGTTAG CTTGAGAGCT GGTGCGGTC GCGGACATGT
5941 TGGCGGCTCT TCGATTCTAG GCGGCTGTG CATCGGCTGT CACTCGGCG TTGACTTCT
6001 TTTGGGTGCT CTTAGAGTT GGAAGAGCTT GCGGTGAGT CCGGTGAGCA CACAGAGAT
6061 CTGTGCTGCT TCACTGTGTA TGACCTGACT GGTGATCTCT TTACCTGCTC TTTTCTCCG
6121 GGTGCGCGCG ATAGCTGACA TGTGCTGTGT CTTCACTTA AGCAATCAA GTGTAACCA
6181 ATGGGCTAAT CCGCTATTAT CCAATGTGTC CAACAAACCT ATTTGTGAAA ACTACTTCT
6241 AGTGGAAAGA TTTGGCCAA ACATTAAGCA AATTTCCCTG TGTGCACTTG TGTACATCTG
6301 GCGCGAGGCA CGTGAGGGAT ACACACAGTG CCGCGTATC AGCGGACTCT GAGACTTCCG
6361 CTGTGTGATT CTACGCGCTG TGTGGGATG GCGGCGGAG CATGTGCCAC GGTTCGCTGT
6421 GCTCATGATT GCGTGTCTAC CTGCGTGGTG CCGGCGCGTG CTTGTATCCG GCACCTTGT
```

【図 1 C】

FIG. 1C

```
6481 GACCACTGT GCGTGTGGAG AACGTGTGTC CTTTCACTGC CTTTGTGCTCA CATCTGACC
6541 ACAACTCAGT GTGGGCGGTT GGTGTGCTGT TAGTTGGAGT GTTGGGTTC CATTCACCC
6601 GACTACAGCA GCGCTGCGCA CTTTACGGCC GGACATCAGT GACGCGCAAC AATTGGGTT
6661 CCGGATAGGC TTGTCGCGCA TCGTGGAGCT AGAGCGGCGG GCGCAAAAT GSCAGCTGT
6721 TCGACATCA TGTGCTTGG ACCGGGCGAC CGTGTGATCC GCTGTGAAGC CCCCACCGT
6781 CAGCGCATAT GGTATACCTA TTAATAGCTT TTCTCCACCA CAAACTTATT GCTATCTCT
6841 CTGTTCTCTT TGTCTATTAG TCACTCTCCA GGTGTGCGCC GGTGGGGCT TGGCGGCTAT
6901 TGTGTGCCAA GAGGAGCGCG TTGAGCTGCT GAGAGAGACA GTTCAACAG CACAGATAGT
6961 GATGAGGCCA AATCTGGCAG CCGCTAGAGC CCGTGAATAT GATGATGGC AGSTTCCGCA
7021 AGCAGTTGCG GACGAGTACA GCGGTTTGGC AGAGCGAGAT GTTCAATGCA CAGCGTCTGT
7081 GAAACCGGCA CTGGCGCTGC GAGCTGAGCA TGAAGTCAAG TTGAGGAGCT TGAAGCTAT
7141 GAGTGTCTTA CCGACAGCTG GCGACAGGTC CCAAAATGCT CCAAAATGCT TGTGACGCG
7201 GGTCTCAGCG TTTGTCCAC CAGTGCCTCA GCGACGCGAC GCGTCTGCGG GTGCTTGA
7261 GCGCGTGGCG ATCTGCTGCG GACGCGCCAA AATCAAGT TTGAGGCGCCG CAGTACCAAT
7321 CTATAATATA ATCCGAGAAG AGTGTCTAT TGTGCTADGC TGTACCGGCT GTTGTGACCA
7381 GCGCTTGAAC GTTCTGATCG CACTTGTGCT TCTGACTTTA ACCAAATATT TGAATACAA
7441 ACACAGCTCA TATATTCCAA AAGAAGAGAT AGAGAAGAGC ACAGAAATAG CTGTATTG
7501 CCGCTTACCA ACAAGCGGCG CAGTAAGAT TATCACTTTC AGAGCAGGTG ACCGATCAGT
7561 CTGATGTTGT CACCCCTTGC AAATCTCTAT TAGGCGCCGT CTTCAAAAGT ATGGGTATAC
7621 TATTGGGAG TGTGCGGACT GCAACGGGCG CTTTGTGTC GAGCGCGGAG TCTGTGACT
7681 CAATGGAGTG AACACTTATG AATCATGAT GCAATCTTAC AATTTGCTCT GATCGATTGT
7741 GCGACCAACA ACCCCACTTT TACTGTCAAC CCGGAGCGGT GCTGGCATTT TGCOCGACA
7801 CACATGCGCG GTCTACACCA CAGAGCGGT TGAATCTTCT GAGCGCGAG CTAAGGTGAC
7861 GATTGTACAA AAGTCAACCA AGTGTGAGCA GTGCTTCCGA GAGCATATCA ATTCGTGCT
7921 TGGCAAGGTA AGGCTCTTCA GACATGTGTC CATGTCAAT TGTCAAGAT
7981 GCGCGCAAC ACCACGCGTG ATCATACAA CCGCACCACT TACACAGATT TGTCTCTGG
8041 AGCGGCAAAA CTTGTGCTTC AAAAATTTG AGATCAGATG CCGCTGGAG TGTAGACGC
8101 TCCAATGGCG ATTTATCCAA AACCTGAAGT GTTTCACGA GACAAGTCAA CACGGAAGCG
8161 ACCACGGTTC ATGATTTTCC CTGGGTGTC GCGACAGTCT CCGGAGAAAA TGAATCTGG
8221 CGATCTTGGC GCGATTAACC AGACGCTGCT AGGTGATGCC TACGGGTTTG CCACCTCGCG
8281 GCATGAGCG GCGCGGCTAC TGAACAATG GTGGAACCTG GCAACGAGCG CACAGGCTAT
8341 CCGGCTTGTG GAGATCTTCT TTGATGAC CATCACGGCA GAGGACATGT ATCGTGAGG
8401 CACATCTGTC GCTGCGGCG ATCAGGACCG GGAAGGTGTT CACGCGCTAT ACAATTATTA
8461 CAAAAGAGC CCGATTTGTC ATATCACAGG AAAAGTTGTC GGGGTGCTTA GCTGTGACG
8521 CTCAGGTAGC CTTACACAA GAGTGGGCAA CACGCTTACT TGTACTCTCA AGSTTCCGCG
8581 AGCTTGCAGC CCGCGCGGCA TTAACCAAT TGGCTTACTA ATTCATGGG ATGACACCTT
8641 CATATCTACA CAGAGTTCGA CTGATGAGT TGTGATGAG TGGGAGCT CCGTGTGATG
8701 CTATGAGCT TACTACAGTA TGCATGAGT TGTGATGCT TCGTATGCG ACCTGTGAG
8761 CCGACGCTGC CACAGCGTTT CCGTCCGCGC ACCTATGCT CCGNCTGCTC TCCACAGAG
8821 TGCAGCTGCG ATTTGCGGCG TTCTGCGGGA AAAAGGCGAT CCACCTGGGT TTATCAGAC
8881 CTATATTGTC ATGTATCTTA CTGCGGCTGT GACTGTCTAC GTTCTGATCG CCGTGTGCTG
8941 CATGCTCAT TGAATGAGC CATGCGGACT GTTACAGCTG GTAACGTTGA GGTGCTGCG
9001 TAAACAGTGT AGCGTGCAGT TGTGCGTGT TCCAACAAT ATTCAAAAT TACAATGGCG
9061 TGACGACCTA CAGTGTGCTC GTGACAATG AGCTTCCA GTGGAAGCT CCTCAGCGCT
9121 GCGCTTCTTT GGCATGAGAG GTTGAACGT CTGGAAGCGG AGACGCGCTG CCAATGAGG
9181 TGTATGATC AAGTGTGGCG GTTGAATGCG GAATTTGCG CAGAATGAT TGTGCTTACC
9241 GAGGTGAAGA ACACACAGC CCGAACCAA GGGCATGTGT CTTCTGCAAC GCGAATGAT
9301 GAGGCGTCCG TACGAAATAT TGACTTTGAG ACAGTTCGAC CCGAATGCTG GTGCTAGTGT
9361 CTTACGGTGT TGGTGGTGT CTAGTGTACT ACTGCTCTG CTTTCTGTTG AAATCTTCAA
9421 TCAATATGTA ACAGGAGTA GTGAGATCA GCTGACCCA CCGCTGCGCT GGTGCTGAG
9481 AAACCGGGG TTGACAGCC CCGCTATCG AGTTGGGCAA GGTACATCA CCGCTGTGAC
9541 GACCCCGGCC CCGATGTGCG CCGCGAGCG CAGGGCGAAG GCACTGAGC TGAAGTCTG
9601 GCGACACTCT CCGTACCCCA CCGAGGCTA CGCTCTGCT TGGCGAGAGC GGTAAACATA
9661 CCGTCTCAGC GTGTGACTCT GAGTATCTTT GTTAAACACT TAATGTCGCT AACTTGACCC
9721 GCGTGCGGG GACTTAAGCG CCGCACCGG ATGAGAGGGG TCAAGCGGCC CTTTCAAT
```

【図 2 A】

FIG. 2A

ヒトベギウイルス 2 (UC0125, US) 遺伝子および非翻訳領域

スタンパク質および遺伝子配列

スタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 2)

MEGMPGTLIVQRGDSLHWCHRHHSVQPDRAVAGPPSVTSVERNMGCTDGTICSPVVGADYNTSSGCRALNNGSH
CGGSGCRSPSRVQVARRVLQCAFLALIGSGMSIRSKTEGRIESQ

スタンパク質遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 104-475

E1 スタンパク質および遺伝子配列

E1 アミノ酸配列: (配列番号 3)

LQIGAGLWGLGAEISLHSEVYVAILCPGLIANYGAGI3KTLVCTGPA
VNIISPYSLSPDTIAGFTWILQPLGLXQMVFSPILYSTWILMLLSGKTAVIAITLLASPTVMA

E1 遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 476-1048

E2 スタンパク質および遺伝子配列

E2 アミノ酸配列: (配列番号 4)

YKHQSESYLYKCTITNTSTSMNDCPFGTITRNTSESRFSIPRFCPVKINSSTFICSWGSGWVFAENIR2PYTDV3MP
SIPDISALCYIYSNNDPPWYHNTTII PQNCRNSTVDPTTAPCRDKWGNATACILDRRSRFGDCYGGCFYTNHSDR
WAFDCEGJYGRDLIEFVQLGQIREPINSNTTIELLAGASLVASGLRPGFGCSRAHGVVHCYRCPFSYRDLQDFP3LG
KVPLPGEPVPELGINPQWARRGFRMSNPLSLQTTFVEDIFLAPFCNPTRGVRVRCNNTAFYPRGGGQVQLIGDVQ
VLTNPNTASLHSLTLLISLILLVCVVSGARFVPLIIF7WSARHYA

E2 遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 1049-2110

Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 5)

SCYLSCDWAVCNDAFCFTSCTCATFNDVLCPVATRISSCGHVPVPPDRGWEVPAAMS4VIRSTGLTFDVF5FIQY
LPTVPGNWNVI1YCGEFTPLGDTIGYKPYFLPGAILLYLTFPLGRMLAGFNIDGLFPIRHATAALRST5SRVTL
CVVAFVLIYLSHPVNAALNRMFLASANLEMILSFDTHYETVLYILCLLLYLQVSPRAGLAAMVAKLSRGLLFAV
LHAGVC

Xタンパク質遺伝子配列: 配列番号 1 のヌクレオチド 2111-2821

【図 2 B】

FIG. 2B

NS 2 タンパク質および遺伝子配列

NS 2 アミノ酸配列：（配列番号 6）

RRGRVFLGVCAIDISHLVEFTGNCWVMSCVSEFWCAVFAFTSPIGRHYKIQIYRYWAQVYARLVLAIVGCGPLGREF
HFRASVGVLMGACMLHPRECSEISLVFLICALTVDITDVLVACL SAGPSARTLA:LADDMARIGDERALRAVLRC
FGSFGTYIYNHMGQVSRVAQAVRDLGGCJBPVWLEBPFTFEIVDDTMSLVCGQLLGGKFPVARCGRVVLVGHNLPE
DLPPFGQLS

NS 2 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 2822-3541

NS 3 タンパク質および遺伝子配列

NS 3 アミノ酸配列：（配列番号 7）

APVVITRPSICTWSFLKATLTGRAETPGSGQIVLVSSLTGRSMOTAVNCTLVATGHCACAGLATCAGLRTPLYTAL
SDGVAYSLGPMSSLDPCCCSPSRVWVMNNGLVCGRVENDVVLDCPTFIDQLRGASGSPVLCDFGHAYALMLG
GYSTSGICARVTVRPHNAYSSSGGQGMQAPAVTPTYSEITTYVAPTSGSKSTKYVVDLVKQGHKVLVLPSPVAVV
KSMAPYIKETTYKIRPEIRACTGPDGVTIVITGENLAYMTYGRFLVDPEHNLRGYAVVLCDECHDTSTTLTGIGAVEN
YAKGAGVTVVFEATAPAGIQVQSHSDIYLLTDGTGVDFYSAKIKMONIRTRGHVIFCHSKARCAELTQQLSLG
IRAVSFWRGCDIKTIPASDSIVVVATDALSTGTGNFDSVIDGCGCVQTVTIOMDPTFSISARVVCTAALRNQRR
GRTCGRRGAYYTTSPGAAPCVSVPDANVHQAVESAMVEFYDWSATRIQQCLAAHYDLGCTPRISCDPHTPVRYMDTL
RAYLRRPEVTTAALAGEQWFLLYGAQLCICKETEARGPDSDIKWCLLNNKRTPLLYALDNHPTLEFTQHDLTRRI
AGALSSTTVFET

NS 3 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 3542-5425

NS 4 タンパク質および遺伝子配列

NS 4 アミノ酸配列：（配列番号 8）

GYGFILLAGAALASFAFAGATGALVPSAVSVSEVRFAGVT

NS 4 A 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 5426-5548

NS 4 B タンパク質および遺伝子配列

NS 4 B アミノ酸配列：（配列番号 9）

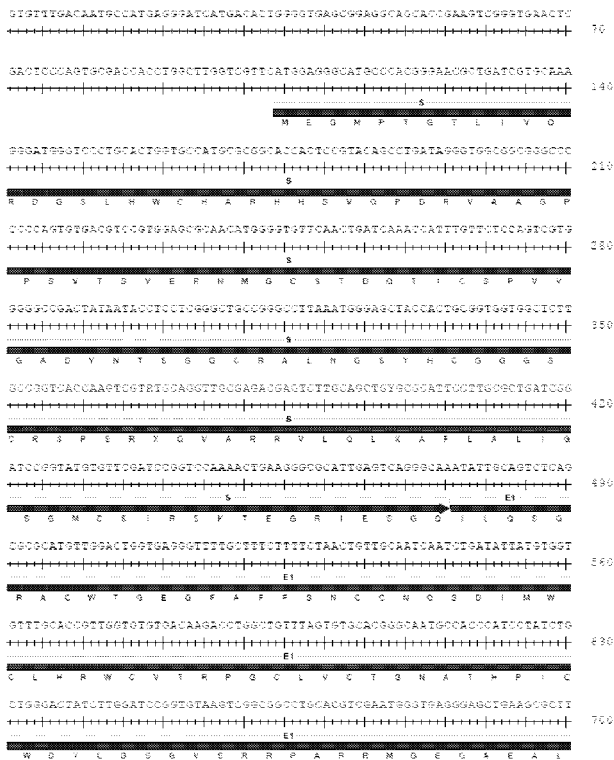
RPDADTETAAVQRLYQACADSGIFASLQGTASAALGKLADSPGASQVLAADAPPSPAPLVQVLFQFLETNFSIASIF
GLLCAGCQAGCECFALAGLVSGATAGLGGAHKLLAIACTWLVLSLQTCSPGGWVAGLSILAGCCIGSVTGLDLPLFGC
LITGREAVVGAAVATQKILSGSADMITLVDLPLALFSPGAGIAGIVLFIILNSSVVTTANRLLSMCAKQITICENYFL
SERFGQLSKLSLWRSVYHQAQAREGTTCCG

NS 4 B 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 5549-6334

【図 3 A】

FIG. 3A

ヒトベギウイルス 2 (UC0125.US) 弱毒化ゲノム



【図 2 C】

FIG. 2C

NS 5 A タンパク質および遺伝子配列

NS 5 A アミノ酸配列：（配列番号 10）

VISGWSFALCILRAVWDNAKHVPRFVPMIGCSFANCGRWLGTGTLLTTCACGERVSLQCLGCTSDPQLSVGRWC
RCSKSVGFPFNPPTTGTGLRDPISDANKLGRFYGVADIVELERRGDKHVCASCCDLDRASVASAVKAPPVANGI
PNSFSPPTQYCLSLCSFDTVCMSTNLCPAKTILSVQCQEEAVELLEETVDITAQVMSQNLAAARRAEYDAWQVRQAV
GDEYTRLADEVDMTASVKPPVARAAVGSSTLDDVSVLTVLRELGDQCNALKFVWQASRFVPPVPRTRVSGVL
BRVRCMRTPPKFEATAVPIHNIIPPECHIVLRCTGCCQDALTPYGC'SLT.TKYLTNKHSHYIPKEKIEEDTEI
AVICAVPTKRASKLITFRAGDRSVSCCHPLQTPIRALLQYVGLPIGWSDCKGPLGDDARVCDVNGVTTYEPC

NS 5 A 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 6335-7708

NS 5 B タンパク質および遺伝子配列

NS 5 B アミノ酸配列：（配列番号 11）

MQSYNWFRSIVAPTTPPLPATRSVAGILRADTSRVYTTTAVDVSEQRQKVTIDQKSAKVQDCLRDTYNCLAKAKTF
RQSGMSYEDAVSKMRANTTDRHNGITYTDLVSGRAKPVVQKIVDQMPAGVYDAFMRILPKPEVFERDKSTRKEPFF
IVFGCAARVAEKMLIGDPGAITKHVLGDAGYFATPPHERARLLEQWNRATEPQA.LAVDAVCFDSITAEUMDREA
NIVAAHATDPEGVHGLYNYKRSNMDITGKVVGRVSCRASGILTTSSGNILTCYLKVRACRAGIKPIGLLIHGD
DTLII TERCAQETLDEFNALDDYGFHTMQVSGDLSIECCSARVDSVCLRGGMRRMLVPQARRAIRVLEKGD
LGVISSYIVMYPTAAVTVVYVLMPLCMLIRNEPSQTGTVLTVLTVHGSVSVSPVLLPTIIANLHGRDALQVVRHSA
SMALSLAALFFGMRGLNCRVRRRAIRTDIMKLGGMNANFQMLLWSPVEPTQPEPEKGMCLLPEELWERPVENLH
LSTIDNRGASLRFWLVASAILALLCL

NS 5 B 遺伝子配列：配列番号 1 のヌクレオチド 7709-9409

5' UTR 配列

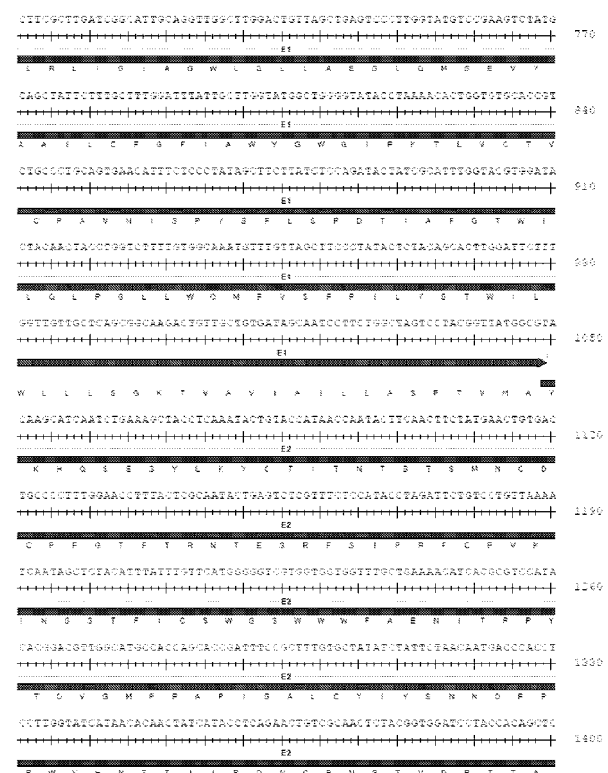
5' UTR 配列：配列番号 1 のヌクレオチド 1-103

3' UTR 配列

3' UTR 配列：配列番号 1 のヌクレオチド 9410-9778

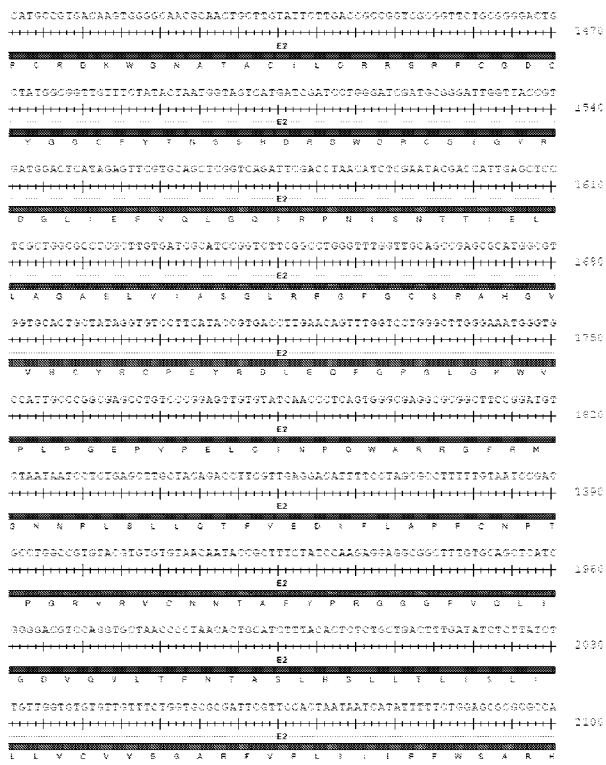
【図 3 B】

FIG. 3B



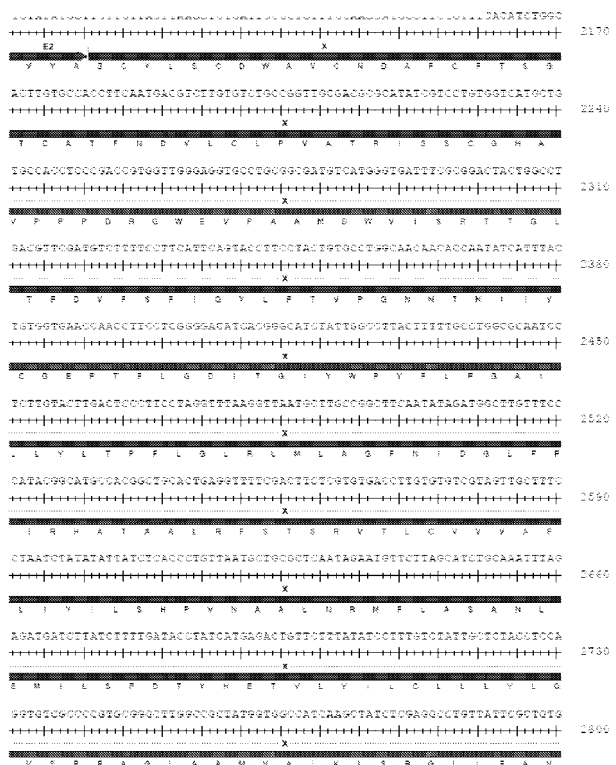
【図 3 C】

FIG. 3C



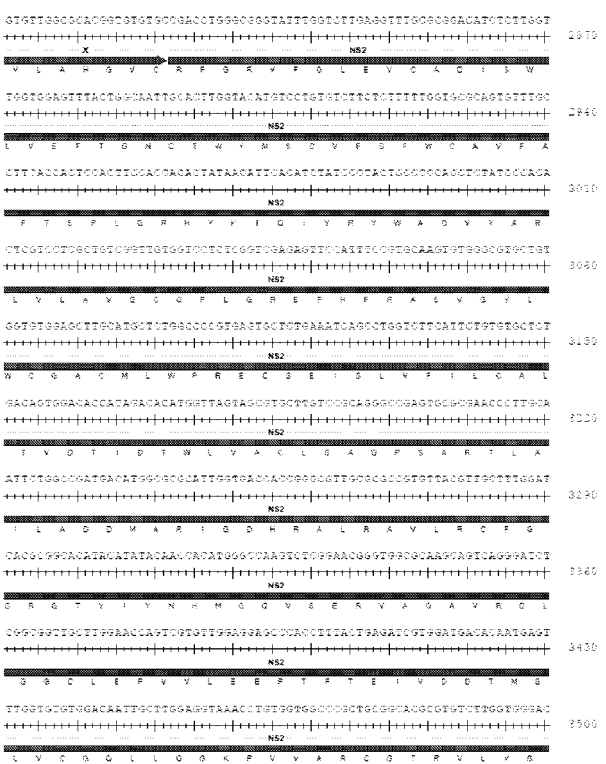
【図 3 D】

FIG. 3D



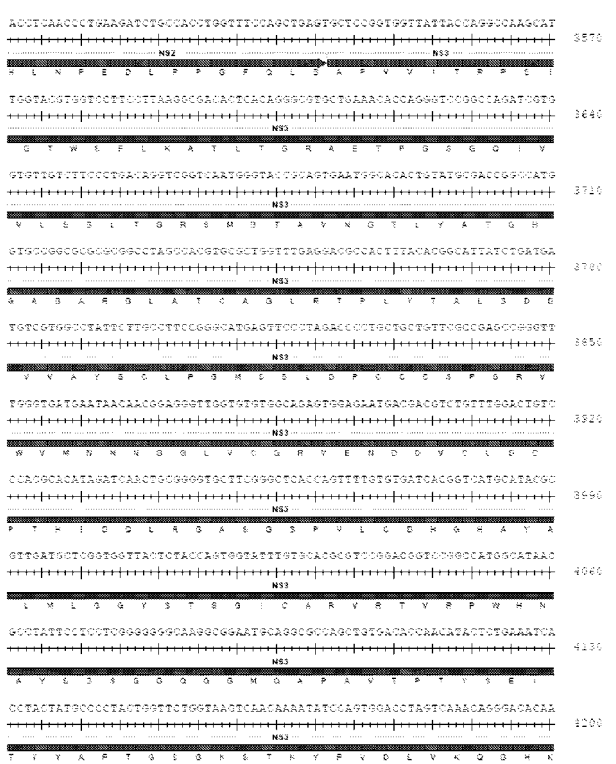
【図 3 E】

FIG. 3E



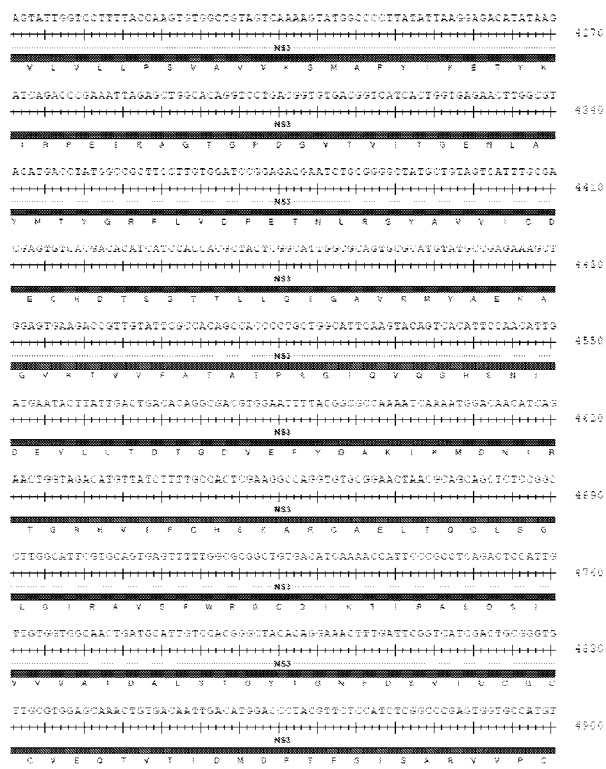
【図 3 F】

FIG. 3F



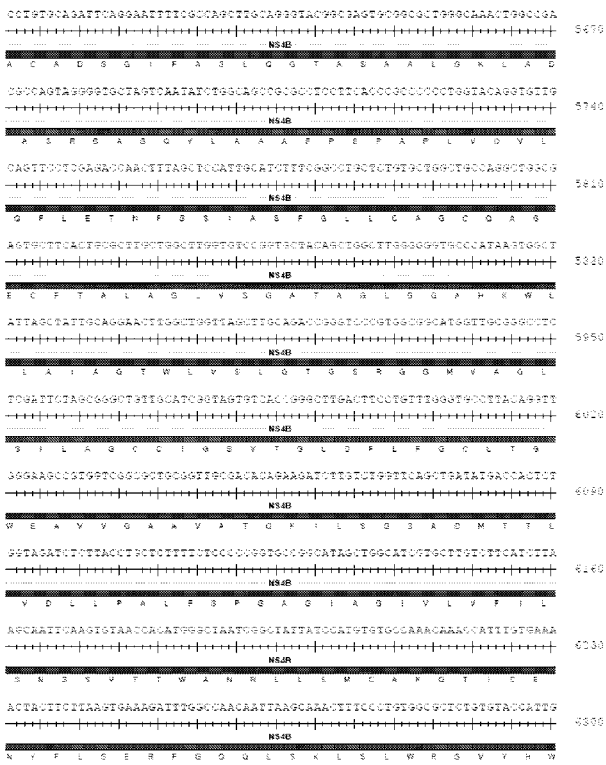
【図 3 G】

FIG. 3G



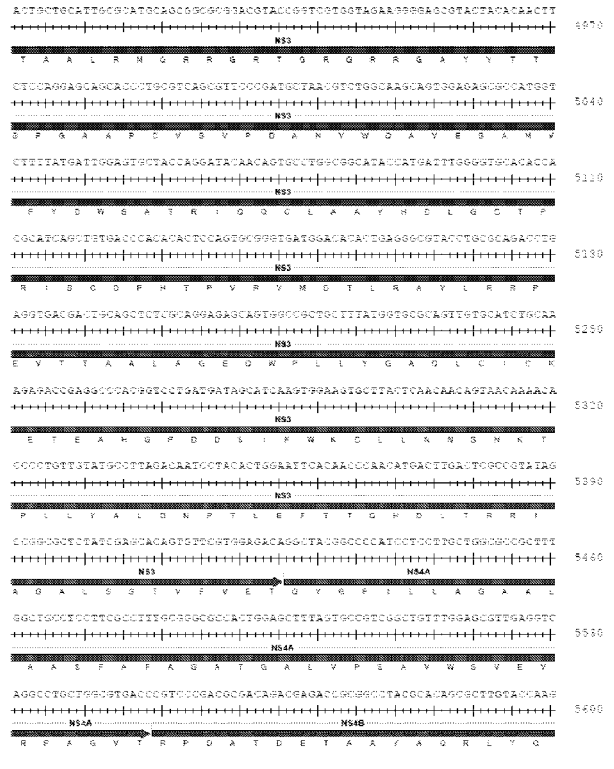
【図 3 I】

FIG. 3I



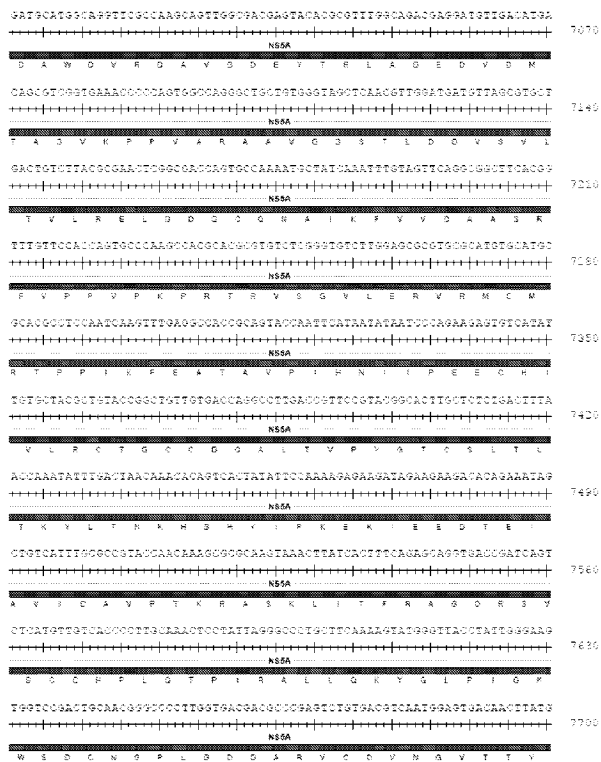
【図 3 H】

FIG. 3H



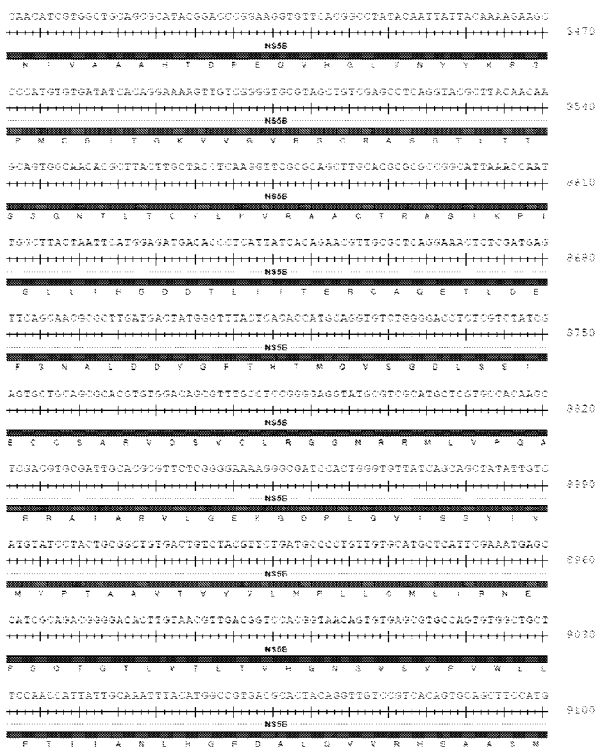
【図 3 K】

FIG. 3K



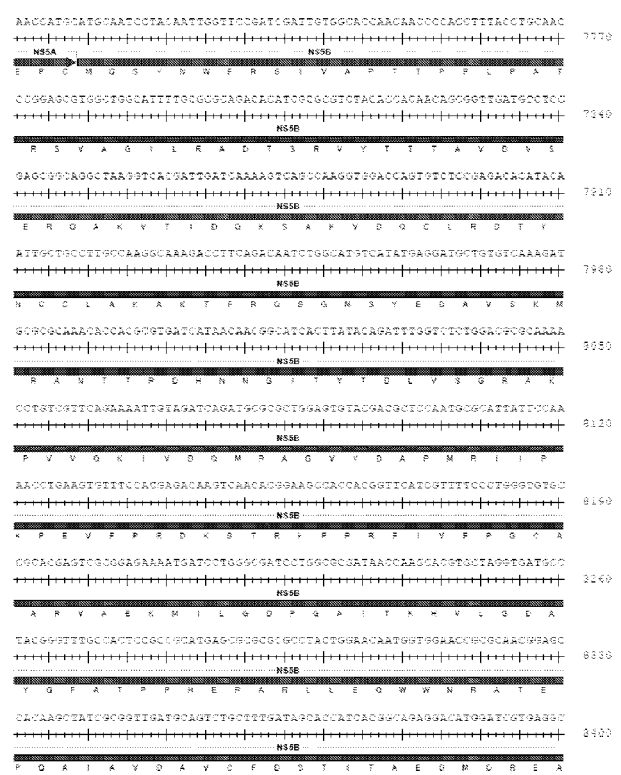
【図 3 M】

FIG. 3M



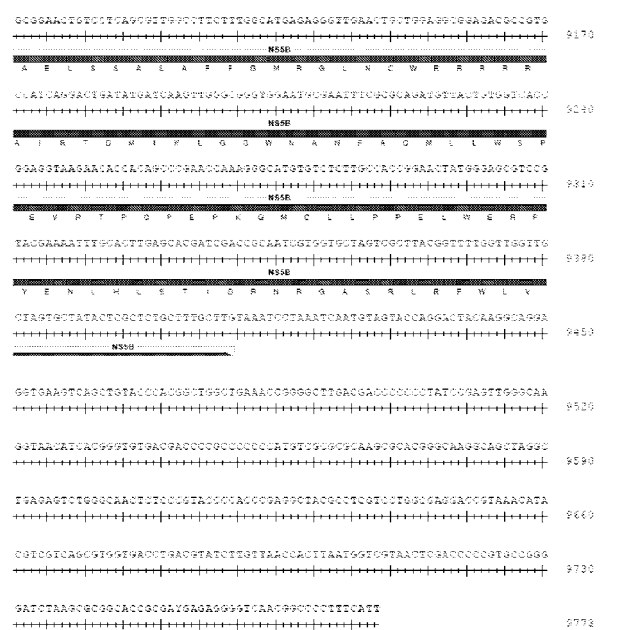
【図 3 L】

FIG. 3L



【 図 3 N 】

FIG. 3N



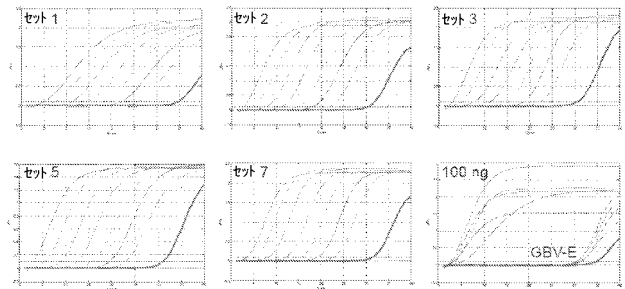
【図 4】

FIG. 4

CCACCGGGCGTTGCGCGCCGTTACGTTGCTTTGGATCACGCGGCACATACATACAACACATGGGCCAAGTC
 TC6GAACGGGTGGCGAAGCAGTCAGGGATCTCGCGGTTGCTTGAACAGTCGTTGGAGGAGCCCAAGCTT
 ← フローブ 5R ← セット 5 Rev
 TACTGAGATCGTGGATGACACAATGAGTTGGTGTGGGACAATTGCTGGAGGTAACCTGTGGTGGCCGCTG
 セット 2 Fwd → ← フローブ 2R
 CGGCACGCGTGTCTTGGTGACACCTCAACCTGAAGATCTGACCTGCTTCCAGCTGAGTGCTCGGTGGTT
 ← セット 2 Rev + セット 7 Fwd → フローブ 7F →
 ATTACCAGGCCAAGCATTTGGTACGTGGTCTCTTCTTAAGGCGACACTCACAGGGCGTCTGAGAACAGAGGTCTG
 ← セット 7 Rev
 GGCATGGTCCGCGCGCGCCCTAGCCACGTGCGCTGTTGAGGACGCCACTTACAGGCATTATCTGAT
 GATGTCGTGGCTATTCTGCTTCCGGGATGAGTCTCTAGACCCCTGCTGCTTCCGCGAGCGG6TTGGG
 セット 4 Fwd → ← フローブ 4R セット 3 Fwd → ← セット 4 Rev
 TGATGAATAACAACGGGGTTGGTGTGGCAGAGTGGAGAGTACGACAGCTCTGTTGGACTGTCCACGAC
 ← フローブ 3R ← セット 3 Rev
 ATAGATCAACTGCGGGTGTCTCGGCTCACAGTTTGTGTGATACGGTCTGTCATACGCGTTGATGCTCGGTG
 GTTACTCTACCAATGGTATTGTGCACGCTCCGACGGTCCGGCCATGGCATAACGCTATTCTCTCGGGGG
 セット 15 Fwd →
 GCAAGGCGGAATGCAGGCGCCAGCTGTGACACCAACATCTCTGAAATCACTACTATGCCCTACTGGTCTGGT
 セット 15 フローブ → ← セット 15 Rev
 AAGTCAACAAATATCCAGTGGACCTAGTCAACACAGGGACACAAAGTATTGTTCTTTTACCAAGTGTGGCTGTAG
 TCAAAAGTATGGCCCTTATATTAAGGAGACATATAAGATCAGACCCGAAATTAGAGCTGGCAGAGTCTGACG
 GTGTGACGGTATCATCTGCTGGTGAAGTGTGGCTACATGACCTATGGCCGCTTCTTGTGGATCCGGAGACAACT
 セット 1 Fwd →
 GCGGGGCTATGCTGTGTCATTTCGCGACGAGTGGTACGACACATCATCCACACGCTACTCGGCATTGGCCAGT
 ← フローブ 1R ← セット 1 Rev
 GCGCATGTATGCGCGAAGAGTGGAGTGAAGACCTGTTGATTGCCACAGCCAC

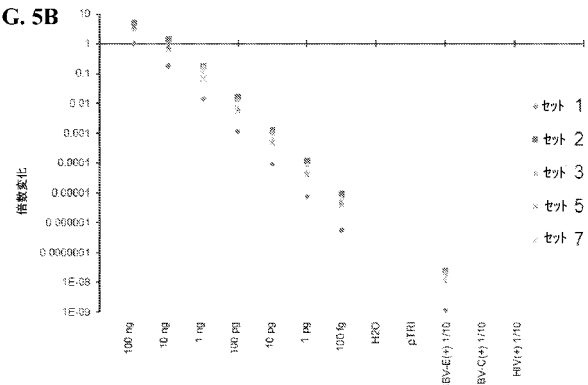
【図 5 A】

FIG. 5A



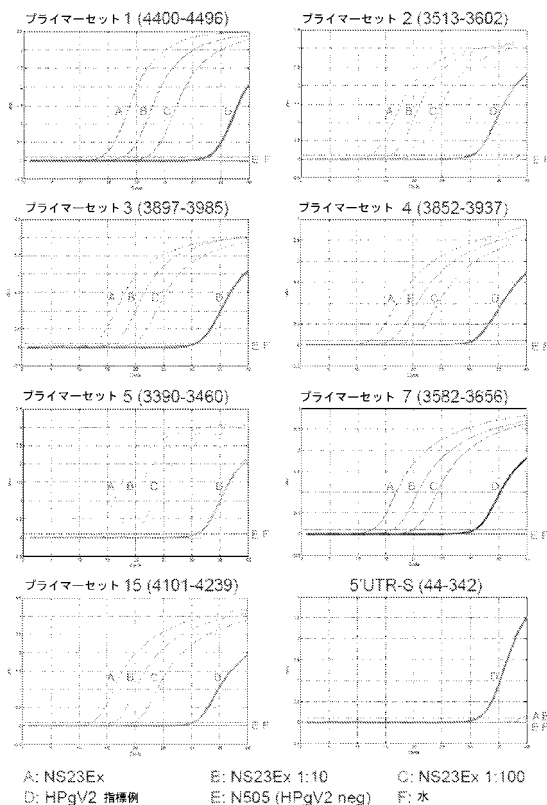
【図 5 B】

FIG. 5B



【図 6】

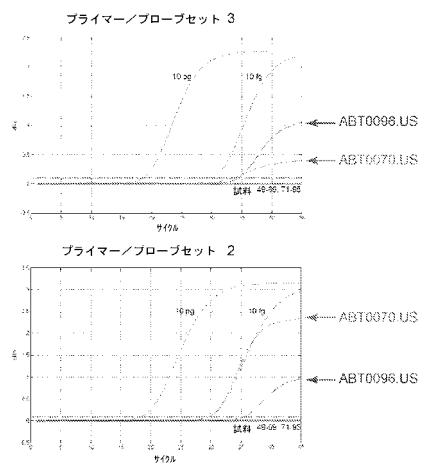
FIG. 6



【図 7 A】

FIG. 7A

ProMedDx (HCV+) #70 & #96

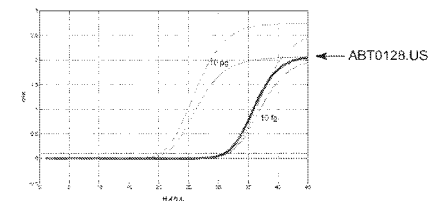


【図 7 B】

FIG. 7B

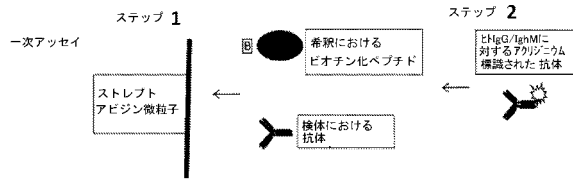
米国赤十字社 (HCV+) #128

プライマー/プローブセット 2 & 3



【図 8】

FIG. 8



【図 9 A】

FIG. 9A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0070P, US) 核酸配列一配列番号 75

```
1 GTGTTTGAGC TGTGACATG CCAATGACGGA TCAATGACACT GGGGTGAGCG GAGGAGAGCA
61 CGAAGTCGGG TGAACCTGAC TCCAGTGGG ACCACTGGG TTGGTGGTTC ATGGAAGGCA
121 TCCCCACGGG AACGCTGATC GTGCAAGGG ATGGGTGCTCT GCACCTGGTG CATCGCGGGC
181 ACCACTCCGT ACAGCTGTAT AGGGTGGCGG CGGGCCCCCC CAGTGTGAGC TCCGTGGAGC
241 GCAACATGGG GTGTTCAACT GATCAACACA TTTGTTCTCC AGTCGTGGAG GCGGACTATA
301 ATACCTCTCT GGGCTGCGGG GCCTTAAAGC GGAAGTACCA CTCGGGTGGT GGGCTTGGC
361 GGTCAACCAAG TCGTGTGCAAG GTTGCAGGAC GAGTCTCTGG GCTGTGGGCA TTCTTGGGCG
421 TGATCGGATC CGATATGTGT TCAATCGGCT CCAAAAATGA AGGGCGGATT GAGTCAGGCG
481 AATATATGCA GTCTCAGCGC GCATGTGGGA CTGGTGAAGG TTTCCTTTTC TTTTCTAACT
541 GTTGAATGCA ATCTGACACT ATGTGGTGT TGCACCGTGT GTGTGTGACA AGACTGGGCT
601 GTTGGTGTGT CACGGGCAAT GCCACTCATC CTGTGTGTGT GGACTATCTT GGGTCCGGGT
661 TGAGTCGGCG GCTTGGGCTT CGAATGGGTC AGGGAGCTGA AGTGTCTCTT GGGTGTGATC
721 GATGTGTGGA TGGCTCGGG CTCTTACGTC AGGCTCTTGG TATGTCTGAG ACTATAGGAG
781 CTTCCTTTTG CTCTGGATTG ATGCTTGGGT ATGGCTGGGG CTATGCTTAG ACTATGGTGT
841 GCACAGCTCT GCGTGAAGTG AACATTTCTC CCTATAGCTT CTTAICTCCA GATACTATCG
901 CATTTGGTAC GTGGCTACTA CAAGTGGCTG GTCTTTTSTG GCAAATGTTT GTACGTTTCC
961 CTATACTTTA CAGTACTTGG ATCTTTTGGT TGTGTCTAG CGGCAAGACT GTTGCTGTGA
1021 TAGCGATCCT TTTGGCTAGT CTAAGGTTTA TGGCATACAA GCATCAAGCT GATAGCTACC
1081 TCAAAATAGT TACCATAACC AATGCTTCAA CTGTACTGAA CTGTGACTGC CCGTTTGGAA
1141 CTTCCTACTG CAATACTGAG TCTGGTTTCA CTATAGCTAG ATTCCTGCTC GTTAAACTTA
1201 ATAGCTCTAC ATTATCTGT TCAATGGGGT CGTGGTGTGT GTTGTGTGAG AACATCACAC
1261 GTCCATACTC GAGACTTTGG ATGCGCGGAC CACCGATTTC CGCTTGTGTC TATATCTATT
1321 CAAACAAATG CCACTCTTCT TGGTATCGTA ACACAACATP CATACTCTAG AACTGTTCAC
1381 ACTCTACGGC TGATCTTACC ACAGCTCCAT CGCGTGACAA GTGGGGCAAT GCAACTGCTT
1441 GTATTCTTGA CGCGCGGTGC CGGTTCTGGC GGGACTGCTA TGGCGGTGGT TTCTACACTA
1501 ATGTTAGTCA TGACCGATCT TGGGATCGAT GCGGAATTGG TTACGCTGAT GAGCTCATAG
1561 ACTTCTGTGA GTGTGTGAGC ATTCGACTTA ACATCGGCAA TACGACTCTG GAGCTCTGCG
1621 CTGCGGCTCT CTTCTCTGAT CATTCTGCTG TATGCTGCTG TATGCTGCTG ATGAGAGGAG
1681 AGCGGCTGTG GACTGCTTTP AAGTGTCTCT CATACGCTGA CTTTAAAGCG TTGCGGCTCT
1741 GCGTGGGAA ATGGGTGGCA TTGCTGGGCG AGCTGTGCTC GAGTGTGTGT ATTAACCGCG
1801 AGTGGGCGAG CGCGGGCTCT CGGGTGTCTA ATATCTCTTT AAGCGTGCTA CAGACTCTCG
1861 TTGAGGACAT TTTCTTAGCG CTTTCTGACA ATCCGACGCG TGCGGCTGTA CBTGTGTGTA
1921 ACAATACTGC TTTCTACCGC AGAGGAGGCG GCTTTGTGCA GCTCATCGGA GAGCTCGAGG
1981 GTTAAACCCG CAACCTTACA TCTTTGACTC CTCTGCTGAC TTTGATATCC CTTACTTGTG
2041 TAGTGTGTGT TGTTTCTTGG CGCGGATTTC TTCCATTGAG AATCAATATC TTCTGGAGCG
2101 TGCGCCACGT ATATGCTTCT TGTACTTAA GCTGTGATPG GCGTGTGTCG AACGATGCTG
2161 TCTGTTTTCAT ATCTGGACTC TGTGCTACTT TCAACGAGCT CTTGTGTGTC CGGTTGTGCG
2221 CGGCAATATC GTCTGTGGCG CATGCTGTGG CACCGCGCGA CGGTGTGTGG GAGGTGGCGG
2281 CAGCGATGTC ATGGGCGATT TCGCTGACTA CCGGCTTTAC GTTCGATGTC TTTTCTTCTA
2341 TCCAGTACTCT TCTACTGTG CCGCGAACCA ATTCCGATAT CATTACTGCT GGTGAACCAA
2401 GCTCTCTGCG GCGTACTGAT GGTATGACTA GCTGACTGAG TTGCGTGGCG AATGCTGCTG
2461 CTGACTTGA TCCGCTCTCG GGTATGACTT TATGCTGTGG GCGGCTTATG ATGAGAGGAG
2521 TCTTTCCCAT ACGGCTATCG ACGGCTGCAH TGAAGTCTCT GACTTGGGCT GAGACTGTGA
2581 GTGCTGTAT TGTCTTCTTA ATCTATATAT TATCTATCCG GTTATAGCTG GCGCTCAATA
2641 GATAGTGTCT AGCATCTGCA AATCTAGAGA TGACTTATC TTTGATACAC TATCATGCTG
2701 CTGCTTTTFA CGTCTTTTGT CTAATGCTCT ACCTCCAGGT GTGCGCCGCT GCGGCGTGGG
2761 CTGCTATGCT GGCAATCAAG CTAATCGAGG GCTGTGTTAT GTGCGTGGTG TTGCGGACAG
2821 GAGTGTGCGG ACCTGGGCGG GTATTTGTCT TTGAGGTTTG CCGCGACATC TCTTGTGTGG
2881 TGAGGTTTAC TGGCACTGCG ACTTGTGACA TGTCTGTGCT TCTCTCTTTT TGGTGGGCGG
2941 TGTTTGCTCT CACCACTCCA CTGTGAGGAG AGTATAAGCT TCAGATCTAT CCGTACTGAG
3001 CGGAGGCTTA TGCGAGACTC ATCTCGGCTG TCGGTTGTGG TCTCTCGGG AGGAGGATCT
3061 ATTTCCGTGC GAGGCTGGGG GTGCTCTGCT GTGTGCTTGG CATGCTCTGG CCGGCTGAGT
```

【図 9 B】

FIG. 9B

```
3121 GCTCTGAAAT CAGCTTGGTC TTATTTCTGT GTGCTGTGAC TG'GGAGACG ATGAGACATAT
3181 GGTTAGTAGC GTGCTGTGTC CGAGGGGCAA GGGCGGGAAC CCTTGAACCT CTGGCGGATG
3241 ACATGGCGCG CAT'GTGTGAC CACCGGGCGT TGCGCGCGGT GT'GGGTGTG TTTGGATCAC
3301 GTGGACATCA CATATACAA CACATGGGCG AGGTCTCAGA ACGGGTGGCG CAGCAGTCA
3361 GGGATTTCGG CGG'GTGCTTG GATCAGTGGG TGT'GGAGGA GCGCACTTAT ACTGAGGTCG
3421 TGGATGATAC AATGAATTTG GTGTGTGAGC AAT'GTCTTGG AGGTAACACC GTGGTGGGCG
3481 GCTCGGGCAC GCG'GTCTTA TGTGGGACAC TCAACCTTGA AGACCTGCGA CCGGTTTTC
3541 AGCTGAGTGC TCCGGTGGTT ATTACCAAA CAAACATTTG TACGTGGGCC TTCTTAAAGS
3601 CGACACTCAC AGGGCGTGTG GAAACAACCG GATCCGGCCA GT'CGTGGTG TTGCTTCTCC
3661 TGACAGGTCG GCTCAATGGT ACTGCAAGTA ATGGCAACT CTATGCGAAC GGGCAAGGTC
3721 CTGGTGGCGG CGCGCTTGGC ACTGTGGCTG TTTGAGGAC CCACTTTTAC AGCGCAATTA
3781 CTGAAGATGT CGTGGCTTCT CTCTGCTTTC GGGCATGAG CTCCCTTAGG TCTCGCACT
3841 CCGCGCCGCG CCGGCTTGG TGTGTGAGA ACACAGAGG GT'GGTGTG CCGAGAGTGS
3901 AGAAGACGCA CGTCTGTTTG GGTGTGCGCA CGCAGATAGA TCAACTGGGG GGTGCTTGG
3961 GGTGGCGGGT TTTGTGTGAT CAGGTCATG CATACGGGT GT'CGTGGT GGTCTACTCA
4021 CCASTGGTAT TGTGTGGCGT GT'CGGATAG TCCGGCCAIG CGAGAACGCC TATTCTOCT
4081 CAGGGGGGCA AGGCGGAATG CAGGCGGCGT GTGTGACACC AACATCTCT GAAATCACT
4141 ACTATGCCCC TACTGGTCTT GGTAAATCAA CAAAATATCC AGTGGACCTA GTCAAGCAGG
4201 GACACAAAGT ATTAGTCTCT TTACCAAGTG TGCTGTCTGT CAAAGATATG GCTCCTTACA
4261 TTAAGGAAAT A7ATAGATT AGACTGAAA TTAGAGCTGG CACAGGGCTG GACGGTGTGA
4321 CGGTCAATCA TGGCGGAGAA TTGGCTGAGA TGAACATTTG CCGT'TTCTCT GTAGATCCGS
4381 AACAAGATCT GCGGCGTTCG GCTGTAGTGA TCTCGGACGA GTCCATGAC ACATCATCA
4441 CCACTGCTCT CGGACTCGCG GCGTGTGCGA GTATGCTGA GAAAGCTGGA GTGAAGCGG
4501 TTGTATTTCG CACAGCCACT CCGTGTGCGA TTCAAGTGCA GTCAATTCOC AACATTGAT
4561 AATATCTATT GAGTGTAGTA GGGGAGTGT AAT'CTACGG GGTCAAAAT AATTTGAGCA
4621 ACATGAGAGT GTATGTAGAT GTATCTTTT GGCACGAGA GCGCAGTGT GCGGACTTGA
4681 CGAGGAGCT CTCCGGCTCT GGTGTCTGCT CAGTGAATTT TTTGGCGGCG TGTGACTCA
4741 AGAGCATTCC CCGCTCAGAG TCTATTTCTG TATGTGGCAAC TGAATGATGT TCCAGAGCT
4801 ACACAGGGAA CTT'GATTTG GTCAATGACT GCGGGTGTG CT'AGAGACA ACTGTACAA
4861 TTGACATGGA CCGCAGTTC TCAATCTCGG CCGGAGTGTG GCAATGCACT GCTGCAATTC
4921 GTATGCAAGC GCGCGGACGC ACCGCTGTG GTAGGAGGG AGCTACTTAC ACACCACTC
4981 CAGGAGCAGC ACCCTGCTGT AGCTTCTCCG ATGCTAACGT CTGGCAATCA GTGAGTCAAG
5041 CCAATGCTCT TATGATTTGG AGTGTGCGCA GGATAGAGCA ATGCGTGGCG GCATCCACTS
5101 ATTTAGGCTG CACACACCGC ATCAGTGTGT ACCCACACAC TCCGATCGGG GTGATGGACA
5161 CACTGAGGGG GTATCTCGCG AGACTGTGAG TGACGACCGC GGCTCTGCGA GGAAGACAGT
5221 GCGCGCTGCT TTAGCGGCTG CAGTGTGCGA TCTGCAAAAG GACCGAGGCC CACGGTCCAG
5281 ACGATGGCAT CAGTGGAACT TGTACTACTA ATAAACAAA CAAAACACCC CTGTTGTAT
5341 CTTAGACAGA TCTTACTACT GAATTCACCA CCAACATAGA CTTGACTGCG GGTATAGCTS
5401 CCGTCTTATC CAGCAGACTG TTCTCTGAGA CAGGCTACGG CCGCATCTCT CTCCCTGGCG
5461 CTCTCTTGG TCCCTCTTCT AGCTTTGAGA CGACACTGAG AGCTTGAAG GCTCGGCGCT
5521 TTTGAGAGTG TGAACACGGG CTCTCTGGCG TGAACGCTCT CAGTGGGACA GAGGAGCTG
5581 CGGCTACGCG CAGCGCTTGG TACCAAGCTG CGCAGATGTC GCAAGTGTG CCGACTTGT
5641 AGGTTACGGG GAGTGGGCGA CTGAGGAGAG TGCCGATGCG CAGTAAAGGT CTGATGCAAT
5701 ATCTGGGAGC CGCGGCTCTCT TCGCGCGGCG TCGCTGTGTA GGTGCTGCGA TTTCTGAGAA
5761 CCAATTTTAC CTCAATGCGA CTCTTCTGCT GTCTGTGTG CCGCTGTGAG CCGCGCGAGT
5821 CCGTCTACTG TATGATTTGG TGGTGTGCGA GTGCTACAGG TGGCTTGGGA CCGCTGTGCG
5881 AGTGGTGTGT GAGTATTTGA GAACTTGGG TATGTTAGCT GTGAGTGGG CCGGCTGGCG
5941 CCGTGTGTTG GCGTGTGCTT ACAGTGTGGG AGGCGGTGGT CCGTGTGCGG GTTGCAGCG
6001 ACTTCTGCTT TGGGTGCTTT ACAGTGTGGG AGGCGGTGGT CCGTGTGCGG GTTGCAGCG
6061 AGAAATCTT GTGCTGTGCG GTGATGACTA CCACTCTGCT AGATCTCTCA CTGCTCTCT
6121 TCTCCCTGCG CCGCGGACTA GCTGGGCTG TGTGTGCTCT TATTTAAAG AACCTAAGTS
6181 TACCAATGTC CTAATTTGCG CTATTTGCGA TGTGTGCAAA CAAACTAATT TGTGAATAAT
6241 ACTCTTATAC TGAGAAATTT GGGCACACAT TAAGCAAACT TCCCTGTGGG CCGCTGTGCT
6301 ACATTTGGCG GAGGAGAGCT GTGCTGAGG TGTGCTGAGG CCGCTGTGCT GAGTGTGCT
6361 GCTTGTCTCT GTGACTTCTA CGTGTGTGCT GGAATTTGGG GGTCAAACT GTGCAAGGT
6421 TCCGCTGTGC TATGATTTGG TGTCTACCTG CBTGGTGGCG GCGCTGTGCT GTGACTGCGA
```

【図 9 C】

FIG. 9C

```
6481 CTTTGTGTGAC CACCTTGGG TGTGGAGAAC GTGATATCCT TCAGTGCCTT TGGTGGACAT
6541 CTGACCCAACT ACTCAGTGTG GCGGCTGTGT GTTGGTGTGT TGGGTTCCAT GGGTTCACAT
6601 TCAACCCGAG GAGCAGAGCG ACTCGGACTT TACGCGCGGA CATCAGTATC GCGACCAAA
6661 TGGGCTTCCG GTATGGTGTG CCGGAGATGT TGGAGCTAGA GCGGCGGGCG AACAAATGGC
6721 ATGTGTGTG AGCATCATGT TGT'GTGAAC GGGGAGAGCT TGCATCTGCG GTGAGGGGCG
6781 CACCGGTCAC GCGCGATGCG ATACCTATCA GTACCTTTTC TCCACCACCA ACTATCAAC
6841 TCTCTCTTTG TCTCTTTTAT TCAGTTTGA TGACTACTTA CTATGATTA CCGTCAAGA
6901 CCGTGAAGTG GTGCTGCGAG GAGGCTGTGT AGCTACTTGA AGAAACAGCT GACAGAGAC
6961 AAGTAGTGAT GTGTCAAAAT TGTGAGGCG GAGAGCGCGG TGAAGTTGAT GCAATGCAAG
7021 TTGCGGAGCG AATTGCGGAG GAGTACAGCG GTTGTGCGGA CGAGGATGTT GACGCGAGCA
7081 CTTGCTGTGA ACCCGGCTGT CCGAAGCGCT CTGCGGATGT CCGGACTTGT GATGATGTTA
7141 GCGTGTGCGG TGTCTGCGG GAGCTGGTGT ACCAGTGCCA AATGCTATC AATTTGTGAT
7201 TFCAGGGGCG TGTGCGGAGT TGTGCGGCG GCGGAGCG AGGAGAGCT GTCTGGGCTG
7261 TGTGAGGCG TGTGCGGAG TGTGCGGCG TGTGCGGCG TGTGCGGCG TGTGCGGCG
7321 TACCAATTCA TGAATATATC CCAAGAGAGT GTCACTATGT GCTAGGCTAT ACAGGCTCA
7381 AGGACAGGCG CTTGACTGTT CCGTACGCGA CTGACTACTA GCTTAACT GAGACTTGA
7441 CTAGTAAACA CAGTCACTAC ATTCCAAAC AGAAGATAGA AGAGGACAGA GAGTACTGT
7501 TCAATTTGCG CGTACCAACA AGCGGCGGCA GAAACTACT CACATTCAGA CGAGGTGATC
7561 GATCAGTCTC ATGTTGTGAC CCGTGTGAAA CCGCTTATAG GCGGCTGCTT CTAAGTAGAG
7621 GGTACTACTAT CCGGAAGTGG TCTGACTGCA AGGCGGCTCT TGGTGAAGT CTGCGAGCT
7681 GTGAGCTCAA TGGAGTAAAC ACTTATGAGC CATGCAATCA ATCCATAGCT TGGTTCGAG
7741 CGATTGTGCG ACCAACACCC CCGCTTTTTC GTGCAACCG CAGCGTGGCT GGCATTTTAC
7801 GCGCAGACAC ATCGCGGCTT TACACACAAA CCGGCGTGTG CCGTCTCGAG CCGCAGGCGA
7861 AGGTCACAA TGAATCAACA TCAGCAGAG TGGATCAGT TTTCCGAGAC ACATCAACT
7921 GCTGCTTGTG TAAGGCAAGG ACCTTCAAGC AATCTGAGCT GTCAATGAGT GAGTGTGTGT
7981 CAAGATGCGG CGCAAGCTCT ACAGCTGAGC ATACAGAGCG CATCACTTAT CATGATTTGG
8041 TCTGTGAGCG CCGAAGACT GTCTGTGAGA AATTTTAA TCAATGCG GCGGAGTGT
8101 AGGAGGCTCT GATGCGGATT ATCCAAAGC CTGAAGTCTT CCGTGGAGC AAGAGACAC
8161 GGAAGCGCAC GAGGTTTATC GTTTTCCCTG GGTGCGGCGG GCGAGTCCG GAGAAATAGA
8221 TCGTGGGTGA TCTTGGCGCG ATACCAAGC AGCTGTGAG TGAATGCTAC GGGTTTGCA
8281 TCTGCGCGCA TGAGCGCGCG CCGCTGTGTTG AACATGTTG GAGCCGCGCA CCGGAGCGA
8341 AAGCTATGCG GTTGTGATGT AT'CTGTTTGT AATGACCACT CAGCGAGAG GACATGGAT
8401 GTGAGGCTAA CATCGTGGCT CGAGCGGATA CCGAGCTTGA AGGTGTTTAC GGCCTATATA
8461 ATTTATACAA AAGAGAGCCC AT'GTGTGACA TCAAGGAGAA GGTGTGCGA GTGCTTGTCT
8521 TCGAGGCGCT GGGTACGCTT AACACAGCA GTGCAAGCAC GCTTACTTTC TACTTAAAGT
8581 TCGTGCAGC TTGACGCGCT CTGCGCATTA AACCAATTTG CTACTTAAT TACTGAGATG
8641 ACACCTCAT CTGTACAGAA CGTTGCGCTC AAGAGACTCT CGATGAGTCT AGCAAGGCTC
8701 TGTGATGATA TGGGTTTCCA CACACTATCC AGGCGTGTG GAGCTCTGCT CTATGAGAT
8761 GCTGTAGGCG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG AGGCTGTGAG TATGCTGTG AGTCTGTG
8821 CAGAGTGTG AGCTGTGAG GAGAGGCTG TCGGAGGCTG TCGGAGGCTG TCGGAGGCTG
8881 TCGGTAGTGT TGTGTGATG TATCCGCTG CCGGCGGCTG GTCTGTGAG GTCTGTGAG
8941 TGTGTGTGAT GCTCATPAGA AATGAGCACT CAGAGCGG GAGACTTGTG ACTCTGCGG
9001 TCCAGGCTAA CAGTGTGAGT GTGCGAGCTG GCGTGTCTCC AACCTCAT GCAATTTTAC
9061 ATGGTGTGTA CCGCATPACG GTAGTCCGCT ACAGTGTGAG TATGCTGAGG TACTTGTAGG
9121 CAGGCTTGGC CTTCTTTTGG ATGAGAGGCT TGAATTTGCT GAGGCGGAGA CCGCGTGTCT
9181 TTAGGGCTGA TATGATCAAG TCAGGCGGCT GGAATTTGGA TTTGCGGAG ATGTTACTGT
9241 GGTCAACGGA GTTAAGRACA CCAACACCGC AACCAAGGCG TGTGTGCTT TTGCGCGCG
9301 AACTGTGGGA GCGTCCGCTG GAAATTTTAC ACTTGAAGG GATGACCGCG AATCGTGTGT
9361 CTAGTGCCTT ACGGTTTGGG TGTGTGCTA GTGCTATACT CCGTCTGCTT TGTGTGATA
9421 TCTTAAATGA A
```


FIG. 11V

[illegible]

FIG. 11W

[illegible]

FIG. 11X

[illegible]

FIG. 11Y

【図 1 2 A】

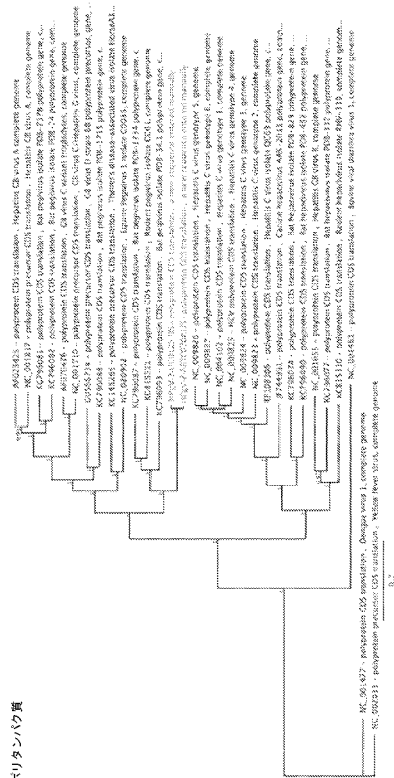


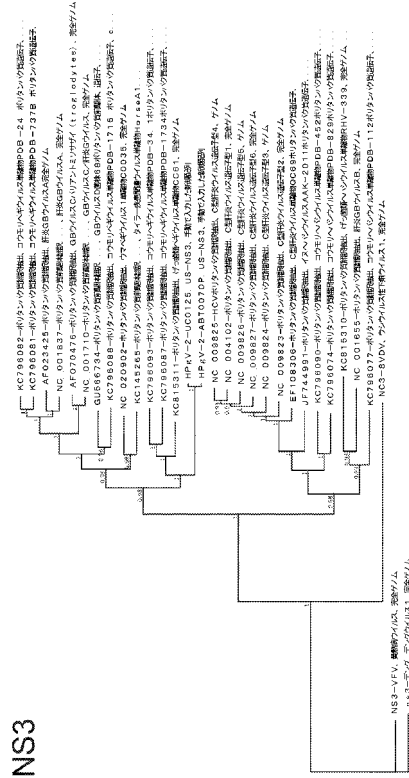
FIG. 12A

ポリタンパク質

31 種のフラビウイルスポリタンパク質の系統発生分析

FIG. 12B

NS3



31 種のフラビウイルス NS3 タンパク質の系統発生分析

【図 1 2 C】

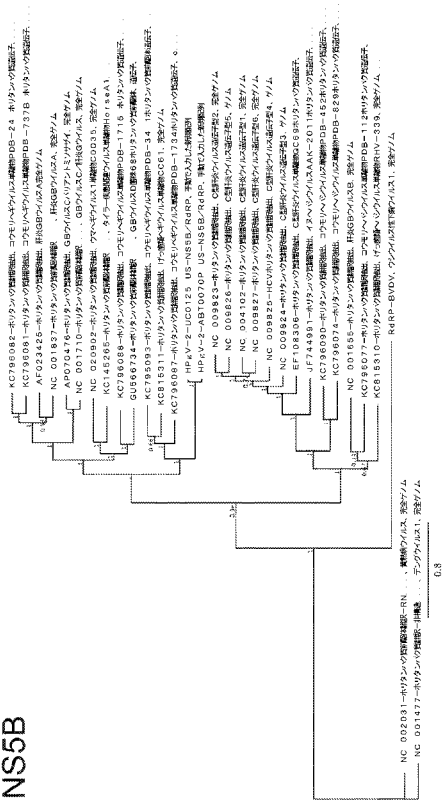


FIG. 12C

NS5B

31 種のフラビウイルス NS5B タンパク質の系統発生分析

【図 1 3 A】

FIG. 13A

ヒトベギウイルス 2 (コンセンサス配列) 核酸配列一配列番号 2 9 9

1 AACTGTGTTGT GTAGCAATGCG GCATATTGCTT ACTTCGGTAC GGCATATTGG TAGGGGCGCCG
61 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
121 CTGGGGTGTG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
181 GCTTGGTGTG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
241 CTGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
301 CCGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
361 CCGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
421 CCGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
481 CCGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
541 CCGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
601 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
661 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
721 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
781 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
841 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
901 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
961 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1021 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1081 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1141 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1201 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1261 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1321 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1381 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1441 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1501 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1561 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1621 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1681 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1741 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1801 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1861 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1921 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
1981 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2041 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2101 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2161 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2221 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2281 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2341 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2401 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2461 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2521 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2581 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2641 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2701 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2761 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2821 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2881 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
2941 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
3001 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
3061 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
3121 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
3181 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
3241 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG
3301 GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG GCGGACATGCG

【図 1 3 B】

FIG. 13B

3361 GTGTTCGGTT GCTTTGGATC ACGTGGCACA TACATATACA ACCACATGGG CCAGGTCTCA
3421 GAACGGGTGG CCGAACGAGT CAGGAGATCT GGGGTGTGCT TGGAAACAGT CGTGTGGAG
3481 GAAGCGACCT TACCGAGAT CTTGGAGATGAT TGGTGTGTGG AAGATGTGAT
3541 GGAGGTAAAC CCGTGGTGGC CCGCTGCGGC AGCGGTGTCT TGGTGGGACA CTTCAACCCCT
3601 GAAGATCTGC CACCGGTGT GTCCTGGGTGG TTA"TTACCA AACAAGCATTT
3661 GGTACTGTGT TCTCCTTTAA GGGGCACTCT ACAGGGGGTG CTGAACACAC XGGATCGGCG
3721 CAGATCGTGG TGTGTCTCTT CTTGACAGGT CGGTCATGG GTACTCGAGT GAATGGGACA
3781 CTGTATGCGA CCGGCTATGG TCGGTGGGCG CCGGGCTTAG CACGTGGCG TGGTTGGAG
3841 AGCGCACTTT ACAGCGAGT ATCTGATGAG GTCGTGCTCT ACTCTTGCCT TCGGGGACG
3901 AGTTCCTTAG AGCCCTGCGT CTGTTTGGCG AGCGGGTGT GGGTGMTGA CAACAAGGGA
3961 GGTGTGGTGT GTGGCAGAGT GGGAGAAGAC GAGCTGTGTT TGGACTGTCC CACGCACA"TA
4021 GATCAACTGC GGGGCGTTC GGGGTACCG GTTTTGTGTG ATCAAGGTCA TGCATAAGCG
4081 TTGATGCTCG TGCTTACTCT TACGACTGGT ATTGTGGCG GTGTCGGGAT AGTCGGGCGA
4141 TGGCAGAGCG CTA"TTCTCT CTAGGGGCGG CCGAGCGGAA TCGAGGCGCC AGCTGTGACA
4201 CGACATACT CTGAATTCAC CTACTGTGCG CTTACTGTGT CTGTGAGTG ACGAAATAT
4261 CCGATGGACC TAGTCAACAA GGGACACAAA GTATTGTCTC TTA"ACCAAG TGTGGCTGTCT
4321 GTCAAAAGTA TGGCCCTTTA CATTAAAGAG ACATAAAGA TTAGACTGGA AATTAGAGCT
4381 GGCACAGBGC CTGAGGGTGT GAGGCTGATC ACTGTGAGA ACT"GGCGTA CATGACCTAT
4441 GCGCGCTTCC TTGTGGATCC GGAGACAGAT CTGCGGGTGT ATGCCGTAGT CATTTGGGAC
4501 GAGTGGCACC ACACATCATC CAGACAGCTA CTGCGCATTT GCGCAGTGCG CATSTATGCC
4561 GAGAAAGCTG GATGTAGAG CTGTGTATTT GCGCAGGCGA CTCCTGCTGG CATCTAGTA
4621 CAGCCACATC CCAACATTGA TGAATTATTA TTGACTGACA CAGCGAGCTG GGAATTTCTAC
4681 GCGGCCAAAA TCAAAATGGA CAACATGAGA ACTGTAGGAC ATG"TAATCT TTGCAACTCG
4741 AAGGCGAGGT GTGCGGAATC AACCGAGCAG CTCCTCGGCC TTGTTGTTCG TCGAGTGAAT
4801 TTTTGGGCGG GCTGTGACAT CAAAACCATT CCGGCGCTGAG ACTCTATTGT TGTAGTGGCA
4861 ACTATGATC TGTTCACAGT CTACACAGX AACTTTGATT CGCTACTGCA GTGCGGGTGT
4921 TGGCTAGAGC AAGCTGTGAT GTTACTGACT GCGCTTAGCT TCTCCTATCC CCGCCGAGTG
4981 GTGCGACTGA CTGCGGATC GCGTATGAG CCGCGGGGAC GTACCGGGTG TGGCAGAAGG
5041 GGAGGTACTT ACACAAAGTA CAGCAGAGCA GCACCTGCG GTACGGTTC CGATGCTAAC
5101 GTCTGGCAAG CAGTGGAGAG CGCGATGGTC TTTTATGATT GAGTGTCTCG CAGGATACAX
5161 CAGTGGCTGG GCGCATACCA TGATTAAAGG TCGACACGAC GCA"CAAGTG TGA"CCACAC
5221 ACTTCAGCTG GGTGATGAGA CACATGTAGG GGTGATGCG GCAAGCTGGA GTGTGACACT
5281 GCGGCTCTCG CAGGAGAGCA GTGGCGCTCG CTTACGGTG TTTACGGTG CATCTCGAAA
5341 GAGACCGAGG CCGACGGCTC AGACAGTXXC ACTAAGTGA AGTGT"TTACT CAACAACACT
5401 AACAAACAC CCGCTGTTGA TGCTTAGAGC AATCCATAC TGAATTCAC TACCACACAT
5461 GACTTGCTCT GCGCTATAGC CGGCGCTTTA TCGAGCAGC TGT"CTGGA GACAGGCTTAC
5521 GCGCCATCC TCTTGTCTGG CCGCGCTTTG GCTGCTCTCT TGGCTTTGG GGGCGGCACT
5581 GGACTTTTAS TGCGGTGGCG CGTGTGAGC GTTGACAAGG GGC"TTGCG GTGAGCGCT
5641 CUGAAGUGGA UAGAGAGAGC CGCGGCTAC GGGUAGGCT TTATCAGAG C"TGCGAGAT
5701 TCAGAGTTX CCGCGAGCTT GCGAGGAGAG CCGAGTGGCG CCG"KG9CA ACTCGCGCAT
5761 GCGCATAGGG GTGCGAGTCA ATATCTGGCA GCGCGGCTC CTTGCGCCGC CCGCCTGGA
5821 CAGGTGCTGC AGTTCCTXGA GACCAACTTT AGCTCCATTC CATCTTTCGG TCTGCTGTGT
5881 GCTGCTGTCT AGGC"GGCGA GTGCTTCACT GCGCTTGCG GTG"GTGCT CGGTGCTACA
5941 GGTGCTGTCT GAGG"GGCGA TAAAGTGGTG TTAGCTATTC CAGGACCTG CATAGTATAG
6001 TTGCAAGCTG GCGCCCGTGG CCGGACTGCT CCGTCTTAG AGGTGTTTGC
6061 ATGCGTAGTG TCACCGGGCT TGACTTCTGT TTTGGTGGC TTA"CAAGTT GAGGGCGGTG
6121 GGTGCTGTCT GCGT"GGGAC ACAGAGAGAT TTGCTGGTT GCGCTGATAT GACCACTCTG
6181 GTGAGTCTCT TACC"GTCTCT CTTC"CCCC GGGGCGGGA TACTGGCAT CATGCTTTCG
6241 TTTATTTTAA CAACTCAGG TGTATCAAGC TGGGTAATG GGC"ATGTC CATGTGTGCA
6301 AAGCAACATA TTGCTGCC ATCTGCTTTA ACTGAGAT TTGCGCACA ATTAAGCAAA
6361 CTTTCTCTGT GAGCTCTCTG GTACCTATGG GCGGAGGAC GTGAGGATA CACAAGACT
6421 GSGTGGSTCA CCGGGATCTG GAGCTTTTGC TTGTGCATTC TACGCGCTGT GTGGGATTGG
6481 GCGCGXAAAC ATGTGCGACG GTTCGCTGTG CTTATGATTG GCTGCTACAC TCGSTGTGTC
6541 GGGCGCTGGC TTGGTACCGG CACCTTTGTT ACCACTGTG GTGTGGAGA ACGTGTGTTC
6601 CTTGAGTGCC TTGCTCAAC ACTCAACCCA AACTCAAGTG TGGCGCGTG GTGCTGGTGT
6661 AGTGTGAGG TTTGCTGCC ATCTACAGCG ACTACAGAG CCA"CGGAC TTTCAGGCG
6721 GATCATAGT AGCGCATPAA ATGTTGGTTC CGATGTGGTG TTGCGGAGAT C"TGAGGACA
6781 GAGCGGGGGG GCGAACAATG CAGTCTCTGT GACAGCATC GTTGCTTGA GTTGTGCGAG

【図 1 3 C】

FIG. 13C

6841 GTTGCAATCG CCGTGAAGCG CCGACCGGTC ACGGCCAATG GTA"AGCTAT CAGTACCTTT
6901 TCTCGACACG AAACCTACAG CCGCTCTCTC TGTCTTTTGG ATTCAGTTTG CATGTCTACT
6961 AACTTATGTA ACCGACTACG GACCCCTGAGT GTGTGCTCX AGGAGCGTGT TGAAGCTACG
7021 GAAGAACAAG TTGACACAGC ACAAAGTAATG ATGTGTCAA ATC"GGAGCG GCGAAGACGC
7081 CGXGAGTAGT ATGCA"GGCA AGTTGCCCAA GCACTTGGCG ACGAGTACAC GCGTTTGGCA
7141 GAGCAGGATG TTGACACGAC AAGCTCGGTT AAGCCCGCGG TGGCGAGGCG TGTGTTGGGT
7201 AGCTACAGT TGAATATBT TAGCTGTCG TGCTCTCTTG ACGTCTCTTG GCGACAAHGC
7261 CAAATGCTA TGAATTTGT AGTTCAAGCG GTTTCACGTT TGT"TCAC AGTGGCGAG
7321 CCGACGACGC GTGCTCGGG TGTGTGGAG C"GTGCGGCA TGTGCA"CGC CACGCGACA
7381 ATCAAGTTTG AGGCCACCGC AGTACCAATC CATACATAA TCCAGAAGA GTGTCAACTT
7441 GTGCTACGCT GTACCGGCTG TAA"CGACAG CCGCTTGACTG TTCGTCAGC CACTTGCATT
7501 CAGACTTTAA TCAAACTTT GACTACAAA CAGAGCCACT ACATTTCCAA AAGAAGAGTA
7561 GAGAGAGCA CAGAGTAAC TGTCTATTGG GCGTACAAA CAAGAGCGCG AAGTAACTC
7621 ATCACTTTCA GAGCAGGTGA TCGACAGTC TCGTGTCTC ACCCTCGCA ACTTCTATTT
7681 AGGCCCTTGC TTCTAAAGTA CCGGTTACCT ATCGGGAAGT GGTCCGACTG CAACGGGCGC
7741 CTTGCTGAGC AGCCCGGAGT CTGTGAGCTC AATGGAGTAA CAACTATGTA ACATAGCA"TG
7801 CAATCTTACA GTTGGTTTUC ACCGATTGTG GCACCAACAA C"CACTCTTT ACGTGAAC
7861 CCGAGCGTGG CTGCACTTT AGCGCGAGAC ACMTCGGCG TTTACACAGC AAGCGGGT
7921 GAGCTCTCG AGCGGAGGC TAAAGTCACA ATGATCAAA CATCA"CCAA GGTGATAGC
7981 TGTTCUGAG AGCAATACAA TTGCTGCTT GCTAAAGCAA AGACCTTGA ACATCTCGC
8041 ATGTCAATG AGAATGCTGT GTCAAGAATG CCGCGAACA CACCGCGTGA CCAATACAA
8101 GGCATCACTT ATTCAGATT GTTCTCTGA GTCTCTGGA C"GTGCTTGA GAAATTAAX
8161 GATCAATGCT GCGCTGAGT GTACGACGCT CCAATCGGCA TTA"CCCAA ACCTGGAAGTG
8221 TTCCCTCGAG ACAAGTCAAC AGCGAGGCA CCGCTGCGC TCGTTTCCC TGGTGGCGC
8281 GCGCGGTGCG CGAAGAAAT GATCTGGGCG GATCTGGCG CATCAACAA CAGAGTGTGA
8341 GGTGATGCTT ACGGTTTTC CACTCCGCGC CATACGAGCG CCGCTGATT TGAACATGG
8401 TGAACCGCG CAACGGAGCC ACAAGCTATC GCGGTTGATG CGA"CTGCTT GATGAGCAC
8461 ATCA"CGGAC AGGACATGGA TCGTGAGGCC AACTCTGGS CTGCA"GGCA TCGGACCT
8521 GAAAGTGTTC AGCGCTATA CAATTATTAC AAAAAGAGCC CCA"TGTTGA CATCACAGGA
8581 AAGTTTGTG GGGTGGCTTG CTGTGAGCG TCGAGTACG TTACACAGC CAGTGGCAACT
8641 AGCTTACTT CTA"CTGGA GTTGTGGA GTTTCAGC GCGCGGAC CCGCGGACAT
8701 GCGTCTTAA TTCA"TGGA TGAACGCTC ATTATACAGC ATTAATGCG CCGAGAACT
8761 CTGAGTAGT TCAGCAACGC ACTTATGAC TATGGTCTC CTCACACTC CAGGTGTCT
8821 GGGGAGCTCT CGTCTGTGGA GTGCTGTAGC GACAGCTTGC ACGCGTTTG TCGCGGGGA
8881 GGTATGCTCT GCATGCTCGT GCGACAAGCT CGACGTGCGA TCGACGCTT TCTCGGGGA
8941 AAGGGGATC CACTGGTGT CATCGAGC TATATTCTA TGTATCTTAC TCGGCGX"TG
9001 ACTGTACTT CTA"CTGCG GTTGTGGA GTTTCAGC GCGCGGAC CATCAACAA
9061 GCGACACTTG TACAGTGAC GGTCCACGCT AACAGTGA CCGTCTACT GTGCTGTCT
9121 CCAACACTCA TTGAAATTT ACATGGCGCT GACGAGTAC AGG"TGACG TCACAGTGCA
9181 GCTTCTATG GGAATGCTG ATCAGCGTTG GCTTCTTTG GCG"TGAGAG GTTGAATCT
9241 TGAAGCGGGA GACCGCGTGC CATCAGGAC GATATGATCA AGT"GGGCG GTGGAATGCG
9301 AATTTGCGCG AGATGTTACT GTGTCACCG TCGAGTAGA CACACACCC CAGACCAAG
9361 GGTATGTGCT TCTTGGCAC GGAATATG GAGCTGTG AGGAGTCTCT AC"GAATTT CAGTGTGAG
9421 AGCATGACG GCAATGTGG TGTAGTGGC TTAGGCTTG GTTGGTTGG TAGTGTATA
9481 CTGCTGCTG TTTGCTTGA AATCCTAAT CAA"TGATTA CAGGAGTAC AAGGCGAGG
9541 GTGAAGTCAG CTGATCCAC GCGTGGCTGA AGCCGGGCT TGA"CGACCC OCTATTCGA
9601 GTTGGCGAAG GTACATCAC GGGTGTGAG ACCCGCGCCC CCGATGTGCG GGTAAAGCG
9661 ACGGCGAAG CAGTATGCT GAGGCTTGG GCACTTCTC CTGACTCCAC CCGAGGCTAC
9721 GCGTGTGCT GCGAGGAGC GTAAATAC ATCTGAGC GTGCGACTG CCGATCTG
9781 TTAACCACTT AATGTGCTA ATCGAGCCC CCGTCCGGGG ATC"TAAGCG GCGAC"CGGA
9841 TGAAGGGGGT CAACGGCCCC TTTCAT

【図 1 4 A】

FIG. 14A

ヒトベギウイルス 2 (コンセンサス配列) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR 配列

5' UTR 配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 1-327

Sタンパク質および遺伝子配列

Sタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 304)

MGSTDDYICSPVVGDYVTSQCTRALNGYVHCGGGSGRSGVQVARRVLQCAELALIGSGMGIKNTGRIEISGQ

Sタンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 328-564

E1タンパク質および遺伝子配列

E1タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 305)

ILQSGRAC"CGEAFPGSHOCQSDINMKLHWCV"FGDCLTQGHATHFV"XDYLSGVGVSRRPRRHQEGAEVLRLE"GIAGGGLLAALAG
NSEIYAILCGPIANYGGIERTLACTVCFAVHISFYSFLSPDTAFGXTLQLPGLWQHVEVF"FIYGVTHLXLLLSGKTVAVAILLAS
PTTHA

E1タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 565-1137

E2タンパク質および遺伝子配列

E2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 306)

YKHQSKSYLYCFLIHASTANLDCPPGTPPHH"KFSFIPFPCC"PKXNS"FKICSGSG"KWKAKHITR"YCD/GXPPAPIGALCYLYSLCP
PPHYHITTI"LPQICHSVTPTAPTRONKHGATACLLDPRSPGCGTGGXPTNGHDSKSDCSIGVROGLIEFYQIGIRPHIS"ITTE
LLAGAGLVAIGLREGXGCGRAHDVHVCRCPSVSDLEGXGPG"KXVLPJGSEVPELICI"PKCARPGFPHQIHPLSLLT"FEVDEIFLAFECI
PTPGRVCHITAFYPPGGGPG"QITSGVQVTPHTASIHSTCTIGLITLMVUSGAP"VPLTITFKSARHVA

E2タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 1138-2199

Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 307)

SCYLSGCAW"NDAPFPGSGTATPDLVLC"PVATRIC"SSCGHNVPP"PRGNEVPRAMHGVIG"STGLTFDVG"FXLYLTP"PRHITCTIIVCGE
PTFGDITG"YVPTLPGVLLLYLTPFGHLLHLAGHLLG"EPHIMTAALPSTSRVTLVS"VAKFAYILGHP"VIALHMHV"ASGANGMI
LSVDYTHYLVKLVCLVLYVS"FGHLAGLAAHVALKLMGMLFAVLAHVC

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

【図 1 4 B】

FIG. 14B

NS2タンパク質および遺伝子配列

NS2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 308)

RGRVPGLEVCADIGWLEPTGICTWYMSGVFQWCAVFAFTGFLGRQVILQI"VRYAQV"XARLILAVSGELGRFIFRAGYGVNLCAGML
NPRECEILSVTILCALITYDVT"JFVWVACLCA"CFEARTLATLA"DHARALRAVLR"CGRGRTYI"NHKQV"SGR"VAGARVRLCGCLSP
VYLESGPTTFEXVDTNHLVQSLGSGR"VAVKSTRWLXGLHPELDPPHGLS

NS2タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 2911-3630

NS3タンパク質および遺伝子配列

NS3タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 309)

APVITKPGITGWFLATLKGAE"TFQSGC"VVLSSLTGRQMGTAH"GTLYATG"HGAGAGBLATCAGLSTLTALSD"VAVYSCLPQSGSL
EPKXCS"PRVXV"MIINIGLVCGRVXNDVCLDPTHTDLPAGAGSPVLC"DHGHAYAIM"GGYSTGICARV"VYPQV"YAYSSS"SQGSMQA
ZAVPTPTGSEITYAPTSUGGTFK"FEVLDKQGHRLVLLIGVATVGH"PLTETVCR"RETRAGTDPGQTV"TGELILATVYGRPLVD"ET
HLRQYAVICCBHDTGCTLLCGAVKSHAKV"LVVLPATPGIGV"PHNHL"DEILITPGV"FEYFAD"VLLITQGH"RGRHVT"FEHZA
RCABLTQQLSGGLVRAV"FEKQCDIET"PADCE"VYVATDALC"TVYGHDP"VLDCC"QVYTHIMDDTFC"DAKV"VCTAALMHQBRSCD
GRGRAGYTTT"FEAGRCVS"VQALVQAVES"MVFYDKGALRI"VQCLJAYHLOCTPR"ISCD"HTPRVMTLRYLR"FEVIT"NALAGEW
ZLLYV"VQACI"CESTASAGFPD"JLXEWCLHRSIKI"PLLYALD"HT"KFTVHDLTFR"ALAGLSSTVYVVT

NS3タンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 3631-5514

NS4Aタンパク質および遺伝子配列

NS4Aタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 310)

GYGPILRAGALAAEFAPAGACGALVFSRVKSVDEGLAGVT

NS4Aタンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 5515-5637

NS4Bタンパク質および遺伝子配列

NS4Bタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 311)

RPCATTAAYVAG"PLVQACSGGXACLGSTACAAKLKLDASRGAGQYLAAP"PDAPV"OVVOFLBT"IFGGLADFP"LLCAGCGAGBCFCTP
ALGVGNTALGSGARHMLAN"CLWLSLQIGRSGH"VLSGLVLAOCIGSYTGLDPLFC"LTGHEVW"GAATPQKILSGADMTLVDLLP
ALFSGAGLAGV"LVLEILSUSVST"XWHLLS"XAKQV"CHYFLTKR"FPQQLSK"JLWRSYXHAQAR"SPVTCG

NS4Bタンパク質遺伝子配列: 配列番号 299 のヌクレオチド 5638-6423

【図 1 4 C】

FIG. 14C

NS 5 A タンパク質および遺伝子配列

NS 5 A タンパク質アミノ酸配列：(配列番号 3 1 2)

VVGGIADPVLICILIRAVDAKAMVPEFPPFMIIGCFEAFGRGLSTGTLCTCGCGEPVGLQCLCTSDFTLVGRKNCNGSVGFUPTTTA
TTRIRPDTRATKIGFVGVYAKIVLEIRRRGDKKHYCAACGCLDRAGVAGVAKPPLTAHRTPTSTFSPQTYISLGLGSDVSTGTLCHPAK
TLCVQDQAEVLEETVDTAQIHQOUEARRPPEYKAWQVAGGCEYTPLADEIVOTTGPPFVAPAAVGSGLDDEVGLTVLPELSDQC
QIRKPVVQAAARFVPEVPPPTPVGVLEVRKHMPTPFPEFAVFPDHLIPBECITVLACTGCIUQALVFGYCTQTLLRELTIRHSH
YIPRQKIESETVETVLCVPTFRASGLITPRAGSDVGRVCHPLTTPFALSLRFVLPJGRKSDCHWPLSDGRVCDVNSKTTVEK

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

NS 5 B タンパク質および遺伝子配列

NS 5 B タンパク質アミノ酸配列：(配列番号 3 1 3)

HQCYXKPEPVAPITPPLPATFQVAGILRADTSRYVYITAVDVDERGAKVTDQGTAEVQCFEPTYHCLAKAMTFPGGHSVEDAVGRRA
UTTRUHDGTTGLVLDGPAKGVVQKLVLMRAGVLAAPKILPKPVFPFRKSTPPKPIVFPGLAARVAEEMILGLPGALTKEVLDGDAY
FATPHEPARFLLEKQKRAETPQIAVVRNICFDQITAEQDREHIMAAABHDQBOVHGLVYIYKRDHCDITGCVYCYRCCRAQDUTATSS
GHTLLCYLVRAACTPACTPFGSLHUBDPLITFENCAUELDFEHLDDVFTHTQVGGADPLQVCEKARYGDCVLEKGRNMLFQAR
RATVAVLGRGSDPLGVICSTVYVHPZAVNVVLLPLCLMLPIRPSGTQTLVTCVBRGIVSVPVSLPTLITLMLRBDLLCVVPRASNAHA
ELGALAPFQRRLGWKRRRRAIRTOHKLGSNIAIFACQKLLASPEVVDKPEPVGKCLXPELWEPYHILHLSITDRUGASRLRFVLA
SAILALLCL

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

3' UTR 配列

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

【図 1 5 A】

FIG. 15A

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

1 AACTGTGCTT GTAGCAATGC GCATATTGCT ACTTCGGATG GCTCAATTGG TAGCGGCCG
61 GCCGACCGGG CCGGACAGGG CCTAGTAGGA CGTGTGCAGA GTCATAGCAA GATCATGCAA
121 CTGCGGGTAG CGGAGGCGAG ACCGAGGTGC GGTGCACTCG ACTCCGAGTC CGACCACTCT
181 GCTTGGTCTG TCATGAGGAG CATGCCACAG GGAACGCTGA TCGTGCAGAG GGAATGGGTCC
241 CTGCACTGGT GCCATGGGCG GCACCACTCC GTACAGCTTG ATAGGGTGGC GCGGCGGCCG
301 CCGAGTGTGA GTCCTGTGGA GCGCACATG GGGTGTTCAG CTGAPCAAGC CATTTGTTCT
361 CAGTGTGTC AGCGCTGACT TAATAGCTCC TCGGCTGTC GGGCTTAA TGAGAGATC
421 CAGTGGGTG GTGGTCTTTC CGGTGACAGA AGTCTGTGTC AGSTTTCAG AGAGTGTCTG
481 CGGCTGTGCG CATCTCTTGC GCTGATCGGA TCGGCTATCG GTTCCATCCG GTCCAAAAT
541 GAAGGGGCGA TTGATCGAGG GCAATATTG CAGTCTCAG GCGCATGTG GACTGTGTAG
601 GGTTTCGCTT TCTTTCTTAA CTGTTCGAA CTGTCGAA TTAATGTGG TTTCACGGT
661 TGGTGTGTGA CAGGACCTCG CTGTTTGGTG TCGACGGGCA ATGCCACTCA TCTGTGTGCG
721 TGGGACTATC TTGGTTCGGG TCGAGTCGG CGGCTGTAGC GTCGAATGG TAGAGGACT
781 GAAGTGTGTA GTTCCGTGAT GCGCATGCA GGTGGCTCG GGTCTTACG TGAAGTCTT
841 GGTATGCTCG AGATCTATGC AGCTTCTCT TGGTITGGAT TTAATGCTTG GTATGGCTGG
901 GGTATACCTA AGCATTTGGT GTGCACATGC TCGCCCTGCA TGAACNTTTC TCCCTATAGC
961 TTTCTATCTC CAGACTACTAT GCAATTGGT ACGTGGCTAC TACAATGCC TGGTCTTTTG
1021 TGGCAAAATG TTGTGAGCTT CCTATACTT TACAGTACTT GGAATCTTGT GTTGTGTGTC
1081 AGCGGCAAGA CTGTGCTGY GAGAGGATC CTTHGGCTA GTCCCTAGGT TATGGCATAC
1141 AGAGTCAAG CTGTGACTA CTTCAATAC TGTACATAA CGATGCTTC AACTGCTATC
1201 AACTGTGACT GCGCTTTTGG AACTTTCAT CTGCAATATC AGTCTGTGTT CATGTAACCT
1261 AGATTCTGCT CTGTAAATC TAATAGCTCT ACAATTACT GTTCAATGGG GTCTGGTGG
1321 TGGTITGCTG AGAACATCAG ACCTCCATAC TCGGACGTTG GCAATGCCG AGCACGATTT
1381 TCCGCTTTGT GCTAATCTA TTCAACAAAT GACCCACCTT CTGTGTATCG TAACACAAT
1441 ATCATACCTC AGAATCTGTA CAATCTAGC GGTGATCTTA CCAACAGCTC ATGCGCTGAC
1501 AGTGGGGA ATCTCTGCT TGTATTCTG AGTGGCGGT TCGGGTCTTG TAAATATCC
1561 TATGGCGGT CTCTCTACAC TAATGTAGT CATGACGAT CTTGGGATCG ATGCGGAAT
1621 GGTATACCTG ATGGACTACT AGAGTTGTG CAGCTCGGT AGATTCGAC TAAATCGCG
1681 AATACGACA TTGAGCTCTT CCGTGGCGCC TCGCTGTGGA TCGCATCCGG TCTTCGGGCT
1741 GGGATATGTT CGACGGGAGC GCAAGCGCTG GTGCACTGCT TTAAGTGTCC TCTACACGCT
1801 GACCTTGAAC GTTTCGGGCC CGGGCTTGG AATGGGTGG CATTCGCTG GAGACTCTGC
1861 CGGAGTGTG GTATTAAAC CGAGTGGGCG AGCGCGGCT TCGGGTCTTG TAAATATCC
1921 TTAAGCTGCG TACAGACCTT CGTGAGGAC ATTTTCTTAS GCGCTTCTG CAATCGACG
1981 CTTGGCGGTG TACGTGTGTG TAAACAATCT GCTTTCTACC CGAGAGGAGG CGGTCTTGTG
2041 CAGCTCATCG GAGACGTCCA GGTGTAACC CCCAATCTA CATCTTTGCA CTCTCTGCTG
2101 ACTTITGATAT CCTTATCTT GTTAGGTGTG GTTGTTCG TGCGCGGAMT CGTTCGATCT
2161 GAATCATAT TCTTCTGGAG CGTGGCGCAC ATATATGCT TGTGTACTT AAGTGTGAT
2221 TGGGTGTTT GAAAGAGGCG AGTCTGTCT ACHTCTGGA CTGTGTACT CTTCAGATC
2281 GTCTGTGCT TCGCGGTGTC GCGCGCATTA TCGTCTGTG GCGATGTGCT GCGACCGGCC
2341 GACCGTGGT GGAAGGTGCC CGACGCGATG TCAIGGGGCA TGAATGGTAC TGTGGGCTTG
2401 AGCTTCGAT CTCTTCTCT CATCCAGTAC CTTCCTACT TGCTGGGCAA CAATTCGAT
2461 AICATTTACT GIGGGAAC AGACTCTTC GGGGACAICA GGGGAIICA TGGCTTAC
2521 TTTTGGCTG GATGTGTGCT CTGTGATG ACCTCGCTC TGGGTITAG GTTAAGTCTT
2581 GCGGCTGTT GTTCTGAC ATGCTGTG CCGAGGCTG CCGAGGCTG CATATATCC
2641 TCGACTTCC GTTGACTCTT GAGTGTGTA TTGTCTTCC TAACTATAT ATTATCTCAT
2701 CCGTGTAACT CTGCGCTCAA TAGAATGTC CTAGCATCTG CAATCTAGA GATGATCTA
2761 TCTTTGATA CCTATCATGA GACTGTTCT TACGTGTTT GTCATTGCT CTACTCCAG
2821 GTGTGCGGCC GTGCTGCTT GGTGCTATG GTGGCCATCA AGCATCTCG AGGCTGTGA
2881 TCGCTGTGTC TGTGGGCA CCGAGTGTGC CGACTGGG GGGATTTCG TCTGAGGT
2941 GCGGCTGCT AGTGTGCTT ACTGGGACT GCGTGTGA CATGTGCTG TGTGCGGCA
3001 GTCTTCTCT TTGCTGCGC AGCTTTGCC TCACTAGTC CACTTGGAG ACAATAGA
3061 CTTGAGATC ATGCTGACTG GCGCGAGGCC TATCGACAG TCACTCTGCC TGTGGTGTG
3121 GGTCTCTCT GGAAGGAGTT CCATTTCCG GCGAGCGGTG GCGTGTCTG GTGTGTGCT
3181 TGCATGCTT GCGCCCGTGA GTGCTCTGAA ATGAGCTTGT TGTATTACT GTGTGCTG
3241 ACTGTGGACA CTTAGAGAC ATGTTTAGTA GCGTGTGTG CCGACGCGC AAGCGCGGA
3301 ACCCTTGCAA CCTATGGCA TGACATGGC GCGATGGTG AGCAGCGGC GTTTCGGGCG

【図 1 5 B】

FIG. 15B

3361 GTGTTGCTT GCTTTGGATC ACCTGGGACA TACATATACA ACCACATGGG CCGAGTCTCA
3421 GAACCGGGTG CGCAACAGCT CAGGATTTTC GCGCGTTGCT TGGAAACAGT CGTCTTGGAG
3481 GAGCCCACTC TBACTGAGGT CGTGATGAT ACATGAATTT TGGTGTGTGG ACAATTTGCT
3541 GAGAGTAAAC CTGTGTGGG CCGCTGGCG AGCGTCTGCT TGGTGGGACA CTTAAACCTC
3601 GAGAGCTGC CACTGTTTTC CCGATGTGCT GGTTCGGTGG TTAATACAA ACCAGCTGCT
3661 GGTACGTGGC CTTTCTTAA GGGGCACTC ACAGGCGGTG TCGAAACACG GGAATCCGCG
3721 CAGATCGTGG TGTGTCTCT CCGACAGGCT CGGTCAATGG GTACTGCAGT GAATGGGACA
3781 CTGTATCGCA CCGGCACTG TCGTGTGGC CCGCGCGTAG CCACTGGCCG TGGTITGAGG
3841 AAGGACTTT ACACGGACTT ACTGAGGAT ACTGTGGCT ACTCTTGGCT TCGTGGGACT
3901 AGCTCCCTAG AGTCTGACA CTGCTGACA CCGCGGGGTT GGGTGTGAA CAACACGCT
3961 GGGTGGGCT GGGTGGGCT GGGGAGGAG GAGGAGGAG CAGGAGGAG CAGGAGGAG
4021 GATCACTGCG GGGTGGCTC GGGGTGCGG GTTITGTGTG ATACAGGCTA TGCATAGGCA
4081 TTGATGCTCG GTGGTCTC TACGACGAG ATTTGTGCG GTGTCGGAT AGTCCGGCCA
4141 TCGCAGAAC CCTATTCTC CTACGGGGCG CAACCGCGAA TCGAGCGGCC ACGTCTGAGT
4201 CCAACATAC CTGAATACG CTACTATGCC CTACTGGTT CTGTAAATC AACAAATAT
4261 CCACTGAGCC TACTGAGCA TGTCAAGCA ATATATGCT TTTACAGAG TGTGGTGTG
4321 CTCAAAAGA TTAATTTGA CAACATAGA AATATAGA TTAGACTGA AATTAGAGT
4381 GGCACAGGGC CTACGGTGT GAGGTCTAT ACTGCGAGA ACTTGGGTA CATGACTAT
4441 GCGGCTTTTC TTGTAGTCC GGAAGCGAT CTGCGGGT AGCTGTACT CATCTGCGAC
4501 GAGTGCCATG ACACATATC CACACGCTA CTGCGCATG CGGCACTGCG CATGTATGCT
4561 GAGAAAGCTG GAGTAGAGC GGTGTATTC GCLACAGCCA CTCTGCTGG CATTAAGTG
4621 CAGTCACTC CCACTATGA TGAATATCA TGTCTGATA CAGGAGACT GGAATCTGAT
4681 GCGCTTAA TPAATTTGA CAACATAGA ACTGTAGAG ATGTATCT TTGCACTG
4741 AAGGCCAGT GCTGGAGACT AAGCGACAG CTCCTCGGCG TGTGTGTTG TCGATGTACT
4801 TTTTGGCGG CTGTGAGCT CAAGGACTT CCGCGCTCAG ACTCTATTG TGTAGTGGCA
4861 ACTGATGAT TGTCCAGAG CTACACAGG AATTTGATT CCGTATTGA CTGTGGTGT
4921 TGGTATGAG AACTGTATC AATTAGATG GAGCCGACT CTCTCATCT GCGCCGAGTG
4981 GTGCTATGA CTGCTGACT GGTATGCGC GCGCGGAGC GACCCGTTG TGGCAGAGG
5041 GAGAGTACT ACACAGCA TCGAGAGCA CAGCCTCGG TCAAGCTGCG CATGTATC
5101 GTCTGCAAT CAGTGGCTC AGCGATGCT TTTATGAT GAGTGTGTC CAGGATAGAG
5161 CAATGCTGG GCGATACCA AGTTATAGG TGCATACCC GCATCGTTG TGCACACAG
5221 ACTCCAGTGC GGGTATGCA CACATGAGG GGTACTCTG CGACAGCTGA GGTGACGACC
5281 CCGGCTCTCG CAGGAGCA GCGGCTGCT GTTACGCG TCGATTTG CATTGCAAG
5341 GAGAGCGAG CCGAGCTGC AGAGCTATG ATCAGATGA AATGCTACT CATATACAC
5401 AACAAAGC CCGTATGTA TGTCTAGG AATCTACG TGAATATC TACCACTAG
5461 GACTTGACT CCGGTATAG TGGGCTAT TCGAGACAT GTTCTGGGA GACAGGACT
5521 GCGGCACTC TCGTCTGCG CCGTGTTFG GCGCTGCTCT TGGCTTTTC GGGCGGACT
5581 GGAGCTTTAG TGGCTGCG GCTTGGAG GGTGAAAGG GGCCTGCTG CBTGACCTGT
5641 CCGATGCGA CAGACGAGC CCGGCGTAC GCGCAGCGCT TGTACCAAGC CTGCGAGAT
5701 TCGAGATCT TCGCAGCTT CCGAGGTAG CCGAGTGGG CACGAGCAG ACTAGCTGT
5761 GCGATGACT ATCTGAGC ATCTGAGG CCGGCGCT CTGCGCGC CCGCTGTGCT
5821 CAGGCTGTC AGTCTGCTCA GCAATTTT AGCTTCTG CATCTTTCG TCTGCTGTG
5881 CCGGCTGTC AGCGCGGCA GACTTCACT GCGTTCGCG GGTGTGTC CAGTGTAGA
5941 CTGTGCTTGG GAGGTGCCA TAAGTGTG TTACTATTG CAGGAACTG GCTAGTATG
6001 TTGCAACTG GCGCGCTG GCGCATGTG GCGGCTCTC CAGTCTAAG AGGCTGTTG
6061 ATCGGTATG TCAAGGGCT TACTTCTG TTTGGTGCT TACAGTGT GAGGCGCTG
6121 GTGTGCTG CCGTGTGAG CAGAGAAAT TGTCTGAGT CCGTGTGCT GACTGATG
6181 GTAGACTTC TACTGTCTT CTCTCCCT GCGCGGCTG TACTGAGCT GCTGCTTTC
6241 TTTATTTCAA GCACTCAAG TGTAACTAG TGGCTAAT GGCATTGTC CATGTGTGA
6301 AAACAACATA TTGTGTCAA TACTTCTTA ACTAGAAAT TTGGCCAACTA ATTAAGCAA
6361 CTCTTCCCTGT GCGCTCTGT GTACATTTG CGAGCGGAC GTGAAGGATA CACACAGTGC
6421 GGTGTGTG CCGGAGATG GAGCTTGTG TTTGTGACT TACGTGTCT GTGAGATTTG
6481 GCGCTAAAC GGTGTGAGT GGTGTGTTG CTTATGATG CTCTGAC TGTGTGCTG
6541 GCGGCTGCT TGTGTATG CACTTGTG GCGGCTGCT TACTGAGCT GGTGTGCTG
6601 CTTACGTGCT TTGTCTGAG ACATGACCA ACATCAAGT TGGGCGCTG GTTGTGTG
6661 AGTTGGCGTG TTGGTTTCC ATTAACCGC AGCAGCAGC CACCGGAC TTACGCGCG
6721 GACATCATG AGCCACCAA ATTTGGCTT CGATGTGTG TCGCCAGAT CCGTAGACT
6781 GAGCGCGCG GCAACAAAT GCAATGCTT CAGCATCAT GCTGCTTGA CCGCGGACG
6841 GTTGTACTCG CCGTAGGGG CCGACGCTG AGCGGAGAT GCACTACTT CAGTACTTT

【図 1 5 C】

FIG. 15C

6901 TCTCCACC AAACATCAA ACTCTCTCT TGTCTTTTG ATTCAGTTG CATGACTACT
6961 AACTTATGTA ATCCAGTAA GACCTGAGT GTGTGCTCG AGGAGGCTG TGAGTACTG
7021 GAGGAACAG TTGACAGAG ACAAGTAGT ATGTGTCAA ATTCGAGGCG CGAGAGCG
7081 GCTGAGTTT GAGTGTGGA AGCTGTGAA GCAATATCG AGAGTAC GAGAGACCA
7141 GAGCAGGAT TTGAGCGAC AAGCTCGTG AATCCCTGCG TGCGAAGG TGTCTGGT
7201 AACTGACT TGATGATG TTAGGTGCT TACTGCTTC GCGAAGCTG TCACTGCTG
7261 CAAATGCTA TCAATTTGT AGTTCAGGCG GTTTCAGGT TTGTCCACC AGTGGCCAG
7321 CAGCGACG GTGCTCGG TGTGTGAG GGTCTGCGA TGTGACTG CAGCGACCA
7381 ATGAGTTTG AGGTGCGCG AGTACCAT CATGATATA TCCGAGAGA GTGTGACT
7441 GTCTGATGCT GCGGCTGCT GCGGCTGCT GCGGCTGCT GCGGCTGCT GCGGCTGCT
7501 CAGCTTTTA TCAAGACTT GACTGATCT AACTGATCT ACATCTCAA CAGAGAGCA
7561 GAGAGGACA CAGAATAT TGTCTTTTC TCGATACCA CAGCGGCGC AAGCAACCT
7621 ATCAATTA CAGCAGTGA TCGATGACT GCAATTTTC ACCCTTTAT ACCACTCTAT
7681 AGGCGCTCG TCTTAAAGT CCGGTTACT TCGTGGAGT GGTCTGACT CAGCGGCC
7741 CTGCTGAG AGTCTGAGT CTGAGACTG AATGAGTAA CAGCTATGA ACATGATG
7801 CATCTACTA GTTGGTTC AGGATGTC GCGCATGTC CCACTATG CTCTGAGC
7861 CCGACGCTG CTGGATTTT AGGCTGCTT ACTGCTGCT TTTCGCTG AAGCGGCTG
7921 GAGTCTCG AGCGCGAGC CAGGTGCA ATTTGCAA CATACGCA GGTGTATCAG
7981 TGTTCGAG ACACATCAA TTGCTGCTT GCTAAGGCA AGACTTCAG AACTGTGCG
8041 ATGCTATG AGGATGCT GTCAAGATG GTCAAGAT CAGCGGCA CCAAGCAAC
8101 GCACTACTT ATTCAGATT GGTCTCGA GCGCGAAGC CTGCTGTGA GAATTTGTA
8161 ATCAATTC GCGCGGAT TGAAGCTT CCGATGCGA TTACCCCAA ACTGAGAT
8221 TCTCTCGA ACMAAGAC ACGGAGTCA CCGAGTCT TCGTTTCC TGTGTGCT
8281 GCGGAGTG CCGGAGAAAT GATCTGCT GATCTGCG CAGTACCAA GAGTGTGTA
8341 GGTGATGCT ACGGTTTC CACTCGCG CAGTGGCT GCGGCTGT GCAACTGT
8401 TGAACCGCG CAGCGAGCT CCAAGTCT GCGTGTATG CAGTGTCT TGAAGTAC
8461 ATCAGGCG AGGACATGA TGTGAGCT AGCATGTG CTGAGCTG TACGAGCTC
8521 GAGGTGTC AGGACTATA TAATATTAC AAAGAGGCT CCAATGTA CATCAGCG
8581 AATTTGCT AGTGTGCT CTGTGCTG TCGGTATGCT TTACATAG CAGGTGAT
8641 ACCTTACTT GCTACCTTA GGTCTGCA GATTGAGC GTCCGACT TAAACACT
8701 GCTTACTA TCTATGAGA TGACACCTC ATGCTGAG AAGTGTGCG TCAAGTAC
8761 CTGATGAT TCAAGACCG ACTGATGAC GATGAGT CACACACT CAGGCTGT
8821 GGGGCTCT GTCTATGA GTGCTGAG CAGCTGTG CAGCGCTTG CTTCGCGGA
8881 GTATGCTC GATGTGCT GCGACACT CAGCTGCGA TGGAGCTG TGTGAGT
8941 AGCGGATC CAGTGGAT CATCGGAG TATTGTG TGTATCCG TGGGCTGCT
9001 ACTGTCTAG TCTATTGCT CCGTGTGCT ATGCTATAC GAATGAGC ATCAGACAG
9061 GGGACACTG TGAGCTGAG GGTCCAGG ACAGTGA GGTGAGC GTGGCTGCT
9121 CCAACCTA TTGCAATTT ACATGCTGCT GACCTACTA AGTATGCT CAGTGTGA
9181 GTTCTCATG CGGAATTT ACTAGGCTG GTCTTTTG CATGAGAG GTTAATTTG
9241 TGAAGTGA GAGCGCTG CATGAGCT GATATATCA ACTGAGTGA GTGTGAGG
9301 AATTTGCT AGTGTACT GTGCTGCT GAGTGTG CAGGACTCA CAGGAGCT
9361 GTCTGTGCT TTTTGGCG GAACTGTG GAGCTGCT GAGTGTG GACTTGA
9421 AGATGAGC GAATGTG TGTGATGCT TATGTTT GTTGTGCT TGTGATG
9481 CTGCTGCT TTTGTTGA AATCTTAA CTAGATG CAGAGTCA GAGGAGT
9541 GATGATGAT GTGATGAG GGTGTGCTA AGCGGGCT TGACGACCT CCGTATGGA
9601 GTTGGGAG GATACATAC GGGTGTGAG ACCCGGCT CCGATGCTG GGTAGGCG
9661 AGCGGATG CAGTGTG GAGTGTG GAGTGTG GAGTGTG GAGTGTG
9721 GCGTCTCT GCGGAGGAC GTAAACAT GCTCTGAG TGGGACTG AGTATGCTG
9781 TTAACACTT AATGTGTA ACTGACCT CCGTGGCT GTCTAGGCG GAGCAGCGA
9841 TGAGGGGGT CAGCGGCTT TCTTACT

【図 16 A】

FIG. 16A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0070p) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR 配列

5' UTR 配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 1-327

S タンパク質および遺伝子配列

S タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 314)

HCGCTDCCTICGTVVEADYVITGCCRALIGSYKGGGCGCPGRVQVAGRVLRCAFLALCGCHGSIKCHIEGRIGSQQ

S タンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 328-564

E 1 タンパク質および遺伝子配列

E 1 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 315)

LIGGQRACVYCGGFAFFGQVQVQGDHNGLRKQVTPREKLKCTGQDTHPFQYDIFGSGVGRPRIRMSRGEVLRLLIGTACKNLGLAENAG
NDEIYALFLAFPGFLAYGSGIETLACTVCEWIIIGFYEFLGSPCTIAPUTALALQLGKLRQFVFFLYVTKLWLLGSGTVAVIALLSG
PIVMA

E 1 タンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 565-1137

E 2 タンパク質および遺伝子配列

E 1 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 316)

YKHAQGYKYCTCTCTASTAKHICNGPGEFKITEGSEFPIEPKCPKWLIGDFFICSGSAXXKASHIEMKSDVQMPKAPISALCYLYGIDHP
PERYAIHTCTPQICHTSTADPCTIACRCKKGIATACILDERDFPCGCTGGGPTTMSJHRDRKPCGCTYRZGLZEPVQLQIQRHIAHTTCH
LWAGGALVADGWRAGGCAHATWICKXGSPHLEKRPFLQKRVFLGAPVFECLIKPKKAGGRPHGIDVLEQVLETPVDEIITLAPTEH
PTGRVRVCHHTAFYPRGGGFWQLGGVQLTPISTLHSLSLTLCLELLVGVSGSRFPLGIIFFNSVRYVA

E 2 タンパク質遺伝子配列: 配列番号 300 のヌクレオチド 1138-2199

X タンパク質および遺伝子配列

X タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 317)

SCYLSCWACHDAFCTGGTCATTHNYCTPYAARISCCGARA/PPEDRGVFUAMASKA*SRITGCTFFWTFQVYPTVQNHISDITTCGR
PFFPDSITCYKVPFLRMHLLDYITPLIGLIMLAGPHIDGIEFMRATAALRFTSGRVTLISVAFILYTLSPQIAATIRPFLASMLRHT
LSPFYHETPLVPCVCLMPLQVCPKAGTAMPAVTKISRSALAPVLRGVC

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

【図 16 C】

FIG. 16C

NS5A タンパク質および遺伝子配列

NS5A タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 322)

VYDGIKSFVLCILRAVQDPAANDVPRFVPMHIGSPAKCRKLGSTGLLTTCGGGSRVLCGLICSTSDPTLSVQKAGCKXGSRFFHPTTTA
TQTLAPDIDGDAYKLGPRVCUNBIVELEBRGIMHVCAGGCCDRACVAGVAPAPPTADGIPITGTPSPQYVKLGCDFDVCMTCHLHBAK
TLSVCSQEAIVELLEKIVURADVWQVLEAKRRAKFAVQVREAIHLEETFLALDEUVATTSVRRP/PAKAAGCGCLIDVQVLTWVLEHLDGC
QHAIFPVVQAGARFVPPVPRKTRVSGVIRKVRMCXTPTPTFRPAARVPTINDIIPFECCHTVACIGCHQALTVPGTCTQSLTKHITSKHOK
YTFQRITARDTEVTVICAVPTTRASKLITFRAGDRSGDCHPIQTEPRALILKNGIEFGKSDCLGFLADDRARVQVYKGVTTTEPC

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

NS5B タンパク質および遺伝子配列

NS5B タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 323)

HQGCKRFPVAPTEPPLPATHTVAGILRADTHVYTTTAVDVDEKCAKVTIDQCAKVVQCFRUCVHCCAKAKIFHQGGEYKAVASKNHA
UTTRDHLIGCTYDGLVSGRAVZVQVQKIVQIRAGVYDAPRCLIPREVEFPEDNTREFFREIVFEGCAARVSEHILGDPALTEHULGDAYG
FATPTEHFEARLEGGKXIRATSPDAVADICFDCITADSDHDEBAHEVSAUICDFEGVHGLYIVYRSGPHCDTGRNVGVGECRSGSLITSS
GHTLCTYKVPACTKSGVPLKQGLHDDDTLIVTERKAGQLEDFEHLNDVQFHWCTJAKUDGSGTECQARVDTGLKGGKRRVLRQAR
KALAYFLKRGSGPLGIGGKVMVPAAVTVYVLLPLLCMLRIRPQGTGLTFLIVAGISGVVBAALLPTILAMLBGKMAQVVRGACADA
ECLGALAFVGRGLIWKRRRRAIRACHIKGGWIAITFAQLCLAGFVPTTQPEFPGILCLFPELWERPYENILECTIDNRGACLRFLWVA
SAILALLCL

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

3' UTR 配列

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

【図 16 B】

FIG. 16B

NS2 タンパク質および遺伝子配列

NS2 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 318)

RGRVFGLVEVCADISKLVSEFTGCTNYHSCVSGFQCAVFAFZSFLGRQVKLOYIRYXAGAYARCLLAVGCGFLSRBEPFRASVGV/LKCGACHL
VRECOBISLV7FLCALVDTIDTWACACGAGFARILACTADDPARIGDHRALRAVLRCPGSGDTYIYHMSQVSRVQAQVR7GGCLSP
VVLSEPTFTEYVDDTHILVCCQLLGGFVVAROOTRV/LVCHLITEDCLPQGLG

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

NS3 タンパク質および遺伝子配列

NS3 タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 319)

APVVTPEFISGTFPEKATLIGRAETFRSQIVULSLCGRGMATAVHTLYACDHGAGRGLATCAGLMTFLYALCEDEYVAYSCLPMHSL
ESGICCPSPKVVYNNHIGLVGGEVERDQVCLDCPTSHIDQLRGAAGSPVLCRHSAYALMLGGYSTGICARVIRVFWQIYZSGSGGGGQVQAR
DAYTPTSSEITTYAETGSGKSTKYVDVAKGSHKVLVLLCSVAVVEGNAPYIKRKYKIRBIRACTGPGQVTVCTGBLAYNTYGRFLVDEFI
HLRGVAVVTCBCHUTSPSTLLICAVRHWABEAGVIVVTFATACAGIQVQGHCHDEVLITGTGDBVEFYCAKPLDIHITCRHIVPCHKZA
KGLMLTQQLGQLIRANGFSGDIEKIRAGCIVVTVCHLSTQYTHGDFVZCCCKYBQVTTIDMDFEGCSRVCTPALRWSRARI
GSGRGAVYTTTSGAPCVSGPDDLVQVSGVEMVYVQNCARIDQCLAYLIDLCETPRCDDHPFVR/MDLRVLRREPE/TTTALAGSQX
HLLVGVQLVICHRETRAGPDDGLKFFVCALHMHSTFELXALMIFTELTFTQVLDLRRAGASSTVVFVT

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

NS4A タンパク質および遺伝子配列

NS4A タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 320)

GYGCTLLAGAAALAGFAFAGATCALVPGAVGQVZULIAGVT

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

NS4B タンパク質および遺伝子配列

NS4B タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 321)

RFDKCDETAANYQRLYACACDSGLASQGTAGAALSPLDASGWSAGVLAAPFSPAPLVQVLTRETFSSACFILLCAGCCGAGCCPTAL
ACLVSATACAGGGAHVILAIACVTKVSLQFQPSGCHVACLVLAGGCCVGTCLDPLFCCLTGKAVYCAAVATCGKLGCGABVTTVLIDLP
ALFPCPAGCAGVVLVILSHSGVTHNHLRSHCAKQITCEYFTEKQQLSKLRSRYHWAQREYTCG

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

【図 17 A】

FIG. 17A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0029A) 核酸配列-配列番号 301

```
1 AACGTGTTGTT GTAGCAATGC GCATATTTGCT ACTTCGGTAC GCGTAATTGG TAGGOGGCGG
2 GCCGACCGGG CCGCAGAGGG CCTAGTAGGA CGTCGTACAA TGCCATGAGG GATCATGACA
121 CTGGGCGRAG CGGAGGCGAG ACCGAAATGG GGTCAACTGG ACTCCGAGT CGACACCTGG
181 GCTTGSTGCT TCATTGAGGG CATGCCAGG GAACTCCGTA TCGTGCAAG GATGSGGTCC
241 CTGCACTGGT CCGATGCGCG CACCACTCC CTACAGCCTG ATAGAGGTGG GGGGGGCCCC
301 CCGACGTGGA CGTCGCTGGA GCGCAACATG GGGTGTTCAA CTGATCAAA CATTGTGTTCT
361 CCACTCGTGG GGGCCGACTA TAATACCTCC TGGGGTGGC GGGGCTTAAA TGGGAGTTAC
421 CACTGCGGTG GTGGCTCTTG CCGTCAACCA AGCTGTGTGG AGGTTGGAG ACGAGTTCTG
481 CAGCTGTGGT CACTCTTGG GCTAAATGGA TCGCGATGT GTTGSAKCG GTCCAAACTG
541 GAAGGGGCGA TTGATCGAGS GCAATATTGG CAGTCTCAGC GCGCATGTTG GACTGGTAGG
601 GTTTCGCTT TCITTTTAA CTGTTGCAAT CAATCTGATA TCACTGGTGT TTTCGACCGT
661 TGGTGTGGA CAAGCACTGG CTGTTTGGTG TGCACGGGCA ATGCCACTCA TCTGCTCTGG
721 TGGGACTATC TGGGTGTCGG CGTAAGTGG CGGCTTGCT GTCGAATGG TGGAGGAGCT
781 GAAGTCTTTC TTGCTTTGAT CGGCGCTGGA GGGTGGCTTG GGCCTGTAGC TGAAGGTGAT
841 GGTATGTGCG AACTCTATCT AGCTATTCT TCGTTGGGT TTACTGCTTG GTATGGCTGG
901 GGTNTACCTA AGACMTGGT GTGCGAGTGC TGCCCTGCGN TAAACNTTTC TGCCTATAGC
961 TTCTTATCTC CAGATACTAT CGCATTTGGC ACGTGAGTAC TACAACCTAC TGCTCTTTGG
1021 TGGCAGATGT TTGTCACCTT CCTATACTT TACAGCACTT GGACTCTTTG GTGTGTCCTC
1081 AGCGGCAAGA CTGTGTGCTG GAAGCACTAC CTTCGTGCTA GTCCTACGGT TATGGGATAC
1141 AAGCATCAT CTGACAGCTA CTTCAATATC TTATACATAA CGAAGTTC TACTGCTAGC
1201 AACTGTGACT GCGCTTTGG ACCTTTACT CGAARACTS AGCTCGTTTG CTCTTAACCT
1261 AGATTCTGCT TGTATAAAT TAAAGCTCTT ACNTTATCT GCTCATGGGG GTGCTGGGTGG
1321 TGGTITGGGG AGAACATCAC GCGTGCATAC KCRGACGTTG GCRSGCACCC AAGCACCGAT
1381 TCYCGTTTGT GCTATATCTA TTCAACAACT GACCACCTCC CTTGATACAT TAACACCACT
1441 ATCATACCTC AGAAYTGTGC CAATCTACG GTKAGTCTA CCACARCTCC ATGCGGAGAC
1501 AAGTGGGGTA ATGCAACTGC TTGATTTCTT GACCCTGGKT CGGGGTCTTG CGGGGAGTGC
1561 TAGGGGGT GTTCTTATC TAAVGTACT CATCATGAT CTTGGGATAG ATGTGGATGT
1621 GGTACACTGG ATGCACTCAT AGAATTSGTG CAGCTGGTGC AGAATSGAC TAACATCTTG
1681 AATACGACCA TTGAGCTCTC CGVGGCGGCC TCGTGTGTGA TCGCATCCGG TCTTCGGGCT
1741 GGGTITGGTT CGAGCGGAGC GCATGGCGTG GTGCACTGCT ATAGGTGTC TTCTACCGGT
1801 GACCTTGAAC AGTTTGGTCC TGGGCTTGGG AATGGGTGG CATTGGCCGG CGAGGCTGTC
1861 CGGAGCTGT GTATCACTCC TCAGTGGGGG AGGCGCGGCT TCGGATGAT TATAAATCTT
1921 CTGAGCTTGC TAGAACCTT CPTPAGGAG ATTTCTCTAG CCGTTTTTGG TAATCCGAGC
1981 CTTGGCGGTG TACGTGTGTG TAACATATCC GCTTCTATC CAGAGGAGAG CGGCTTTGTC
2041 CAGCTCATCG GGGACGTCCA GGTGCTAACC CTTAACACTG CATCTTTACA CTCTCTGCTG
2101 ACTTTGATAT CTCTTATCTT GTTGGTGTGG GTTCTTCTG GTGCGGGATAT CGGTCCACTA
2161 ATAATCATAT TTTTCTGAGG CGGCGGCCAY GTMATGCTT CTGTGTTACT AAGCTGAGT
2221 TGGGCTGTTT GCAACATGTC GTTCTGTTTC ACATCTGGTA CTGAGTAC TTCAATGAC
2281 CTGCTGTGTC TGCGCGTTTC AACCCGATA TCGTCTGTGS CGACGCTGT ACCTCCGAGC
2341 GACCGTGOTT GSGAGGTGCC TGCGCGGATG TCATGSGTGA TTTCGGGAC TACTGCTCTG
2401 ACGTTGCGAT GTTCTCTTT CATCCAGTAC TTCCCTACTG TGCTTGGCAA TAACACTGAT
2461 ATTACTACT GTGGGAAACC WACCTCTTT GGGGACATCA CGGGCACTTA TTGGGCTTAC
2521 TTTTGGCTGG GCGTGTGCT CTGTACTTGG ACTCCCTTC TGGGTTTTAG GTTAATGCTT
2581 GCTGGCTTAT ATATAGATGG GTTCTTCCC ATACGGCATG CCACGGGTC ACTGAGGTC
2641 TGGCTGTGCG GTGCAAGCTT GAGSGTGTA TCGTCTTTTG TACATCTAT ATATGCTAC
2701 CTTGTTAAYG CTGCTGCTAA TAGAATGTTT YTACCATCTG CAACCTTAGA GATGATCTA
2761 TCCITTGATA CCTATCACGA GACTGTTCTT TACATCTTTT GTCTATTCTT CTACCTCCAG
2821 GTGTCGCCCC TGTGCGGCTT GGCOCGTATG TGTGCCATCA AGCTATCTCG GGGCTGCTA
2881 TTGCTCTTGG TGTGTGGCCA AGGCGTGTGC CGAGCTGGGG GGGGTGTTGG TCTTGAGGT
2941 TGCGCGGAG CTCTTTRT GTGCGATTG AGTGGAACT GACTGTGATA CATGTGCTG
3001 ATCTTCTGCT TTGGTGGTGC AGCTTTTGG TGCACGAGTC GACTGTGAGC AAGATTAAG
3061 CTTCAGATCT ACCGCTACTG GGCACAGGTC TATGCCAGAC TCACCTCGCG GTCTRGTTGT
3121 GGTCTCTCTG GACGAGAGTT CCATTTCGCG GCAAGCGTGG CGGCGCTTTG GTGTGGTGTG
3181 TGCATGCTCT GGCCCGGTGA GTGCTCTGAA ATCAGCTTGG CTCTCATCT GTGTGCTCTG
3241 ACGTGGACA CCATGAGCAC ATGGCTAGTA CGTGCTGTGT CCGACCGGAG GAGTGGCGGCA
3301 GCCCTTGCAA CGCTGGCGGA CGCATGGTG CGATGGGGT ACACCGGGG GTTGGGCGCT
```

【図 17 B】

FIG. 17B

```
3361 GTGTTGCGCT GCTTTGATC ACCTGGACAC TACATATACA ACCACATGGG CCAGGCTCTCA
3421 GAACGGGTGG CGCAAGCAGT CAGGAGCTTC GCGCGTGGCT TGGAAACAGT CGTGTTCGAG
3431 GAGCGCCACCT TTACTGAGGT CGTGGATGAT ACAATGAGTA AGAATATGTA ACAATTCGCTT
3541 GGTGGTAAAC CCGTGGTGGC CCGCTGCGGC ACCTGCTGTT TGGTGGGACA CTCTCAACCTT
3601 GAAGATCTGC CACCTTGCTT CCAGCTAGTG GCTCCGGTGG TTACTACCAA ACCAAGACAT
3661 GGTACGTGGT GCTTCTCTTA GCGCAACACT ACAGAGGCGG CTGAAGACCC CGGATCCGGG
3721 CAGATGTTGG TGTGTTCTTC CCGGACAGGT CAGTTCAGTG GTACTTCAGT GARTGTCACA
3781 CTGTATGGGA CCGGCTTGGT TGCTGTGGTA CGCGGCTTAG CCAGGTGTGC TGGTTTGAAG
3841 ACCTGCTCTT ACACGSCATT ATCTGATGAT GTGTGTGGCT ACTCTTGCC TCCGGGCAAG
3901 AGTTCCCTAG AGCCCTCGCC CTGTTGCGCG AGCCGGGTTT GGGTATGAA CAACAATGGA
3961 GGGTTGGTGT TTGGCAGAGT GGAAGATGAA GAGCTCTGTT TGGACTGTCC CACCGACAAT
4021 GATCAACTGC GGGGTGCTTC GGGTTACCGG GTTTTGTGTT ATCACGGTCA TGCTATACGG
4081 TTGATCTCTG GTGGTATCTC TACCAAGTGT GTGTGTGGCT GTGTCTGGAT AGTCCGGTCA
4141 TGGGCAAGCC CTATATCTCT CTGAGGCTGC GAGCGGCGCA TCGAGCGGCC ACAATGTAGA
4201 CCAACATACT CTGAATTCAC CTACTAGGCC COTACVGGTT CTGGTAAAGT ACACAAATAT
4261 CCACTGGACC TGTCTCAACA GGGACACAGG GTATTGGTCA TCAATCCAAG TGTGCTGTCT
4321 GTCAAGAGTA TGGCCCTTTA CATTAAGAGG ACAATPAAGA TTAGACTGTA AATTAGAGCT
4381 GGCACAGGGC CTGAGGCTGT GAGCGTTATC ACTGTGAGA ACTTGGCGTA CATGACCTAC
4441 GCGCTCTTC TCGTGGATCT GGAACAGAA TCTCGGGGTT ATCGCTGGT ATCGTGGTCA
4501 GAGTGGACAG ACAGATGATC TACCGAGCTA CTGGTATGTC CGGACGAGTC CATGTATGTC
4561 GAGAAAGCTG GAGTGAAGAC CGTTGTATTC GCCACAGCCA CTCCTGCTGG CATTCAGATG
4621 CAGCCACATC CCAACATTGA TGAATATTTA TTGACTGACA CAGGCGACGT GGAATTTCTAC
4681 GCGGCCAAAA TCAAAATTGA TAACATCAGA ACTGTATGAC ATGTATCTTT TTGCCACTCG
4741 AAGGCCAGGT GTGCGGAGCT ACGCGACGAC TCTCCGGGCT TGTGTTGTTC TGCAATGAGT
4801 TTTTGGCAG GCTGTGACAT CAACACCAT CCGGCTCGAG CTCTATTTGT CMTGTTGCA
4861 ACTGATGCAT TGCTCGAGG TGTCAAGAGG AACTTTGATT CGTCTATGTA CTGCGGTGT
4921 TGCGTAGAGC AAGCTGTGAC AATTACATGT GATTCACAGT TCTCCATCTC AGCCCGAGTG
4981 GTGCCATGTA CTGCTGATT GCGTATGAC GCGCGGGAG GTACTGTTC CCGGCAAGAG
5041 GGGGCGTACT ACACACCAAC TCCAGAGAGA GCACCTGTGT TCGCGTTCC CGACGCTAAC
5101 GTCTGGCAAG CAGTGGAGAG CGCAGTGGCT TTTTATGATT GGAAGCGCGC CAGGATGAGT
5161 CAGTGGCTGG CAGCATACA TGAATTAAGG TGTCACACG GCTCTAGTTG TGAATCAATG
5221 ACTCCAGTGC CGGTGATGGA CACATAGAGR GGTACTCTGC CGACAGCTGA GGTGACAGT
5281 GCGGCTCTGC CAGGAGAGCA GTGGCGCTGC CTTTAGGGTG TGCAGTTGTG CATCTGCAAG
5341 GAGACTGAGG CCAACGCTGC AACGACATGTC ATCAAGTGGG AGTGCTTACT CAACAACATG
5401 AAYAAAAACC CCTGTGTTTA TGCCCTTAGAC ATCTCTACAC TGGAAATCCA TACCACAACAT
5461 GACTTGCATC CGCTATPAGC CGGCGCTTTA TGACGACAG TGTCTGTGGA GACAGGCTAC
5521 GCGGCTCTGC TCTTGTGTTG GCTGCTGTTG GTGCTCTGCT GTCGCTGTTG GCGGCTGAG
5581 GAGGCTTAG TGCCCTCGGC CGTGTGGAGG GTTCAATAGC GGGTGTCTGG COTGACCCGT
5641 CCGGACGCGA CAGACAGGAG CCGGCGCTAC GCGACGCTGT TGTACCAAGT TGTGCGAGAT
5701 TCAGGACTTC TGCGCAGTCT GCGAGGCGAG GCGATGCGG GCGTACAGAA AUTGCGGAT
5761 CCGACTAGGG CCACTGGCTC ATATCTGAGA ATCTCTACAC TGGAAATCCA TACCACAACAT
5821 CAGGTGCTGC AGTCTCTTGA GACCACTTAT AGCTTCATGC CATCTCTGCG TCTGCTCTGC
5881 GCTGTGCTGC AGGCTGCGA GTGCTCTACA GCGCTTGCGG GGTGTGTTGC CGGTGTAAG
5941 CCTGCTTGGC GAGGAGACCA TAAGTGTGTT TTAGCCTTGS CAGGAACTTG CTGAGTTAGT
6001 CTGCGACAG GCGGCGGTGG CCGACTGGT GCGGCGCTCT CGTCTCTGG AGGCTGTGTC
6061 ATCGGTAGTG TCACTGGGCT TGACTTCTGT TTGCGTGGC TTACAGGTTG GAGGCGCGTG
6121 GTTGTGCTGC GGGTGTGAGC ACAGAAATCT TTGTCTGGT CGGCTGATAT GACCACCTCG
6181 TTAGATCTCT TACCTGCTTT TTCTTCCCTT GCGGCGCGG TAGCTGGCAT CTTGCTGTGC
6241 TTATTTGTTA AGCATGAGAG TGTACACAGC TGGCTATGAT GGTATGTTG CAGTGTAGA
6301 AAACAAACCA TTTTGCACAA CTACTTCTTA TCTGACAAAT TTGCGCAACA ATTAAGTAAA
6361 CTTTCTTGTG GCGGCACTCT GTATCTGTGG CCGGAGGCGC GTGAGGGATA CACACAGTGT
6421 GGTGTGGTGC GCGGAGCTGT GAGCTTTGTC TTGTGCATTC TACGCGCTGT GTGGAGTTGG
6481 GCGGCTAAAC ATGTGCCACG GTTCCGTGTT CCCATGATTG GCTGCTCAC TGGCTGGTGC
6541 GGGGCTGTGC TTGGTATGCG CAGCTTGTGT ACCACTTGGG GGTGTGGAGA ACGTGTGCT
6601 CTTCAGCTGC TTGCTGTGAG GTCTGATCCA TTCTCTAGG TGGGTGGTGT GTGGGCTGTC
6661 AGTTGGAGCG TTGSGTTTCC ATTCAACCCG ACTACAGACG CACCGGCGAC TTACCGGCTG
6721 GACATTAGCG ACCTGACATG ATTGGGTTTC CGGTATGGCA TTGCGGAGAT GTGCGAGCTG
6781 GAGCTGCGGG AGGACAAATG GCACTCTGTC GAGCATCAT GTTGTGGGA CCGAGCTATG
6841 GTTGATCTCG CTGTGAAGGC CCGACCGGTC ACAGCAATG GTATACCTAT CAGTACTTTC
```

【図 17 C】

FIG. 17C

```
6901 TCTCCACCAC AAACCTACAG CCTCTCTCTC TGTTCTTTTG ATTCAGTTTG CATGCTACT
6961 AATCTATGTA ACCCAGCCAA GACCTCGAGT GTTGCTCTAC AGAGAGCGCT TGAGCTGCTG
7021 GAAGAAGACG TTGACACGGC ACAAGTATG ATGTGTATGA ATCTGGAGGC GCGAAGACGC
7081 GCGGAATATG ATGATCGGCA AGTTGCGCAC CGAGTTCGGG CAGGATACAC GCGTTTGGCA
7141 GACGAGGATG TTGACACGAC AAGCTCGGTT AAACCCCGCG CCGCGAGGCC TGCTGTGGAT
7201 AGCTCAACGT TGGAGATATG TAGGCTGCTG ACTCTTTTGG GCGAGCTCGG CGACCAATCG
7261 CAAATGTGA TCAATTTGT AGTACGAGG GCTATCGGCT TGCTGACGC TGTGCGGAGA
7321 CCGGCGACGC GCGTCTCGGG CGTGTGGAG COTGTGGCA CTGCTATGCG CACGCCACCA
7381 ATCAAGTTTG AGGCCACCGC AGTACCAAT CATACATAAA TCCACAGAGA GTGTCACATC
7441 GTGCTACGCT GTACTGCGCT TAACGACGAG GCCTTGACTG TTGCTACGG CACTTGCACT
7501 CAGCTTTTAA TTAGACATTT GACCACAAA CACACACACT ATATTCCTAA ACAGAAAGTA
7561 GAAGAAGACA CAGAAGTATG TGTGCTTTC GCGCTACAAA CAAAGCGGCC AAGTAAACTC
7621 ATGATTTTCA GAGCAGGTGA TCGATGCTC TGTGTTGCC ACCCTTACA AACTCTTACT
7681 AGCGCCCTGC TTCTAAAGTA CCGGTTACCT ATCCGAGCTC GCTCCACTG CACCGAGGCC
7741 CTGTGTAGC ACCTCCGAGT CTGTGAGCTC AATGAGTGA CAACTTATGA ACCATGATG
7801 CAATCTTACA GTTGGTTCGG ACCAATTGTT GCACCTACAA CCGCCACTTT ACCGTAAAC
7861 CAGAGGCTGG CTGGGATTTT ACGGCGAGC ACATUGGUGG TTACACCAAC AAGGCGGCTC
7921 GAGCTCTCG AGCGGCGCTC TAAGGTACA ATTGATCAAA CATCAGCCAA GGTGGACGAG
7981 TGTTTCTGT ACACATACAA CTGTTGCTT GGTATGGCC AACTCTTCA AACTCTTACT
8041 ATGTCTATAG AGGATGCTGT GTCAAAAATG CCGCCAAACA CCGCGCTCA CCATACACT
8101 GGCATCACT ATTCAGATT GTGCTCTGGA CCGGCAACC CCGCGCTTCA AAAAATGTA
8161 GATCAAAATG GTGCTGAGAT GTACAGCGCT CCAATGGACA TTACTCCCTAA ACCTGAAGTG
8221 TTCCCGCGAG ACAAGTCAAC ACGGAGCCA CCGGCTTCA TGGTTTCCC TGGGTGGGCG
8281 GCGGAGTGT CCGGAGAAAT GATCTTGGGC GATCTTGGG CACCAACCAA GAGCAATGA
8341 GAGTGGCTG AGCGGTTTGC CATCTCGCGC CCGCTACGAG CCGCGCTTCA GCGGCTGAG
8401 TGGAAACGTC CAACGAGGC ACAAGTATC CGGTTGATG CAGCTGCTT TGAATGATG
8461 ATACAGCAG AGGACATGGA TCGCGAGGCC AACCTCTGGS CTACGGCGGA TCTGCAACCT
8521 GAGGTGTTT CCGGCTGATA CAATATTATC AAAAGAGGCC CCACTGTGTA TATCAGAGGA
8581 AATGTTGTG GAGTGGCTGT CTGTAGAGCC TCAGGTACGC TACAAACAAG CAGTGGACAT
8641 ACCTTACTT GCTACCTCAA GGTGTGTGTA GCTTGCACGC CGGCGGCACT TAACCAACT
8701 GCTTGTGTA TTGATGGGA TGATGCTCTC ATCTACAGC AAGCTTGCCG TCAAGAGATG
8761 CTGATGATG TCAGCAATGC ACTTAATGAC TACGGTTTCC CTGACACTT CCGAGGCTCT
8821 GGGGACCTCT GCTCAGTTGA GTGCTGTAGC GCACGTGCGG ACAGGCTTTC CTTCCGGGGA
8881 GGTATGGCT GATGCTCGT GCGCAAGCT CAGCTCTGGA TTGACCGCT TCTCGGGGAA
8941 AAGGCGGATC CACTGGGTGT CATCAGCAGC TATATTGTCA TGATCTCTAC TGGGCGCGTG
9001 ACTGTCTAG TGTATTGCG CTTGTGTGCT ATGCTATCTC GAATGAGCC ATCGCAGAGC
9061 GGGACCTGT TTGATGGGA TGATGCTCTC ATCTACAGC AAGCTTGCCG TGGGCTGCT
9121 CCAACATCA TTTTAATTT ACATGGCGCC GAGCCTCTGC AGGATAGTG TCACTATGCA
9181 GCTTCTATG CCGAGCTGTC ATCAGCGTTG GCTTCTTTTG GCAATGAGAG GTTGAATGCT
9241 TGAGGUGGA GAGGCGCTGC CATCAGGAT GAAATGATCA AGTGGGUGG GTGAAATGAG
9301 AATTTCGCG AGATGTTACT GTGGTCACC CAGGTGAGGA CACCAACACC CAGACCAAGG
9361 GGTGTGTGCT TCTTACACC GGAATATG GAGCTCCGT ACAGAAATTT GCACTTGAAC
9421 GCTGCTGCT GCGGAGGACC GTAAACATAC GTGCTAGGS TGGGAGCTC ACGTATCTTG
9481 TTAAACATCT AATGGCTGCA ACTCGGCCCT CCGCTCGGCG ATTCAGGCC GGCACCGGCA
9541 GTGAAGTCAG GTTATCCAC GGTGTGGCTGA AAGCGGGGCT TGAAGACCCC CCGTATCGGA
9601 GTTGGGCAAG GTAACATAC GGGTGTGAGC ACCCGGCCCT CCGAGTGGCC GCGTAAAGCC
9661 ACGGGCAAG CAGCTAGGCT GAGAGTCTGG GCAACTCTCC CGTACCCCAC CCGAGGCTAT
9721 GCTGCTGCT GCGGAGGACC GTAAACATAC GTGCTAGGS TGGGAGCTC ACGTATCTTG
9781 TTAAACATCT AATGGCTGCA ACTCGGCCCT CCGCTCGGCG ATTCAGGCC GGCACCGGCA
9841 TGAGGCGGGT CAGCGGCCCC TTTCAIT
```

【図 18 A】

FIG. 18A

ヒトベギウイルス 2 (A B T 0 0 2 9 A) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR 配列

5' UTR 配列: (配列番号 301 のヌクレオチド 1-327)

Sタンパク質および遺伝子配列

Sタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 324)

MGSTGQTCSPVVEADVITGSGCRANSGYHCGGGGCRGSGVQVARRVLQLCALLALSSGHCISBETBORIESQ

Sタンパク質遺伝子配列: (配列番号 301 のヌクレオチド 328-564)

E1タンパク質および遺伝子配列

E1タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 325)

ILDSQAACWGRGAFSGHCCQGDIMKILRRCVTRPGCACTGATHPTWKDYLGSGVTRPARMRGAEVLLRIGAKLGLAEALG
NRBIYAALICGFIAGVGGIERTLVCTCFVAVHISPYESLSPCTAFGTILQLPGLLQRFVHFPLVSTWLVNKLGGCGVAVIALLAS
PTVNA

E1タンパク質遺伝子配列: (配列番号 301 のヌクレオチド 565-1137)

E2タンパク質および遺伝子配列

E2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 326)

YKHQSGVLKVTITNAGTAMCCDCPGTFRUPRSGRSPIPRCPPVILKSGFTICGKSGKWFABLIPRYVGVKSPAPILALCYIYSLNDP
FPNYLPTITIPCHSGHCTVPTKPCRGKSHIACILDRSRFGGCTGGGCFYENGCHDSRDCGIGVSRGLISXVOLGCGKPHIETIE
LLAGASLVASGLRFGGCRSHISVVICRCPGRCLDGRGFGKGVPLRGPVELICLPNWRSPRSHHILSLLOTFPVEDITLAFCH
PTGRVRCVHTAFYFGGGGCVOLGDPVLTPTFASLISLTLISLILLYVSGARGPLLIIPASARHYA

E2タンパク質遺伝子配列: (配列番号 301 のヌクレオチド 1138-2919)

Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 327)

SCVLDKAAVCHDAPFGSGCTATFDVILCLVATHISCGGAVPFDGRGWEVTAHAGVIGSTGTLFPDVPFIQVPTPTGHTIDIVCGE
PTFPDCTIGVYGVFLVOLLVLTLPFLPFHMACPFICDGLFPIRATAARFOTSRACLGVGAFILYILGHVIAALHPLFAGLALHMI
LGLPFIYHICVLTPLCLVQLVQSTRAGLASAMVILKSGLEFALVAGVC

Xタンパク質遺伝子配列: (配列番号 301 のヌクレオチド 2200-2910)

【図 18 B】

FIG. 18B

NS2タンパク質および遺伝子配列

NS2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 328)

RPGRVGLGVCDPVNDLVEFTGKTHWMCIFSPYCAVFAITSPLOQGYTLQIVRYKAQYFARILANVCGSLFAGREPHFASVGVNCSACMC
WPRCEBESLALLICALLYDIDTILVACLGAQFARALATLANVSMVDRALPRLPCRSRGCIYIHHMGQVBERVAGVRDLGCLSEF
VVLRSPTTFVNDTHGKTDQILGKGVVARGCGRVTVGRHIFILNPPFGILG

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

NS3タンパク質および遺伝子配列

NS3タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 329)

AFVVTIKPSIGTWSEFATLIRARETIPGGCIVVLSSLTGRMTAVXCTIYATGHCAGARGLATCAKRFELTALSDDTVAYSCFPMHSG
EPCRCGSEVYHKEHOGVCGVHEVCLDPTLIDLRGAGSGFLCHDSYAYALMGQVTSSTSHRNVIRFVQHAZGSGGGGGA
DAVFTTYKSEITYAFEGCKHETFPVCLVQXGHWLWILIEVGVNKGVAHYETZYHSEIEIAGTREGGVCTITGEMHAYHTRFSLDPET
NLSGVAVNCDCEHCTCTLLIGVNRHVAEAGVETVVFACMPCICQVGRPHIDVLLTDTGQVDFPVITZTGEMHAYHTRFSLDPET
RCALERTQGLGGLGVAEPFNGCUIHTIPASDSIVVYATDALSTGYTHGTFSDICCCQVGVTHDHPFESGARVPCCTAALRQRRGR
GRKRRGATHTTPRGAAPCVFPHHVKQWGAHVFTYDIAARILQCLAYHMDGCTPHLSCDTPVWNVNLRATLPRPZVTALAGGZ
ELLVQVQVCTREHRCPPDXIZSKLLIHCHWELLVALHPIETFTQHDLPRALALSTVFVEE

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

NS4Aタンパク質および遺伝子配列

NS4Aタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 330)

GYSPILLGAAALAAAFAGATGALVPSAVKSVNIGVAGVT

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

NS4Bタンパク質および遺伝子配列

NS4Bタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 331)

PPNATPETAAYAGVQYCAQGLIASIQTAJAAHSLNLRGRCADQVYLAQFPSPAPIVGVIGFHTHSSASGPIILCAQCRGCTTA
AGLVGATAGLGGHMLAIGTMLVLTGQARGGWAQGLVLSGCTISVTLGFLPGLCTIGAEAVVGLAVATGTLISGSAHTLLDLLE
AFFPQAGAGVIGVILSLISGCTTAKHRLNCAKQITCDYFLSEFQGLCKLKLWRYKARARESTYQCG

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

【図 18 C】

FIG. 18C

NS5Aタンパク質および遺伝子配列

NS5Aタンパク質アミノ酸配列：(配列番号332)

YVGGIKSFVLCILRAVYDKAAKHVPRFRVPMIGCSFANCRGXLTQCTLLTTCOGGERSVLCQLCSTSOPLLRVGRKRCCKYVGFHFTTTA
TGLTLPDISDATHLPGFVFIABTLELLRHRHVRVCAASCLDDRADVAGVAFPPYTAIGFIPITFSPFPYTGILSLCLSFSDVCHSTLCLIPAK
TLYVCQGVNELLLEFVTFQVMDQVLEHRRARFVRAQVQRAVQVDEYPLACAEVDTTGVVFAARAACTCSLMDQVLTLYVRLSDGC
QIAIFVYVCAARFVPRFRFVQVGLERVRACNSPTPIFEATVPIHUIPEECHVLECTGCQDALIVFYSTCTQCLIEHLTKHNI
YIPKQLEEDREVTVICAVPTERRAKLILFRAGDSVSCHPLOTPIRALLLKYLGPCTGKSDCIWPLDGDARVJNGTGTYPCC

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

NS5Bタンパク質および遺伝子配列

NS5Bタンパク質アミノ酸配列：(配列番号333)

HQYVYRPRFVAPTTTPLLVTBVRVAGLIRBARTVRYTTANVQVBEQKVTIQCTEAIVQVNRPTVYUCLAKAKTTPQGDVSYZBAVQVMA
HITHDHIFGTFSCILVGRASPAVQKVDQIRASGVADPMCLLPKRVPPKGTGPKFPHLPVPPKAAVAGEKLLIDVPAETKHLSDAYG
FATPHERARLLBQKAIHRTSPQJLAVDAICPDSTFADENPBBHILLAAHSPZEGVRLVYKRRSPKCDITGVVGVRCRARSCTTSS
GHTLVLYKVRASCTASGIFZGLLIHSDTILLTERCAQETLOEISHLIDVGFPHFVASDLSVSEVCAVDEVCLEGRMRRLVQAR
RAIDRVYGVSDPQVGSYVYVYVPLNAVTVYVPLDMLRDEPQTGTVLTLYRCHVSEVVPVGLLPTITVYLRGDLQVVRVADMA
ELISLLATFGRMLDQVRRNRDILRTQYKLDGSRNCTQVQLLRSEVSTTPFPFGVCLLEPMLERPVIHLBISTDRIHGRSLRFLVA
SALLALCL

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

3' UTR配列

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

【図 19 A】

FIG. 19A

ヒトベギウイルス2 (ABT0239AN) 核酸配列-配列番号302

1 IHHHHHHHHHHH ITAGCAATGC GCATATTGCT ACTTCGGTAG GCCGTATTGG TAGGCGCCGC
61 GCGGACCGCG CCGCGAAGGG CCGTAGAGGA CGTGTAGAGA GCGTGAAGAG GATCATGACA
121 CTGGGGTAGG CGGAGGCGAG ACCGAGATCG GGTGACCTCG ACTCCAGTAG CGACCACTCG
181 GCTTGGTGGT TCATGGAGGG CATGCGCACG GGAACCGTGA TGTGTCAAGG GATGGGGTCC
241 CTCACCTGGT GCATCGGCGG GCACCACTTC GTACAGCTGG ATAGGTGTRG GGTGGGCCCC
301 CCGAGTGTGA GCTCGTGGGA GCGCAACTGT GGGTGTTCAG CTGATCAAG CTATTGTGCT
361 CCGACTGTGG GCGCGGCTTA TATATCTCTC TCGGCTGTCC GGGCTTAAZ TGGAGGCGG
421 CACTCGGGTG GAGACTCTTG CCGGTCAOCC AGTGGGTGCG AGGCTGCTAG AGAGTCTTG
481 CAGCTGTGCG CATCTCTTGC GTTGATCGGA TCCGGTATGT GTTCGATCCG GTCCAAACTG
541 GAAGGGCGCA TTGAGTCGGG GCAAAATTTG CAGTCTCAGC GCGCATGTTC GACTGGTGAG
601 GGTTTTGGCT TCTTTCTAA CTGTTGCAAC CAATCTGATR TTATGTGGTG TTTGCAAGGT
661 TGCTGTCTCA CAGAGCTGG CTGTTTAGTG TCGCAAGCCA ATGCCACCA TCGTCTCTCG
721 TGGGACTACC TTGGTCCGGG TGTAAATGGG CGGCGTGGCG GCGGATTGCG CAGAGGTGCT
781 GAAATGCTCC TTGCTTGATG CGGCAATTGA GGTTCGGCTCG GTTGCTTAGG TGAGGTGCTT
841 GGTATGTCCG AAATGTATCG AGCTATCTTT TGTCTTGGTG TTATCTGCTT GTATGGTGGG
901 GGTATACCTA AACATTTGGT GTGCACATGT TCGCCCTGGG TAAACATTTT TCCCTATAGC
961 TTTTATCTCC CAGACACTAT CGCATTGTGG ACPTGGAGAT TACAACCTAC TGGTCTTTTG
1021 TGGAAATGT TTGTGAACIT TCTATATCTT TACGACTCT GACTCTTTTG GTTGTGCTT
1081 AGTGGAGAGA CTCTGCTGT GATAGCAATC CTTTTSUATA GTCTGMSST TATGGGTGAC
1141 AAGCATCCAT CTGAAAGCTA CTTCAAAATC GTGACATAAA CCAATGCTTC AGCTGTATAG
1201 AACTGTGACT GCGCTTTTGG AACCTTTTAC CGCAATATCG AGTCTGCTTT GTCTATACCT
1261 AGATTCTGTC CTGTAAATAT TGAGAGTTCT ACATTTATCT GCTCATGGGG GTCTGGTGGG
1321 TGGTTTGGTG AGAGACTCAC AGCTGCATAC TCGAGCTGCG GAGCGCCCGC AGCACCGGAT
1381 TCGCTTTGCT GTATATCTCT TTCAAACATC GACCGACTCT CTGGCTATTA TAATCAACT
1441 ATTTATCTCC AGAATGTGCG CAACCTKWCG GTTGACTCYA CCAACGCTCC ATGCCTGTGAC
1501 AAGTGGGGCA ATGCAACTCG TTGTATTCTT GACCGCGGCT CGGGGTTCTG CCGGGACTGC
1561 TATGGGGGCT GCTTCTATAC TAATGGTAGT CATGACTGAT CCTGGGATCG ATCGGGGAT
1621 GTTATCCGCG ATGAGACTCAT AGATTTTGTG CAGCTTGTCT AGATTGAGC TAACATCTGT
1681 AACACGACCA TTGAGCTTCT CCGTGGTGGC TCGTGTGTA TTGCACTCGG TTTTGGGCT
1741 GGTGACGCTT GCGTGGGGG GATAGGCTTG GCGACTCTTG ATAGGCTCTT TTCAACGCT
1801 GACCTTGAAC AGTGTGCTCC TGGGCTCGGG AATGGGTGCG GTCTGCTTGG TGAGCTGTGC
1861 CGGGAGTTGT GTATCAACCC TCAATGGGCG AGGCGCGGCT TCGGGTGTCT TAACAATCT
1921 TTAAGCTTGA TACAGCACTT TGTTGAGGAC ATCTTCTTAG CCGCTTTTGT YAMTCGAGG
1981 CCGTGTGCTG TACGCTGTGT TAACAATATC GCTTCTATC CAAGAGGAGG CGGCTTTGTC
2041 CAGCTGATCG GAGACTTCCA GCGTCTGACC CCGTAACACT GATCTTGAGA CATCTTCTGC
2101 ACTCTGATAT CCGTCACTCT GCTATATCTT GCGGAGCTGA GCGGCGGAT CCGTCAATTA
2161 ATCATCATAT TTTTCTGGAG CGTGGGSCAT GTAAATGCTT CCGTGTACTT GAGCTGTGAT
2221 TGGGCTGTTT GCAAGATGTC ATTCTGTTTC ACTTCTGGTA CTGTGTCTAC CTTCAATGAC
2281 GTCTTGTGTC TGGCGGTGCG GACGCGTATA TCGTCTCTG GCGATGCTGT GCGCCGCCCC
2341 GACCGTGGT GGGAGGTGCC TGGGCGCTG TCAVGGGKGA TTTGCGGAG TACYGGCTTG
2401 AGCTTGGAG TCTTCTTTT CATTCAGTAT CTCCTCATG TCGCTGGGAA CAATTCGAT
2461 CATTAATGCT CTGGGAGAG CCGCATTTTC GACTCATCTA TGGCTGTGAC TGGCTGTGAC
2521 TTTTGGCCCG GTGTGTCTCT TTGTACTGTG ACTCCCTTCC TCGTCTTAGG TATGGTGGCT
2581 GCGGCTTTA ATATAGATGG CTTATTTCCC ATAGCGCATG CACCGGCTGC ATGAGGTGTC
2641 TCGACTTCGC GTGTGACCT GAGTGTGCTG GCTGCTTTC TAACTATAT ATATCCGAC
2701 CCGTGTAAAG CTGCGCTCAA TAGAATGTC TTAGCATCTG CAAATTTAGA GATGATCTTA
2761 TCGTTTGA CAATCATGA GACTATCTTT TATATGCTT GCGTAAGTGT GCTCATCTGAC
2821 GTCACGCGCC GCGGCGGACT GCGGCGGACT GCGGACATCA AGCATCTCC AGCTGTGA
2881 TTGCTGTGGG TGTGGGCGCA CGGAGTGTGC CGACCGCGG GGGATTGAG TCTTGAGGT
2941 TGGCGGACA TCTCTGTGTT GTGGAGTTT ACTGGCACT GACTTGTGA TATGTCTGT
3001 GTCTTCTCT TTTGTGCGCG AGTGTTTGCG TTAGCACTC CACTTGGAGC AAGATAAG
3061 CTTGAGATCT ATCGGTACTG GCGCGAGGCT TATGCCAGAG TATGCCAGC TATCGGTTGT
3121 GCGTCTCTG GCGGAGAGTT CCAATTTCGC GGAAGGTGG GCGTATTGT GTGTGGGACT
3181 TGTATGCTCT GCGGCGGCTA ATGAGTGTGA GCTCATCTCT GTGGTGTCT GTGGTGTCT
3241 ACAGTGACA CAGTAGACA ATGTTAGTA GCGTGTGTT GCGGAGGCG AAGTGCGGA
3301 ACCCTTGCAA CGCTGGCGGA TGACATGGCG CCGATGGGTT ACACCGCGG GTTGGCGGCG

【図 19 B】

FIG. 19B

3361 GTGTGGTGT GCTTTGGATC ACGTGGGACA TACATATACA ACCACATGGG CCAAGTCTCA
3421 GAGCGGGTGG CGGAGCAGCT CAGGGATCTC GCGCTTGCTT TGGAAACAGT CBTCTGGAG
3481 GAGGCCAAGCT TTACTGAGGT COTGGATGC ACATGTGART TAGCTGTGTTG ACAAATGCTT
3541 GAGAGTAAAC CTGTGTGGCG CCGTCTGGCG AGCGTGTCT TGGGGAGCA CTTAAACCT
3601 GAGACTTGGC CACCTGGGTT CAGCTGAGT GCTCCGGTGG TTAYACCAAA ACAAGACTGT
3661 GGTACGTGGT CTTCTCTTAA GCGGACACTC ACAAGGGGTG STGARACACC GGGATCTCGG
3721 CAGATCGTGG TCGTGTCTTC CTTGACAGG CCGTCAATGG GTACTGCATCT GALTGRACA
3781 CTGTATCGGA CCGCGCATGG TCGCGGTGCG CCGTGGTCTG ACACTGTGCG TGTGTGAGG
3841 AGGCACTTCT ACAGAGACTC AICTGATAGC GTGCTGGCTT ATCTTGGCT TCCGGGCAAG
3901 AGTTCCTGCG GACCTGTGCT CTTGASGCG AGCGGGATT GGGCACTGA CAGAACTGA
3961 GGGTGGTGT GCGGAGAGT GAGGAGAGAG GACCTGTCTT TGGACTGTCC CAQCCAGCA
4021 GATCAACTCG GGGGTGCTTC AGGCGTCAAG GTTGTGTTG ATCAAGGTCA TGCATAGCG
4081 TTGATGCTCG GTGATGTCT TACCAGTGGG ATTTGTGGCG GTGCGCGGAT AGTTTACGGA
4141 TGGCAGAGAG COTATTCTCT CTCGCGGGCG AAGCGGGGAA TCGAGCGGCC ACGTGTGACA
4201 CCACTACTCT TGAATATCG CTACTATGCT CTTACGGTGT CTGGTAGTIC AACAATATCT
4261 CCGTGTGACC TGGTAAACA GGGACAGAG GTATTGGTCA TCAACAGAG TGTACTGTCT
4321 GTTAAAGATA TGGCAATTA TATTAGAGAG ACATACAGGA TCGACCTGTA AATTAGSCT
4381 GGCAGTGGCC CTGACGGTGT GACGGTATCT ATGCTGAAA GCTTGGGCTA CATGACCTAT
4441 GCGCGCTTCC TTGTGATCC GGAAGAGAT CTTGCAAGGCT AGCGGTAGT CATTTGGAC
4501 GAGTGGCAGG ACACATCAT CTACACGCTA CTGCGCATAG CGCGGGTGGC CATSTTTGCT
4561 GAGAAAGTGT GAGTAGAGAG CBTGTATTT GCGCACAGCA CCGCTGCTGG CATTCAGTA
4621 CAGCCACATC TGGCAATTTA TGAATATTTA TTGACTGACA CAGCGGAGCT GAGTGTACT
4681 GCGCGCAAAA TCAAAATGSA CAACATGACA ATGCTGTAGAC ATGTATCTTT TTGTCACTGT
4741 AAGCGCAGGT TCGGAGACTC AACGAGCAG CTTCTCGGCC TTGGTGTTCG TGCATGAGT
4801 TTTTGGCGCG GCTGTGACT CAAAACCAT CCGCCCTCAG ACTCTATTGT TGTAGTGGA
4861 ACTGATGATC TGGCACAGG CTACACAGGA AATTTGATT CCGCATOGA CTGCGGGTGT
4921 TGGGTAGAGT AAATGTGAG AATTGACATG GAGCTTAGGT TTTCATCTCT GCGCGAGAT
4981 GTGCACTGA CTGCTGATT GGTATGGAG CCGCGAGAC GTACCGGTG TGGTAGAAG
5041 GAGCGGTATT ACACACACAC TCCAGAGACA GCACCTTGCG TCAAGTCTCC AGTGTCTAAC
5101 GTCTGGCAAG CAGTGAAGA CGCATGTGT TTTTATGAT GGGGTGCTCG CAGGATACAA
5161 CAATGCTGGT CGGCTATGSA TATATAGAG TGACACACAC GCACTAGTIG YGATCCAGC
5221 ACTCCAGTGC GGGTATGSA CACACTTGGC GCGTACCTG CAGGACCTGA GGTACAGAT
5281 GAGGACTGT CAGAGAGCTA GTGCGGCTG CTTTATGTTG TCGAGTTGT CATCTGCAAA
5341 GAAACCGAGS CCGATGTGCT AGAGATAGC ATAAGAGGA AGTGTACTT CAACAGAT
5401 AATAAAGAC CCGTCTGTA TGCCTTAGAC AATCTACAC TGGATTTCAC TACCACACAT
5461 GACTTGACTC CGGTATAGC GCGGCTCTTA TCGAGACAGG TGTCTGGGA GACAGGCTAC
5521 GCGCCCTTCC TCGCTGTGCG CCGCGCTTGG GTGCTCTCT TCGCTTTGCG GGGTGTACA
5581 GAGCGCTTAG TCGCTGGGCG GTTGAGAAC GGTAGCTGCG GGTAGCTCG GTGACCGGT
5641 CCGAGCGGCA CAGACGAAAC CGCGGCTTAC GTTACAGAGC CTTGCGAGAT
5701 TCGAGGAGAG CAGGAGAGAG GAGATGTGCG GGTAGAGAA ACTTGTGAT
5761 GCGAGTAGGG GCGCTATGCA ATATCGGCGA GCGGCGGCT CTTGCGCGCG CCGCGGAG
5821 CAGGTGCTGC ATTTCTTGA GACCAACTTT AGTTCATTG CATCTTTGCG TGTCTCTGT
5881 GCTGGTGTTC AGGCTGTGCA GCTCTTCAAC CGCTTGGCG GCGTGTGTC CCGTGCTAGA
5941 GCTGGCTTGG GAGGTGCCA TAAGTGGTG TACTGATTG CAGGAACTCG GCTAGTATG
6001 TCGAGAGCTG GCGCGCTGG CCGCTGCTCT CCGTCTAGC AGGAGTGTG
6061 AGCTGATG TCGCGGCTC GACTTCTG TTTGGTGGC TTAGAGGTG GAGAGCGGAG
6121 GTTGGCGCTG CCGTGTGCA GCGAGAGCT TGTGCTGTT CAGCTAGAT GACCACTG
6181 GTAGACTCT TACTTGACT TCTTCCCHH HHHHHCAGCA TAGCTGGCAT CBTCTTGTG
6241 TTTATCTCAA GTACTCAAG TGTAAACGAG TGGGCTAAT GGCATCTGIC CATCTGTGA
6301 AAACAARCTA TTTGTATPAA CTACTTCTA ATCTAGAAAT TTGGCATCA ATTAAGCAA
6361 CTTTCCGTGT GCGCGCTGT GTACCATTTG GCGAGAGAC GTGAGGAGTA CACAGACTGC
6421 GCGTGGGTGA GCGAGATCG CAGTGTGCT TGTGCGTCT GCGGCGCTGT GTGAGTGA
6481 GCGCGCAAGC ATGTGCCACG CTTCCGTGTG CTTATGATG CCGTCTAC TGAATGTGCG
6541 GGGCGCTGGC TGTGACCG CAGCTGTGT ACCACTGTG GGTGTGAGA ACGTGTGTC
6601 CTTCAGTGCC TTCTCTCAAC GTCTGACCA ACACCACTG TGGCGCTGT GTGCGGTGT
6661 AGTGGATGTG TCGGTTTCCC ATTAACCGC ACTAAGACAG CCAACCGCAA TTATCGGCG
6721 GACGATAGTG AOCACATPAA ATTTGGTTTC GATATGATA TAGCGAGAT CBTGAGCTG
6781 GAGCGGCTGA GCGAGATCG CAGTGTGCT GACGACTAT GTTCTTGA CCGAGCAG
6841 GTTGACTACG CCGTAGAGG CCGACGCTC AGCGCAATG GTACTACTT CCGTACTTCT

【図 19 C】

FIG. 19C

6901 TCTCCACCAC AAACCTACAG CCTCTCTCT TGTTCTTTC ATTACGTTG CATGTCTAGT
6961 AACTTATGTA ACCACGATA GACCTGAGT GTGTGCTCC AGAGAGTCT CAGGTACTG
7021 GAGAGAGAG TTGATAAAG ACATGTAATG ATGTGTCAAA ATCTGGAGG CGGAGAGCG
7081 GAGAGTATG ATGATGATCA GGTGTGCTGA GAGTGTGCG AGCATGTGAG
7141 GAGCAGAGAT TTGACCGGAC AACCTGGTGT AAACCGCGCG TGGCAGGCG TGTGTGGT
7201 AGCTCAAGCT TGGATGAGT TAGCTGCTGT ACTGTCTTCC GGAACGTGCG CGAGCACTAG
7261 CAAATGCTA TCAAAATTTG AGTTCAGGCG GCTTACGCT TGTTCACC AGTACCAAG
7321 CCGCGCGAGC GCGTCTGGG TGCTGAGAG CGTGTGCGA TGTGATGCG CAGCGACCA
7381 ATCAAAATTT AGGCAACAGC AGTACCAAT CATACATATA TCGGAGAGT GTGTCACTA
7441 ATGCGAGGCT CAGCGCGGCT TACGAGAGC GCGTGTGCG TGTGAGAG CACTGTGCTG
7501 CAGCATTTAA TCAAAATTTT GACTAACAAA CAGCACTCAT ACATCTCAAA AAGAGATA
7561 GAGAGAGACA CAGAAGTAA TGTCTTTGCG CGGTACCAA CAGCGCGCG GCAATGACTC
7621 ATCACTTTCA GAGCAGGTA TCGATGAGT TCAITGTGTC ACCCTTGCA ACTCCTGTG
7681 AGCAGCCTCG TTCTAAAGTA TGGTGTGCT TCGTACAGC CCGTGTGCT CAGCGCGGCG
7741 CTTGGTAGAG ATGCGGAGT CTGTGAGCT ATGAGATGA CACTATGATA ACCTGTGAT
7801 CATCTGTA GTTGTGCTG ACATATGTA CGGACAGCA CCGCACTT ACTGTAGC
7861 CCGAGGTGCG CTGGCAATT AGCGGAGAG ACTGCGGCT TTACACAC TAAAGCGT
7921 GAGTGTGCG AGCGCGAGC TAAGGTACA ATTAGTCAA CATGACCAA GGTGTATGAC
7981 TGTTCGAG ACACATACAA TTGCTGCTT CCGTAGGCA AGACTTCCA ACAATCTGCG
8041 ATGCTATAGT AGGATGCTGT GTYAAAGATG CCGCAACAA CCGCGCTGA CCAATCAAT
8101 GCGACGCTT ATTCAGATT GGTCTGGA CGCGCAAC AGCTGTTCA GAAATATGA
8161 GATCAAGCG GCGTGGATG TACGAGCT CCAATGAGA TTAATCAA ACTGAGTA
8221 TTCCCTGGG AAGATGAAC AGGAGAGCA CCGAGTCTGA TCGTTTCCC TGGTGTGCG
8281 GCGCGAGTGG CCGAGAAAT GACTCGGCG GACTCTGGG CATCTGCGG GCACTGTGCT
8341 GGTGATGCT ATGGTTTGC CACTCGGCG CATGAGCGG CCGCTTAT TGAACATGCG
8401 TGGAAACGTT CACGAGAGC ACAAGACTC CGGTGTGCT GBACTGCT TGAATAGT
8461 ATCAAGGAG AGGATAGTA TCGGAGGCG ACATCATG CTGCGGCGCA TTGCGACCT
8521 GAGGTGTGCT ATGCGCTGA CAGATATAC AAAAGAGCC CAGTGTGCT CATACAGGA
8581 AAGTGTGCG GGGTGTGCT GTTGTGAGC TCGAGTCTG TACAGAGAG CAGTGGGAG
8641 AGCTTACTT CTATCTCAA GGTGTGCGA GCTTGCAGC GCGCGGAT TAAACACT
8701 GGTACTATA TTGATGAGA TGATACCTC ATTTGCTGA AAGTGTGCG TCAAGAACT
8761 CTOGATGAT TACAGACGCG ACTGAGTAT TATGGTTTCC CTACACCTT CCGTGTGCT
8821 GGGGAGCTCT CBTCTGTGA GTGCTGAG CAGCTGTGCG ACAGGTTGCT CTTGCGGAG
8881 GGTATGCT CTACTGCTG ACATGAGT CAGTGTGGA TTGAGGCT TCTGGGAG
8941 AAGGTGATC CACTGTGCT GTTGTGAGC TCGAGTCTG TACAGAGAG TGTGCTGAG
9001 ACTGTCTAG TGTATTGCG CTTGTATG ATGCTATC TGAATGAGC AGTACAGAG
9061 GGGAGGATG TGAAGCTAG GGTGACGAG TACGTGTGA GCGGCGGT GTGGTGTCT
9121 CCAACATCA TTGTAATTT ACATGTGCT GAGCACTAC AAGTAGTCCG TCAAGAACT
9181 GTTCTCATG GCGACTGCT GTGAGGTTG GCGTCTTTG GCAAGAGAG GTTGAATGCG
9241 TGGAGGAGGA GAGCGGCGG ACACAGAT GATGATGATA TCTGGGCG GTGAGTGG
9301 AATTGTGCG AGTGTGCT GTTGTGAGC GAGTGTGGA CAGCAGCG CAGAGTGA
9361 GGTGTGTGCT TTTTACAC GGAATATG GAGGTCTGT TTACGGTTT GAGTGTGAG
9421 ACCTGTGAG GTATCTGCG TGTATGCG GTTGTGCT CAGTGTGCT CAGAGACT AAGGAGAG
9481 CTGCTCTGCT TTGCTTGA AACTCTAA CAATGTGTA CAGAGACT AAGGAGAG
9541 GTGAGGTGAG GTGATACAC GCGTGTGAG GCGTGTGCT GAGGAGGCT CAGTGTGAG
9601 GTTGGAGAG GTGATACACT GGTGTGAGC ACCCGGCG CCGTGTGCT GGTGAGCG
9661 AGGGGTGAG GAGTGTGCT GGTGTGAGT GGTGTGAGT GGTGTGAGT GGTGTGAG
9721 GCTCTGCTCT GCGGAGGAG GTAAACATC GTGCTGAGT GCGTGTGCT AGCTATCTG
9781 TTAACACTT AATGTGTGATA ACTGAGCCCG GTGCGGCGG ATTCAGGCG GGCACCGGA
9841 TGAGGGGGGT CAACGCGCCC TTTTATT

【図 2 1 B】

FIG. 21B

```
3301 ACCCTTGCAA TTCTGGCCGA TGAATGCGCG CGCATTTGGT ACCACGGGGC GTTGGCGGCT
3361 GTTATAGCTT GCTTTGATAT ACAGCGGAGT ACACGCTGCA ACCGCTGCTG CGAGGATGCG
3421 GAATGGGOTGG CGCAAGCAAGT CAGGAGATCTC GCGCTTTGCT TGGAAACCACT CGTGTTTGGAG
3481 GAGGCCCACTT TTACTGTAGAT CGTGGATGAGT ACAATGAGTT TGGTGTGTGG ACAAATTTGCT
3541 GGAGGTAAAC CTGTGGTGGG CCAGCTGCGG ACAGCTGTCT TGGTGGGAACA CCTCAACCTCT
3601 GAAGATCTCG CACCTGTGTTT CCAGCTGAGT GCGTCGGTGG TATATTACAG GCCAAGCACT
3661 GGTACGTGGT GTCTCTTTAA GCGCACTCTC ACAGGAGGTT GCGAAACAC AGGATCTGCG
3721 CAGATCTGGG TGTTGTGTTT CCGCAAGGCT CGGATCAATG GTACCGGAGT GAATGGGACA
3781 CTGTATGGGA CCGGCGATAG TCGCGGCGCG GCGGCGCTAG CACAGCTGCC TGGTTTGAAG
3841 ACGCCACTTT ACACGGGATT ATGTATGATG ATCTTGGCTT GGGTGAATGA TAACAAACGGA
3901 AGTTCCTTAG ACCCTCTGCTG CTGTTGCGCG AACCGGGTTT GGGTGAATGA TAACAAACGGA
3961 GGGTTGGTGT GTGGCAGAGT GGAGAAATGC GAGCTCTGTT TGGACTGTCC CAAGCAACATA
4021 GATCACTCTG GGGGTGCTTC GGGCTCACCA GTTTTGTGTG ATCAAGGCTA TGCATACGCG
4081 TGTATGCTCG GTGTGTACTT TACGAGGAGT ATTGTGCAAG CCGTCCGGAC GGTCCGGGCA
4141 TGGCATACCG CCTATTCTCT CTGGGGGGGG CAAAGCGAGA TGCAGGCGCC ASCTGTGAAC
4201 CCAACATACT CTGAATAAC CTACTATGCC CCTACTGGTT TCGGTAACTC AAAAAATAT
4261 CCACTGGACG TACTCAACA GGAACACAAA GTATTGGTCC TTTTACCAGG TGTGGCTGTGA
4321 GTCAAAAGTA TGGGCGGCTTA TATTAAGGAG ACATATTAAGA TCAGAACCGCA AATTAGAGCT
4381 GGCAAGAGCT CTGAGCGTGT CAGGCTATAT ACTGGTGAAG ATCTGGGCTA CATAGACTAT
4441 GGGCGCTTCC TTGGTGATCG GGGAGGAGAT CTGCGGGGCT GAGCTGTAGT CATTTGGGAG
4501 GAGTGTACCG ACACATATCT CACCAAGCTA CTCGCGATCG GCGCAAGTGG CATGTATGCC
4561 GAGAAAAGTG GAGTGAAGAG CTGTATTCTT GCGCAACATCA CCGCTGTGGG CATTCAGATA
4621 CAGTCACATT CCAACATTTGA TGAATACTTA TTGACTGAACA CAGGCGAGCT GGAATTTTAC
4681 GCGGCCAAAA TCFAAATAGA CAACATCAGA ACTGTAGAGC ATGTATCTTT TTGCACTCTG
4741 AAGGCGAGCT GTGGCGAGCT AAGCGAGGAC CTCTCGGCTC TGTGCTATCG TCGATGAGT
4801 TTTTGGCGCG GGTGTGACAT CAAAGCAATC CCGCGCTCAG ATCTCAATCT TGTGTGGGGA
4861 ACTGTGCAAT TGTCCACGGG CTAGCAAGGA AACTTTGATT CCGCATCGCA CTGGGGGTGT
4921 TCGTGGGAGC AATCTGTGAC AATTGACATG GAGCTTACGT TCTCATCTCT GGGCGGAGTG
4981 GTGCCATGTA GTCTGTCATT GCGCATGCA GCGCGCGGAC GTACCGGTCT TGGTAGAAGG
5041 GGAAGCTACT ACACAATCTC TCCAGGAGCA GACACCTTGG TCAGCGTTCC CGATGCTAAC
5101 GCTTGGTAAG CAGTGAAGAG CCGCATCTGA TTTATGATTT GAGTGTATC CAGATACAAA
5161 CAGTGGCTGG GCGATACACA TGAATTTGGG TCGAGTACCA CAGCATCGCT TGACCGCAAC
5221 ACTCCAGTGC GGGTGAATGA CAGACTGAGG GCGTAACTCG CAGACAGCTCA GGTGACAGAT
5281 CAGACTCTCG CAGGAGATCG GCGGCGCTG CTTATGGTG CGCAGTTGTG CATTCGAAA
5341 GAGACCGGAG CCGACCGGCT TGAATGATAG ATCAAGTGA AGTGCTTACT CAACAAAGT
5401 AACAAAACAC CCGTGTGTTA TGCCTTAGAC AATCTACAC TGGAAATCAC AACCAACAT
5461 GACTGTGCTC GCGGTATGAG CCGCATCTCT TTTATGATTT GATGTGTAC CAGATACAAA
5521 GCGCCCATCC TCTTGTGCTGG CCGCGCTTGG GCTGCTCTCT TCGCTTTTGG GCGCGCACCT
5581 GGAAGCTTAG TCGCGTGGCG TGTTTGGAGT GTTGAAGTCA GCGCTGCTGG CGTGAACCGT
5641 CCGGACGGGA CAGACAGGAC CCGGAGCTAC GCGACGGCTT GTATCAAGC CTGTGCGAT
5701 TCAAGAAATT TCGCGAGCTT CAGAGGATCG CCGAGTGGCG CCGCGGCGAA ACTGCGCGAC
5761 GCGAGTAGGG GTGTGATCTA ATATTTGCGA GCGCGGCTCT CTTCACCGCG CCGCTTGGTA
5821 CAGTGTGTC AGTCTTGA GACACATCTT AGCTGATG CTATTTGCT CCGCTCTCTT
5881 GCTGGTGGCG AGGCTTGGCA GTGCTTCA CCGCTTGGTG GCTTGGTGC CGGCTGCTAGA
5941 GCTGGCTTGG GGGGTGGCCA TAAGTGGCTA TTAGCTATTG CAGGAAGTGT GCTGGTTAGC
6001 TTGAGACGCG GTTCCCGTGG GCGCATGCTT GCGGCTCTCT CAGCTTACG GGGTGTGTC
6061 ATCGGTAGTG TCAACCGGCT TGAATCTCTG TTTGGTGCTC TTACAGTTGT GGAAGCGGCG
6121 GTCGCGCGCT GCGTGTGCGC ACAGAGAGAT TTGCTGTGTT CAGCTGATAT GACCACTCG
6181 GTAGATCTCT TACGTGCTCT TTTCTGCTCT GCGCGGCGCA TAGCTGGCTT CCGTCTGCT
6241 TTCACTTAA GCAATCTCAAG GTAAACCCCA TGGCTTAATC GGCATATATC CATGTGTGCC
6301 AAACAAACCA TTTGTGATAATA CTCTCTTAA AGTGAAGAAT TTGCGCAACA ATTAAGCAAA
6361 CTTTCCCTGT GCGCGCTCTGT GTACCAATGG GCGCAGGCAC GTGAGGGAAT CACAAGATGC
6421 GCGCTGATCA CGCGGATCTG GAGGCTCGCG TTGTGATTC TACGCGCTGT GTGGAGTTGG
6481 GCGGCCAAGC ATGTGGACAC GTTCCGTGTC CCTATGATTT GCTGCTACAC TGGTGTGTC
6541 GCGCGCTGCT TGGTACCGC CAGCTGTGTC ACCACTGTG CGTGTGGGA AGTGTGTGTC
6601 CTTCACTGCC TTTGCTCAAC ATCTACACCA CAATCAAGT CAATCAAGT GTGTCGCTGT
6661 AGTTGGAGTG TTTGGTTCCC ATTCACCCCG ACTACAGCAG CAGCTGGCAC CTTACGGGCG
6721 GACATCAATG ACGCCAACAA ATTTGGTTTC CGATATGGCG TTGCGGACAT CGTGAAGCTA
6781 GAGCGGCGGG GCGCAAAATG GCACTCTGT GCAACATCAT GTTGCITGGA CCGGCGCAGC
```

【図 2 1 C】

FIG. 21C

```
6841 GTTGCACTCG CTGTGAAGGC CCGACCGGTC ACGGCTAATG GTATACCTAT TAATAGCTTT
6901 TCTCACACAC AAGCTTATGT CTATCTCTC GTTCTCTTT ATACAGTTTG CATGCTTACT
6961 AACTTATGTA ACCGAGCTAA GAGCTTGAGT GTTGGCAG AGAGAGGGGT TGAAGTCTG
7021 GAAGAGAGCAG TTGACACAGC ACAAGTAGTG ATAGGCTAAA ATCTGGCAGC GCGTGAAGCC
7081 GCTGAGTATG ATGCATGGCA GGGTGGCCAA CAGATGGGCG ACAGATACAC GCGTTTGGCA
7141 GAGCAGGATG TTGACATGAC AGGCTCGGTT AAACCCCGAC TGGCCAGGGC TGGTGTGGT
7201 AGCTCAAAGT TGGATGATGT TAGCTGCTGT AGCTTCTTGA GCGAAGCTCG GCGAAGCTGC
7261 CAAAATGCTA TCFAATTTGT AGTTAGGGCG GCTTCAAGGT TGTTCACCC AGTGGCCAGG
7321 CACGACAGCG GTGTCTCGCG TGTCTTGGG CCGTGGTACA TGTGCAATCG CAGCTTCCA
7381 ATCAAGTTTG AGGCCACCGC AGTACCAAT CATATATAA TCCCAAGAGA GTGTCAAT
7441 GTGCTACGCT GTACCGGCTG TGTGACAGC GCTTGACCG TCCGTACGG CACTTCTGCT
7501 CTGACTTTAA CCAAAATATT GACTAACAA CAGATCACT ATATTCCTAA AGAGAGATA
7561 GAAGAGAGACA CAGAAATAGC TGTCAATTGC GCGTACCAA CAAAGCGGCC AAGTAAACT
7621 ATCACTTTCA GAGCAGGTGA CCGATCAGCT TCAITGTATC ACCCTTTGCA AACTCTTACT
7681 AGGCGCTGCT TGCBAAGTA TGGTTTACCT ATTGGAAGT GGTCCGACTG CAAGCGGCGC
7741 CTGTGACAG AGCGCCAGCT GTGTGAGCTC AATGAGGTGA CAATATATA ACCTACCAAG
7801 CAATCTACA ATTTGTTCCG ATGAGTTGTG GCACACAAA CCGCACTTTT AACTGCAAC
7861 CCGAGCGCTGG CTGGCAATTT CCGCGAGAC GCGTACGCG ATATACCAA ACCTACGCTT
7921 GATGTCTCG AGCGCGAGCG TAAGTCAAG CATGATCAA ATATGATCAA AGTCAGCGAA GGTGACGAG
7981 TGTCTCGAG ACACATACAA TTGTCGCTT GCGAAGCAA AGACCTTACG ACAAATTTGG
8041 ATGTATATG AGGATGCTGT GCGCAAGT GCGCAACA CCAAGCGTGA TGTATACAG
8101 GGCATCACT ATACAGATT GGTCTGTGTA CCGCAAAAC CTGCTGTCA GAAATTTGA
8161 GATCAGATGC GCGCTGAGT GTACGAGCT CCAATGGCA TTAATCCAAA AACTGAGTG
8221 TTTCCAGAGG ACAAGTCAAC ACGGAAGCA CCGAGTTTCA TGGTTTTCCT TGGTGTGCT
8281 GACAGAGTGC CCGAGAAAT GATCTGGCG GATCTGGCG CGATACCAA GCACTGTGTA
8341 GGTGATGCTT ACGGTTTTCG CACTCGGCTG CATGAGCGCG GCGGCTTACT GGAACATG
8401 TGGAAACCG CACGAGGCT ACAAGTATC GCGTGTGAT CACTGCTCT TGTATAGAC
8461 ATCAAGGAC AGGACATGGA TCGTAGGCTC AACTCTGTG CTCAGAGTGA TACGACCGC
8521 GAAGGTGTTT ACGCGCTATA CAATTATTAC AAAAGAAGCA CCAATGTGTA TATCAGAGA
8581 AAGTGTGCT GGTGTGATG CTGTGAGCC TCAATGACG TTACAAACAG CAGTGGCAC
8641 ACGCTTACT GCTACTCAA GGTGTGGCA CCGAGGCTC AATGATCAA AGTCAACTT
8701 GGGCTACTAA TTCAITGAGA TGACACCTTC ATATACAGC AAGGTTTTCG TCGAGAACT
8761 CCGATGAGT TCAACAGCG GCTTGAAGC TATGCTGTA CTACACATC GCAAGTGTCT
8821 GGGAGCTCT CBTCTATGTA GTGCTGAGC GCACTGTGCG ACAAGTGTG CCGCGGGGA
8881 GGTATGCTG CAGTGTGCTT GCCAAGCTT CAGCTGCGA TTGCGAGCTT TCTCGGGGA
8941 AAGCGGACCT CACTGGGTGT TATCAGAGC TATATTGTA TGTATCTAT TCGGCTGCTG
9001 ACTGTCTAG TTTGTATGCC CCGTGTGTC ATGCTGATC GAATAGAGC ATCGCAGAGC
9061 GGGACACTTG TAACTGTGAC GGTCCAGCG ACAGGTTCA AGGTCGCACT TGGCTGCTT
9121 CCAACATTA TTTGCTGTA AATCTTAA CTAGATGAT CAGGATCTAG AGGTTGCTG TCAACATGA
9181 GTTCTATG GCGAATCTT CTGAGGTTG GTTCTTTC GTTGTGAGG GTTGAATG
9241 TGGAGCGGGA GACCGCTGCG CATCAGACTT GATATGATCA AGTTGGGCGC GATATGCG
9301 AATTTCGCG AGATGTATC GTGTGACCG GAGGTAGAA CACCAAGCG CCAACAAAG
9361 GGCATGTCT TTTTGCACC GAACTATCG GAGGATGAG AGGAAATTT GCAATTTGAC
9421 ACGATGACG GCAATGCTG TGTGATGCG TTACGTTTT GTTGGTTTC TAGTGTGTA
9481 CCAACATTA TTTGCTGTA AATCTTAA CTAGATGAT CAGGATCTAG AGGTTGCTG TCAACATGA
9541 GTGAAGGCG GGTGAGTGA GCGTGGTGA AAGCGGCGCT TCGAGCGCC CCGATCTGA
9601 GTTGGCGAG GTATACAC CAGGTTGAGC ACCCGCCCC CCGATGTCG CCGCAGCGC
9661 ACGGGCAAG CAGTAGGCT GAGAGTGTG GCACTCTCC CCGATCCCC CCGAGGCTAC
9721 GCTTCTGCT GCGGAGGAC GTAACATAC GTTGTACGCG TGTGACTGT AAGTATTTG
9781 TTAACCACT AATGTGCTA ACTGACCCC CGTGCGGGG ATCTAGGCG GGCACCGGA
9841 TGAGAGGGGT CAGCGGCCCT TTTGATT
```

【図 2 2 A】

FIG. 22A

ヒトベギウイルス 2 (U01125) 遺伝子および非翻訳領域

5' UTR 配列

5' UTR 配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 24-327

Sタンパク質および遺伝子配列

Sタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 344)

MSCTDQITCSYVVDGNYHSGGKALHSGYHCGGGGCRSPGRVQVYARVYLQCAFLALIGGKCSIRSTGRIEISGQ

Sタンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 328-564

E1タンパク質および遺伝子配列

E1タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 345)

ILGQRACNTGGAFFSHCHQGDLYNKLKRWCTTRPGCLVCTGHTATKIDKYLGGVGRFARRHISGAEALLRIGIAGRLGLLAEISL
HSEVAAILCFQFIARVGGIGITLCTVCTGPAHVISPVGLPSTLAFTWHLQLGLNQHFGVFFILGTVLWLLLSRTVAVIAILLAS
FTVVA

E1タンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 565-1137

E2タンパク質および遺伝子配列

E1タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 346)

YHQGSEYLYCTITITLSTGMIQCCPFGTPTPLTCSRFSIFRFCPVNIHSTFICSGGKXWFAHITRFYTDVGHFAPFAPICALYIYINSDP
PPKVIHTIIPQICRISITDPTAPCRDFWGHACALDPRGRFGCTGGGTYTNGHGRSKLRGIGVRCGLIEFVQLGTFPHIQTTE
LLAGSLVYAGLRGFGCRARHGVHVCPSFSDLEDFGRLGRVPLGDFVPELILPQKARRGRBNHPLRLTLQTFVEDIFLAPFCU
PTGCRVRCVHTAFTRGGGQVQLGCVQVLTHTTAGLSLTLIGLILNVCGGARFVFLIIFWGAHVYA

E2タンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 1138-2199

Xタンパク質および遺伝子配列

Xタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 347)

SCYLGQDAVCHDACTPFGCTATPHVYCLPVAITRSCGGAAPFPGGSGVFAAMWVIGRTIGLTFDPVPSFIQCLFTVPHQHTIYCGE
FTLGLDITLYNYFYLPGAILLFTPLGLALAGLFTLDGLFPIRHATALEFSTISVTLVQVAVFYIILGPIHAAIHMHFACAAHLEMI
LSDTYHETVYLILCLLILYQWFRAGLANMVAIXLSPGLLENVVAJHVC

Xタンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 2200-2910

【図 2 2 B】

FIG. 22B

NS2タンパク質および遺伝子配列

NS2タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 348)

RSGVSELEVCADGKLVHFTGHTVYNGCVPSFKAVFATGFLQWYHGIQITLYVYKAVYARVYLAVGSGGLSREHFPBASVGLKXCAHML
KPRRQSPTEIMPTICATVTDITNVLVACLGAGSPARTIALACVARTGSHRAKAVIPCRSGRTYTHHMSQVGRVQAQVRIAGIICP
VLESEPTPEIIVDTHMLVQGLLGGVAVARCGTRVLRHILFEDLPPTGGLG

NS2タンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 2911-3630

NS3タンパク質および遺伝子配列

NS3タンパク質アミノ酸配列: (配列番号 349)

APVAVITRPSITWSELEATLCKAETPGGGGIVLSSLTGKSHSTAVIGLYATGAGAGAGLATCAGLTELTYLSDVGVVAYSCLPKHSLL
DECCSCSEMYVMYHMGGLVGRVVDVQCLVPIHIDQLRGASGGFVLCRHGATALMLGSGYGTGICARVMVKNHLYSSYSGGQGHQA
PAVETTCSEITTYATGGSGKTPVLDVGRHVLVLESAVYKEMPTIETVASEPAGTGGGTVTGGSLAHNTYGFELDEET
HLRGAVVLCBECHDSSTLLIGLGVHMYAEACVTVVATATPAGVQVGGHSHIDELLITDGTGDBEYCAKIMDIHPTGRHVPCHGKA
RCAPITCQISGATRAVFKRSDIFETIPAGDSVVAATPAIGTGVTHPNSITDCCGVQITVITDMDPTFSGARVPCTAAIPVQRRT
GRGRGAYTTTSGAANCYVPPAHVQAVKSMVYVQWKAETITGCLAAVHTGCTPSCDPTPHVHTHTRAYLRPRPVTTAALAGQV
PLVHAILCTCKEATGVHDDGLRWCLDGLNIRKPLGLYALDPTLEPCTDQDHTERIALGSLSTVFEV

NS3タンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 3631-6514

NS4Aタンパク質および遺伝子配列

NS4Aタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 350)

GVGPIILAGAAASFAAGATGALVPSAVGVVPRAGVT

NS4Aタンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 5515-5637

NS4Bタンパク質および遺伝子配列

NS4Bタンパク質アミノ酸配列: (配列番号 351)

RPAIDETAYAVRQVQACNDGIFASLQGTACALGKLADACRAGASQYLAAPPSAPLVQVQLPLETIFSSCASFGCLAGCGVGBGFTAL
AGLVGACVNLGGHSHVLLAGNTRVLGATGSGRGVHGLSLAGCTGGVTFGLFGLGIEVYAGVATVQKILSGSADVTTLVDLSP
ALGSGGAGIAGVYVLSLSDVTTKAMHLLSCAKVTICDITVLSRHFQVLLSGKSLDRVYHRAQAGSGTTCG

NS4Bタンパク質遺伝子配列: 配列番号 303 のヌクレオチド 5638-6423

【図 2 2 C】

FIG. 22C

NS5Aタンパク質および遺伝子配列

NS5Aタンパク質アミノ酸配列：(配列番号352)

VIGSGSPALCILRAVNDAAHIVPRFRVPAIGGCPAWDGRKLGITGLITTCACGSEVGIQCLCTSDPOLSVGRKCRGKGVDFEPIHFTTIG
TGTLRDPISDAIKRLGPRYGVADIVLEKRRGKMYHCAAGCCLDASVAGVAPVTAIGIPIINGSPPTVCLSLGSEDFVCMSTHLCIPAK
CLGVQGBAYVELLEETVDTAQVNGSHLARRRAEYDAKVQVQAVGDEYTRIADEVDHTASVKEPVPVRAAVGSSTLDDVSVLTIVRELGDGC
QLIIFPVVQAGFFVEVPVPRKTRYSQVLEVRKCHETPEFFSATVPIHIIIPBECHEVLRCTGCGDGLITVPIYCTSLTITRYLTHRKH
YIPKRIEECTEIAVICAVPTIRASKLITTSAGDGRGKCHFLQTFIRALLQKYLCPGWDGCKGPLASDASVQVYIKVTITTEPC

NS5Aタンパク質遺伝子配列：配列番号303のヌクレオチド6424-7797

NS5Bタンパク質および遺伝子配列

NS5Bタンパク質アミノ酸配列：(配列番号353)

NQGYKPFSDIVAPTPPIPATRVQACTIADNTSRVYVTTTAVDVRQAKVTTQKCAFVQCTRTVYVQCTAKAKTPQSGHSDVDAVGRRA
HTTROIHHGITITDLSGRAPVQKIVDQWRAGYVDAPNLIIPREVEFPRDCESTRKPPRTIVFPGCAARVASEKMLIGDFGAIETKIVLSDAYG
FATPPEHFAFLQKXIRATEPQIAIVACVFDITPASIDMDRZAHIVAAATGDEGVTGLIYVYRSPKADITGMPVYRGKFAQSITLTTS
GTLICYIKFPACTRAHIIIPGULLIHMDTLITTEKAGQCLGEPHALLQGVHFWYVYKQULNITBAXHAYDQVTLRGRKRLAPQR
RAISAVGEGSDPLVIGSVIVHYTAAVTVVYIMLTLCLNRIEPODTGIVTLTVKSGVSEVPRILLPTTAHLHGLDGLQVYHIGACDHA
ELISALAPFKRGKGLCKRRKRAIKIMIKLGGHAIKPAQLLLASPEVPTQPEPFYGHCLPEPELWREVEYITLMJLSTDIRHGRRLRWVA
GAILLCLCL

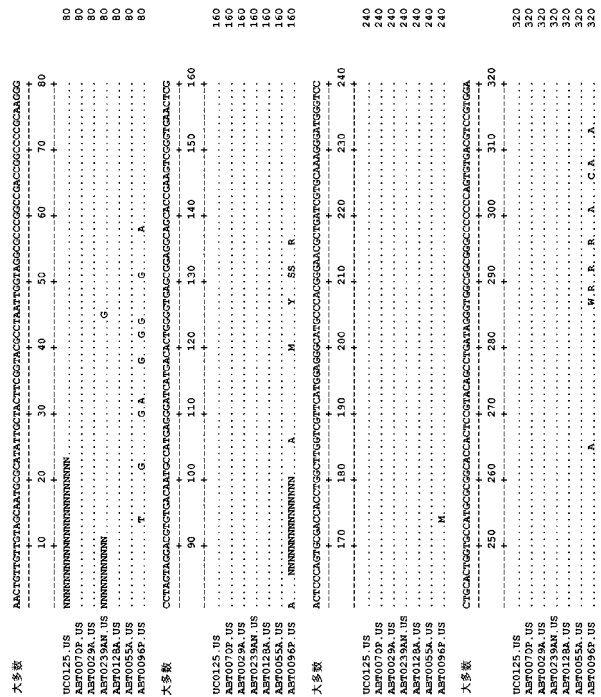
NS5Bタンパク質遺伝子配列：配列番号303のヌクレオチド7798-9498

3' UTR配列

3' UTRコンセンサス配列：配列番号303のヌクレオチド9499-9867

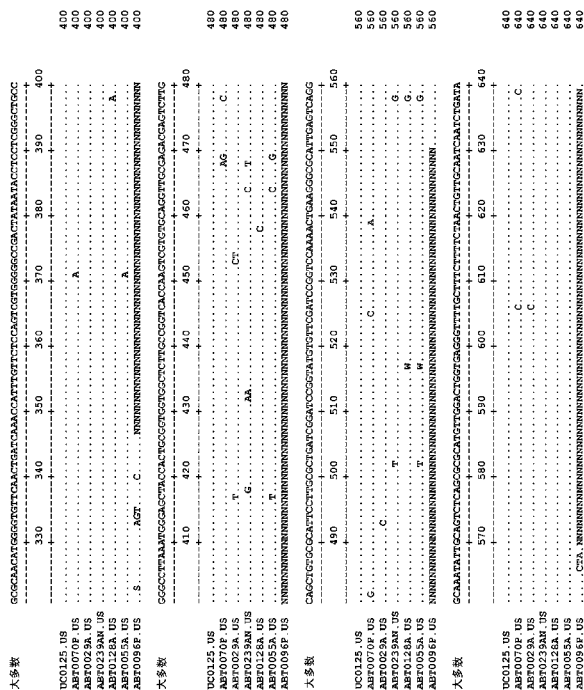
【図 2 3 A】

FIG. 23A



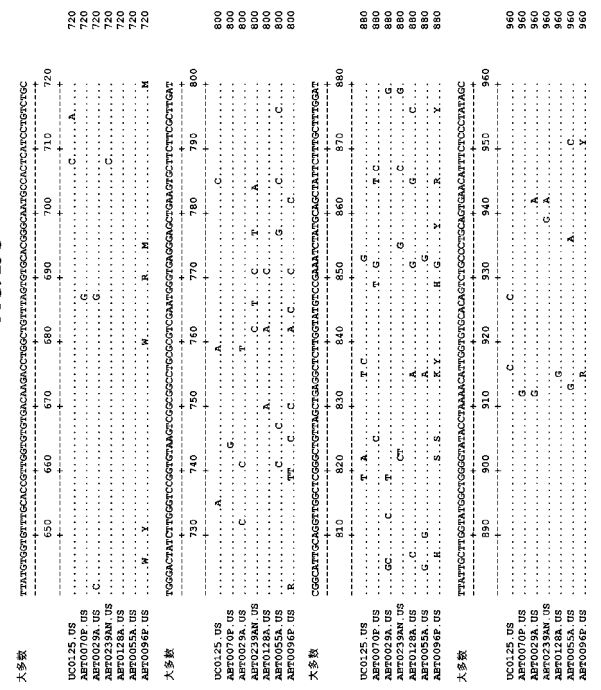
【図 2 3 B】

FIG. 23B

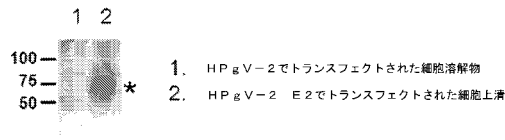


【図 2 3 C】

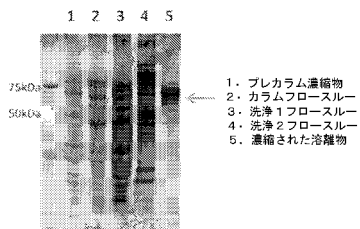
FIG. 23C



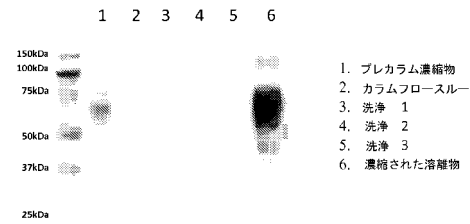
【図 2 4 A】
FIG. 24A



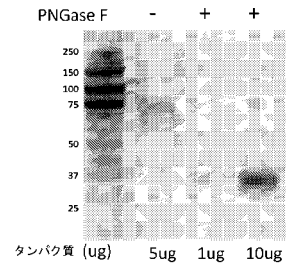
【図 2 4 B】
FIG. 24B



【図 2 4 C】
FIG. 24C

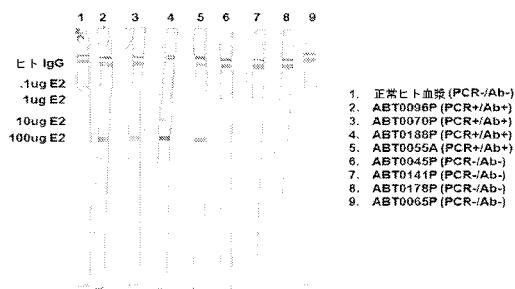


【図 2 4 D】
FIG. 24D



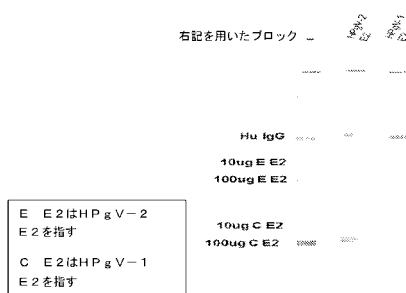
【図 2 5】

FIG. 25



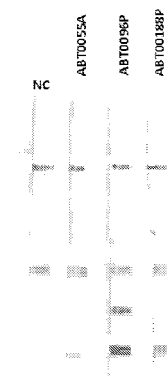
【図 2 6】

FIG. 26



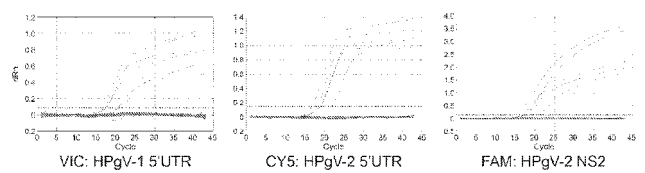
【図 2 7】

FIG. 27



【図 2 8】

Fig 28



【図 29 A】

FIG. 29A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0030P, US) 核酸配列一配列番号 419									
1	AACGTGTTGTT	GTAGCAATCG	GCATATGTCG	ACTTCGGTAC	GCCTAATTGG	TAGGCGCCGG			
61	CGCCAGCCGG	CCCGCAAGGG	CCTAGTAGGA	CGTGTGACAA	TGCCATGAGG	GATTATGACA			
121	CTGGGGTGAG	CGAGGCGCAG	ACCGAAGTGC	GGTGAATTCG	ACTCCAGTGG	CGACCACTCG			
181	GCTTGGTCGT	TCAATGGGCG	CATGCCACAG	GGAACGCTGA	TGCTGCAGAA	GGATGGGTCG			
241	CTGCATCGGT	CCCATGCCCG	CGCCACTCCG	GTACAGCCTG	ATAGGGTGCG	CGCGGCCCCC			
301	CCAGTGTGGA	CGTCCGTGGA	CGCGCAACATG	GGGTGTTCAA	CTGATCAAAAC	CATTGTGTTCT			
361	CCAGTGTGTTG	GGCGGCACTA	TAATACCTCC	TGCGGCTGCC	GGGCTTTAAA	TGGGAGGCTAC			
421	CACGTGGGTC	GTGGCTCTTG	CGGTCACCA	AGTGGTGTGC	AGGTGTGGAG	ACGAGTCTTG			
481	CAGTGGAGCG	CATCTCGGTC	GTGGTATGTC	TCCGTAATGT	GTTCGATCGG	GTCCAAACAT			
541	GAAGGCGGCA	TGGATCGGGG	GCATATATGG	CAGTCTCAGC	GCCTATGTTG	GGCTGGTGAG			
601	GCTTGTGCTT	TCCTTTCTAA	CTGTGGCAAT	CAATCTGATA	TCATGTGGTG	TTTGACACGT			
661	TGCTGTGTGA	CAAGACTGCG	CTGTTAGTGG	TGCACGGCCA	ATGCCACTCA	TCCTGTCTGC			
721	TGGGACTATC	TGGGCTCCGG	TGTAAGCCGG	CGGCTGCGCG	GTGCAATGSG	TGAGGGAGCT			
781	GTAGCGCTTC	TGCTCTTGAT	TGGTATGCTA	GATTTGGCTG	GGCTGCTAGC	TGAGGCTCTT			
841	GGATATGCCA	AACCTACAGC	AGCTATTCTT	TGCTTTGGAT	TTATTTGCTT	GTATGGTGTG			
901	GGTATACCTA	AAACATTTGG	TGTCACAGTC	TGCCCTGCAG	TAAACATTTT	TCCTCATATGC			
961	TTCTTATCTC	CAGACACTAT	CGCATTTTGG	ACGTGTGATC	TACAACATCC	TGCTCTTTTG			
1021	TGCGCAATGT	TGCTATACCT	TCCTATACCT	TACAGCACTT	GGATTCCTTG	GTGTTGTGCT			
1081	ACGGGCAAAAT	CTGTGTGCTT	GATAGCAATT	CTTTTGGCGA	GTCTCATAGT	TATGGCATAC			
1141	AAGCATCAAT	CTCTCAATAT	CCCTCAATAT	TGTACCAIAA	CCAAATGCTT	AACCTGTATG			
1201	ACATGTGACT	GGCCCTTTGG	AACTTTTACT	CGCAATACCT	AGTCTCGTGT	TCCTATACCT			
1261	AGCTTCTGTC	CTGTTTAAAT	TATAGTCTCT	ACATTTATCT	GCCTATGGGT	GTCCAAACAT			
1321	TGGTTTGCTC	AGACATGATC	AGACATGATC	TGCGATCACC	GGCACCGATG				
1381	TCTGCTTTGG	GCTATATCTA	TTCAAAACAT	GACCTCTCTC	CTTGTATACC	TAAATCAACT			
1441	ATCATACCTC	ACGACCTGCG	CAACTCAAG	GCTGATCCCA	CCACAGCCCC	ATGCCGCTGC			
1501	AAGTGGGGGA	ACGCACTCTG	TTGTAATCTT	GACCCGCGGT	CGCGGTTCTG	CGGGGACATG			
1561	TATGGCGGCT	GCTCTATATC	TATGGTAGT	CATGATCGAT	CTGGGATCG	ATGGCGGATG			
1621	GTTTACCGTG	ATGGATCATCT	AGAGTTCCTG	CAGCTCGGTC	AGATTGCAAC	CAACATCTTC			
1681	AGTACGACCA	TGAGGCTCTCT	CGCTGGCGCC	TGCTAGTAGA	TGTGATCCGG	TCTTGGGGCT			
1741	GGGTACGGTT	CGACGCGAGC	GCATGGGCTG	GTGCACTGCT	ATAAGTGTCC	TTTATACCGT			
1801	GAGCTTGAAC	AAATTTGGTCC	CGGCTTCGGG	AAATGGGTGC	CATTGCGCTG	CGAGGCTGTC			
1861	CGGAGTTGTG	GTATTTAACC	CCAGTGGGAG	AGGCGCGGCT	TCCGGGTGTC	TAAACATCTT			
1921	TGATCATCTGA	CACAGCACTAT	TGTTGAGGAC	ATCTTCTATG	CACCTTTTGG	CAGTCTCGAC			
1981	CTCGGCGGTC	TAGCTGTGTG	TAAACAATAT	GCTTTCTATC	CGAGCGAAGG	TGGTTTTGTG			
2041	CAGCTCATCG	GAGAGCTATC	GGTGTCTAAC	CTTACACTG	CATCTTTTAC	CTTCTGCTGT			
2101	ACTTTAAAT	CTCTTCTCTT	CTCTTCTCTT	CGATCTTACG	CGCTTCTGTC	CTTCTGCTGT			
2161	ATCATCATAT	TTTCTGCGAG	CGTGGCCAC	GTATATGCTT	CTTGTACTT	AGCTGTGATG			
2221	TGGGCTGTTT	ACACGATGCG	GTTCCTGTGC	ACATCTGSCA	CTTGTGCTAC	TTTCTGCTGT			
2281	GTCTGTGCTC	GGGAGGTTGC	GGGCGGCAAT	TGCTCTGTGT	GCCACGCTGT	GCCACTCTCC			
2341	GCTGCGGTT	TGGGCGTAGG	TGGGCGTAGG	TCATGGGCGA	TTTGGCGGAC	TACTGTTTGT			
2401	AGCTTGATAT	TCTTCTCTTT	TATTCATGAT	TTCCTTACAG	TGCCGTGCAA	CAACACCGAT			
2461	ATGTTTACT	GTGGTGAAC	AACCTCTACT	TGCTGACATCA	CAGGCACTCT	TTGGGCTTAC			
2521	TTTTGGCTCT	GCTTGTGCTT	CTGTGATCTG	ACTCTCTTAC	TGGGTTTTAG	GTTTATGCTT			
2581	CGGCGCTTCA	ATATAGATGG	CTTGTTCCTC	ATACGCGATG	CCACGCGCTG	CGTGAGGTTT			
2641	TGCACTCATC	GTGCGACCAT	GTGTTGTGTA	TCTGCTTTCC	TAACTATATAT	ATTATCTCAT			
2701	GCTTGTAAAT	CTGCGCTCAA	TATGCTCTG	CTAGACTCTG	CAAACTTAGA	GATGACTCTA			
2761	TCCTTTGATA	CTCTATCATGA	GACTATCTCT	TACATCGCTT	GTCTATTGCT	CTACTTCCAG			
2821	GTGTGCGCCC	CGCGGGGCTG	CGGCGCTATG	GTGGCAGCTA	AGCTGTCTGT	AGGCGTGCTA			
2881	TTTGTGCTGT	CTGTTGGGGA	CGGCTGTGTA	CGAGCTGGGG	GCTGATTTGG	CTTGTGAGTA			
2941	TGGGCGGACA	TCCTATGCTG	GGTGGAGTTT	ACTGGCAACT	GCAGTTGGTA	CATGCTCTGT			
3001	GCTCTCTCTT	TTTTGGTGCG	AGGTTTGGCT	TCACCAAGTC	CACCTTGGAG	ACCATATAGG			
3061	CTTCAGATCT	ACCGGACTAG	CGGCGAGGCT	TATGCGAGAC	TCATCTTTGC	TGTCGGTGTG			
3121	GCTCTCTCTG	CGCTCTCTCG	CCATTTCGCT	CGAAGGCTGG	GTGTGCTTTG	GTGTGGTGCT			
3181	TGCATGCTCT	GGCCCGGTGA	GTGCTGTGAA	ATCAGCTTGG	TCTTCACTTC	GTGTGCTCTG			

【図 29 C】

FIG. 29C

6601	CTTCAGTGCC	TTTGTGCGAC	GTCTGAGCCA	ACACTCAGTG	TGGGCGTTG	GTGTGGGTGC
6661	AGTTGGAGTG	TGGGTTTCCC	ATTCAACCCG	ACTACGACAG	CCACGGGAC	TTTACGGCGG
6721	GACATTAGCG	ACCGCACTAA	ATTGGGTTTC	CGGATGGGTA	TTGCTGAGAT	TGTGGAGCTA
6781	GAGTGGCGGG	ACAAAGAAATG	CACGCTCTCG	GCAGCATCAT	GTTCGCTGTA	CCGAGCTAGT
6841	TTTGCAATCG	CGGTTGAAGG	CCACGGGCTG	ACAGCACTAT	CATGACTTTT	
6901	TTCTCCACAG	CAAGTATCAA	ACTCTCTCTC	TGTTCTTTTG	ATTCACTCTG	CATGCTCTAC
6961	TCAAGTAAAC	AACCTTGAAT	CTCAGTGCTG	TGCTCAGAGG	AGGCTGTGTA	GCTCGGTGAA
7021	GAACAGTTG	ATACAGACGA	AGCAGTAGAT	TGTAAGAAATC	TGAGAGCGCG	AAAGACGGCT
7081	GAATATGATG	CATGGGAGCA	TGCTGAAGCA	GTTCGGGACG	AGTACAGCGG	GTTCGCTGAC
7141	GAGGATGTTG	ACACAACAGC	GTGCGTGAAT	CCCCCGGTGG	CCAGGGCTGT	TGTGGGTAGC
7201	TCAACCTTGG	ATGCTTTTAA	CGTGGTACAT	CTCTTCCGCG	AGCTTCGCTG	CCAAATGCCAA
7261	AATGCTATGA	AATTTTAGCT	CACGGGCGGT	TCAAGGTTTG	TTCCACAGAT	CGCCAGGGCG
7321	CGCAGCGCTG	CGAGTGAAGC	GTGCGAGGCT	GTGCGACTG	CGTCCAGCTG	GCACCAATCT
7381	AAGTTTGGTG	CCACGCGGAT	ACCTTCTCAT	ACCATATTCAT	CAGAGAGGCT	TCATGCTGTG
7441	CTACGCTCTG	CCGGCTGTAG	TGACCAAGCC	TTGACTGTTC	CGTACGGCAC	TGTCACTCAG
7501	ACTTTACGCA	ACCATTTTGA	TAAACAAGCA	AGCCATATCA	TTCCAAACCA	GAAGATAGAA
7561	GAAGACGACG	AAGTAACCTG	TATCTGGCG	GTACCAACAA	CGCGCGCATC	TAAACTCATC
7621	ACTTTTACAG	CAGGTGTATG	ATAGCTCTCT	TGTTGTCACC	CCTTACAAAC	TCCTATTAGG
7681	CGCCTGCTTC	TAAAGTACGG	GTATACCTAT	GGGAAGTGGT	CTGATGTCAA	CGGCGCCCTT
7741	GGTGACGACG	CCCGAGTCTG	TGAGCTCATG	GGATTAACAA	ATTTAGAACG	ATGATGTCAA
7801	TCTTACAGTT	GGTTCGACGC	GAITGTGGGA	CCAACAACCC	CACCTTTGCG	TGCAACCCGG
7861	AGCGTGGCTG	CAGTTTATAG	CGCAGACACA	TGCGCGTPTT	ACACCAACAG	CGCGGTTTAC
7921	GTCTCCGAGA	GGCAGGCTAA	GGTCACAATG	GATCAAAATC	CAGCCAAAGT	GGATCAGTGT
7981	TTCCGAGACA	CTACCAATTG	TTGCTTTGCT	AAGGCAAGAA	CTTCAACACA	ATCTGGGATG
8041	TCATATGAGG	ATGCTGTGTC	AAAGATGGCG	GCAAAACCCA	CGGCTGATCA	TAACTATGGC
8101	ACTACTTATT	CAGATTTTGT	CTCTGGGAGC	GCAAAAGCTG	TGCTTACAGAA	AATGTGTAAT
8161	CAATATCGCG	CTGAGTAGTA	CGACGCTCCA	ATGGCGATTA	TCCCAAAAC	TGAGGTGTTT
8221	CTCTGAGACA	AGGAAGAGCG	GAAGCGACCA	CGGTTCAATG	CTTTCTCTG	GTGCGCGCA
8281	CGAGTCCGCG	AGAAAATGAT	CTTGGGCGAT	CTTGTGGCGA	TAAACAGACA	CGTCTTAGT
8341	GATGCTTACG	GGTTTGGCAC	TTCCGCCCCC	GAGCGCGCGC	GCCTGTGTGA	ACAAATGGTG
8401	AACCGCGCAA	CAGAGCGACA	AGCTATCGCG	GTGATGCGGA	TCTGCTTTGA	TAGACTATTC
8461	ACGGCAGAGG	ACATGGATGT	TGAAGCCAC	ATCTGTGGTG	CAGCGCATCG	GGACCTGAA
8521	GGTGTTCACG	GGCTATACAA	TTATTAACAA	AGAAGGCCCA	TGTGTGACAT	CACAGGAAT
8581	ATTGTCCGGG	TGCTTGTGTC	CCGAGCTCCA	GGTACGCTTA	CAACAAGCAG	TGGCAACAG
8641	CTTACTTGCT	ACCTCAAGGT	TGCGCGGCT	TGCACGCGGG	CGGCAATTA	ACCAATTTGG
8701	TACTATATTC	ATGGAGATGA	CACCCCTCAT	ATCAAGAGAC	GTTCGCGCTA	AGAAACTCTC
8761	GATGAGTTCA	CGGAGGCACT	TGATGACTAT	GGGTTCCCCC	ACACCTTCCA	GGCGTCTGGG
8821	GACCTCTGCT	CTATCGAGTG	CTTGACGCGA	CACGTGGACA	GGTGTTCGCT	CCGGGAGGTT
8881	AATGCTTCCG	TGCTGTGGTG	ACAACTGCGA	CGTGGGATTT	CAGCGGTTCT	CCGGGAGGTT
8941	GGCATGCCAC	TGGGTTGATC	CAGCAGCTAT	ATTGTGATGT	ATTCCTACTG	GGCGGTGACT
9001	GCTGTATGTC	TGTTGGCTCT	GATTTGCGCT	TATGATGGA	ATGAGCCATC	GCAGCGGGG
9061	ACATTTGCTG	CTCTGGGCTG	CGAGCGAGCT	AGTCTGAGGC	TGCACGCTG	CGCTCTTCA
9121	ACCATCATGT	TAAATTTAGA	TGGTGTGAC	GCATCTAAG	TAGTCTGCTA	CACCTGAGCT
9181	TGCTATGGCG	AGCTGTCTCT	AGCGTTGGCC	TCCTTTGGCA	TGAGAGGGTT	GAACCTGCTG
9241	AGCGGAGAC	CGCGTGCCAT	CAGGCTGAT	ATGATCAAGT	TGGCGGGGTG	GAATGCGAAC
9301	TTTCCGCGAGA	TGTTACTGTG	GTACCGGAG	GTGAGAACAC	CACAGCCCGA	ACCAAGAGGC
9361	ATGTGTCTCT	TACCACCGGA	ACTATGGGAG	CGTCCGTACG	AAAAATTGCA	TTTGAGCAGC
9421	ATCGACCGCA	ATCGTGTGTC	TAGTCTGCTA	CGGTTTGGTG	TGTTTGTCTAG	TGCTATACTC
9481	GCTCTGCTTT	GCTTTTAAAT	CTTAAATCAA	TGTAGTACCA	GGACTACAG	CGAGGAGGTG
9541	AAGTACGCTG	TACCCACCGG	TGGCTGAAC	CGGGCTTTGA	GCACCCCCCC	TATCINNINN
9601	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	ATGTGCGCGG	TAAAGCGGAG
9661	GGCAAGGACG	CTAGGCTGAG	AGTCTGGGCA	ACTCTGCCCT	ACCCACCCCG	AGGCTACGCG
9721	TGCTCTGGC	GAGGACCGTA	ACATATCGCT	CGTCAAGGTC	TGACCTGAGC	TATCTTGTGA
9781	ACCATTTAAT	GGTCTTAACT	CGACCCCTG	GCTGGGGATC	TAAAGCGGCG	ACCCGGATGA
9841	GAGGGTGCAA	NNNNNNNN	NNNN			

【図 29 B】

FIG. 29B

3241	ACAGTGGACA	CCATAGACAC	ATGTTTAGTA	CGGTGCTTGT	CCGCAAGGCC	GAGTGGCGGA
3301	ACCTTTGCAA	CACCTGGCGA	TGACATGGCG	CGCTTTGGTG	ACCACCGGGG	GTTCGGCGGC
3361	CTTGGGCTGT	GCTTTTGAGT	ACGTGGACCA	TACATATACA	ACCATATGGG	CCAGGCTTCA
3421	GAACGGGTGG	CGCAACGAGT	CAGGGATTTT	GGCGGTTGCT	TGGAGACCAT	CTGTGTTGAG
3481	GAAGCCACCT	TTACTTGAAT	TGCTGGATGC	TAGTGTGCTT	GAAGTGTGCT	CAATTTGCTT
3541	GGAGGTAAAG	CTGTGGTGGC	CGCGTGGCG	ACGGGTTGCT	TGTTGGGACA	CTTCAACCTT
3601	GAAGATCTGC	CACCTGTGTT	CGAGCTTAGT	GCTCCGGTGA	TTATCAGCAA	ACCAAGCATT
3661	GGTACGGGT	CTTCTCTTAA	GGTACACTTC	ACAGGCGGTG	CTGAACAC	GGGATCCGCG
3721	CAGATCTGTC	TGTTGTCTTC	CTGACAGAGT	CGGCTAATGG	GTACTTGAGT	GTAGTGACAA
3781	CTGTATGOGA	CGGCAATGG	TGCTGGTGGC	CGCGGCTTAC	CCAGTGGCG	CGGTTTGAAG
3841	AGGCCACTTT	ACACGGCAT	ATCTGATGAT	GTCTGGGCT	ACTCTTCCCT	CCCGGCGATG
3901	AGTTCCCTAG	AGGCTTGGCG	CTGTGGCGCG	CGCGGGTITT	GGGTGATGAA	CAAGATGGA
3961	GGTGTGGTGT	GTGGCAGAGT	GGAGATGAG	GACGTCTGTT	TGACGTGTCC	CACGACATA
4021	GATCAACTGC	GGGGTGTCTT	GGATCCGCG	GTCTTGTGTC	ATCACGGTCA	TGCATACGGC
4081	CTGATGCTCG	GTGGTTACTC	TACAGTGGT	ATTTTGGCG	GTGTCGGAT	ATCTCGGCGA
4141	TGCGAGAAGC	CCTATTCTCT	CTCAGGGGCG	CAAGGGGAGA	TGCAAGGCGC	AGCTGTGACA
4201	CCACATATCT	CTGAATACAC	CTACTAGTCC	CTACTGGTT	CTGTATAGT	ACAAAATAT
4261	CCAGTGGACC	TGGTCAACA	GGGACACAA	GATCTGGTCC	TTATACCAAG	TSTGGTCTC
4321	CTCAAAAGCA	TGGCCCTTCA	CAITTAAGAG	ACATAAGA	TTAGACCTGA	AAITTAGAGT
4381	GGCAAGGCG	CTGACGGTGT	GACGGTCACT	ATGTTGAGTA	ACCTTGGGTA	CATGACCTAT
4441	GGCGGCTTCT	TGTTGGATCC	GGAGACGAT	CTGACGGGTT	ATGGCTGAT	CATTTGGCA
4501	GATGAGTCT	GGTCTGATC	CTGCGCATG	CTGCGCATG	GGCGCATG	GGCGCATG
4561	GAGAAGCTG	GAGTGAAGC	CGTTGTATTC	GGCAAGCCA	CGCTTGTG	CAATCAAGTA
4621	CGGCCACACC	CCAACTTGA	TGAATATTTA	TTTACATATG	AAGGCGAGCT	GGACTTCTAC
4681	GGGCGCCAAA	TCAAATTTGA	CAACTACGA	ACTGCTAGC	ATGTTATCTT	TGTGCTATCG
4741	AGGGCCAGGT	GGCGGAACT	AACGACAGC	CTCTCGGCG	TGGGCGTTCA	TGCATGAGT
4801	TTTTGGCGCG	GCTGTGACAT	CAAAACCAT	CCCGGCTCAG	GCTCTATTGT	TGTATGTTGA
4861	ACTGATGCAT	TGTCACAGG	CTTCACAGGA	AATTTTGA	TGCTCATGCA	CTGCGGGTGT
4921	TGCTTAGAGC	AAACTGTGAC	TAATGACATG	GACCCACGCT	CCGCTAGGTA	GGCCCGAGTG
4981	GTGGCATGTA	CTGCTGATCT	CGTATGTCAG	CGGCGGGAG	CACCCGGTGC	TGCGCAAGG
5041	GGAGGCGTACT	ACACAAACCA	TCCAGGACCA	GACCCCTGCG	TGCAAGGCTCC	CGATGCTAAC
5101	GTCTGGCAAG	CAGCGGAGAG	CGCATGTGTC	TTTTATGATT	GGAAATGCTG	TAGGATACAG
5161	CAGTGGCTGT	GGGCAATACA	TGACTTAGGG	TGCACACAT	GTGCTGGTTG	TAGCCACAC
5221	ACTCCAGTGC	GGGTGATGGA	CACACTGAGG	GGTACCTGCG	CGACAGCTGA	GGTGACACT
5281	CGAGCTCTCG	CGGAGGAGCA	GTGGCGGCTG	CTTATGCTGT	TGCACTTTGTA	CATCTGCTAA
5341	GAGACCGAG	CCCAAGGCT	AGATGATGAG	ATCAAGTGA	AGTGTACT	CACACATACT
5401	ATTAAGAAC	CCCTGTGTA	CGCTTTAGAC	ATGATACAG	TGCAATTCAC	TACCAACAT
5461	GACTTGACTC	GGGTATGAG	GGGCGCTTGA	TGACAGACCA	TGTTCTGTGA	AGCAGGCTAC
5521	CGCCCATCTC	TCTTCTGCTG	CGGCGCTTGG	CGACCTCTCT	TGCGCTTTGC	CGGCGGCACT
5581	GGAGCTTTAG	TGCGGTGGCG	CGTTTGGAGC	GATGCTACG	CGGCTGTGCG	CGGCGGCGT
5641	CCGAGCGGGA	CAGACGAGAC	TGCGGCTACG	CGGCGGCTCT	TGTCACAAAG	CTGCGGAGAT
5701	TCAAGGAATC	TGCGGAGCT	GCAGGCGGCA	GCTGTGCG	CGCTGAGCAA	ATGAGCGGCT
5761	GGAGTAAAGG	GTGCTAGTCA	ATATCTGGCA	CGGCGGCTC	CTTCCGCGCG	CCGCTGTGTC
5821	CAGGCTGCTC	AGTTCCTGCA	GACATACTTT	ATGCTCATAT	CATCTCTGCG	TCTGCTTCTG
5881	CGTGGTGTTC	AGGCTGATGCA	GTCTCTTACC	CGACTCGG	GGTGGTGTTC	CGGCGTACA
5941	GCAGCGTTTG	GAGGTGCCCA	TAAAGTGTGT	TGGGCAATG	CAGGAGAACT	CTGTGGTATG
6001	CTGCGAGACG	CGGCCCTGCG	CGGCTAGTGT	TGCGGCTCT	CGGTTTACG	AGGCTGTGTC
6061	ATGCGGACTG	TACCGGGGCT	TGACTTCCTG	TTTTGGGTCG	TACGCGGTTG	GGAGGCGGTS
6121	GTGGTGGTCT	CGSTGTGCA	GAGCAAAATC	TGTTTGGTT	GGGCTGACAT	GACACTTACT
6181	GTGATGATCT	TGCTGCTGAT	CTGCTCTCTC	GTGGCGGAG	TAGCGGAGCT	CTGTGCTGCT
6241	GAATCTCTTA	CTGCTGCTG	CTGCTGCTG	CTGCTGCTG	CTGCTGCTG	CTGCTGCTG
6301	AAAACACCTA	TTTGTGAAA	TTACTTCTTG	ATGCTGAGAT	TGGGCGCA	AAITTAAGCA
6361	CTTTOCCCTT	GGGCGCGTGT	GTACCTATGC	GCACAGGCGC	CGAGGAGATA	CACACGATAT
6421	GGTGTGGTGT	GGGGATGTCT	GTAGCTTTGC	TTTGTGGTGC	TGCGAGCTGT	TGCGGATTTG
6481	CGGCGTAGG	ATGTTGCCAC	CTTCTGGTGT	CCCATGATG	CGTCTCCATC	TGATGGTGTG
6541	GGGCGTAGG	TGTGATCCGG	CACCTTGTGT	ACCATCTGTC	GGTGTGAGA	ACGCTGTGTC

【図 30 B】

FIG. 30B

NS 2 タンパク質および遺伝子配列

NS 2 アミノ酸配列：（配列番号 4 2 4）

REGRVFGLEVCADLSWLEVFETGXTWYMSVFSFKCAVFAFTSPLEGRHYKLQYRYAAQVYAKLLLAAGCGPLGRFEPFASV
GVIAAGCMIAFRESRISIVFIIICAITVDPTIDTIVACILSAGPSARTIALADIMARFEDHRAIRAVIRCFGRSEYTYTNM
QGVSEVAQAVRDTGGCLEPVVLEEFETFEVVDTMNLVCOQLGGCKPVVARECOTRVLCHLNPEDEPPGQFQS

NS 2 遺伝子配列：配列番号 4 1 9 のヌクレオチド 2 9 1 1 - 3 6 3 0

NS 3 タンパク質および遺伝子配列

NS 3 アミノ酸配列：（配列番号 4 2 5）

AEVITCKPISLTWFLKACTLTGPADTF389QIVVLEGLIGRNM3TAVGGTLVATGHIGAGARGLATCAGLRITFLVYALGCDVVA
YSLZFGMSLSEPCPCAFSRVYVMHMGSDVGRVNEDEVCIDCPTRIDQLRSGSGSPVLCIDGHAYALMLGGYSTSGICARVR
IVREQWNAIS5SGGGGGQAPAVITPSTSEITLYATPTGSGCKSTKYPTDVLQKSHKVLVLEFSVAVYKSAVPIKETIKIRELIR
AGTGSDGVVTITGELAHMTHGPTLVDEETNLQGVAVVLCIDECFTDSSTLLIGLIGAVNMAKCAZHVIVVEHATFAGIQVQV
HEVTPRYVITVRGDPVDEKATKLOWPTGRHVIYKHSVAKAF7QQLSCLGVAVSPARGDITKTPALASVIVVATDIA5S
TCGTHFDHSDVIDGGCGGQVDTVTIMDPTFSISASVVPCTAALRMQRQRTGEGRGAIVYITTEGALPCVSPVDANVWQAAESA
NVFYDWAARITQQLLAAYHDLGCTPAC3CDPHTEVFVMDTLRALJRAPEVITAAALAGEQAPLLYVQLGICKETLHAGFDGDI
KXKRLANNYKTKLLVALDNPTLEPT3QHDLPTRAGALSSTVFVEA

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

NS 4 タンパク質および遺伝子配列

NS 4 A アミノ酸配列：（配列番号 4 2 6）

GIGFILLAGSLAASFAFAGATGALVPSA7KSVJNGPAGVT

NS 4 A 遺伝子配列：配列番号 4 1 9 のヌクレオチド 5 5 1 5 - 5 6 3 7

NS 4 B タンパク質および遺伝子配列

NS 4 B アミノ酸配列：（配列番号 4 2 7）

REDRTETANVAGRLVQACADSGILSLAQGTACNALSKLADASGASQVIAAPSPAPLVQVLQFLETFSSIASFGLICAG
CQAGCEFTLHGLVSGATAGLGHAKLLAIGATWLSYLOTPRGQMVAGLEVLAAGCICSYTOLDPLFCILTGWEAVVQABV
ATQKILSGSADNTLVDDLPAIFSPG3IA5GVLVFLINSVVTTMARLLSMCAKQTCIBNTFITERFGQQLSKLSLWRZVY
HKAQAREGTYQCG

NS 4 B 遺伝子配列：配列番号 4 1 9 のヌクレオチド 5 6 3 8 - 6 4 2 3

【図 30 C】

FIG. 30C

NS 5 タンパク質および遺伝子配列

NS 5 A アミノ酸配列：（配列番号 4 2 8）

YVGGIWSFALCVLRVAVDWAARHVFFFPVPMIGCSFAKCGRWLGTGTLITCGGSERVSLQCLCSTSDPTLSVGRWCRCSSWSV
GFFENPTTIAATIRLDPID3DKTLGFRYGVABIELEFRDNKNIIVCAASCCVDRAGVASVAKAPVPTANGIPISGPEPEYK
LSLCSF2SVCMENSNPAKTLVSCQSQAEVLEETVDTAGAVKCNLEARRRAEDVAQVRQAVGDEVTSLADEDVDTASVK
PQVRAAVAGSSTLDDVWVLTVRELGDQCONAKIFVQAAASFVTPVDRDRTRVSGVLERVRCMYRTPIKFEAPAVPIHNI
PSECHIVLRGICGSDQALTVPYGTCQTGTLTKHLTNKHSYIPKQKIEEDTEVTVICAVPTIRASKLITFRASDRSVSCCHPLQ
TPEALLKXVGPWKHS2CKPLGDDARVCDVWGVTIYEPG

NS 5 A 遺伝子配列：配列番号 4 1 9 のヌクレオチド 6 4 2 4 - 7 7 9 4

NS 5 B タンパク質および遺伝子配列

NS 5 B アミノ酸配列：（配列番号 4 2 9）

NQSYSVSRPITVAPITPEPLFATRSVAGILRADSRVYCTTAVDVSRQAKVTIDQTSKXVQCQCRDYNCCLRKAKCFKQSGXS
YDZASVKMRANTTDLMHGTITYSLVSGRAKPVVOKIVNOMRAGVDAPMRIIPKEPVFERDKREIKP3PFIYFGCAARVAD
KMLGSDGAIITHVL3DAYGFATPPEPARLLEQWNRATPEQJAVDAICFDSITAEEDMDREANIVAAHADPEGVHGLYN
YKFSPMGDIITHGVRCRASGTLTSSGNTLTCYLVRAACTRAGIKPIGLIIGDDTDIITERCAGETLDEFSRALDDY
GFPTTFGASGDSLECCSAHVDSVCLRGGRMMLVPQARATARVLEKEDLSYISSYIVMYPTAAVTVYVLLPLLCMLIR
NDEPOTGTFTVLTVHGSVSVPWILLPTIIVNLIIG3DALQVREITASMAELSSALFPMRGLXGWRERRRAIRRAIMIKVGS
WNAFQAMLMWSFVETPQPEPKGNL2PELWEPENLHSTIDRNKRGSLF8FVLVSAIALLCLL

NS 5 B 遺伝子配列：配列番号 4 1 9 のヌクレオチド 7 7 9 5 - 9 4 9 5

5' UTR 配列

5' UTR 配列：配列番号 4 1 9 のヌクレオチド 1 - 3 2 7

3' UTR 配列

3' UTR 配列：配列番号 4 1 9 のヌクレオチド 9 4 9 6 - 9 8 6 4

【図 31 A】

FIG. 31A

ヒトベギウイルス 2 (ABT0041P, US) 核酸配列 - 配列番号 4 3 0

1 NNNNNNNNNN NNNNNNAATGC GCATATTGCT ACTTCGGTAC GCCTAATTGG TAGGCGCCGG
61 CGCGCAAGCGC CGCGCAAGGGC CCTAGTAGGA CGTGTGACAA TGCCATGAGG GATCATGACA
121 CTGGGGGTGAG CGGAGGACAGC ACCGAAAGTCG GGTGAACCTCG ACTCCAGTGC CGACCAACCTG
181 GCTTGGTCTGT TCAATGGAGGGC CACGCCACCG GGAACCGCTGA TCGTGCAGAA GGAATGGGCTG
241 CTGCACTGGT GCGATGCGCG CAATGACCTCC GTACAGCCTTG ATAGGGTGCC GGGATGGCCGCC
301 CCGAGTGTGGA CGTCCGTGGA GCGCAACATCG GGGTGTTCAA CTGATCAAA CATTGTGTCT
361 CCACTCGTGG GCGGCGACCTA TAATACCTCC TCGGGCTGCC GGGCTPTAAA TGGGAGGTAC
421 CACTGCGGTG GTGGCTCTTG CGGTGCACCA AGTCTGTGCG AGTCTGCGGG ACCGAGCTTG
481 CGGCTGTGGC CATTGCTTGC GTTGAATCGA TCCGGTATGT GTTCGATCG GTCCAAAACCT
541 GAAGGGGCGCA TTGAGTICAGG GCATAATATG CAGTCTCAGC GCGCATGTGT GACTGGTGAG
601 GGTTCGCTGT CTCTTCTCAA CTGTGTGAAAT CAACTCGATA TTATGTGTGT TTTCACCGGT
661 TGCTGTGTGA CAGAGCTCTG CTGTGTGTGT TGCAACGGCA ATGCCACCTA TCTATCTCG
721 TGGGACTATC TTGGGTCCGG TGTAAGTCCG CGGCTGCAC GTCAATAGGG TGAAGGAGCT
781 GAAGTGTCTC TTGCTGTGAT CGGCATTGCA GTTGGCTCG GGTGTGTAGC TGAAGACTTT
841 GGTATGTCCG AATCTATGCG AGCTATTCTA TGCATTG3AT TTATTGCTTG GTATGCTAGG
901 GGTATACCTA AAACATATGG CTGACCGCTC TCGCCCTCAG TGAACATTT TCCCTATGCT
961 TCTTATATCT CAGATACTAT CGCATTTGGT ACGTGGATAC TACAACTACC TGGCTTTTGT
1021 TGGCAAAATGT TTGTCAACTTT TCTTACTACT TCAAGCACTT GGAATCTTTG GTTGTGTAGC
1081 CGCGGCAAGA CTGTTGCTGT GATAGCAATC CTTTGTGGTA GTCTACAGGT TATGGCA7AC
1141 AAGCATCAAT CTGAAAGCTA CTTCAAAATC GTTACCAATA CCAATGCTTC AATGCTATGT
1201 AATTGTGACT GCCCCTTTGG AACCTTTACT CGTAATACTG AGTCTGCTTT CTCTATACCT
1261 AGATTCTGTC CTGTTAAATAT TGACAGCTCT ACATTTAICT GTCTGTGGGG GTCTGTGGTG
1321 TGGTTTGTGT AGAAGCATCA CGGTCCATCA TCGGAGCTTG GCATGCGCCG AGCAGCCGAT
1381 TCCGCTTTGT GCTATACTTA TGTAAGACAT GAGCCACTCT CTTGG3ATCA TAAACAACT
1441 ATCATACTCT AGAAGCTGCG CAACTCCTCG GCTAGATCTA CACTGCTCC ATGCGTGGC
1501 AAGTGGGGCA ATGCAACTGC TTGTATCTTT GACCGCGGCT CGCGGTTCG CGGGAGCGTG
1561 TATGGCGGTT GTTCTTATAC TAA7TGGCACT CAGCATCSAT CTGSGATCG ATGCGGATAT
1621 GGTATCCGTT ATGGACATCAT AGATTTTGTG CAGCTTG3TC AGATTCGACC CAACATCTCG
1681 AATACGACCA TTGAACTTGGT CGCTTGGCGCG CGCTTTGIGA TCGCATCCGG TCTTCGGCGT
1741 GECTACGGTT GCAAGCGGTG CGATGCGGCTG GTGCACTGCT ATAGGTGTCC TTCAATATGT
1801 GACCTTTGAAC AGTTTGTGTC GGGGCTCGGG AATAGGGTGC CACTGCTGCG CAGAGCTGTCT
1861 CGCGAGTTGT GTATTACACC TCAGTGGGCG AGACGCGGCT TCGGGGTATC TAAACAACCT
1921 TTAAGCTTTC TGCAAGCTTT CGT7TAGGAC ATTTTCTATG ACCTPTTTTC CAACCGACCG
1981 CCTGGCGGTG TAAGTGTGTG TAAACAATAT GCTTTCTATC CGAAGGGAGG CGGCTTT7TG
2041 CAGCTCATCG GAGAGCGTGA GGTGT7TAAC COTTAACACT CATCTTTAAC CTCTTGCTG
2101 ACTTTAAATAT CCTCTTATTT GTTAAGTGTGT GTTGT7TCTG GGGGCGGATT CGTCCGACT
2161 TTATCATAT TTGTTGGAGG CGTGGAGACT GTATATGCTT CTTGT7PACT TAAGCTGTGAT
2221 TGCGCTGTCT GCAACGTATG GTTCTGT7TC ACATCTG3CA CTGTGCTGAC TTTCATGAG
2281 GTCTTCTGTC TCGCGGTGTG GACCGGCTTA TCGCTCTGCG GGCATCTGAC ACCACCT7CG
2341 GACCGTGGTT GGGAGSGTGC TATGGCGATG TCA7GGCGA TCTGACAGAC TACTGGCTGC
2401 ACGTTCGATG TCTTTTCTCT CA7CCAGTAC TTTCCTACTG TCGCTGG3AA CAACTCATAT
2461 ATCATTTTACT GTGGTGAACCT ACTGTTTCTC GGGGACATCA CGGGCATCTA TTGGCT7GAT
2521 TTTTTCGCTG GCAATGTGCT CTGTGACTTT ACTCT7TTC TGGGT7TAAG GT7AATGCTT
2581 GCTGGCTTCA ATATAGTATG CT7TGTTCCT ATACGCGACG CACGCGGCTG ACTGAAGCTT
2641 TCGACTTCGC GTGTGACTTT GAGTGTG3TA CT7GCTTCT TAATCTATAT ACTATCT7CA
2701 CCTGTTAAATG TCGACAGCTT AGATAGCTG TACAGCTCTG CAAT7TAA GATGATCTAC
2761 TCTTTTGACA CTTATCATAT GACTATTTCT TACATTTCTT GCGTGT7GCT CTACCTCCAG
2821 GTGTGCGCCC GCGTGGGCT GCGGCTATG TGGCGGCTCA AGCTATCTCG AGGGCT7GCT
2881 TGTGCGCGTG TGT7GGCGCA CGGAGTGTGC CGACCGGGCG GGGTATTTGG TCTTGAAGGT
2941 TCGCGGGACA TCACTGGAGTT GGTGGAGTTT ACTGGCAACT GCACTGTGTA CATGTGCTGT
3001 GTTTCCTCAT TTGTGTGCGC AGTGTGCGC TTCACTGCGC TTCACTGAGC ACGGTAAAG
3061 CTTCAGACT ACTGGGTATG GCGCGACTTA TGTCCGAA CA7CTCTGCA TACTCTCTG TCGCGTGT
3121 GGTGCTCTCG GACGGAGTT CCA7TTCCGT GCAAGCGTGG GTGCT7TTG GTGCGTGT
3181 TGCATGCTCT GGC0CCCGTA G7GCTCTGAA A7CAGCACTGG TCTTATCTTC G7GTGCTCTG

【図 31 B】

FIG. 31B

3241 ACAGTGGACA CCA7AGACAN NNNNNNNNNN KNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
3301 NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN KNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
3361 GTTGTGCGTT GCTTTGGA7C ACGTGGCACA TACATATACA ACCACATGGG CCAGGTCTCA
3421 GAA0GGGTGG CGCAAGCAGT CAGGGAT7TC GCGCGT7GCT TGGAAACAGT C3GT7TGGAG
3481 GAGCCCACTT TTACTGAGGT CGTGGATGAT ACAATGAGTC TAGTGTGTGG ACAAT7GCTT
3541 GAGAGTAAAC CTGTGTGTGG CGGCTGCGGC AGCGGTGCTT TGTGTGGACA CCTCAACCT
3601 GAGACCTTGC CACTTGGTTT CAGCTGA7GT CCGTCCGGTG GCTCCGGTGG TATACACAA ACAAGCAAT
3661 GGTACGTG7T CTTCTCTTAA GCGCACACTC ACAGCGG7GT CTGACAGAAC GGAATCCGGC
3721 CAGATCTG7G TGTGTCTCTT CTTGACAGGT CGGTCAATGG GATCCGAGTC GATGTAGACA
3781 CTGTATGCGA CGCGGCATGG TGTG7GTGGC CGCGCGCTAG CCACTGGCTT ACTCTGGCTT TCCCGGATC
3841 ACCCAGCTTT ACACCCCACT ATCAAGATAT ATCACTGGCT ACTCTGGCTT TCCCGGATC
3901 ACTTCCCTTG AGCCCTGCTG CTGTGCGCG AGCGCGG7TT GGGTAG7AA CAAACATGGA
3961 GCGTGTGG7T GTGCGAGAGT GGAAGAGGAC GAGCTGTG7T GGACTGTGCT CAGCGACATA
4021 GATCAGCTGC GGGCTGCTC GGGCTGACG GTTTTGTG7T ATCAAGTCCA CCGATAGCG
4081 TGTATGCTCG GTGCGTACTC TACAGCGGT ATTGTG7C6G GTCTCCGAT ACTCGGGCA
4141 TGCGAGAACG CTTATCTCTC CTCAGG9GGG CAA9GCG3AA TCGAGSGCC ASC7TGTAC
4201 CCAACATATCT CTGAAT7CAC CTACTATGCC CCTACTG7TT CTGGT7AGTC AACAAATAT
4261 CGAGTGGAC7 TAGTCAACA GGGACACAAG GTCTTGG7TC TTATACCAAG C3GTGGCTGC
4321 GTCAAAAGCA TGGCCCTT7A CAT7AAGGAG ACATAT7AGA TTAGACCTCA AATT7AGGCT
4381 GTCAGCAGGGC CTGACGGTGT GACGGTCA7C ACTG7TGAGA ACTTGGGCTA CAT7AGCCTAT
4441 GCGCTGT7TC TCGTGGATCC GGAAGCAAT CTGCGGG7TT ATGCGCTAGT CATT7GGAC
4501 GAGTGT7CAC ATACATCA7C CACCACTG7A CTCGGGAT7G GCGAGT7GG CATGTATGCC
4561 GAGCAAGCTG GAGTGAAGAC CGTGTAT7TC GGCACAGCCA CTCCTGCTGG TATCCAAGTA
4621 CAGCCACATC CAACAT7TGA TGAATAT7TA TTGACTGACA CAGGGAGCCT GAA7TCT7AC
4681 GGGGCCAAA TCAAA7TGA CAACAT7AGA ACTGGTAGAC ATGTTATCTT TGTCACT7G
4741 AGAGCCAAGT GTGCGGAAT AACCGACAGC TCGCTGCTGCT TGGGT7TGG TCGAGTGA7
4801 TTTTGGCGG GCTGTGACAT CAAGACAT TTCCGCTGCT ACTGAT7GT TGTGGTGA
4861 ACTGATGCT TGTCCAGAGG CTACGAGGA AATT7GAT TTGCTG7TA CTGCGGCTAT
4921 TCGGTAGAC7 AA7CTGT7GAC AAT7GACATG CTAAGCCAGT TCTGCA7CTC GSCCGAGTA
4981 GTGCA7TGA CTGCTGCA7T GCGAAT7GAC CGGCGCGGAC GCAACGGTGC TGGCAGAGG
5041 CGAGGTG7ACT ACACAACAC TCCAGGAGCA GCACCTCGC TCAACGTTCC C3GTGCTAAC
5101 GTCTGGCAAG CAGTGAAGTC AGCCATGG7C TTCTATGATT GGAATGCTCG CAGGATACAG
5161 CAGTGTCTG CGGCA7ACCA TGA7TTAGGG TGTACACACT GCATCAST7G TACACCAAC
5221 ACTCAAGTGC GGGTGA7GGA CACACTGAGG CGGTACT7GC CGACAGCTGA G3TGACGACT
5281 CGGCTCT7CG CAGGAGAGCA GTGGCGG7G CTATACGG7G TACAG7T7G CAT7GCAAA
5341 GAGACCGAGG CCGACGGTCC AGATGAT7GC ATCAAGT7GA AAT7TTTACT CA7TACAAAC
5401 AATAAAACAC CCGTGT7TGA TGCCTTAGAC AATCCTACAC TGGAT7CAC TAACCAACAT
5461 GACTTGACTC GCGGTATGCG CGGCGCTCTA TCGAGGACAG TCGTGT7GGA GACAGCG7AT
5521 GCGCCCATCT TCTCTCTGCG GCGCGCT7TG GCGCTCTCTC TGGCTGCTG GCGGCCACT
5581 SCAGCTTTAG TGGCTGCGC CGT7TGA7GT GTTGACAACT GGGCTACTGG C3TGACCGCT
5641 CCGACCGGA CAGACAGAC CCGTGGCTAC GCGCTGCTG CAGGAGT7G CAGGAGT7G
5701 TCAAGAA7TC TCGCACT7T CCGAGCT7T CCGAGGACG CGGTGTGCGG CACTGCA7AA ACTGGCGCAT
5761 CGCAGTAGGG GTGCTAGCTA ATA7CTGGCA AGCCGCTCT CTTGSCCGCC CCGCTGTGTA
5841 GCGGCTGCTG AGTCTCTGA GACCACT7T ACCTGCA7TG CATCT7TGG TGTGCT7GT
5901 GCTGGT7GTC AGGCTGGTGA GTGCTTCACT GCGCTTGGCG GAGT7GTGC C3GTGCTAC
5961 CGTGGCT7TG GAGGTGCCCA TAAGTGG7TG TTAGCTAT7G CAGGAACCTG CAG7AT7TAG
6001 CTGAGAGCG GCGCCCGTGG CGGCA7GGT CGGCGTCTC CGGTCTAGC G3GCTGT7C
6061 ATGCGCGG7G TCA0CGGCT TGACTTCT7G TTTGGT7GCT TTAGAG7TGT G3AGGCGG7G
6121 GTGAGTCTG CCGT7GCGAC ACAGAGATCT TGTCTG7GT CCGGCTGAT GACCACT7G
6181 CTGATCTCT TACCTGCTCT CT7TTCCTCT GGTGCTGGA TACGTGAT TCTGCT7GT
6241 TTATTTCTAA GCAACACAA TGA7AACCGA TGGGCAACT GGCAT7TGT CAGTGTGGA
6301 AAACAACCA TTTGTGA7AA CTACTTCTTA TCGGCAAA7 TGGGCAACA AT7AAGCAAA
6361 CT7TCT7TGT GGGTGTG7T GTACATT7G GCGCAGGAC ATGAGG5GTA CACACAG7C
6421 CGTGTGCTG CGCGGACT7G GACTT7GTC TACGCACTC CAGGCGACT GTGGAT7G
6481 GCGGCAACT ATGCGGAC GTTCCGCTC CACTGCACT CACTGCACT CACTGCACT
6541 GGGCGCTGGC TTGCTACTGG CACCT7G7G ACCACCT7G GGTG7GGA AC7GTATCC

【配列表】

2017521654000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/38067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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

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

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

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

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

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

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

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 November 2015 (05.11.2015)

Date of mailing of the international search report

08 DEC 2015

Name and mailing address of the ISA/

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/38067

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***Please See Supplemental Page.***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US15/38067

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

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

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

The composition can be searched to the extent that the peptide comprises a portion of an amino acid sequence encompassing SEQ ID NO: 2 (Human Pegivirus 2 amino acid sequence). It is believed that Claims 10 (in-part), 11 (in-part) and 12 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims can be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 2 (Human Pegivirus 2 amino acid sequence). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: SEQ ID NO: 3 (Human Pegivirus 2 amino acid sequence).

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

The composition can be searched to the extent that the synthetic nucleic acid encompasses SEQ ID NO: 299 (Human Pegivirus 2 DNA sequence). It is believed that Claims 18 (in-part), 19 (in-part) and 20 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 299 (Human Pegivirus 2 DNA sequence). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "*" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An Exemplary Election would be: SEQ ID NO: 300 (Human Pegivirus 2 DNA sequence).

The inventions listed as Groups I-III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include human Pegivirus 2, which is not present in any of Groups II+ and III+, the special technical features of Groups II+ include SEQ ID NOs: 76-85, which are not present in either of Groups I or III+, the special technical features of Groups III+ include SEQ ID NOs: 300-303, which are not present in either of Groups I or II+.

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

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

-Continued Within the Next Supplemental Box-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/38067

***Continued from Previous Supplemental Page:

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

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

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

フロントページの続き

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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