

(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2005-532064
(P2005-532064A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A61K 38/00
A61K 39/00
A61P 31/20
C07K 14/18

F 1

C 12 N 15/00
A 61 K 39/00
A 61 P 31/20
C 07 K 14/18
C 07 K 19/00

Z N A A
H
4 B O 6 5
4 C O 8 4
4 C O 8 5

テーマコード(参考)

4 B O 2 4
4 B O 6 4
4 B O 6 5
4 C O 8 4
4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-519849 (P2004-519849)	(71) 出願人	591076811 カイロン コーポレイション アメリカ合衆国, カリフォルニア 946 08, エミリービル, ホートン ストリー ト 4560
(86) (22) 出願日	平成15年7月2日(2003.7.2)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月28日(2005.2.28)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/020996	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02004/005473		
(87) 國際公開日	平成16年1月15日(2004.1.15)		
(31) 優先権主張番号	60/393,694		
(32) 優先日	平成14年7月2日(2002.7.2)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/394,510		
(32) 優先日	平成14年7月8日(2002.7.8)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変したNS3ドメインを有するHCV融合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、HCVポリペプチドの別の領域に由来する、少なくとも1つの他のHCVエピトープに融合された、変異NS3プロテアーゼドメインを含むHCV融合タンパク質を提供する。この融合物は、C型肝炎ウイルス(HCV)特異的T細胞(CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞を含む)の活性化のような、HCVに対する細胞性免疫応答を刺激する方法において使用され得る。この方法は、HCV特異的免疫原性組成物を開発するためのモデルシステム、およびHCVに対して哺乳動物を免疫するためのモデルシステムにおいて使用され得る。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下：

(a) HCV NS3 領域に少なくとも 1 つの、プロテアーゼ活性が阻害されるようなアミノ酸置換を含む改変された NS3 ポリペプチドおよび

(b) NS3 領域以外の HCV ポリタンパク質の領域に由来する、少なくとも 1 つのポリペプチド

を含む免疫原性融合タンパク質。

【請求項 2】

前記改変が、全長 HCV - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、 His - 1083 、 Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。 10

【請求項 3】

前記タンパク質が、改変された NS3 ポリペプチド、 NS4 ポリペプチド、 NS5 ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドを含む、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

前記タンパク質が、 NS5b ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドをさらに含む、請求項 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

前記タンパク質が、 E2 ポリペプチド、 p7 ポリペプチド、 NS2 ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドをさらに含む、請求項 3 に記載の融合タンパク質。 20

【請求項 6】

前記タンパク質が、 E1 ポリペプチド、 E2 ポリペプチド、 p7 ポリペプチド、 NS2 ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドをさらに含む、請求項 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

前記タンパク質が、 E2 ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドをさらに含む、請求項 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記タンパク質が、 E1 ポリペプチド、 E2 ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドをさらに含む、請求項 3 に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 9】

前記タンパク質が、 E2 ポリペプチド、改変された NS3 ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

前記タンパク質が、 E1 ポリペプチド、 E2 ポリペプチド、改変された NS3 ポリペプチドおよび必要に応じてコアポリペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

前記 (a) および (b) のポリペプチドが、同一の HCV 単離体に由来する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。 40

【請求項 12】

前記融合タンパク質に存在するポリペプチドの少なくとも 1 つが、改変 NS3 ポリペプチドである異なる、単離体に由来する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

アミノ末端からカルボキシ末端方向において、以下：

(a) 改変された NS3 ポリペプチド、 NS4 ポリペプチド、および NS5a ポリペプチドであって、該改変された NS3 ポリペプチドは、全長 HCV - 1 ポリタンパク質に關 50

連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(b) 改変されたNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびNS5bポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(c) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、改変されたNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、およびNS5aポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(d) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、改変されたNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、およびNS5aポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(e) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、改変されたNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびNS5bポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(f) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、改変されたNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびNS5bポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(g) E2ポリペプチドおよび改変されたNS3ポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(h) E1ポリペプチド、E2ポリペプチドおよび改変されたNS3ポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(i) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチドおよび改変されたNS3ポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；あるいは

(j) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチドおよび改変されたNS3ポリペプチドであって、該改変されたNS3ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105および/またはSer - 1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド

から本質的になる免疫原性融合タンパク質。

アミノ末端からカルボキシ末端方向において、以下：

(a) 改変された NS 3 ポリペプチド、NS 4 ポリペプチド、NS 5 a ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(b) 改変された NS 3 ポリペプチド、NS 4 ポリペプチド、NS 5 a ポリペプチド、NS 5 b ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(c) E 2 ポリペプチド、p 7 ポリペプチド、NS 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチド、NS 4 ポリペプチド、NS 5 a ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(d) E 1 ポリペプチド、E 2 ポリペプチド、p 7 ポリペプチド、NS 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチド、NS 4 ポリペプチド、NS 5 a ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(e) E 2 ポリペプチド、p 7 ポリペプチド、NS 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチド、NS 4 ポリペプチド、NS 5 a ポリペプチド、NS 5 b ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(f) E 1 ポリペプチド、E 2 ポリペプチド、p 7 ポリペプチド、NS 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチド、NS 4 ポリペプチド、NS 5 a ポリペプチド、NS 5 b ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(g) E 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(h) E 1 ポリペプチド、E 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；

(i) E 2 ポリペプチド、p 7 ポリペプチド、NS 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、His - 1083、Asp - 1105 および / または Ser - 1165 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド；あるいは

(j) E 1 ポリペプチド、E 2 ポリペプチド、p 7 ポリペプチド、NS 2 ポリペプチド、改変された NS 3 ポリペプチドおよびコアポリペプチドであって、該改変された NS 3

10

20

30

40

50

ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、 H i s - 1 0 8 3 、 A s p - 1 1 0 5 および / または S e r - 1 1 6 5 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチドから本質的になる免疫原性融合タンパク質。

【請求項 1 5】

改変された N S 3 ポリペプチドであって、該改変された N S 3 ポリペプチドは、全長 H C V - 1 ポリタンパク質に関連して番号付けた、 H i s - 1 0 8 3 、 A s p - 1 1 0 5 および / または S e r - 1 1 6 5 に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果、改変された N S 3 ポリペプチドが H C V 融合タンパク質に存在する場合、プロテアーゼ活性が阻害される、ポリペプチド。

10

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性融合タンパク質または請求項 1 5 に記載の改変された N S 3 ポリペプチドを、薬学的に受容可能な賦形剤と組み合せて含む、組成物。

【請求項 1 7】

脊椎動物の被験体における細胞性免疫応答を刺激する方法であって、該方法は、治療有効量の請求項 1 6 に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 1 8】

脊椎動物の被験体における細胞性免疫応答を刺激する方法における、請求項 1 5 に記載の組成物の使用。

20

【請求項 1 9】

脊椎動物の被験体における細胞性免疫応答を刺激するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性融合タンパク質または請求項 1 5 に記載の改変された N S 3 ポリペプチドの使用。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の免疫原性融合タンパク質または請求項 1 5 に記載の改変された N S 3 ポリペプチドを、薬学的に受容可能な賦形剤と組み合せて含む、組成物を製造する方法。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質または請求項 1 5 に記載の改変された N S 3 ポリペプチドをコードするコード配列を含むポリヌクレオチド。

30

【請求項 2 2】

以下 :

(a) 請求項 2 1 に記載のポリヌクレオチド ; および

(b) 該ポリヌクレオチドに作動可能に連結された少なくとも 1 つの制御要素、を含む組換えベクターであって、それによって、該コード配列が、宿主細胞において転写および翻訳され得る、組換えベクター。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 4】

免疫融合タンパク質または改変されたポリペプチドを產生する方法であって、該方法は、該タンパク質を產生するための条件下で、請求項 2 3 に記載の宿主細胞集団を培養する工程を包含する、方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

(技術分野)

本発明は、 C 型肝炎ウイルス (H C V) 構築物に関する。より具体的には、本発明は、改変した N S 3 ドメインを有する H C V 融合タンパク質に関する。このタンパク質は、例えば、 H C V 特異的 T 細胞を準備刺激するために、および / または H C V 特異的 T 細胞を

50

活性化するために、細胞媒介性免疫応答を刺激し得る。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は、世界の人口の約1%がこのウイルスに感染しており、重大な健康問題となっている。急性的に感染した個体のうち75%以上は、最終的に慢性保菌者状態へと進行し、肝硬変、肝不全、および肝細胞癌を生じ得る。Alterら(1992)N. Engl. J. Med. 327:1899-1905; ResnickおよびKoff(1993)Arch. Intern. Med. 153:1672-1677; Seeff(1995)Gastrointest. Dis. 6:20-27; Tongら(1995)N. Engl. J. Med. 332:1463-1466を参照のこと。10

【0003】

HCVは、NANBHの原因としてHoughtonらによって最初に同定され、そして特徴付けられた。HCVのウイルスゲノム配列は公知であり、この配列を得るための方法もまた公知である。例えば、国際公開番号WO89/04669; WO90/11089; およびWO90/14436を参照のこと。HCVは、9.5kbのポジティブセンス(positive-sense)である一本鎖RNAゲノムを有し、ウイルスのF1aviridaeファミリーのメンバーである。少なくとも6つの別個の、しかし関連するHCVの遺伝子型が、系統学的分析に基づいて同定されている(Simmondsら、J. Gen. Virol. (1993)74:2391-2399)。このウイルスは、3000を超えるアミノ酸残基を有する単一のポリタンパク質をコードする(Chooら、Science (1989)244:359-362; Chooら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991)88:2451-2455; Hanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991)88:1711-1715)。このポリタンパク質は、翻訳とともに、および翻訳後に構造タンパク質および非構造(NS)タンパク質のいずれにもプロセスされる。20

【0004】

特に、図1に示されるように、いくつかのタンパク質は、HCVゲノムによってコードされる。HCVポリタンパク質の切断生成物の順序および命名法は以下の通りである: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOH。ポリタンパク質の最初の切断は、宿主プロテアーゼによって触媒され、3つの構造タンパク質(N末端ヌクレオカプシドタンパク質('コア'と称される)および2つのエンベロープ糖タンパク質('E1'(Eとしても公知)および'E2'(E2/NS1)としても公知))、ならびにウイルス酵素を含む非構造(NS)タンパク質が遊離する。NS領域は、NS2、NS3、NS4およびNS5と称される。NS2は、タンパク質分解活性を有する膜結合タンパク質であり、NS3と一緒に、NS2-NS3シスル(sisssle)結合を切断し、次いでNS3-N末端を生成し、そしてセリンプロテアーゼ活性とRNAヘリカーゼ活性との両方を含む大きなポリタンパク質を放出する。NS3プロテアーゼは、残りのポリタンパク質をプロセスする役目を果たす。これらの反応において、NS3は、NS3補因子(NS4a)、2つのタンパク質(NS4bおよびNS5a)、およびRNA依存性RNAポリメラーゼ(NS5b)を遊離させる。ポリタンパク質成熟の完了は、NS3セリンプロテアーゼによって触媒されるNS3-NS4a接合部での自己触媒的切断によって開始される。3040

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

HIVのような特定のウイルスに対する医薬の開発における広範な進歩にもかかわらず、急性HCV感染および慢性HCV感染の制御における成功は限られている(HoofnagleおよびDi Bisceglie(1997)N. Engl. J. Med. 33350

6 : 3 4 7 - 3 5 6)。特に、細胞性免疫応答（例えば、強力な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答）の生成は、HCV感染の制御および根絶のために重要であると考えられる。従って、HCVに対する細胞性免疫応答を刺激する有効な方法について、当該分野における必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

（発明の要旨）

HCVに対する細胞性免疫応答を刺激する（例えば、HCVポリペプチドのエピトープを認識するT細胞を準備刺激する、および／または活性化する）ための試薬および方法を提供することが、本発明の目的である。本発明のこの目的および他の目的は、以下に記載される1以上の実施形態によって提供される。

10

【0007】

本発明は、このような応答を刺激するために有用なHCV融合タンパク質を提供する。本発明の1つの実施形態は、プロテアーゼ活性を阻害し、その結果、融合の切断が阻害されるように改変されたNS3ポリペプチドを含むHCV融合タンパク質に関する。この融合タンパク質は、改変したNS3ポリペプチドに加えて、以下に詳細に記載されるHCVポリタンパク質の他の領域に由来する1以上のポリペプチド含む。これらのポリペプチドは、NS3ポリペプチドと同一のHCV単離体由来であるか、広範なHCV遺伝子型に対して増大した保護を提供するために、異なる株および単離体（任意の種々のHCV遺伝子型を有する単離体を含む）由来である。

20

【0008】

特定の実施形態において、NS3の改変は、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および／またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含む。

【0009】

さらなる実施形態において、このタンパク質は、改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

【0010】

さらなる実施形態において、このタンパク質は、さらにNS5bポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

30

【0011】

なおさらなる実施形態において、このタンパク質は、さらにE2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

【0012】

さらなる実施形態において、このタンパク質は、さらにE1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

【0013】

さらなる実施形態において、このタンパク質は、さらにE2ポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

40

【0014】

なおさらなる実施形態において、このタンパク質は、さらにE1ポリペプチド、E2ポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

【0015】

さらなる実施形態において、このタンパク質は、E2ポリペプチド、改変したNS3ポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

【0016】

さらなる実施形態において、このタンパク質は、E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、改変したNS3ポリペプチドを含み、そして必要に応じてコアポリペプチドを含む。

50

【0017】

別の実施形態は、本質的に、HCVの改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、そして必要に応じてコアポリペプチドからなる融合タンパク質を提供する。特定の実施形態において、NS5bポリペプチドもまた、存在する。

【0018】

上記の実施形態において、融合タンパク質における種々の領域は、それらが天然のHCVポリタンパク質中で天然に存在する順序である必要はない。従って、例えば、コアポリペプチドは、存在する場合には、この融合のN末端および/またはC末端であり得る。

【0019】

なおさらなる実施形態において、本発明は、本質的に、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下：

(a) 完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、およびNS5aポリペプチド；

(b) 完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびNS5bポリペプチド；

(c) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、およびNS5aポリペプチド；

(d) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、およびNS5aポリペプチド；

(e) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびNS5bポリペプチド；

(f) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびNS5bポリペプチド；

(g) E2ポリペプチド、および完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド；

(h) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、および完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド；

(i) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、および完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド；

10

20

30

40

50

ゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド；あるいは

(j) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、および完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、からなる免疫原性の融合タンパク質に関する。

【0020】

別の実施形態において、本発明は、本質的に、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下：

(a) 完全长のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、およびコアポリペプチド；

(b) 完全长のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、NS5bポリペプチドおよびコアポリペプチド；

(c) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびコアポリペプチド；

(d) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチドおよびコアポリペプチド；

(e) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、NS5bポリペプチドおよびコアポリペプチド；

(f) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、NS5bポリペプチドおよびコアポリペプチド；

(g) E2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、およびコアポリペプチド；

(h) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、およびコアポリペプチド；

(i) E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、およびコアポリペプチド；あるいは

(j) E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、p7ポリペプチド、NS2ポリペプチド

10

20

30

40

50

、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果プロテアーゼ活性が阻害される改変したNS3ポリペプチド、およびコアポリペプチドからなる免疫原性の融合タンパク質に関する。

【0021】

なおさらなる実施形態において、本発明は、改変したNS3ポリペプチドに関し、これは、完全長のHCV-1ポリタンパク質に関して番号付けされたHis-1083、Asp-1105、および/またはSer-1165に対応するアミノ酸の置換を含み、その結果、この改変したNS3ポリペプチドがHCV融合タンパク質内に存在する場合にプロテアーゼ活性が阻害される。

【0022】

本発明のなお別の実施形態は、上記に詳述される任意のタンパク質をコードする単離したポリヌクレオチド、同一物を含む組換えベクター、このベクターで形質転換される宿主細胞、ならびに融合タンパク質を組換え生成する方法を提供する。

【0023】

本発明はまた、任意のこれらの融合タンパク質、これらの融合をコードするポリヌクレオチド、またはこれらのポリヌクレオチドを含む組換えベクター、および薬学的に受容可能なキャリアを含有する組成物を提供する。

【0024】

本発明のなお別の実施形態は、本明細書中で記載されるような組成物を投与することによって脊椎動物被験体において細胞性免疫応答を刺激する方法を提供する。特定の実施形態において、この組成物は、HCVポリペプチドのエピトープを認識するT細胞を準備刺激および/または活性化する。T細胞は、改変したNS3ポリペプチドおよび少なくとも1つのさらなるHCVポリペプチドを含む融合タンパク質と接触される。活性化したT細胞の集団は、このNS3ポリペプチドおよび/またはさらなるHCVポリペプチドを認識する。

【0025】

従って、本発明は、HCVに対する細胞性免疫応答を刺激する（例えば、HCVポリペプチドのエピトープを認識するT細胞を準備刺激するおよび/または活性化する）ための方法および試薬を提供する。これらの方法および試薬は、強力なCTL応答に関係するHCVポリペプチドのエピトープを同定するために、およびHCVに対して哺乳動物（ヒトを含む）を免疫するために、特に有利である。

【0026】

（発明の詳細な説明）

本発明の実施は、他に示されない限り、当該分野の技術の範囲内の、化学、生化学、組換えDNA技術および免疫学の従来の方法を使用する。このような技術は、文献に完全に説明される。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）；Methods In Enzymology（S. Colowick and N. Kaplan編、Academic Press, Inc.）；DNA Cloning, Vols. I and II(D. N. Glover編)；Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編)；Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames & S. J. Higgins編)；Animal Cell Culture(R. K. Freshney編)；Practical Guide to Molecular Cloningを参照のこと。

【0027】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容がそうではないと明らかに示さない限り、複数の参照をも含むことが留意されなければならない。従って、例えば、「抗原」に対する参照は、2以上の抗原

10

20

30

40

50

の混合物を含む、など。

【0028】

以下のアミノ酸の略語は、この明細書を通して使用される：

アラニン：A l a (A)	アルギニン：A r g (R)
アスパラギン：A s n (N)	アスパラギン酸：A s p (D)
システイン：C y s (C)	グルタミン：G l n (Q)
グルタミン酸：G l u (E)	グリシン：G l y (G)
ヒスチジン：H i s (H)	イソロイシン：I l e (I)
ロイシン：L e u (L)	リジン：L y s (K)
メチオニン：M e t (M)	フェニルアラニン：P h e (F)
プロリン：P r o (P)	セリン：S e r (S)
スレオニン：T h r (T)	トリプトファン：T r p (W)
チロシン：T y r (Y) (I . 定義)	バリン：V a l (V)

10

本発明を記載する際に、以下の用語が使用され、そして以下に示されるように定義されることが意図される。

【0029】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーをいい、そして生成物の最小長に限定されない。従って、ペプチド、オリゴペプチド、ダイマー、マルチマーなどが、この定義によって包含される。全長タンパク質およびそのフラグメントの両方が、この定義に含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾（例えば、グルコシル化、アセチル化、リン酸化など）を含む。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、ネイティブな配列に対する、改変（例えば、欠失、付加および置換（天然では、一般に保存的））を含むタンパク質をいう。これらの改変は、部位特異的変異誘発を介するように意図的であり得るか、または例えば、このタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR增幅に起因するエラーを介するように偶発的なものであり得る。

20

【0030】

H C V ポリペプチドは、上記のように、H C V ポリタンパク質に由来するポリペプチドである。このポリペプチドは、物理的にH C V に由来する必要はないが、合成的にまたは組換え的に生成され得る。さらに、このポリペプチドは、種々のH C V 株および単離物（例えば、Simmondsら、J. Gen. Virol. (1993) 74: 2391 - 2399に記載されるH C V の6つの遺伝型を有する単離物を含む（例えば、1株、2株、3株、4株など））ならびに新しく同定された単離物およびこれらの単離物のサブタイプ（例えば、H C V 1 a、H C V 1 bなど）のいずれかに由来し得る。多くの保存領域および可変領域が、これらの株間で既知であり、そして一般に、これらの領域に由来するエピトープのアミノ酸配列は、2つの配列が整列された場合に、高い程度の配列相同性（例えば、30%より大きい、好ましくは40%より大きいアミノ酸配列相同性）を有する。従って、例えば、用語「N S 4」ポリペプチドは、種々のH C V 株のいずれかに由来するネイティブなN S 4、ならびに以下にさらに定義されるようなN S 4 アナログ、ムテインおよび免疫原性フラグメントをいう。

30

【0031】

用語「アナログ」および「ムテイン」は、参照分子の生物学的に活性な誘導体またはこのような誘導体のフラグメントをいい、これらは、以下に定義される細胞媒介性免疫応答を刺激する能力のような所望の活性を維持する。改変されたN S 3の場合において、「アナログ」または「ムテイン」は、そのネイティブなタンパク質分解活性を欠損するN S 3分子をいう。一般に、用語「アナログ」は、改変が免疫原性活性を破壊しない限り、ネイティブ分子に対して、1以上のアミノ酸付加、置換（一般に、天然では保存的、または改変されたN S 3の場合において、活性タンパク質分解活性部位で天然では非保存的）、および/または欠失を有するネイティブなポリペプチド配列および構造を有する化合物をい

40

50

う。用語「ムテイン」は、1つ以上のペプチド模倣物（「ペプトイド」）を有するペプチドをいい、例えば、これらは、国際公開番号WO 91/04282に記載される。好ましくは、このアナログまたはムテインは、ネイティブな分子として少なくとも同じ免疫活性を有する。ポリペプチドアナログおよびムテインを作製するための方法は、当該分野で公知であり、そして以下にさらに記載される。

【0032】

上に説明されるように、アナログは、一般に、天然では保存的である置換（すなわち、それらの側鎖が関係するアミノ酸のファミリー内で起こるこれらの置換）を含む。具体的に、アミノ酸は、一般的に4つのファミリーに分類される：(1)酸性--アスパラギン酸およびグルタミン酸；(2)塩基性--リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性--アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および(4)無電荷で極性--グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、しばしば、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンでの、アスパラギン酸のグルタミン酸での、スレオニンのセリンでの単独置換、またはアミノ酸の構造的に関連したアミノ酸の類似の保存的な置換は、生物学的活性に対して、主要な効果は有さないことが、合理的に予測可能である。例えば、目的のポリペプチドは、分子の所望の機能がインタクトなままである限り、約5～10までの保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、もしくは約15～25までの保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換、あるいは5～25の間の任意の整数の保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換を含み得る。当業者は、当該分野で周知の、Hopp/WoodsおよびKyte-Doolittleプロットを参照することによって、変化を許容し得る目的の分子の領域を容易に決定し得る。

【0033】

「改変されたNS3」とは、NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性が取り除かれるような改変を有するNS3ポリペプチドを意味する。改変は、ネイティブな分子に対して1つ以上のアミノ酸の付加、置換（天然では一般に非保存的）および/または欠失を含み得、NS3ポリペプチドのプロテアーゼ活性は取り除かれている。プロテアーゼ活性を測定する方法は、以下にさらに議論される。

【0034】

「フラグメント」は、インタクトな全長ポリペプチド配列および構造の一部のみからなるポリペプチドを意図される。このフラグメントは、ネイティブなポリペプチドのC末端欠失および/またはN末端欠失を含み得る。特定のHCVタンパク質の「免疫原性フラグメント」は、一般に、全長分子の少なくとも約5～10の連続するアミノ酸残基、好ましくは全長分子の少なくとも約15～25の連続するアミノ酸残基、および最も好ましくは全長分子の少なくとも約20～50以上の連続するアミノ酸残基（これらは、エピトープを規定する）を含み、または5個のアミノ酸と全長配列との間の任意の整数の連続するアミノ酸残基を含むが、ただし、本明細書中に記載されるアッセイによって測定される場合、問題のフラグメントは、免疫原性活性を保持する。

【0035】

本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ」は、少なくとも約3～5、好ましくは約5～10または15、および約1000アミノ酸以下（またはこの間の任意の整数のアミノ酸）の配列をいい、これは、それ自体によって、またはより大きな配列の一部として、このような配列に応答して産生される抗体に結合する配列を規定する。フラグメントの長さに臨界的な上限は存在せず、このフラグメントは、ほぼ全長のタンパク質配列、またはHCVポリタンパク質由来の2つ以上のエピトープを含む融合タンパク質でさえ含み得る。本発明における使用のためのエピトープは、これが由来する親タンパク質の一部分の正確な配列を有するポリペプチドに限定されない。実際に、ウイルスゲノムは、一定のフラックスの状態にあり、そして単離物間で比較的高い程度の変異性を示すいくつかの可変領域を含む。従って、用語「エピトープ」は、ネイティブな配列に同一な配列、ならび

10

20

30

40

50

にネイティブな配列に対する改変（例えば、欠失、付加および置換（一般に、天然では保存的））を包含する。

【0036】

エピトープを含む所定のポリペプチドの領域は、当該分野で周知の、任意の数のエピトープマッピング技術を使用して、同定され得る。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology、第66巻（Glenn E. Morris編、1996）Human Press、Totowa、New Jerseyを参照のこと。例えば、直鎖エピトープは、例えば、多数のペプチド（これらのペプチドは、タンパク質分子の一部分に対応する）を固体支持体上で同時に合成し、そしてこれらのペプチドを固体支持体になおも付着させながら、これらのペプチドを抗体と反応させることによって決定され得る。このような技術は、当該分野で公知であり、そして以下に記載される：例えば、米国特許第4,708,871号；Geyserら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002；Geyserら（1986）Molec. Immunol. 23:709-715。同様に、コンホメーションエピトープは、例えば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴によって、アミノ酸の空間的立体配座を決定することによって容易に決定される。例えば、Epitope Mapping Protocols（前出）を参照のこと。タンパク質の抗原性領域はまた、標準的な抗原性および疎水性親水性指標プロット（例えば、Oxford Molecular Groupから入手可能なOmiga version 1.0ソフトウェアプログラムを使用して計算されたもの）を使用して、同定され得る。このコンピュータプログラムは、抗原性プロフィールを決定するためのHopp/Woods法（Hoppら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1981）78:3824-3828）、および疎水性親水性指標プロットのためのKyte-Doolittle技術（Kyteら、J. Mol. Biol.（1982）157:105-132）を使用する。

【0037】

種々のHCVエピトープの説明について、例えば、Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1992）89:10011-10015；Chienら、J. Gastroenterol. Hepatol.（1993）8:S33-39；Chienら、国際公開番号WO93/00365；Chien, D.Y., 国際公開番号WO94/01778；ならびに米国特許第6,280,927号および同第6,150,087号を参照のこと。

【0038】

本明細書中で使用される場合、用語「T細胞エピトープ」とは、ペプチド構造または関連するハプテンに関するT細胞免疫を誘導し得るペプチド構造の特性をいう。T細胞エピトープは、一般に、MHC分子のペプチド結合間隔内の拡大した立体配座を想定する直鎖ペプチド決定因子を含む（Unanueら、Science（1987）236:551-557）。ポリペプチドのMHCII型関連直鎖ペプチド決定因子（一般に5~14アミノ酸長）への変換とは、抗原提示細胞（APC）によって実行される「抗原プロセシング」をいう。より詳細に、T細胞エピトープは、短鎖ペプチド構造の局所的な特性によって規定され、その結果、主なアミノ酸配列の性質は、電荷および疎水性、ならびに全体のポリペプチドの折り畳みに依存しない二次構造の特定の型（例えば、ヘリシティ）を含む。さらに、ヘルパーT細胞によって認識され得る短鎖ペプチドは、一般に疎水性側（MHC分子との相互作用について）および親水性側（T細胞レセプターとの相互作用について）を含む両親媒性構造であり（Margalitら、Computer Prediction of T-cell Epitopes, New Generation Vaccines Marcel-Dekker, Inc., ed. G.C. Woodrowら（1990）pp.109-116）、そしてさらに、両親媒性構造は螺旋立体配座を有する（例えば、Spougeら、J. Immunol.（1987）138:204-212；Berkowerら、J. Immunol.（1986）136:2498-2500）。

10

20

30

40

50

503を参照のこと)ことが考えられる。

【0039】

それ故に、T細胞エピトープを含むタンパク質のセグメントは、多数のコンピュータプログラムを使用して容易に予測し得る(例えばMargalitら、Computer Prediction of T-cell Epitopes, New Generation Vaccines Marcel-Dekker, Inc., ed. G.C.Woodrowら、(1990)pp.109-116を参照のこと)。このようなプログラムは、一般的に、T細胞応答を誘導することが公知の配列とペプチドのアミノ酸配列を比較し、そしてT細胞エピトープを必要とすることが考えられるアミノ酸のパターンについて検索する。

10

【0040】

HCV抗原(ポリペプチドおよびインビボで発現されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの両方を含む)または組成物に対する「免疫学的応答」は、目的の組成物に存在する分子に対する被験体の体液性免疫応答および/または細胞性免疫応答における発生である。本発明の目的のために、「体液性免疫応答」とは、抗体分子により媒介される免疫応答をいい、一方、「細胞性免疫応答」は、Tリンパ球および/または他の白血球により媒介されるものである。細胞性免疫の1つの重要な局面は、細胞溶解性T細胞(「CTL」)による抗原特異的応答に関する。CTLは、主要な組織適合性複合体(MHC)によりコードされるタンパク質と結合して存在し、そして細胞表面上に発現されるペプチド抗原に対する特異性を有する。CTLは、細胞内微生物の細胞内破壊またはこのような微生物に感染した細胞の溶解の誘導および促進を補助する。CD8+T細胞およびCD4+T細胞の両方は、HCV感染細胞を殺傷し得る。細胞性免疫の別の局面は、ヘルパーT細胞による抗原特異的応答に関する。ヘルパーT細胞は、それらの表面上にMHC分子に結合したペプチド抗原を提示する細胞に対する機能を刺激し、そしてこの細胞に対する非特異的エフェクター細胞の活性に焦点を当てることを補助するように作用する。「細胞性免疫応答」はまた、抗ウイルス性サイトカイン、ケモカイン、ならびに活性化T細胞および/または他の白血球(CD4+T細胞およびCD8+T細胞に由来するものを含む)により産生される他のこののような分子(IFN-αおよびTNF-αが挙げられるがこれらに限定されない)の産生をいう。

20

【0041】

細胞性免疫応答を誘発する組成物またはワクチンは、細胞表面でMHC分子と結合している抗原の提示により、脊椎動物被験体を感作するように働き得る。この細胞媒介性免疫応答は、その細胞の表面に抗原を提示する細胞に、またはその付近で指向される。さらに、抗原特異的Tリンパ球は、免疫された宿主の将来的な保護を可能にするように生成され得る。

30

【0042】

細胞媒介性免疫学的応答を刺激する特定の抗原の能力は、多くのアッセイによって(例えば、リンパ球増殖(lymphoproliferation)(リンパ球活性化)アッセイ、CTL細胞傷害性細胞アッセイによって、または感作された被験体における抗原に特異的なTリンパ球についてアッセイをすることによって)決定され得る。このようなアッセイは、当該分野において周知である。例えば、Ericksonら、J. Immunol.(1993)151:4189~4199; Doeら、Eur. J. Immunol.(1994)24:2369~2376; および以下の実施例を参照のこと。

40

【0043】

従って、本明細書中で使用される免疫学的応答は、CTLの產生、および/またはヘルパーT細胞の產生もしくは活性化を刺激するものであり得る。目的の抗原もまた、抗体媒介性免疫応答を誘発し得る。従って、免疫学的応答は、1以上の以下の効果を含み得る:B細胞による抗体の產生;ならびに/あるいは目的の組成物またはワクチンに存在する抗原に対して特異的に指向されるサプレッサーT細胞および/またはT細胞の活性化。これらの応答は、感染性を中和し、そして/あるいは抗体・補体、または抗体依存性細胞

50

傷害性（A D C C）を媒介して、免疫された宿主に対する症状の保護または軽減を提供するように働き得る。このような応答は、当該分野において周知である、標準的な免疫アッセイおよび中和アッセイを使用して決定され得る。

【0044】

「等価な抗原決定基」とは、H C V の異なる亜種または株由来（例えば、H C V の 1 株、2 株または 3 株など由来）の抗原決定基を意味し、抗原決定基は、配列のバリエーションに起因して等しく必要とされないが、問題の H C V 配列における等価な位置に生じる。一般的に、等価な抗原決定基のアミノ酸配列は、2 つの配列が整列された場合、高い程度の配列相同性（例えば、30 % より大きい、通常 40 % より大きい、60 % より大きい、なお 80 ~ 90 % より大きいアミノ酸配列相同性）を有する。

10

【0045】

「コード配列」または選択されたポリペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合、インビトロまたはインビボで転写され（D N A の場合）、そしてポリペプチドに翻訳される（m R N A の場合）核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端で開始コドンによって、そして 3'（カルボキシ）末端で翻訳終止コドンによって決定される。転写終結配列は、コード配列に対して 3' に位置され得る。

【0046】

「核酸」分子または「ポリヌクレオチド」は、二本鎖配列および一本鎖配列の両方を含み得、ウイルス由来の c D N A、原核生物または真核生物由来の m R N A、ウイルス（例えば、D N A ウィルスおよびレトロウイルス）由来のゲノム D N A 配列または原核生物 D N A、特に合成 D N A 配列をいうが、これらに限定されない。この用語はまた、D N A および R N A の公知の塩基アナログのいずれかを含む配列も含む。

20

【0047】

「作動可能に連結される」とは、そのように記載される成分が、それらの所望の機能を実行するように構成されるエレメントの配置をいう。従って、コード配列に作動可能に連結される所与のプロモーターは、適切な転写因子などが存在する場合、コード配列の発現をもたらし得る。プロモーターは、コード配列の発現を指示するように機能する限り、コード配列と連続である必要はない。従って、例えば、介在する、翻訳されないが転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得（イントロンは転写され得る）、プロモーター配列は、なお、コード配列に「作動可能に連結される」と考えられ得る。

30

【0048】

核酸分子を記載するために本明細書中で使用される場合、「組換え体」は、その起源または操作により、天然に付随するポリヌクレオチドのうちの全てまたは一部を付隨しない、ゲノム、c D N A、ウイルス、半合成、または合成起源のポリヌクレオチドを意味する。タンパク質またはポリペプチドに関して使用される場合、用語「組換え体」は、組換えポリヌクレオチドの発現によって產生されるポリペプチドを意味する。一般的に、目的の遺伝子は、以下にさらに記載のように、クローン化され、次いで、形質転換された生物において発現される。宿主生物は、発現条件下で外来遺伝子を発現してタンパク質を產生する。

40

【0049】

「制御エレメント」とは、それが連結するコード配列の発現を助けるポリヌクレオチド配列をいう。この用語は、プロモーター、転写終結配列、上流調節ドメイン、ポリアデニル化シグナル、非翻訳領域（5' - U T R および 3' - U T R を含む）、ならびに適切な場合、リーダー配列およびエンハンサー（これらは、集合的に、宿主細胞においてコード配列の転写および翻訳を提供する）を含む。

【0050】

本明細書中で使用される場合、「プロモーター」は、宿主細胞において R N A ポリメラーゼを結合し得、それに作動可能に連結される下流の（3' 方向）コード配列の転写を開始し得る D N A 調節領域である。本発明の目的のために、プロモーター配列は、バックグ

50

ラウンドよりも上の検出可能なレベルで目的の遺伝子の転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含む。プロモーター配列には、転写開始部位、ならびにRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）がある。真核生物プロモーターは、しばしば、常にではないが、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。

【0051】

制御配列は、RNAポリメラーゼがプロモーター配列に結合し、mRNAにコード配列を転写する場合、細胞においてコード配列の「転写を指示し」、次いで、このmRNAは、コード配列によってコードされるペプチドに翻訳される。

【0052】

「発現カセット」または「発現構築物」とは、目的の配列または遺伝子の発現を指向し得るアセンブリをいう。この発現カセットは、上記のような制御エレメント（例えば、目的の配列または遺伝子に（これらの転写を指向するように）作動可能に連結されるプロモーター）を含み、そしてしばしば、同様に、ポリアデニル化配列を含む。本発明の特定の実施形態において、本明細書中に記載される発現カセットは、プラスミド構築物内に含まれ得る。この発現カセットの構成成分に加えて、このプラスミド構築物はまた、1種以上の選択マーカー、このプラスミド構築物が単鎖DNAとして存在することを可能にするシグナル（例えば、M13の複製起点）、少なくとも1ヶ所のマルチクローニングサイト、および「哺乳動物」の複製起点（例えば、複製のSV40起点またはアデノウイルス起点）を含み得る。

【0053】

本明細書中で使用される「形質転換」とは、挿入のために使用される方法（例えば、直接的な取り込み、トランスフェクション、感染などによる形質転換）に係わらず、外因性ポリヌクレオチドの宿主細胞への挿入をいう。トランスフェクションの特定の方法については、以下をさらに参照のこと。外因性ポリヌクレオチドは、組み込まれていないベクター（例えば、エピソーム）として維持され得るか、または宿主ゲノムに組み込まれ得る。

【0054】

「宿主細胞」は、外因性DNA配列によって、形質転換された細胞、または形質転換され得る細胞である。

【0055】

「単離された」とは、ペプチドをいう場合、示された分子が、その分子が天然に見出される生物全体から分離され、そして別々であるか、または同じ型の他の生物学的高分子の実質的な非存在下で存在することを意味する。ポリヌクレオチドに関して、用語「単離された」は、天然においてそのポリヌクレオチドと通常関連する配列の全てまたは一部を欠いた核酸分子；または天然で存在するが、その配列に関連する異種配列を有する配列；または染色体から解離した分子である。

【0056】

本明細書中で使用される用語「精製された」とは、好ましくは、少なくとも75重量%、より好ましくは、少なくとも85重量%、より好ましくは、少なくとも95重量%、最も好ましくは、少なくとも98重量%の、同じ種類の生物学的高分子が存在することを意味する。

【0057】

「相同性」とは、2つのポリヌクレオチド部分または2つのペプチド部分の間の同一性の割合をいう。2つのDNAまたは2つのペプチド配列は、これらの配列が、規定された長さの分子にわたって、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、より好ましくは少なくとも約80%～85%、好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%～98%またはそれ以上の配列同一性を示す場合、互いに「実質的に相同」である。本明細書中で使用される場合、実質的に相同はまた、特定のDNA配列またはペプチド配列に対して完全な同一性を示す配列をいう。

【0058】

10

20

30

40

50

一般的に、「同一性」とは、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列それぞれの正確なヌクレオチド-ヌクレオチドの対応またはアミノ酸-アミノ酸の対応をいう。同一性の割合は、それらの配列を整列させ、2つの整列された配列の間の一一致の正確な数を数え、短い方の配列の長さによって割り、そして結果に100を掛けることによる、2つの分子間の配列情報の直接的な比較によって決定され得る。容易に入手可能なコンピュータプログラム（例えば、ALIGN, Dayhoff, M.O.、Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff編、補遺5、3:353~358, National biomedical Research Foundation, Washington, DC（これは、ペプチド分析のために、SmithおよびWaterman Advances in Appl. Math. 2:482~489, 1981の局所的相同性アルゴリズムを適合させる））は、分析を助けるために使用され得る。ヌクレオチド配列同一性を決定するためのプログラム（例えば、BESTFIT、FASTAおよびGAPプログラム（これらもまた、SmithおよびWatermanのアルゴリズムに依存する））は、Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group, Madison, WIから入手可能)において入手可能である。これらのプログラムは、製造業者によって推奨され、そして上に参照されるWisconsin Sequence Analysis Packageに記載されるデフォルトパラメーターを用いて容易に使用される。例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列の同一性の割合は、6つのヌクレオチド位置のデフォルトスコアリングテーブルおよびギャップペナルティーを用いてSmithおよびWatermanの相同性アルゴリズムを使用して決定され得る。

【0059】

本発明の状況において同一性の割合を確立する別 の方法は、University of Edinburghによる著作権があり、John F. CollinsおよびShane S. Sturrockによって開発され、IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA)によって配給されるプログラムのMPSRC Hパッケージを使用することである。この一そろいのパッケージから、Smith-Watermanアルゴリズムを使用し得、ここで、デフォルトパラメーターは、スコアリングテーブルのために使用される（例えば、12のギャップオープンペナルティー、1のギャップ伸長ペナルティー、および6のギャップ）。生成されるデータから、「一致」値が「配列同一性」を反映する。配列間の同一性の割合または相同性の割合を計算するための他の適切なプログラムは、当該分野において一般的に公知であり、例えば、別の整列プログラムは、デフォルトパラメーターとともに使用されるBLASTである。例えば、BLASTNおよびBLASTPは、以下のデフォルトパラメーターを使用して用いられ得る：遺伝子コード=標準；フィルター=なし；鎖=両方；カットオフ=60；期待値=10；マトリクス(Matrix)=BLOSUM62；記載(Descriptions)=50配列；ソート=HIGH SCORE；データベース(Database)=縮重なし、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss protein+Supupdate+PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスにおいて見出され得る：http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST。

【0060】

あるいは、相同性は、相同な領域間に安定な二重鎖を形成する条件下でのポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続いて、単鎖特異的ヌクレアーゼでの消化、および消化されたフラグメントのサイズの決定によって決定され得る。実質的に相同であるDNA配列は、その特定の系について規定されるように、例えばストリンジエントな条件下で、ザザンハイブリダイゼーション実験で同定され得る。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当該分野の技術の範囲内である。例えば、Sambrookら、上記；DNA Cloning上記；Nucleic Acid Hybridization 50

、上記を参照のこと。

【0061】

「核酸免疫化」によって、インビボにおける免疫原（単数および複数）の発現のために、宿主細胞中に1つ以上の選択した抗原をコードする核酸分子を導入することを意味する。核酸分子は、例えば、注入投与、吸入投与、経口投与、鼻腔内投与、および粘膜投与などによってレシピエント被験体中に直接的に導入され得るか、あるいは、エキソビボで宿主から取り出された細胞中に導入され得る。後者の場合、形質転換された細胞は、被験体中に再導入され、被験体中で、核酸分子によってコードされる抗原に対する免疫応答を開始し得る。

【0062】

本明細書において使用される場合、「処置」とは、(i)伝統的なワクチンにおけるような、感染または再感染の予防、(ii)症状の減少または除去、および(iii)問題の病原体の実質的な除去または完全な除去、のいずれかをいう。処置は、予防的（感染前）であっても、治療的（感染後）であっても達成され得る。

【0063】

「脊椎動物被験体」とは、以下を含むがこれらに限定されない、コルダータ（cordata）亜門の任意のメンバーを意味する：ヒトおよび他の靈長類（チンパンジーおよび他のサル（ape）種およびサル（monkey）種のような非ヒト靈長類を含む）；飼育場用家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ）；家庭用家畜（例えば、イヌおよびネコ）；実験用動物（マウス、ラットおよびモルモットのような齧歯類を含む）；トリ（ニワトリ、シチメンチョウおよび他の家禽、アヒル、ガチョウなどのような家庭用、野生および狩猟用のトリを含む）。この用語は、特定の年齢を示さない。従って、成体の個体および新生仔の個体の両方を網羅することが意図される。これら全ての脊椎動物の免疫系が同様に作動するので、本明細書中に記載される発明は、上記脊椎動物種のいずれにおける使用のためにも意図される。

【0064】

（I I . 発明を実施するための形態）

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、もちろん、特定の処方物もプロセスのパラメーターも変動し得るので、特定の処方物にもプロセスのパラメーターにも限定されないことが理解されるべきである。本明細書中で用いられる用語は、本発明の特定の実施形態を記載する目的のためでしかなく、限定されることはないこともまた理解されるべきである。

【0065】

本明細書中に記載された組成物および方法と類似するかまたは等価な多数の組成物および方法が、本発明の実施で用いられ得、好ましい材料および方法が本明細書中に記載される。

【0066】

本発明は、融合タンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチドに関し、これは、改変されたNS3ポリペプチドおよびHCVポリタンパク質由来の少なくとも1つの他のHCVポリペプチドを含む。本発明の融合タンパク質は、細胞免疫応答を刺激するため（例えば、HCV特異的T細胞（すなわち、これらのポリペプチドのエピトープを認識するT細胞）を活性化するため、および/またはヘルパーT細胞の産生を惹起するため、および/または抗ウイルスサイトカイン、ケモカインなどの産生を刺激するため）に使用され得る。このような融合タンパク質によるHCV特異的T細胞の活性化は、（特に、応答と関連するHCVポリペプチドエピトープを同定するための）HCVワクチンの開発のためのインビトロモデル系およびインビボモデル系の両方を提供する。融合タンパク質はまた、哺乳動物におけるHCVに対する免疫応答（例えば、CTL応答）を生成するため、および/またはCD8+T細胞およびCD4+T細胞をプライムして、治療目的または予防目的のいずれかのための抗ウイルス剤を作製するために使用され得る。

【0067】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる理解のために、さらに詳細な考察が、本発明の組成物において使用するための融合タンパク質、ならびにタンパク質の产生、それらを含む組成物およびタンパク質を使用する方法に関して、以下に提供される。

【0068】

(融合タンパク質)

HCV系統のゲノムは、約9,000~12,000ヌクレオチドの単一のオーブンリーディングフレームを含み、これは、ポリタンパク質に転写される。図1および表1に示されるように、HCVポリタンパク質は、切断の際に、NH₂-コア-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4a-NS4b-NS5a-NS5b-COOHの順序で、少なくとも10個の異なる産物を产生する。このコアポリペプチドは、HCV-1に対して番号付けされた、1位~191位に存在する(HCV-1ゲノムに関して、Chooら(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.SA 88:2451-2455を参照のこと)。このポリペプチドは、さらに、アミノ酸約1位~約173位を含むHCVポリペプチドを产生するように処理される。このエンベロープポリペプチド(E1およびE2)は、それぞれ、約192位~約383位および約384位~約746位に存在する。P7ドメインは、約747位~約809位に見出される。NS2は、タンパク質分解性を有する完全な膜タンパク質であり、そしてこのポリタンパク質の約810位~約1026位に見出される。NS2は、単独か、またはNS3(約1027位~約1657位に見出される)と組み合わせてかのいずれかで、NS2-NS3単結合(sisssle bond)を切断し、次に、NS3-N末端を生成し、そしてセリンプロテアーゼ活性およびRNAヘリカーゼ活性の両方を含む大きなポリタンパク質を放出する。このNS3プロテアーゼ(約1027位~約1207位に見出される)は、残りのポリタンパク質を処理するのに役立つ。ヘリカーゼ活性は、約1193位~約1657位に見出される。NS3は、NS3補因子(約1658位~約1711位に見出されるNS4a)、2個のタンパク質(約1712位~約1972位に見出されるNS4b、および約1973位~約2420位に見出されるNS5a)、ならびにRNA依存性RNAポリメラーゼ(約2421位~約3011位に見出されるNS5b)を遊離する。ポリタンパク質の成熟の完了は、NS3セリンプロテアーゼにより触媒される、NS3-NS4a結合の自己触媒による切断より開始される。

【0069】

【表1】

表 1	
ドメイン	およその境界 *
C(コア)	1-191
E1	192-383
E2	384-746
P7	747-809
NS2	810-1026
NS3	1027-1657
NS4a	1658-1711
NS4b	1712-1972
NS5a	1973-2420
NS5b	2421-3011

* HCV-1に対して番号付けられている。Chooら(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.U.SA 88:2451-2455を参照のこと。

【0070】

本発明の融合タンパク質は、プロテアーゼ活性を阻害し、その結果、融合物のさらなる切断が、阻害されるように改変されたNS3ポリペプチドを含む。NS3ポリペプチドが

10

20

30

40

50

、 NS 3 プロテアーゼドメインの全てまたは部分の欠失により改変され得る。あるいは、タンパク質分解活性が、プロテアーゼドメインの活性領域中のアミノ酸の置換により阻害され得る。最後に、触媒部位が改変されるような、アミノ酸のこのドメインの活性領域への付加がまた、タンパク質分解活性を阻害するのに役立つ。

【 0 0 7 1 】

上で説明されるように、このプロテアーゼ活性は、アミノ酸位置 1 0 2 7 - 1 2 0 7 の周りで見出され、全長 H C V - 1 ポリタンパク質 (Choo ら、 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1991) 88 : 2451 - 2455 を参照のこと) に対して、図 2 (配列番号 4) の位置 2 - 1 8 2 に番号づけられる。 NS 3 プロテアーゼの構造および活性部位は、公知である。例えば、 De Francescos ら、 Antivir. Ther. (1998) 3 : 99 - 109 ; Koch ら、 Biochemistry (2001) 40 : 631 - 640 を参照のこと。従って、ネイティブ配列の欠失および改変は、代表的にこの分子の活性部位にて、またはこの近くで生じる。特に、図 2 (配列番号 4) の位置 1 - 1 8 2 もしくは 2 - 1 8 2 、好ましくは 1 - 1 7 0 もしくは 2 - 1 7 0 または 1 - 1 5 5 もしくは 2 - 1 5 5 に存在する、 1 つ以上のアミノ酸に対して改変するかまたは欠失を作製することが、望ましい。好ましい改変は、プロテアーゼを不活性化するために、プロテアーゼの活性部位での触媒的三つ組、すなわち、 H 、 D および / または S 残基に対してである。これらの残基は、それぞれ、位置 1 0 8 3 、 1 1 0 5 および 1 1 6 5 に存在し、全長 H C V ポリタンパク質に対して番号づけられる (図 2 (配列番号 4) の位置 5 8 、 8 0 および 1 4 0) 。このような改変は、タンパク質分解性開裂を抑制する一方、 T 細胞エピトープを保持する。
10
20

【 0 0 7 2 】

当業者は、活性を妨害するために欠失すべき NS 3 プロテアーゼの部分を、容易に決定し得る。活性の存在または非存在は、当業者に公知の方法を使用して決定され得る。

【 0 0 7 3 】

例えば、プロテアーゼ活性またはその欠失は、実施例の下部に記載される手順を使用して、ならびに当該分野で周知のアッセイを使用して、決定され得る。例えば、 Takeshit a ら、 Anal. Biochem. (1997) 247 : 242 - 246 ; Kakuchi ら、 J. Biochem. (1997) 122 : 749 - 755 ; Sa i ら、 Biochemistry (1998) 37 : 3392 - 3401 ; Cho ら、 J. Virol. Meth. (1988) 72 : 109 - 115 ; Cerretani ら、 Anal. Biochem. (1999) 266 : 192 - 197 ; Zhang ら、 Anal. Biochem. (1999) 270 : 268 - 275 ; Kakiuchi ら、 J. Virol. Meth. (1999) 80 : 77 - 84 ; Fowler ら、 J. Biomol. Screen. (2000) 5 : 153 - 158 ; および Kim ら、 Anal. Biochem. (2000) 284 : 42 - 48 を参照のこと。
30

【 0 0 7 4 】

本発明の融合タンパク質は、改変された NS 3 ポリペプチドに加えて、 H C V ポリタンパク質の 1 つ以上のほかの領域由来の 1 つ以上のポリペプチドを含む。実際には、融合物は、 H C V ポリタンパク質の全ての部分を含み得る。これらのポリペプチドは、 NS 3 ポリペプチドと同じ H C V 単離物からか、または異なる株または任意の種々の H C V 遺伝子型を有する単離物を含む単離物から誘導され得、幅広い範囲の H C V 遺伝型に対する保護を増加する。さらに、ポリペプチドは、特定の地理的な領域で特有の特定のウイルスクリード水腫に基づいて選択され得、ここで融合物を含むワクチン組成物が、使用される。本発明の融合物が、広範な文脈で H C V 感染を処置する有効な手段を提供することが、容易に明らかである。
40

【 0 0 7 5 】

特定の実施形態において、融合タンパク質は、改変された NS 3 (本明細書中で NS 3 * とも呼ばれる) 、 NS 4 (NS 4 a および NS 4 b) 、 NS 5 a ならびに、必要に応じて、 H C V のコアポリペプチド (NS 3 * NS 4 NS 5 a または NS 3 * NS 4 NS 5 a)
50

Core融合タンパク質、本明細書中で「NS3^{*}45a」および「NS3^{*}45aCore」とも呼ばれる)を含む。これらの領域は、ネイティブのHCVポリタンパク質において天然に存在する順序である必要はない。従って、例えば、コアポリペプチドは、融合物のN末端および/またはC末端であり得る。

【0076】

別の実施形態は、NS3^{*}、NS4、NS5a、NS5bおよび必要に応じて、HCVのコアポリペプチド(NS3^{*}NS4NS5aNS5bまたはNS3^{*}NS4^{*}NS5bCore融合タンパク質、本明細書中で「NS3^{*}45ab」および「NS3^{*}45abCore」とも呼ばれる)を含む融合タンパク質を提供する。これらの領域は、これらがネイティブなHCVポリタンパク質中で天然に存在する順番である必要はない。従って、10例えば、コアポリペプチドが、融合物のN末端および/またはC末端であり得る。

【0077】

なお別の実施形態は、NS2と組み合わされるNS3^{*}、NS2、p7およびE1と組み合わされるNS3^{*}、NS2、p7ならびにE1およびE2と組み合わされるNS3^{*}、NS2、p7およびE1と組み合わされるNS3^{*}、E2と組み合わせられるNS3^{*}、E1およびE2と組み合わせられるNS3^{*}(これらの全てはコアポリペプチドを有していても有していないてもよい)を含む融合タンパク質に関する。上記の融合物と同様に、これらの領域は、これらが天然に存在する順序である必要はない。さらに、これらの領域の各々は、同じHCV単離物または異なるHCV単離物から誘導され得る。

【0078】

図3(配列番号5~6)は、典型的な改変された融合タンパク質を示し、このタンパク質は、N末端からNS3プロテアーゼドメインが欠失されており、C末端上のコアのアミノ酸1~121を含む。

【0079】

上記の種々の融合物に存在する種々のHCVポリペプチドは、全長ポリペプチドまたはその部分のいずれかであり得る。融合タンパク質を構成するHCVポリペプチドの一部は、少なくとも1つのエピトープを含み、これは、活性化T細胞上のT細胞レセプターにより認識され、例えば、2152-H E Y P V G S Q L - 2160(配列番号1)および/または2224-A E L I E A N L L W R Q E M G - 2238(配列番号2)である。NS2、p7、E1、E2、NS3、NS4(NS4aおよびNS4b)、NS5a、NS5b、NS3NS4NS5a、およびNS3NS4NS5aNNS5bのエピトープは、種々の方法により、同定され得る。例えば、上の任意の組み合わせを含む個々のポリペプチドまたは融合タンパク質が、例えば、ポリペプチドまたはタンパク質に対するモノクローナル抗体を使用する免疫親和性精製により、単離され得る。次いで、単離されたタンパク質配列は、全タンパク質配列にわたる精製されたタンパク質のタンパク質分解性開裂により一連の短いペプチドを調製することによりスクリーニングされ得る。例えば、100マー-ポリペプチドで開始することにより、各々のポリペプチドは、HCV活性化T細胞上のT細胞レセプターにより認識されるエピトープの存在について試験され得、進歩的により小さく、重なるフラグメントは、次いで、同定された100マーから試験されて目的のエピトープをマッピングし得る。

【0080】

HCV活性化T細胞上のT細胞レセプターにより認識されるエピトープは、例えば、⁵¹C_rリリースアッセイ(例えば、実施例4)により、またはリンパ増殖アッセイ(例えば、実施例6)により、同定され得る。⁵¹C_rリリースアッセイにおいて、標的細胞が、エピトープをコードするポリペプチドを発現ベクター中にクローニングすることにより、そしてこの発現ベクターを標的細胞中に形質転換することにより、目的のエピトープを表示する標的細胞が、構築され得る。HCV特異的CD8⁺T細胞が、例えば、融合物中で見出されるHCVポリタンパク質の1つ以上の領域から1つ以上のエピトープを表す標的細胞を溶解し、そしてこのようなエピトープを示さない細胞を溶解しない。リンパ増殖アッセイにおいて、HCV活性化CD4⁺T細胞は、例えば、融合物中に見出されるH C

10

20

30

40

50

Vポリタンパク質の1つ以上の領域由来の1つ以上のエピトープと共に培養される場合、増殖するが、HCVエピトープ性ペプチドの非存在下では、増殖しない。

【0081】

種々のHCVポリペプチドは、融合タンパク質中に任意の順序で存在し得る。所望される場合、1つ以上のポリペプチドの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10以上が、融合タンパク質中に存在し得る。複数のHCVのウイルス株が存在し、そして任意のこれらの株のHCVポリペプチドが、融合タンパク質中で使用され得る。

【0082】

多くのHCV株および単離物の核酸配列およびアミノ酸配列（コア、NS2、p7、E1、E2、NS3、NS4、NS5a、NS5bの遺伝子およびポリペプチドを含む、HCVポリタンパク質の種々の領域の核酸配列およびアミノ酸配列を含む）が、決定された。例えば、単離されたHCV J1.1が、Kuboら（1989）Japan. Nuc 1. Acids Res. 17: 10367-10372; Takeuchiら（1990）Gene 91: 287-291; Takeuchiら（1990）J. Virol. 71: 3072-3033; およびTakeuchiら（1990）Nucl. Acids Res. 18: 4626に記載されている。2つの独立した単離物、HCV-JおよびBKの完全コード配列が、Katoら（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9524-9528およびTakamizawaら（1991）J. Virol. 65: 1105-1113にそれぞれ記載されている。

【0083】

HCV-1単離物を記載する刊行物としては、Chooら（1990）Brit. Med. Bull. 46: 423-441; Chooら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2451-2455およびHanら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1711-1715が挙げられる。HCV単離物HC-J1およびHC-J4は、Okamotoら（1991）Japan. J. Exp. Med. 60: 167-177に記載されている。HCV単離物HCT18~、HCT23、Th、HCT27、EC1およびEC10が、Weinerら（1991）Virol. 180: 842-848に記載されている。HCV単離物Pt-1、HCV-K1およびHCV-K2が、Enomotoら（1990）Biochem. Biophys. Res. Commun. 170: 1021-1025に記載されている。HCV単離物A、C、DおよびEが、Tsukiyama-Koharaら（1991）Virus Genes 5: 243-254に記載されている。

【0084】

融合タンパク質の各々の成分が、同じHCV株もしくは単離物または異なるHCV株もしくは単離物から得られ得る。例えばNS3ポリペプチド由来の、HCVポリペプチドを含む、融合タンパク質は、HCVの第1の株から得られ得、そして存在している他のHCVポリペプチドは、HCVの第2の株から得られ得る。あるいは、1つ以上の他のHCVポリペプチド（例えば、存在する場合、NS2、NS4、コア、p7、E1および/またはE2）は、HCVの第1の株から得られ得、そして残るHCVポリペプチドは、HCVの第2の株から得られ得る。さらに、存在する各々のHCVポリペプチドは、異なるHCV株から得られ得る。

【0085】

上に説明するように、本発明の融合物中のHCVポリタンパク質のコア領域から得られるポリペプチドを含むことが、望ましくあり得る。この領域は、HCV-1に対して番号づけられる、HCVポリタンパク質のアミノ酸位置1~191に存在する。全長タンパク質、そのフラグメント（例えば、アミノ酸1~160、例えば、アミノ酸1~150、1~140、1~130、1~120、例えば、アミノ酸1~121、1~122、1~123...1~151など）、またはこの全長タンパク質のエピトープを含むより小さなフラグメントのいずれか（例えば、アミノ酸10~53、アミノ酸10~45、アミノ酸67~88、アミノ酸120~130または例えばHoughtonら、米国特許番号5

10

20

30

40

50

, 350, 671号; Chienら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 10011 - 10015; Chienら、J. Gastroenterol. Hepatol. (1993) 8: S33 - 39; Chienら、国際公開番号WO93/00365; Chien, D.Y., 国際公開番号WO94/01778; および米国特許番号6,280,927号および同6,150,087号で同定される任意のコアエピトープの間で見出される、エピトープ)が、本発明の融合物に使用され得る。さらに、ポリタンパク質のコア領域のフレームシフトから生じるタンパク質(例えば、国際公開番号WO99/63941に記載されるような)が、使用され得る。

【0086】

コアポリペプチドが存在する場合、これは、融合物のN末端、C末端および/または内部に存在し得る。特に好ましいのは、特定のアジュバント(例えば、以下にさらに記載される、ISCOM)との複合体の形成を可能にする、C末端上のコアポリペプチドである。

【0087】

上に記載されるように、HCV融合物中で有用なポリペプチドとしては、ポリタンパク質の任意の種々の領域から誘導されるT細胞エピトープが挙げられる。この点において、E1、E2、p7およびNS2は、ヒト細胞エピトープ(CD4+およびCD8+の両方)を含み、ワクチン効力を増加し、そして複数のHCV遺伝子型に対する保護レベルを増加するよう働く1つ以上のこれらのエピトープを含むことが、公知である。さらに、特異的な、保存されたT細胞エピトープの複数のコピーがまた、融合物(例えば、異なる遺伝子型由来のエピトープの複合物)の中で使用され得る。

【0088】

例えば、HCV E1および/またはE2領域由来のポリペプチドが、本発明の融合物において使用され得る。E2は、複数の種(Spaeteら、Virology (1992) 188: 819 - 830; Selbyら、J. Virology (1996) 70: 5177 - 5182; Grakouiら、J. Virology (1993) 67: 1385 - 1395; Tomeiら、J. Virology (1993) 67: 4017 - 4026)として存在し、そしてクリッピングおよびタンパク質分解が、E2ポリペプチドのN末端およびC末端で起こり得る。従って、本明細書中で使用のためのE2ポリペプチドは、全長HCV-1ポリタンパク質に対して番号づけられる、HCVポリタンパク質のアミノ酸405~661(例えば、400、401、402...~661)(例えば、383もしくは384~661、383もしくは384~715、383もしくは384~746、383もしくは384~749または383もしくは384~809あるいは383もしくは384から661~809の間の任意のC末端)を含み得る。同様に、本明細書中で使用のためのE1ポリペプチドは、HCVポリタンパク質のアミノ酸192~326、192~330、192~333、192~360、192~363、192~383または192から326~383の間の任意のC末端を含み得る。

【0089】

エピトープを含むE1および/またはE2の免疫原性フラグメントは、本発明の融合物において使用され得る。例えば、E1ポリペプチドのフラグメントは、約5~分子のほぼ全長(例えば、E1ポリペプチドの6、10、25、50、75、100、125、150、175、185またはそれ以上のアミノ酸)あるいは述べられた数の間の任意の整数を含み得る。同様に、E2ポリペプチドのフラグメントは、E2ポリペプチドの6、10、25、50、75、100、150、200、250、300または350アミノ酸あるいは述べられた数の間の任意の整数を含み得る。

【0090】

例えば、E2の超可変領域(アミノ酸384~410または390~410にわたる領域のような)から得られるエピトープは、この融合物中に含まれ得る。E2ポリペプチド配列中に組み入れられる特に有効なE2エピトープは、この領域から得られるコンセンサス配列(例えば、HCV1型ゲノムのアミノ酸390~410のコンセンサス配列を表す

10

20

30

40

50

コンセンサス配列 G l y - S e r - A l a - A l a - A r g - T h r - T h r - S e r - G l y - P h e - V a l - S e r - L e u - P h e - A l a - P r o - G l y - A l a - L y s - G l n - A s n (配列番号 7)) を含むものである。さらなるエピトープ E 1 および E 2 は、公知であり、例えば、C h i e n ら、国際公開番号 W O 9 3 / 0 0 3 6 5 に記載されている。

【 0 0 9 1 】

さらに、E 1 ポリペプチドおよび / または E 2 ポリペプチドは、ドメインに広がる膜の全てまたは一部を欠失し得る。E 1 について、アミノ酸位置約 3 7 0 以上 (H C V - 1 E 1 の番号づけに基づく) で終結するほとんどのポリペプチドは、E R により保持され、従って増殖媒地中に分泌されない。E 2 について、アミノ酸位置 7 3 1 以上 (これはまた、H C V - 1 E 2 配列の番号づけに基づく) で終結するポリペプチドは、E R により保持され、そして分泌されない。(例えば、1 9 9 6 年 2 月 1 5 日に公開された、国際公開番号 W O 9 6 / 0 4 3 0 1 を参照のこと)。これらのアミノ酸位置が決定的ではなく、ある程度変動し得ることが留意されるべきである。従って、本発明は、膜貫通結合ドメインならびに (アミノ酸位置約 3 6 9 以下で終結する) E 1 ポリペプチドおよび (アミノ酸位置 7 3 0 以下で終結する) E 2 ポリペプチドを含む膜貫通結合ドメインの全てまたは一部を欠くポリペプチドを保持する E 1 ポリペプチドおよび / または E 2 ポリペプチドの使用を企図する。さらに、C 末端短縮は、N 末端に向かうドメインにわたる膜を貫通して伸び得る。従って、例えば、例えば 3 6 0 より低い位置に存在する E 1 短縮および例えば 7 1 5 より低い位置に存在する E 2 短縮がまた、本発明に含まれる。必要な全ては、短縮した E 1 ポリペプチドおよび E 2 ポリペプチドが、その意図された目的のために機能性を保持することである。しかし、特に好ましい短縮された E 1 構築物は、アミノ酸約 3 0 0 を越えて伸びないものである。最も好ましいものは、位置 3 6 0 での終結である。好ましい短縮された E 2 構築物は、アミノ酸位置約 7 1 5 を越えて伸びない C 末端短縮を有するものである。特に好ましい E 2 短縮物は、任意のアミノ酸 7 1 5 ~ 7 3 0 (例えば 7 2 5) の後で短縮される分子である。

【 0 0 9 2 】

これらの H C V 領域および他の H C V 領域由来の種々の H C V エピトープの記載については、例えば、C h i e n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A (1 9 9 2) 8 9 : 1 0 0 1 1 - 1 0 0 1 5 ; C h i e n ら、J . G a s t r o e n t . H e p a t o l . (1 9 9 3) 8 : S 3 3 - 3 9 ; C h i e n ら、国際公開番号 W O 9 3 / 0 0 3 6 5 ; C h i e n , D . Y . , 国際公開番号 W O 9 4 / 0 1 7 7 8 ; ならびに米国特許番号第 6 , 2 8 0 , 9 2 7 号および同第 6 , 1 5 0 , 0 8 7 号を参照のこと。

【 0 0 9 3 】

好ましくは、上述の融合タンパク質およびこれらのタンパク質の個々の成分は、組換的に產生される。これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドが、発現ベクター内に導入され、これは、適切な発現系において発現され得る。種々の細菌、酵母、哺乳動物および昆虫の発現系が、当該分野で使用可能であり、そして任意のこののような発現系が使用され得る。必要に応じて、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、無細胞翻訳系において翻訳され得る。このような方法は、当該分野で周知である。このタンパク質はまた、固相タンパク質合成によって構築され得る。

【 0 0 9 4 】

所望の場合、融合タンパク質またはこれらのタンパク質の個々の成分はまた、他のアミノ酸配列 (例えば、アミノ酸リンカーまたはシグナル配列、およびグルタチオン - S - トランスフェラーゼおよびブドウ球菌性プロテイン A のようなタンパク質精製において有用なリガンド) を含み得る。

【 0 0 9 5 】

(融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド)

上述のように、ポリヌクレオチドは、完全に満たない H C V ゲノムを含むか、またはあるいは、変異 N S 3 ドメインを有する完全なポリタンパク質の配列を含み得る。ポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドは、RNAまたは一本鎖もしくは二本鎖のDNAで有り得る。好ましくは、ポリヌクレオチドは、他の成分（例えば、タンパク質および脂質）を含まないで単離される。ポリヌクレオチドは、上述の融合タンパク質をコードし、従って、NS3^{*}およびHCVポリタンパク質の異なる領域由来の少なくとも1つの他のHCVポリペプチド（例えば、NS2、p7、E1、E2、NS4、NS5a、NS5b、コア（core）などに由来するポリペプチド）をコードする配列を含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、タンパク質精製において有用なリンカー、シグナル配列、またはリガンド（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、およびブドウ球菌性プロテインA）をコードする配列のような、他のヌクレオチド配列を含み得る。

【0096】

10

発現収率を上げるために、ポリタンパク質を発現のためのフラグメントに分裂させることができ望ましく有り得る。これらのフラグメントは、本明細書中で記載されるように組成物において組み合わせて使用され得る。あるいは、これらのフラグメントは、発現の後に結合し得る。従って、例えば、NS3^{*} NS4 Coreは、1つの構築物として発現され得、そしてNS5a NS5b Coreは、第2の構築物として発現され得る。同様に、NS3^{*} NS4 NS5aは、1つの構築物として発現され得、そして例えば、NS3^{*} NS4 NS5a Coreを有する第2の構築物が、第2の構築物として発現され得る。例えば、NS2 p7 E2 NS3^{*} NS4は、1つの構築物として発現され得、そしてNS3（非修飾）NS4 NS5bは、本発明の組成物における使用のためのさらなる構築物として発現され得る。上記の組み合わせは、代表例に過ぎず、任意の組み合わせの融合物が別々に発現され得ることが理解されるべきである。

【0097】

20

種々のHCVポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、例えば、HCVに感染した個体の血漿、血清、または肝臓ホモジネートに存在する核酸配列に由来するゲノムライブラリーから単離され得るか、または例えば、自動合成機を使用して実験室において合成され得る。PCRのような増幅方法を使用して、HCVゲノムDNAまたはこれをコードするcDNAのどちらかからポリヌクレオチドを増幅し得る。

【0098】

30

ポリヌクレオチドは、天然に存在するこれらのポリペプチドについてのコード配列かまたは天然に存在しない人工配列であり得るこれらのポリペプチドについてのコード配列を含み得る。これらのポリヌクレオチドを、標準的分子生物学技術を用いて連結させて、融合タンパク質のコード配列を形成し得る。所望の場合、ポリヌクレオチドを発現ベクター内にクローン化し、そして、例えば、細菌、酵母、または哺乳動物細胞内に形質転換し得、それにより、本発明の融合タンパク質が、細胞培養物において発現し得、これから単離され得る。

【0099】

40

所望の融合物またはこれらの融合物の個々の成分を含む個々の発現構築物を含む、本発明の発現構築物を、核酸免疫化のために使用して、標準的遺伝子送達プロトコールを用いて細胞免疫応答を刺激し得る。遺伝子送達のための方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、同第5,580,859号、同第5,589,466号を参照のこと。遺伝子は、直接脊椎動物被験体に送達され得るか、またはその代わり、被験体に由来する細胞にエキソビオで送達され得、そしてこの細胞は、被験体に再移植され得る。例えば、この構築物は、例えば、プラスミド（例えば、pBR322、pUC、またはCOL E1）内に含まれるプラスミドDNAとして送達され得る。

【0100】

50

さらに、この発現構築物は、細胞内に送達される前に、リポソーム内に封入され得る。脂質カプセル化は、一般に、核酸を安定的に結合するかまたは捕捉して維持し得る、リポソームを使用して達成される。凝集したDNA対脂質調製物の比率は変わり得るが、一般によよそ1:1である（mg DNA : 高分子脂質）か、より脂質が多い。核酸の送達のためのキャリアとしてのリポソームの使用の総説については、HugおよびSleigh

t , Biophys. Acta. (1991) 1097 : 1 - 17 ; Straubingerら, Methods of Enzymology (1983) , Vol. 101 , pp. 512 - 527 を参照のこと。

【0101】

本発明での使用のためのリポソーム調製物としては、カチオン性(正に荷電)調製物、アニオン性(負に荷電)調製物、および中性調製物が挙げられ、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、容易に入手可能である。例えば、N[1-2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチル-アンモニウム(DOTMA)リポソームは、Lipofectionの登録商標で、GIBCO BRL (Grand Island, NY.)から市販されている(Felgnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84 : 7413 - 7416)もまた、参照のこと。他の市販の脂質としては、トランスフェクテース(transfectace)(DDAB / DOPE)およびDOTAP / DOPE(Boehringer)が挙げられる。他のカチオン性リポソームは、当該分野で周知の技術を使用して、容易に入手可能な物質から調製され得る。例えば、DOTAP(1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リポソームの合成の記載については、Szokaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75 : 4194 - 4198; PCT出願公開番号WO 90/11092を参照のこと。種々のリポソーム-核酸複合体は、当該分野で公知の方法を使用して調製される。例えば、Straubingerら, METHODS OF IMMUNOLOGY (1983) , Vol. 101, pp. 512 - 527; Szokaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75 : 4194 - 4198; Papahadjopoulosら, Biophys. Acta (1975) 394 : 483; Wilsonら, Cell (1979) 17 : 77); DeamerおよびBangham, Biophys. Acta (1976) 443 : 629; Ostroら, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76 : 836; Fraleyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76 : 3348; EnochおよびStrittmatter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76 : 145; Fraleyら, J. Biol. Chem. (1980) 255 : 10431; SzokaおよびPapahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75 : 145; ならびにSchaefer-Ridderら, Science (1982) 215 : 166を、参照のこと。

【0102】

DNAはまた、Papahadjopoulosら, Biochem. Biophys. Acta. (1975) 394 : 483 - 491によって記載されるのと類似の渦巻き状(cochleate)脂質組成物中で送達され得る。また、米国特許第4,663,161号および同第4,871,488も、参照のこと。

【0103】

多くのウイルスベースの系が、哺乳動物細胞内への遺伝子伝達のために開発されている。例えば、レトロウイルス(例えば、マウス肉腫ウイルス、マウス乳癌ウイルス、モロニーマウス白血病ウイルス、およびラウス肉腫ウイルス)は、遺伝子送達系についての便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子は、当該分野で公知の技術を用いて、ベクター内に挿入され得、そしてレトロウイルス粒子内に封入され得る。次いで、組換えウイルスは単離され得、次いで、インビオまたはエキソビオのいずれかで、被験体の細胞に送達され得る。多くのレトロウイルス系が、記載されている(米国特許第5,219,740号; MillerおよびRosman, Biotechniques (1989) 7 : 980 - 990; Miller, A.D., Human Gene Therapy (1990) 1 : 5 - 14; Scarpaら, Virology (1991) 180 : 849 - 852; Burnsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90 : 8033 - 8037; ならびにBoriss-LawrieおよびTemin,

Cur. Opin. Genet. Develop. (1993) 3 : 102 - 109)。簡潔には、本発明のレトロウイルス遺伝子送達ビヒクルは、例えば、B型、C型およびD型のレトロウイルスを含む広範な種々のレトロウイルス、ならびにFIV、HIV、HIV-1、HIV-2およびSIVのようなスプーマウイルスおよびレンチウイルスから容易に構築され得る (*RNA Tumor Viruses*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985を参照のこと)。このようなレトロウイルスは、American Type Culture Collection ('ATCC'; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) のような寄託当局または収集局から得られ得るか、または一般に利用可能な技術を用いて、公知の供給源から単離され得る。

10

【0104】

アデノウイルス2型ベクターおよび5型ベクターのような、多くのアデノウイルスベクターもまた記載されている。宿主ゲノム内に組み込むレトロウイルスと違い、アデノウイルスは、染色体外に留まり、従って、挿入変異に関わる危険性を最小にする (Haj-AhmadおよびGraham, *J. Virol.* (1986) 57 : 267 - 274; Bettら, *J. Virol.* (1993) 67 : 5911 - 5921; Mitterederら, *Human Gene Therapy* (1994) 5 : 717 - 729; Sethら, *J. Virol.* (1994) 68 : 933 - 940; Barrら, *Gene Therapy* (1994) 1 : 51 - 58; Berkner, K. L. *Biotech Techniques* (1988) 6 : 616 - 629; ならびにRichら, *Human Gene Therapy* (1993) 4 : 461 - 476))。

20

【0105】

Michaelら, *J. Biol. Chem.* (1993) 268 : 6866 - 6869およびWagnerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89 : 6099 - 6103に記載のアデノウイルスキメラベクターのような分子結合体ベクターもまた、遺伝子送達のために使用され得る。

30

【0106】

シンドビスウイルスおよびセムリキ森林ウイルス、VEEに由来するベクターのような(しかしこれらに限定されない)アルファウイルス属のメンバーもまた、目的の遺伝子の送達のためのウイルスベクターとしての使用を見出す。本発明の方法の実践のために有用なシンドビスウイルス由来ベクターの記載については、Dubenskyら, *J. Virol.* (1996) 70 : 508 - 519; および国際公開番号WO 95/07995およびWO 96/17072を参照のこと。

30

【0107】

他のベクターが使用され得、他のベクターとしては、シミアンウイルス40およびサイトメガロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。Salmonella spp.、Yersinia enterocolitica、Shigella spp.、Vibrio cholerae、MycobacteriumBCG株、およびListeria monocytogenesのような細菌ベクターが、使用され得る。MCおよびMC1のような小染色体(minichromosome)、バクテリオファージ、コスミド(ファージcos部位が挿入されているプラスミド)およびレプリコン(細胞内において、それ自身の制御の下で複製を可能にする遺伝エレメント)もまた、使用され得る。

40

【0108】

発現構築物もまた、粒子キャリアにカプセル化され得、吸着され、または結合され得る。このようなキャリアは、免疫系に対し選択された分子の多くのコピーを提示し、局部リンパ節における分子の捕捉および維持を促進する。粒子はマクロファージによって補食され得、そしてサイトカイン放出を通して抗原提示を増大し得る。粒子キャリアの例としては、ポリメチルメタクリレートポリマー由来の粒子キャリア、ならびにポリ(ラクチド)由来の微粒子およびポリ(ラクチド-コグリコリド)(PLGとして公知である)由来の

50

微粒子が挙げられる。例えば、Jefferyら, Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; およびMcGeeら, J. Microencap. (1996) を参照のこと。

【0109】

発現構築物を細胞に送達するために、広範な種々の他の方法が、使用され得る。このような方法としては、DEAEデキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリリジン媒介性トランスフェクションもしくはポリオルニチン媒介性トランスフェクション、または他の不溶性無機塩（例えば、リン酸ストロンチウム、ケイ酸アルミニウム（ベントナイトおよびカオリンが挙げられる）、酸化クロム、ケイ酸マグネシウム、滑石など）を使用した沈殿が挙げられる。他の有用なトランスフェクション方法としては、エレクトロポレーション、ソノボレーション、プロトプラス融合、リポソーム、ペプトイド送達、またはマイクロインジェクションが挙げられる。例えば、目的の細胞を形質転換させるための技術の考察については、Sambrookら（前出）を参照のこと；そして遺伝子移入に有用な送達系の総説については、Felgner, P. L., Advanced Drug Delivery Reviews (1990) 5: 163-187を参照のこと。エレクトロポレーションを使用したDNAの送達の特に効果的な方法が、国際公開番号WO/0045823に記載される。

【0110】

さらに、金およびタンゲステンのような粒子キャリアを使用する粒子銃（biolistic）送達系は、本発明の発現構築物を送達するために特に有用である。この粒子は、送達されるべき構築物で被膜され、「遺伝子銃」から発射される銃粉末を用いて、一般に減圧の雰囲気下で、高速まで加速される。このような技術およびこれらに有用な装置の記載については、例えば、米国特許第4,945,050号；同第5,036,006号；同第5,100,792号；同第5,179,022号；同第5,371,015号；および同第5,478,744号を参照のこと。

【0111】

（融合タンパク質または融合ポリヌクレオチドを含有する組成物）

本発明はまた、融合タンパク質またはポリヌクレオチドを含有する組成物を提供する。この組成物は、1つ以上の融合物を含有し得、本明細書中で記載のような、この融合物の1つは、変異NS3ドメインを含む。本発明の組成物はまた、薬学的に受容可能なキャリアを含有し得る。このキャリアは、それ自体が宿主に対して有害な抗体の産生を誘導すべきではない。薬学的に受容可能なキャリアは、当業者に周知である。このようなキャリアとしては、タンパク質、多糖類（例えば、ラテックス官能化セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズなど）、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、多量体アミノ酸（例えば、ポリグルタミン酸、ポリリジンなど）、アミノ酸コポリマー、および不活性型ウイルス粒子のような、大型のゆっくりと代謝される高分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0112】

薬学的に受容可能な塩もまた、本発明の組成物中で使用され得る。例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩または硫酸塩のような無機塩、および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、または安息香酸塩のような有機酸の塩である。特に有用なタンパク質基質は、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミン、破傷風毒素、および当業者に周知の他のタンパク質である。本発明の組成物はまた、単独または組み合わせで、水、生理食塩水、グリセロール、デキストロース、エタノールなどのような液体または賦形剤、および湿潤剤、乳化剤、またはpH緩衝化剤のような物質を含有する。本発明のタンパク質はまた、リポソームおよびPLGのような粒子キャリアに吸着し得るか、これに捕捉され得るか、またはさもなければこれに結合し得る。リポソームおよび他の特定のキャリアは、上述される。

【0113】

所望の場合、B7-1もしくはB7-2、またはサイトカイン、リンホカイン、および

10

20

30

40

50

ケモカインのような、リンパ球に対する免疫提示を改善する同時刺激性分子が、組成物中に含有され得る。このケモカインとしては、IL-2、改変IL-2(cys125からser125へ)、GM-CSF、IL-12、-インターフェロン、IP-10、MIP1、FLP-3、リバビリンおよびRANTESのようなサイトカインが挙げられるが、これらに限定されない。必要に応じて、アジュバントもまた、組成物中に含有され得る。使用され得るアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(1)水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなどのアルミニウム塩(ミョウバン)；(2)水中油乳剤処方物(ムラミルペプチド(下を参照)または細菌細胞壁成分のような他の特定の免疫刺激剤を含有するかまたは含有しない)〔例えば：(a)(必要に応じて種々の量のMTP-PEを含有する)5%スクアレン、0.5%Tween 80、および0.5%Span 85を含有するMF59(PCT公開番号WO 90/14837)(モデル110Yマイクロフルイタイザー(Microfluidics, Newton, MA)のようなマイクロフルイタイザーを用いてミクロン未満の粒子に処方される)(b)10%スクアレン、0.4%Tween 80、5%ブルロニックプロックポリマーL121およびthr-MDP(下記参照)含有のSAF(ミクロン未満の乳剤に微小流動されるか、またはボルテックスしてより大きな粒子サイズの乳剤が作製される)、ならびに(c)2%スクアレンと、0.2%Tween 80と、モノホスホリピドA(MPL)、トレハロースジミコレート(TDM)、および細胞壁骨格(CWS)からなる群由来の1つ以上の細菌細胞壁成分(好ましくは、MPL+CWS(DetoxTM))とを含むRibitTMアジュバント系(RAS)(Ribit Immunochem, Hamilton, MT)〕；(3)QS21またはStimulonTM(Cambridge Bioscience, Worcester, MA)のようなサポニンアジュバントが使用され得るか、またはこれから作製されるISCOM(免疫刺激融合体)のような粒子であって、このISCOMは、さらなる界面活性剤を有さなくてもよい(例えば、国際公開番号WO 00/07621を参照のこと)；(4)Freunds完全アジュバント(CFA)およびFreunds不完全アジュバント(IFCA)；(5)サイトカイン〔例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12などのインターロイキン(例えば、国際公開番号WO 99/44636を参照のこと)、インターフェロンのようなインターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)など〕；(6)コレラ毒素(CT)、百日咳毒素(PT)または大腸菌易熱性毒素(LT)のような細菌性ADPリボシリ化毒素の無毒化変異体、特にLT-K63(ここで、63位の野生型アミノ酸がリジンで置換されている)、LT-R72(ここで、72位の野生型アミノ酸がアルギニンで置換されている)、CT-S109(ここで、109位の野生型アミノ酸がセリンで置換されている)、およびPT-K9/G129(ここで、9位の野生型アミノ酸がリジンで、129位の野生型アミノ酸がグリシンで置換されている)(例えば、国際公開番号WO 93/13202およびWO 92/19265を参照のこと)；(7)必要に応じてミョウバンの実質的非存在下にあるモノホスホリルリピドA(MPL)または3-O-脱アシル化MPL(3dMPL)(例えば、GB2220221; EPA 0689454を参照のこと)、(例えば、国際公開番号WO 00/56358を参照のこと)；(8)3dMPLと、例えばQS21および/または水中油乳剤との組み合わせ(例えば、EPA 0835318; EPA 0735898; EPA 0761231を参照のこと)；(9)ポリエキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル(例えば、国際公開番号WO 99/52549を参照のこと)；(10)CpGオリゴヌクレオチドのような免疫刺激性オリゴヌクレオチド、またはサポニン+CpGオリゴヌクレオチドのような免疫刺激性オリゴヌクレオチド(例えば、国際公開番号WO 00/62800を参照のこと)；(11)免疫刺激剤および金属塩の粒子(例えば、国際公開番号WO 00/23105を参照のこと)；(12)サポニンおよび油中水乳剤(例えば、国際公開番号WO 99/11241を参照のこと)；(13)サポニン(例えば、QS21)+3dMPL+IL-12(必要に応じて+ステロール)(例えば、国際

10

20

30

40

50

公開番号 WO 98 / 57659 ; (14) MPL 誘導体 RC529 ; ならびに (15) 免疫刺激剤として作用し、組成物の有用性を高める他の基質。ミョウバンおよびMF59が、好ましい。

【0114】

上記のように、ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP) 、 -アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (CGP 11637 (nor-MDPと呼ばれる)) 、 N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン (CGP 19835A (MTP-PEと呼ばれる)) などが挙げられるが、これらに限定されない。
10

【0115】

さらに、上記融合タンパク質は、ISCOMに吸着され得るか、またはISCOM内に捕捉され得る。古典的ISCOMは、コレステロール、サポニン、ホスホリピド、および免疫原（例えば、ウイルスエンベロープタンパク質）の組み合わせによって形成される。一般的には、免疫原（通常は、疎水性領域を有する）は、界面活性剤中に可溶化され、そして反応混合物に添加され、それによって、ISCOMが、免疫原を中に組み込んで形成される。ISCOMマトリックス組成物は、同様に形成されるが、ウイルスタンパク質を含まない。高い正電荷を有するタンパク質は、このISCOM粒子中に、疎水性の力を介してではなく、静電的に結合され得る。サポニンおよびISCOM、ならびにISCOMを処方するための方法のより詳細な一般的な考察について、Barra (1998) Ad v. Drug Delivery Reviews 32: 247~271 (1998) を参照のこと。
20

【0116】

本発明とともに使用するためのISCOMは、当該分野で周知の標準技術を使用して生成され、そして例えば、米国特許第4,981,684号、同第5,178,860号、同第5,679,354号および同第6,027,732号；欧州特許出願公開番号EPA 109,942；同180,564および同231,039；Coulterら (1998) Vaccine 16: 1243に記載される。代表的には、用語「ISCOM」とは、グリコシド（例えば、トリテルペノイドサポニン（特にQuill A））と、疎水性領域を含む抗原との間に形成される、免疫原性複合体を指す。例えば、欧州特許出願公開番号EPA 109,942および同180,564を参照のこと。この実施形態において、HCV融合物（通常は、疎水性領域との融合物）は、界面活性剤中に可溶化され、反応混合物に添加され、それにより、ISCOMが、上記融合物を中に組み込んで形成される。HCVポリペプチドISCOMは、両親媒性特性を示すHCVポリペプチドを用いて容易に生成される。しかし、望ましい疎水性特性を欠く、タンパク質およびペプチドが、疎水性アミノ酸、脂肪酸ラジカル、アルキルラジカルなどを有するペプチドと結合した後に、免疫原性複合体中に組み込まれ得る。
30

【0117】

欧州特許出願公開番号EPA 231,039に説明されるように、抗原の存在は、基本的ISCOM構造（マトリックスまたはISCOMATRIXと呼ばれる）を形成するためには必要ではない。この構造は、ステロール（例えば、コレステロール）、ホスホリピド（例えば、ホスファチジルエタノールアミン）、およびグリコシド（例えば、Quill A）から形成され得る。従って、目的とするHCV融合物は、マトリックス中に組み込まれるのではなく、マトリックスの外側に存在し、例えば、静電的相互作用を介してマトリックスに吸着される。例えば、高い正電荷を有するHCV融合物は、疎水性の力を介するのではなく、ISCOM粒子に静電的に結合され得る。サポニンおよびISCOM、およびISCOMを処方する方法のより詳細な一般的な考察について、Barra (1998) Ad v. Drug Delivery Reviews 32: 247~271 (1998) を参照のこと。
40
50

【0118】

ISCOMマトリックスは、例えば、可溶性ステロールと、グリコシドと、(必要に応じて)ホスホリピドとを、一緒に混合することによって、調製され得る。ホスホリピドが使用されない場合、2次元構造が形成される。例えば、欧州特許出願公開番号EPA231,039を参照のこと。用語「ISCOMマトリックス」とは、3次元構造および2次元構造の両方を指すために使用される。使用されるべきグリコシドは、一般的には、両親媒性特性を示しあつその分子中に疎水性領域および親水性領域を含む、グリコシドである。好ましくは、サポアルビン(sapoalbin)(例えば、Quillaja saponariaからのサポニン抽出物(MoliniaおよびQuillA))が、使用される。他の好ましいサポニンは、Aesculus hippocastanum由来のエスチン(aescine)(Pattら(1960)Arzneimittelforschung 10:273~275)、およびGypsophilla struthium由来のサポニン(Vochtenら(1968)J.Pharm.Belg.42:213~226)である。

【0119】

ISCOMを調製するために、グリコシドが、少なくとも臨界ミセル形成濃度において使用される。QuillAの場合、この濃度は、約0.03重量%である。ISCOMを生成するために使用されるステロールは、動物起源または植物起源の公知のステロール(例えば、コレステロール、ラノステロール、ルミステロール、ステイグマステロール、およびシトステロール)であり得る。適切なホスホリピドとしては、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンが挙げられる。一般に、グリコシド(特に、QuillAである場合)とステロール(特に、コレステロールである場合)とホスホリピドのモル比は、1:1:0~1であり、各数字について±20%(好ましくは±10%以下)である。これは、QuillA:コレステロールについての重量比約5:1に等しい。

【0120】

可溶化剤もまた、存在し得、それは、例えば、界面活性剤であっても、尿素であっても、グアニジンであってもよい。一般に、非イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤、または双性イオン性界面活性剤、またはコール酸ベースの界面活性剤(例えば、デゾキシコール酸ナトリウム、コール酸塩、およびCTAB(セチルトリアンモニウムプロミド))が、この目的のために使用され得る。適切な界面活性剤の例としては、オクチルグルコシド、ノニルN-メチルグルカミド、またはデカノイルN-メチルグルカミド、アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル(例えば、9~10個のオキシエチレン基を有するポリエチングリコールp-イソオクチル-フェニルエーテル(商標名TRITON X-100RTMの下で販売される)アシルポリオキシエチレンエステル(例えば、アシルポリオキシエチレンソルビタンエステル(商標名TWEEN 20TM、TWEEN 80TMなどの下で販売される))が挙げられるが、これらに限定されない。可溶化剤は、一般的には、例えば、限外濾過、透析、超遠心分離またはクロマトグラフィーによって、ISCOMの形成のために除去されるが、特定の方法においては、この工程は不要である(例えば、米国特許第4,981,684号を参照のこと)。

【0121】

一般的には、グリコシド(例えば、QuillA)とHCV融合物との重量比は、5:1から0.5:1の範囲にある。好ましくは、この重量比は、約3:1から1:1であり、より好ましくは、この比は、2:1である。

【0122】

一旦ISCOMが形成されると、そのISCOMは、本明細書中に記載されるように、組成物へと処方され得、動物に投与され得る。望ましい場合、得られる免疫原性複合体の溶液は、凍結乾燥され得、その後、使用前に再構成され得る。

【0123】

(HCV特異的抗体を生成する方法)

HCV融合タンパク質が、HCV特異的ポリクローナル抗体およびHCV特異的モノク

10

20

30

40

50

ローナル抗体を生成するために使用され得る。HCV特異的ポリクローナル抗体およびHCV特異的モノクローナル抗体は、HCV抗原に特異的に結合する。ポリクローナル抗体は、哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、またはウマ）にこの融合タンパク質を投与することによって、生成され得る。免疫された動物由来の血清が収集され、それらの抗体は、例えば、硫酸アンモニウムを用いる沈殿、その後のクロマトグラフィー（好ましくは、アフィニティクロマトグラフィー）によって、血漿から精製される。ポリクローナル抗血清を生成および処理するための技術は、当該分野で公知である。

【0124】

その融合タンパク質中に存在するHCV特異的エピトープに対するモノクローナル抗体もまた、容易に生成され得る。HCV融合タンパク質で免疫された哺乳動物（例えば、マウス）由来の正常B細胞が、例えば、HAT感受性マウス骨髄腫細胞と融合されて、ハイブリドーマが生成され得る。HCV特異的抗体を生成するハイブリドーマは、RIAまたはELISAを使用して同定され得、そして半固体寒天におけるクローニングによって、または限界希釀によって、単離され得る。HCV特異的抗体を生成するクローンは、もう1回のスクリーニングによって、単離される。

【0125】

HCVエピトープに対する抗体（モノクローナルおよびポリクローナルのいずれか）は、サンプル中のHCVまたはHCV抗原（例えば、HCVに感染したヒト由来の血清サンプル）の存在を検出するために、特に有用である。HCV抗原についてのイムノアッセイは、1つの抗体またはいくつかの抗体を利用し得る。HCV抗原についてのイムノアッセイは、例えば、HCVエピトープに対するモノクローナル抗体、1つのHCVポリペプチドの複数のエピトープに対するモノクローナル抗体の組み合わせ、種々のHCVポリペプチドの複数のエピトープに対するモノクローナル抗体、同一のHCV抗原に対するポリクローナル抗体、種々のHCV抗原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とポリクローナル抗体との組み合わせを使用し得る。イムノアッセイプロトコルは、例えば、標識抗体を使用する、例えば、競合アッセイ、直接反応アッセイ、またはサンドイッチ型アッセイに基づき得る。その標識は、例えば、蛍光標識、化学発光標識、または放射活性標識であり得る。

【0126】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、免疫アフィニティカラムによって、HCV粒子またはHCV抗原を単離するためにさらに使用され得る。この抗体は、例えば、吸着によって、または共有結合によって、固体支持体に固定され得、その結果、その抗体は、その免疫選択性を保持する。必要に応じて、スペーサー基が含まれ得、その結果、その抗体の抗原結合部位は、接近可能なままである。その後、固定された抗体が、生物学的サンプル（例えば、血液または血漿）由来のHCV粒子またはHCV抗原に結合するために使用され得る。結合したHCV粒子または結合したHCV抗原は、例えば、pHの変化によって、カラムマトリックスから回収される。

【0127】

（HCV特異的T細胞）

インビボまたはインビトロで発現される、上記の融合物（（コアポリペプチドを含むかまたは含まない）NS3^{*} NS4 NS5a融合タンパク質またはNS3^{*} NS4 NS5a NS5b融合タンパク質、ならびに本明細書中に記載される他の種々の融合物を含む）によって活性化されるHCV特異的T細胞は、HCVポリペプチド（例えば、NS2ポリペプチド、p7ポリペプチド、E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、NS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、またはNS5bポリペプチド）のエピトープ（これらのペプチドのうちの1つ以上と、NS3^{*}との（コアポリペプチドを含むかまたは含まない）融合物のエピトープを含む）を認識する。HCV特異的T細胞は、CD8⁺またはCD4⁺であり得る。

【0128】

HCV特異的CD8⁺T細胞は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）であり得、これは、

10

20

30

40

50

MHCクラスI分子と複合体形成したこれらのエピトープのうちのいずれかを提示するHCV感染細胞を死滅させ得る。HCV特異的CD8⁺T細胞は、例えば、⁵¹Cr放出アッセイ(実施例4を参照のこと)によって検出され得る。⁵¹Cr放出アッセイは、HCV特異的CD8⁺T細胞が、これらのエピトープのうちの1つ以上を提示する標的細胞を溶解する能力を測定する。抗ウイルス剤(例えば、IFN-)を発現するHCV特異的CD8⁺T細胞もまた、本明細書中で企図され、これはまた、免疫学的方法によって、好ましくは、上記HCVポリペプチド(例えば、NS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、またはNS5bポリペプチドであるが、これらに限定されない)のうちの1つ以上でのインビトロ刺激の後、IFN-または同様のサイトカインについての細胞内染色によって、検出され得る(実施例5を参照のこと)。

10

【0129】

インビボまたはインビトロで発現される、上記の融合物((コアポリペプチドを含むかまたは含まない)NS3*NS4NS5a融合タンパク質またはNS3*NS4NS5aN5b融合タンパク質であるが、これらに限定されない)によって活性化されるHCV特異的CD4⁺細胞は、好ましくは、HCV感染細胞上のMHCクラスII分子に結合したHCVポリペプチド(例えば、NS2ポリペプチド、p7ポリペプチド、E1ポリペプチド、E2ポリペプチド、NS3ポリペプチド、NS4ポリペプチド、NS5aポリペプチド、またはNS5bポリペプチドであるが、これらに限定されない)のエピトープ(その融合物(例えば、NS3NS4NS5a融合タンパク質またはNS3NS4NS5aN5b融合タンパク質であるが、これらに限定されない)のエピトープを含む)を認識し、このHCVポリペプチドのエピトープは、HCV感染細胞上のMHCクラスII分子に結合され、そして例えば、コアポリペプチドを用いてかまたは用いずに、NS3*NS4NS5aペプチドまたはNS3*NS4NS5aN5bペプチドを刺激することに応じて増殖する。

20

【0130】

HCV特異的CD4⁺T細胞は、リンパ増殖アッセイによって検出され得る(実施例6を参照のこと)。リンパ増殖アッセイは、HCV特異的CD4⁺T細胞が、例えば、NS2エピトープ、p7エピトープ、E1エピトープ、E2エピトープ、NS3エピトープ、NS4エピトープ、NS5aエピトープ、および/またはNS5bエピトープに応じて増殖する能力を測定する。

30

【0131】

(HCV特異的T細胞を活性化する方法)

HCV融合タンパク質またはポリヌクレオチドは、インビトロまたはインビボのいずれかでHCV特異的T細胞を活性化するために使用され得る。HCV特異的T細胞の活性化は、特に、HCVに対するCTL応答を最適にするモデルシステムを提供するため、そしてHCV感染に対する予防処置または治療処置を提供するために、使用され得る。インビトロ活性化について、タンパク質は、上記のように、プラスミドまたはウイルスベクター(例えば、アデノウイルスベクター)を介して、好ましくはT細胞に供給される。

【0132】

T細胞のポリクローナル集団は、HCVに感染している哺乳動物の、血液から誘導され得、好ましくは、末梢リンパ器官(例えば、リンパ節)、脾臓、または胸腺から誘導され得る。好ましい哺乳動物としては、マウス、チンパンジー、ヒヒ、およびヒトが挙げられる。HCVは、哺乳動物中の活性化したHCV特異的T細胞の数を拡大するように作用する。その後、哺乳動物由来のHCV特異的T細胞は、本明細書中に記載されるHCV融合タンパク質(例えば、コアポリペプチドを含むかまたは含まない、HCV NS3NS4NS5aエピトープペプチドまたはHCV NS3NS4NS5aN5bエピトープペプチドであるが、これらに限定されない)を、T細胞に添加することによって、インビトロで再刺激され得る。その後、HCV特異的T細胞は、特に、増殖、IFN-の生成、および例えば、NS3NS4NS5aエピトープまたはNS3NS4NS5aN5bエピトープを提示する標的細胞を溶解する能力について、インビトロで試験され得る。

40

50

【0133】

リンパ増殖アッセイ（実施例6を参照のこと）において、HCV活性化CD4⁺T細胞は、HCVポリペプチド（例えば、NS3エピトープペプチド、NS4エピトープペプチド、NS5aエピトープペプチド、NS5bエピトープペプチド、NS3NS4NS5aエピトープペプチド、またはNS3NS4NS5aNS5bエピトープペプチドであるが、これらに限定されない）とともに培養された場合に増殖するが、エピトープペプチドの非存在下では増殖しない。従って、HCV特異的CD4⁺T細胞によって認識される特定のHCVエピトープ（例えば、NS2、p7、E1、E2、NS3、NS4、NS5a、NS5b、およびこれらのエピトープの融合物（例えば、NS3NS4NS5aエピトープまたはNS3NS4NS5aNS5bエピトープ）は、リンパ増殖アッセイを使用して同定され得る。10

【0134】

同様に、上記の融合タンパク質を用いるインビトロ刺激の後にHCV特異的CD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞におけるIFN- γ を検出することは、例えば、IFN- γ を生成するようにCD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞を刺激する際に特に有用である、融合タンパク質エピトープ（例えば、NS2、p7、E1、E2、NS3、NS4、NS5a、NS5b、およびこれらのエピトープの融合物（例えば、NS3NS4NS5aエピトープまたはNS3NS4NS5aNS5bエピトープであるが、これらに限定されない））を同定するために使用され得る。

【0135】

さらに、⁵¹Cr放出アッセイは、HCVに対するCTL応答のレベルを決定するため有用である。Cooperら、Immunity 10:439~449を参考のこと。例えば、HCV特異的CD8⁺T細胞が、HCVに感染した哺乳動物の肝臓から誘導され得る。これらのT細胞は、例えば、NS3NS4NS5aエピトープまたはNS3NS4NS5aNS5bエピトープを提示する標的細胞に対する⁵¹Cr放出アッセイにおいて、試験され得る。異なるNS3NS4NS5aエピトープまたはNS3NS4NS5aNS5bエピトープを発現するいくつかの標的細胞集団は、各標的細胞集団が、異なるエピトープNS3NS4NS5aまたはNS3NS4NS5aNS5bを提示するように、構築され得る。HCV特異的CD8⁺細胞は、これらの標的細胞集団の各々に対してアッセイされ得る。⁵¹Cr放出アッセイの結果は、NS3NS4NS5aまたはNS3NS4NS5aNS5bのうちのどちらが、HCVに対する最も強力なCTL応答を担うかを決定するために使用され得る。その後、最も強力なCTL応答を担うエピトープを含む、NS3^{*}NS4NS5a融合タンパク質またはNS3^{*}NS4NS5aNS5b融合タンパク質（コアポリペプチドを含むかまたは含まない）が、⁵¹Cr放出アッセイから誘導された情報を使用して、構築され得る。30

【0136】

上記のようなHCV融合タンパク質、またはそのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、HCV特異的T細胞をインビボで活性化するために、哺乳動物（例えば、マウス、ヒビ、チンパンジー、またはヒト）に投与され得る。投与は、上記のように、当該分野で公知の任意の手段（非経口投与、経鼻投与、筋肉内投与または皮下注射（生物学的微粒子銃（「遺伝子銃」）を使用する注入を含む）を含む）によってであり得る。40

【0137】

好ましくは、HCVポリヌクレオチドの注射は、T細胞を活性化するために使用される。構築および改変を簡単にすることによる実用的利点に加えて、このポリヌクレオチドの注射は、宿主における融合タンパク質の合成を生じる。従って、これらの免疫原は、天然の翻訳後修飾、構造、および立体構造を有する宿主免疫系に提示される。このポリペプチドは、好ましくは、大きな哺乳動物（例えば、ヒト）に、1kg当たり、0.5mg、0.75mg、1.0mg、1.5mg、2.0mg、2.5mg、5mgまたは10mgの用量で、筋肉内注射される。

【0138】

10

20

30

40

50

H C V 融合タンパク質またはポリヌクレオチドを含む本発明の組成物は、使用される特定の組成物と適合する様式で、かつ、とりわけ、⁵¹Cr遊離アッセイ、リンパ球増殖アッセイによって測定されるかまたはIFN- γ についての細胞内染色によって測定される場合に、活性なH C V特異的T細胞に対して有効な量で投与される。タンパク質および/またはポリヌクレオチドは、H C Vに感染していない哺乳動物にかH C V感染哺乳動物のいずれかに投与され得る。組成物中のポリヌクレオチドまたは融合タンパク質の特定の用量は、投与される哺乳動物の種、年齢、および全体的な状態、ならびに組成物の投与様式を含むがこれらに限定されない多くの要因に依存する。本発明の組成物の有効量は、慣用的な実験のみを用いて容易に決定され得る。上記のインビトロおよびインビボモデルが、適切な用量を同定するのに用いられ得る。以下に記載の実施例において使用されるポリヌクレオチドの量は、インビボまたはインビトロのいずれかにおいてH C V特異的T細胞の活性化を最適化するのに使用され得る全般的な手引きを提供する。概して、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5、5、または10mgのH C V融合タンパク質またはポリヌクレオチド（コアポリペプチドを含む場合も含まない場合もある）が、ヒヒ、チンパンジー、またはヒトのような大きな動物に投与される。所望の場合、同時刺激分子またはアジュvantがまた、組成物の前、後、または同時に提供され得る。

【0139】

本発明の組成物の送達により生成される哺乳動物の免疫応答（H C V特異的T細胞の活性化を含む）は、用量、投与経路、またはブーストレジメン（boosting regimen）を変更することにより増強され得る。本発明の組成物は、単回用量スケジュール、または好ましくは多回用量スケジュールで与えられ得る。多回用量スケジュールにおいて、初回ワクチン接種は、1~10の別々の用量を含み、他の用量が、免疫応答を維持および/または強化するのに必要とされるその後の時間間隔（例えば、第2用量については1~4月）で与えられ、および必要な場合、数ヶ月後にその後の用量が与えられる。

【実施例】

【0140】

（I I I . 実験）

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の実施例である。この実施例は、例示目的のみのために提供され、いかなる方法においても本発明の範囲を限定することを意図するものではない。当業者は、ひとたび本開示の教示が与えられれば、本発明が種々の方法で実施され得ることを容易に理解する。

【0141】

使用される数値（例えば、量、温度等）に関して、正確さを確保する努力をしているが、ある程度の実験誤差および偏差は、当然、許容されるべきである。

【0142】

（実施例1：NS3^{*}NS4NS5aコアポリヌクレオチドの生成）

以下の実施例において、NS3^{*}は、改変されたNS3分子を表す。NS3NS4NS5a（H C V-1に対する番号でいうと、アミノ酸約1027~2399）（本明細書中では、NS345aとも言う）をコードするポリヌクレオチドを、H C Vから単離する。この分子のNS3部分を、プロテアーゼ活性部位で見出されるHis、Asp、およびSer残基についてのコード配列を変異させることにより変異誘発する。その結果、得られた分子は、これらの部分ではHis、Asp、およびSer以外のアミノ酸をコードし、NS3プロテアーゼ活性を欠く。この構築物を、全長ポリペプチドのアミノ酸1~122を含むコアポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと融合する。コアをコードするポリヌクレオチド配列を、この構築物のNS5aコード部分から下流に融合し、その結果、得られた融合タンパク質は、そのC末端にコアポリペプチドを含む。この構築物を、プラスミド、ワクシニアウイルス、およびアデノウイルスベクター中にクローニングする。さらに、この構築物を、組み換え発現ベクター中に挿入し、NS3^{*}NS4NS5aコア融合タンパク質を産生する宿主細胞を形質転換するのに使用する。

【0143】

10

20

30

40

50

プロテアーゼ酵素活性は、以下のようにして決定する。N S 4 Aペプチド (K K G S V V I V G R I V L S G K P A I I P K K) (配列番号8) およびその融合タンパク質を、90 μlの反応緩衝液 (25 mM Tris、pH 7.5、0.15 M NaCl、0.5 mM EDTA、10% グリセロール、0.05 n-DデシルB-D-マルトシド、5 mM DTT) 中に希釈し、室温で30分間混合する。この混合物90 μlをマイクロタイタープレート (Costar Inc., Corning, NY) に添加し、HCV基質10 μl (Anaspec, Inc., San Jose CA) を添加する。このプレートを混合し、Fluostarプレートリーダーで読み取る。結果を、1分当たりの相対蛍光単位 (RFU) で表す。

【0144】

10

(実施例2：ワクチン接種動物におけるHCV特異的CTLのプライミング)

上記のようにして生成したHCV融合タンパク質NS3*NS4NS5aコアを以下のように使用して、HCV融合体-ISCOMを生成する。この融合体-ISCOM処方物は、融合タンパク質と、予め形成したISCOMATRIX(空のISCOM)をイオン性相互作用を利用して混合し、抗原とアジュバントとの間の会合を最大にすることにより調製する。ISCOMATRIXは、本質的に、Coulter et al. (1998) Vaccine 16: 1243に記載されるようにして調製する。

【0145】

20

アカゲザル (Rhesus macaques) を、麻酔下で免疫する。動物を、2つのグループに分割する。第1グループに、 2×10^8 プラーカ形成単位 (pfu) (経皮的に 1×10^8 、乱切 (scarification) によって 1×10^8) のrVVCE1を感染させる(第0月)。このグループを、CTLプライミングについてのポジティブコントロールとして利用する。第2グループの動物を、上述のような、ISCOMに吸着させた25~100 μgのHCV融合ポリペプチドを用いて、左大腿四頭筋における筋内 (IM) 注射によって免疫する(第0、1、2、および6月)。細胞障害活性を、Paliard et al. (2000) AIDS Res. Hum. Retroviruses 16: 273に記載されるような、標準的な⁵¹Cr遊離アッセイにおいてアッセイする。

【0146】

30

(実施例3：NS3*NS4NS5aコアポリヌクレオチドによる免疫)

1つの免疫プロトコルにおいて、動物を、NS3*NS4NS5aコア融合タンパク質をコードするプラスミドDNA 50~250 μgを用いて、前脛骨筋への筋内注射により免疫する。ワクシニアウイルス(VV)-NS5a 10⁷ pfu(腹腔内)またはプラスミドコントロール50~250 μg(筋内)のブースター注射を、6週間に提供する。

【0147】

40

別の免疫プロトコルにおいて、動物の前脛骨筋に、NS3*NS4NS5aコア融合タンパク質をコードするアデノウイルス粒子10¹⁰を、筋内注射する。VV-NS5a 10⁷ pfuの腹腔内ブースター注射またはNS3*NS4NS5aコアをコードするアデノウイルス10¹⁰の筋内ブースター注射を、6週間に提供する。

【0148】

50

(実施例4：HCV特異的CD8+T細胞の活性化)

(⁵¹Cr遊離アッセイ)⁵¹Cr遊離アッセイを用いて、NS5aエピトープを提示する標的細胞を溶解するHCV特異的T細胞の能力を測定する。脾臓細胞を、免疫した動物からプールする。これらの細胞を、IL-2の存在下で、HCV NS5a由来のCTLエピトープペプチド p214K9 (2152-H E Y P V G S Q L - 2160; 配列番号1) を用いて、6日間インビトロで再刺激する。次いで、この脾臓細胞を、Weiss (1980) J. Biol. Chem. 255: 9912-9917に記載のように、標準的な⁵¹Cr遊離アッセイにおいて、クラスI MHC分子を発現するがクラスII MHC分子を発現しないペプチド感作標的細胞 (L929) に対する細胞障害活性につい

てアッセイする。60:1、20:1、および7:1のエフェクター（T細胞）対標的（B細胞）の比を試験する。パーセント特異的溶解を、各エフェクター対標的の比について算出する。

【0149】

（実施例5：IFN- γ を発現するHCV特異的CD8+T細胞の活性化）

（インターフェロン（IFN- γ ）に対する細胞内染色）IFN- γ の細胞内染色を用いて、NS5aエピトープp214K9によるインビトロ刺激後にIFN- γ を分泌するCD8+T細胞を同定する。個々の免疫した動物の脾臓細胞を、IL-2およびモネンシンの存在下で、p214K9または非特異的ペプチドのいずれかを用いて、6~12時間、インビトロで再刺激する。次いで、この細胞を、表面CD8および細胞内IFN- γ について染色し、フローサイトメトリにより分析する。次いで、IFN- γ について陽性でもあるCD8+T細胞のパーセントを算出する。

【0150】

（実施例6：HCV特異的CD4+T細胞の増殖）

（リンパ球増殖アッセイ）プールした免疫動物からの脾臓細胞を、磁気ビーズを用いてCD8+T細胞を枯渇させ、p222D、HCV-NS5a由来のNS5a-エピトープペプチド（2224-AELIEANLLWRQEMG-2238；配列番号2）、または培地のみのいずれかと共に培養する（三連）。72時間後、細胞を、1μl Ci/ウェルの³H-チミジンでパルスし、6~8時間後に収集する。放射活性の取り込みを、収集後に測定する。平均cpmを算出する。

【0151】

（実施例7：NS3*45aコアコードDNAワクチン処方物のCTLプライム能力）

動物を、実施例3に記載されるようなNS3*45aコア融合タンパク質をコードするプラスミドDNA 10~250μg、NS3*45aコアをコードするPLG連結DNA（以下を参照のこと）、またはNS3*45aコアをコードするDNAのいずれかを用いて、エレクトロポレーションを通じて送達することによって免疫する（この送達技術については、例えば、国際公報番号WO/0045823を参照のこと）。この免疫に続いて、NS3*45aコアをコードするプラスミドDNAの6週後にブースター注射を行う。

【0152】

（PLGにより送達されるDNA）ポリラクチド-co-グリコリド（PLG）ポリマーを、Boehringer Ingelheim, U.S.A.から入手する。PLGポリマーは、50/50のコポリマー比および65kDaの分子量を有するRG505である（製造元データ）。DNAの吸着したカチオン性微粒子を、本質的に、Singhet al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97: 811-816に記載されるような、改良した溶媒蒸発プロセスを用いて調製する。簡単に言うと、微粒子を、塩化メチレン中5%w/vポリマー溶液10mlと、1mlのPBSとを、IKAホモゲナイザーを用いて高速で乳化することにより調製する。次いで、このプライマリーエマルジョンを、セチルトリメチルアンモニウムプロミド（CTAB）を含有する（0.5%w/v）蒸留水50mlに添加する。これにより、w/o/wエマルジョンの処方物が得られ、これを、室温にて12時間、6000rpmで攪拌して、塩化メチレンを蒸発させる。得られた微粒子を、10,000gで遠心分離することによって、蒸留水で2度洗浄し、そして凍結乾燥する。調製、洗浄、および回収後、100mgのカチオン性微粒子を、1mg/mlのDNA溶液中、4~6時間、インキュベートすることによって、DNAを微粒子に吸着させる。次いで、微粒子を、遠心分離によって分離し、ペレットをTE緩衝液で洗浄し、そしてこの微粒子を凍結乾燥する。

【0153】

CTL活性およびIFN- γ 発現を、上記実施例において記載されたような⁵Cr遊離アッセイまたは細胞内染色によって測定する。

【0154】

10

20

30

40

50

(実施例 8 : 免疫経路および NS 3 * 45a コアをコードするレプリコン粒子 SINC R (DC+))

アルファウイルスレプリコン粒子(例えば、SINC R (DC+))を、Polo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 4598 - 4603に記載されるように調製する。動物に、NS 3 * 45a コアをコードする SINC R (DC+) レプリコン粒子 5×10^6 IUを、実施例 3 に記載されるように筋内(IM)注射するか、もしくは尾の基部(BoT)および足パッド(FP)において皮下(S/C)注射するか、または2/3のDNAをIM投与を通じて送達し、1/3のDNAをBoT経路を通じて送達する組み合わせを用いる。この免疫に続いて、実施例 3 に記載されるように、NS 5aをコードするワクシニアウイルスをブースター注射する。IFN- の発現を、実施例 5 に記載されるように、細胞内染色によって測定する。
10

【0155】

(実施例 9 : アルファウイルスレプリコンのプライミング、その後の種々のブーストレーション)

アルファウイルスレプリコン粒子(例えば、SINC R (DC+))を、Polo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 4598 - 4603に記載されるように調製する。動物を、SINC R (DC+)、NS 3 45a コアをコードするレプリコン粒子 1.5×10^6 IUを、前脛骨筋に筋内注射することによってプライムし、その後、NS 5aをコードするプラスミドDNA $10 \sim 100 \mu g$ 、NS 3 * 45a コアをコードする 10^{10} のアデノウイルス粒子、NS 3 * 45a コアをコードする SINC R (DC+) レプリコン粒子 1.5×10^6 IU、または NS 5aをコードするワクシニアウイルス 10^7 pfuのいずれかのブースターを第6週に用いる。IFN- の発現を、実施例 5 に記載されるように、細胞内染色によって測定する。
20

【0156】

(実施例 10 : NS 3 * 45a コアを発現するアルファウイルス)

アルファウイルスレプリコン粒子(例えば、SINC R (DC+) および SINC R (LP))を、Polo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96: 4598 - 4603に記載されるように調製する。動物を、NS 3 * 45a コアをコードする SINC R (DC+) レプリコン $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ IUを用いて、送達経路の組み合わせ(2/3をIMで、1/3をS/Cで)を通じて、およびS/C単独によって免疫するか、またはNS 3 * 45a コアをコードする SINC R (LP) レプリコン $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ IUを用いて、送達経路の組み合わせ(2/3をIMで、1/3をS/Cで)を通じて、およびS/C単独によって免疫する。この免疫に続いて、NS 5aをコードするワクシニアウイルス 10^7 pfuのブースター注射を行なう。IFN- の発現を、実施例 5 に記載されるように、細胞内染色によって測定する。
30

【0157】

このように、細胞媒介免疫応答を刺激するためのHCV融合ポリペプチドを開示する。本発明の好ましい実施形態がある程度詳細に記載されているが、本明細書中で定義される本発明の意図および範囲から逸脱することなく、明らかな変更がなされることが理解される。
40

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図 1】図 1 は、HCVゲノムのダイアグラム表示であり、HCVポリタンパク質の種々の領域を示す。

【図 2】図 2 は、代表的な天然の改変していない NS 3 プロテアーゼドメインのDNAおよび対応するアミノ酸配列(配列番号 3 ~ 4)を示す。

【図 3】図 3 は、NS 3 プロテアーゼドメインが N 末端から欠失されかつ C 末端上にコアのアミノ酸 1 ~ 121 を含む、代表的な改変した融合タンパク質のDNAおよび対応するアミノ酸配列(配列番号 5 ~ 6)を示す。
50

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chiron Corporation
<120> HCV FUSION PROTEINS WITH MODIFIED NS3 DOMAINS
<130> PP19545.004 (2300-19545.40)

<150> 60/394,510
<151> 2002-07-08

<150> 60/393,694
<151> 2002-07-02

<150> 09/721,479
<151> 2000-11-22

<150> 60/167,502
<151> 1999-11-24

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitope recognized by a Tcell receptor

<400> 1

His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu
1 5

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> epitope recognized by a Tcell receptor

<400> 2

Ala Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly
1 5 10 15

<210> 3
<211> 546
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DNA sequence of a representative native, unmodified NS3 protease domain

10

20

30

40

<400> 3

atg gcg ccc atc acg gcg tac gcc cag cag aca agg ggc ctc cta ggg Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly	48	
1 5 10 15		
tgc ata atc acc agc cta act ggc cgg gac aaa aac caa gtg gag ggt Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly	96	
20 25 30		
gag gtc cag att gtg tca act got gcc caa acc ttc ctg gca acg tgc Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys	144	
35 40 45		
atc aat ggg gtg tgc tgg act gtc tac cac ggg gcc gga acg agg acc Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr	192	10
50 55 60		
atc gcg tca ccc aag ggt cct gtc atc cag atg tat acc aat gta gac Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp	240	
65 70 75 80		
caa gac ctt gtg ggc tgg ccc gct ccg caa ggt agc cga tca ttg aca Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr	288	
85 90 95		
ccc tgc act tgc ggc tcc tcg gac ctt tac ctg gtc acg agg cac gcc Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala	336	
100 105 110		
gat gtc att ccc gtg cgc cgg cgg ggt gat agc agg ggc agc ctg ctg Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu	384	20
115 120 125		
tcg ccc cgg ccc att tcc tac ttg aaa ggc tcc tcg ggg ggt cog ctg Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu	432	
130 135 140		
ttg tgc ccc gcg ggg cac gcc gtg ggc ata ttt agg gcc gcg gtg tgc Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys	480	
145 150 155 160		
acc cgt gga gtg gct aag gcg gtg gac ttt atc cct gtc gag aac cta Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu	528	
165 170 175		
gag aca acc atg agg tcc Glu Thr Thr Met Arg Ser	546	30
180		

<210> 4

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequence of a representative native unmodified NS3 protease domain

<400> 4

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
 20 25 30

Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
 35 40 45

Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
 50 55 60

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
 65 70 75 80

10

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr
 85 90 95

Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
 100 105 110

Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125

Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140

Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160

20

Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu
 165 170 175

Glu Thr Thr Met Arg Ser
 180

<210> 5

<211> 5676

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> DNA sequence of a representative modified fusion protein, with
 the NS3 protease domain deleted from the N-terminus and including
 amino acids 1-121 of Core on the C-terminus

30

<400> 5

atg gct gca tat gca gct cag ggc tat aag gtg cta gta ctc aac ccc 48
 Met Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro
 1 5 10 15

tct gtt gct gca aca ctg ggc ttt ggt gct tac atg tcc aag gct cat 96
 Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His
 20 25 30

ggg atc gat cct aac atc agg acc ggg gtg aga aca att acc act ggc 144
 Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Gly

40

35	40	45	
agc ccc atc acg tac tcc acc tac ggc aag ttc ctt gcc gac ggc ggg Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly	50	55	192
50	60		
tgc tcg ggg ggc gct tat gac ata ata att tgt gac gag tgc cac tcc Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser	65	70	240
65	75	80	
acg gat gcc aca tcc atc ttg ggc att ggc act gtc ctt gac caa gca Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala	85	90	288
85	95		
gag act gcg ggg gcg aga ctg gtt gtc ctc gcc acc gcc acc cct ccg Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro	100	105	336
100	110		
ggc tcc gtc act gtg ccc cat ccc aac atc gag gag gtt gct ctg tcc Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser	115	120	384
115	125		
acc acc gga gag atc cct ttt tac ggc aag gct atc ccc ctc gaa gta Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val	130	135	432
130	140		
atc aag ggg ggg aga cat ctc atc ttc tgt cat tca aag aag aag tgc Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys	145	150	480
145	155	160	
gac gaa ctc gcc gca aag ctg gtc gca ttg ggc atc aat gcc gtg gcc Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala	165	170	528
165	175		
tac tac cgc ggt ctt gac gtg tcc gtc atc ccg acc agc ggc gat gtt Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val	180	185	576
180	190		
gtc gtc gtg gca acc gat gcc ctc atg acc ggc tat acc ggc gac ttc Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe	195	200	624
195	205		
gac tcg gtg ata gac tgc aat acg tgt gtc acc cag aca gtc gat ttc Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe	210	215	672
210	220		
agc ctt gac cct acc ttc acc att gag aca atc acg ctc ccc caa gat Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp	225	230	720
225	235	240	
gct gtc tcc cgc actcaa cgt cgg ggc agg act ggc agg ggg aag cca Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro	245	250	768
245	255		
ggc atc tac aga ttt gtg gca ccg ggg gag cgc ccc tcc ggc atg ttc Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe	260	265	816
260	270		
gac tcg tcc gtc ctc tgt gag tgc tat gac gca ggc tgt gct tgg tat Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr	275	280	864
275	285		

gag ctc acg ccc gcc gag act aca gtt agg cta cga gcg tac atg aac Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn 290 295 300	912	
acc ccg ggg ctt ccc gtg tgc cag gac cat ctt gaa ttt tgg gag ggc Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly 305 310 315 320	960	
gtc ttt aca ggc ctc act cat ata gat gcc cac ttt cta tcc cag aca Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr 325 330 335	1008	
aag cag agt ggg gag aac ctt cct tac ctg gta gcg tac caa gcc acc Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr 340 345 350	1056	10
gtg tgc got agg gct caa gcc cct ccc cca tcg tgg gac cag atg tgg Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp 355 360 365	1104	
aag tgt ttg att cgc ctc aag ccc acc ctc cat ggg cca aca ccc ctg Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu 370 375 380	1152	
cta tac aga ctg ggc gct gtt cag aat gaa atc acc ctg acg cac cca Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Ile Thr Leu Thr His Pro 385 390 395 400	1200	
gtc acc aaa tac atc atg aca tgc atg tcg gcc gac ctg gag gtc gtc Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val 405 410 415	1248	20
acg agc acc tgg gtg ctc gtt ggc ggc gtc ctg gct gct ttg gcc gcg Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala 420 425 430	1296	
tat tgc ctg tca aca ggc tgc gtc ata gtg ggc agg gtc gtc ttg Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu 435 440 445	1344	
tcc ggg aag ccg gca atc ata cct gac agg gaa gtc ctc tac cga gag Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu 450 455 460	1392	
ttc gat gag atg gaa gag tgc tct cag cac tta ccg tac atc gag caa Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln 465 470 475 480	1440	30
ggg atg atg ctc gcc gag cag ttc aag cag aag gcc ctc ggc ctc ctg Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu 485 490 495	1488	
cag acc gcg tcc cgt cag gca gag gtt atc gcc cct gct gtc cag acc Gln Thr Ala Ser Arg Gln Ala Glu Val Ile Ala Pro Ala Val Gln Thr 500 505 510	1536	
aac tgg caa aaa ctc gag acc ttc tgg gcg aag cat atg tgg aac ttc Asn Trp Gln Lys Leu Glu Thr Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe 515 520 525	1584	

atc agt ggg ata caa tac ttg gcg ggc ttg tca acg ctg cct ggt aac Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn 530 535 540	1632	
ccc gcc att gct tca ttg atg gct ttt aca gct gct gtc acc agc cca Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro 545 550 555 560	1680	
cta acc act agc caa acc ctc ctc ttc aac ata ttg ggg ggg tgg gtg Leu Thr Thr Ser Gln Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val 565 570 575	1728	
gct gcc cag ctc gcc gcc ccc ggt gcc gct act gcc ttt gtg ggc gct Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala 580 585 590	1776	
gac tta gct ggc gcc gac atc ggc agt gtt gga ctg ggg aag gtc ctc Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ile Gly Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu 595 600 605	1824	10
ata gac atc ctt gca ggg tat ggc gcg ggc gtg gcg gga gct ctt gtg Ile Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val 610 615 620	1872	
gca ttc aag atc atg agc ggt gag gtc ccc tcc acg gag gac ctg gtc Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val 625 630 635 640	1920	
aat cta ctg ccc gcc atc ctc tcg ccc gga gcc ctc gta gtc ggc gtg Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val 645 650 655	1968	
gtc tgt gca gca ata ctg cgc cgg cac gtt ggc ccg ggc gag ggg gca Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala 660 665 670	2016	
gtg cag tgg atg aac cgg ctg ata gcc ttc gcc tcc cgg ggg aac cat Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His 675 680 685	2064	
gtt tcc ccc acg cac tac gtg ccg gag agc gat gca gct gcc cgc gtc Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val 690 695 700	2112	
act gcc ata ctc agc agc ctc act gta acc cag ctc ctg agg cga ctg Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu 705 710 715 720	2160	30
cac cag tgg ata agc tcg gag tgt acc act cca tgc tcc ggt tcc tgg His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp 725 730 735	2208	
cta agg gac atc tgg gac tgg ata tgc gag gtg ttg agc gac ttt aag Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys 740 745 750	2256	
acc tgg cta aaa gct aag ctc atg cca cag ctg cct ggg atc ccc ttt Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe 755 760 765	2304	
gtg tcc tgc cag cgc ggg tat aag ggg gtc tgg cga ggg gac ggc atc	2352	

Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile		
770 775 780		
atg cac act cgc tgc cac tgt gga gct gag atc act gga cat gtc aaa	2400	
Met His Thr Arg Cys His Cys Gly Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys		
785 790 795 800		
aac ggg acg atg agg atc gtc ggt cct agg acc tgc agg aac atg tgg	2448	
Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp		
805 810 815		
agt ggg acc ttc ccc att aat gcc tac acc acg ggc ccc tgt acc ccc	2496	
Ser Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro		
820 825 830		
cct cct gcg ccg aac tac acg ttc gcg cta tgg agg gtg tct gca gag	2544	
Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Thr Phe Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu		
835 840 845		
gaa tac gtg gag ata agg cag gtg ggg gac ttc cac tac gtg acg ggt	2592	
Glu Tyr Val Glu Ile Arg Gln Val Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly		
850 855 860		
atg act act gac aat ctt aaa tgc ccg tgc cag gtc cca tcc ccc gaa	2640	
Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys Pro Cys Gln Val Pro Ser Pro Glu		
865 870 875 880		
ttt ttc aca gaa ttg gac ggg gtg cgc cta cat agg ttt gcg ccc ccc	2688	
Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro		
885 890 895		
tgc aag ccc ttg ctg ccg gag gag gta tca ttc aga gta gga ctc cac	2736	
Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His		
900 905 910		
gaa tac ccg gta ggg tcg caa tta cct tgc gag ccc gaa ccg gac gtg	2784	
Glu Tyr Pro Val Glu Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val		
915 920 925		
gcc gtg ttg acg tcc atg ctc act gat ccc tcc cat ata aca gca gag	2832	
Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu		
930 935 940		
gcg gcc ggg cga agg ttg gcg agg gga tca ccc ccc tct gtg gcc agc	2880	
Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Val Ala Ser		
945 950 955 960		
tcc tcc gct agc cag cta tcc gct cca tct ctc aag gca act tgc acc	2928	
Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr		
965 970 975		
gct aac cat gac tcc cct gat gct ctc ata gag gcc aac ctc cta	2976	
Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu		
980 985 990		
tgg agg cag gag atg ggc ggc aac atc acc agg gtt gag tca gaa aac	3024	
Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn		
995 1000 1005		
aaa gtg gtg att ctg gac tcc ttc gat ccg ctt gtg gog gag gag gag	3072	
Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp		

10

20

30

40

1010	1015	1020	
gag cgg gag atc tcc gta ccc gca gaa atc ctg cgg aag tct cgg aga Glu Arg Glu Ile Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg 1025 1030 1035 1040			3120
ttc gcc cag gcc ctg ccc gtt tgg gcg cgg gac tat aac ccc ccg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro 1045 1050 1055			3168
cta 'gtg gag acg tgg aaa aag ccc gac tac gaa cca cct gtg gtc cat Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His 1060 1065 1070			3216
ggc tgc ccg ctt cca cct cca aag tcc cct cct gtg cct ccg cct cgg Gly Cys Pro Leu Pro Pro Lys Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg 1075 1080 1085			3264
aag aag cgg acg gtg gtc ctc act gaa tca acc cta tct act gcc ttg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala Leu 1090 1095 1100			3312
gcc gag ctc gcc acc aga agc ttt ggc agc tcc tca act tcc ggc att Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ser Phe Gly Ser Ser Thr Ser Gly Ile 1105 1110 1115 1120			3360
acg ggc gac aat acg aca aca tcc tct gag ccc gcc cct tct ggc tgc Thr Gly Asp Asn Thr Thr Ser Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys 1125 1130 1135			3408
ccc ccc gac tcc gac gct gag tcc tat tcc tcc atg ccc ccc ctg gag Pro Pro Asp Ser Asp Ala Glu Ser Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu 1140 1145 1150			3456
ggg gag cct ggg gat ccg gat ctt agc gac ggg tca tgg tca acg gtc Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val 1155 1160 1165			3504
agt agt gag gcc aac ggc gag gat gtc gtg tgc tgc tca atg tct tac Ser Ser Glu Ala Asn Ala Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr 1170 1175 1180			3552
tct tgg aca ggc gca ctc gtc acc ccg tgc gcc gcg gaa gaa cag aaa Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys 1185 1190 1195 1200			3600
ctg ccc atc aat gca cta agc aac tcg ttg cta cgt cac cac aat ttg Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu 1205 1210 1215			3648
gtg tat tcc acc acc tca cgc agt gct tgc caa agg cag aag aaa gtc Val Tyr Ser Thr Ser Arg Ser Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val 1220 1225 1230			3696
aca ttt gac aga ctg caa gtt ctg gac agc cat tac cag gac gta ctc Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu 1235 1240 1245			3744
aag gag gtt aaa gca gcg gcg tca aaa gtg aag gct aac ttg cta tcc Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys Val Lys Ala Asn Leu Leu Ser 1250 1255 1260			3792

gta gag gaa gct tgc agc ctg acg ccc cca cac tca gcc aaa tcc aag Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys 1265 1270 1275 1280	3840	
ttt ggt tat ggg gca aaa gac gtc cgt tgc cat gcc aga aag gcc gta Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val 1285 1290 1295	3888	
acc cac atc aac tcc gtg tgg aaa gac ctt ctg gaa gac aat gta aca Thr His Ile Asn Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Asn Val Thr 1300 1305 1310	3936	
cca ata gac act acc atc atg gct aag aac gag gtt ttc tgc gtt cag Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln 1315 1320 1325	3984	
cct gag aag ggg ggt cgt aag cca gct cgt ctc atc gtg ttc ccc gat Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp 1330 1335 1340	4032	10
ctg ggc gtg cgc gtg tgc gaa aag atg gct ttg tac gac gtg gtt aca Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Thr 1345 1350 1355 1360	4080	
aag ctc ccc ttg gcc gtg atg gga agc tcc tac gga ttc caa tac tca Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser 1365 1370 1375	4128	
cca gga cag cgg gtt gaa ttc ctc gtg caa gcg tgg aag tcc aag aaa Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys 1380 1385 1390	4176	20
acc cca atg ggg ttc tcg tat gat acc cgc tgc ttt gac tcc aca gtc Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val 1395 1400 1405	4224	
act gag agc gac atc cgt acg gag gag gca atc tac caa tgt tgt gac Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ala Ile Tyr Gln Cys Cys Asp 1410 1415 1420	4272	
ctc gac ccc caa gcc cgc gtg gcc atc aag tcc ctc acc gag agg ctt Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu 1425 1430 1435 1440	4320	
tat gtt ggg ggc cct ctt acc aat tca agg ggg gag aac tgc ggc tat Tyr Val Gly Pro Leu Thr Asn Ser Arg Gly Glu Asn Cys Gly Tyr 1445 1450 1455	4368	30
cgc agg tgc cgc gcg agc ggc gta ctg aca act agc tgt ggt aac acc Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr 1460 1465 1470	4416	
ctc act tgc tac atc aag gcc cgg gca gcc tgt cga gca ggg ctc Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu 1475 1480 1485	4464	
cag gac tgc acc atg ctc gtg tgt ggc gac gac tta gtc gtt atc tgt Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys 1490 1495 1500	4512	

gaa agc gcg ggg gtc cag gag gac gcg ggc agc ctg aga gcc ttc acg Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr 1505 1510 1515 1520	4560	
gag gct atg acc agg tac tcc gcc ccc cct ggg gac ccc cca caa cca Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro 1525 1530 1535	4608	
gaa tac gac ttg gag ctc ata aca tca tgc tcc tcc aac gtg tca gtc Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val 1540 1545 1550	4656	
gcc cac gac ggc gct gga aag agg gtc tac tac ctc acc cgt gac cct Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro 1555 1560 1565	4704	
aca acc ccc ctc gcg aga gct gcg tgg gag aca gca aga cac act cca Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro 1570 1575 1580	4752	10
gtc aat tcc tgg cta ggc aac ata atc atg ttt gcc ccc aca ctg tgg Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp 1585 1590 1595 1600	4800	
gcg agg atg ata ctg atg acc cat ttc ttt agc gtc ctt ata gcc agg Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg 1605 1610 1615	4848	
gac cag ctt gaa cag gcc ctc gat tgc gag atc tac ggg gcc tgc tac Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr 1620 1625 1630	4896	
tcc ata gaa cca ctg gat cta cct cca atc att caa aga ctc cat ggc Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly 1635 1640 1645	4944	
ctc agc gca ttt tca ctc cac agt tac tct cca ggt gaa atc aat agg Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg 1650 1655 1660	4992	
gtg gcc gca tgc ctc aga aaa ctt ggg gta ccg ccc ttg cga gct tgg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp 1665 1670 1675 1680	5040	
aga cac cgg gcc cgg agc gtc cgc gct agg ctt ctg gcc aga gga ggc Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly 1685 1690 1695	5088	30
agg gct gcc ata tgt ggc aag tac ctc ttc aac tgg gca gta aga aca Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr 1700 1705 1710	5136	
aag ctc aaa ctc act cca ata gcg gcc gct ggc cag ctg gac ttg tcc Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala Ala Gly Gln Leu Asp Leu Ser 1715 1720 1725	5184	
ggc tgg ttc acg gct ggc tac agc ggg gga gac att tat cac agc gtg Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val 1730 1735 1740	5232	
tct cat gcc cgg ccc cgc tgg atc tgg ttt tgc cta ctc ctg ctt gct	5280	

Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile Trp Phe Cys Leu Leu Leu Ala
 1745 1750 1755 1760
 gca ggg gta ggc atc tac ctc ctc ccc aac cga atg agc acg aat cct 5328
 Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg Met Ser Thr Asn Pro
 1765 1770 1775
 aaa cct caa aga aag acc aaa cgt aac acc aac cgg cgg ccg cag gac 5376
 Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp
 1780 1785 1790
 gtc aag ttc ccg ggt ggc ggt cag atc gtt ggt gga gtt tac ttg ttg 5424
 Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu
 1795 1800 1805
 ccg cgc agg ggc cct aga ttg ggt gtg cgc gcg acg aga aag act tcc 5472
 Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 1810 1815 1820
 gag cgg tcg caa cct cga ggt aga cgt cag cct atc ccc aag gct cgt 5520
 Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg
 1825 1830 1835 1840
 cgg ccc gag ggc agg acc tgg gct cag ccc ggg tac cct tgg ccc ctc 5568
 Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu
 1845 1850 1855
 tat ggc aat gag ggc tgc ggg tgg gcg gga tgg ctc ctg tct ccc cgt 5616
 Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg
 1860 1865 1870
 ggc tct cgg cct agc tgg ggc ccc aca gac ccc cgg cgt agg tcg cgc 5664
 Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg
 1875 1880 1885
 aat ttg ggt aag 5676
 Asn Leu Gly Lys
 1890

<210> 6
 <211> 1892
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> amino acid sequence of a representative modified fusion protein,
 with the NS3 protease domain deleted from the N-terminus and
 including amino acids 1-121 of Core on the C-terminus 30

<400> 6
 Met Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His
 20 25 30
 Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly
 35 40 45

Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly
 50 55 60
 Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser
 65 70 75 80
 Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala
 85 90 95
 Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro
 100 105 110
 Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser
 115 120 125
 Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val
 130 135 140
 Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Cys
 145 150 155 160
 Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala
 165 170 175
 Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val
 180 185 190
 Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe
 195 200 205
 Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe
 210 215 220
 Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp
 225 230 235 240
 Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro
 245 250 255
 Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe
 260 265 270
 Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr
 275 280 285
 Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn
 290 295 300
 Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly
 305 310 315 320
 Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr
 325 330 335
 Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr
 340 345 350
 Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp
 355 360 365
 Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu

10

20

30

40

370	375	380	
Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Ile Thr Leu Thr His Pro			
385	390	395	400
Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val			
405	410	415	
Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala			
420	425	430	
Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu			
435	440	445	
Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu			
450	455	460	10
Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln			
465	470	475	480
Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu			
485	490	495	
Gln Thr Ala Ser Arg Gln Ala Glu Val Ile Ala Pro Ala Val Gln Thr			
500	505	510	
Asn Trp Gln Lys Leu Glu Thr Phe Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe			
515	520	525	
Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn			
530	535	540	20
Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro			
545	550	555	560
Leu Thr Thr Ser Gln Thr Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val			
565	570	575	
Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala			
580	585	590	
Gly Leu Ala Gly Ala Ala Ile Gly Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu			
595	600	605	
Ile Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val			
610	615	620	
Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val			
625	630	635	30
Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val			
645	650	655	
Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala			
660	665	670	
Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His			
675	680	685	
Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val			
690	695	700	

Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu
 705 710 715 720
 His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp
 725 730 735
 Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys
 740 745 750
 Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe
 755 760 765
 Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile
 770 775 780
 Met His Thr Arg Cys His Cys Gly Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys
 785 790 795 800
 Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp
 805 810 815
 Ser Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro
 820 825 830
 Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Thr Phe Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu
 835 840 845
 Glu Tyr Val Glu Ile Arg Gln Val Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly
 850 855 860
 Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys Pro Cys Gln Val Pro Ser Pro Glu
 865 870 875 880
 Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro
 885 890 895
 Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His
 900 905 910
 Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val
 915 920 925
 Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu
 930 935 940
 Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ser Val Ala Ser
 945 950 955 960
 Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr
 965 970 975
 Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu
 980 985 990
 Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn
 995 1000 1005
 Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp
 1010 1015 1020

10

20

30

Glu Arg Glu Ile Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg
 1025 1030 1035 1040
 Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro
 1045 1050 1055
 Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu Pro Pro Val Val His
 1060 1065 1070
 Gly Cys Pro Leu Pro Pro Lys Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg
 1075 1080 1085
 Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala Leu
 1090 1095 1100
 Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ser Phe Gly Ser Ser Ser Thr Ser Gly Ile
 1105 1110 1115 1120
 Thr Gly Asp Asn Thr Thr Ser Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys
 1125 1130 1135
 Pro Pro Asp Ser Asp Ala Glu Ser Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu
 1140 1145 1150
 Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val
 1155 1160 1165
 Ser Ser Glu Ala Asn Ala Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr
 1170 1175 1180
 Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys
 1185 1190 1195 1200
 Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu
 1205 1210 1215
 Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val
 1220 1225 1230
 Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu
 1235 1240 1245
 Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser Lys Val Lys Ala Asn Leu Leu Ser
 1250 1255 1260
 Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys
 1265 1270 1275 1280
 Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val
 1285 1290 1295
 Thr His Ile Asn Ser Val Trp Lys Asp Leu Leu Glu Asp Asn Val Thr
 1300 1305 1310
 Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln
 1315 1320 1325
 Pro Glu Lys Gly Arg Lys Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp
 1330 1335 1340
 Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Thr

10

20

30

40

1345	1350	1355	1360	
Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser				
1365		1370	1375	
Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys				
1380		1385	1390	
Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val				
1395		1400	1405	
Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu Glu Ala Ile Tyr Gln Cys Cys Asp				
1410		1415	1420	
Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu				10
1425		1430	1435	1440
Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Arg Gly Glu Asn Cys Gly Tyr				
1445		1450	1455	
Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr				
1460		1465	1470	
Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu				
1475		1480	1485	
Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys				
1490		1495	1500	
Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp Ala Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr				
1505		1510	1515	1520
Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro				20
1525		1530	1535	
Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val				
1540		1545	1550	
Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro				
1555		1560	1565	
Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro				
1570		1575	1580	
Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp				
1585		1590	1595	1600
Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg				30
1605		1610	1615	
Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr				
1620		1625	1630	
Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly				
1635		1640	1645	
Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg				
1650		1655	1660	
Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp				
1665		1670	1675	1680

Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly
 1685 1690 1695

Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr
 1700 1705 1710

Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala Ala Ala Gly Gln Leu Asp Leu Ser
 1715 1720 1725

Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val
 1730 1735 1740

Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile Trp Phe Cys Leu Leu Leu Ala
 1745 1750 1755 1760

Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg Met Ser Thr Asn Pro
 1765 1770 1775

Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp
 1780 1785 1790

Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly Val Tyr Leu Leu
 1795 1800 1805

Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser
 1810 1815 1820

Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg
 1825 1830 1835 1840

Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu
 1845 1850 1855

Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg
 1860 1865 1870

Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg
 1875 1880 1885

Asn Leu Gly Lys
 1890

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> E2 epitope consensus sequence

<400> 7

Gly Ser Ala Ala Arg Thr Thr Ser Gly Phe Val Ser Leu Phe Ala Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Lys Gln Asn
 20

10

20

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> NS4A peptide

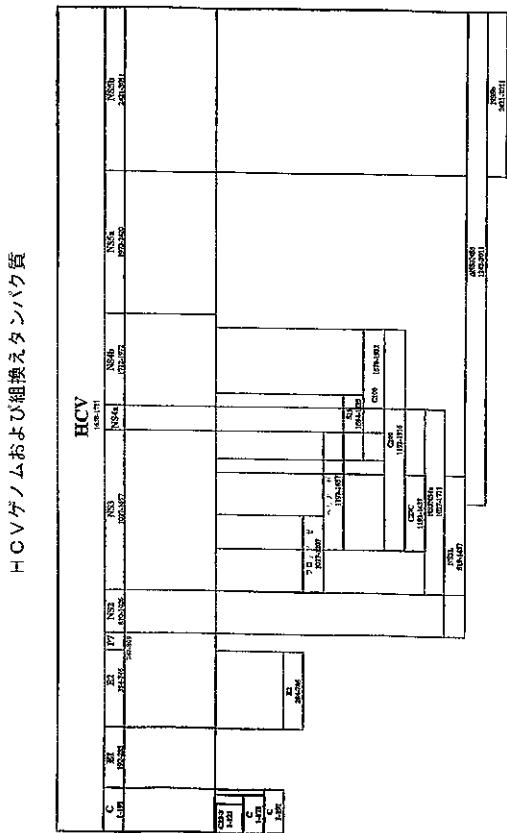
<400> 8

Lys Lys Gly Ser Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys
 1 5 10 15

Pro Ala Ile Ile Pro Lys Lys
20

10

(义 1)



1

〔 义 2 〕

FIG. 2

1 M A A Y R A Q G C Y X 19
 ATG GCT GCA TAT GCA GCT CGG GGC TAT RAG
 20 V L Y E N P S V A A T L G F G
 GTG CTA GTA CTC AAC CCC TCT GGT CCT GCA AGA CTC GGC TTT GGT
 30 R Y K S X H G L D P M I R T 40
 GCT TAC ATG TCC ATG GCT CAT GGG ATC GAT CCT AAC ATC AGG ACC
 40 G V T P T I T G S I F T Y S T 50
 G V G G T G A G A A C R M T T C C A T G G C A G C C C C T C A G T A C C
 50 G V G K F L A D G G C S G G A Y 60
 TAC GGC AGG TTC CTT GGC GAC GGC GGG TCG TCG GGG GGC GCT TAT
 60 D I I I C P B C H S T T D A T S 70
 GAC ATA ATA ATT TGT GAC GAG TGC CTC AGC TCC ATG GAT GGC GCT TCC
 70 D L G I G T V L D Q Q R A B T A G 80
 ATT TTG GGC ATT GGC ACT CTC CTT GCA GCA GCA GCA GAG ACT GCA GGG
 80 R R L V V L A T A T P P G S V 90
 GCG AGA CTG GTT CTG CTC GCC ACC GGC ACC CCT CGC GGC TCC GTC
 90 T V P H P N I B E V A L S T T 100
 ACT GTC CCC CNT CCC ACG ATC GAG GAG GAG GTT GCT CTC TCC BCC ACC
 100 G E I P F Y G K A I P D B E V I 110
 GGA GAG ATC CCT TTT TAC GGC AGG GCT ATC CCC CTC GAA GTC GAA
 110 K G G R H L I F C H S K K K C 120
 AGG GGG SSS AGA CTA CTC ATC TTC TOT CTC GAT AGG AMG AGG TGC
 120 D B L A A K L V A L G I N A V 130
 GAC GAA CTC GCC GCA AGG CTG GTC GCA TGT GGC ATC AAT GGC GTC
 130 R Y Y R G L D V S V I P T S G 140
 GGC TAC TAC CGC GGT CTT GAC GAG GGC TCC GTC ATC CGC ACC AGC GGC
 140 D V V V V V A T D A L M T G Y T 150
 GAT GTC GTC GTC GCA GCA AAT GCA GTC CCT CTC ATC AAC GGC ACC AGC GGC
 150

FIG. 34

FIG. 3B

V T S T W V L V G C G V L R A L 430
 GTC AGG AGC ACC TGG CTG CTC CCT GTC GGC GCG GTC CTG GCT CCT TGG
 A A Y C L S T G C V V I V G R 440
 GCC CGG TAT TGC CTG TCA ACA GGC GGC TGG CTG GTC ATC GCG CGG AGG
 V V L S K F R I I P D R E V 450
 GTC GTC TTG TCC GGG AGG CGG UCA ATC ATA CCT GAC AGG GAA GTC
 Y L R E F D B H E B C S Q H L 460
 CTC TAC CGA CGG TGT CAT GAG ATA GCA GAG TGC AGT CCT CAG CGG CCT
 P Y I E O G H M L A B O N K Q 470
 CGG TAC ATC GAG CAA CGG ATG AGA ATC CTC GGC BAG CGG TTC AAC CGG
 K A L G L L Q T A R S R Q A S 480
 TAC GCC CTC CGC CTC CTG CGC ACC AGG CCT TCC CCT CAG GCA GGC GTT
 I A P R A V Q T N N Q K L H T F 490
 ATC GGC CCT CCT CGC CAG AAC TNC CAA AAA CCT CAG GAC ATT TTC
 N A K H M H N P I S R Q I G Y L 500
 TGG CGG AGG CAT ATG TGG AAC TTC ATC AGG GCG ATA CAA TAC TGC
 A G L S T L P G N P A I A S L 510
 GGC GSC TTG TCA AGC CTG CCT GST AAC CCC GGC ATT GTC TCA TGG
 M A F T T A A V T S P L T T S Q 520
 ATG GCT TTT AGA CCT GCT GTC AGC ACC AGG CCA CTA ACC ACT AGC ACC
 T L L F N I L G C G H W V A R Q L 530
 AAC CTC CGC TGC TAC ATA ATG CGG TGG TGC UGG CCT GCG CGG CCT CTC
 R A P G A A T A T F V G A G L A 540
 GCC GCC CGG GGT GGC GCT ACT GCG TTT GTC GGC GCT GGC TTA OCT
 G A A I G C S V G L G K V L I D 550
 GGC GCC GCC ATC AGC AGT GAT GCA CGG CGG AGG GTC CTC ATA GCA
 I T A L A G O Y G G A G V G A G L A L 560
 ATC CCT CGA CGG TAT GGC GGC GGG GCG GCG GCA CCT GTC CCT GCA
 620

FIG. 3C

630 F K I N S G B V P S T T B D L V 640
 TIC AAC ATC ATG AGC GGT GAG CTC CCC TCC AGG GAG GAC CTC GTC GTC
 650 N L L P R I L S G A L V V G
 AAC CTA CTC CTC CCC GCA ATC CTC TCG CCC GCA GGC CTC GTC GTC GTC GTC
 660 V V C R A R I L R R H Y V G P G B
 GTC GTC TGT GCA GCA ATA CTG CGC CGG CGC GTC GTC GCG CGG GGC GAA
 670 G A V Q N M H E R L T A F A S R
 CGG GCA ATG CAG TGG ATG AGC CGG CGT ATA GCG TCT GCT GCG TCC CGG
 680 G N H V S P T H Y V P E S D A
 CGG GAC GAT GTT TCC CGC AGC TAC GTC CGG CGG GAC GAT GCA
 690 A R A V T V A I L S S T L T V T Q
 GGT GCG CGC CGC ATC AGC CGG CGT ACT GTC ACC CGG
 700 G I X R D L H Q W I S S B C T T
 CTC CTC AGG CGA CGG AAC CAG TGG ATA AGC TCG TGT GAG TGT AGC ACT ACC
 710 P C S G G C N L R D I H D W I C
 CGA TGG TGC GGT TCC TGG CTA AGG GAC ATC TGG GAC TGG TCC TGC
 720 E V L S S D F X T K T L K L R L
 GAG GAG TCC TAC AGC TTC AAC AGC TCC CTA AGT AGC TAC AAC AGC AGC
 730 P Q L P G G I P F V S C Q R G X
 CGA CAG CGG CCT GGG ATC CGT TTT GAG GTC TCC TGC CGG CGC GGG TAT
 740 F G Y W R G D G I K M K T R C H
 AGG GGG GTC TGG CGA CGG GAC GGC ATC ATG CGC ACT CGG TGC CAC
 750 C G A B E I T G E V K R G T H R
 TCC AGG GCT GAG ATC ACT AGC GAT GTC AAA AAC AGG AGC TCC TGC AGG
 760 I V G P R T C E R N M K S G T P
 ATC GTC GGT GCT ATC AGC ACC TGC AGG AAC ATG AGC TGG AGT GGT GGG ACC TTC
 770 P I N A Y T T G D T F L E A
 CGC ATT ATT GCT CGC TGC AAC TGT CGC TCC GCG TCC GCG TCC GCG TCC GCG TCC
 780

FIG. 3D

P N Y T F 840 E 850
 CGG AGC TAC AGG TCA GCG CTA TGG AGG GTG TCT GCA GAG GAC TAC
 V E I R Q V G D F 860 H Y T G M
 GTC GAG ATG AAG CGG CTG GGG GAG TAC TAC TGC AGC AGT GGT ATG
 T T D N L K C P C Q V P S F B 880
 ACT ACT GAC ATG CCT AAA TGG TGC TGC TGC CAG GCA TGG CCC GAA
 F T T C G C S L D G G V R L H R F A P 900
 TTC TCC ACG GAA TGG GAC GGG GAG CTC CAT AGG TTT GCG CGG
 P C X D L L R H V S P R V G 920
 CGC TGC AGG CGC CTC CGG CGG GAG GAG GTC TCA TCG AGA STA CGA
 L H E Y P V G S G L P C E P B 940
 CTC CAC GAA GCA CGC GTR GGG TCG CGA TTA CCT TGC GAG CGC CGA
 P D V A V L T S M L T D P S H 960
 DDC GAC GCG GCG TCC TGC AGG TAC AGG CTC ACT GAT CGC CGC TCT
 I T A R A A A G R R L A R G S P 980
 WTA AGA GCA GAC GCG GCG GCG AGG TGG CGG AGG GGA TCG AGG GGA TCG
 P S V A S S S A S Q C T S A P S 990
 CGC TCT STG GCG AGG TCC TGC CGT AGC CAG CGG CTA TCC GCT CGA TCT
 L K C A T C T A N H D S F D D A E 1000
 TCC AGG GAG AGA ACT TGC AGC AGT GAC TAC CGC TCG CCT GAT GCT GCT GAG
 I T R V E S E N K V I L D S 1010
 WTC AGC AGG TCA TGT GAG TCA GAA AGC AGA CGG GTC ATT CTG GAC TCC
 F D P E I L R K R S R F P A Q A L 1030
 XC GCA GAA ATG CTG CGG CGC AGG TCT CGG AGA TGC GAA TTC CGG CGA CGC GTC

FIG. 3E

P V W R A 1050 P B Y N R P L V E T 1060
 CCC GTT TGG GCG CGG CGG QAC TAT AAC CCC CGG CTA CTG GAG AGC
 W K K F 1070 I Y S P V V N G C P
 TGG AAA ARG CCC GAC TAC GAA CCA CCT GTC CAT GGC TGC AGC
 L P P F S S P F P P P R K X 1080 1090
 CCT CGA CCT CGA AAG TCC CCT CCT GTC CGC CCT CGC CCT CGG AAG ARG
 R T V V L T E S D B S T A L A 1100
 CGG AGG GTG GTC CTC ACT GAA TCA ACC CTA TCT TGT GCG TTG GCC
 B L A T R S F G S S T T S G I 1110 1120
 GAG CTC GCC ACC AGA AGC TTT GGC AGC TCC TCA AGT TCC TGG ATT
 A G D N T T S S E P A P S G 1130
 AGG GGC GAC AGC AGC AGC AGC ACA TCC TGT GAG CGC GGC CCT TCT AGC
 C P P D S D A H E S Y S S P M P 1140 1150
 TGC CGG CGC GAC TCC GAC GCT GAG CGC TAC TAT TCC TAU AGG CGG CCT
 L E G H P G D P L L S D G S W 1160
 CTG GAS GGG GAG CCT CGG GAT CGG GAT CCT AGC AGC GGG TCA TGG
 S T V S S E B A N A E D V V V C 1170 1180
 TCA AGG GTC AGT AGT GAG CGC AAC AGC CGG GAG GAT GTC GTG TGC TGC
 S M S Y S N T T G A L V U T P C A 1190
 TCA ATG TCT TAC TCT TGT AGC AGA CGG GCA CTC GCG ACC CGG TGG AGC
 A E E Q K L P I N R L S N S L 1200 1210
 CGG GAA GAA CGG AAA CGG CCC ATC ATC GAT CGA CTA AGC AAC TCG ITG
 L R H N H N L V Y S T T S F S A 1220
 CTA CGT CGC CAC AAC ATT TGG GGG PAT TGT ACC ACC TCA CGC AGT GOT
 C Q R Q K K V T T F D R L Q V L 1230 1240
 TCG CAA AGG CGG AMG AAG GTC AGC AGC TGT GAG CGC CGG CTA GTT CGC
 D S H Y Q D V L K E V K A A A 1250
 GAC AGG CGT TAC CGG GTC ETC AGG GAG GTT ARA GCA CGG GCG GCG

FIG. 3E

S	K	V	K	A	N	L	L	S	V	E	R	A	C	S	1270
TCA	AAA	GTC	AGG	GCT	AAC	TTC	CTA	TCC	GTA	GNG	GAA	GCT	TGC	REC	
L	T	P	P	H	S	A	K	F	G	Y	G	A			1280
CTG	AGG	CCC	CCA	CAC	TCA	GCC	AAA	TCC	AGG	TTC	TAT	GGG	GCA		
K	D	V	R	C	K	R	A	R	K	A	V	T	H	I	1300
AAA	GAC	GTC	CCT	TCG	CAT	GCT	AGA	AGA	GCA	GTA	ACC	CAC	ATC	ATC	
S	V	N	K	P	D	L	B	D	N	V	T	P	I	D	1310
TCC	GTC	TGG	AAA	GAC	CTT	CTG	GAA	GAC	ATA	GTG	ACA	GCA	ATA	GAC	
T	T	I	M	A	K	N	E	V	F	C	V	P	E		1320
ATC	ACC	ATC	ATG	GCT	AGG	AGA	GAC	GAG	GTT	TTC	TTC	GTT	GCA	CCT	GAG
K	G	G	R	K	P	A	R	L	V	F	F	D	L		1340
ARG	GGG	GGT	GCT	AGG	CGA	GCT	CCT	CTG	ATC	GTC	GGG	TTC	CCC	GAT	GTC
G	V	R	V	C	S	K	M	A	L	Y	D	V	V	T	1360
GTC	GTC	GCG	GTC	TCC	GAA	JUG	JTG	GCT	TTC	TAC	GAC	GGT	GTT	ACA	
E	L	P	L	A	V	M	G	S	S	Y	G	F	O	Y	1370
ARG	CTC	CCC	TTC	GCG	GTG	ATG	GGA	AGC	ICC	TAC	GGA	TCA	CAA	TAC	
S	P	G	Q	V	W	E	F	L	V	Q	A	R	W	K	1380
TCC	CCA	CCA	CAG	CGG	GTT	GAA	TTC	CTG	GNG	CAA	GCG	TGG	AGG	TCC	
K	K	T	P	M	G	S	S	Y	D	T	R	C	F	B	1390
ANG	AAA	ACC	CCA	ATG	GGG	TTC	TUG	TAT	GAT	ACC	COG	TCC	TGT	TTC	
S	T	V	T	E	S	B	I	R	T	B	E	R	A	I	1400
TCC	ACA	GCA	GTC	ACT	GAG	AGC	GAC	ATC	CUT	ACG	GAG	GAG	GCA	ATC	TAC
G	C	C	D	L	B	D	P	Q	A	R	V	A	I	K	1410
CAA	TGT	TGT	GAC	TCC	GAC	CCC	CAA	GCC	CCC	GTC	GCC	GCC	ATC	AGG	TCC
L	T	E	R	L	Y	V	G	G	P	L	T	N	S	R	1420
CTC	ACC	GAG	AAC	CTT	TAT	GTC	GGG	GCG	CCT	CYT	ACC	ATC	ATA	CGG	
G	B	N	C	G	Y	R	F	R	C	R	A	G	V	U	1430
GCG	GAG	GAC	TGC	GCG	TAT	CDC	AGG	TCC	CGT	CGN	GNG	GCG	GTC	CTG	
G	B	N	C	G	Y	R	F	R	C	R	A	G	V	U	1440
GCG	GAG	GAC	TGC	GCG	TAT	CDC	AGG	TCC	CGT	CGN	GNG	GCG	GTC	CTG	
G	B	N	C	G	Y	R	F	R	C	R	A	G	V	U	1450
GCG	GAG	GAC	TGC	GCG	TAT	CDC	AGG	TCC	CGT	CGN	GNG	GCG	GTC	CTG	
G	B	N	C	G	Y	R	F	R	C	R	A	G	V	U	1460
GCG	GAG	GAC	TGC	GCG	TAT	CDC	AGG	TCC	CGT	CGN	GNG	GCG	GTC	CTG	

FIG. 3G

T T S C G N T L T C Y X R P 1470
 RGA ACT AGC TGT GGT AAC AGC AAC CTC ACT TSC TRC ATC RAG CGC DCG
 1490
 A A C R E A R A G L Q D C D T N L V
 CGA GCC TGT CGA GCG HCA GGG CTC CGC GAC TGC ACC NGG CTC CGT CGE
 1510
 D C G D D L V V I C E S S A G V Q
 TGT CGC GAC GAC CCT OTC GTT AGC ATC TGT CGA AGC CGG CGG GTC CAG
 1530
 B P A A S L R A F T K A M T E
 GAG GAC CGG CGG CCT AGA CGG CGG TCC AGT GAG OCT ATG ACC AGG
 1550
 Y S A R P G D P P Q P E Y D 1540
 TAC TCC CGC CGC CCT CGG CGC CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA
 1570
 E L I T S C C S S N V S V A B D
 GAG CTC TTA AGA TCA TCC TCC FOE AAC GAG CTG TCA GTT GCT GAC GAC GAC
 1590
 G A C E R V Y Y L T R D P T 1570
 CGW CGT GSA AGG ROG GTC TIC TAC TCC ACC CGT GAC CGT CGK ACC ACC
 1610
 F L L A R R A N W E T A R H T P V
 CCC CGC CGS AGR CGC CCT TGT CGG AGA CGA CGA AGA CGC ACT CGA CGC
 1630
 N S M L L G N I L M F A P T L W
 ATC TCC TGT CGT CGC AGC ATA ATC AGC TGT CGC CGC CGC AGC CGT CGG
 1650
 A R E M I L M T H P F V W L I A
 CGG AGG AGG ATA CGG ATG AGC CGT TTC TTC AGC CGC CGC ATA CGG CGC
 1670
 R D Q Q L B E Q A R L D C E I Y V P 1650
 AGG GAC CGG CGT CGT CGA CGA CGC CGC CGT CGT CGA CGA CGA CGA CGC CGC
 1690
 C T S I T R F P L D L P D I Y Q E
 CGT TAC CCT ATA CGA
 1710
 L H C L S A F S L H S Y S P G 1660
 CGT CGT CGC CGT CGC CGA
 1730
 E I H R V R A C L R K L G S V P
 CGA ATC ATC AGG GTG CGC CGA CGA CGC CGC CGC CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA

FIG. 3E

1680
P D R M R H R R A R S V R A R
CCC TTG CGA GCT TGG AGA AAC CGG TCG CGG AGC GTC CGC GCT ARG
1690
L L A S G G R D A I C G K Y L
CTT CTG GCG AGA GCA GCG ACC CCTT GCG ATG TGT GCG AAG TAC CTC
1700
F N W A V R T K L E L T P I A
TTC AAC TGG GCA GTC AGA ACA AAC TGC CTC AAA ACT CCT CCA ATA GCG
1710
A A G Q L D L S G W F T A G Y
GCG CCT GGC CAG CTC GAC TTG TCC GCG TGG TGC AAC CCT GCG TAC
1720
S G Q D I Y E S V G H A R P R
AGC GGG GGA GAC ATT TAT AAC AGC TGT TGT GAT GCG CGG CGC CGC
1730
W I N Y C L L L A A G V G I
TGG ATC TGG TTT TGC CTC CTC CTC CTC CCT CCT GCA GGG GTC GCG ATC
1740
Y L L P N R M S T N P K P Q R
TAC CTC CCT CCC AAC CGA ATG AGC AGC ATG CCT AAA CCT CRA AGA
1750
K T X R N T K R R P Q D V X F
AGC ACC AAA CCT AAC ACC AAC CGG CGG AGC AGC AGC AGC AGC AGC TTC
1760
P G S G Q J V G G W Y L L P R
CCC GGT GGC GGT CAG ATG GTT GGT GGA GTT AAC TTG TTG CGG CGC
1770
R G P R L G V R A T R K T S E
AGG GGC CCT ADA TTG CCT GTC CGG CGG AGC AGA AGA AGC ACT CCT GAC
1780
R S Q D R G R P Q P I V K A R
CGG TCG CAA CCT CRA GGT AGA AGC CGG CCT ATG CCT CGG AGC AGC GCT CGT
1790
R P E G R T N A Q P G Y P W P
CGG CGC GAG GGC AGG AGC TTG GCT CGG CGC CGG TAC CCT TGG CGG CGC
1800
L Y G N H G C G W A G W L L S
CTG TAT GCG ATG GAG CGC CCT TTG CGG CGG CGA TGG CGC CTC TCC
1810
P R G S R P S W G F T D P R R
CCC CCT GGC TGT CGG CCT AGC AGC TGG GGC CGC AGA GCA CGC CGC CGU
1820
1830
FIG. 3J

FIG. 3I

【手続補正書】

【提出日】平成17年6月15日(2005.6.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2005532064000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/20996																																							
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 14/18; A61K 39/29 US CL : 530/350; 424/189.1 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) U.S. : 530/350; 424/189.1																																									
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) WEST/USPT, PGPB, JPAB, EPAB, DWPI; Dialog																																									
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category *</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/30812 A2 (CHIRON CORPORATION) 03 May 2001 (03.05.2001), see entire document.</td> <td>1, 3-10</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2, 13-15, 18</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/38360 A2 (CHIRON CORPORATION) 31 May 2001 (31.05.2001), see entire document.</td> <td>1, 3-10</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2, 13-15, 18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>DIEPOLDER, H.M. et al. Immunodominant CD4+ T-Cell Epitope within Nonstructural Protein 3 in Acute Hepatitis C Virus Infection. August 1997, Vol. 71, No. 8, pages 6011-6019, see entire document.</td> <td>1-10, 13-15</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SHOJI, I. et al. Proteolytic Activity of NS3 Serine Proteinase of Hepatitis C Virus Efficiently Expressed in Escherichia coli. Hepatology. December 1995, Vol. 22, No. 6, pages 1648-1655, see entire document, especially page 1650.</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>3-10, 13-15, 18</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 01/30812 A2 (CHIRON CORPORATION) 03 May 2001 (03.05.2001), see entire document.	1, 3-10	---		-----	Y		2, 13-15, 18	X	WO 01/38360 A2 (CHIRON CORPORATION) 31 May 2001 (31.05.2001), see entire document.	1, 3-10	---		-----	Y		2, 13-15, 18	A	DIEPOLDER, H.M. et al. Immunodominant CD4+ T-Cell Epitope within Nonstructural Protein 3 in Acute Hepatitis C Virus Infection. August 1997, Vol. 71, No. 8, pages 6011-6019, see entire document.	1-10, 13-15	---		-----	Y		18	X	SHOJI, I. et al. Proteolytic Activity of NS3 Serine Proteinase of Hepatitis C Virus Efficiently Expressed in Escherichia coli. Hepatology. December 1995, Vol. 22, No. 6, pages 1648-1655, see entire document, especially page 1650.	1, 2	---		-----	Y		3-10, 13-15, 18
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																																							
X	WO 01/30812 A2 (CHIRON CORPORATION) 03 May 2001 (03.05.2001), see entire document.	1, 3-10																																							
---		-----																																							
Y		2, 13-15, 18																																							
X	WO 01/38360 A2 (CHIRON CORPORATION) 31 May 2001 (31.05.2001), see entire document.	1, 3-10																																							
---		-----																																							
Y		2, 13-15, 18																																							
A	DIEPOLDER, H.M. et al. Immunodominant CD4+ T-Cell Epitope within Nonstructural Protein 3 in Acute Hepatitis C Virus Infection. August 1997, Vol. 71, No. 8, pages 6011-6019, see entire document.	1-10, 13-15																																							
---		-----																																							
Y		18																																							
X	SHOJI, I. et al. Proteolytic Activity of NS3 Serine Proteinase of Hepatitis C Virus Efficiently Expressed in Escherichia coli. Hepatology. December 1995, Vol. 22, No. 6, pages 1648-1655, see entire document, especially page 1650.	1, 2																																							
---		-----																																							
Y		3-10, 13-15, 18																																							
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 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																																									
Date of the actual completion of the international search 10 November 2003 (10.11.2003)		Date of mailing of the international search report 18 DEC 2003  Authorized officer Donna C. Wortman, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196																																							
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230																																									

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

PCT/US03/20996

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ECKART, M.R. et al. THE HEPATITIS C VIRUS ENCODES A SERINE PROTEASE INVOLVED IN PROCESSING OF THE PUTATIVE NONSTRUCTURAL PROTEINS FROM THE VIRAL POLYPROTEIN PRECURSOR. Biochem. Biophys. Comm. 30 April 1993, Vol. 192, No. 2, pages 399-406, see the entire document.	1-10, 15 -----
Y	GRAKOUI, A. et al. Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites. Journal Virology. May 1993, Vol. 67, No. 5, pages 2832-2843, see entire document, especially pages 2834-2835.	13, 14, 18 -----
X	TOMEI, L. et al. NS3 Is a Serine Protease Required for Processing of Hepatitis C Virus Polyprotein. Journal Virology. July 1993, Vol. 67, No. 7, pages 4017-4026, see entire document, especially Fig. 1.	1-4, 13, 15, ----- 5-10, 14, 18
Y		1-10, 13, 15, ----- 14, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/20996

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim 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. Claim Nos.: 11, 12, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZW

(72)発明者 ホートン , マイケル

アメリカ合衆国 , カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エミリービル , カイロン コーポレーション インテレクチュアル プロパティ - アール4 4 0 ピー . オー . ボックス 8 0 9 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA07 DA02 DA05 DA11 EA02 EA04 GA11
 HA01 HA17
 4B064 AG32 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AB01 AC14 BA01 CA24 CA44 CA45
 4C084 AA01 AA07 DC50 NA14 ZA751 ZB331
 4C085 AA03 BA87 BB11 CC08 CC21
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA02 DA56 DA86 EA20
 FA74