(19)日本国特許庁(JP)　(12)特 許 公 報(B2)　(11)特許番号
特許第4593783号
(P4593783)
(45)発行日　平成22年12月8日(2010.12.8)　(24)登録日　平成22年9月24日(2010.9.24)

(51)Int.Cl.		F I	
C07K 16/10	(2006.01)	C07K 16/10	ZNA
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	A
C12N 1/15	(2006.01)	C12N 1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N 1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N 1/21	

請求項の数 12　(全 32 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-561222(P2000-561222)
(86)(22)出願日	平成11年7月20日(1999.7.20)
(65)公表番号	特表2002-521391(P2002-521391A)
(43)公表日	平成14年7月16日(2002.7.16)
(86)国際出願番号	PCT/EP1999/005173
(87)国際公開番号	WO2000/005266
(87)国際公開日	平成12年2月3日(2000.2.3)
審査請求日	平成18年6月13日(2006.6.13)
(31)優先権主張番号	98113595.7
(32)優先日	平成10年7月21日(1998.7.21)
(33)優先権主張国	欧州特許庁(EP)

前置審査

(73)特許権者　504053139
ゲンマブ・アクティーゼルスカブ
Ｇｅｎｍａｂ　Ａ／Ｓ
デンマーク、デーコー－１２５３コペンハーゲン・コー、トールズボズギャーゼ３３番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗Ｃ型肝炎ウイルス抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープを特異的に認識し、共有的または非共有的に会合したＥ２／Ｅ１複合体を沈殿させることができる、図６（V_H）（配列番号３）に示されるＤＮＡ配列によってコードされるアミノ酸配列を含むヒト抗体のV_H領域の相補性決定領域（ＣＤＲ）および図５（V_L）（配列番号１）に示されるＤＮＡ配列によってコードされるアミノ酸配列を含むヒト抗体のV_L領域のＣＤＲを少なくとも含む抗体。

【請求項２】

該抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、合成抗体、抗体断片、またはその化学的に修飾された誘導体である、請求項１記載の抗体。

【請求項３】

配列番号４に記載のV_H領域および配列番号２または６に記載のV_L領域のアミノ酸配列を含んでなる、請求項１または２記載の抗体。

【請求項４】

請求項１～３のいずれかに記載の抗体の免疫グロブリン鎖の少なくとも１つの可変領域をコードするポリヌクレオチド。

【請求項５】

請求項４記載のポリヌクレオチドを含んでなるベクターであって、場合により該抗体の他の免疫グロブリン鎖の可変領域をコードする請求項４記載のポリヌクレオチドと組み合

わせて含んでなるベクター。
【請求項６】
請求項4記載のポリヌクレオチドまたは請求項5記載のベクターを含んでなる宿主細胞。
【請求項７】
Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープを認識することが可能な抗体またはその機能的断片もしくは免疫グロブリン鎖（群）の製造方法であって、
（ａ）請求項6記載のいずれかの細胞を培養すること、および
（ｂ）該抗体またはその機能的断片もしくは免疫グロブリン鎖（群）を培養細胞から単離すること
を含んでなる方法。
【請求項８】
請求項4記載のポリヌクレオチドによってコードされるまたは請求項7記載の方法によって得ることが可能な抗体またはその断片。
【請求項９】
請求項１～3のいずれかに記載の抗体、請求項4記載のポリヌクレオチド、請求項5記載のベクターまたは請求項6記載の細胞、および場合により免疫診断方法において慣用的に用いられる適当な試薬を含有する診断用組成物。
【請求項１０】
Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２の存在に関するインビトロ免疫アッセイであって、該Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２の、請求項１～3または8のいずれかに記載の抗体との共沈殿を非還元的条件下で測定することによって特徴付けられるインビトロ免疫アッセイ。
【請求項１１】
被検体におけるＨＣＶ感染の処置もしくは予防のためのまたはＨＣＶ感染の再発防止のための医薬組成物の製造のための、請求項１～3または8のいずれかに記載の抗体、請求項4記載のポリヌクレオチド、請求項5記載のベクターまたは請求項6記載の細胞の使用。
【請求項１２】
該医薬組成物が肝臓移植前、肝臓移植中または肝臓移植後に投与されるように設計されている、請求項１１に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
発明の属する技術分野
本発明はＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープに特異的に結合できるヒト抗体およびその種々の用途に関する。
本明細書では幾つかの文献を引用している。ここに引用している文献（製造元仕様書、指示書等を含む）はそれぞれ、引用により本明細書に包含される。しかし、これら引用する文献が本発明に対する先行文献であると表明するものではない。
【０００２】
発明の背景
Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）は非Ａ非Ｂ肝炎の主たる病因である。供血者におけるＨＣＶ感染の罹患率は０．４から２％と算定されている（Chooら、1989）。急性ＨＣＶ感染は７０％以上の患者において、硬変症および肝細胞癌に進展させかねない慢性肝炎を発症させる（Saitoら、1990）。ＨＣＶはフラビウイルス科に分類されるエンベロープを有するプラス鎖ＲＮＡウイルスである（Franckiら、1991，Millerら、1990）。ＨＣＶは３０１０から３０３３アミノ酸のポリタンパク質をコードする約９５００ヌクレオチドのゲノムを含有する。宿主およびウイルスプロテアーゼによるこのポリタンパク質のプロセッシングにより、構造タンパク質および非構造（ＮＳ）タンパク質が産生される（Riceら、1996）

。構造タンパク質にはヌクレオキャプシドと２つの推定ビリオンエンベロープ糖タンパク質Ｅ１およびＥ２がある（Miyamuraら、1993）。非構造タンパク質にはＮＳ２からＮＳ５までの抗原がある。

【０００３】

急性感染が成功裏に治癒する患者も存在し、そのことはＨＣＶが宿主の免疫系によって制御可能であることを示している。宿主がＨＣＶ感染に打ち勝つ機序は依然不明である。これまでの報告では、ヒトおよびチンパンジーはウイルス中和抗体を産生できることが強く示されている（Chooら、1994，Farciら、1994，1996，Shimizuら、1994）。組換えＥ１およびＥ２タンパク質によってチンパンジーを免疫することで、均質なＨＣＶ分離株による一次感染の予防がインビボにおいて成功をおさめている（Chooら、1994）。この研究では、抗Ｅ２抗体の高い力価を示すチンパンジーのみが予防された。中和性抗原ドメインは同定されなかったが、中和抗体の誘導には免疫原の構造が重要であると推論されている。

【０００４】

現在までのところＣ型肝炎ウイルスを増殖させる効率的なインビトロ複製系が存在せず、中和検定法を開発できないため、抗Ｅ１／Ｅ２抗体の生物学的機能を評価する検定法がその替りとして活発に調べられている。感受性細胞と推定されるものに対するウイルス付着を防止することが予備的研究として開示された（Shimizuら、1994，Zibertら、1995）。より最近になって、高度に精製されたＥ２タンパク質の感受性標的細胞に対する特異的結合性を利用する「インビトロ」結合中和（neutralization of binding，ＮＯＢ）検定法が開発された（Rosaら、1996）。この検定法では、このような細胞に対するＥ２の結合を中和できるＮＯＢ抗体を定量的に評価することができる。この系を利用し、RosaらはＥ１およびＥ２タンパク質によって免疫されて高い抗ＮＯＢ力価を示すチンパンジーのみが感染チャレンジに対して予防的であることを示したが（Rosaら、1996）、このことはＮＯＢ活性がウイルス感染の「インビボ」中和の指標となり得ることを示している。ＨＩＶ感染では、同様のモデルによって最近、エンベロープの糖タンパク質オリゴマーと結合する抗体の親和性がウイルス中和を予知する良好なものであることが示された（Foutsら、1997）。抗Ｅ１および／または抗Ｅ２抗体の生物活性を評価する別の方法として、これらの抗体がビリオン表面に存在すると考えられる天然の構造を認識できるか試験することがある。インビトロ試験により、Ｅ１およびＥ２が相互作用し、非共有的に結合した複合体を形成することが示された（Deleersnyderら、1997，Ralstonら、1993）。この複合体はＨＣＶビリオンの機能的サブユニットであると提示されている（Deleersnyderら、1997，Dubuissonら、1994，DubuissonおよびRice、1996，Ralstonら、1993）。ウイルス感染におけるＢ細胞レパートリーを調べることは、ウイルス感染に絡む病因論を理解するうえで重要である。ヒトモノクローナル抗体はそうするための代替法を提供する。ＨＣＶの場合、限定された数ではあるがウイルス抗原に対するヒトモノクローナル抗体の単離および特性化が報告されている。ウイルス抗原にはヌクレオキャプシド、ＮＳ３およびＮＳ４タンパク質（Akatsukaら、1993，Cerinoら、1991，1993，Chanら、1996，Mondelliら、1994）があり、より最近のものとして糖タンパク質Ｅ２（Chanら、1996）が挙げられる。後者の場合、その著者はファージ・ディスプレー法（phage display technology）を抗Ｅ２免疫反応をスクリーニングするための合成ペプチドとともに使用することで、Ｅ２配列を認識する特異的ＩｇＧ１本鎖Ｆｖを入手することができた。特異的な鎖状のエピトープ配列が同定されたが、抗Ｅ２抗体の生物活性は何ら記載されておらず、感染の制御あるいは進行におけるこの抗体の推定的な役割は未確定のままである。最近、WO97/40176により、ＨＣＶ Ｅ２抗原と特異的に結合できる、コンビナトリアル・ライブラリーから入手された免疫グロブリン分子が開示された。この免疫グロブリンのＦａｂ断片は結合中和検定法において結合活性を有することが示されたが、組換え的に発現されるＦａｂクローンおよび対応する全ＩｇＧ分子はＨＣＶ Ｅ２ポリペプチドとの結合中和に陰性であることが見出された。

【０００５】

発明の概要

本発明は、ＨＣＶ糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープを特異的に認識できるヒト抗体の可変ドメインにおける少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む新規な抗体に関する。さらに、本発明はこの抗体によって認識される抗原に関する。さらに本発明は、本発明の抗体または抗原をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ポリヌクレオチドまたはベクターを含有する細胞に関する。本発明のさらなる態様は、ＨＣＶ糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープを認識でき、かつ感受性細胞に対するＥ２タンパク質の結合を中和できる抗体の調製方法に関する。本発明はまた、本発明の抗体、抗原、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含有する医薬および診断用組成物、および種々の治療的および診断的応用におけるこれら本発明化合物の使用に関する。

【０００６】

発明の詳しい説明

このように、本発明の技術的課題は、ヒトにおけるＨＣＶ感染の処置および予防（阻止）のための手段および方法を提供することである。

この技術的課題は、特許請求の範囲にて特徴付けられる態様により解決される、即ち、本発明は１）コンホメーション依存性決定基（群）を認識し、２）種々のＨＣＶ遺伝子型から誘導される抗原を認識でき、および３）ビリオン粒子の表面に存在すると考えられる非共有的に会合しているＥ１Ｅ２複合体を沈降できる抗体を提供し、そして４）感受性細胞に対するＥ２タンパク質の結合を中和できる抗体を提供するものであり、これは本発明抗体がインビボ中和に利用できる可能性を示している。本発明の抗体は、ＨＣＶのような高度に変異しやすいものによる感染症と闘ううえで治療的または予防的戦略を展開するのに特に有用である。

【０００７】

従って、本発明は、Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープを特異的に認識しかつ共有または非共有的に会合しているＥ２／Ｅ１複合体を沈降できる、図５（V_L）（配列番号１）および図６（V_H）（配列番号３）に示されるＤＮＡ配列にコードされるアミノ酸配列を含むヒト抗体のV_Hおよび／またはV_L領域における少なくとも１つ（好ましくは２つ、より好ましくは３つ、４つまたは５つであり、最も好ましくは６つ）の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む抗体に関する。あるいは、および／または、さらに、本発明の抗体は、配列番号６のアミノ酸配列を含み配列番号５に示すＤＮＡ配列によってコードされる、配列番号１のＤＮＡ配列をコードするV_Lのアレル変異体（図５）であるヒト免疫グロブリン鎖のV_L領域における少なくとも１つ、２つまたは３つのＣＤＲを含んでいる。

【０００８】

抗体の可変ドメイン（重鎖V_Hおよび軽鎖V_L）それぞれが比較的保存された４つのフレームワーク領域、「ＦＲ」にフランキングされた、相補性決定領域、「ＣＤＲ」と呼ばれることのある３つの超可変領域を含んでいることは当業者に知られている。本発明抗体の可変領域に含まれるＣＤＲは、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest（米国保健社会福祉省(U.S. Department of Health and Human Services), ３版,1983, ４版,1987, ５版,1990）に従って決定することができる。上記可変ドメインを有する抗体の可変ドメインが所望の特異性および生物学的機能を有する他のポリペプチドまたは抗体の構築に使用できることは、当業者ならば容易に理解される。従って、本発明は、上記可変ドメインの少なくとも１つのＣＤＲを含み、かつ以下の実施例に記載する抗体と実質的に同じまたは同様の結合特性を好都合にも有しているポリペプチドおよび抗体をも包含する。上記の可変ドメインまたはＣＤＲを使用すれば、例えばEP-A10451216およびEP-A10549581に記載されているような当業界に既知の方法に従って抗体を構築できることは、当業者ならば容易に理解される。

【０００９】

「Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープ」なる用語は、本発明抗体によって認識されるエピトープの非鎖状という性質を規定するものである。

これは、エピトープの抗原決定基が、ＨＣＶ糖タンパク質Ｅ２のアミノ酸配列ではなく、その三次元構造に由来することを意味する。
【００１０】
「共有または非共有的に会合しているＥ２／Ｅ１複合体を沈降できる」なる用語とは、ビリオン粒子に存在していると考えられるＥ１およびＥ２の非共有的に会合している複合体を本発明抗体が沈降できることを意味する。
【００１１】
「感受性細胞に対するＥ２タンパク質の結合を中和できる」なる用語は、ＨＣＶ感染を受けやすい細胞に対する高度に精製されたＥ２の結合を候補抗体が中和（結合の中和またはＮＯＢ）できることを意味する（実施例４を参照）。好都合には、本発明抗体は約１μｇ／ｍｌの濃度でＮＯＢ活性を有し、好ましくは約０．１μｇ／ｍｌ、最も好ましくは約０．０３μｇ／ｍｌの濃度でＮＯＢ活性を有する。
【００１２】
本発明では、細胞に直接発現されたＥ２を認識できる抗Ｅ２抗体を特異的に検出できる、抗原を精製する必要のないスクリーニング検定法を使用することで、コンホメーション依存性決定基に対する抗体を同定し精製した。この検定法は遺伝子型１ａ誘導化抗原の発現を基礎としており、従って交叉反応性の抗Ｅ２抗体およびエピトープの特徴付けも行うことができる。この手法により、ＨＣＶに慢性的に感染された２人の患者から抗Ｅ２抗体を産生する２つのクローンを入手した。第１のクローン（クローン５０３）は遺伝子型４単離株に感染された患者（患者１）から入手し、第２のクローン（クローン１０８）は遺伝子型１ｂ単離株に感染された第２の患者（患者２）から誘導した。本発明ＨＭａｂはさらに遺伝子型１ｂ抗原に対しても良好な反応性を示すことが示され、このことは、これらの抗体が標的としている決定基（群）が世界中に蔓延している主要な少なくとも２つのウイルスサブタイプ（サブタイプ１ａおよび１ｂ）間にて保存されていることを物語っている。このことから、本発明の抗体は、２、３ａ、４，５および／または６などの他の遺伝子型の抗原とも反応できると合理的に予測することができる。これらの遺伝子型に関連する本発明抗体の結合活性は実施例に記載する方法に従って容易に試験することができる。
【００１３】
鎖状の決定基はペプチドスキャンニング法、ウエスターンブロッティング法、およびタンパク質の発現された断頭ドメインを利用する免疫蛍光分析法などの種々のスクリーニング手法では同定できないため、本発明に従って得られた結果は、本発明のＨＭａｂが認識する決定基がＥ２のコンホメーション依存性ドメインに標的化されていることを示している。実施例２参照。他方、還元または非還元条件下にて行った免疫沈降法は、本発明のＨＭａｂがコンホメーション依存性決定基を認識することを示した。非還元条件下では、これら本発明抗体は共有的および非共有的に会合しているＥ１Ｅ２複合体を沈降させた。実施例３．２参照。後者の場合、ビリオン粒子に組込まれた機能的サブユニットであると考えられる（Deleersnyderら、1997）。具体的には、エピトープ形成の動力学的分析によって得られたデータは２つのＨＭａｂがＥ２タンパク質における明らかに早期に折り畳まれるドメインを認識することを強く示している。このようなドメインは、タンパク質がさらに成熟し、ビリオン表面に存在しやすいＥ２形態の最終的なコンホメーション特性をとるまで、影響を受けやすい状態を保持する。この動力学的分析はＮＯＢデータ（即ち、抗体５０３がＮＯＢ活性を示すこと）と相俟って、本発明の２つの抗体が異なる決定基を認識することを示している。実施例４参照。あるいは、Ｅ２タンパク質に対するこれらの抗体の親和性が相違している。
【００１４】
本発明にて得られた最も鼓舞される結果は、本発明ＨＭａｂのうちの１つが強いＮＯＢ活性を示すことが証明されたことである。この観察事項はRosaら（Rosaら、1996）とともに、ＮＯＢ抗体が認識する決定基（群）が、明らかに種々の遺伝子型間で保存されているＥ２のコンホメーション依存性ドメインに標的化されているらしいことを示している。このようなドメインは、中和エピトープを含むことが示されている超可変領域１（ＨＶＲ）と

は別個のようである。最近の研究では、Zibertら（Zibertら、1997）は、ＨＶＲに見出される非ーコンホメーション構造に対する抗体の初期出現と急性の自己限定性感染症とを関連付けることができた。この研究の結果は、Ｅ２の鎖状決定基に対する抗体の存在と、ＨＣＶ感染制御におけるその役割との重要性を示しており、この観察事項はFarciらのチンパンジーモデルにて最初に行われた研究（Farciら、1996）と符合している。この後者の研究の著者は、充分に特徴付けられた接種原の感染力を中和できる抗体を含む、ＨＶＲ由来のペプチドに対する超免疫血清を作製した。同様の実験はShimizuらによっても行われた（Shimizuら、1996）。このように、すべての研究は、ＨＣＶの中和は大方、可変性の非保存性エピトープが関与するタイプ特異的であることを強く示している。それにもかかわらず、最近の観察事項により、ＨＶＲに対するものでない、交叉反応性の他の中和決定基の存在が示唆され始めた。Chooらによるワクチン接種実験では、誘導された中和抗体はＥ２のＨＶＲに指向せず、明らかにその抗原が有する他の決定基に指向していた（Chooら、1994）。最近、Abrignaniは慢性感染の自発的解消と高い抗ＮＯＢ抗体力価とが相関することを観察した（Abrignani 1997）。以下の実施例に示す患者では、Ｅ２結合における高度なまたは測定可能な中和は遺伝子型１ａ単離株に感染された患者由来の血清に限定されず、このことは本明細書に開示しているような交叉反応性のエピトープの存在を示唆するものである。精製ＭＡｂのＮＯＢ力価と患者血清中に見出される力価（本発明者らの研究における両患者は＞１：１０００という類似のＮＯＢ血清力価を有していた）との直接的相関性を見出すのは困難であるので、抗体５０３が極く低濃度（０．０３μｇ／ｍｌ）で検出可能なＮＯＢ活性を有し、強力な活性を示したのは予想外であった。実施例４参照。

【００１５】

本発明に従って調製されるＨＭＡｂはＨＣＶ糖タンパク質の生物発生学、折り畳みおよび組み立て（アッセンブリー）に関するさらなる研究、およびビリオン構造と推定細胞表面レセプターの特徴付けを行う有用な手段になると期待される。Ａｂ５０３に例示される本発明抗体はＮＯＢ活性を有するものとしてこれまで開示されている初めてのＨＭＡｂであるので、本発明抗体は受動免疫の研究に特に有用である。レンチウイルス科の場合、抗体注入研究により、制御における中和抗体投与の有益な役割と種々の動物モデルにおける感染予防さえもが証明されている（Conleyら、1996，Eminiら、1992，Putkonenら、1991）。

【００１６】

本発明の好ましい態様では、抗体はＨＣＶ　Ｅ２糖タンパク質と特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、または二特異性抗体、合成抗体、Ｆａｂ、ＦｖもしくはｓｃＦｖ断片などの抗体断片などのそれらの断片、あるいはこれらの化学的に修飾された誘導体である。モノクローナル抗体は例えば、当業界にて開発された修飾物によって免疫した哺乳動物由来の脾臓細胞をマウス骨髄腫細胞と融合させることを包含する、KohlerおよびMilstein，Nature 256(1975)，495およびGalfre，Meth.Enzymol. 73 (1981)，3に最初に開示された手法によって調製することができる。さらに、上記のエピトープに対する抗体またはその断片は、例えばHarlowおよびLane "Antibodies，A Laboratory Manual"，CSH Press，コールド・スプリング・ハーバー，1988に記載されている方法によって入手することができる。上記抗体の誘導体をファージ・ディスプレー法により入手する場合、ＢＩＡｃｏｒｅ系に使用されるような表面プラスモン共鳴を利用し、コンホメーション依存性ＨＣＶ糖タンパク質Ｅ２エピトープのエピトープと結合するファージ抗体の効率を高めることができる（Schier，Human Antibodies Hybridomas 7 (1996)，97-105; Malmborg，J. Immunol. Methods 183 (1995)，7-13）。キメラ抗体の生産方法は例えば、WO89/09622に記載されている。ヒト化抗体の生産方法は例えば、EP-A1 0 239 400およびWO90/07861に記載されている。本発明にて利用される抗体のさらなる供給源はいわゆる異種抗体である。マウスにおけるヒト抗体生産のような異種抗体の生産の一般原則は、例えばWO91/10741、WO94/02602、WO96/34096およびWO96/33735に記載されている。上記のように、本発明の抗体は完全な抗体のほかに種々の形態で存在すること

ができ、例えばＦｖ、ＦａｂおよびＦ(ａｂ)２、そして一本鎖形態である；例えばWO88/09344を参照。１つの特異性がＨＣＶ Ｅ２糖タンパク質エピトープに指向し他の特異性が好ましくはＣＤ３などのＴ細胞抗原に指向している二特異性抗体の場合、ウイルスエピトープを認識する結合部位の親和性は高いと有益であり、そうであればＨＣＶで感染された標的細胞またはウイルスを捕捉し、高効率で破壊することができる。他方、例えばＴ細胞を認識する結合部位の結合親和性は天然のＴ細胞レセプター／リガンド相互作用の程度、あるいはＴ細胞同時刺激分子とそのレセプターとの相互作用に通常見出される程度であるべきである。

【００１７】

本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖（群）は、当業者に既知の通常の手法、例えばアミノ酸の欠失、挿入、置換、付加および／または組換えおよび／または当業者に既知の他の修飾を単独であるいはそれらを組み合わせることにより、さらに修飾することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列を基礎付けるＤＮＡ配列にこのような修飾を導入する方法は当業界にて周知である。例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.を参照。

【００１８】

特に好ましい態様では、本発明の抗体は図５および６にそれぞれ示す$Ｖ_{H}$および／または$Ｖ_{L}$領域のアミノ酸配列を含有する。

【００１９】

さらなる態様では、本発明は本発明抗体によって認識される抗原またはそのエピトープに関する。この抗原またはエピトープはグリコシル化されていても、されていなくてもよく、または部分的にグリコシル化されていてもよい。ここに説明し実施例にて示しているように、本発明の特徴は、上記抗体によって認識される新規な抗原である。本発明の抗原およびエピトープを同定し単離するためには、例えば種々のｃＤＮＡを卵母細胞に注入してｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするに当たり、ｃＤＮＡ遺伝子産物が発現される充分な時間をかけ、所望のｃＤＮＡ発現産物の存在を例えば本発明抗体を用いて試験すればよい。

【００２０】

あるいは、大腸菌でのｃＤＮＡ発現ライブラリーを本発明抗体を用いて本発明の少なくとも１つのエピトープを有するペプチドに関して間接的にスクリーニングしてもよい（ChangおよびGottlieb, J. Neurosci., 8:2123,1988）。このような抗原の構造が見出されれば、結合パートナーおよび／またはドメインを合理的にデザインすることが可能となる。例えば、適当なコンピュータープログラムを用い、折り畳みシュミレーションや構造モチーフのコンピューターリデザインを行うことができる（Olszewski, Proteins 25(1996),286-299; Hoffman, Comput. Appl.Biosci. 11(1995), 675-679）。さらに、コンピューターを使用すれば、詳細なタンパク質モデルのコンホメーションおよびエネルギー分析を行うことができる（Monge, J.Mol.Biol. 247(1995), 995-1012; Renouf, Adv.Exp.Med. Biol. 376(1995), 37-45）。

【００２１】

別の態様として、本発明は、本発明にかかる上記抗体の免疫グロブリン鎖における少なくとも可変領域をコードしているポリヌクレオチドに関する。免疫グロブリンの一形態では、抗体の基本構造単位を構成する。この形態はテトラマーであり、それぞれの対（ペアー）が１つの軽鎖と１つの重鎖を有している、免疫グロブリン鎖の２つの同一の対から構成される。対それぞれは、軽鎖および重鎖の可変領域またはドメインが共同して抗原との結合性を担い、定常領域は抗原エフェクター機能に関与する。抗体に加え、免疫グロブリンは、例えばＦｖ、ＦａｂおよびＦ(ａｂ')２、および一本鎖抗体（例えばHuston, Proc.Nat.Acad.Sci. USA 85(1988),5879-5883およびNird, Science 242(1988),423-426）などの種々の他の形態（所望の活性を保持する完全長よりも短いものなど）で存在することができる（上記参照）。免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変ドメインは、ＣＤＲとも呼ばれる３つの超可変領域が介入する「フレームワーク」領域から構成される。

【００２２】
本発明の抗体は、本発明抗体の重鎖および軽鎖免疫グロブリン鎖をコードする組換えＤＮＡセグメントを単独または組み合わせて発現させることにより、調製することができる

【００２３】
上記抗体をコードするポリヌクレオチドは例えば、ＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ＲＮＡまたは合成ＤＮＡもしくはＲＮＡ、またはこれらポリヌクレオチドを単独または組み合わせて含有する組換え的に調製されるキメラ核酸分子であることができる。好ましくは、ベクターの一部である。このようなベクターはさらに、適当な宿主細胞での適当な条件下における該ベクターの選択を可能とするマーカー遺伝子などのさらなる遺伝子を含有することができる。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、原核または真核生物細胞での発現を可能とする発現制御配列と作動可能に結合している。このようなポリヌクレオチドの発現にはポリヌクレオチドの翻訳可能なｍＲＮＡへの転写が含まれる。真核生物細胞、好ましくは哺乳動物細胞にて発現させるための調節因子は当業界にて周知である。これは通常、転写を開始させる調節配列を含み、さらに要すれば転写を終止させて転写体を安定にするポリＡシグナルを含む。さらなる調節因子として、転写および翻訳エンハンサーおよび／または天然にて関連しているかまたは異種であるプロモーター領域が挙げられる。この場合、当業者ならば、軽鎖および／または重鎖の少なくとも可変ドメインをコードするポリヌクレオチドが両免疫グロブリン鎖またはその一方のみの可変ドメインをコードすることができることは容易に理解されるよう。同様に、上記ポリヌクレオチドは同じプロモーターの制御下に置くことができ、あるいは発現に関して別々に制御してもよい。原核生物宿主細胞での発現を可能とする可能性ある調節因子は、例えば大腸菌におけるＰＬ、ｌａｃ、ｔｒｐまたはｔａｃプロモーターを含有し、また真核生物宿主細胞での発現を可能とする調節因子には例えば、酵母におけるＡＯＸ１またはＧＡＬ１プロモーター、または哺乳動物および他の動物細胞におけるＣＭＶ－、ＳＶ４０－、ＲＳＶ－プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、ＣＭＶ－エンハンサー、ＳＶ４０－エンハンサーまたはグロビンイントロンがある。転写開始に関与する因子のほか、このような調節因子はＳＶ４０－ポリＡ部位またはｔｋ－ポリＡ部位、ポリヌクレオチドの下流領域などの転写終止シグナルも含有することができる。さらに、使用する発現系に応じて、ポリペプチドを細胞コンパートメントに導く、または培地に分泌させることのできるリーダー配列を本発明のポリヌクレオチドのコード配列に付加することができ、それらは当業界にて周知である。リーダー配列は翻訳、開始および終止配列とともに適当な段階にて組み立てられ、好ましくは翻訳されたタンパク質またはその部分を細胞膜周辺腔または細胞外培地に分泌させることのできるリーダー配列である。要すれば、この異種配列は、所望の特性、例えば発現される組換え産物の安定性または精製を単純化できる性質を付与するＣ－またはＮ－末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。この意味における適当な発現ベクターは当業者に既知であり、例えばOkayama-Berg ｃＤＮＡ発現ベクターｐｃＤＶ１（ファルマシア）、ｐＣＤＭ８、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐｃＤＮＡ１、ｐｃＤＮＡ３（In-vitrogene）、またはｐＳＰＯＲＴ１（GIBCO BRL）などがある。

【００２４】
好ましくは、真核生物宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトできるベクターにおける真核生物プロモーター系が発現制御配列であるが、原核生物宿主の制御配列も使用することができる。ベクターを適当な宿主に導入すれば、得られた宿主をヌクレオチド配列の高発現レベルに適した条件下に維持し、次いで所望であれば、免疫グロブリンの軽鎖、重鎖、軽／重鎖ダイマーまたは無傷の抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の捕集および精製を行うことができる。Beychok, Cells of Immunoglobulin Systhesis, Academic press, N.Y. (1979)を参照。また例えば以下の実施例も参照。

【００２５】
上記のように、本発明のポリヌクレオチドは、例えば遺伝子治療またはＨＣＶ感染に関連する疾患の診断に、単独にてまたは本発明の（ポリ）ペプチドを細胞にて発現するベクターの一部として使用することができる。本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを細胞

に導入し、次いで抗体を産生させる。遺伝子治療は治療遺伝子をｅｘ－ｖｉｖｏまたはインビボ法によって細胞に導入することを基礎としているが、これは遺伝子導入における最も重要な適用の１つである。インビトロまたはインビボ遺伝子治療のために適当なベクターおよび方法は文献に記載されており、当業者に既知である。例えばGiordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ.Res. 79(1996), 911-919; Anderson, Science 256(1992), 808-813; Isner, Lancet 348(1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77(1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2(1996), 714-716; WO94/29469; WO97/00957またはSchaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640およびそれらに引用される文献を参照のこと。本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは直接導入またはリポソームを介する細胞への導入用に、またはウイルスベクター（例えばアデノウイルス、レトロウイルス）に改作することができる。好ましくは、このような細胞は生殖細胞系列、胚細胞、または卵細胞もしくはそれらの誘導体であり、最も好ましくは幹細胞である。

【００２６】

さらに本発明は、遺伝子工学において慣用的に用いられるベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージであって、本発明抗体の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードするポリヌクレオチドを、場合により、本発明抗体の他の免疫グロブリン鎖の可変ドメインをコードする本発明のポリヌクレオチドと組み合わせて含むものに関する。好ましくは、該ベクターは発現ベクターおよび／または遺伝子転移または標的化ベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルスまたはウシパピローマウイルスのようなウイルス由来の発現ベクターを、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターの標的細胞集団内へのデリバリー用に用いてもよい。当業者に周知である方法を用いて、組換えウイルスベクターを構築できる；例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) に記載される技術を参照のこと。

【００２７】

別法として、本発明のポリヌクレオチドおよびベクターを、標的細胞へのデリバリー用にリポソーム中へ再構成できる。細胞性宿主のタイプに応じて異なる周知の方法により、本発明のポリヌクレオチド（例えば、免疫グロブリン鎖の重および／または軽可変ドメイン（群）をコードする配列および発現コントロール配列）を含むベクターを宿主細胞内へ輸送できる。例えば、原核生物細胞に対しては一般に、塩化カルシウムトランスフェクションを利用するのに対し、他の細胞性宿主に対しては、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションを用いることができる；上記 Sambrook を参照のこと。

【００２８】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換された宿主細胞に関する。このような宿主細胞は原核生物細胞または真核生物細胞であってよい。宿主細胞内に存在する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは宿主細胞のゲノムに組み込まれるか、あるいは染色体外に維持され得る。

【００２９】

宿主細胞は任意の原核生物細胞または真核生物細胞、例えばバクテリア、昆虫、真菌、植物、動物またはヒト細胞であり得る。好ましい真菌細胞は、例えばサッカロミセス（Saccharomyces）属、特にＳ．セレビシエ（S. cerevisiae）の細胞である。用語「原核生物」とは、本発明の抗体または対応する免疫グロブリン鎖の発現に関して、ＤＮＡまたはＲＮＡ分子で形質転換またはトランスフェクトできるすべてのバクテリアを含むものとする。原核生物宿主には、グラム陰性菌ならびにグラム陽性菌、例えば大腸菌（E. coli）、ネズミチフス菌（S. typhimurium）、セラチアマルセッセンス（Serratia marcescens）および枯草菌（Bacillus subtilis）が含まれ得る。用語「真核生物」とは、酵母、高等植物、昆虫および好ましくは哺乳類細胞を含むものとする。組換え生産手法において用いられる宿主に依存して、本発明のポリヌクレオチドによってコードされる抗体または免疫グ

ロブリン鎖はグリコシル化されるか、あるいはグリコシル化されないこともある。本発明の抗体または対応する免疫グロブリン鎖はまた、最初のメチオニンアミノ酸残基を含んでいてもよい。本発明のポリヌクレオチドを用い、当業者に対して一般に既知のいずれかの技術を利用して宿主を形質転換またはトランスフェクトできる。さらにまた、融合された、作動可能に連結された遺伝子の製造方法および、例えば哺乳類細胞およびバクテリアにおけるその発現方法は当分野に既知である（Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。ここに記載されている遺伝的構築物および方法を、本発明の抗体または対応する免疫グロブリン鎖を真核生物または原核生物宿主において発現するために用いることができる。概して、挿入されたポリヌクレオチドの効率的な転写を促進するプロモーター配列を含有する発現ベクターが宿主とともに用いられる。この発現ベクターは典型的に、複製起点、プロモーターおよびターミネーター、ならびに形質転換細胞の表現型による選択を提供可能な特定の遺伝子を含む。さらにまた、本発明の（ポリ）ペプチドの大規模生産用に、本発明の細胞を含むトランスジェニック動物、好ましくは哺乳類を用いることができる。

【００３０】

したがって、さらなる態様では、本発明は、Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２のコンホメーション依存性エピトープを認識できる抗体またはその機能的断片または免疫グロブリン鎖（群）の生産方法であって、

（ａ）本発明の細胞を培養し；ならびに、

（ｂ）該抗体またはその機能的断片または免疫グロブリン鎖（群）を培養物から単離することを含む方法に関する。

【００３１】

形質転換細胞を発酵槽において生育させ、当分野に既知の技術にしたがって培養し、最適な細胞発育を達成することができる。発現後、本発明の全抗体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖または他の免疫グロブリン形態は、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当分野の標準的手順にしたがって精製できる；Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982) を参照のこと。次いで本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖（群）を培養培地、細胞可溶化物または細胞膜フラクションから単離できる。例えば微生物において発現された本発明の抗体または免疫グロブリン鎖の単離および精製は、任意の慣用的方法、例えば調製的クロマトグラフィーによる分離および、例えば本発明の抗体の定常領域に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の使用を含むもののような免疫学的分離によるものであってよい。本発明の抗体を、例えば薬物ターゲティングおよびイメージング適用のために他の部分とさらにカップリングできることが当業者には明らかであろう。このようなカップリングは抗体または抗原の発現後に結合部位に対して化学的に行ってもよいし、あるいはカップリング生成物を本発明の抗体または抗原内にＤＮＡレベルでエンジニアリングしてもよい。次いでＤＮＡを適当な宿主系において発現させ、発現タンパク質を収集し、必要であれば復元する。

【００３２】

医薬的用途には、少なくとも約９０～９５％均質の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、９８～９９％またはそれ以上均質なものが最も好ましい。部分的に、あるいは所望の均質性にまで精製した後、この抗体を治療的（体外的なものを含む）に用いるか、あるいはアッセイ手順の開発および実行において用いることができる。

【００３３】

本発明にはまた、本発明の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖（群）の発現能を有する細胞を生産する方法であって、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを用いて細胞を遺伝子的にエンジニアリングすることを含む方法が含まれる。本発明の方法によって得ることができる細胞を用いて、例えば、本発明の抗体とその抗原の相互作用を試験できる。さらにまた、本発明は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるか、あるいは上記方法によって得ることができるか、あるいは上記方法によって生産された細胞由来

である本発明の抗体またはその断片に関する。本発明の抗体に関しては、典型的に、モノクローナル抗体に基づく治療が可能な実質的に任意の疾患の処置における個別的使用が見出されるであろう。特にこの免疫グロブリンは受動免疫化、または、例えば補体媒介性溶解（complement mediated lysis）による、ＨＣＶまたは望ましくない細胞または抗原の除去（これらはすべて、多くの以前の抗体に関連する実質的免疫反応（例えばアナフィラキシー性ショック）を伴わない）のために用いることができる。本発明の抗体に関して、処置に適当な典型的疾患状態には慢性ＨＣＶ感染が含まれる。

【００３４】

本発明の抗体、抗原およびエピトープは、例えばＨＣＶ感染患者の治療に用いることができる。このような治療は、例えば本発明の抗体、抗原またはエピトープの投与によって行うことができる。このような投与では、ラベルされていない抗体または抗原ならびにラベルされた抗体または抗原を用いることができる。ラベルされていない抗原またはエピトープを有益に利用できる場合とは、例えば、抗原が免疫応答を刺激するほど大きくないが、結合し、ＨＣＶがＥ２糖タンパク質を介して標的細胞に結合するのをブロックするのに十分な大きさの断片であるような場合であろう。

【００３５】

別法として、本発明の抗体、抗原およびエピトープを治療物質でラベルして投与することができる。これらの物質は直接的あるいは間接的に本発明の抗体または抗原とカップリングさせることができる。間接的なカップリングの一例は、スペーサー部分の使用によるものである。さらに本発明の抗体は、共有結合または非共有結合によって結合しているさらなるドメインを含み得る。この結合は、当分野に既知の方法にしたがう、上記の遺伝子融合に基づくものであってよく、あるいは、例えばＷＯ９４／０４６８６に記載のような化学的架橋によって行うことができる。本発明の抗体を含む融合タンパク質に存在するさらなるドメインは、好ましくはフレキシブルリンカー、有益には、該さらなるドメインのＣ末端と本発明の抗体のＮ末端、あるいはその逆の間隔にまたがるのに十分な長さの、複数の、親水性の、ペプチド結合したアミノ酸を含むポリペプチドリンカーによって連結されていてもよい。上記融合タンパク質にはさらに、開裂可能なリンカーまたはプロテアーゼの開裂部位を含ませてもよい。また、これらのスペーサー部分は不溶性または可溶性であってよく（Diener, et al., Science, 231:148, 1986）、標的部位における、抗原からの薬物放出を可能にするように選択可能である。免疫治療のために、本発明の抗体、抗原およびエピトープとカップリングさせることが可能な治療物質の例には、薬物、放射性同位体、レクチンおよびトキシンがある。本発明の抗体、抗原およびエピトープと共役させることができる薬物には、伝統的に薬物と称される化合物、例えばマイトマイシンＣ、ダウノルビシンおよびビンブラスチンが含まれる。放射性同位体を共役させた本発明の抗体、抗原またはエピトープを例えば免疫治療に用いる場合、白血球の分布ならびに安定性および放射性のような要因に依存して特定の同位体が他のものより好ましいこともある。自己免疫応答に応じて、いくつかのエミッターが他のものより好ましいこともある。概して、免疫治療には、αおよびβ粒子を放出する放射性同位体が好ましい。好ましいのは、短期間の高エネルギーのαエミッター、例えば^{212}Ｂｉである。治療目的で、本発明の抗体、抗原またはエピトープに結合させることができる放射性同位体の例には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{90}Ｙ、^{67}Ｃｕ、^{212}Ｂｉ、^{212}Ａｔ、^{211}Ｐｂ、^{47}Ｓｃ、^{109}Ｐｄおよび^{188}Ｒｅがある。本発明の抗体、抗原またはエピトープとカップリングさせることができる他の治療物質、ならびにエクスビボおよびインビボの治療プロトコルは当業者に既知であるか、あるいは容易に確認できるものである。当業者は、適当な場合には、タンパク質材料そのものを用いる代わりに上記抗体、抗原またはエピトープのいずれかをコードする本発明のポリヌクレオチドまたは対応するベクターを用いることができる。

【００３６】

さらに、本発明は、本発明の上に記載される抗体、抗原またはエピトープ、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含む医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物はさらに製薬的に許容される担体を含んでいてもよい。適当な医薬的担体の例は当分野に周知であり、

これにはリン酸緩衝化塩類溶液、水、エマルジョン、例えば油／水エマルジョン、種々のタイプの湿潤剤、滅菌溶液などが含まれる。このような担体を含む組成物は周知の慣用的方法によって製剤化できる。これらの医薬組成物を適当な用量で患者に投与し得る。適当な組成物の投与は種々の経路、例えば静脈内、腹膜内、皮下、筋肉内、局所または皮内投与によって行うことができる。投与方法は担当医および臨床的要因によって決定される。医学分野では周知であるように、いずれの患者に対する投与も、患者の大きさ、身体の表面領域、年齢、投与される具体的な化合物、性、投与期間および経路、全体的健康および同時に投与されている他の薬物を含む多くの要因に依存する。代表的な用量は、例えば０．００１～１０００μｇの範囲とす（るか、あるいはこの範囲の発現または発現阻害用の核酸用量とす）ることができる；しかし、この例示範囲以下またはこれ以上の用量も、特に上記要因を考慮して想定される。一般に、医薬組成物の定期的投与としての方法は１日当たり１μｇ～１０ｍｇ単位の範囲であるべきである。方法が連続注入である場合、それぞれ１分当たり、体重ｋｇ当たり１μｇ～１０ｍｇ単位の範囲でもあるべきである。定期的な評価によって進行をモニターできる。用量は変化するが、ＤＮＡの静脈内投与用の好ましい用量は、ＤＮＡ分子約$１０^{６}$～$１０^{１２}$コピーである。本発明の組成物は局所または全身に投与することができる。投与は一般に非経口であり、例えば静脈内投与する；ＤＮＡはまた、例えば内部標的部位または外部標的部位への微粒子銃デリバリーによるか、あるいは動脈内部位へのカテーテルによって標的部位に直接投与してもよい。非経口投与用の製剤には、滅菌水性または滅菌非水性の溶液剤、懸濁剤およびエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例には、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルがある。水性担体には、水、アルコール性／水性の溶液、エマルジョンまたは懸濁液（塩溶液および緩衝化媒体を含む）が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸化リンガー溶液（lactated Ringer's）または固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、体液および栄養補給液（fluid and nutrient replenishers）、電解液補給液（electrolyte replenishers）（例えばリンガーデキストロースに基づくもの）などが含まれる。また保存剤および他の添加剤、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなどを含ませてもよい。さらにまた、本発明の医薬組成物には、この医薬組成物の意図される用途に応じてインターロイキンまたはインターフェロンのようなさらなる物質を含ませることができる。例えば、本発明の医薬組成物は、上記のように、他の抗ウイルス剤と組み合わせて投与することができる。このような物質には、非制限的な例として、インターフェロン、他の抗ＨＣＶモノクローナルまたはポリクローナル抗体、ヌクレオシドアナログ、ＤＮＡポリメラーゼの阻害剤、および実施例６に記載の物質が含まれ得る。このような複合治療の場合、抗体を抗ウイルス剤と同時に与えるか、あるいは抗ウイルス剤での処置前または処置後に順に与えてもよい。このような医薬組成物はまた、例えば肝臓移植患者を免疫化し、該患者のＨＣＶ感染再発の可能性を排除するために用いることもできる。さらに、例えば本発明の医薬組成物がＨＣＶに対する有効な免疫応答の誘導能を有する上記抗原を含んでいる場合、この医薬組成物をワクチンとして製剤化してもよい。本発明の医薬組成物に関し、肝臓移植における使用を意図することは有益である。さらに、本発明の抗体は、ＨＣＶ感染ヒト血清での Tupaia 肝細胞（Tupaia-hepatocytes）の感染を予防するのに有用であることが予想される。

【００３７】

本発明によって意図されるのは、標準的ベクターおよび／または遺伝子デリバリー系を用い、単独あるいは任意の組み合わせで、場合により製薬的に許容される担体または賦形剤とともに、本発明の種々のポリヌクレオチドおよびベクターを投与することである。投与後、該ポリヌクレオチドまたはベクターは、患者のゲノムに安定に組み込まれ得る。また、特定の細胞または組織に特異的であり、該細胞内で維持されるウイルスベクターを用いてもよい。適当な医薬的担体および賦形剤は当分野に周知である。本発明にしたがって調製された医薬組成物はＨＣＶ感染を予防または処置または遅延させるために用いることができる。さらに、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む本発明の医薬組成物を

遺伝子治療において用いることも可能である。適当な遺伝子デリバリー系には、リポソーム、レセプター媒介性デリバリー系、裸のＤＮＡおよび、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスのようなウイルスベクターなどが含まれる（また上記を参照のこと）。また遺伝子治療のために、微粒子銃デリバリー系、例えば Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2729) に記載されるような系を用いて、核酸を身体の特定部位にデリバリーすることができる。
【００３８】
さらなる態様では、本発明は、患者（被検体）におけるＣ型肝炎ウイルスの（再）感染を予防する方法であって、本発明の抗体、ポリヌクレオチドまたはベクターを投与する工程を含む方法に関する。さらに患者における慢性Ｃ型肝炎を緩和する方法であって、製薬的に許容される担体と組み合わせた本発明の前記化合物を用いて該患者を処置する工程を含む方法を含む。
【００３９】
別の態様では、本発明は、上記本発明の抗体、抗原、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞のいずれかを含む診断組成物および場合により適当な検出手段に関する。本発明の抗原および抗体は、例えば、それらが液相で利用可能であるか、あるいは固相担体と結合可能であるような免疫アッセイにおいて使用するのに適当である。本発明の抗原を利用できる免疫アッセイの例には、直接または間接形式の競合および非競合免疫アッセイがある。このような免疫アッセイの例には、放射性免疫アッセイ（ＲＩＡ）、サンドイッチ（免疫測定アッセイ（immunometric assay））およびウエスタンブロットアッセイがある。本発明の抗原および抗体は多くの種々の担体と結合可能であり、該ポリペプチドと特異的に結合する細胞の単離に用いることができる。周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリビニルクロライド、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカルボナート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱が含まれる。担体の性質は、本発明の目的のために可溶性または不溶性であり得る。
【００４０】
当業者に既知の、多くの種々のラベルおよびラベル化方法が存在する。本発明で用いることができるラベルのタイプの例には、酵素、放射性同位体、コロイド状金属、蛍光化合物、化学発光化合物および生物発光化合物が含まれる（また、本明細書中上に論考される態様を参照のこと）。
【００４１】
さらなる態様により、本発明の抗体は、試験される個人から体液サンプル（試料）（血液サンプル、リンパ液サンプル、または他のいずれかの体液サンプルであってよい）を得、この体液サンプルを、抗体−抗原複合体を形成可能な条件下で本発明の抗体と接触させることにより、個人におけるＨＣＶ感染を診断する方法において用いることもできる。次いで、当分野に既知の方法によってこのような複合体のレベルを測定し、コントロールサンプル中で形成されたレベルより有意に高いレベルであれば試験された個人におけるＨＣＶ感染が示される。同様に、本発明の抗体が結合する特異的抗原を、試験される個人由来の体液サンプルを上記抗原と接触させ、サンプル中の抗原−抗体複合体の形成を測定することによって個人におけるＨＣＶ感染を診断するのに用いてもよい。したがって本発明は、Ｃ型肝炎ウイルスの糖タンパク質Ｅ２の存在に関するインビトロ免疫アッセイであって、好ましくは非還元条件下、その本発明の抗体との共沈殿を測定することを特徴とするアッセイに関する。さらに本発明は、患者における慢性Ｃ型肝炎の診断方法であって、本発明の抗体を用い、Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２の標的細胞への結合の中和が存在するか否かに関して該患者のサンプルを試験することを特徴とする方法を含む。したがって、本発明はまた、本発明の抗体を用い、Ｃ型肝炎ウイルス糖タンパク質Ｅ２の標的細胞への結合を阻害する中和アッセイに関する。
【００４２】
本発明はまた、サンプル、例えば細胞サンプル中のＨＣＶ抗原の存在を検出する方法であ

って、患者から細胞サンプルを得、これを、好ましくは、抗体の抗原に対する結合を可能にする非還元条件下で、上記抗体の１つと接触させ、例えば放射性免疫アッセイまたは酵素免疫アッセイのような免疫アッセイ技術を用いて結合抗体の存在を検出することを含む方法をも含む。さらに本発明は、患者における、Ｃ型肝炎ウイルスに対する自己抗体の検出方法であって、患者由来のサンプルを本発明の抗原と接触させ、該抗原と結合する抗体の存在を検出することを含む方法に関する。

【００４３】

さらに好ましい態様では、本発明は、患者のＨＣＶ感染を処置または予防するか、あるいはＨＣＶ感染の再発を予防するための医薬組成物の製造における、上記抗体、抗原、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞の使用に関する。好ましくは、このような医薬組成物を肝臓移植前、移植中または移植後に投与されるように設計する。

【００４４】

本発明の医薬組成物、方法および使用は、ヒトにおいて用いられるのが望ましいが、本明細書中に記載の方法および使用には動物の処置も含まれる。

【００４５】

これらおよび他の態様は本発明の詳細な記載および実施例に開示され、含まれている。本発明において用いられる抗体、方法、使用および化合物のいずれかに関するさらなる文献は、例えば電子デバイスを用いて公的なライブラリーおよびデータベースから引き出すことができる。例えば、インターネット上、例えば http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html において利用可能な公的なデータベースである「Medline」を用いることができる。さらなるデータベースおよびアドレス、例えば http://www.ncbi.nlm.nih.gov/、http://www.infobiogen.fr/、http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, http://www.tigr.org/ は当業者に既知であり、例えば http://www.lycos.com を利用して得ることもできる。バイオテクノロジー分野の特許情報の概観、および過去の検索（retrospective searching）および現状の認識（current awareness）に有用な特許情報の関連ソースの調査は Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 に与えられている。

【００４６】

上の開示は本発明を全体的に記載している。以下の具体的な実施例を参照することによってより完全な理解を得ることができる。この実施例は本明細書中に、単に例示目的で提供されるものであって、本発明の範囲を限定するためのものではない。

【００４７】

実施例により本発明を示す。

実施例１：患者のスクリーニングおよびヒトモノクローナル抗体産生Ｂ細胞（ＬＣＬ）の作成

２人の患者が本実験に関与した。ＲＩＢＡIIIアッセイ（Abbott Laboratories）によってＨＣＶ感染を測定した。ＰＢＭＣ（末梢血液単核細胞）を不死化する時点で、組織学的試験およびポジティブＰＣＲアッセイによって測定したところ、両患者は慢性肝炎を有していた。ｂＤＮＡアッセイバージョン２．０（quantiplex HCV RNA Assay, Chiron Diagnostics）を用いて血清ウイルス負荷を測定した。３つの異なる方法を用いてＨＣＶ遺伝子型を決定した。第一の方法は非構造性抗原４（ＮＳ４）に対する遺伝子型特異的抗体の検出に基づくものであり、製造元の指示書（MUREX Diagnostics SA, Bhattacherjee et al., 1995）にしたがい、ＭＵＲＥＸ １－６血清型アッセイを用いて測定した。第二の方法は遺伝子型／サブタイプ特異的プライマーを用いるゲノムの５'非コード化領域（ＮＣＲ）由来のウイルス配列の増幅に基づくものであり、ＩＮＮＯ－ＬＩＰＡアッセイ（Innogenetics S.A.）を用いて行った。これら２人の患者のうちの１人、患者１においては、血清中のＰＣＲによって検出可能なＨＣＶ ＲＮＡにもかかわらず、血清ＡＬＴ（アラニンアミノ転移酵素）レベルは正常であり、維持されていた（穏やかな肝炎）。対照的に、患者２においては、ＡＬＴレベルは一貫して高く維持されており、この患者における感染は肝硬変を特徴としていた。ＨＭＡｂ産生セルラインの作成は、以前に記載（Boyer et al., 1991, Desgranges et al., 1988, Seigneurin et al., 1983）されるように行った。簡単

には、Ficoll 単離後、ＰＢＭＣをＥＢＶ培養上清（Ｂ９５．８株上清１ｍＬ、５×１０^{6}ＰＢＭＣに対して１０－３ ＴＤ５０／ｍＬの力価）に室温で暴露した。インキュベーション後、これを媒地中で希釈し、ウェル当たり５０～１００×１０^{3}細胞の範囲の濃度にした。２～４週間後、ＳＶＥ２ ＣＶ－１ ＩＦＡにより、上清を抗－Ｅ２反応性に関してスクリーニングした。抗－Ｅ２抗体の検出は抗原生産方法に強く依存することが報告されている（Chien et al., 1993, Hsu et al., 1993, Lesniewski et al., 1995）。原核生物ではなく、真核生物によってＨＣＶ Ｅ２を発現させると、このタンパク質は適正にプロセッシングされ、グリコシル化されることが示された（Selby et al., 1993）。我々の実験では、抗－Ｅ２抗体についてのスクリーニングアッセイとして、真核生物によって発現されたＥ２抗原を用い、天然形態下で分析し、すなわち免疫蛍光アッセイ（ＩＦＡ）によって明視化した。このような検出アッセイは以前に Fournillier-Jacob らによって用いられたものであり、抗体検出に特に有効であることが示されている（Fournillier-Jacob et al., 1996）。簡単には、原型株Ｈ（遺伝子型１ａ）由来のＨＣＶ Ｅ２アミノ酸配列３７１～７４６を発現する組換えプラスミド、ｐＣＷ１８ Ｅ２を用いて、ヘルパーＳＶ４０突然変異ウイルスとともにＣＶ－１細胞をトランスフェクトし、Ｅ２を発現する組換えウイルス（ＳＶＥ２、Fournillier-Jacob et al., 1996, Wychowski et al., 1986）のストックを作成した。ＳＶＥ２ウイルスを用いて、ＣＶ－１細胞をさらに感染させ、感染患者の血清および以前に記載されるＥＢＶ不死化Ｂ細胞（Fournillier-Jacob et al., 1996）由来の上清を用いて免疫蛍光分析を行った。分析前に細胞をメタノール：アセトン（３：７）で固定した。さらに、放射線照射（２，５００rad）された同種ＰＢＭＣ５０×１０^{3}を用い、２～２０細胞／ウェルでＬＣＬを２回サブクローニングした。２人の患者由来の２個の一貫してポジティブなクローンを得た。表１に２人の患者の特徴および、（５０３および１０８と称される）ＨＭＡｂを産生する２種類のリンパ系Ｂセルラインの特徴をまとめる。２種類のクローンの培養上清を分析すると、両クローンがＩｇＧ１のみを分泌することが示された。各クローン由来の上清を、組換えＳＶＥ２ウイルスで感染させたＣＶ－１細胞におけるＩＦＡによって試験し、ヒトＩｇＭ、ＩｇＧまたはＩｇＡ（Byosis）、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４サブクラス（Sigma Immuno Chemical Co.）およびλおよびκ軽鎖（Dakopatts）に対する特異的二次抗体を用いて染色した。

表１．患者および誘導されるヒト抗－Ｅ２モノクローナル抗体の特徴

【表１】

患者	遺伝子型[a]	ｳｲﾙｽ負荷[b] Eq/mL×10^5	組織学的診断	HMAb	ｲｿﾀｲﾌﾟ[c]
1	4	５．２	穏やかな慢性肝炎	５０３	IgG1λ
2	１ｂ	２１．８	肝硬変	１０８	IgG1λ

[a] 患者のＥＢＶ－ＰＢＭＣ形質転換の日に得られたサンプルならびに以後２年間のうち、異なる２つの時点で得られたサンプルを用いて分析を行った。異なる時点での結果および異なるアッセイ間の結果は一致した。

[b] Quantiplex ｂＤＮＡアッセイ（Quantiplex HCV RNA アッセイ、Chiron Diagnostics, Emeryville）を用いて血清中において定量。

[c] 各クローン由来の上清を、組換えＳＶＥ２ウイルスで感染させたＣＶ－１細胞においてＩＦＡによって試験し、ヒトＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＧ１～４サブクラスに対する特異的二次抗体を用いて染色した。

【００４８】

上清が産生したＨＭＡｂのアフィニティー精製用にプロテインＡ（Pharmacia）カラムを

用いた。以前に記載（Boyer et al., 1991）されるようにＥＬＩＳＡによって培養上清中の抗体濃度を測定した。ＬＣＬは慣用の培養媒地１ｍＬ当たり２～５μｇのＡｂを産生した。患者１および２に感染したウイルスの遺伝子型決定は、ＰＢＭＣ不死化の時点および不死化前２年間の間に２回、２種類の異なるアッセイを用いて行った。両アッセイは一致した結果を与え、これにより、患者１には遺伝子型４単離体が感染し、患者２には遺伝子型１ｂ単離体が感染していることが示された。市販のＨＣＶ遺伝子型決定アッセイは特異性を欠いていることがあり得るため、二重感染の可能性を排除するため、我々はＨＣＶゲノムの５'非コード化領域内に位置するＰＣＲ誘導配列の分析によって上記結果をさらに確認した。クローニングされた準種（quasispecies）由来のヌクレオチド配列を公的なデータベース（Bukh et al., 1992）と比較した結果、市販の遺伝子型決定アッセイを用いて得られた結果、すなわち両患者には単一のウイルスタイプが感染していたことが確認された。図１は、患者の血清（ＡおよびＢ）または精製されたモノクローナル抗体（ＣおよびＤ）を用いるＩＦＡにおいて得られたＳＶＥ２感染ＣＶ－１細胞の染色を示す。この反応性は細胞質に局在し、核周囲に優勢な分布を示した。

【００４９】

実施例２：ＨＭＡｂの免疫学的特徴

種々のアプローチを用いて生産された抗体の免疫反応性を特徴付けした。元の患者の血清、ＬＣＬ由来の上清ならびに精製された抗体を用い、変性条件および、サブタイプ１ａおよび１ｂによって誘導されたＥ２タンパク質を含むタンパク質調製物を用いるウエスタンブロット分析（Nakano et al., 1997）を行った。ウエスタンブロット分析では、バキュロウイルスに発現させた遺伝子型１ａおよび１ｂ配列由来のＥ２タンパク質を以前に記載されるように用いた（Nakano et al., 1997）。患者の血清（１：５０）、２種類のクローン由来の上清ならびに精製されたＨＭａｂ（１０μｇ／ｍＬの高濃度で試験）を用いた。以前に記載（Courtesy A.M. Prince, Wang et al., 1996）される全Ｅ２オープンリーディングフレームをカバーするひとそろいの合成ペプチドを用いて、患者の血清ならびに精製された抗体を用いるエピトープマッピングを行った。この合成ペプチドは大部分が、連続するペプチド間に６ａａの重複を伴う１２－ｍｅｒであり、ＨＣＶ－Ｈ株（遺伝子型１ａ）Ｅ２タンパク質の配列に対応する。Ｅ２（ａａ３８４～７２７）に対してトータルで５７のペプチドが存在し、これらはすべて AnaSpec によって合成されたものである。

【００５０】

両ＨＣＶ感染患者の血清は１ａおよび１ｂ誘導Ｅ２タンパク質と反応したが、培養上清または精製されたＨＭＡｂはいずれも、１０μｇ／ｍＬの高濃度で試験した場合でもポジティブなシグナルを与えなかった。培養上清または精製された抗体を、Ｅ２　１ａ配列をカバーする合成ペプチドのパネルを用いるペプチドスキャンニングＥＬＩＳＡにおいて試験した場合でも、全く反応性が観察できなかった。

【００５１】

上記観察により、認識された決定基が非鎖状的性質であり得ることが示されるため、種々のサンプルの免疫反応性をＩＦアッセイにおいて分析した。試験し、限られた（restricted）決定基配列を同定するために、Ｅ２の種々のドメインを発現するひとそろいのプラスミド（図２を参照のこと）で細胞を形質転換した。Ｅ２タンパク質の断頭ドメインを発現するひとそろいのベクター（図２を参照のこと）によってトランスフェクトされたＬＴＫ細胞に対するＩＦＡにより、得られた２種類のＨＭａｂを反応性について評価した。標準的技術を用い、以前に記載（Sambrook et al., 1989, Nakano et al., 1997）されるように、プラスミドｐＣＩＥ２およびｐＣＩＥ２ｔに関しては、Ｅ２配列をｐｃＤＮＡ３プラスミド（Promega）のＣＭＶプロモーター直下にクローニングするか、あるいはプラスミドｐＳ２Ｓ．Ｅ２Ａ－Ｅに関しては、これをＢ型肝炎ウイルス表面抗原との融合タンパク質として発現させた。全てのＤＮＡ調製物は Qiagen 精製カラム（Qiagen）を用い、製造元の指示書にしたがって作成した。リポフェクタミン（Lipofectamine, Gibco BRL）の存在下、ＤＮＡ１．０μｇを用いてＬＴＫ細胞をトランスフェクトした。感染後４８時間の時点で、以前に記載（Major et al., 1995）されるように、細胞上清および精製されたＨ

ＭＡｂの免疫反応性をＩＦＡによって試験した。ポジティブコントロールではプラスミドｐＣＩＥ２ｔの直接注入によって免疫化されたマウスから作成された反応性過免疫血清を使用した（Nakano et al., 1997）。ネガティブコントロールでは非感染ＬＴＫ細胞ならびに、Ｅ１を発現する組換えＳＶ４０ウイルスで感染させたＣＶ－１細胞を使用した（Fournillier-Jacob et al., 1996）。

【００５２】

表２：患者の血清の免疫反応性およびＥ２の断頭ドメインに対する精製モノクローナル抗体（ＨＭＡｂ）の免疫反応性

【表２】

HCV 構築体[a]		A	B	C	D	E	pCIE2α	pCIE2t	pcDNA3
患者 1[b]	血清	+	-	+	-	-	+	+	-
	HMAb503	-	-	-	-	-	-	+	-
患者 2[c]	血清	-	-	-	-	-	-	+	-
	HMAb108	-	-	-	-	-	-	+	-
ﾏｳｽﾎﾟﾘｸﾛｰﾅﾙ Ab[d]		+	+	+	+	+	+	+	-

[a] ＬＴＫ細胞を記載のプラスミドによって一時的にトランスフェクトし、Major らによって記載されるように４８時間後にＩＦＡを行った（Major et al., 1995）。ｐS2.SE2A-E プラスミドに関してはNakano ら（Nakano et al., 1997）にしたがう。pcDNA3 プラスミド（Promega）をネガティブコントロールとして用いた。

[b] 患者の血清は１／２０希釈で試験した；ＬＣＬの上清または精製ＨＭＡｂは、少なくとも２回の独立して行われた実験において１０μｇ／ｍＬまでの濃度で用いた。

[c] 全ての場合において、プラスミド pCIE2t の直接注入によって免疫化したマウスから得られた反応性過免疫血清を用い、トランスフェクションの効率およびプラスミドの適正な発現を評価した（Nakano et al., 1997）。

【００５３】

ＩＦ実験の結果を表２にまとめる。患者１の血清は、種々のＥ２を発現するプラスミドから発現された配列内に位置する複数の決定基を認識した。対照的に、この患者から誘導されたＨＭＡｂ５０３は、（プラスミドｐＣＩＥ２ｔによってコードされる）Ｅ２から発現されたほぼ完全長のもののみを認識し、より小さい発現形態の抗原を全く認識しなかった。患者２に関しては、血清ならびに誘導１０８抗体は最大に発現された形態のＥ２に対してのみ反応した。したがってこのアプローチを用いて、どちらかの精製抗体によって認識される限られた決定基配列を同定することは不可能であった。

【００５４】

全ての上記実験はサブタイプ１ａ誘導抗原を含んでいた。交差反応能を評価する方法としてさらにサブタイプ１ｂ誘導Ｅ２を認識するこの精製モノクローナル抗体の能力が評価された。ＨＭＡｂの反応性は、このような抗原を発現する組換えシンドビスウイルス、Sinrep/HCV-BK1-1207 で感染させた細胞を用いる免疫沈降によって試験した。強い特異的シグナルの観察によって示されるように、両抗体は抗原を認識できた。

【００５５】

上記結果をまとめると、これらのデータは、ＨＭＡｂが少なくとも２種類のＥ２サブタイプ（１ａおよび１ｂ）誘導抗原の特異的な決定基を認識できることが示される。さらに、これらはこの抗体がコンホメーション依存性決定基を認識する可能性が高いことを強く示す。

【００５６】
実施例３：免疫沈降試験
ウエスタンブロッティングにおいても、およびＥ２の先端が切り取られたそれぞれ異なった部分を発現する一連のベクターでトランスフェクションされたＬＴＫ細胞に対するＩＦＡによっても、ＨＭＡｂの反応性がないということは、Ａｂがコンホメーション依存性エピトープを認識していることを示唆している。したがって、ＨＭＡｂによるＥ２の認識をパルスチェイス実験でさらに調べた。さらに、これまでの報告（Deleersnyderら,1997）では、ビリオン粒子に取り込まれる機能的サブユニットであると提唱される複合体をＥ１とＥ２が相互作用して形成することが示唆されているので、そのような複合体を認識するＨＭＡｂの能力も評価した。これらのＥ１Ｅ２複合体は、非共有的に会合しているか、あるいはＥ１Ｅ２集合体を形成する分子内ジスルフィド結合によって安定化されている。
【００５７】
共有的に会合したＥ１Ｅ２複合体はまた、ウイルス粒子の機能的サブユニットの一部であるとは考えられないとも報告されている（Dubuissonら,1994、Grakaouiら,1993,Ralstonら,1993）。本発明のために、それぞれ異なった組換えウイルスを使用した。これらのウイルスには、１）Ｔ７　ＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスｖＴＦ７．３（Fuerstら, 1986）、２）ＨＣＶ－Ｈアミノ酸配列を発現する一連の組換えワクシニアウイルスｖＨＣＶ170-809、ｖＨＣＶ371-809、ｖＨＣＶ1-1488およびｖＨＣＶ370-661（Grakouiら, 1993, Michalakら, 1997, Fournillier-Jacobら, 1996, Major et.al., 1995）および３）遺伝子型１ｂ株、ＢＫ株の構造タンパク質を発現する組換えシンドビスウイルス（Sinrep/HCV-BK１－1207）（Dubuisson et.al.,1994）。ウイルスストックは、記載されているとおり（Dubuisson et.al.,1994、Bredenbdeeck et.al.,1993）、ＣＶ－１単層（ワクシニアウイルス用）またはＢＨＫ－２１細胞（シンドビスウイルス用）において作成した。以前に記載されているとおり（Dubuisson et.al.,1994、Dubuisson and Rice, 1996）、細胞を感染させ、３５Sートランスラベル（ＩＣＮ）で代謝的に標識した。細胞を、１０mM　Tris－HCl（pH７.５）、１５０mM　NaClおよび２mM　ＥＤＴＡ中の、０．５％ＮＰ－４０で溶解させた。ジスルフィド結合形成を分析する実験については、２０mMのヨードアセトアミドをこの溶解緩衝液に入れた。免疫沈降は記載されているとおり行なった（Dubuisson et.al.,1994、Dubuisson and Rice, 1996）。定量実験については、デンシオメトリーによってオートラジオグラフを分析した。
【００５８】
３．１　<u>ＨＭＡｂはＥの早期に折り畳まれるドメインを認識する</u>
免疫沈降を行ない、これらＨＭＡｂによって認識されるタンパク質を特徴付けた（図３）。コンホメーション非依存性エピトープまたはコンホメーション依存性エピトープに対するネズミ抗Ｅ２MAb（ＭAbＡ１１またはＭAbＨ２）を比較のために使用した（Dubuisson et.al.,1994、Deleersnyder et.al., 1997）。還元的条件下では、パルスの間、ＨＭＡｂ１０８および５０３によってＥ２タンパク質は沈降しなかったが、３０分のチェイス後にＥ２に対応するバンドが検出され始め、６０分後には強度が増加した（図３、還元的ＨＭＡｂ１０８および５０３）。これは、コンホメーション非依存性エピトープに対するネズミＭＡｂＡ１１を使用したときに観察された結果とは対照的であった（図３、還元的、ＭＡｂＡ１１）。この後者の抗体に関しては、前に観察されたように、恐らくＥ２－ＮＳ２前駆体におけるＮＳ２領域の合成中の翻訳休止の結果として、成分の異なったＥ２関連産物がパルス中に検出された（Dubuisson et.al.,1996）。ＭAbＡ１１については、沈降したＥ２－ＮＳ２前駆体の強度は、３０分のチェイス後に非常に高く、時間とともに減少したのに対し、ＨＭＡｂ１０８および５０３によって沈降したＥ２－ＮＳ２タンパク質の強度は低くむしろ一定であり、主としてＥ２がＥ２－ＮＳ２前駆体から分解した後にＡｂによって沈降したことを示した。コンホメーション依存性ＭＡｂＨ２を用いて行なった免疫沈降との比較は、Ｅ２の検出における大きな遅れを示した（図３、還元的、ＭＡｂＨ２）。これらの観察結果は、実際、ＨＭＡｂが、Ｅ２タンパク質の成熟過程の早期に現れるＥ２のコンホメーション依存性ドメインを認識していることを示している。両ＨＭＡｂ

のエピトープ形成の推定半減期は、約１５分であった（データ示さず）。

【００５９】

３．２　ＨＭＡｂは非共有的Ｅ１Ｅ２複合体を沈降させることができる

非還元的条件下で更なるパルスチェイス実験を行ない、還元的条件下で行なった実験と比較した（図３）。還元的条件下の間、両ＨＭＡｂはＥ１と共沈し、これらがＥ１およびＥ２複合体を認識していることを示したが、Ｅ１Ｅ２複合体を安定化するジスルフィド結合を阻止する非還元的条件下で免疫沈降を行なった場合、遅く移動するバンドがさらにゲルの上部で検出された。これら後者の観察結果は、沈降したＥ１Ｅ２複合体が、非共有的に会合したヘテロダイマーおよび異種の連結した集合体から成っていたことを示唆している。Ｅ２の天然の形態を認識可能であると示されているＭＡｂＨ２について前に観察されたように、その場合ではＥ１およびＥ２に対応するバンドのみがゲルの上部に検出された（図３、非還元的、Ｈ２、Deleersnyder et.al.,1997）。非還元的条件下で、Ｅ１単量体のＨＭＡｂ１０８による共沈殿はＨＭＡｂ５０３と比較すると弱く、長い時間暴露した後にだけ特異的なバンドが検出された。したがって、両ＨＭＡｂは早期に折り畳まれるとみられるＥ２タンパク質のドメインを認識し、そのタンパク質が、非共有的に会合したＥ１Ｅ２複合体の共沈殿によって示唆されるような最終的なコンホメーションをとりながらも影響されやすい状態を維持し得る。

【００６０】

以上をまとめると、上記のデータは、ＨＭＡｂ１０８および５０３の両方が、コンホメーション依存性決定基（単数または複数）を認識し、ビリオン粒子の表面に存在すると考えられているＥ１およびＥ２の非共有的に会合した複合体を沈殿させることができたということを示している。

【００６１】

実施例４：細胞上に結合するＥ２の中和

Rosaらによって最近開発されたアッセイ（Rosa et.al.,1996）によって、ＨＣＶに感染しやすい細胞上への、高度に精製されたＥ２の結合を中和する候補抗体の能力（neutralizing of binding即ちＮＯＢ）を定量的に評価することが可能である。このアッセイで両ＭＡｂを評価した。Ｅ２のＭＯＬＴ４細胞への結合を中和するＨＭＡｂの能力（Neutralization of Binding即ちＮＯＢ）を、Rosaらによって最近開発されたアッセイ（Rosa et.al.,1996）で評価した。このアッセイは、９６Ｕ底マイクロプレートにて行なった。簡潔に説明すると、０．５μg／mLの組換えＣＨＯ　Ｅ$2_{384-715}$タンパク質２０μLを、種々の希釈率の抗Ｅ２　ＨＭＡｂおよび対照ＨＭＡｂ（Rosa et.al.,1996, Boyer et.al.,1991）と混合した。４℃で１時間インキュベーションした後、混合物をＭＯＬＴ－４細胞に加えた（ウェルあたり10^5細胞）。洗浄したのち、細胞を、標的細胞に結合したＥ２を認識する抗Ｅ２免疫グロブリンを有する希釈率１／１００のヒト血清とインキュベーションした。細胞を洗浄して、フルオレセインイソチオシアネートをコンジュゲートしたＩｇＧに対する抗血清とインキュベーションした。蛍光をFACScanフローサイトメーターで分析した。特異的中和を以下のように計算した：（（ポジティブコントロールＭＦＩ－実験ＭＦＩ）／（ポジティブコントロールＭＦＩ－ネガティブコントロールＭＦＩ））×１００［ここで、ＭＦＩ＝細胞集団の平均蛍光強度であり、細胞に結合した蛍光標識したＨＣＶタンパク質の表面密度に直接関係する。ＨＣＶタンパク質ありまたはなしで、ＨＣＶ　ＨＭＡｂまたはＨＣＶネガティブ　ＨＭＡｂまたは免疫前血清（Rosa et.al.,1996）とインキュベーションした細胞のＭＦＩ値を比較する。陽性の閾値は、ＨＣＶに対する抗血清およびフルオレセインイソチオシアネート標識した二次抗体とインキュベーションした、ＨＣＶタンパク質が結合していない細胞のフローサイトメトリー分析によって、実験ごとに設定する。競合結合解析については、抗体を以下のとおりビオチン化した：０．４Ｍリン酸緩衝液中の抗体1mg／mLをＮ－Ｎ－ジメチルホルムアミドビオチン２mg／mLと４℃で２時間インキュベーションし、大量のＰＢＳに対して一晩透析した。両抗体を用いてＮＯＢ活性の試験を行ない、競合標識抗体は２．５μｇ／mLで使用した。

【００６２】

それぞれ異なる抗体濃度で得られた中和百分率を図４に示す。この結果は、ＨＭＡｂ５０３がＮＯＢ活性を示し、結合の５０％中和が０．０３μｇ/mLの濃度に達したことを示している。ＨＭＡｂ１０８については、試験したいずれの濃度においてもＮＯＢ活性が検出されなかった。よって、ＮＯＢ活性があるＨＭＡｂ５０３はこれまでに開示されたはじめての抗体である。興味深いことに、このアッセイでは遺伝子型１（ａ）由来の抗原を使用したのに産出クローン（５０３）が遺伝子型４に感染した患者に由来するものであったという事実によって、この抗体の交差反応の潜在能力が確認される。このデータはさらに、ＮＯＢ活性を有する抗体が、異なった遺伝子型の間で保存されている決定基を標的としているようであるということを示唆している。

【００６３】

この２種の抗体が同様なエピトープに結合するのか、あるいは形状の異なったエピトープに結合するのかを競合実験を行なって調べた。ＨＭＡｂ１０８は、５０３Ａｂの中和活性の検出を妨害しなかった（つまり、競合しなかった）。この結果は、ＨＭＡｂ１０８および５０３が、Ｅ２タンパク質の異なったエピトープを認識しているということを強く示唆するものである。

【００６４】

実施例５：肝臓移植におけるＨＣＶ感染の阻止

以下に、本発明の抗体を移植した臓器の再感染を回避するために投与する、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）に感染している場合の肝臓移植について述べる。

【００６５】

患者の準備：全身を剃毛し、浣腸し、血液を採取し（ＨＣＶ－ＲＮＡの定量的測定）、薬剤による腸の汚染除去を行なう。

【００６６】

ドナーの準備（脳死を確認、心拍あり）：血液を採取（Ｂ型、Ｃ型肝炎ウイルス；ＨＩＶ、サイトメガロウイルスに対する抗体のチェック）、臓器を摘出し、ウィスコンシン大学に輸送するため保存用媒体中で保存し（カリウムに富む電解質溶液、温度を４℃に維持）、患者のところへ輸送する。患者に対し、全身麻酔＋手術室内での免疫抑制（プレドニゾロン約１ｇ＋ＦＫ５０６またはシクロスポリンＡ＋場合によりアザチオプリン（azathriopine）＋場合により抗胸腺細胞グロブリン）を行なう；胃を開き（開腹術）；血流を安定化させるためにバイパスを大腿静脈（隆線（ridge））と腋窩静脈（腋窩）の間で固定し；肝臓を周囲の組織から離し；導入性および導出性血管（肝動脈、門脈、総担管、肝静脈）を処理して肝臓を移動させる（pringel-Manoever）。血管をクランプで止め、肝臓を摘出する。

【００６７】

この段階において：抗体を投与する：１００～２００mg抗体＋５００mgヒト血清アルブミンの凍結乾燥品または濃縮溶液を等張食塩水１００mLまたは５％グルコース溶液に溶解し、２時間かけて輸液する。輸液の間、ドナーの臓器は患者の腹部に置く。血管をつなぎ（縫合）、検査用血液を再び採取した（ＨＣＶ－ＲＮＡ力価の測定）。輸液が完了したら、血管を再潅流し閉塞をチェックする。血管が閉塞していたら、肝臓を腹部に置く。潅流を開始してから１時間後に肝臓の生検を取り、腹部を閉じた。抗体が標的に到達しているかどうか、生検を免疫組織化学的に分析する。

【００６８】

患者を集中治療室に移動させ、麻酔と人工呼吸を維持する。肝機能、二次出血、血管閉塞、感染の程度、血中の抗体濃度並びにＨＣＶ－ＲＮＡ力価を厳密に監視する（平均的なＨＣＶ－ＲＮＡ力価の経過：数日後測定レベル以下、約１週間後に増加）。

【００６９】

長期間の方針：始めの期間は、１日あたり１００mgのプレドニゾロンを投与、３ヶ月経過する間に投与量を５mgへと減らす；プレドニゾロンおよび個々の用量のＦＫ５０６またはシクロスポリンを生涯にわたり投与し、アザチオプリン（azathriopine）および／または抗胸腺細胞グロブリンは、始めの４週間だけ投与する。治療用抗体を大体６～８週間

ごとに更新し（１００～２００mg輸液）；ＨＣＶ－ＲＮＡ力価および抗体の濃度を４週間ごとに測定する。抗体についてさらに多くのことが分かっている場合は、それ以上測定する必要はないであろう。肝機能、感染および拒絶反応の可能性（生検）を生涯にわたり監視する。暴露前の予防（感染者のパートナー；妊娠を望まない場合は、通常、コンドームの使用による予防）：６～８週間ごとに１００～２００mgの抗体を筋肉内投与（十分許容可能ならば）または輸液によりにボーラス投与する。血中の抗体濃度の監視を行なう。

【００７０】

暴露後の予防（注射針で自分自身を刺した看護婦など）については、血液を採取し（ＨＣＶ－ＲＮＡ力価を測定する）、結果が出る前に１００～２００mgの抗体を輸液により投与する。

【００７１】

実施例６：ヒト抗ＨＣＶ抗体の機能的免疫グロブリン可変領域配列のクローニングおよび配列決定およびＣＨＯ細胞における発現

Chomczynski（Analytical biochemistry 162 (1987) 156-159）にしたがって、抗体産生ＥＢＶ－形質転換ヒトＢ細胞系から全ＲＮＡを調製した。次いで、ｃＤＮＡを標準的なプロトコルにしたがって合成した（Sambrook, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, 第２版）。

【００７２】

ヒト抗ＨＣＶ抗体のラムダ軽鎖およびγ１重鎖Ｆｄ断片（ＶＨ＋ＣＨ１）をコードするＤＮＡ領域を、鋳型として表３に記載したオリゴヌクレオチドプライマーセットと前記ヒトＢ細胞系から合成したｃＤＮＡを用いてＰＣＲにより増幅した。

【００７３】

プライマーセットには、重鎖Ｆｄ断片については５’－ＸｈｏＩおよび３’－ＳｐｅＩ認識部位、ラムダ軽鎖については５’－ＳａｃＩおよび３’－ＸｂａＩ認識部位を導入する。重鎖ＦｄをコードするＤＮＡ断片のＰＣＲ増幅については、５つのそれぞれ異なった５’－ＶＨ－プライマー（ＶＨ１,３,５,７、ＶＨ２、ＶＨ４、ＶＨ４ＢおよびＶＨ６）をそれぞれ３’－ＶＨ－プライマーＣＧｄ１と組み合せた；ラムダ軽鎖断片のＰＣＲ増幅については、８つのそれぞれ異なった５’－ＶＬ－プライマー（ＶＬ１－８）をそれぞれ３’－ＶＬ－プライマーＣＬ２と組み合せた。

【００７４】

以下のＰＣＲプログラムを増幅に使用した：９４℃２０秒間の変性、５２℃５０秒間のプライマーアニーリングおよび７２℃６０秒間のプライマー伸長、これを４０サイクル、次いで７２℃で１０分間の最終伸長。

【００７５】

ＰＣＲはアガロースゲル上で行ない、適切なサイズのＤＮＡバンドを単離した。次いで、単離した各ＤＮＡバンドを制限酵素ＸｈｏＩおよびＳｐｅＩ（重鎖断片の場合）、またはＳａｃＩおよびＸｂａＩ（軽鎖断片の場合）で消化し、ＸｈｏＩおよびＳｐｅＩによる消化またはＳａｃＩおよびＸｂａＩによる開裂のいずれかによって調製したプラスミドベクターBluescript（Stratagene）にクローニングした。

【００７６】

次いで、クローニングした重鎖または軽鎖断片のプラスミド調製物を配列解析した。正確に１つの機能的ＶＨ領域および１つの機能的ＶＬ領域を同定することが可能な、機能的免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域（ＶＨおよびＶＬ）をコードする２つの配列をそれぞれ選択した。機能的ＶＬ配列およびＶＨ配列を図５（配列番号１および２）および図６（配列番号３および４）に示す。成熟Ｎ末端のアミノ酸配列は、ヒトＶ遺伝子配列データバンク（http:/www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/）によって提供されている対応する生殖細胞系の配列との比較によって完成させた。

【００７７】

クローニングおよび配列決定は、標準的な方法によって行なった（Sambrook, Cold Sprin

g Harbour Laboratory Press 1989，第２版）。
ヒト抗ＨＣＶ抗体の重鎖および軽鎖の元のＮ末端を含むＶＬおよびＶＨ断片をクローニングするために、以下の実験手順を実行した：標準的なプロトコル（Sambrook，Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989，第２版）にしたがって、全ＲＮＡをＭＭＬＶ逆転写酵素SuperscriptII（Gibco BRL，Eggenstein）により逆転写した。ｃＤＮＡの特異的プライミングは、２つのオリゴヌクレオチドＣＧｄ１（重鎖用）およびＣＬ２（軽鎖用）を用いて行なった。
【００７８】
次いで、標準的なプロトコルにしたがって、ターミナルトランスフェラーゼ（Pharmacia，Freiburg）を用いてｃＤＮＡの第１の鎖の末端にPoly-Gをつなげた。このｃＤＮＡを、Gilliland.L.K et.al.,(Tissue Antigen 47，１－20,1996)に公開されたアンカープライマー配列に基づいている、５’-AncTail（CGTCGATGAGCTCTAGAATTCCCCCCCCCCCCCD）と称される、Poly－C伸長鎖を含むセンスプライマーを用いてＰＣＲ-増幅した。このアンカープライマーを、ラムダ軽鎖定常領域（ＣＬ２）またはＩｇＧ１－ＣＨ１重鎖ドメイン（ＣＧｄ１）のＣ末端をコードする核酸配列にそれぞれ特異的なアンチセンスプライマーと組み合せた。
【００７９】
ＰＣＲは以下のとおりに行なった：初期変性：９４℃４分間；増幅３０サイクル：９３℃３０秒間；５５℃３０秒間；７２℃３０秒間；末端伸長：７２℃３分間。これらのプライマーはそれぞれ、対応するＰＣＲ断片のプラスミドベクターへのクローニングを可能にする、ＥｃｏＲＩ／ＸｂａＩまたはＥｃｏＲＩ／ＳｐｅＩでそれぞれ消化される制限酵素開裂部位（５’-AncTail：ＥｃｏＲＩ；ＣＬ２：ＸｂａＩ；ＣＧｂ１：ＳｐｅＩ）を含んでいる：このために、bluescriptＫＳ＋プラスミドベクター（Genebank番号No X52327）を使用した。一般的な配列決定プライマーを使用することによって生じた挿入物を容易に配列解析できるからである。重鎖および軽鎖断片のクローンのいくつかは、それぞれ同一の配列を有していることが分かり、機能的ＶＬ領域またはＶＨ領域のいずれか一方をコードしていると同定できた。ＶＨ配列は上記方法によってクローニングされた配列と同一であることが分かった。ＶＬのアミノ酸配列（配列番号６）は、上記方法によって得られたＶＬ－配列と比較すると、成熟Ｎ末端の第２位において１つのアミノ酸置換を有することが分かった。
【００８０】
天然のリーダーペプチドを含む完全なラムダ軽鎖を標準的な方法にしたがってＰＣＲにより哺乳類発現ベクターｐＥＦ－ＡＤＡにクローニングした（ＰＣＴ／ＥＰ９８／０２１８０参照）。ＶＨはまた、標準的な方法にしたがってＰＣＲにより、ＰＣＴ／ＥＰ９８／０２１８０に記載されているように、哺乳類発現ベクターｐＥＦ－ＤＨＦＲ内のヒトγ１重鎖のゲノム構造にクローニングした。
【００８１】
完全なヒトＩgＧ１ラムダ抗体の発現は、記載されているように（ＰＣＴ／ＥＰ９８／０２１８０）、ＣＨＯ細胞の安定なトランスフェクションとその後の遺伝子増幅により行なった。培養細胞上清からの抗体の精製は、ＰＣＴ／ＥＰ９８／０２１８０に記載されているように、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィーによって行なった。
【表３】
プライマーのリスト

５’－ＶＨプライマーセット：
VH1,3,5,7: AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
VH2: CAG(AG)TCACCTTGCTCGAGTCTGG
VH4: CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG
VH4B: CAGGTGCAGCTACTCGAGTGGGG
VH6: CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG
３’－ＶＨプライマー：
CGd1 GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTTGG
５’ＶＬプライマーセット：
VL1: AATTTTGAGCTCACTCAGCCCCAC
VL2: TCTGCCGAGCTCCAGCCTGCCTCCGTG
VL3: TCTGTGGAGCTCCAGCCGCCCTCAGTG
VL4: TCTGAAGAGCTCCAGGACCCTGTTGTGTCTGTG
VL5: CAGTCTGAGCTCACGCAGCCGCCC
VL6: CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC
VL7: CAGGTTGAGCTCACTCAACCGCCC
VL8: CAGGCTGAGCTCACTCAGCCGTCTTCC
３’ＶＬプライマー：
CL2: CGCCGTCTAGAATTATGAACATTCTGTAGG

【００８２】
参考文献

Abrignani, Springer Semin. Immunopathol. 19 (1997), 47-55
Akatsuka, Hepatology 18 (1993), 503-510
Bhattacherjee, J. Gen. Virol. 76 (1995), 1737-1748
Bergeron, Trends Biochem. Sci. 19 (1994), 124-129
Boyer, Clin. exp. Immunol. 83 (1991), 452-459
Bredenbeek, J. Virol. 67 (1993), 6439-6446
Bukh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 (1992), 4942-4946
Cerino, J. Immunol. 147 (1991), 2692-2696
Cerino, J. Immunol. 151 (1993), 7005-7015
Chan, J. Gen. Virol. 77 (1996), 2531-2539
Chien, Lancet 342 (1993), 933
Choo, Science 244 (1989), 359-362
Choo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 (1994), 1294-1298
Conley, J. Virol. 70 (1996), 6751-6758
Deleersnyder, J. Virol. 71 (1997), 697-704
Desgranges, Lancet, 8591 (1988), 935-936
Dubuisson, J. Virol. 68 (1994), 6147-6160
Dubuisson, J. Virol. 70 (1996), 778-786
Emini, Nature 355 (1992), 728-730
Farci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 (1994), 7792-7796
Farci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1996), 15394-15399
Fournillier-Jacob, J. Med. Virol. 50 (1996), 159-167
Fournillier-Jacob, J. Gen. Virol. 77 (1996), 1055-1064
Fouts, J. Virol. 71 (1997), 2779-2785
Francki, Arch. Virol. 2 (1991), 223-233
Fuerst, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1986), 8122- 8126
Gakoui, J. Virol. 67 (1993), 1385-1395
Hsu, Hepatology 17 (1993), 763-771
Fuerst, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 (1986), 8122-8126.

Lesniewski, J. Med. Virol. 45 (1995), 415-422
Lanford, Virology 197 (1993), 225-235
Major, J. Virol. 69 (1995), 5798-5805
Michalak, J. Gen. Virol. 78 (1997), 2299-2306
Miller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 (1990), 2057-2061
Miyamura, Trends Microbiol. 1 (1993), 229-231
Mondelli, J. Virol. 68 (1994), 4829-4836
Nakano, J. Virol. 71(1997), 7101-7109
Putkonen, Nature 352 (1991), 436-438
Ralston, J. Virol. 67 (1993), 6753-6761
Rice, Fields Virology, Third edition. Raven Press, New York (1996)
Rosa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1996),1759-1763
Saito, Proc. Nad. Acad. Sci. USA. 87 (1990), 6547-6549
Sambrook, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spung Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York (1989)
Seigneunn, Science 221 (1983),173-175
Selby, J. Gen. Virol. 74 (1993), 1103-1113
Shimizu, J. Virol. 68 (1994),1494-1500
Shimizu, Virology 223 (1996), 409-412
Weiner, Virology 180 (1991), 842-848
Wang, J. Inf. Dis. 173 (1996), 808-821
Wychowski, EMBO J. 5 (1986), 2569-2576
Zibert, Virology 208 (1995), 653-661
Zibert, Hepatology 25 (1997), 1245-1249

【図面の簡単な説明】

【図１】　間接的免疫蛍光分析。以前に記載（Fournillier-Jacob et al., 1996）されるようにＣＶ－１細胞をＳＶＥ２組換えウイルスで感染させ、患者の血清（１：２０希釈）またはＨＭＡｂ産生セルライン由来の上清を用いて免疫蛍光分析を行った。フルオレセインとカップリングさせたヤギ抗ヒトＩｇＧ免疫血清を用いて染色を行った。（Ａ）患者１由来の血清；（Ｂ）患者２由来の血清；（Ｃ）ＨＭＡｂ　５０３；（Ｄ）ＨＭＡｂ　１０８；（Ｅ）ＨＣＶに関連しない慢性肝炎の患者由来の血清。さらに、ＳＶＥ１組換えウイルス（Ｅ１を発現）でトランスフェクトされ、ＨＭＡｂ　５０３または１０８で染色（結果はＨＭＡｂ　５０３のみに関して示す）されたＣＶ－１細胞を含むネガティブコントロール（Ｆ）。

【図２】　エピトープマッピング試験において用いられたプラスミド。（Ａ）ウイルスのヌクレオキャプシド（Ｃ）、糖タンパク質Ｅ１およびＥ２および非構造タンパク質ｐ７、ＮＳ２およびＮＳ３をコードするＨＣＶゲノムドメインの説明（Rice et al., 1996）。タンパク質分解の開裂部位のアミノ酸位置を示す。（Ｂ）種々の発現プラスミドによってコードされる配列のマップ位置（map position）およびアミノ酸境界（amino acid boundaries）を示す。

【図３】　還元条件および非還元条件下での、Ｅ２の免疫沈降およびＥ１の共沈殿およびエピトープ形成の分析。ｖＴＦ７－３およびｖＨＣＶ１－１４８８で共感染させた細胞（ｖＨＣＶ）またはＴＦ７－３単独で感染させた細胞（Ｍ）を５分間パルスラベルし、記載される時間（単位：時間）追跡した。Ｅ２糖タンパク質を、ＨＭＡｂ　１０８、５０３およびマウスＭＡｂＨ２（Deleersnyder et al., 1997）およびＡ１１（Dubuisson et al., 1994）を用いて免疫沈降させた。免疫沈殿を還元条件または非還元条件下、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１０％ アクリルアミド）によって分析した。ＨＣＶ特異的タンパク質の予想される位置を図の左に示す。

【図４】　ＨＣＶ－Ｅ２、ＨＭＡｂによるＥ２結合の中和％。種々の濃度の抗－Ｅ２ＨＭＡｂ　５０３および１０８を、その、精製されたＣＨＯ発現Ｅ２タンパク質のＭＯＬＴ－

４細胞への結合の中和能に関して試験した。中和は、以前に記載（Rosa et al., 1996）されるように計算し、５０％中和力価を示した。
【図５】　ＨＭＡｂ　５０３の軽鎖の可変領域（V_{L}）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列。
【図６】　ＨＭＡｂ　５０３の重鎖の可変領域（V_{H}）のヌクレオチドおよびアミノ酸配列。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Connex - Gesellschaft zur Optimierung von Forschung und Entwicklung mbH
<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.)

<120> Anti Hepatitis C virus antibody and uses thereof

<130> B3070PCT

<150> EP 98 11 35 95.7
<151> 1998-07-21

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 1
tct tac gag ctc acg cag ccg ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag 48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aag caa tat gct 96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
20 25 30

tac tgg tat cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg ttg gtg ata tat 144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

aaa gat aat gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc 192
Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

agg tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa 240
Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt tct tcc 288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
85 90 95

tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 324
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

```
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
            20                  25                  30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
        35                  40                  45

Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
                85                  90                  95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105


&lt;210&gt; 3
&lt;211&gt; 351
&lt;212&gt; DNA
&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;
&lt;221&gt; CDS
&lt;222&gt; (1)..(351)

&lt;400&gt; 3
cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag      48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1               5                   10                  15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc tta agt ggt tac      96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

ttc tgg acc tgg atc cgc cag tcc ccc ggg aag ggg ctg gag tgg att     144
Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

ggg gaa agc aat tat agt gga agt acc agg tac aac ccg tcc ctc aag     192
Gly Glu Ser Asn Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
    50                  55                  60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc cag aac cag ttc tcc ctg     240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gta tat tac tgt gcg     288
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

aga ggt tgg gcg gtg gac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg     336
Arg Gly Trp Ala Val Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
            100                 105                 110

gtc acc gtc tcc tca                                                 351
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Gly Tyr
20 25 30

Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ser Asn Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Trp Ala Val Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 5
tcc tct gag ctg aca cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag 48
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aag caa tat gct 96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
20 25 30

tac tgg tat cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg ttg gtg ata tat 144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

aaa gat aat gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc 192
Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

agg tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa 240
Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

```
gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt tct tcc      288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
                85                  90                  95

tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta                      324
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105


<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1               5                   10                  15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
            20                  25                  30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
        35                  40                  45

Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
                85                  90                  95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105
```

【図１】

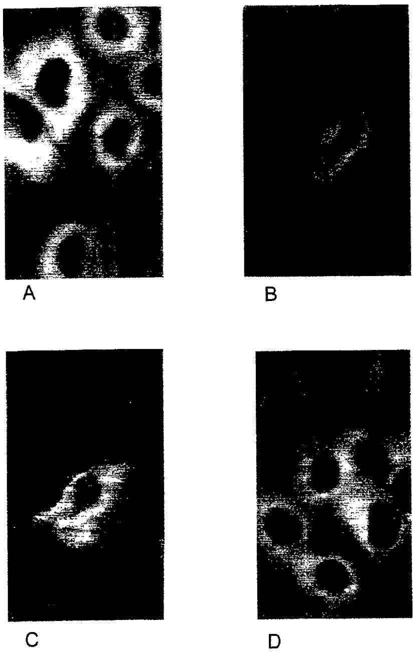

Figure 1

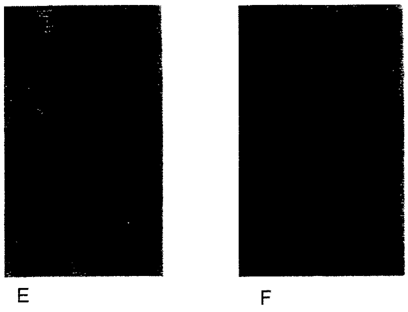

Figure 1 continued

【図2】

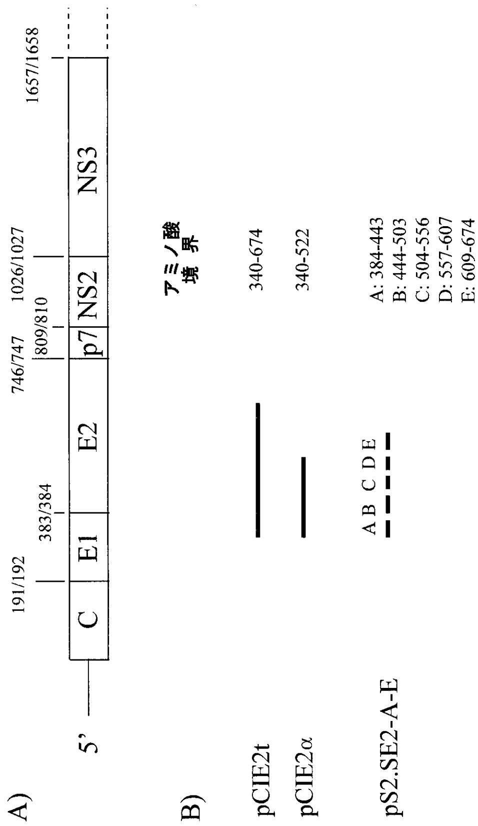

Figure 2

【図3】

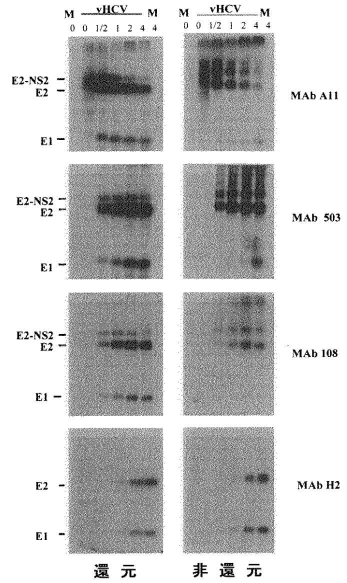

Figure 3

【図4】

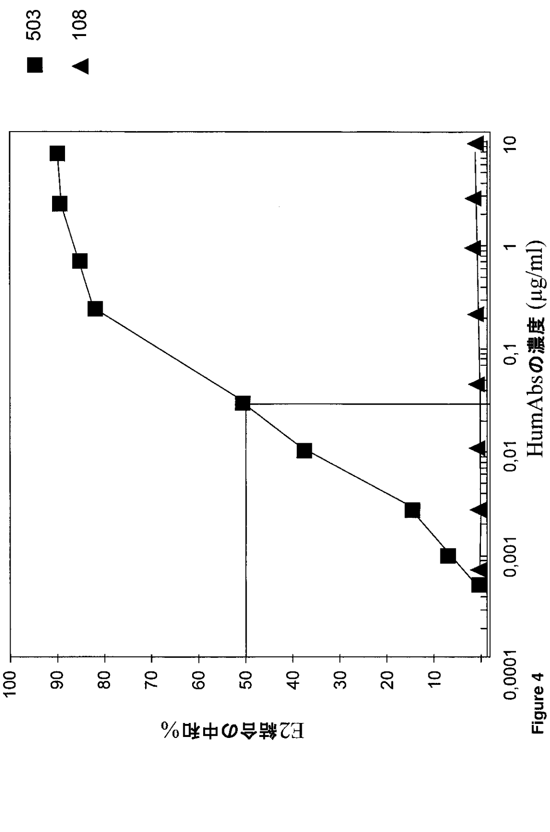

Figure 4

【図5】

```
                  9            18            27            36            45            54
5' TCT TAC GAG CTC ACG CAG CCG CCC TCG GTG TCA GTG TCC CCA GGA CAG ACG GCC
    S   Y   E   L   T   Q   P   P   S   V   S   V   S   P   G   Q   T   A

                 63            72            81            90            99           108
   AGG ATC ACC TGC TCT GGA GAT GCA TTG CCA AAG CAA TAT GCT TAC TGG TAT CAG
    R   I   T   C   S   G   D   A   L   P   K   Q   Y   A   Y   W   Y   Q

                117           126           135           144           153           162
   CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG TTG GTG ATA TAT AAA GAT AAT GAG AGG CCC
    Q   K   P   G   Q   A   P   V   L   V   I   Y   K   D   N   E   R   P

                171           180           189           198           207           216
   TCA GGG ATC CCT GAG CGA TTC TCT GGC TCC AGG TCA GGG ACA ACA GTC ACG TTG
    S   G   I   P   E   R   F   S   G   S   R   S   G   T   T   V   T   L

                225           234           243           252           261           270
   ACC ATC AGT GGA GTC CAG GCA GAA GAC GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAA TCA GCA
    T   I   S   G   V   Q   A   E   D   E   A   D   Y   Y   C   Q   S'  A

                279           288           297           306           315           324
   GAC AGC AGT GGT TCT TCC TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA
    D   S   S   G   S   S   W   V   F   G   G   G   T   K   L   T   V   L
3'
```

Figure 5

【図６】

```
              9           18          27          36          45          54
5' CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG
    Q   V   Q   L   Q   Q   W   G   A   G   L   L   K   P   S   E   T   L

              63          72          81          90          99         108
   TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTA AGT GGT TAC TTC TGG ACC TGG
    S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   L   S   G   Y   F   W   T   W

             117         126         135         144         153         162
   ATC CGC CAG TCC CCC GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA AGC AAT TAT AGT
    I   R   Q   S   P   G   K   G   L   E   W   I   G   E   S   N   Y   S

             171         180         189         198         207         216
   GGA AGT ACC AGG TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC
    G   S   T   R   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S   V   D

             225         234         243         252         261         270
   ACG TCC CAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG
    T   S   Q   N   Q   F   S   L   K   L   S   S   V   T   A   A   D   T

             279         288         297         306         315         324
   GCT GTA TAT TAC TGT GCG AGA GGT TGG GCG GTG GAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC
    A   V   Y   Y   C   A   R   G   W   A   V   D   G   M   D   V   W   G

             333         342         351
   CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA 3'
    Q   G   T   T   V   T   V   S   S
```

Figure 6

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
Ｃ１２Ｎ	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０１
Ｃ１２Ｐ	***21/02***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
Ａ６１Ｋ	***39/29***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/29	
Ａ６１Ｐ	***31/14***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	31/14	
Ｇ０１Ｎ	***33/53***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｖ
Ｇ０１Ｎ	***33/569***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/569	Ｌ
Ｇ０１Ｎ	***33/576***	***(2006.01)***	Ｇ０１Ｎ	33/576	Ｚ

(73)特許権者 592236234
アンスティテュー・ナシオナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・メディカル・（イ・エヌ・エス・ウ・エール・エム）
ＩＮＳＴＩＴＵＴ ＮＡＴＩＯＮＡＬ ＤＥ ＬＡ ＳＡＮＴＥ ＥＴ ＤＥ ＬＡ ＲＥＣＨＥＲＣＨＥ ＭＥＤＩＣＡＬＥ （Ｉ．Ｎ．Ｓ．Ｅ．Ｒ．Ｍ．）
フランス７５６５４パリ・セデックス１３、リュ・ドゥ・トルビアック１０１番
(74)代理人 100068526
弁理士 田村 恭生
(74)代理人 100100158
弁理士 鮫島 睦
(74)代理人 100126778
弁理士 品川 永敏
(74)代理人 100150500
弁理士 森本 靖
(74)代理人 100156111
弁理士 山中 伸一郎
(74)代理人 100162695
弁理士 釜平 双美
(72)発明者 クリスティアン・ライター
ドイツ連邦共和国デー−８５７５７カールスフェルト、ラートハウスシュトラーセ８番
(72)発明者 フランソワ・ハベルセッツァー
フランス、エフ−６７４００イルキルシューグラッフェンスターデン、リュ・ドゥ・プロヴァンス２番
(72)発明者 アンヌ・フールニリエ
フランス、エフ−６９００３リヨン、リュ・デュ・プル・シシリー６番
(72)発明者 クリスティアン・トレポ
フランス、エフ−６９５００ブロン、パッサージュ・デュ・ヴェルディエ・スッド４番
(72)発明者 クロード・デスグランジェ
フランス、エフ−７５０１３パリ、ビス・アヴニュ・ドゥ・ショワジ１２９番
(72)発明者 ジェネヴィエーヴ・アンシャスペ
フランス、エフ−６９００３リヨン、リュ・ヴィヨン４番

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第９７／０４０１７６（WO，Ａ１）
J. Virol.，１９９７年，vol.71，no.1，p.697-704
Hepatology，１９９６年，vol.24，no.4，p.381A[1020]
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，１９９６年，vol.93，no.5，p.1759-1763

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 16/00-16/46
C12N 15/00-15/90
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed