



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102596996 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201080049667. 0

代理人 孔青 郭文洁

(22) 申请日 2010. 10. 29

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

2009-251165 2009. 10. 30 JP

2009-251341 2009. 10. 30 JP

C07K 16/10 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 31/14 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12N 7/00 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 04. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/069323 2010. 10. 29

(56) 对比文件

WO 2009/014216 A1, 2009. 01. 29, 说明书第

0003, 0040, 0041, 0057, 0068, 0167, 0181.

JP 2008-532559 A, 2008. 08. 21, 全文.

CN 101321865 A, 2008. 12. 10, 全文.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/052735 JA 2011. 05. 05

(83) 生物保藏信息

FERM BP-11263 2009. 10. 15

FERM BP-11264 2009. 10. 15

审查员 赵九永

(73) 专利权人 东丽株式会社

地址 日本东京都

专利权人 日本国立感染症研究所

(72) 发明人 胁田隆字 西村和美 中村纪子

赤泽大辅

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

权利要求书1页 说明书35页

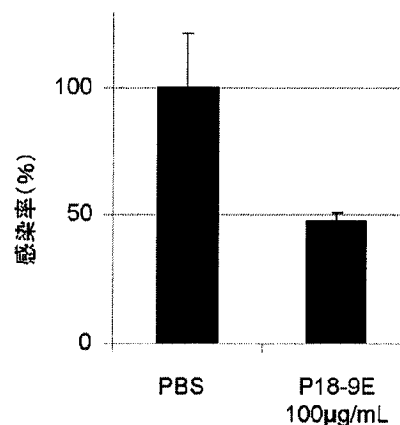
序列表35页 附图5页

(54) 发明名称

对丙型肝炎病毒(HCV)具有感染抑制活性的
抗体及其用途

(57) 摘要

本发明的目的在于提供抑制丙型肝炎病毒(HCV)感染的抗体。本发明提供:通过将丙型肝炎病毒颗粒的立体构造的全部或部分识别为表位后与其结合,从而抑制丙型肝炎病毒与宿主细胞表面结合,可以抑制HCV感染的抗丙型肝炎病毒抗体、其人源化抗体以及丙型肝炎病毒感染抑制剂。



1. 抗丙型肝炎病毒抗体,其将由丙型肝炎病毒颗粒的 E1 蛋白和 E2 蛋白构成的复合物的立体构造识别为表位,对丙型肝炎病毒具有感染抑制活性,其在重链可变区包含含有序列表的 SEQ ID NO: 18、20 和 22 所示氨基酸序列的互补性决定区域,并且在轻链可变区包含含有 SEQ ID NO: 25、27 和 29 所示氨基酸序列的互补性决定区域。

2. 权利要求 1 记载的抗丙型肝炎病毒抗体,其由保藏号为 FERM BP-11263 的杂交瘤细胞株产生。

3. 抗丙型肝炎病毒抗体,其将由丙型肝炎病毒颗粒的 E1 蛋白和 E2 蛋白构成的复合物的立体构造识别为表位,对丙型肝炎病毒具有感染抑制活性,其在重链可变区包含含有序列表的 SEQ ID NO: 32、34 和 36 所示氨基酸序列的互补性决定区域,并且在轻链可变区包含含有 SEQ ID NO: 39、41 和 43 所示氨基酸序列的互补性决定区域。

4. 权利要求 3 记载的抗丙型肝炎病毒抗体,其由保藏号为 FERM BP-11264 的杂交瘤细胞株产生。

5. 权利要求 1 或 3 记载的抗丙型肝炎病毒抗体,其为人源化抗体。

6. 保藏号为 FERM BP-11263 的杂交瘤细胞株。

7. 保藏号为 FERM BP-11264 的杂交瘤细胞株。

8. 丙型肝炎病毒的感染抑制剂,其以权利要求 1 ~ 5 中任一项记载的抗丙型肝炎病毒抗体作为有效成分。

对丙型肝炎病毒 (HCV) 具有感染抑制活性的抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及对丙型肝炎病毒 (HCV) 具有感染抑制活性的抗体及其用途。

背景技术

[0002] 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus; 下称“HCV”) 是被认定为非甲非乙型肝炎的主要致病病毒的、属于黄病毒科丙型肝炎病毒 (Hepacivirus) 属的 RNA 病毒 (非专利文献 1)。HCV 基因组编码翻译后由来自宿主的信号肽酶或来自 HCV 的蛋白酶切断为 10 种病毒蛋白 (核心、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 以及 NS5B) 的前体蛋白。其中, 核心、E1、E2 以及 p7 蛋白被分类为结构蛋白, NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 以及 NS5B 蛋白被分类为非结构蛋白。

[0003] HCV 主要通过输血而感染, 由于目前已经确立了高灵敏度的 HCV 检测方法, 因此通过输血而导致的新 HCV 感染患者剧减。另一方面, 即使现在, 推测包含无肝炎症状的病毒携带者在内的 HCV 携带者在日本有 200 万人以上, 在全世界有 1 亿 7000 万人以上。很大的原因是由于 HCV 感染引起的肝炎的慢性化率高达 70 ~ 80%, 现阶段除干扰素以外还没有有效的抗病毒剂。因 HCV 感染引起的慢性肝炎 (慢性丙型肝炎) 有可能在之后二十多年的时间中发展为肝硬化、最终恶化为肝癌。另外, 已知肝癌即使通过手术摘除癌, 由于非癌部分持续发生炎症而复发的患者较多。

[0004] 故希望开发出以预防携带者发病或清除病毒为目的的药效优异的抗病毒药或疫苗。因此, 需要明确 HCV 是如何侵入宿主细胞进行复制增殖的, 以及会对宿主细胞产生什么样的影响之类的 HCV 的生活周期的详细情况。

[0005] HCV 的生活周期具有下示的一系列循环。首先, HCV 与细胞表面的特异性蛋白 (病毒受体) 结合, 通过内吞作用摄入到宿主细胞内, 接着, HCV 基因组 RNA 由病毒颗粒释放到宿主细胞质内 (脱壳)。接着, 该释放的 HCV 基因组 RNA 所编码的 HCV 蛋白前体被翻译、通过加工生成各病毒蛋白, 之后 HCV 基因组 RNA 被生成的病毒蛋白的一种即 RNA 聚合酶复制。复制的 HCV 基因组 RNA 被作为结构蛋白的核心蛋白和包膜蛋白 (E1 蛋白和 E2 蛋白) 包装, 形成新的病毒颗粒。最后, 病毒颗粒破坏宿主细胞膜, 释放到细胞外。

[0006] 因此, 要预防 HCV 携带者发病或清除病毒, 开发出阻止 HCV 感染的上述一系列过程中的至少一个路径的方法是很重要的。

[0007] 人们认为 HCV 与细胞表面的结合是 HCV 的包膜蛋白承担的, 因此一直以来都在研究制作抗 HCV 感染患者血清中的包膜蛋白的抗体。然而, 对 C100 抗体 (NS4-NS-5 抗体) 或抗核心抗体的至少一种、以及抗包膜蛋白抗体显示阳性的 HCV 感染患者为整体患者的 10% 左右, 而且, 因中和抗体的出现而使丙型肝炎自然治愈者占其中的约 10% (非专利文献 2), 因此认为因抗包膜蛋白抗体而治愈的患者只不过为整体患者的 1% 左右。推测这是由于存在阻碍或抑制抗 HCV 包膜蛋白抗体产生的机构 (非专利文献 3)。

[0008] 另一方面, 非专利文献 4 中公开了在用哺乳动物表达 HCV 的包膜蛋白的一种即 E2 蛋白的情况下, 与人细胞表面存在的 CD81 特异性结合。根据该实验结果, 尝试由丙型

肝炎患者分离显示抑制 E2 蛋白与 CD81 的结合（结合的中和作用（Neutralisation of binding), NOB) 活性的抗体。例如,通过由基因型 1a 的 HCV 引起的慢性丙型肝炎患者的骨髓淋巴细胞制作抗体基因文库,使用噬菌体展示法,分离上述抗体（专利文献 1）。在由基因型 1b 的 HCV 引起的丙型肝炎患者的末梢 B 细胞制作杂交瘤的方法中,也分离了显示 NOB 活性的抗体（非专利文献 5、专利文献 2）。然而,在由 HCV 感染患者制备单克隆抗体的方法中,因为限于具有 HCV 感染抑制抗体的患者等,难以获得感染抑制抗体的不同谱（repertoire）或找出作为抗 HCV 剂有用的抗体。另外,据报道,显示 NOB 活性的抗体未必抑制感染（非专利文献 8）。

[0009] 还尝试了将重组型包膜蛋白给予小鼠来诱导抗体的方法（专利文献 3）、以及使其淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合来制作产生抗体的杂交瘤,制作抗包膜蛋白抗体（专利文献 4 及非专利文献 6）。然而,迄今为止尚未获得抑制 HCV 感染的有效抗体。未用包膜蛋白对动物进行免疫、制作中和 HCV 感染的抗体的一个理由为:免疫使用的重组型包膜蛋白与病毒本来的包膜蛋白构造不同。另外,据报道,重组型包膜蛋白容易凝集,无法保持本来的立体构造（非专利文献 7）。

[0010] 因此,从利用 HCV 的抗体进行治疗、预防的观点来看,需要开发出能抑制病毒感染的抗包膜蛋白抗体及有效诱导该抗体的新方法。

[0011] 基于上述背景,近年来确立了利用细胞培养系制作感染性 HCV 颗粒的技术（专利文献 5、专利文献 6 及专利文献 7）。与通过基因重组技术表达重组型包膜蛋白、将其用作抗原的上述方法相比,利用细胞培养系制作的 HCV 颗粒显示感染性,因此认为其保持了 HCV 抗原的立体构造。

[0012] HCV 的立体构造由包膜构成,该包膜由作为包膜蛋白的 E1 蛋白和 E2 蛋白、以及脂质膜构成。另外,认为这些 E1 蛋白和 E2 蛋白相互结合,形成复合物（非专利文献 7）。

[0013] 另一方面,明确了:艾滋病病毒的包膜蛋白形成 3 聚体,将其立体构造识别为表位（抗原决定簇）的抗体与以往的抗艾滋病病毒抗体相比,对大范围的艾滋病病毒有效,而且为中和活性高的抗体。这表明,在抗体的中和活性中,可以将病毒抗原的立体构造识别为表位是很重要的（非专利文献 9）。

[0014] 现有技术文献

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献 1:日本特表 2005-531286 号公报

[0017] 专利文献 2:日本特表 2006-504645 号公报

[0018] 专利文献 3:日本特表 2004-500366 号公报

[0019] 专利文献 4:日本特表平 6-505389 号公报

[0020] 专利文献 5:WO 05080575A1

[0021] 专利文献 6:WO 06022422A1

[0022] 专利文献 7:WO 06096459A2

[0023] 非专利文献

[0024] 非专利文献 1:Choo 等人, Science, 1989 年, 244 卷, 359-362 页

[0025] 非专利文献 2:Matsuura 等人, J. Virol., 1992 年, 66 卷, 1425-1431 页

[0026] 非专利文献 3:斋藤等人, 实验医学, 1991 年, 9 卷, 2075-2080 页

- [0027] 非专利文献 4 :Pileri 等人, Science, 1998 年, 282 卷, 938-941 页
- [0028] 非专利文献 5 :Hadlock 等人, J. Virol., 2000 年, 74 卷, 10407-10416 页
- [0029] 非专利文献 6 :铃木等人, 最新医学, 2003 年, 58 卷, 2017-2022 页
- [0030] 非专利文献 7 :Op de Beeck 等人, J. Gen. Virol., 2001 年, 82 卷, 2589-2595 页
- [0031] 非专利文献 8 :Burioni 等人, J. Virol., 2002 年, 76 卷, 11775-11779 页
- [0032] 非专利文献 9 :Laura M. Walker 等人, Science, 2009 年, 326 卷, 285 页

发明内容

[0033] 发明要解决的课题

[0034] 本发明的目的在于提供抑制 HCV 感染的抗体。

[0035] 解决课题的手段

[0036] 本发明人进行了深入的研究, 结果成功地从产生抗体的杂交瘤中取得了多个具有 HCV 感染抑制活性的单克隆抗体, 所述产生抗体的杂交瘤是由给予了感染性 HCV 颗粒的小鼠制作的。这些单克隆抗体是将由 HCV 的 E1 蛋白和 E2 蛋白构成的复合物的立体构造识别为表位的抗 HCV 抗体。预想可以将这种立体构造识别为表位的抗体对大范围的 HCV 有效, 且不会因 HCV 的变异而失去感染抑制能力。本发明正是基于这些发现而完成的, 即, 包含以下内容:

[0037] (1) 抗 HCV 抗体, 其将由 HCV 颗粒的 E1 蛋白和 E2 蛋白构成的复合物的立体构造识别为表位, 对 HCV 具有感染抑制活性。

[0038] (2) (1) 中记载的抗 HCV 抗体, 其中 E1 蛋白和 E2 蛋白的氨基酸序列分别含有序列表的 SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列。

[0039] (3) (1) 或 (2) 记载的抗 HCV 抗体, 其中上述 HCV 颗粒产自将 HCV 的 J6CF 株和 JFH-1 株的基因组的一部分连接而构成的 HCV 嵌合基因组, 上述 HCV 嵌合基因组为下面的 (i) 或 (ii)。

[0040] (i) 将来自 J6CF 株的 5' 非翻译区、核心蛋白编码序列、E1 蛋白编码序列、E2 蛋白编码序列及 p7 蛋白编码序列、来自 JFH-1 株的 NS2 蛋白编码序列、NS3 蛋白编码序列、NS4A 蛋白编码序列、NS4B 蛋白编码序列、NS5A 蛋白编码序列、NS5B 蛋白编码序列及 3' 非翻译区由 5' 一侧顺序连接而成的 HCV 嵌合基因组

[0041] (ii) 将来自 J6CF 株的 5' 非翻译区、核心蛋白编码序列、E1 蛋白编码序列、E2 蛋白编码序列、p7 蛋白编码序列及 NS2 蛋白编码区域的编码 N 末端至 16 位的氨基酸残基的氨基酸序列的序列、来自 JFH-1 株的 NS2 蛋白编码区域的编码始自 N 末端的 17 位氨基酸残基以后的氨基酸序列的序列、NS3 蛋白编码序列、NS4A 蛋白编码序列、NS4B 蛋白编码序列、NS5A 蛋白编码序列、NS5B 蛋白编码序列及 3' 非翻译区由 5' 一侧顺序连接而成的 HCV 嵌合基因组

[0042] (4) (3) 记载的抗 HCV 抗体, 其中上述 HCV 嵌合基因组是由序列表的 SEQ ID NO : 2 所示核苷酸序列构成的核酸 (不过, 在该核酸为 RNA 的情况下, 核苷酸序列中的胸腺嘧啶 (T) 改读为尿嘧啶 (U))。

[0043] (5) 上述 (1) ~ (4) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体, 其中感染抑制活性是抑制 HCV 颗粒与宿主细胞表面结合的活性。

[0044] (6) 上述 (1) ~ (5) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体,其由保藏号为 FERM BP-11263 的杂交瘤细胞株产生。

[0045] (7) 上述 (1) ~ (5) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体,其由保藏号为 FERM BP-11264 的杂交瘤细胞株产生。

[0046] (8) 上述 (1) ~ (5) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体,其为人源化抗体。

[0047] (9) 保藏号为 FERM BP-11263 的杂交瘤细胞株。

[0048] (10) 保藏号为 FERM BP-11264 的杂交瘤细胞株。

[0049] (11) HCV 感染抑制剂,其以上述 (1) ~ (8) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体作为有效成分。

[0050] (12) 上述 (1) ~ (5) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含含有序列表的 SEQ ID NO :18、20 和 22 所示的氨基酸序列的互补性决定区域。

[0051] (13) 上述 (12) 中记载的抗 HCV 抗体,其包含含有序列表的 SEQ ID NO :13 所示的氨基酸序列的重链可变区。

[0052] (14) 上述 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(12) 或 (13) 中记载的抗 HCV 抗体,其包含轻链可变区,该轻链可变区包含含有序列表的 SEQ ID NO :25、27 的 29 所示的氨基酸序列的互补性决定区域。

[0053] (15) 上述 (14) 中记载的抗 HCV 抗体,其包含含有序列表的 SEQ ID NO :14 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0054] (16) 上述 (1) ~ (5) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体,其包含重链可变区,该重链可变区包含含有序列表的 SEQ ID NO :32、34 和 36 所示的氨基酸序列的互补性决定区域。

[0055] (17) 上述 (16) 中记载的抗 HCV 抗体,其包含含有序列表的 SEQ ID NO :15 所示的氨基酸序列的重链可变区。

[0056] (18) 上述 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(16) 或 (17) 中记载的抗 HCV 抗体,其具有轻链可变区,该轻链可变区包含含有序列表的 SEQ ID NO :39、41 和 43 所示的氨基酸序列的互补性决定区域。

[0057] (19) 上述 (18) 中记载的抗 HCV 抗体,其具有包含序列列表的 SEQ ID NO :16 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0058] (20) 上述 (12) ~ (19) 中记载的抗体,其中,在上述重链可变区或轻链可变区的氨基酸序列中,框架区中的 1 ~ 5 个氨基酸被缺失、取代、插入或添加。

[0059] (21) 上述 (12) ~ (20) 的任一项中记载的抗 HCV 抗体,其为人源化抗体。

[0060] (22) 上述 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)、(17)、(18)、(19)、(20) 或 (21) 中记载的抗 HCV 抗体的片段,其将由 HCV 颗粒的 E1 蛋白和 E2 蛋白构成的复合物的立体构造识别为表位,对 HCV 具有感染抑制活性。

[0061] (23) 多核苷酸,其编码上述 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(12)、(13)、(14)、(15)、(16)、(17)、(18)、(19)、(20) 或 (21) 的任一项中记载的抗体或上述 (22) 中记载的抗体的片段。

[0062] (24) 载体,其含有上述 (23) 中记载的多核苷酸。

[0063] 本说明书包含作为本申请的优先权基础的日本专利申请 2009-251165 号、2009-251341 号的说明书和 / 或附图中所记载的内容。

[0064] 发明效果

[0065] 本发明的具有 HCV 感染抑制活性的抗体及其用途可用于丙型肝炎的治疗或预防，还可在为了阐明 HCV 的感染机理的研究中利用。

附图说明

[0066] 图 1 表示给予 J6/JFH-1-HCV 颗粒小鼠血清的 IgG 组分的 HCV 感染抑制活性。

[0067] 图 2 表示单克隆抗体 P18-9E 对 J6CF 感染性 HCV 样颗粒的 HCV 感染抑制活性。

[0068] 图 3 表示单克隆抗体 P19-7D 对 J6CF 感染性 HCV 样颗粒的 HCV 感染抑制活性。

[0069] 图 4 表示单克隆抗体 P18-9E 对 J6/JFH1 感染性 HCV 颗粒的 HCV 感染抑制活性。

[0070] 图 5 表示单克隆抗体 P18-9E 和 P19-7D 的重链及轻链可变区中互补性决定区域 (CDR) 和框架区 (FR) 的氨基酸序列的序列编号。

[0071] 图 6 表示使用将重组 E1 蛋白和 E2 蛋白固相化的板的、单克隆抗体 8D10-3 的酶免疫测定 (EIA) 结果。

[0072] 图 7 表示使用将 HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 固相化的板的、单克隆抗体 8D10-3 和单克隆抗体 P18-9E 的 EIA 结果。

[0073] 图 8 表示使用将 HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 固相化的板的、单克隆抗体 8D10-3 和单克隆抗体 P19-7D 的 EIA 结果。

具体实施方式

[0074] 下面详细说明本发明的实施方式。需要说明的是，本发明可以使用在该领域技术范围内的分子生物学和免疫学的现有技术来实施。这类技术已在文献中充分说明。例如可参照 Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory(第 3 版, 2001) ;Ed Harlow 等人, Antibodies :A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory(1988)。

[0075] 本说明书中引用的所有刊物、专利和专利申请都整体援引到本说明书中作为参考。

[0076] 1. 抗 HCV 抗体及其片段

[0077] 本发明的一种方案是以 HCV 颗粒作为抗原、并具有 HCV 感染的抑制活性的抗 HCV 抗体或其片段。

[0078] 1-1. 抗 HCV 抗体及其片段

[0079] 本发明的“抗 HCV 抗体”是以产自后述的 HCV 嵌合基因组的 HCV 颗粒作为抗原而诱导的抗体，是将 HCV 颗粒的立体构造识别为表位而结合、并且具有抑制其 HCV 感染宿主细胞的活性的所谓中和抗体。本发明的抗 HCV 抗体包含多克隆抗体或单克隆抗体，优选为单克隆抗体。在本说明书中，“单克隆抗体”是指：含有单一的免疫球蛋白、或者其框架区 (Framework region, 下称“FR”) 和互补性决定区域 (Complementarity determining region, 下称“CDR”), 与作为抗原的 HCV 颗粒特异性结合、并且可识别该 HCV 颗粒的多肽。上述免疫球蛋白中, IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD 的各类抗体是已知的, 本发明的抗体可以是任一类, 优选 IgG。

[0080] 本发明的抗 HCV 抗体的具体例子有：重链可变区 (H 链 V 区：下称“VH”) 中包含含

有 SEQ ID NO :18、20 和 22、或者 SEQ ID NO :32、34 和 36 所示的氨基酸序列的 CDR 的抗体。例如,具有包含 SEQ ID NO :13 或者 15 所示的氨基酸序列的 VH 的抗体是适当的。

[0081] 本发明的抗 HCV 抗体的具体例子还有:轻链可变区(L 链 V 区:下称“VL”)中包含含有 SEQ ID NO :25、27 和 29、或者 SEQ ID NO :39、41 和 43 所示的氨基酸序列的 CDR 的抗体。例如,具有包含 SEQ ID NO :14 或者 16 所示的氨基酸序列的 VL 的抗体是适当的。

[0082] 本发明的抗体或者后述的其片段的可变区(下称“V 区”),特别是该区中所含 FR 的氨基酸序列只要保持与 HCV 颗粒的特异性结合活性,可以含有变异。即,FR 的氨基酸序列中可以缺失、取代、插入或者添加 1~5 个、优选 1~4 个、更优选 1~3 个、进一步优选 1 或 2 个氨基酸。其原因是:FR 为构成 V 区的骨格的区域,与抗体的抗原结合特异性不直接相关,因此即使在向该区域引入上述变异的情况下,保持与 HCV 颗粒的特异性结合活性的可能性仍较高。另一方面,向 CDR 导入变异很有可能改变抗原特异性结合活性,通常不优选。然而,向 CDR 导入变异而显著增大抗体的结合活性的例子也是已知的。因此,本发明中上述变异也可以在 CDR 内。在这种情况下,CDR 可以含有 1~3 个、优选 1 或 2 个氨基酸的缺失、取代、插入或者添加。这种变异的导入可以利用后述的噬菌体载体。由于噬菌体载体可迅速且大量地表达导入的抗体,并且有可能在宿主细菌的表面表达足量的抗体分子,因此在进行筛选保持与 HCV 颗粒的特异性结合活性或增大该活性的含有变异的抗体方面是便利的。

[0083] 本发明的“其片段”是指:上述抗 HCV 抗体的部分区域,具有与该抗体所具有的抗原特异性结合活性实质上同等的活性的多肽链或其复合物。例如,包含至少 1 个抗原结合部位的抗体部分,即具有至少 1 个 VL 与至少 1 个 VH 的多肽链或其复合物是适当的。具体例子有:通过用各种肽酶切断免疫球蛋白而产生的多个充分带有特征的抗体片段等。更具体的例子有 Fab、F(ab')₂、Fab' 等。Fab 是通过木瓜蛋白酶在铰链区的较之二硫键靠近 N 末端一侧切断 IgG 分子而产生的片段,由多肽和轻链构成,该多肽由 VH 和构成 H 链 C 区(重链恒定区,下称“CH”)的 3 个结构域(CH1、CH2、CH3)中与 VH 邻接的 CH1 构成。F(ab')₂ 是通过胃蛋白酶在铰链区的较之二硫键靠近 C 末端一侧切断 IgG 分子而产生的 Fab' 的二聚体。Fab' 与 Fab 相比仅含有铰链区的部分 H 链稍长,实质上具有与 Fab 同等的构造(参照 Fundamental Immunology, Paul ed., 第 3 版,1993)。Fab' 可通过将 F(ab')₂ 在温和的条件下还原,切断铰链区的二硫键而获得。这些抗体片段均包含抗原结合部位,具有与抗原(即,本发明中为 HCV 颗粒)特异性结合的能力。

[0084] 本发明的抗 HCV 抗体或其片段可以修饰。此处所称修饰也包含:在本发明的抗体或其片段具有与 HCV 颗粒的特异性结合活性方面必要的功能上的修饰(例如糖基化)、或者在检测本发明的抗体或其片段方面必要的标记。上述抗体标记中例如有:用荧光色素(FITC、罗丹明、Texas Red(德克萨斯红)、Cy3、Cy5)、荧光蛋白(例如 PE、APC、GFP)、酶(例如、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶)、或者生物素或(链霉)抗生物素蛋白进行的标记。另外,本发明抗体的糖基化也可以为了调整抗体对标的抗原的亲合性而改变。这种改变例如可以通过变更抗体序列内的一个以上的糖基化部位来实现。更具体来说,例如,可以通过向构成 FR 内的一个以上的糖基化部位的氨基酸序列中导入一个以上的氨基酸取代来除去该糖基化部位,使该部位的糖基化丧失。这种脱糖基化在增加抗体对抗原的亲合性方面是有效的(美国专利第 5714350 号和美国专利第 6350861 号)。

[0085] 本发明的抗 HCV 抗体或其片段优选具有与 HCV 颗粒的解离常数为 $5.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下,优

选 $1.0\text{e}^{-9}\text{M}$ 以下,更优选 $5.0\text{e}^{-10}\text{M}$ 以下、 $1.0\text{e}^{-10}\text{M}$ 以下、 $5.0\text{e}^{-11}\text{M}$ 以下、 $1.0\text{e}^{-11}\text{M}$ 以下、 $5.0\text{e}^{-12}\text{M}$ 以下或 $1.0\text{e}^{-12}\text{M}$ 以下的高亲和性。上述解离常数可以使用该领域中公知的技术测定。例如,可以通过 BIAcore 系统 (GE Healthcare bioscience 公司制) 用速度评价工具包软件测定。解离常数的测定适当确定即可,正确的测定优选在 0.3M 氯化钠的存在下进行。

[0086] 本发明的抗 HCV 抗体或其片段为来自任意生物的抗体或其片段,优选为来自哺乳动物的抗体或其片段。在为了抑制 HCV 感染而给予人的情况下,希望为人抗体、或者化学合成或用重组 DNA 法合成的重组抗体。这是由于:来自人以外的生物的抗 HCV 抗体的恒定区(下称“C 区”)在人体内具有免疫原性,因此对该抗体诱发免疫反应,无法实现上述目的。

[0087] 本说明书中上述“重组抗体”是指例如嵌合抗体、人源化抗体及合成抗体。

[0088] “嵌合抗体”是指将某抗体的 C 区用其他抗体的 C 区取代而成的抗体。例如,在后述的具有 HCV 感染抑制活性的小鼠单克隆抗体 P18-9E 或 P19-7D 中,将其 C 区取代为人抗体的 C 区而成的抗体是适当的。由此能够减轻人体内对该抗体的免疫反应。本发明的嵌合抗体的更具体的例子有:VL 含有来自抗 HCV 小鼠单克隆抗体的 SEQ ID NO:14 或 16 所示的氨基酸序列、且 L 链 C 区(轻链恒定区;下称“CL”)含有任意的人抗体的 CL 中的氨基酸序列、和/或 VH 含有来自抗 HCV 小鼠单克隆抗体的 SEQ ID NO:13 或 15 所示的氨基酸序列、且 CH 含有任意的人抗体的 CH 中的氨基酸序列的抗体。

[0089] “人源化抗体”也称为重构(reshaped)人抗体,是将人以外的哺乳动物,例如小鼠抗体的 CDR 移植到人抗体的 CDR 中而获得的嵌合抗体。抗体的抗原结合特异性主要由 V 区中的 CDR 群承担。因此,在制作与某种特定的抗体具有同样的结合特性的重组抗体时,不必获得该抗体的全部氨基酸序列,通过使用已有的重组 DNA 技术,制备将编码来自该抗体的各 CDR 区的 DNA 序列取代为编码分别来自人抗体的相应 CDR 的 DNA 序列的嵌合抗体,使其进行表达,可以获得模仿了该特定抗体的性质的重组抗体。制备人源化抗体的一般性基因重组手法也是已知的(欧洲专利申请公开号 EP 125023 号公报)。例如有如下方法:将使小鼠抗体的 CDR 和人抗体的 FR 两者的末端区域具有重叠部分而制作的多个寡核苷酸用作引物,通过 PCR 法合成设计使小鼠抗体的 CDR 与人抗体的 FR 连接的 DNA 序列。本发明中,由于抗 HCV 小鼠单克隆抗体 P18-9E 和 P19-7D 的 CDR 已是清楚的,因此例如可以用后述的方法制作人源化抗体。

[0090] “合成抗体”是指化学合成或者使用重组 DNA 法合成的抗体或抗体片段。例如,介由具有适当长度和序列的连接肽等将特定抗体的一个以上的 VL 和一个以上的 VH 人工连接而成的一聚体多肽分子、或者其多聚体多肽是适当的。这种多肽的具体例子有:单链 Fv(scFv;可变区的单链片段)(参照 Pierce Catalog and Handbook,1994-1995, Pierce Chemical Co., Rockford, IL)、双链抗体(diabody)、三链抗体(triabody)或者四链抗体(tetrabody)等。免疫球蛋白分子中,VL 和 VH 通常位于不同的多肽链(轻链和重链)上。单链 Fv 是将这 2 个多肽链上的 V 区用足够长的柔软性接头连接,具有包含在 1 个多肽链上的构造的合成抗体片段。单链 Fv 内的两个 V 区可以相互自己集合而形成 1 个功能性抗原结合部位。单链 Fv 可以通过使用公知技术将编码它的重组 DNA 插入噬菌体基因组中进行表达而获得。双链抗体是具有以单链 Fv 的二聚体构造为基础的构造的分子(Holliger 等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。例如,在上述接头的长度短于约 12 个氨基酸残基的情况下,单链 Fv 内的 2 个可变部位不能自己集合,通过形成双链抗体,即通过使

2 个单链 Fv 相互作用,一个 Fv 链的 VL 有可能与另一个 Fv 链的 VH 集合,可以形成 2 个功能性抗原结合部位 (Marvin 等人,2005,Acta Pharmacol. Sin. 26 :649-658)。而且,通过在单链 Fv 的 C 末端添加半胱氨酸残基,两个 Fv 链彼此之间可能形成二硫键,也可以形成稳定的双链抗体 (Olafsen 等人,2004,Prot. Engr. Des. Sel. 17 :21-27)。这样,双链抗体是二价的抗体片段,各自的抗原结合部位不必与同一表位结合,可以具有识别并特异性结合各不相同的表位的双重特异性。例如,一个抗原结合部位可以由包含含有 SEQ ID NO :18、20 和 22 所示的氨基酸序列的 CDR(分别相当于 P18-9E 的 VH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3) 的 VH、与包含含有 SEQ ID NO :25、27 和 29 所示的氨基酸序列的 CDR(分别相当于 P18-9E 的 VL 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3) 的 VL 构成,另一个抗原结合部位可以由包含含有 SEQ ID NO :32、34 和 36 所示的氨基酸序列的 CDR(分别相当于 P19-7D 的 VH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3) 的 VH、与包含含有 SEQ ID NO :39、41 和 43 所示的氨基酸序列的 CDR(分别相当于 P19-7D 的 VH 中的 CDR1、CDR2 和 CDR3) 的 VL 构成。三链抗体和四链抗体与双链抗体同样,具有以单链 Fv 构造为基础的其三聚体、及四聚体构造。也可以分别为三价及四价的抗体片段,为多重特异性抗体。而且,上述“其片段”包含使用噬菌体展示文库鉴定的抗体片段(例如参照 McCafferty 等人,1990,Nature 348 卷,552-554)、并且具有抗原结合能力的抗体片段。此外,还希望参照例如 Kubly, J., Immunology, 第 3 版, W. H. Freeman & New York(1998)。

[0091] “HCV 感染”是指 HCV 颗粒结合到宿主细胞的细胞表面,在宿主细胞内增殖后释放到细胞外的过程。因此,本说明书中的“抑制 HCV 感染”是指阻碍或者抑制 HCV 感染的上述一系列过程中的至少一个。优选抑制 HCV 结合到宿主细胞的细胞表面的病毒受体的路径和/或 HCV 基因组侵入宿主细胞内的路径。

[0092] 1-2. 作为抗原的 HCV 颗粒

[0093] 本发明中的抗 HCV 抗体的特征在于:以产自 HCV 嵌合基因组的 HCV 颗粒作为抗原。

[0094] “HCV 颗粒”是指由 HCV 包膜蛋白和其中包装的 HCV 基因组构成的 HCV。

[0095] “HCV 嵌合基因组”是指来自不同的二个以上 HCV 基因组的 HCV 基因组。例如,HCV 基因组通常由从 5' 一侧向 3' 一侧由 5' 非翻译区、核心蛋白编码序列(下称“核心序列”)、E1 蛋白编码序列(下称“E1 序列”)、E2 蛋白编码序列(下称“E2 序列”)、p7 蛋白编码序列(下称“p7 序列”)、NS2 蛋白编码序列(下称“NS2 序列”)、NS3 蛋白编码序列(下称“NS3 序列”)、NS4A 蛋白编码序列(下称“NS4A 序列”)、NS4B 蛋白编码序列(下称“NS4B 序列”)、NS5A 蛋白编码序列(下称“NS5A 序列”)、NS5B 蛋白编码序列(下称“NS5B 序列”)及 3' 非翻译区构成的 RNA 构成。因此,“HCV 嵌合基因组”由构成 HCV 基因组的上述各区域不同的二个以上的来自 HCV 株的区域构成。

[0096] 对构成上述 HCV 嵌合基因组中各区域的不同二个以上的 HCV 株没有特别限定。例如有 JFH-1 株(基因型 2a)、J6CF 株(基因型 2a)或者 TH 株(基因型 1b)。另外,对构成嵌合基因组的各区域来自哪个 HCV 株、以及其组合没有特别限定。具体来说,HCV 嵌合基因组例如可以使 (i) 5' 非翻译区、核心序列、E1 序列、E2 序列、p7 序列及 NS2 序列来自 JFH-1 株以外的毒株,且 (ii) NS3 序列、NS4A 序列、NS4B 序列、NS5A 序列、NS5B 序列及 3' 非翻译区来自 JFH-1 株。或者,也可以使 (i) 5' 非翻译区、核心序列、E1 序列、E2 序列及 p7 序列来自 JFH-1 株以外的毒株,且 (ii) NS2 序列、NS3 序列、NS4A 序列、NS4B 序列、NS5A 序列、NS5B 序列及 3' 非翻译区来自 JFH-1 株。

[0097] 在一个实施方案中,HCV 嵌合基因组为从 5' 一侧向 3' 一侧使 (i) 5' 非翻译区、核心序列、E1 序列、E2 序列及 p7 序列来自 J6CF 株,且 (ii) NS2 序列、NS3 序列、NS4A 序列、NS4B 序列、NS5A 序列、NS5B 序列及 3' 非翻译区来自 JFH-1 株的嵌合基因组。优选为使 (i) 5' 非翻译区、核心区域、E1 区域、E2 区域、p7 区域、NS2 区域的编码 N 末端一侧的 16 位氨基酸残基为止的序列来自 J6CF 株,且 (ii) NS2 区域的编码自 N 末端一侧数 17 位以后的氨基酸残基的序列、NS3 区域、NS4A 区域、NS4B 区域、NS5A 区域、NS5B 区域及 3' 非翻译区来自 JFH-1 株的嵌合基因组。该嵌合基因组被克隆至由 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列构成的 J6/JFH-1 中。还可以为使 5' 非翻译区来自 JFH-1 株,核心序列、E1 序列、E2 序列及 p7 序列来自 TH 株 (Wakita, T. 等人, J. Biol. Chem., 269, 14205-14210, 1994, 日本特开 2004-179), 且 NS2 序列、NS3 序列、NS4A 序列、NS4B 序列、NS5A 序列、NS5B 序列及 3' 非翻译区来自 JFH-1 株的嵌合基因组,优选为使 5' 非翻译区来自 JFH-1 株,核心序列、E1 序列、E2 序列、p7 蛋白及 NS2 区域的编码 N 末端一侧 33 位为止的氨基酸残基的序列来自 TH 株,NS2 区域的编码自 N 末端一侧数 34 位以后的氨基酸残基的序列、NS3 序列、NS4A 序列、NS4B 序列、NS5A 序列及 NS5B 序列以及 3' 非翻译区来自 JFH-1 株的嵌合基因组。

[0098] 在另一个实施方案中,通过将本说明书中记载的产自 HCV 嵌合基因组的 HCV 颗粒用后述的方法灭活,也可以用作疫苗。通过将该疫苗按照该领域中公知的方法对人接种,有可能在接种者的体内直接制造本发明的抗 HCV 抗体。

[0099] 1-3. HCV 颗粒的制备

[0100] 本发明中用作抗原的感染性 HCV 颗粒可以用细胞培养系制备。这种基本技术记载在 WO 04104198A1;WO 06022422A1;WO 06096459A2;Wakita, T. 等人, Nat. Med. 11: 791-796, 2005;Lindenbach, BD. 等人, Science 309:623-626, 2005 及 Pietschmann, T. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103:7408-7413, 2006 中。下面具体说明感染性 HCV 颗粒的制备。

[0101] 1-3-1. HCV 嵌合基因组

[0102] HCV 颗粒的制备中可以使用上述“1-2. 作为抗原的 HCV 颗粒”项中记载的 HCV 嵌合基因组。例如,可以使用具有 SEQ ID NO:2 所示的核苷酸序列的核酸。另外,使用的 HCV 嵌合基因组也可以是 RNA 或 DNA。不过,在核酸为 RNA 的情况下,上述核苷酸序列中的“胸腺嘧啶 (T)”改读为“尿嘧啶 (U)”。本说明书中,关于其他核苷酸序列,以下也同样。

[0103] 1-3-2. HCV 嵌合基因组 RNA 的制备

[0104] HCV 颗粒可以如下制备:由将完全长度的 HCV 嵌合基因组 RNA 的 cDNA 以能够表达的方式连接至转录启动子下游的表达载体(例如,在 T7 启动子的控制下插入了 HCV 嵌合基因组的载体)合成 HCV 嵌合基因组 RNA,将该基因组 RNA 导入宿主细胞。基因组 RNA 的合成使用该领域中公知的技术即可。例如,在使用前述的表达载体的情况下,可以通过体外 RNA 合成法合成基因组 RNA。利用体外 RNA 合成法的各种试剂盒由生命科学相关的各制造商销售(例如,Ambion 公司的 MEG Ascript T7 试剂盒),因此也可以利用它们进行合成。

[0105] 1-3-3. 宿主细胞

[0106] 导入合成的 HCV 嵌合基因组 RNA 的宿主细胞只要允许形成 HCV 颗粒即可,没有特别限定。例如有 Huh7、HepG2、IMY-N9、HeLa、HEK293 等培养细胞,更优选 Huh7 等来自肝脏的培养细胞,进一步优选 Huh7 的衍生株 Huh7.5、Huh7.5.1。本发明中“衍生株”是指由某种

培养细胞诱导的不同细胞株。另外,在 Huh7、HepG2、IMY-N9、HeLa 或 HEK293 中还可以使用表达了 CD81 基因和 / 或 Claudin1 基因的细胞。

[0107] 1-3-4. 向宿主细胞导入 HCV 嵌合基因组 RNA 的方法

[0108] 将 HCV 嵌合基因组 RNA 导入上述宿主细胞的方法可以使用公知的任意方法。例如有磷酸钙共沉淀法、DEAE 葡聚糖法、脂质转染法、显微注射法、电穿孔法,优选脂质转染法和电穿孔法,更优选电穿孔法。

[0109] 导入了 HCV 嵌合基因组 RNA 的宿主细胞中病毒颗粒的产生能力可以通过该领域公知的技术进行评价。例如,可以使用针对构成释放到培养液中的 HCV 颗粒的蛋白(例如核心蛋白、E1 蛋白或 E2 蛋白)的抗体,通过 ELISA(酶联免疫吸附测定)法或者蛋白质印迹法等确认。另外,通过使用特异性引物的 RT-PCR 法将培养液中的 HCV 颗粒所含的 HCV 嵌合基因组 RNA 扩增来检测,也可以间接地检测 HCV 颗粒的存在。

[0110] 1-3-5. HCV 颗粒的感染能力的验证

[0111] 制备的 HCV 颗粒是否具有感染能力可以通过该领域中公知的病毒感染的评价方法来确认。例如可以如下判断:将培养导入了 HCV 嵌合基因组 RNA 的细胞而获得的上清液进一步添加至新的 HCV 允许细胞(例如 Huh7)中,之后培养适当的时间(例如 48 小时)。然后,充分洗涤该细胞,用识别抗核心抗体等 HCV 特异性蛋白的抗体免疫染色,对感染细胞数进行计数;或者由上述细胞提取蛋白,将提取物通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳后,通过蛋白质印迹法检测 HCV 特异性蛋白。

[0112] 1-3-6. HCV 颗粒的纯化

[0113] 所得 HCV 颗粒用作抗原前优选进行纯化。HCV 颗粒的纯化可以如下实现:由培养上述导入了 HCV 嵌合基因组 RNA 的细胞而获得的、含有感染性 HCV 颗粒的溶液(病毒液)除去细胞和 / 或细胞残渣,之后,将柱色谱法和密度梯度离心分别单独进行或按任意的顺序组合进行。细胞及其残渣的除去使用离心和 / 或过滤器等进行即可。根据需要,上述除去了残渣的病毒液也可以进一步用截留分子量 100,000 ~ 500,000 的超滤膜浓缩至 10 ~ 100 倍左右。

[0114] 上述柱色谱法例如有凝胶过滤色谱法、离子交换色谱法及亲和色谱法。优选的凝胶过滤色谱法为以烯丙基葡聚糖和 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺的交联聚合物作为凝胶基质的色谱法。更优选由 Sephacryl(注册商标)S-300、S-400 和 S-500 构成的色谱法。离子交换色谱法有使用 Q-Sepharose(注册商标)作为阴离子交换树脂、和使用 SP Sepharose(注册商标)作为阳离子交换树脂的方法。亲和色谱法中作为配体,可以将选自肝素、硫酸化 Cellulofine、凝集素及各种色素的基质结合而成的树脂用作载体。优选利用 HiTrap Heparin HP(注册商标)、HiTrap Blue HP(注册商标)、HiTrap Benzamidine FF(注册商标)和硫酸化 Cellulofine 以及 LCA、ConA、RCA-120 和 WGA 结合而成的载体。更优选通过将硫酸化 Cellulofine 用作载体的亲和色谱法来纯化 HCV 颗粒,该方法可以将纯化前和纯化后溶液中的总蛋白量与 HCV 的 RNA 拷贝数的比率纯化至 30 倍以上。

[0115] 作为密度梯度离心中形成密度梯度的溶质,可以使用氯化铯、蔗糖、Nycodenz(注册商标)以及 Ficoll(注册商标)和 Percoll(注册商标)等糖聚合物。优选蔗糖。作为密度梯度离心中使用的溶剂,可以使用水或者磷酸缓冲液、Tris 缓冲液、乙酸缓冲液或甘氨酸缓冲液等缓冲液。通过密度梯度离心进行纯化时的离心力优选为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9 g$,更

优选为 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7 \text{g}$, 进一步优选为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5 \text{g}$ 。

[0116] 纯化上述 HCV 颗粒时的温度优选 $0 \sim 40^\circ\text{C}$, 更优选 $0 \sim 25^\circ\text{C}$, 进一步优选 $0 \sim 10^\circ\text{C}$ 。

[0117] 在将密度梯度离心和柱色谱法组合进行纯化的情况下, 优选通过多个柱色谱法纯化后使用密度梯度离心的组合。更优选将使用阴离子交换柱、之后用亲和色谱法获得的含 HCV 颗粒的组分用密度梯度离心进行纯化的组合, 进一步优选将通过使用 Q-Sepharose (注册商标) 的柱色谱法获得的含 HCV 颗粒的组分用使用硫酸 Cellulofine 的柱色谱法进一步纯化, 将所得含 HCV 颗粒的组分用密度梯度离心纯化的组合。需要说明的是, 在柱色谱法和密度梯度离心的步骤之间或之后, 可以通过使用透析或超滤进行含 HCV 颗粒的溶液的溶质置换和 / 或 HCV 颗粒的浓缩。

[0118] 1-3-7. HCV 颗粒的灭活

[0119] 本发明的抗 HCV 抗体的制作中, 在给予人以外的动物的情况下, 用作抗原的 HCV 颗粒的灭活处理不是必须的。然而, 从防止感染操作者的角度来看, 优选灭活。另外, 在将产自上述 HCV 嵌合基因组的 HCV 颗粒作为疫苗给予人的情况下, 该灭活处理是必须的。作为将 HCV 颗粒灭活的方法, 可以通过将福尔马林、 β -丙内酯、戊二醛等灭活剂例如添加到含有感染性 HCV 颗粒的病毒液中充分混合来实现 (Appaiahgari 等人, Vaccine, 22 :3669-3675, 2004)。还可以通过对含有感染性 HCV 颗粒的病毒液照射紫外线, 使 HCV 的感染性迅速丧失。从对构成 HCV 的蛋白等的影响小的角度来看, 用紫外线照射进行灭活的方法是优选的。紫外线的线源可以使用一般市售的杀菌灯, 特别是 15W 杀菌灯, 但并不限于此。优选可以通过用 $20\text{mW}/\text{cm}^2$ 的紫外线将含感染性 HCV 颗粒的溶液在室温下照射 5 分钟以上来灭活感染性 HCV 颗粒。另外, 本灭活方法不受纯化、未纯化等状态限制。

[0120] 1-4. 抗 HCV 抗体的制备

[0121] 1-4-1. 对动物的免疫

[0122] 本发明的抗体可以通过将 HCV 颗粒给予动物, 由免疫反应诱导来获得。作为免疫所用的动物, 只要是可产生有可能制作杂交瘤的抗体产生细胞的非人动物即可, 没有特别限定。例如, 可以使用非人哺乳动物, 更具体为小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、山羊、驴、羊、骆驼和马等。本发明在下面将举出使用小鼠的方法作为例子。

[0123] 将通过上述方法获得的 HCV 颗粒作为抗原 (免疫原) 对 4 ~ 10 周龄的小鼠进行免疫, 根据需要, 可以变更、省略 HCV 颗粒的纯化步骤, 也可以省略 HCV 颗粒的灭活。

[0124] 将作为免疫原的 HCV 颗粒溶解于缓冲液中制备免疫原溶液。此时, 为了有效地进行免疫, 必要时可以添加佐剂。佐剂例如可以将弗氏完全佐剂 (下称“FCA”)、弗氏不完全佐剂 (下称“FIA”)、氢氧化铝凝胶、百日咳菌疫苗、Titer Max Gold (Vaxel 公司)、GERBU 佐剂 (GERBU Biotechnik 公司)、MPL (Monophosphoryl Lipid A, 单磷酸类脂 A) + TDM (synthetic trehalose dicorynomycolate) (Sigma 佐剂体系; Sigma 公司) 等单独或混合使用。

[0125] 接着, 将上述制备的免疫原溶液给予小鼠 (例如近交系小鼠的 BALB/c) 进行免疫。免疫原溶液的给予方法例如有: 使用 FIA 或 FCA 的皮下注射、使用 FIA 的腹腔内注射、或者使用 0.15mol/L 氯化钠的静脉注射, 但不限于此。免疫原的 1 次给予量是根据免疫动物的种类、给予途径等适当决定的, 通常按每只动物约 $50 \sim 200 \mu\text{g}$ 即可。另外, 对免疫的间隔没有特别限定, 间隔数天至数周, 优选间隔 1 ~ 4 周。优选在初次免疫后进行追加免疫, 其

次数为 2 ~ 6 次, 优选 3 ~ 4 次。优选在初次免疫之后, 由免疫小鼠的眼底静脉丛或尾静脉采血, 通过 ELISA 法等测定血清中的抗体效价。还可同时测定感染抑制活性。如果抗体效价达到稳定, 将免疫原溶液注射到静脉内或腹腔内, 作为最终免疫即可。最终免疫中优选不使用佐剂。在最终免疫后第 3 ~ 10 天, 优选第 4 天, 由免疫小鼠采血, 通过按公知的方法 (Antibodies :A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) 处理血清可以获得多克隆抗体。需要说明的是, 关于免疫的动物是否产生具有本发明的 HCV 感染抑制活性的抗 HCV 抗体, 优选在最终免疫之前, 通过前述“1-3-5. HCV 的感染能力的验证”及后述的“1-4-6. 抗 HCV 抗体的选择”中记载的方法预先加以确认。

[0126] 1-4-2. 产生抗 HCV 单克隆抗体的杂交瘤细胞的制作

[0127] 在制作抗 HCV 单克隆抗体的情况下, 产生该抗体的杂交瘤例如可以通过下面记载的方法制作。

[0128] 首先, 由上述免疫的小鼠采集抗体产生细胞。抗体产生细胞有脾细胞、淋巴结细胞、末梢血细胞等, 优选脾细胞或局部淋巴结细胞。接着, 通过进行抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合, 可以制作生产抗 HCV 单克隆抗体的杂交瘤。细胞融合中使用的骨髓瘤细胞为来自小鼠的确立细胞株, 可在体外增殖的骨髓瘤细胞即可, 没有特别限定, 为了在后述的步骤中简便地选拔杂交瘤, 优选具有药剂选择性、在未融合的状态下在选择培养基 (例如 HAT 培养基, 即, 向 Dulbecco's 改良 MEM 培养基 (下称“DMEM”) 中加入了 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 2- 巯基乙醇、100 单位 /mL 青霉素、 $100 \mu \text{g/mL}$ 链霉素及 10% 胎牛血清 (下称“FCS”)、 10^{-4}M 次黄嘌呤、 $1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ 胸苷及 $4 \times 10^{-7} \text{M}$ 氨基蝶呤的培养基) 中无法生存、仅在与抗体产生细胞融合的状态下具有可生育性质的骨髓瘤细胞。例如, 可以使用 8- 氮鸟嘌呤耐性小鼠 (来自 BALB/c) 骨髓瘤细胞株 P3-X63Ag8-U1 (P3-U1)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、P3-X63-Ag8653 (653)、P3-X63-Ag8 (X63)、P3/NS1/1-Ag4-1 (NS1) 等。这些细胞株可购自理化研究所生物资源中心、ATCC (American Type Culture Collection, 美国模式培养物保藏中心) 或者 ECACC (European Collection of Cell Cultures, 欧洲细胞培养物保藏中心), 关于这些细胞株的培养和继代, 按照公知的方法 (例如 Antibodies :A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Selected Methods in Cellular Immunology W. H. Freeman and Company, 1980) 培养即可。

[0129] 使上述抗体产生细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合时, 将上面获得的脾细胞和骨髓瘤细胞洗涤之后, 在不含血清的 DMEM 培养基、RPMI1640 培养基等动物细胞培养用培养基中, 将抗体产生细胞与骨髓瘤细胞按约 1 : 1 ~ 20 : 1 的比例混合, 在细胞融合促进剂的存在下进行融合反应即可。作为细胞融合促进剂, 可以将平均分子量 1, 500 ~ 4, 000Da 的聚乙二醇 (下称“PEG”) 等以约 10 ~ 80% 的浓度使用。通常, 优选使用平均分子量 1, 500Da 的 PEG。为了提高融合效率, 也可以根据需要结合使用二甲基亚砜等辅助剂。还可以使用利用了电刺激 (例如电穿孔) 的市售细胞融合装置使抗体产生细胞与骨髓瘤细胞融合 (Nature, 1977, 266 卷, 550-552)。

[0130] 细胞融合处理后, 用骨髓瘤细胞的培养中使用的培养基 (例如向 DMEM 培养基中加入了 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 2- 巯基乙醇、100 单位 /mL 青霉素、 $100 \mu \text{g/mL}$ 链霉素及 10% FCS 的培养基) 洗涤细胞, 之后制备细胞悬浊液, 接着将细胞悬浊液用例如含有 FCS 的 RPMI1640 培养基等适当稀释, 之后按 2×10^6 个 / 孔左右加入 96 孔板中, 向各孔中加入选择培养基, 以后适当

地交换选择培养基进行培养即可。培养温度为 20 ~ 40℃, 优选约 37℃。在骨髓瘤细胞为 HGPRT 缺失株或胸苷激酶 (TK) 缺失株的情况下, 通过使用含有次黄嘌呤、氨基蝶呤及胸苷的选择培养基 (HAT 培养基), 可以仅选择性生育、增殖抗体产生细胞与骨髓瘤细胞的杂交瘤, 因此可以将开始在选择培养基中培养后约 10 天前生育的细胞选作杂交瘤。

[0131] 1-4-3. HCV 感染抑制活性试验

[0132] 关于上述杂交瘤产生的抗体有无 HCV 感染抑制活性, 可以通过下面例示的方法、以及后述的实施例中所述的使用感染性 HCV 颗粒的方法进行评价。例如, 首先, 培养上述产生抗 HCV 单克隆抗体的杂交瘤, 之后采集培养上清液的一部分作为抗体样品。将该抗体样品与前述的感染性 HCV 颗粒混合, 在 37℃ 下反应 1 小时 (混合样品)。接着, 向前一天在 96 孔板中按 5×10^3 个 / 孔培养的 Huh7 细胞中加入 50 μ L 上述混合样品, 在 37℃ 下培养 2.5 小时。培养后除去培养液和混合样品, 用 PBS 洗涤细胞后再加入新鲜培养基继续培养。48 小时后, 除去培养液, 用 PBS 洗涤 1 次后加入 100 μ L ISOGEN (Nippon Gene 公司), 由细胞制备 RNA。定量 RNA 后测定 HCV 基因组 RNA 量。用定量 RT-PCR 进行的 HCV RNA 的检测按照 Takeuchi 等的方法 (Gastroenterology, 116 : 636-642, 1999) 检测 HCV RNA 的 5' 非翻译区的 RNA 即可。

[0133] 评价 HCV 感染抑制活性的其他方法有如下方法。首先, 将得自产生抗 HCV 单克隆抗体的杂交瘤株的抗体样品与感染性 HCV 颗粒混合, 在 37℃ 下反应 1 小时 (混合样品)。接着, 向前一天在 96 孔板中按 1×10^4 个 / 孔培养的 Huh7 细胞中加入 50 μ L 上述混合样品, 在 37℃ 下培养 2.5 小时。培养后除去培养液及混合样品, 用 PBS 洗涤细胞后再加入新鲜培养基继续培养。72 小时后, 除去培养液, 之后将板浸入冰冷却的甲醇中固定细胞。之后, 风干除去甲醇, 用含 0.3% Triton (注册商标)-X100 的 Block Ace (注册商标) (大日本制药公司) 进行细胞的可溶化处置。然后, 用克隆 2H9 抗 HCV- 核心抗体 (参照 Nat. Med. (2005) 11 : p791-6.) 及山羊抗小鼠 IgG-Alexa488 (Molecular Probe 公司) 将 HCV 感染细胞在荧光显微镜下计数, 可以将抑制了 HCV 感染的孔的抗体样品选作具有 HCV 感染抑制活性的抗 HCV 单克隆抗体。

[0134] 作为其他方法, 也可以使用通过在逆转录病毒颗粒上提呈功能性 HCV 包膜蛋白而制作的感染性 HCV 样颗粒 (下称“HCVpp”) 来代替感染性 HCV 颗粒, 进行 HCV 感染抑制活性试验。通过向该 HCVpp 中包装绿色荧光蛋白 (GFP) 标记基因或荧光素酶基因, 有可能以高可靠性迅速地测定 HCV 包膜蛋白介导的感染 (Bartosch, B. 等人, J. Exp. Med. 197 : 633-642, 2003)。具体来说, 例如, 具有基因型 2a 的包膜蛋白的 HCVpp 可以如下获得 : 通过使用 FuGENE6 (Roche 公司 : 目录号 11814443001), 将编码基因型 2a 的 HCV 株即 J6CF 株的蛋白 (NCBI 蛋白质登录号 AAF01178.1) 的 132 位的氨基酸残基至 750 位的氨基酸残基 (相当于核心蛋白的一部分、E1 蛋白和 E2 蛋白) 的核酸克隆至 pcDNA3.1 的载体“pcDNA J6dC-E2”、将编码小鼠白血病病毒的 gag 和 pol 的基因克隆化的表达载体“Gag-Pol 5349”、以及将荧光素酶基因克隆化的逆转录病毒载体“Luc126”转染到 HEK 293T 细胞 (ATCC CRL-1573) 后, 回收含 HCVpp 的培养液, 用 0.45 μ m 的薄膜过滤器过滤而获得。

[0135] 在制作携带有基因型 1a 的包膜蛋白的 HCVpp 的情况下, 使用将编码基因型 1a 的 HCV 株即 H77 株的蛋白 (NCBI 蛋白登录号 AAB67036.1) 的 132 位的氨基酸残基至 746 位的氨基酸残基 (相当于核心蛋白的一部分、E1 蛋白和 E2 蛋白) 的核酸克隆至 pcDNA3.1 的载

体“pcDNA H77dC-E2”代替上述的 pcDNA J6dC-E 即可。

[0136] 在制作携带有基因型 1b 的包膜蛋白的 HCVpp 的情况下,使用将编码基因型 1b 的 HCV 株即 TH 株的蛋白(Wakita, T. 等人, J. Biol. Chem., 269, 14205-14210, 1994) 的 132 位的氨基酸残基至 747 位的氨基酸残基(相当于核心蛋白的一部分、E1 蛋白和 E2 蛋白)的核酸克隆至 pcDNA3.1 的载体“pcDNA THdC-E2”代替上述的 pcDNA J6dC-E 即可。

[0137] 例如,将得自产生抗 HCV 单克隆抗体的杂交瘤株的抗体样品与 HCVpp 混合,在 37℃ 下反应约 30 分。抗体样品的稀释用 DMEM 培养基(含有 10% FCS、1% MEM 非必需氨基酸溶液、10mM HEPES-Tris(pH7.3)、1mM 丙酮酸钠)进行。将 Huh7.5.1 细胞在 96 孔板中按 1×10^4 细胞/孔培养一天,向各孔中加入上述 HCVpp 与抗体样品的混合液,在 37℃ 下培养约 3 小时。培养后除去样品,用 PBS 洗涤细胞 1 次,之后加入新鲜培养基继续培养。约 72 小时后,除去培养液。用 PBS 洗涤 4 次左右,之后分别按 25 μ L/孔加入无血清 DMEM 培养基和溶解缓冲液(例如可以使用 Steady-Glo(Promega 公司:目录号 E2520)),溶解细胞(使用试剂盒时,原则上按照所附的使用说明书),将细胞的溶解液按 40 μ L/孔移至白色的 96 孔板(例如住友 Bakelite 公司:目录号 MS-8496W),使用例如 ARVO X4(PerkinElmer 公司)的可测定荧光的装置测定发光强度。以与 DMEM 混合时的发光强度(%)作为感染率 100%,可以求出与抗体样品混合时的感染率(%)。因此,可以将因添加抗体样品而感染率降低(即发光强度减弱)的抗体样品作为具有 HCV 感染抑制活性的抗 HCV 单克隆抗体。

[0138] 需要说明的是,产生本发明抗体的杂交瘤只要是通过上述方法选择的杂交瘤即可,没有特别限定。具体的例子有例如后述的产生本发明的具有 HCV 感染抑制活性的单克隆抗体“P18-9E”或“P19-7D”的杂交瘤株。

[0139] 1-4-4. 抗 HCV 抗体的制备

[0140] 将上面选择的杂交瘤在无血清培养基,例如 Hybridoma-SFM(Invitrogen 公司)中驯化,可以将培养的上清液作为抗 HCV 抗体样品(抗 HCV 单克隆抗体样品)。培养中可以使用培养瓶(flask)、培养皿(dish)、旋动培养瓶、转瓶或者高密度培养的培养瓶 CELLline(Becton Dickinson 公司)。

[0141] 在使用动物制备单克隆抗体的情况下,对降植烷处理(腹腔内给予 0.5mL 2,6,10,14-四甲基十五烷(降植烷)后饲养 2 周)过的 8~10 周龄小鼠、裸鼠或 SCID 小鼠按 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$ 细胞/匹腹腔内注射上面选择的产生抗 HCV 单克隆抗体的杂交瘤细胞。在 10~21 天期间杂交瘤腹水癌化。由该小鼠采集腹水,可以将其作为抗 HCV 单克隆抗体样品。将所得抗体样品离心,除去细胞或其破碎物,单独或者组合使用以 40~50%饱和硫酸铵进行的盐析、辛酸沉淀法、DEAE-琼脂糖柱、Protein A 柱、Protein G 柱、HiTrap IgM Purification HP 柱(GE Healthcare 公司)、甘露聚糖结合性蛋白柱(Pierce 公司)或者凝胶过滤柱等,回收 IgG 或者 IgM 组分,可以获得纯化抗 HCV 单克隆抗体。纯化单克隆抗体的亚型的确定也可以使用小鼠单克隆抗体分型试剂盒(Pierce 公司)等来进行。本发明的具有 HCV 感染抑制活性的抗体的类别没有特别限定,优选为 IgG 或者 IgM,更优选为 IgM 的抗体。

[0142] 1-4-5. 抗 HCV 人源化抗体的制作

[0143] 抗 HCV 人源化抗体中,选择 CDR 可形成良好的抗原结合部位的人抗体的 FR。也可以根据需要,取代抗体的 V 区中 FR 的氨基酸,使重构人抗体的互补性决定区域形成适当的

抗原结合部位 (Sato, K., 等人, Cancer Res. 53 :851-856, 1993)。

[0144] 在制作本发明的抗 HCV 人源化抗体的情况下, 作为一个例子, 首先, 由产生抗 HCV 单克隆抗体的杂交瘤等提取 mRNA, 合成编码 VH 和 VL 的 cDNA。将合成的 cDNA 插入噬菌体或者质粒等载体中, 制作 cDNA 库。将小鼠抗体的 C 区部分或者 V 区部分用作探针, 由 cDNA 库分别分离具有编码 VH 的 cDNA 的重组噬菌体或者重组质粒、及具有编码 VL 的 cDNA 的重组噬菌体或者重组质粒。确定重组噬菌体或者重组质粒上的目标抗体的 VH 和 VL 的全核苷酸序列, 由核苷酸序列推定 VH 和 VL 的全氨基酸序列。

[0145] 作为其他方法, 使用 PCR 克隆编码 VH 和 VL 的 cDNA 也是可能的。以如前所述制备的杂交瘤的 cDNA 作为模板, 使用基于各自的基因中保存的氨基酸序列而设计的多个引物进行扩增, 将其 cDNA 片段克隆至克隆载体, 可以获得编码 VH 和 VL 的 cDNA。

[0146] 通过在编码人抗体的 CH 和 CL 的基因的上游插入编码上述抗 HCV 抗体的 VH 和 VL 的 cDNA, 可以构建编码人抗 HCV 单克隆抗体的 cDNA。CH 中可以使用 C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4, CL 中可以使用 C κ 、C λ 。另外, 为了改善抗体或其产生的稳定性, 也可以修饰 C 区。

[0147] 在以哺乳动物细胞作为宿主的情况下, 可以使用能够在哺乳动物细胞中表达的启动子、抗体基因以及其 3' 末端的下流功能性结合有 PolyA 信号的表达载体来表达该基因。可以使用的启动子例如有: 人巨细胞病毒、逆转录病毒、多瘤病毒、腺病毒、猿病毒 40 (SV40) 等病毒启动子 / 增强子、或者延伸因子 1 α (EF1 α) 等来自哺乳细胞的启动子 / 增强子等。

[0148] 在以大肠杆菌作为宿主的情况下, 可以使用能够在大肠杆菌中表达的启动子、用于抗体分泌的信号序列和抗体基因功能性结合的表达载体来表达该基因。启动子例如有 lacZ 启动子、araB 启动子、Trp 启动子、T7 启动子等。

[0149] 在以昆虫细胞作为宿主的情况下, 可以使用能够在昆虫细胞中表达的启动子、要表达的抗体基因以及其 3' 末端的下流功能性结合有 PolyA 信号的表达载体来表达该基因。可使用的启动子例如有多角体蛋白启动子、来自杆状病毒 OpNMPV 的极早期 OpIE2 启动子等。

[0150] 本发明中的抗 HCV 人源化抗体通过按照常规方法, 在适当条件下培养含有表达该抗体的上述表达载体的宿主细胞, 在其培养液上清或者宿主细胞内产生。具体来说, 例如, 在以哺乳动物的培养细胞作为宿主的情况下, 通过向 DMEM 培养基中以 1×10^5 细胞 / mL 接种宿主细胞, 在 37°C 的 5% CO₂ 培养箱中培养, 可以获得含有抗体的培养液上清。另外, 例如, 在以大肠杆菌作为宿主细胞的情况下, 通过接种到 LB 培养基等大肠杆菌培养所用的一般培养基中进行培养, 诱导蛋白的表达, 可以在培养液上清或者宿主细胞内产生抗体。

[0151] 需要说明的是, 通过使用 Protein A 柱、Protein G 柱、抗免疫球蛋白抗体亲和柱等对 C 区进行选择, 可以从培养液上清或细胞破碎液中纯化、回收目标抗 HCV 人源化抗体。

[0152] 1-4-6. 抗 HCV 抗体的选择

[0153] 为了选择本发明的抗 HCV 抗体, 将 HCV 的蛋白固定 (固相化) 于载体上, 接着加入样品抗体, 在足以形成抗体 / 抗原复合物的时间和条件下进行反应。接着, 为了检测形成的复合物, 使其与二次抗体 (即识别结合了作为信号的酶、色素或放射性同位素的样品抗体的抗体) 接触, 形成第 2 混合物。使第 2 混合物在足以形成抗体 / 抗原复合物的时间和条件下反应。由此, 通过酶、色素或放射性同位素的信号来检测识别 HCV 蛋白的抗体的存在。

[0154] 作为固相化于载体上的 HCV 的蛋白,可以使用 HCV 颗粒本身,也可以使用由 HCV 基因组中的核心序列、E1 序列、E2 序列、p7 序列、NS2 序列、NS3 序列、NS4A 序列、NS4B 序列、NS5A 序列或者 NS5B 序列构成的 cDNA 在大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞等中表达的编码这些区域的蛋白,还可以化学合成该蛋白使用。固相化中使用的蛋白的氨基酸残基的长度没有限定,为 3 个氨基酸残基以上,优选 8 个氨基酸残基以上即可。

[0155] 下面示出在哺乳动物细胞中表达 JFH-1 株或 J6CF 株的包膜蛋白即 E1 蛋白和 E2 蛋白的例子。JFH-1 株或 J6CF 株 (JFH1 株:NCBI 蛋白登录号 BAB32872、J6CF 株:NCBI 蛋白登录号 AAF01178.1) 的 E1 蛋白在以 JFH-1 株全长蛋白的氨基酸序列的起始甲硫氨酸作为第 1 位的情况下,为始自 192 位的氨基酸残基止于 383 位的氨基酸残基。该 E1 蛋白的 353 位的氨基酸残基至 383 位的氨基酸残基被认为是跨膜域(也称 C 末端疏水性区域)(Cocquerel, L. 等人, J. Virol. 74 :3623-3633, 2000)。

[0156] JFH-1 株或 J6CF 株的 E2 蛋白为始自上述氨基酸序列的 384 位的氨基酸残基止于 750 位的氨基酸残基。该 E2 蛋白的 722 位的氨基酸残基至 750 位的氨基酸残基被认为是跨膜域(Cocquerel, L. 等人, J. Virol. 74 :3623-3633, 2000)。

[0157] 利用哺乳动物细胞使蛋白在培养上清液中分泌表达的情况下,该蛋白需要携带信号肽,不具有跨膜域。

[0158] 因此,E1 蛋白和 E2 蛋白的不含跨膜域的蛋白分别由上述的 192 位至 352 位的氨基酸残基、及 384 位至 721 位的氨基酸残基构成,如果在性质上等价,氨基酸移位也没有问题。在 JFH-1 株的 E1 蛋白的情况下,若为 192 位至 352 位的氨基酸残基内的序列,在 E2 蛋白的情况下,若为 384 位至 720 位的氨基酸残基内的序列、优选 384 位至 714 位的氨基酸残基内的序列,则可以用作不含跨膜域的蛋白。另外,在 J6CF 株的 E1 蛋白的情况下,若为 192 位至 352 位的氨基酸残基内的序列,在 E2 蛋白的情况下,若为 384 位至 720 位的氨基酸残基内的序列,则可以用作不含跨膜域的蛋白。在将这些氨基酸残基的编号适用于其他 HCV 株的氨基酸序列的情况下,在与上述 JFH-1 全长蛋白的氨基酸序列的序列对比中以对应的氨基酸残基的编号指定即可。

[0159] 编码不含 E1 蛋白和 E2 蛋白的跨膜域的蛋白的核酸可以基于 GenBank 中记载的 JFH-1 株的核酸序列(NCBI 核苷酸登录号 AB047639),以 JFH-1 株的 cDNA 为模板通过 PCR 合成,或者通过全合成制作。

[0160] JFH-1 株以外的 HCV 株的对应 E1 蛋白和 E2 蛋白的区域能够如下容易地确定:边考虑取代或缺失其 HCV 株的序列,边进行整列(序列对比)以使与 JFH-1 株的序列相比序列间一致的序列最大。该分析可以使用基因信息处理软件(例如 GENETYX, Software 开发株式会社)进行。

[0161] 使不含 E1 蛋白和 E2 蛋白的跨膜域的蛋白在哺乳动物细胞中分泌表达时,在密码子的读框符合的状态(符合读框)下将编码该蛋白的核酸连接到编码信号肽的核酸的下游,再在其 3' 末端添加终止密码子插入表达载体中。信号肽由分泌蛋白的 N 末端存在的 15 ~ 30 个氨基酸残基、主要为疏水性氨基酸构成,参与蛋白的细胞膜通透机制。

[0162] 可用于在哺乳动物细胞中分泌表达蛋白的信号肽是分泌蛋白的信号肽即可。作为携带信号肽的载体,例如有携带小鼠 GM-CSF 的信号肽序列的载体(日本特开昭 63-276490)、携带 IgG κ 链的信号肽序列的载体 pSecTag/FRT/V5-His(Invitrogen 公

司)、携带前胰蛋白酶原的信号肽序列的载体 p3XFLAG-CMV13(Sigma 公司)、携带 IL-2 的信号肽序列的载体 pFUSE-Fc2(Invivogen 公司)以及携带 IgM 的信号肽序列的载体 pTriEx-7(Novagen 公司)等。

[0163] 表达蛋白时,以目标蛋白与标记蛋白的融合蛋白形式表达,可以用抗标记蛋白的抗体或与标记蛋白特异性结合的分子来进行融合蛋白的检测或纯化。这种标记蛋白也称为标签(Tag)。对标记蛋白没有限定,例如有 FLAG 肽(也称为 flag 肽或 Flag 肽)、3×FLAG 肽(也称为 3×FLAG 肽、3×Flag 肽或 3×flag 肽)、HA 肽、3×HA 肽、myc 肽、6×His 肽、GST 多肽、MBP 多肽、PDZ 域多肽、碱性磷酸酶、免疫球蛋白、抗生物素蛋白等。这些肽或多肽通常融合到目标蛋白的 N 末端或 C 末端,但根据情况也可以插入目标蛋白内。另外,携带前胰蛋白酶原信号肽和 3×FLAG 肽的融合多肽的载体可以作为 p3×FLAG-CMV-9 购自 Sigma 公司。

[0164] 1-4-7. 抗体表位的分析

[0165] 本发明涉及的更优选的具有 HCV 感染抑制活性的抗体可以将 HCV 的、优选 J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白的复合物的立体构造识别为表位,即本发明涉及的优选的抗体可以将 E1 蛋白和 E2 蛋白的复合物的三级构造的全部或者一部分识别为表位。E1 蛋白和 E2 蛋白是参与和宿主细胞表面上的受体(HCV 受体)结合的包膜蛋白,HCV 经由该 HCV 受体感染宿主细胞。据报导,CD81 被鉴定为该 HCV 受体的一种,是 HCV 感染的一个必需因子(Akazawa 等人, J. Virol. 81 :5036-5045, 2007)。因此,认为维持感染细胞的能力的 HCV 保持着可与 CD81 结合的 E1 蛋白和 E2 蛋白的复合物的立体构造。

[0166] 本发明的抗 HCV 抗体将 HCV 中的 E1 蛋白和 E2 蛋白的复合物的立体构造的全部或者一部分识别为表位,与其结合。本发明的抗 HCV 抗体通过与 E1 蛋白和 E2 蛋白的复合物结合,抑制感染性 HCV 的 E1 蛋白和 E2 蛋白与宿主细胞上的 CD81 结合。结果, HCV 的感染能力丧失。因此,本发明的抗 HCV 抗体与带有感染性的多种 HCV 具有结合能力,可抑制 HCV 感染。

[0167] 已知 HCV 是容易发生变异的病毒,将边发生变异边增殖的带有多多样性的 HCV 的集合体称为“准种(quasispecies)”。HCV 的 E2 蛋白的 N 末端具有氨基酸的变异频繁的称为超变区(hypervariable region,下称“HVR”)的区域。目前已知的具有 HCV 感染抑制活性的抗体显示以该变异频繁区域的肽作为表位(Farci 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 15394-15399, 1996 ; Shimizu 等人, J. Virol. 68 :1494-1500, 1994 ; Zhang 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 :8449-8454, 2007)。然而,有报导指出以 HVR 作为表位的抗体因 HCV 的变异会丧失某一方面的效果(Farci 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :7792-7796, 1994 ; Weiner 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :3468-3472, 1992 ; Kato 等人, J. Virol. 67 : 3923-3930, 1993)。因此,抗 HCV 抗体的表位优选为 HVR 以外的表位。

[0168] 本发明的抗 HCV 抗体是将由 E1 蛋白和 E2 蛋白的复合物构成的立体构造识别为表位的抗 HCV 抗体,不同于仅以 HVR 作为表位的现有的具有 HCV 感染抑制活性的抗 HCV 抗体,因此可以期待由于 HCV 的准种而不丧失感染抑制效果。

[0169] 为了分析通过上述方法选择的杂交瘤细胞株产生的本发明的抗体的表位,可以使用采用了 HCV 蛋白的酶免疫测定(EIA)、蛋白质印迹法或者点渍法等。通过进行作为抗 HCV 单克隆抗体的一次筛选的该表位分析,可以有效筛选以特定的 HCV 蛋白作为标的的抗 HCV 单克隆抗体。

[0170] 2. HCV 感染抑制剂

[0171] 本发明的其他方案是 HCV 感染抑制剂。

[0172] 本发明的“HCV 感染抑制剂”是以前述的本发明的抗 HCV 抗体作为有效成分,可以抑制 HCV 感染宿主细胞过程中必要的、至少一种功能的物质。本发明的 HCV 感染抑制剂可以单独用作药物,或者用作药物组合物的有效成分,优选用作丙型肝炎的治疗用或预防用药物,另外还可用于阐明 HCV 的感染机理的研究工具。

[0173] 2-1. 药物组合物

[0174] 本发明的 HCV 感染抑制剂可以用于药物组合物。本发明的药物组合物可以含有作为药物的本发明的抗 HCV 抗体以及药学上可接受的载体。

[0175] “药学上可接受的载体”是指制剂技术领域通常能使用的溶剂和 / 或添加剂。

[0176] 药学上可接受的溶剂例如有:水、药学上可接受的有机溶剂(例如乙醇、丙二醇、乙氧基化异硬脂醇、聚氧化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯类)。希望对这些溶剂进行灭菌,根据需要优选调整至与血液为等渗的。

[0177] 药学上可接受的添加剂例如有:胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯树胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、双甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白(HSA)、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、作为药物添加物可接受的表面活性剂等。

[0178] 此外,还可以根据需要,含有赋形剂、结合剂、崩解剂、填充剂、乳化剂、流动添加调节剂、润滑剂、矫味矫臭剂、溶解辅助剂(增溶剂)、悬浊剂、稀释剂、表面活性剂、稳定剂、吸收促进剂、增量剂、润湿剂、保湿剂(例如甘油和淀粉)、吸附剂、崩解抑制剂、包衣剂、着色剂、防腐剂、抗氧化剂、香料、风味剂、甜味剂、缓冲剂等。

[0179] 上述溶剂和 / 或添加剂可以根据使用的本发明的药物组合物的剂型单独或适当组合使用。例如,在用作注射用制剂的情况下,可以使用将纯化的抗 HCV 抗体溶解于溶剂(例如生理盐水、缓冲液和葡萄糖溶液)中,向其中添加防吸附剂(例如吐温 80、吐温 20、明胶和人血清白蛋白)而成的制剂。或者,为了制成使用前溶解重构的剂型,也可以为冻干的制剂。例如,可以使用用于冻干的赋形剂(例如甘露醇、葡萄糖等糖醇或糖类)。

[0180] 本发明的药物组合物可以按照常规方法来制剂化。关于制剂化,希望参照例如 Remington's Pharmaceutical Science, 最新版, Mark Publishing Company, Easton, U. S. A. 。

[0181] 本发明的药物组合物也可以结合已有的抗病毒剂,例如干扰素、病毒唑等来使用。

[0182] 2-2. 药物组合物的给予方法

[0183] 本发明的含有 HCV 感染抑制剂的药物组合物优选根据给予单位剂型(unit dosage form)进行给予,可以经口给予、组织内给予(例如皮下给予、肌肉给予和静脉内给予)、局部给予(例如经皮给予)或者经直肠给予。因此,优选 HCV 感染抑制剂的剂型为适合给予方法的剂型。例如,在组织内给予的情况下,优选经血流注射,因此剂型为液体。

[0184] 在注射的情况下,对注入部位没有特别限定。例如有静脉内、动脉内、肝脏内、肌肉内、关节内、骨髓内、髓腔内、心室内、经皮、皮下、皮内、腹腔内、鼻腔内、肠内或者舌下等。优选静脉内注射或者动脉内注射等向血管内的注射。这是由于经由血流本发明的药物组合物

可以迅速遍布全身,另外侵袭性比较低,对受试者产生的负担小。或者,也可以注射到肝脏内或肝门静脉。这是由于可以使 HCV 感染抑制剂直接作用于 HCV 局部存在的部位。

[0185] 在给予上述 HCV 感染抑制剂的情况下,优选一个给予单位中含有能发挥 HCV 感染抑制活性的有效量。在本说明书中使用时,“有效量”是指有效成分在发挥其功能上必要的量,即,本发明中 HCV 感染抑制剂在抑制 HCV 感染上必要的量,且对给予的受试者几乎没有或者完全没有有害的副作用的量。该有效量能够根据受试者的信息、剂型及给予途径等各种条件而变化。“受试者的信息”包括疾病的进展程度或者严重程度、全身的健康状态、年龄、体重、性别、饮食生活、药剂感受性、有无联用药物以及对治疗的耐受性等。上述 HCV 感染抑制剂的最终给予量及有效量根据各个受试者的信息等,由医师判断决定。在需要大量给予上述 HCV 感染抑制剂来获得 HCV 感染抑制效果的情况下,为了减轻受试者的负担,也可以分数次给予。

[0186] 作为具体给予量的一个例子,例如,在给予丙型肝炎发病初期、不必联合使用其他药物的成年男人(体重 60kg)的情况下,每天的 HCV 感染抑制剂的有效量通常在 1 ~ 2000mg,优选 1 ~ 1000mg,更优选 1 ~ 500mg 的范围内。根据受试者的状态或者给予途径等,也可以给予不足上述范围或者超过上述范围的用量。

[0187] 在将本发明的 HCV 感染抑制剂给予受试者的情况下,作为有效成分的本发明抗体的有效给予量在每次每 kg 体重 0.001mg ~ 1000mg 的范围内选择。或者,可以选择每名受试者 0.01 ~ 100000mg/ 人的给予量,但不限于这些给予量。另外,作为上述给予时期,可以不考虑是在疾病的临床症状发生之前还是之后来给予。

[0188] 本发明的具有 HCV 感染抑制活性的抗体对任意的丙型肝炎有效,例如对慢性肝炎或者暴发型肝炎有效,另外对基因型 2a 或者 1b 的 HCV 引起的丙型肝炎特别有效。

[0189] 3. HCV 检测方法

[0190] 本发明的其他方案是 HCV 的检测方法及该方法中使用的 HCV 检测试剂。本发明可以使用本发明的抗 HCV 抗体通过免疫学检测方法检测试样中的 HCV 颗粒。

[0191] 本说明书中“试样”是指能够含有 HCV 颗粒或者其包膜蛋白的各种试样。例如,培养细胞、培养细胞破碎液、培养液上清、或者人试样。人试样是采自人的组织(例如术后采集的组织)、血液、血清、血浆、尿、脑脊液、唾液、淋巴液、精液等体液等所有来自人的生物试样,优选血液、血清、血浆或者尿。另外,本发明中的试样不仅可以是液体试样,也可以是固体试样。例如,可以使用脏器移植的捐赠者的脏器、或者组织切片标本等。

[0192] 本发明的“免疫学检测方法”可以通过 ELISA 法、EIA 法、荧光免疫测定法、放射免疫测定法或者发光免疫测定法等使用标记抗体的公知的免疫学检测法、或者表面等离子共振法(SPR 法)、石英晶体微天平测定法(QCM 法)实施,优选适用于使用标记抗体的免疫学检测法中。

[0193] ELISA 法也称为酶免疫吸附分析法,是使用酶标记的抗体或者抗原,利用该酶的作用基于发色浓度或荧光强度检测抗原抗体反应,由此来定量试样中所含微量的标的抗原的方法。即,将本发明的抗 HCV 抗体或者 HCV 颗粒固定在固相载体上,酶促检测该抗体等和 HCV 的免疫学反应的方法。关于 ELISA 法的测定方法,希望参照公知的方法(日本临床病理学会编的“臨床病理臨時増刊特集第 53 号臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用”,临床病理刊行会,1983 年;石川荣治等人编的“酵素免疫測定法”,第 3 版,医学书院,

1987 年；北川常广等人编的“タンパク質核酸酵素別冊 No. 31 酵素免疫測定法”，共立出版，1987 年；入江实编的“ラジオイムノアッセイ”，讲谈社 Scientific, 1974 年；入江实编的“続ラジオイムノアッセイ”，讲谈社 Scientific, 1979 年）。上述固相载体可以使用由聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚乙基甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、胶乳、明胶、琼脂糖 (agarose)、纤维素、琼脂糖凝胶 (sepharose)、玻璃、金属、陶瓷或者磁性体等材质形成的珠、微板、试验管、棒或者试验片等形状的不溶性载体。本发明的抗 HCV 抗体或者 HCV 颗粒在固相载体上的固定可以按照物理吸附法、化学结合法或者二者并用的方法等公知的方法使该 HCV 抗体或者 HCV 颗粒结合到固相载体上来实现。

[0194] 作为标记抗 HCV 抗体的标记物质，例如在 ELISA 法的情况下，可以使用过氧化酶 (POD)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖氧化酶、乳酸脱氢酶、淀粉酶或者生物素-抗生物素蛋白复合物等，在荧光免疫测定法的情况下，可以使用异硫氰酸荧光素、四甲基罗丹明异硫氰酸酯、取代罗丹明异硫氰酸酯、二氯三嗪异硫氰酸酯、Alexa480 或者 AlexaFluor488 等，在放射免疫测定法的情况下，可以使用氚 (^3H)、碘 125 (^{125}I) 或者碘 131 (^{131}I) 等，但不限于这些。另外，发光免疫测定法可以使用 NADH-FMN₂-荧光素酶系、鲁米诺-过氧化氢-POD 系、吖啶酯系或者二氧杂环丁烷化合物系等。在 ELISA 法的情况下，标记抗原与抗体的结合法可以使用戊二醛法、马来酰亚胺法、吡啶基二硫化物法或者过碘酸法等公知的方法，在放射免疫测定法的情况下，标记抗原与抗体的结合法可以使用氯胺 T 法、Bolton-Hunter 法等公知的方法。

[0195] 本发明的免疫学测定方法还可以通过基于透过光或散射光的光学方法测量或者目视测量免疫比浊法、胶乳凝聚反应、胶乳比浊法、红细胞凝聚反应或者颗粒凝聚反应等生成的免疫复合物凝聚物的测定法来实施。在这种情况下，作为溶剂可以使用磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris 缓冲液或者 Good 缓冲液等，还可以含有 PEG 等的反应促进剂或非特异性反应抑制剂。

[0196] 下面，作为本发明的 HCV 检测方法的具体例子，就适用 ELISA 法的情况进行简单说明。首先，将本发明的抗 HCV 抗体固相化于不溶性载体上。需要说明的是，固相化的抗体只要特异性识别 HCV 颗粒即可，可以为 1 种，也可以为多种。接着，使能够含有 HCV 颗粒的试样与固相化抗体的表面作用，在载体表面形成固相化抗体与 HCV 颗粒的复合物。之后，通过用洗涤液充分洗涤，除去试样中存在的 HCV 颗粒以外的未结合的物质。再制作特异性识别 HCV 颗粒的其他抗 HCV 标记抗体，使该标记抗体、与固相化抗体和 HCV 颗粒的复合物所结合的载体作用，通过用洗涤液充分洗涤后利用标记进行检测，可检测试样中存在的 HCV 颗粒。

[0197] 也可以先将标记抗体和含有 HCV 颗粒的试样混合而形成抗原抗体复合物，之后使其与固相化抗体作用。如果将固相化抗体用生物素标记，在将生物素化固相化抗体、含有 HCV 颗粒的试样、实施了生物素以外的标记的抗体全部混合形成抗原抗体复合物之后，通过使抗生物素蛋白与固相化的载体作用，可以利用生物素化以外的标记检测抗原抗体复合物。

[0198] 本发明的免疫学测定方法还可以使用免疫色谱法用试验片条。免疫色谱法用试验片条例如由下述部分构成：由容易吸收试样的材料构成的试样接收部分；含有本发明诊断药的试剂部分；试样与诊断药的反应物进行移动的展开部分；，使展开的反应物显色的标记部分；显色的反应物进行展开的提示部分等。例如，市售的妊娠诊断药等具有与此同样的

形态。本测定方法的原理如下：首先，向试样接收部分供给试样，试样接收部分吸收试样，使试样到达试剂部分。接着，在试剂部分，试样中的 HCV 与前述的抗 HCV 抗体发生抗原抗体反应，反应复合物在展开部分移动到达标记部分。在标记部分上述反应复合物与标记二次抗体发生反应，其与标记二次抗体的反应物展开至提示部分，确认显色。上述免疫色谱法用试验片条侵袭性极低，根本不会给使用者带来痛苦或者因使用试剂而产生危险性，因此可用于家庭中的监测器，将其结果在各医疗机关等级进行精查和 / 或治疗（外科的切除等），可以预防转移和 / 或复发。另外，这种试验片条在可廉价地大量生产这一点上也很便利。

[0199] 根据本发明的方案，可以检测试样中的 HCV 颗粒和 / 或其包膜蛋白。由此，可以将经由捐赠者的血液或脏器发生的 HCV 感染防患于未然。

[0200] 4. HCV 检测用试剂盒

[0201] 本发明的其他方案是含有本发明的抗 HCV 抗体、用于通过上述“3. HCV 检测方法”检测 HCV 的 HCV 检测用试剂盒。本发明的检测用试剂盒可以含有标记二次抗体、检测标记所需要的基质、阳性对照或阴性对照、用于稀释或洗涤试样的缓冲液、和 / 或使用说明书。

[0202] 实施例

[0203] 下面举出实施例来更具体地说明本发明。不过，这些实施例只是用于具体地说明本发明而举出的，并不限制本发明的技术范围。

[0204] < 实施例 1>J6/JFH-1-HCV 颗粒的制作

[0205] 按照 Wakita, T. 等人, Nat. Med., 11 (2005) 791-796 页和国际公开 WO 2004/104198 中记载的方法，制作将分离自暴发型肝炎患者的 HCV JFH-1 株（基因型 2a）的基因组 RNA 全部区域逆转录获得的 cDNA（基因组 cDNA）克隆至 pUC19 质粒的 T7 RNA 启动子序列下游而获得的质粒 DNA（pJFH-1）。pJFH-1 中插入的来自 JFH-1 株的基因组 cDNA 的核苷酸序列如 SEQ ID NO :1 所示。将该 pJFH-1 用 EcoRI 消化后，再用 BclI 部分消化，制备切除了从 EcoRI 部位至最初的 BclI 部位的片段（约 2840bp）的质粒 DNA 片段，将其纯化。

[0206] 另一方面，按照国际公开 WO 2006/022422 中记载的方法，制作将来自 HCV J6CF 株的基因组 cDNA（GenBank 登录号 AF177036、Yanagi, M. 等人, Virology 262 :250-263 (1999)）克隆至 pUC19 质粒的 T7 RNA 启动子序列下游而获得的质粒 DNA（pJ6CF）。将该 pJ6CF 用 EcoRI 和 BclI 部分消化，将获得的约 2840bp 的片段纯化，将其与上述切除了 EcoRI-BclI 片段的 pJFH-1 质粒 DNA 片段连接，获得质粒 DNA（pJ6/JFH-1）。克隆化至该 pJ6/JFH-1 中的 DNA（SEQ ID NO :2）为 HCV 嵌合基因组 cDNA，其是使来自 J6CF 株基因组 cDNA 的 5' 非翻译区、核心序列、E1 序列、E2 序列和 p7 序列、NS2 蛋白的编码 N 末端至 16 位的氨基酸残基的区域的序列、以及来自 JFH-1 株基因组 cDNA 的 NS2 蛋白的编码 17 位氨基酸残基至 C 末端的区域的序列、NS3 序列、NS4A 序列、NS4B 序列、NS5A 序列、NS5B 序列和 3' 非翻译区按该顺序连接而成的。

[0207] 将制作的 pJ6/JFH-1 用 XbaI 切割后，加入绿豆核酸酶 20U（总反应液量 50 μ L）在 30℃ 下培育 30 分钟，由此使 Xba I 切割末端平滑。进行苯酚 - 氯仿提取、乙醇沉淀，获得除去了粘性末端的 4 碱基（CTAG）的 XbaI 切割片段。以该切割的质粒作为模板，用 MEGAscript T7 试剂盒（Ambion 公司）合成 RNA（参照 WO 2006/022422）。将如此合成的各 HCV 基因组 RNA 用于以下的细胞导入。

[0208] 将 3×10^6 个 Huh7 细胞与 5 μ g 的各 HCV RNA 悬浮于 Cytomix 溶液（120mM KCl、

0.15mM CaCl_2 、10mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、25mM Hepes、2mM EGTA、5mM MgCl_2 、20mM ATP、50mM 谷胱甘肽 400 μL) 中,移至 4mm 透明试管中,然后使用 Gene Pulser(BioRad 公司)在 260V、950 μF 下使 HCV RNA 电穿孔至 Huh-7 细胞中。之后,将 HCV 基因组 RNA 导入用的宿主细胞接种在 10 cm^2 培养皿中,进行继代培养。继代时使用 HCV 抗原 ELISA 检测试剂盒(Ortho 公司)对培养上清液中所含的 HCV 核心蛋白进行定量,确认 HCV 颗粒的产生。选择核心蛋白的量多、HCV 颗粒产生的活性高的培养上清液,作为病毒原液(virus stocks)保存。

[0209] 向用 10% FCS-DMEM 培养基(含有 1% MEM 非必需氨基酸溶液(Invitrogen 公司)、10mM HEPES-Tris(pH7.3)和 1mM 丙酮酸钠)培养的 10cm 培养皿中的 Huh7 细胞中加入上述获得的 J6/JFH-1 病毒原液(4×10^4 ffu/mL)各 100 μL 左右,使 HCV 病毒感染 Huh7 细胞。

[0210] 细胞适宜在不融合(confluent)的情况下进行继代,由 1 个 225 cm^2 培养瓶(flask)扩大培养至 4 个、12 个。接着由其中的 8 个 225 cm^2 培养瓶剥离细胞,接种在 2 个 5 层 CellSTACK(注册商标)(Corning 公司)中,培养基添加至 650mL/个。将得自余下 4 个培养瓶的细胞接种在 12 个培养瓶中,由此继续以良好的效率产生病毒。

[0211] 继代次日弃去培养基,加入 650mL 2% FCS-DMEM 培养基(含有 1% MEM 非必需氨基酸溶液(Invitrogen 公司)、10mM HEPES-Tris(pH7.3)和 1mM 丙酮酸钠)。培养基更换 3 天后回收培养基,通过 0.45 μm 过滤器,然后保存在超低温冰柜(deep freezer)中。另外,向回收培养上清液后的 CellSTACK 中加入 650mL 上述 2% FCS-DMEM 培养基,继续培养。培养基更换 2 天后进行同样的操作,回收培养上清液。再重复 1 次同样的操作。这里,将回收的培养上清液用于后述的实施例 2。

[0212] 如上所述,导入了由 pJ6/JFH-1 合成的 HCV 嵌合基因组 RNA 的细胞产生具有感染性的 HCV 病毒颗粒,其上清液中混在产生的感染性 HCV 病毒颗粒。

[0213] < 实施例 2> J6/JFH-1 HCV 颗粒的纯化

[0214] 将实施例 1 中产生的病毒颗粒用以下 3 个步骤纯化。

[0215] 1) 浓缩和透析过滤

[0216] 利用中空纤维滤芯(Hollow Fiber Cartridge)(GE Healthcare 公司;500kDa 截留,型号 UFP-500-C-8A,下称“中空纤维”),将上述实施例 1 获得的含 HCV 颗粒的培养上清液浓缩至 60 倍。

[0217] 2) 密度梯度超离心

[0218] 向 Ultra-clear 25 $\times$ 89mm 离心管(Beckman Coulter 公司;目录号 344058)中加入 3mL 冷却的含 60% 蔗糖的 TNE 缓冲液(10mM Tris-HCl(pH 7.4)、150mM NaCl、1mM EDTA),覆盖 7mL 含 20% 蔗糖的 TNE 缓冲液。再在含 20% 蔗糖的 TNE 缓冲液上覆盖 25mL 样品。使用 SW-28(Beckman Coulter 公司),以 28,000 转在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下超速离心 4 小时。

[0219] 使用 25G 注射针(Terumo 公司)在管的底面穿孔,由该孔获得 12 支 1mL 的组分。测定各组分溶液的比重,确认形成了蔗糖的密度梯度。由比重大的组分开始,回收第 3、4、5 号的各个组分,用于浓缩和缓冲液置换。

[0220] 3) 浓缩和缓冲液置换

[0221] 使用 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units(排除分子量 100kDa,Millipore 公司)和 TNE 缓冲液,将洗脱组分进行缓冲液置换的同时进行浓缩。将如此获得的浓缩液在后述免疫步骤中用作含感染性 HCV 颗粒的病毒液。

[0222] < 实施例 3>HCV 的灭活

[0223] 将上述实施例 2 中获得的病毒液中的 HCV 通过紫外线照射灭活。使用东芝公司制 GL-15 作为紫外线的线源。将纯化的感染效价 1×10^6 ffu/mL 的含有 HCV 颗粒的溶液装入涂布了硅的聚乙烯制微量离心管 (Assist 公司制) 中, 放置在使紫外线的照射强度为 $20\text{mW}/\text{cm}^2$ 的距离, 照射 5 分钟 UV-C。

[0224] 处置后, 将 HCV 颗粒在 DMEM 培养基中以 50 倍、250 倍、1250 倍、6250 倍、31250 倍、156250 倍、和 781250 倍系列稀释。

[0225] 前一天, 按 1×10^4 细胞 / 孔在 96 孔聚-L-赖氨酸包被板 (Corning 公司制; Corning 96 孔透明平底聚-L-赖氨酸包被微孔板 (Corning 96 Well Clear Flat Bottom Poly-L-Lysine Coated Microplate)) 中接种 Huh-7 细胞, 向其中接种系列稀释的上述病毒颗粒, 在 37°C 培养 72 小时。

[0226] 除去培养上清液后, 将板浸在冰冷却的甲醇中, 固定细胞。之后, 风干除去甲醇, 用含 0.3% Triton (注册商标)-X100 (GE Healthcare 公司) 的 Block Ace (注册商标) (大日本制药公司) 进行细胞的可溶化处置。使用克隆 2H9 抗 HCV-核心抗体 (Wakita, T. 等人, Nat. Med. 11 : 791-796, 2005) 和山羊抗-小鼠 IgG-Alexa488 (Molecular Probe 公司), 检测 HCV 感染细胞, 在荧光显微镜 (Olympus 公司制 IX-70) 下计数。确认紫外线处置后的 HCV 的感染效价在检测限以下。在后述实施例中, 给予小鼠时使用这种感染性完全消失的灭活 J6/JFH-1-HCV 颗粒。

[0227] < 实施例 4> 使用灭活 HCV 颗粒对小鼠进行免疫

[0228] 佐剂使用动物用佐剂 MPL+TDM (Sigma 公司; Sigma 佐剂系统, 目录号 S6322)。向 $100\ \mu\text{L}$ 含实施例 3 所示灭活 J6/JFH-1-HCV 颗粒 (相当于 2pmol HCV 核心蛋白的量) 的溶液中加入等量的 MPL+TDM, 形成乳液。乳液的形成如下确认: 在烧杯中准备适量的水, 在水面上滴一滴混合液, 混合液不分散。乙醚麻醉 Balb/c 小鼠 (7 周龄、雌), 通过腹腔内给予如上所述制备的含灭活 J6/JFH-1-HCV 颗粒的乳液进行免疫。

[0229] 2 周后, 向 $100\ \mu\text{L}$ 含 J6/JFH-1-HCV 颗粒 (相当于 2pmol HCV 核心蛋白的量) 的溶液中加入等量的 MPL+TDM, 形成乳液, 同样地腹腔内给予以进一步免疫。再在 4 周后及 6 周后, 同样地腹腔内给予以进行免疫。

[0230] < 实施例 5> 测定用灭活 HCV 颗粒免疫的小鼠的血清中 HCV 感染抑制活性

[0231] (1) 感染性 HCV 样颗粒 (HCVpp) 的制作

[0232] HCVpp 的制作按照 Bartosch 等人的方法进行 (文献: Bartosch, B. 等人, (2003) J. Exp. Med., 197, 633-642)。该方法如下: 通过将 3 种表达载体 (表达逆转录病毒的 Gag-pol 的载体、表达 HCV 的包膜蛋白的载体以及表达报道基因的逆转录病毒包装载体) 导入动物细胞中进行表达, 报道基因被包装, 制作在其病毒表面表达 HCV 包膜蛋白的假病毒 (pseudo virus)。

[0233] 为了制作携带基因型 2a 的包膜蛋白的 HCVpp, 使用 pcDNA J6dC-E2。该质粒是将编码基因型 2a 的 HCV 株即 J6CF 的蛋白 (NCBI 蛋白质登录号 AAF01178.1) 的 132 位的氨基酸残基至 750 位的氨基酸残基 (核心蛋白的一部分、E1 蛋白和 E2 蛋白) 的核酸克隆至 pcDNA3.1 的表达载体。

[0234] 作为将编码小鼠白血病病毒的 gag 和 pol 的基因克隆化的表达载体, 使用 Gag-Pol

5349。作为将荧光素酶基因克隆化的逆转录病毒包装载体,使用 Luc126。

[0235] 293T 细胞在 10% FCS-DMEM 培养基(含有 1% MEM 非必需氨基酸溶液(Invitrogen 公司)、10mM HEPES(pH 7.3)、1mM 丙酮酸钠、100 单位/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素(Gibco 公司:目录号 15140-122))(下称“DMEM-10F”)中継代培养。培养使用胶原包被的培养瓶(IWAKI 公司:目录号 4100-010 和 4160-010)。将 293T 细胞接种在胶原包被的 10cm 培养皿中(IWAKI 公司:目录号 4020-010),达到 2.5×10^6 细胞/培养皿,培养一夜。将下示量的 Opti-MEM(Gibco 公司:目录号 11058)、FuGENE6 以及 3 种构建物(construct)(HCV 包膜蛋白表达载体 pcDNA J6dC-E2、Gag-Pol 5349 及 Luc126)按 Opti-MEM 为 500 μ L、FuGENE6 为 21.6 μ L、pcDNA J6dC-E2 为 1 μ g、Gag-Pol 5349 为 3.1 μ g、Luc126 为 3.1 μ g(或与它们相同的构成比)进行混合,在室温下培育 15 分钟。将 293T 细胞的培养基更换为 7.5mL Opti-MEM,向其中添加 DNA 复合物,在 37°C、5% CO₂ 下培育 6 小时。反应结束后,用 PBS 洗涤 1 次,添加 8mL DMEM-10F,在 37°C、5% CO₂ 下培育 48 小时。培养结束后,回收上清液,将用 0.45 μ m 过滤器过滤所得的溶液作为 HCVpp 溶液。HCVpp 按每 1mL 分注,在 -80°C 下保存。

[0236] 将如此操作获得的携带基因型 2a 的 J6CF 株的结构蛋白的感染性 HCV 颗粒称为“J6CF HCVpp”。

[0237] (2) 感染抑制活性的测定

[0238] 将实施例 4 中 HCV 颗粒给予前的正常小鼠血清、以及从用灭活 HCV 颗粒(J6/JFH-1-HCV 颗粒)免疫的小鼠在初次免疫 49 天后采血 200 μ L 的血清分别应用于 1mL 的 Protein G 琼脂糖凝胶柱(GE Healthcare 公司),用 PBS 洗涤柱后,用 0.1M 甘氨酸缓冲液(pH3.0)按 1mL/组分洗脱。洗脱后,立即添加 1M Tris-HCl(pH9.5),返回中性。将洗脱的蛋白的峰组分作为 IgG 组分,测定该组分的 HCV 感染抑制活性。具体来说,向本实施例的步骤“(1) 感染性 HCV 样颗粒(HCVpp)的制作”中获得的 J6CF HCVpp 溶液中加入 DMEM 培养基(含有 10% FCS(Invitrogen 公司)、1% MEM 非必需氨基酸溶液(Invitrogen 公司)、10mM HEPES-Tris(pH7.3)、1mM 丙酮酸钠的 DMEM),稀释 IgG 组分样品,使 IgG 的最终浓度为 10、30、100、200 μ g/mL,在 37°C 下培育 30 分。弃去前一天在 96 孔板上按 1×10^4 细胞/孔培养的 Huh7.5.1 细胞的培养基,之后按 50 μ L/孔添加加入 IgG 组分样品培育的病毒液,在 37°C 下培育 3 小时。弃去病毒液后,用 PBS 按 100 μ L/孔洗涤 1 次,加入 200 μ L/孔的培养基在 37°C 下培育 72 小时。弃去培养基后,加入 25 μ L/孔的 DMEM 培养基(未添加血清)和 25 μ L/孔的 Steady-Glo(Promega 公司:目录号 E2520),按照所附的说明书溶解细胞。将细胞的溶解液按 40 μ L/孔移至白色的 96 孔板(住友 Bakelite 公司:目录号 MS-8496W),用 ARVO X4(PerkinElmer 公司)测定发光强度。

[0239] 结果如图 1 所示。图 1 的纵轴表示作为发光强度的荧光素酶活性,横轴的数值表示 J6CF HCVpp 溶液中混合的 IgG 浓度(μ g/mL)。另外,“对照”表示未加抗体的阳性对照,“正常小鼠 mIgG”表示对照抗体。将向 J6CF HCVpp 溶液中混合 DMEM 时的值作为显示 100% 感染率的对照,发光强度越低显示抑制感染的活性越高。确认 HCV 感染抑制活性依赖于来自给予 J6/JFH-1-HCV 颗粒的小鼠血清的 IgG 组分的用量。

[0240] <实施例 6> 杂交瘤的制作

[0241] 将小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0(购自 ECACC)用含有 5×10^{-5} M 的 2-巯基乙醇、100 单位/mL 的青霉素、100 μ g/mL 的链霉素、以及 10% FCS(Invitrogen 公司)的 DMEM 培养基

(Invitrogen 公司) 培养, 获得对数增殖期的 SP2/0 细胞。将该细胞用不含血清的 DMEM 培养基洗涤 3 次。

[0242] 接着从给予了实施例 4 的 HCV 颗粒 (J6/JFH-1-HCV 颗粒) 的小鼠取出脾细胞, 用不含血清的 DMEM 培养基洗涤 3 次。按 SP2/0 细胞与小鼠脾细胞为 1 : 5 的比率装入 50mL 的离心管中, 在 1,000 转下离心 10 分钟。将上清液完全吸除, 用手指轻叩管底, 将团块 (cell pellet) 分散 (loosen)。用 1 分钟向细胞中加入 1mL 在 37℃ 下保温的 50% PEG-1500 溶液 (Roche 公司), 在 37℃ 下继续反应 1 分钟。接着, 用 1 分钟缓慢加入 1mL 不含血清的 DMEM 培养基, 再用 1 分钟缓慢加入 1mL 不含血清的 DMEM 培养基。最后, 用 3 分钟加入 7mL 不含血清的 DMEM 培养基, 稀释 PEG 溶液。将稀释液中的该细胞以 1,000 转离心 10 分钟, 向其中加入 50mL 的 HT 培养基 (含有 5×10^{-5} M 的 2- 巯基乙醇、100 单位 /mL 的青霉素、100 μ g/mL 的链霉素以及 10% 的 FCS、 10^{-4} M 的次黄嘌呤以及 1.5×10^{-5} M 的胸苷的 DMEM 培养基), 通过移液分散细胞团块。将细胞移到 2 个 75cm² 的培养瓶中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养一夜。

[0243] 将细胞以 1,000 转离心 10 分钟后回收。轻叩细胞团块将其分散, 并悬浮于 10mL 的 DMEM 培养基中。将该细胞悬浮液加入到 90mL 的甲基纤维素 HAT 选择培养基 (Stem Cell Technology 公司) 中, 充分混合, 按 10mL/ 培养皿的量加入 10cm 的培养皿中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

[0244] 培养 10 ~ 14 天, 用移液管 (pipette chip) 将被认为由单一的细胞增殖而获得的杂交瘤的菌落吸上来, 将其加入 96 孔板的各孔中进行培养, 该 96 孔板按每孔 200 μ L 加入含有 10% 的杂交瘤增殖因子 (Bio Veris 公司) 的 HT 培养基。

[0245] < 实施例 7> 筛选产生 HCV 感染抑制抗体的杂交瘤

[0246] 在实施例 6 制作的杂交瘤充分增殖时, 回收培养上清液, 如下进行筛选。

[0247] 筛选如下进行: 将 E1 蛋白和 E2 蛋白固定在板上, 通过 EIA 评价杂交瘤上清液中的抗体是否与上述蛋白结合, 并评价杂交瘤上清液中的抗体是否可抑制 HCV 感染 (实施例 8 中记载)。

[0248] (1) 制作来自 J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白

[0249] 如下所示制备 J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白。以基因型 2a 的来自 J6CF 株的基因组 cDNA (GenBank 登录号 AF177036) 作为模板, 使用 Advantage GC2 PCR 试剂盒 (Takara Bio 公司)、以及 J6E1dTM-s (SEQ ID NO : 3 : CACAAGCTTGCCGAAGTGAAGAACATCAGT) 和 J6E1dTM-as (SEQ ID NO : 4 : GCTCTAGATTAATGAGCCCCGCTAATGATGTC), 用 PCR 法扩增编码 E1 蛋白的基因, 所述 E1 蛋白为以 J6CF 全长蛋白序列 (J6CF 株基因组序列所编码的一个连续的蛋白序列; GenBank 登录编号 AF177036 中也有记载的氨基酸序列) 的 N 末端的起始甲硫氨酸作为第 1 位时相当于 192 位至 352 位的、不含跨膜域的蛋白。将扩增的 DNA 片段克隆至 pCR-TOPO (Invitrogen) 中, 分析 3 个克隆的核苷酸序列。将具有正确的核苷酸序列的插入片段的克隆命名为 “pTOPO-J6E1dTM”。

[0250] 将 pTOPO-J6E1dTM 用 HindIII 和 XbaI 消化, 切出含有约 500bp 的 DNA 片段 (E1 片段) 的凝胶。使用 GeneElute (SIGMA 公司), 由该凝胶纯化 DNA 片段。同样, 将 p3XFLAG-CMV-9 (SIGMA 公司) 用 HindIII 和 XbaI 消化后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳。切出含有约 6,400bp 的片段的凝胶后, 使用 GeneElute (SIGMA 公司) 由凝胶纯化 DNA 片段。将各

纯化的 DNA 片段用 T4 连接酶 (Takara Bio 公司) 连接, 获得参入了 J6CF 株的 E1 片段的动物细胞表达载体 “CMV-3XFLAG J6E1dTM”。

[0251] 接着, 使用 Advantage GC2 PCR 试剂盒 (Takara Bio 公司)、以及 J6E2dTM-s (SEQ ID NO :5 :CACAAGCTTCGCACCCATACTGTTGGGG) 和 J6E2dTM-as (SEQ ID NO :6 :GCTCTAGATTACC ATCGGACGATGTATTTTGT), 用 PCR 法扩增编码 E2 蛋白的基因, 所述 E2 蛋白为以 J6CF 全长蛋白序列的 N 末端的起始甲硫氨酸作为第 1 位时相当于 384 位至 720 位的、不含跨膜域的蛋白。将扩增的 DNA 片段克隆至 pCR-TOPO (Invitrogen 公司) 中, 分析 3 个克隆的核苷酸序列。将具有正确核苷酸序列的插入片段的克隆命名为 “pTOPO-J6E2dTM”。

[0252] 接着, 将用 HindIII 和 XbaI 消化 p3XFLAG-CMV-9 (SIGMA 公司) 获得的 DNA 以及用 HindIII 和 XbaI 自 pTOPO-J6E2dTM 切出的约 1,000bp 的 DNA 片段用 T4 DNA 连接酶连接而环化。将该载体命名为 “CMV-3XFLAGJ6E2dTM”。

[0253] 如下所述, 将这些 CMV-3XFLAGJ6E1dTM 或 CMV-3XFLAG J6E2dTM 导入来自猴肾脏的 COS1 细胞 (获自理研细胞银行, 保藏号为 RCB0143), 分别使 E1 蛋白或 E2 蛋白表达。

[0254] 用含有 10% FCS (Invitrogen 公司)、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 硫酸链霉素的 DMEM 培养基 (Invitrogen 公司) 培养 COS1 细胞。在基因导入前一天, 以 2 倍的稀释倍率 (split ratio) 将 COS1 细胞接种到 150cm² 培养瓶 (Corning Coaster) 中, 在 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养一夜。

[0255] 另一方面, 向 DMEM 培养基 (Invitrogen) 中加入 DEAE 葡聚糖 (Pharmacia 公司) 和氯喹 (SIGMA 公司), 使其终浓度分别为 400 μ g/mL 和 100 μ M, 再按照每 13mL 该溶液加入 500 μ L (50 μ g) 的 0.1 μ g/ μ L 浓度的上述表达载体 (CMV-3XFLAGJ6E1dTM 或者 CMV-3XFLAG J6E2dTM) 进行培养 (将其称为 “DEAE 葡聚糖 -DNA 混合液”)。接着, 吸除培养的上清液后, 添加 10mL 的 PBS (-) (日水公司) 洗涤细胞 1 次。吸除 PBS (-) 后, 按照 13mL/150cm² 培养瓶加入 DEAE 葡聚糖 -DNA 混合液, 在 37°C、5% CO₂ 存在下培育 4 小时。

[0256] 4 小时后, 吸除 DEAE 葡聚糖 -DNA 混合液, 用 10mL 的 PBS 洗涤 1 次, 按 50mL/ 培养瓶加入 CHO-SFM 培养基 (Invitrogen 公司), 在 37°C、5% CO₂ 存在下培养。4 天后, 将培养上清液回收至 50mL 的离心管 (Corning Coaster) 中。回收的上清液在以 6,000rpm (使用 HITACHI RPR9-2 转子)、30 分钟、4°C 离心后, 用 0.2 μ m 的过滤器 (Whatman 公司) 过滤。

[0257] 使用抗 FLAG M2 琼脂糖 (SIGMA 公司), 如下所述纯化培养上清液。向 500mL 的培养上清液中添加 1mL 的抗 FLAG M2 琼脂糖, 用转瓶边搅拌边在 4°C (低温室) 下反应。2 小时后, 将上清液和抗 FLAG M2 琼脂糖的混合液移至 Econo-Column (BIO-RAD 公司), 回收流出的组分 (flow-through fractions)。接着, 用 10mL 的 TBS (50mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH7.4) 洗涤 2 次。用 0.1M 甘氨酸 -HCl (pH3.5) 洗脱 6 个组分 (1mL/ 组分)。洗脱后, 立即添加 1M Tris-HCl (pH9.5), 返回中性。将各组分的 20 μ L 在还原下供给 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用考马斯亮蓝染色。结果, 确认来自 J6CF 株的 E1 蛋白或 E2 蛋白得到纯化。

[0258] (2) E1 蛋白和 E2 蛋白的固相化板的制作

[0259] 将来自 J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白用 PBS 稀释, 使其分别达到 1 μ g/mL。向 Immuno Plate (NUNC 公司) 的各孔中加入 50 μ L 该 E1 蛋白和 E2 蛋白的混合蛋白溶液, 在 4°C 下静置一夜, 将蛋白固定在板上。除去蛋白溶液, 向各孔中加入 150 μ L 的 Block Ace (大日本制药), 在室温下封闭 4 小时。

[0260] 将这些板用于后述的在杂交瘤的培养上清液中筛选抗 HCV 抗体。

[0261] (3) 筛选以 J6/JFH-1-HCV 颗粒为抗原制作的杂交瘤的上清液

[0262] 将上述 (2) 中制作的、固定有来自 J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白的板用含有 0.1% 吐温 20 (SIGMA 公司) 的 PBS 洗涤 4 次, 向各孔中加入 50 μ L 实施例 6 中获得的各杂交瘤上清液样品, 在室温下边用 Plate Mixer 振动边反应 1 小时。反应后, 用含有 0.1% 吐温 20 (SIGMA 公司) 的 PBS 洗涤 4 次, 之后向各孔中加入 50 μ L 用含有 0.1% 吐温 20 的 PBS 稀释至 10,000 倍的 HRP 标记抗小鼠 IgG 抗体 (SIGMA 公司), 在室温下边振动边反应 1 小时。反应后, 用含有 0.1% 吐温 20 (SIGMA 公司) 的 PBS 洗涤 4 次, 使用过氧化酶发色试剂盒 (住友 Bakelite 公司) 发色, 用多重扫描 (Titer-Tech 公司) 测定 450nm 下的吸光度, 选出阳性克隆。

[0263] < 实施例 8> HCV 感染抑制活性的评价

[0264] 向实施例 5 的步骤“(1) 感染性 HCV 样颗粒 (HCVpp) 的制作”中获得的 J6CF HCVpp 溶液中加入杂交瘤上清液, 在 37°C 下培育 30 分钟。由前一天在 96 孔板中按 1×10^4 细胞/孔培养的 Huh7.5.1 细胞除去培养基, 之后按 50 μ L/孔添加加入杂交瘤上清液培育的病毒液, 在 37°C 下培育 3 小时。弃去病毒液后, 用 PBS 按 100 μ L/孔洗涤 1 次, 加入 200 μ L/孔的培养基在 37°C 下再培育 72 小时。弃去培养基后, 加入 25 μ L/孔的 DMEM 培养基 (未添加血清) 和 25 μ L/孔的 Steady-Glo (Promega 公司: 目录号 E2520), 按所附的说明书溶解细胞。将细胞的溶解液按 40 μ L/孔移至白色的 96 孔板 (住友 Bakelite 公司: 目录号 MS-8496W), 使用 ARVO X4 (PerkinElmer 公司) 测定发光强度。将用向 J6CF HCVpp 溶液中混合了 DMEM 培养基 (与杂交瘤上清液等量) 的病毒液同时进行上述试验时的发光强度作为 100% 感染, 用 % 表示与杂交瘤上清液混合时的发光强度, 求出感染率 (%)。

[0265] 将感染率少的样品作为产生具有 HCV 感染抑制活性的单克隆抗体的杂交瘤细胞株选出 2 类。将这些细胞株用有限稀释法克隆化, 获得产生单克隆抗体 P18-9E 的杂交瘤细胞株 P18-9E 以及产生单克隆抗体 P19-7D 的杂交瘤细胞株 P19-7D。

[0266] 将本实施例中选出的杂交瘤细胞株 P18-9E (保藏号: FERM BP-11263) 和杂交瘤细胞株 P19-7D (保藏号: FERM BP-11264) 于 2009 年 10 月 15 日保藏在独立行政法人 产业技术综合研究所 专利生物保藏中心 (日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)。

[0267] 这些杂交瘤细胞株可以用向 DMEM 中添加了 1mM 丙酮酸钠、55 μ M 2-巯基乙醇、10% FCS 的培养基, 在 37°C 下适当培养。

[0268] < 实施例 9> 抑制 HCV 感染的单克隆抗体的分析

[0269] 实施例 8 中获得的产自杂交瘤细胞株的、抑制 HCV 感染的单克隆抗体的特性分析如下进行。需要说明的是, 将产自杂交瘤细胞株 P18-9E (保藏号: FERM BP-11263) 的单克隆抗体称为“单克隆抗体 P18-9E”, 将产自杂交瘤细胞株 P19-7D (保藏号: FERM BP-11264) 的单克隆抗体称为“单克隆抗体 P19-7D”。

[0270] (1) 抗体的亚型

[0271] 小鼠抗体的亚型分析使用杂交瘤的培养上清液、用 Mouse MonoAB ID 试剂盒 (Invitrogen 公司) 进行。单克隆抗体 P18-9E 的同种型的分析结果表明 H 链为 γ 2b、L 链为 κ , 因此显示为 IgG2b 抗体。单克隆抗体 P19-7D 的同种型的分析结果表明 H 链为 γ 1、L 链为 κ , 因此显示为 IgG1 抗体。

[0272] (2) 纯化

[0273] 用无血清培养基 Hybridoma SFM (Invitrogen 公司) 将杂交瘤培养至融合后, 将培养液回收至离心管, 在 1500rpm 下离心 5 分钟。将培养上清液添加到 Prosep-G (Millipore 公司) 中, 用 20 床体积 (bed volume) 的 PBS 洗涤, 接着用 1 床体积的 0.1M 甘氨酸-HCl (pH3.0) 洗脱 6 个组分。洗脱后, 立即添加 1M Tris-HCl (pH9.5), 返回中性。使用 NanoDrop (NanoDrop Technologies 公司, ND-1000) 测定各组分在 280nm 的吸光度, 回收含蛋白的组分 ($OD_{280nm} > 0.1$), 在用 Amicon Ultra 50K (Millipore 公司) 浓缩的同时用 PBS 进行缓冲液更换, 用 0.22 μm 过滤器进行过滤。将浓缩样品的 20 μL 在还原下和非还原下进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用考马斯亮蓝染色, 确认为 IgG。测定样品在 280nm 的吸光度, 计算溶液中所含的抗体量 (按 10mg/mL IgG = 13.70D 换算)。

[0274] (3) 纯化单克隆抗体的 HCV 感染抑制活性

[0275] A. 对感染性 HCV 样颗粒 (J6CF HCVpp) 的 HCV 感染抑制活性

[0276] 向实施例 5 的步骤“(1) 感染性 HCV 样颗粒 (HCVpp) 的制作”中获得的 J6CF HCVpp 溶液中加入纯化单克隆抗体 P18-9E 或纯化单克隆抗体 P19-7D, 在 37°C 下培育 30 分。纯化单克隆抗体 P18-9E 或纯化单克隆抗体 P19-7D 用 PBS 稀释至最终浓度分别为 100 $\mu g/mL$ 或者 300 $\mu g/mL$ 后使用。

[0277] Huh7.5.1 细胞用 10% FCS-DMEM 培养基 (含有 1% MEM 非必需氨基酸溶液 (Invitrogen 公司)、10mM HEPES (pH7.3)、1mM 丙酮酸钠、100 单位/mL 青霉素、100 $\mu g/mL$ 链霉素 (Gibco 公司; 目录号 15140-122)) 继代培养。

[0278] 由前一天在 96 孔板中按 1×10^4 细胞/孔培养的 Huh7.5.1 细胞弃去培养基, 之后按 50 μL /孔添加加入纯化单克隆抗体培育的病毒液, 在 37°C 下培育 3 小时。弃去病毒液后, 用 PBS 按 100 μL /孔洗涤 1 次, 加入 200 μL /孔的培养基, 在 37°C 下培育 72 小时。弃去培养基后, 加入 25 μL /孔的 DMEM 培养基 (未添加血清) 和 25 μL /孔的 Steady-Glo (Promega 公司; 目录号 E2520), 按照所附的说明书溶解细胞。将细胞的溶解液按 40 μL /孔移至白色的 96 孔板 (住友 Bakelite 公司; 目录号 MS-8496W), 使用 ARVO X4 (PerkinElmer 公司) 测定发光强度。将用向 J6CF HCVpp 溶液中混合了 PBS (与稀释的纯化单克隆抗体等量) 的病毒液同时进行上述试验时的发光强度作为 100% 感染, 用 % 表示与纯化单克隆抗体混合时的发光强度, 求出感染率 (%)。

[0279] 图 2 表示单克隆抗体 P18-9E 的 HCV 感染抑制活性。图 2 的纵轴表示感染率 (%), 横轴的“PBS”表示未加入抗体的阳性对照, “P18-9E 100 $\mu g/mL$ ”表示 J6CF HCVpp 溶液中混合的单克隆抗体 P18-9E 的最终浓度。如图 2 所示, 纯化单克隆抗体 P18-9E 抑制了 J6CF HCVpp 的感染。

[0280] 图 3 表示单克隆抗体 P19-7D 的 HCV 感染抑制活性。图 3 的纵轴表示感染率 (%), 横轴的“P19-7D 100 $\mu g/mL$ 、300 $\mu g/mL$ ”表示 J6CF HCVpp 溶液中混合的单克隆抗体 P19-7D 的最终浓度。另外, “P.C”表示未加入抗体的阳性对照, “IgG”表示作为对照抗体的小鼠 IgG 300 $\mu g/mL$ 的结果。如图 3 所示, 纯化单克隆抗体 P19-7D 抑制了 J6CF HCVpp 的感染。

[0281] B. 对感染性 HCV 颗粒 (J6/JFH1 HCVcc) 的 HCV 感染抑制活性

[0282] HCVcc 病毒液使用上述实施例 2 的步骤 (1) 中获得的 J6/JFH1-HCV 颗粒液 (含有 HCV 颗粒的培养上清液的浓缩液) (下称“J6/JFH1 HCVcc”)。

[0283] Huh7.5.1 细胞用 10 % FCS-DMEM 培养基 (含有 1 % MEM 非必需氨基酸溶液 (Invitrogen 公司)、10mM HEPES(pH7.3)、1mM 丙酮酸钠、100 单位/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素 (Gibco 公司; 目录号 15140-122)) 继代培养。将 Huh7.5.1 细胞按 1×10^4 细胞/孔接种到 96 孔板 (包被 poly-D-lysine) 上, 培养一夜。向 J6/JFH1 HCVcc 溶液中混合纯化单克隆抗体 P18-9E, 在室温下培育 30 分钟。此时, 将单克隆抗体 P18-9E 用 PBS 稀释至 20 μ g/mL、60 μ g/mL、200 μ g/mL 后使用 (混合液中抗体的最终浓度为 10 μ g/mL、30 μ g/mL、100 μ g/mL)。弃去细胞的培养基后, 按 50 μ L/孔添加加入抗体培育的病毒液, 在 37°C 下培育 3 小时。弃去病毒液后, 用 PBS 按 100 μ L/孔洗涤 1 次, 加入 200 μ L/孔的 DMEM 培养基在 37°C 下培育 72 小时。除去培养上清液后, 将板浸在冰冷却的甲醇中, 固定细胞。之后, 风干除去甲醇, 按 100 μ L/孔添加含有 3% H_2O_2 的 PBS 溶液, 在室温下培育 5 分钟。用 PBS 按 150 μ L/孔洗涤 2 次, 按 100 μ L/孔加入含 0.3% Triton (注册商标)-X100 (GE Healthcare 公司) 的 Block Ace (注册商标) (大日本制药公司), 在室温下封闭处置 1 小时。用 PBS 按 150 μ L/孔洗涤 2 次, 按 50 μ L/孔加入稀释 100 倍的 HRP 标记抗 HCV-核心抗体 (Ortho 公司), 反应 1 小时。之后, 用 PBS 按 150 μ L/孔洗涤 4 次, 按 50 μ L/孔加入 QuantaBlu (注册商标) (PIERCE 公司) 反应液, 在室温下静置 30 分钟, 按 50 μ L/孔加入 QuantaBlu 停止液停止反应。按 20 μ L/孔移至黑色的 384 孔板 (Corning 公司; 目录号 3676), 使用 ARVO X4 (PerkinElmer 公司) 测定荧光强度。将用向 J6/JFH1 HCVcc 溶液中混合了 PBS (与稀释的纯化单克隆抗体等量) 的病毒液同时进行上述试验时的荧光强度作为 100% 感染, 用 % 表示与纯化单克隆抗体混合时的荧光强度, 求出感染率 (%)。

[0284] 结果如图 4 所示。图 4 的纵轴表示感染率 (%), 横轴的“P18-9E 10 μ g/mL、30 μ g/mL、100 μ g/mL”表示 J6/JFH1 HCVcc 溶液中混合的单克隆抗体 P18-9E 的最终浓度。另外, “PBS”表示未加入抗体的阳性对照, “小鼠 IgG”表示阴性对照抗体, “CD81 0.1 μ g/mL”表示阳性对照抗体的结果。如图 4 所示, 纯化单克隆抗体 P18-9E 抑制了 J6/JFH1 HCVcc 的感染。

[0285] 这些结果显示, 单克隆抗体 P18-9E 和单克隆抗体 P19-7D 是具有 HCV 感染抑制活性的中和抗体。

[0286] (4) 单克隆抗体的表位分析

[0287] 关于 J6CF 株的 E1 蛋白的 1 ~ 162 位的氨基酸 (SEQ ID NO :7)、J6CF 株的 E2 蛋白的 1 ~ 337 位的氨基酸 (SEQ ID NO :8), 合成由将 10 个连续的氨基酸自 N 末端开始通过以每 3 个氨基酸为单位 (3 アミノ酸ずつ) 进行移动 (shift) 而设计的氨基酸序列构成的肽组。各肽的 N 末端生物素化, C 末端作为甘氨酸 (委托 JPT 公司合成)。

[0288] 将合成的肽溶解在 DMSO 中, 然后溶解于 PBS 中以达到 0.01nmol/ μ L。向链霉抗生物素蛋白包被板 (Nunc 公司) 的各孔中加入 50 μ L 该肽溶液, 在室温下反应 1 小时。接着, 弃去肽溶液, 按 200 μ L/孔加入 Blocking One (Nacalai Tesque 公司), 在室温下放置 5 小时。之后, 弃去 Blocking One 溶液, 按 150 μ L/孔用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS (pH7.2) 洗涤 4 次, 按 50 μ L/孔加入用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS (pH7.2) 稀释至 1 μ g/mL 的单克隆抗体, 在室温下反应 1 小时。接着, 弃去抗体溶液, 按 150 μ L/孔用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS (pH7.2) 洗涤 5 次, 按 50 μ L/孔加入用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 稀释至 5000 倍的 HRP 化抗小鼠 IgG 山羊抗体 (GE Healthcare 公司), 在室温下反应 1 小时。反应后, 弃去抗体溶

液,按 150 μ L/孔用含有 0.05%吐温 20 的 PBS(pH7.2)洗涤 5 次,接着,用分光光度计(OD 450nm)检测用 HPR 发色试剂盒(住友 Bakelite 公司)结合在肽上的抗体。

[0289] 其结果,纯化单克隆抗体 P18-9E 和纯化单克隆抗体 P19-7D 与任何肽都未反应。该结果暗示,单克隆抗体 P18-9E 和单克隆抗体 P19-7D 是识别立体构造表位的抗体。

[0290] (5) 编码单克隆抗体的 V 区的 DNA 的克隆化

[0291] 如下将编码抗 HCV 颗粒的小鼠单克隆抗体的 V 区的 DNA 克隆化。

[0292] 使用 PureLink Micro-to-Midi(Invitrogen 公司),按照所附手册中记载的方法,由杂交瘤细胞株制备总 RNA。即,使 2×10^6 个的杂交瘤细胞株 P18-9E 和杂交瘤细胞株 P19-7D 的细胞悬浮于 0.5mL 的 RNA 裂解溶液中,使细胞数次通过带 18 号注射针的注射器而均浆化。将匀浆离心,向所得的该上清液中加入等量的 70%乙醇,应用于 RNASpin Cartridge。向 Cartridge 中加入洗涤液充分洗涤,用不含 RNA 酶的水洗脱 RNA。

[0293] 使用 Novagen 公司的 Mouse Ig-Primer Set 的 IgG μ 型 H 链和 κ 型 L 链特异性 3' 引物,由总 RNA 合成单股 cDNA。具体来说,向 3 μ g 的各 RNA 中加入 2pmol 的 μ 型 H 链特异性 3' 引物或 κ 型 L 链特异性 3' 引物、1 μ L 的 10mM dNTPs 溶液,再加入蒸馏水使最终容量达到 13 μ L,在 65°C 下退火 10 分钟,在冰上静置。向其中加入 1 μ L 的 0.1M DTT、1 μ L 的 RNA OUT、4 μ L 的 SuperScriptIII(Invitrogen 公司)附带的 5 $\times$ RT Buffer 以及 1 μ L 的逆转录酶 SuperScriptII(Invitrogen 公司),在 50°C 下反应 60 分钟、70°C 下反应 15 分钟,在 4°C 下保存所得反应物,将所得反应物直接用于下一步骤的聚合酶链式反应(PCR)。作为用于 PCR 的引物组,使用 Mouse Ig-Primer Set,按所附使用手册的条件进行 PCR。PCR 使用 GeneAmp(注册商标)PCR System 9700(Applied Biosystems 公司)和 Advantage GC2 DNA polymerase 试剂盒(TAKARA 公司)进行。具体来说,在 H 链的扩增中,使用试剂盒附带的 MuIgVH5' -A 至 MuIgVH5' -F 的引物(与小鼠 μ 型 H 链的前导序列杂交)和 MuIgGVH3' -1 引物(与小鼠 μ 型 CH 杂交)进行 PCR。在 L 链的扩增中,使用试剂盒附带的 MuIg κ VL5' -A 至 MuIg κ VL5' -F 的引物(与小鼠 κ 型 L 链的前导序列杂交)和 MuIg κ VL3' -1 引物(与小鼠 κ 型 CL 杂交)进行 PCR。向 1 ~ 4 μ L 如上所述制备的单股 cDNA 合成的反应混合物中加入 Advantage GC2 DNA polymerase 试剂盒所附的、10 μ L 的 5 $\times$ PCR Buffer、5 μ L 的 GC Melt、5 μ L 的 2mM dNTPs 溶液、1 μ L 的 Advantage GC2 DNA polymerase mix、2 ~ 5pmol 的 MuIg κ VL 5' 引物、2pmol 的 MuIg κ VL3' -1 引物,再加入蒸馏水使最终容量达到 50 μ L。将 50 μ L 该 PCR 溶液在 94°C 下培育 3 分钟后,反复进行 40 次 94°C 1 分钟、60°C 1 分钟、72°C 2 分钟的温度循环后,将反应混合物再在 72°C 下培育 6 分钟。

[0294] 在如上所述用 PCR 法扩增的 DNA 片段的克隆化中,使用 TOPO TA 克隆试剂盒(Invitrogen 公司)。加入试剂盒所附的 pCR-TOPO 载体和 DNA 片段以及所附的盐溶液,将在室温下放置 5 分钟后的反应溶液的一部分加入大肠杆菌 DH5 α (TAKARA 公司)的感受态细胞中。将该大肠杆菌感受态细胞在冰上放置 30 分钟,接着在 42°C 下加热 45 秒后,再在冰上放置 2 分钟,加入 SOC 培养基(室温),在 37°C 下培养 1 小时后接种在琼脂培养基中,在 37°C 下培养一夜。由该转化体制备质粒 DNA,通过常规方法确定克隆化的 DNA 的核苷酸序列。

[0295] (6) 分析编码单克隆抗体 V 区的 cDNA 的核酸序列

[0296] 对于在上述(5)中确定核苷酸序列、克隆至质粒中的 DNA(分别编码小鼠单克隆抗

体的 VH 和 VL 的 cDNA), 如下进行分析。

[0297] 对将在单克隆抗体 P18-9E 的 H 链中用 MuIgVH5' -B 的 5' 引物扩增的 PCR 产物克隆化的 6 个克隆进行分析。结果, 在核苷酸序列的 1 处, 6 个克隆中的 1 个克隆有取代, 5 个克隆的 V 区的核苷酸序列相同。选择 5 个克隆获得的 DNA, 确定单克隆抗体 P18-9E 的 H 链 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :9)。

[0298] 对将在单克隆抗体 P18-9E 的 L 链中用 MuIg κ VL5' -F 的 5' 引物扩增的 PCR 产物克隆化的 3 个克隆进行分析, 结果是, 在核苷酸序列的 2 处, 3 个克隆中的 1 个克隆有取代, 2 个克隆的 V 区的核苷酸序列相同。选择在各取代处 2 个克隆显示的碱基, 确定单克隆抗体 P18-9E 的 L 链 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :10)。

[0299] 对得自将在单克隆抗体 P19-7D 的 H 链中用 MuIgVH5' -C 的 5' 引物扩增的产物克隆化的 6 个克隆的核苷酸序列进行分析。其结果是, 在核苷酸序列的 3 处, 6 个克隆中的 1 个克隆有取代, 各取代处的 5 个克隆的核苷酸序列相同。选择在各取代处 5 个克隆显示的碱基, 确定单克隆抗体 P19-7D 的 H 链 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :11)。

[0300] 对将在单克隆抗体 P19-7D 的 L 链中用 MuIg κ VL5' -G 的 5' 引物扩增的 PCR 产物克隆化的 4 个克隆进行分析。结果是, 在 V 区的核苷酸序列的 2 处, 4 个克隆中的 1 个克隆有取代, 3 个克隆的核苷酸序列相同。选择在各取代处 3 个克隆显示的碱基, 确定单克隆抗体 P19-7D 的 L 链 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO :12)。

[0301] 另外, 通过用数据库检索由核酸序列推定的编码化氨基酸序列, 推定出单克隆抗体 P18-9E 和单克隆抗体 P19-7D 的、H 链及 L 链的 V 区的 FR1 至 J 区 (FR4) 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :13 ~ 16)。由该氨基酸序列推定的 CDR1 至 CDR3 示于图 5。

[0302] 单克隆抗体 P18-9E 的 VH 的、FR1 的氨基酸序列为 DAQGQMQQSGPELVKPGASVKLSCKTT DFTFN (SEQ ID NO :17), CDR1 的氨基酸序列为 RNYIS (SEQ ID NO :18), FR2 的氨基酸序列为 WLRQKPGQSLEWIA (SEQ ID NO :19), CDR2 的氨基酸序列为 WIYAGTGGTKYNQKFTG (SEQ ID NO :20), FR3 的氨基酸序列为 KAQMTVDTSSHTAYMQFSNLTTEDSAVYYCAR (SEQ ID NO :21), CDR3 的氨基酸序列为 YLFDGYYIPLFDY (SEQ ID NO :22), FR4 (J 区, 也称为 J 片段或者 J 链) 的氨基酸序列为 WGQGTTLTVS (SEQ ID NO :23)。

[0303] 单克隆抗体 P18-9E 的 VL 的、FR1 的氨基酸序列为 AQCDVQITQSPSYLAASPGETISINC (SEQ ID NO :24), CDR1 的氨基酸序列为 RANKSIDKYLA (SEQ ID NO :25), FR2 的氨基酸序列为 WYQEKPGKTNKLLIY (SEQ ID NO :26), CDR2 的氨基酸序列为 SGSTLQS (SEQ ID NO :27), FR3 的氨基酸序列为 GVPSKFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAMYYC (SEQ ID NO :28), CDR3 的氨基酸序列为 QQHNEYPLT (SEQ ID NO :29), 及 FR4 (J 区) 的氨基酸序列为 FGAGTKLDLRR (SEQ ID NO :30)。

[0304] 单克隆抗体 P19-7D 的 VH 的、FR1 的氨基酸序列为 LSQPSQSLSTCTVSGFSLT (SEQ ID NO :31), CDR1 的氨基酸序列为 TYGVH (SEQ ID NO :32), FR2 的氨基酸序列为 WVRQSPGKGLEWLG (SEQ ID NO :33), CDR2 的氨基酸序列为 VIWRGGSTDYNAAFSL (SEQ ID NO :34), FR3 的氨基酸序列为 RLSITKDNSKSQVFFKMNSLQPDDTAIYYCAKN (SEQ ID NO :35), CDR3 的氨基酸序列为 SWDGAY (SEQ ID NO :36), FR4 (J 区) 的氨基酸序列为 WGQGTTLTVS (SEQ ID NO :37)。

[0305] 单克隆抗体 P19-7D 的 VL 的、FR1 的氨基酸序列为

SSSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISC(SEQ ID NO:38), CDR1 的氨基酸序列为 RSSQSLLSHNGNTYLH(SEQ ID NO:39), FR2 的氨基酸序列为 WYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO:40), CDR2 的氨基酸序列为 KVSNRFS(SEQ ID NO:41), FR3 的氨基酸序列为 GVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEADLGLYFC(SEQ ID NO:42), CDR3 的氨基酸序列为 SQNTHFPWT(SEQ ID NO:43), FR4(J 区) 的氨基酸序列为 FGGGTELEISR(SEQ ID NO:44)。

[0306] 明确了:在通过单克隆抗体 P18-9E 和单克隆抗体 P19-7D 识别立体构造表位中发挥作用的 H 链和 L 链的 V 区的核苷酸序列和氨基酸序列。

[0307] (7) 使用 HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 分析单克隆抗体 P18-9E 和单克隆抗体 P19-7D 的性状

[0308] A. 使用酶免疫测定 (EIA) 研究 (HCV-VLP) 单克隆抗体对 HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 的反应性

[0309] (a)HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 的制作

[0310] HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 是指不含病毒基因组的中空颗粒。使用 MembranePro(注册商标) Reagent(Invitrogen 公司), 可以由表达 HCV 的 E1 蛋白和 E2 蛋白的 293T 细胞, 制作 HCV 的 E1 蛋白和 E2 蛋白在其表面表达的中空颗粒 (HCV-VLP)。

[0311] 用在 500mL 的 DMEM 培养基 (Invitrogen 公司) 中添加了 50mL 的 FCS(GIBCO 公司) 和 5mL 的 PenStrep(Invitrogen 公司) 的培养基培养 293T 细胞。将 1.2×10^7 个 293T 细胞接种在 225cm² 胶原蛋白包被的培养瓶 (IWAKI 公司) 中, 在 37℃、5% CO₂ 的条件下培养一昼夜。

[0312] 将 4mL 的 Opti-MEM I(GIBCO 公司) 和 216 μL 的 Lipofectamine2000(Invitrogen 公司) 混合, 在室温下培育 5 分钟后, 再添加 4mL 的 Opti-MEM I(GIBCO 公司)、10.8 μg 的 pcDNA J6dC-E2(实施例 5 中记载的 HCV J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白的表达质粒) 和 32.4 μL 的 MembranePro(注册商标) Reagent(Invitrogen 公司) 的混合物, 在室温下培育 20 分钟。将该溶液滴加到培养了一昼夜的 293T 细胞的培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 的条件下培育 18 小时。之后, 除去培养液, 更换为 35mL 的新鲜培养基(除去了 PenStrep 的培养基), 再培养 48 小时。将培养上清液回收至 50mL 的离心管中, 在 4℃、2,000×g 下离心分离 10 分钟。将上清液移至新的 50mL 的离心管中(剩下 2mL 不取), 添加 7mL 的 MembranePro Precipitation Mix(Invitrogen 公司)。数次倒转混和, 在 4℃下静置一昼夜以上。之后, 在 4℃、5,500×g 下离心分离 5 分钟, 用移液管除去上清液。向细胞团 (pellet) 中添加 5mL 将 MembranePro Precipitation Mix 用 1×PBS(-) 稀释 6 倍的溶液, 再在 4℃、5,500×g 下离心分离 5 分钟, 用移液管除去上清液。向细胞团中添加 500 μL 的 PBS(-) 使其悬浮, 进行分注, 在 -80℃下保存至使用。将其作为“HCV-VLP”。

[0313] (b) 来自 J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白(重组蛋白)的制作

[0314] 以实施例 7 的 (1) 中记载的方法, 分别制作来自 J6CF 株的 E1 蛋白和 E2 蛋白(重组蛋白)。

[0315] (c) 酶免疫测定 (EIA)

[0316] 将各 50ng 作为重组蛋白的 E1 蛋白和 E2 蛋白混合, 将其混合物用 PBS(-) 稀释并添加至 96 孔板 (Nunc 公司) 中以达到 50 μL/孔, 进行固相化。同样, 添加在“a. HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 的制作”中制作的 HCV-VLP, 以达到 500ng/孔, 在 4℃下培育一昼夜进行固相

化。倾析 (decant) 除去抗原溶液, 添加用 milliQ 水稀释 5 倍的 Blocking One (Nacalai Tesque 公司), 以达到 $200 \mu\text{L}$ /孔, 在室温下培育 1 小时进行封闭。倾析除去封闭溶液, 用含有 0.05% (v/v) 吐温 20 (Sigma 公司) 的 PBS(-) (下称“洗涤液”) 洗涤 2 次。添加用洗涤液稀释的单克隆抗体溶液 (P18-9E 或 P19-7D), 以达到 $50 \mu\text{L}$ /孔。在作为阴性对照的孔中仅添加洗涤液, 以达到 $50 \mu\text{L}$ /孔。在室温下培育约 1.5 小时后, 用洗涤液洗涤 3 次。接着, 添加用洗涤液稀释至 3,000 倍的 HRP 标记抗小鼠 IgG 抗体 (Amersham 公司), 以达到 $50 \mu\text{L}$ /孔, 在室温下培育 1 小时后, 用洗涤液洗涤 4 次。按过氧化酶发色试剂盒 (Sumiron 公司) 的产品所附文件制备发色液, 添加该发色液以达到 $50 \mu\text{L}$ /孔。在室温下培育 15 分钟后, 添加试剂盒中包含的反应停止液, 达到 $50 \mu\text{L}$ /孔。之后, 用酶标仪 (Model 680, Bio-Rad 公司) 测定 450nm 的吸光度。由各孔的吸光度减去阴性对照的孔的吸光度, 将所得的值作为各溶液的反应值。

[0317] 实验中用单克隆抗体 8D10-3 (W02010/038789) 作为对照抗体。单克隆抗体 8D10-3 是用重组 E2 蛋白对 BALB/c 小鼠进行免疫获得的、具有 E2 蛋白的线状表位的抗体。

[0318] 结果示于图 6 ~ 图 8 中。图 6 显示使用将重组 E1 蛋白和 E2 蛋白的混合物固相化的板的、单克隆抗体 8D10-3 的 EIA 的结果。图 7 显示使用将 HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 固相化的板的、单克隆抗体 8D10-3 和单克隆抗体 P18-9E 的 EIA 的结果。图 8 显示使用将 HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 固相化的板的、单克隆抗体 8D10-3 和单克隆抗体 P19-7D 的 EIA 的结果。图中纵轴表示 450nm 的吸光度的值, 横轴表示单克隆抗体的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)。

[0319] 结果显示, 单克隆抗体 8D10-3 与作为重组蛋白的 E1 蛋白和 E2 蛋白的混合物反应 (图 6)。另一方面, 单克隆抗体 8D10-3 对抗 HCV-VLP 的反应比单克隆抗体 P18-9E 对抗 HCV-VLP 弱 (图 7)。同样, 单克隆抗体 8D10-3 对抗 HCV-VLP 的反应比单克隆抗体 P19-7D 对抗 HCV-VLP 弱 (图 8)。

[0320] 由于单克隆抗体 8D10-3 是具有 E2 蛋白的线状表位的抗体, 识别 HCV-VLP 表面的包膜构造的能力弱; 而单克隆抗体 P18-9E 和单克隆抗体 P19-7D 对抗 HCV-VLP 的反应强, 暗示它们识别作为由 HCV 颗粒表面的 E1 蛋白和 E2 蛋白构成的复合物的包膜型构象 (envelope conformation)。

[0321] B. 使用 Biacore 研究单克隆抗体对抗 HCV 样颗粒 (HCV-VLP) 的反应性

[0322] (a) protein A/G 的固定化

[0323] 在表面等离子共振测定装置 Biacore S51 (GE 公司) 用传感器芯片中, 将 S 系列传感器芯片 CM-5 (GE 公司) 装在 Biacore S51 上, 达到将用超纯水稀释至 $1\times$ 的分析缓冲液即 HBS-EP (GE 公司) 以 $30 \mu\text{L}$ /分钟的流速在芯片上流过的状态。内部温度设定为 25°C 。制备胺偶联试剂盒 (GE 公司) 中的 EDC (N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐) 和 NHS (N-羟基琥珀酰亚胺), 使其分别达到 100mM 和 400mM。用 Acetate 4.0 (GE 公司) 制备 $50 \mu\text{g/mL}$ 的 protein A/G (Pierce 公司)。使用制备的 EDC、NHS 和同一试剂盒中的乙醇胺溶液将 protein A/G 用胺偶联法固定化。一系列的固定化操作以 $10 \mu\text{L}$ /分钟的流速进行, protein A/G 的添加时间设定为 10 分钟。由此在同一流动池 (flow cell) 的两个点 1 和 2 处将 protein A/G 近似等量固定化。

[0324] (b) 抗体的捕获

[0325] 将用 HBS-EP 制成 $20 \mu\text{g/mL}$ 的、纯化单克隆抗体 P18-9E 和 Mouse IgG (Sigma 公

司)以 10 μ L/ 分钟的流速在上述芯片上流过 8 分钟。利用 Protein A/G 与各抗体的 Fc 部位的亲和性,在芯片上的点 1 处捕获单克隆抗体 P18-9E,点 2 处捕获小鼠 IgG。

[0326] (c) 与 VLP 的结合和解离

[0327] 将用 HBS-EP 制成 30、100、300 μ g/mL 的 HCV-VLP 以 10 μ L/ 分钟的流速在上述芯片上分别流过 3 分钟,通过表面等离子共振实时测量监测 VLP 的结合反应后,将 HBS-EP 流过 10 分钟,测定解离反应。

[0328] (d) 分析

[0329] 分析使用 S51 Evaluation。测定值用共振反应的单位 RU (Resonance Unit) 表示。将 HCV-VLP 对抗小鼠 IgG 的反应作为非特异吸附,通过从 HCV-VLP 对抗单克隆抗体 P18-9E 的反应中减去来进行校正。

[0330] (e) 结果

[0331] 其结果,观察到对单克隆抗体 P18-9E 有依赖于 VLP 浓度、且类似抗原抗体反应的温和结合及解离。该结果还暗示,单克隆抗体 P18-9E 与 HCV-VLP 结合,识别作为由 HCV 颗粒表面的 E1 蛋白和 E2 蛋白构成的复合物的包膜立体构造。

[0332] 产业上的可利用性

[0333] 本发明的具有 HCV 感染抑制活性的抗体可用作 HCV 感染的治疗和预防用药物。

[0334] 序列表自由文本

[0335] SEQ ID NO :1 :表示克隆至 pJFH-1 中的 HCV 基因组 cDNA。

[0336] SEQ ID NO :2 :表示克隆至 pJ6/JFH-1 中的嵌合 HCV 基因组 cDNA 的序列。

[0337] SEQ ID NO :3 :表示引物 (J6E1dTM-s) 的序列。

[0338] SEQ ID NO :4 :表示引物 (J6E1dTM-as) 的序列。

[0339] SEQ ID NO :5 :表示引物 (J6E2dTM-s) 的序列。

[0340] SEQ ID NO :6 :表示引物 (J6E2dTM-as) 的序列。

[0341] SEQ ID NO :7 :表示 J6CF 株的 E1 蛋白的 1 ~ 162 位的氨基酸的序列。

[0342] SEQ ID NO :8 :表示 J6CF 株的 E2 蛋白的 1 ~ 337 位的氨基酸的序列。

[0343] SEQ ID NO :9 :表示编码单克隆抗体 P18-9E 的 VH 的基因的核苷酸序列。

[0344] SEQ ID NO :10 :表示编码单克隆抗体 P18-9E 的 VL 的基因的核苷酸序列。

[0345] SEQ ID NO :11 :表示编码单克隆抗体 P19-7D 的 VH 的基因的核苷酸序列。

[0346] SEQ ID NO :12 :表示编码单克隆抗体 P19-7D 的 VL 的基因的核苷酸序列。

[0347] SEQ ID NO :13 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 的氨基酸序列。

[0348] SEQ ID NO :14 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 的氨基酸序列。

[0349] SEQ ID NO :15 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 的氨基酸序列。

[0350] SEQ ID NO :16 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 的氨基酸序列。

[0351] SEQ ID NO :17 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 中的 FR1 的氨基酸序列。

[0352] SEQ ID NO :18 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 中的 CDR1 的氨基酸序列。

[0353] SEQ ID NO :19 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 中的 FR2 的氨基酸序列。

[0354] SEQ ID NO :20 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 中的 CDR2 的氨基酸序列。

[0355] SEQ ID NO :21 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 中的 FR3 的氨基酸序列。

[0356] SEQ ID NO :22 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 中的 CDR3 的氨基酸序列。

- [0357] SEQ ID NO :23 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VH 中的 FR4(J 区域) 的氨基酸序列。
- [0358] SEQ ID NO :24 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 中的 FR1 的氨基酸序列。
- [0359] SEQ ID NO :25 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 中的 CDR1 的氨基酸序列。
- [0360] SEQ ID NO :26 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 中的 FR2 的氨基酸序列。
- [0361] SEQ ID NO :27 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 中的 CDR2 的氨基酸序列。
- [0362] SEQ ID NO :28 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 中的 FR3 的氨基酸序列。
- [0363] SEQ ID NO :29 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 中的 CDR3 的氨基酸序列。
- [0364] SEQ ID NO :30 :表示单克隆抗体 P18-9E 的 VL 中的 FR4(J 区) 的氨基酸序列。
- [0365] SEQ ID NO :31 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 中的 FR1 的氨基酸序列。
- [0366] SEQ ID NO :32 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 中的 CDR1 的氨基酸序列。
- [0367] SEQ ID NO :33 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 中的 FR2 的氨基酸序列。
- [0368] SEQ ID NO :34 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 中的 CDR2 的氨基酸序列。
- [0369] SEQ ID NO :35 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 中的 FR3 的氨基酸序列。
- [0370] SEQ ID NO :36 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 中的 CDR3 的氨基酸序列。
- [0371] SEQ ID NO :37 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VH 中的 FR4(J 区) 的氨基酸序列。
- [0372] SEQ ID NO :38 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 中的 FR1 的氨基酸序列。
- [0373] SEQ ID NO :39 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 中的 CDR1 的氨基酸序列。
- [0374] SEQ ID NO :40 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 中的 FR2 的氨基酸序列。
- [0375] SEQ ID NO :41 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 中的 CDR2 的氨基酸序列。
- [0376] SEQ ID NO :42 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 中的 FR3 的氨基酸序列。
- [0377] SEQ ID NO :43 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 中的 CDR3 的氨基酸序列。
- [0378] SEQ ID NO :44 :表示单克隆抗体 P19-7D 的 VL 中的 FR4(J 区) 的氨基酸序列。
- [0379] 本说明书中引用的所有刊物、专利和专利申请都原样作为参考,援引到本说明书中。

[0001]

CPCH1260316P

序 列 表

<110> 东丽株式会社

日本国立感染症研究所

<120> 对丙型肝炎病毒(HCV)具有感染抑制活性的抗体及其用途

<130> PH-4553-PCT

<150> 2009-251165

<151> 2009-10-30

<150> 2009-251341

<151> 2009-10-30

<160> 44

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 9678

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 在 pJFH-1 中克隆的 HCV 基因组 cDNA

<400> 1

acctgcccct aataggggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt	60
cttcacgcag aaagcgccta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc	120
ccccctcccg ggagagccat agtggctctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg	180
aagactgggt cctttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg	240
caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgtggtactg cctgataggg	300
cgcttgcgag tgccccgga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc	360
tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgccagaa gacgttaagt tcccgggcgg	420
cggccagatc gttggcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg	480
cacgacaagg aaaacttcgg agcgggccca gccacgtggg agacgccagc ccatccccaa	540
agatcggcgc tccactggca aggcctgggg aaaaccaggt cgcccctggc ccctatatgg	600
gaatgaggga ctcggctggg caggatggct cctgtcccc cgaggctctc gccctcctg	660

[0002]

gggccccact gacccccggc ataggtcgcg caacgtgggt aaagtcacg acaccctaac	720
gtgtggcttt gccgacctca tggggtacat ccccgctgta ggcgccccgc ttagtggcgc	780
cgccagagct gtcgcgcacg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt atgcaacagg	840
gaacctaccc ggtttcccct tttctatctt ctgtctggcc ctgttgtcct gcatcacctg	900
tccggtctct gctgcccagg tgaagaatac cagtagcagc tacatggtga ccaatgactg	960
ctccaatgac agcatcactt ggcagctcga ggctgcggtt ctccacgtcc ccgggtgcgt	1020
cccgtgcgag agagtgggga atacgtcacg gtgttgggtg ccagtctcgc caaacatggc	1080
tgtgcggcag ccggtgccc tcacgcaggg tctgcggacg cacatcgata tggttgtgat	1140
gtccgccacc ttctgtctg ctctctacgt gggggacctc tgtggcgggg tgatgctcgc	1200
ggcccagggtg ttcacgtctc cgccgcagta ccactggttt gtgcaagaat gcaattgctc	1260
catctaccct ggcaccatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactggtc	1320
gcccacggcc accatgatcc tggcgtacgt gatgcgcgtc cccgaggta tcatagacat	1380
cgtttagcggg gctcactggg gcgtcatgtt cggcttgcc tacttctcta tgcagggagc	1440
gtgggcgaag gtcattgtca tccttctgct ggccgctggg gtggacgcgg gcaccaccac	1500
cgttgagggc gctgttgac gttccaccaa cgtgattgcc ggctgttca gccatggccc	1560
tcagcagaac attcagctca ttaacaccaa cggcagttgg cacatcaacc gtactgcctt	1620
gaattgcaat gactccttga acaccggctt tctcgggcc ttgttctaca ccaaccgctt	1680
taactcgtca ggggtgtccag ggcgcctgtc cgcctgccgc aacatcgagg ctttccggat	1740
agggtggggc accctacagt acgaggataa tgtcaccaat ccagaggata tgaggccgta	1800
ctgctggcac tccccccaa agccgtgtgg cgtagtcccc gcgaggtctg tgtgtggccc	1860
agtgtactgt ttcaccccca gcccggtagt agtgggcacg accgacagac gtggagtgcc	1920
cacctacaca tggggagaga atgagacaga tgtcttctta ctgaacagca cccgaccgcc	1980

[0003]

gcagggctca tggttcggct gcacgtggat gaactccact ggtttcacca agacttgtgg	2040
cgcgccacct tgccgcacca gagctgactt caacgccagc acggacttgt tgtgccctac	2100
ggattgtttt aggaagcatc ctgatgccac ttatattaag tgtggttctg ggccctggct	2160
cacaccaaag tgccitggicc actaccctta cagactctgg cattaccctt gcacagtcaa	2220
ttttaccatc ttcaagataa gaatgtatgt aggggggggt gagcacaggc tcacggccgc	2280
atgcaacttc actcgtgggg atcgtgcga cttggaggac agggacagga gtcagctgtc	2340
tcctctgttg cactctacca cggaatgggc catcctgcc tgcacctact cagacttacc	2400
cgttttgtca actggctctt tccaccttca ccagaacatc gtggacgtac aatacatgta	2460
tggcctctca cctgctatca caaaatacgt cgttcgatgg gagtgggtgg tactcttatt	2520
cctgctctta gcggacgcca gagtctgcgc ctgcttgtgg atgctcatct tgttgggcca	2580
ggccgaagca gcattggaga agttggtcgt cttgcacgct gcgagtgcgg ctaactgcca	2640
tggcctccta tatittgcca tcttcttcgt ggcagcttgg cacatcaggg gtcgggtggt	2700
ccccitgacc acctattgcc tcactggcct atggcccttc tgcctactgc tcatggcaact	2760
gccccggcag gcttatgcct atgacgcacc tgtgcacgga cagataggcg tgggtttgtt	2820
gatattgatc accctcttca cactcacccc ggggtataag accctcctcg gccagtgtct	2880
gtgggtggtt tgctatctcc tgacctggg ggaagccatg attcaggagt ggttaccacc	2940
catgcaggtg cgcggcggcc gcgatggcat cgcgtgggcc gtcactatat tctgccggg	3000
tgtggtgttt gacattacca aatggctttt ggcgttgctt gggcctgctt acctcttaag	3060
ggccgctttg acacatgtgc cgtacttcgt cagagctcac gctctgataa gggatatgcg	3120
tttggtgaag cagctcgcgg ggggtaggta tgttcaggtg gcgctattgg cccttggcag	3180
gtggactggc acctacatct atgaccacct cacacctatg tcggactggg ccgctagcgg	3240
cctgcgcgac ttagcggtcg ccgtggaacc catcatcttc agtccgatgg agaagaaggt	3300

[0004]

catcgtcttg	ggagcggaga	cggctgcatg	tggggacatt	ctacatggac	ttcccgtgtc	3360
cgccccactc	ggccaggaga	tcctcctcgg	cccagctgat	ggctacacct	ccaaggggtg	3420
gaagctcctt	gtcccatca	ctgcttatgc	ccagcaaaca	cgaggcctcc	tgggcgccat	3480
agtggtagt	atgacggggc	gtgacaggac	agaacaggcc	ggggaagtcc	aaatcctgtc	3540
cacagtctct	cagtccttcc	tcggaacaac	catctcgggg	gttttgtgga	ctgtttacca	3600
cggagctggc	aacaagactc	tagccggctt	acgggggtccg	gtcacgcaga	tgtactcgag	3660
tgctgagggg	gacttggtag	gttgcccag	ccccctggg	accaagtctt	tggagccgtg	3720
caagtgtgga	gccgtcgacc	tatatctggt	cacgcggaac	gtgatgtca	tcccggctcg	3780
gagacgcggg	gacaagcggg	gagcattgct	ctccccgaga	cccatttcga	ccttgaaggg	3840
gtcctcgggg	gggccgggtc	tctgccctag	gggccacgtc	gttgggctct	tccgagcagc	3900
tgtgtgctct	cggggcgttg	ccaaatccat	cgatttcac	cccgttgaga	cactcgacgt	3960
tgttacaagg	tctcccactt	tcagtacaa	cagcacgcca	ccggctgtgc	cccagacct	4020
tcaggtcggg	tacttgcatg	ctccaactgg	cagtggaaag	agcaccaagg	tccctgtcgc	4080
gtatgccgcc	caggggtaca	aagtactagt	gcttaacccc	tcggtagctg	ccaccctggg	4140
gtttggggcg	tacctatcca	aggcacatgg	catcaatccc	aacattagga	ctggagtcag	4200
gaccgtgatg	accggggagg	ccatcacgta	ctccacatat	ggcaaatttc	tcgccgatgg	4260
gggctgcgct	agcgggcctt	atgacatcat	catatgcgat	gaatgccacg	ctgtggatgc	4320
tacctccatt	ctcggcacg	gaacggtcct	tgatcaagca	gagacagccg	gggtcagact	4380
aactgtgctg	gtacggcca	caccccccg	gtcagtgaca	accccccatc	ccgatataga	4440
agaggtaggc	ctcgggcggg	agggtgagat	ccccttctat	gggagggcga	ttcccctatc	4500
ctgcatcaag	ggaggagac	acctgatttt	ctgccactca	aagaaaaagt	gtgacgagct	4560
cgcggcgccc	cttcggggca	tgggcttgaa	tgccgtggca	tactatagag	ggttggacgt	4620

[0005]

ctccataata ccagctcagg gagatgtggt ggtcgtcgcc accgacgccc tcatgacggg	4680
gtacactgga gactttgact ccgtgatcga ctgcaatgta gcggtcaccc aagctgtcga	4740
cttcagcctg gaccccacct tcactataac cacacagact gtcccacaag acgtgtctc	4800
acgcagtcag cgccgcgggc gcacaggtag aggaagacag ggcacttata ggtatgtttc	4860
cactggtgaa cgagcctcag gaatgtttga cagtgtagt ctttgtgagt gctacgacgc	4920
aggggctgcg tggtagatc tcacaccagc ggagaccacc gtcaggctta gacgtattt	4980
caacacgccc ggcctaccgc tgtgtcaaga ccatcttgaa ttttgggagg cagttttcac	5040
cggcctcaca cacatagacg cccacttcct ctcccaaaca aagcaagcgg gggagaactt	5100
cgcgtaccta gtagcctacc aagctacggt gtgcgccaga gccaaggccc ctccccgtc	5160
ctgggacgcc atgtggaagt gcctggcccc actcaagcct acgcttgagg gccccacacc	5220
tctcctgtac cgtttgggcc ctattaccaa tgaggtcacc ctcacacacc ctgggacgaa	5280
gtacatcgcc acatgcatgc aagctgacct tgaggtcatg accagcacgt gggtcctagc	5340
tggaggagtc ctggcagccg tcgccgata ttgcctggcg actggatgag tttccatcat	5400
cggccgcttg cacgtcaacc agcgagtcgt cgttgcgcg gataaggagg tcctgtatga	5460
ggcttttgat gagatggagg aatgcgcctc tagggcggt ctcacgaag aggggcagcg	5520
gatagccgag atgttgaagt ccaagatcca aggcttgctg cagcaggcct ctaagcaggc	5580
ccaggacata caaccgcta tgcaggcttc atggcccaaa gtggaacaat tttgggccag	5640
acacatgtgg aacttcatta gcggcatcca atacctcgca ggattgtcaa cactgccagg	5700
gaaccccgcg gtggcttcca tgatggcatt cagtgcgcc ctcaccagtc cgttgtcgac	5760
cagtaccacc atccttctca acatcatggg aggtgtgta gcgtcccaga tcgcaccacc	5820
cgcgggggcc accggctttg tcgtcagtgg cctgggtggg gctgccgtgg gcagcatagg	5880
cctgggtaag gtgctggtgg acatcctggc aggatatggt gcgggcattt cgggggcct	5940

[0006]

cgtcgcattc aagatcatgt ctggcgagaa gccctctatg gaagatgtca tcaatctact	6000
gcctgggatac ctgtctccgg gagccctggg ggtgggggtc atctgcgcgg ccattctgcg	6060
ccgccacgtg ggaccggggg agggcgcggt ccaatggatg aacaggctta ttgcctttgc	6120
ttccagagga aaccacgtcg cccctactca ctacgtgacg gagtcggatg cgtcgcagcg	6180
tgtgacccaa ctacttggct ctcttactat aaccagccta ctcagaagac tccacaattg	6240
gataactgag gactgcccc a tcccatgctc cggatcctgg ctccgcgacg tgtgggactg	6300
ggtttgcacc atcttgacag acttcaaaaa ttggtgacc tctaaattgt tccccaaagt	6360
gcccggcctc cctttcatct cttgtcaaaa ggggtacaag ggtgtgtggg ccggcactgg	6420
catcatgacc acgcgctgcc cttgcggcgc caacatctct ggcaatgtcc gcctgggctc	6480
tatgaggatc acagggccta aaacctgcat gaacacctgg caggggacct ttcctatcaa	6540
ttgctacacg gagggccagt gcgcgccgaa acccccacg aactacaaga ccgccatctg	6600
gaggggtggc gcctcggagt acgcggaggt gacgcagcat gggtcgtact cctatgtaac	6660
aggactgacc actgacaatc tga aaattcc ttgccaacta ctttctccag agtttttctc	6720
ctgggtggac ggtgtgcaga tccatagggt tgcaccaca ccaaagccgt ttttccggga	6780
tgaggctctg ttctgcgttg ggttaattc ctatgtgtc gggteccagc ttccctgtga	6840
acctgagccc gacgcagacg tattgaggtc catgctaaca gatccgccc acatcacggc	6900
ggagactgcg gcgcggcgct tggcacgggg atcacctcca tctgaggcga gtcctcagt	6960
gagccagcta tcagcaccgt cgtgcgggc cacctgcacc acccacagca acacctatga	7020
cgtggacatg gtcgatgcca acctgctcat ggagggcggt gtggctcaga cagagcctga	7080
gtccagggtg cccgttctgg actttctcga gccaatggcc gaggaagaga gcgaccttga	7140
gccctcaata ccatcggagt gcatgctccc caggagcggg tttccacggg ccttaccggc	7200
ttgggcacgg cctgactaca acccgccgct cgtggaatcg tggaggaggc cagattacca	7260

[0007]

accgcccacc gttgctgggt gtgtctctccc ccccccaag aaggccccga cgctcccc	7320
aaggagacgc cggacagtgg gtctgagcga gagcaccata tcagaagccc tccagcaact	7380
ggccatcaag acctttggcc agccccctc gagcgggtgat gcaggctcgt ccacgggggc	7440
gggcgccgcc gaatccggcg gtccgacgtc ccctgggtgag ccggccccct cagagacagg	7500
ttccgcctcc tctatgcccc ccctcgaggg ggagcctgga gatccggacc tggagtctga	7560
tcaggtagag cttaacctc cccccaggg ggggggggta gctcccggtt cgggctcggg	7620
gtcttggtct acttgctccg aggaggacga taccaccgtg tgctgctcca tgcatactc	7680
ciggaccggg gctctaataa ctccctgtag cccgaagag gaaaagttgc caatcaacc	7740
tttagtaac tcgctgttgc gataccataa caagggtac tgtacaacat caaagagcgc	7800
cicacagagg gctaaaaagg taacttttga caggacgcaa gtgctcgacg ccattatga	7860
ctcagtctta aaggacatca agctagcggc ttccaaggtc agcgcaaggc tcctcacctt	7920
ggaggaggcg tgccagtga ctccacccca ttctgcaaga tccaagtatg gattcggggc	7980
caaggaggtc cgcagcttgt ccgggagggc cgtaaccac atcaagtccg tgtggaagga	8040
cctcctggaa gaccacaaa caccaattcc cacaaccatc atggccaaaa atgagggtgt	8100
ctgcgtggac ccgccaagg ggggtaagaa accagctcgc ctcctggtt accctgacct	8160
cggcgtccgg gtctgcgaga aaatggccct ctatgacatt acacaaaagc ttctcaggc	8220
ggtaatggga gcttctatg gcttcagta ctccccigcc caacgggtgg agtatctctt	8280
gaaagcatgg gcggaaaaga aggaccccat gggtttttcg tatgataccc gatgcttcga	8340
ctcaaccgtc actgagagag acatcaggac cgaggagtcc atataccagg cctgctccct	8400
gcccaggag gcccgcacig ccatacactc gctgactgag agactttacg taggagggcc	8460
catgttcaac agcaagggtc aaacctgcgg ttacagacgt tgccgcgcca gcggggtgct	8520
aaccactagc atgggtaaca ccatcacatg ctatgtgaaa gccctagcgg cctgcaaggc	8580

[0008]

tgcggggata gttgcgcca caatgctggt atgcggcgat gacctagtag tcatctcaga	8640
aagccagggg actgaggagg acgagcggaa cctgagagcc ttcacggagg ccatgaccag	8700
gtactctgcc cctcctggtg atccccccag accggaatat gacctggagc taataacatc	8760
ctgttctca aatgtgtctg tggcgttggg cccgcggggc cgccgcagat actacctgac	8820
cagagacca accactccac tcgcccgggc tgcctgggaa acagttagac actcccctat	8880
caattcatgg ctgggaaaca tcatccagta tgctccaacc atatgggttc gcatggtcct	8940
aatgacacac ttcttctcca ttctcatggt ccaagacacc ctggaccaga acctcaactt	9000
tgagatgtat ggatcagtat actccgtgaa tcctttggac cttccagcca taatigagag	9060
gttacacggg ctgacgcct ttctatgca cacatactct caccacgaac tgacgcgggt	9120
ggcttcagcc ctcagaaaac ttggggcgcc acccctcagg gtgtggaaga gtcgggctcg	9180
cgcagtcagg gcgtccctca tctcccgtag agggaaagcg gccgtttgcg gccgatatct	9240
cttcaattgg gcggtgaaga ccaagctcaa actcactcca ttgccggagg cgcgcctact	9300
ggacttaicc agttggttca ccgtcggcgc cggcgggggc gacatttttc acagcgtgtc	9360
gcgcgcccga ccccgctcat tactcttcgg cctactccta cttttcgtag gggtaggcct	9420
cttctactc cccgctcggg agagcggcac acactaggta cactccatag ctaactgttc	9480
cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttcttttt tttttttttc	9540
cctctttctt cctttctcat cttattctac tttctttctt ggtggtcca tcttagccct	9600
agtcacggct agctgtgaaa ggtccgtgag ccgcatgact gcagagagtg ccgtaactgg	9660
tctctctgca gatcatgt	9678

<210> 2

<211> 9683

<212> DNA

<213> 人工序列

[0009]

<220>

<223> 在 pJ6/JFH-1 中克隆的 HCV 基因组 cDNA

<400> 2

```

acccgcccct aataggggcg acactccgcc atgaatcact cccctgtgag gaactactgt      60

cttcacgcag aaagcgtcta gccatggcgt tagtatgagt gtcgtacagc ctccaggccc      120

ccccctcccg ggagagccat agtggctctgc ggaaccggtg agtacaccgg aattgccggg      180

aagactgggt cttttcttgg ataaaccac tctatgcccg gccatttggg cgtgcccccg      240

caagactgct agccgagtag cgttgggttg cgaaaggcct tgtggtactg cctgataggg      300

tgcttgcgag tgccccggga ggtctcgtag accgtgcacc atgagcaca atcctaaacc      360

tcaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg tcgccacaaa gacgttaagt ttccgggcgg      420

cggccagatc gttagcggag tatacttggt gccgcgcagg ggccccaggt tgggtgtgcg      480

cgcgacaagg aagacttcgg agcgggtcca gccacgtgga aggcgccagc ccatccctaa      540

agatcggcgc tccactggca aatcctgggg aaaaccagga taccctggc ccctatacgg      600

gaatgaggga ctcggctggg caggatggct cctgtcccc cgaggttccc gtccctcttg      660

gggcccgaat gacccccggc ataggtcgcg caacgtgggt aaggtcatcg ataccctaac      720

gtgcggcttt gccgacctca tggggtacat ccctgtcgtg ggcgccccgc tcggcggcgt      780

cgccagagct ctcgcgcatg gcgtgagagt cctggaggac ggggttaatt ttgcaacagg      840

gaacttaccg ggttgctcct tttctatctt cttgttgccc ctgctgtcct gcatcaccac      900

cccgtctccc gctgccgaag tgaagaacat cagtaccggc tacatggtga ctaacgactg      960

caccaatgac agcattacct ggcagctcca ggctgtgtc ctccacgtcc ccgggtgcgt     1020

cccgtgcgag aaagtgggga atgcatctca gtgctggata ccggtctcac cgaatgtggc     1080

cgtgcagcgg cccggcgccc tcacgcaggg cttgcggacg cacatcgaca tggttgtgat     1140

gtccgccacg ctctgtcttg cctctacgt gggggacctc tgcggtgggg tgatgtctgc     1200

```

[0010]

agcccaaatg ttcatgtct cgcgcagca ccaactggtt gtccaagact gcaattgctc	1260
catctaccct ggtaccatca ctggacaccg catggcatgg gacatgatga tgaactggtc	1320
gccacggct accatgatct tggcgtacgc gatgcgtgtc cccgaggta ttatagacat	1380
cattagcggg gtcattggg gcgtcatgtt cggcttggcc tacttctcta tgcaggagc	1440
gtgggcgaaa gtcgttgtca tccttctgtt ggccgccggg gtggacgcgc gcaccatac	1500
tgttgggggt tctgccgcgc agaccaccgg gcgcctcacc agcttatttg acatgggccc	1560
caggcagaaa atccagctcg ttaacaccaa tggcagctgg cacatcaacc gcaccgcct	1620
gaactgcaat gaciccttgc acaccggctt tatcgcgtct ctgttctaca cccacagctt	1680
caactcgtca ggatgtcccg aacgcatgtc cgctgccgc agtatcgagg ccttccgggt	1740
gggatggggc gccttgcaat atgaggataa tgtcaccaat ccagaggata tgagacccta	1800
tigtgtggcac taccaccaa ggcatgttg cgtggtctcc gcgaagactg tgtgtggccc	1860
agtgtactgt ttacccccca gccagtggt agtgggcacg accgacaggc ttggagcgcc	1920
cacttacag tggggggaga atgagacaga tgtcttcta ttgaacagca ctcgaccacc	1980
gctggggta tggttcggct gcacgtggat gaactcttct ggctacacca agacttgcgg	2040
cgcaccaccc tgccgtacta gagctgactt caacgccagc acggacctgt tgtccccac	2100
ggactgtttt aggaagcatc ctgataccac ttacctcaaa tgcggctctg ggccctggct	2160
cagccaagg tgctgatcg actacccta cagctcttg cattaccct gcacagttaa	2220
ctataccatc ttcaaaataa ggatgtatgt gggaggggtt gagcacaggc tcacggctgc	2280
atgcaatttc actcgtgggg atcgttgcaa cttggaggac agagacagaa gtcaactgtc	2340
tcctttgttg cactccacca cggaatgggc catttiacct tgccttact cggacctgcc	2400
cgcttctcg actggtcttc tccacctca caaaacatc gtggacgtac aattcatgta	2460
tggcctatca cctgccctca caaaatacat cgtccgatgg gaggggtaa tactcttatt	2520

[0011]

ccigctctta gcggacgcca gggtttgcgc ctgcttatgg atgctcatct tgttgggcca	2580
ggccgaagca gcactagaga agctggcat cttgcacgct gcgagcgag ctagctgcaa	2640
tggcttccta tattttgtca tcttttctgt ggctgcttgg tacatcaagg gtcgggtagt	2700
cccccttagct acctattccc tcactggcct gtggctcctt agcctactgc tcctagcatt	2760
gccccaacag gcttatgctt atgacgcac tgtgcatggc cagataggag cggtctgct	2820
ggtaatgac accctcttca cactacccc ggggtataag accctcctcg gccagtgtct	2880
gtgggtgttg tgctatctcc tgaccctggg ggaagccatg attcaggagt gggtagcacc	2940
catgcaggtg cgcggcggcc gcgatggcat cgcgtgggccc gtcactatat tctccccggg	3000
tgtggtgttt gacattacca aatggctttt ggcgttgctt gggcctgctt acctcttaag	3060
ggccgctttg acacatgtgc cgtacttctg cagagctcac gctctgataa gggtagcgc	3120
tttggtgaag cagctcgcgg ggggtaggta tgttcaggtg gcgctattgg cccttggcag	3180
gtggactggc acctacatct atgaccacct cacacctatg tcggactggg ccgctagcgg	3240
cctgcgcgac ttagcggctg ccgtggaacc catcatcttc agtccgatgg agaagaaggt	3300
catcgtctgg ggagcggaga cggtgcatg tggggacatt ciacatggac ttcccgtgtc	3360
cgcccactc ggccaggaga tctcctcgg ccagctgat ggctacacct ccaaggggtg	3420
gaagctcctt gctcccatca ctgcttatgc ccagcaaaca cgaggcctcc tgggcgccat	3480
agtgtgagt atgacggggc gtgacaggac agaacaggcc ggggaagtcc aaatcctgtc	3540
cacagtctct cagtccttcc tcggaacaac catctcgggg gttttgtgga ctgtttacca	3600
cggagctggc aacaagactc tagccggctt acggggctcg gtcacgcaga tgtactcgag	3660
tgtgagggg gacttgtag gctggcccag cccccctggg accaagtcct tggagccgtg	3720
caagtgtgga gccgtcgacc tatacttggt cagcggaac gctgatgtca tcccggctcg	3780
gagacgcggg gacaagcggg gagcattgct ctccccgaga cccatttcga ccttgaaggg	3840

[0012]

gtcctcgggg gggccggtgc tctgccctag gggccacgtc gttgggctct tccgagcagc	3900
tgtgtgtctt cggggcgtgg ccaaattccat cgatttcata cccgttgaga cactcgacgt	3960
tgttacaagg tctcccactt tcagtgacaa cagcacgcca ccggctgtgc cccagaccta	4020
tcaggtcggg tacttgcatg ctccaactgg cagtggaaag agcaccaagg tccctgtcgc	4080
gtatgccgcc caggggtaca aagtactagt gcttaacccc tcggtagctg ccaccctggg	4140
gtttggggcg tacctatcca aggcacatgg catcaatccc aacattagga ctggagtcag	4200
gaccgtgatg accggggagg ccatcacgta ctccacatat ggcaaatttc tcgccgatgg	4260
gggctgcgt agcgggcctt atgacatcat catatgcgat gaatgccacg ctgtggatgc	4320
tacctccatt ctcggcatcg gaacggtcct tgatcaagca gagacagccg gggtcagact	4380
aactgtgtg gctacggcca cccccccgg gtcagtgaca acccccatac ccgatataga	4440
agaggtaggc ctcgggcggg agggtagat ccccttctat gggagggcga ttcccctatc	4500
ctgcatcaag ggaggagac acctgatttt ctgccactca aagaaaaagt gtgacgagct	4560
cgcggcggcc cttcggggca tgggcttgaa tgccgtggca tactatagag ggttgacgt	4620
ctccataata ccagctcagg gagatgtggt ggtcgtcgcc accgacgccc tcatgacggg	4680
gtacactgga gactttgact ccgtgatcga ctgcaatgta gcggtcacc aagctgtcga	4740
cttcagcctg gacccacct tctactatac cacacagact gtcccacaag acgtgtctc	4800
acgcagtcag cgccgcgggc gcacaggtag aggaagacag ggcacttata ggtatgttc	4860
cactggtgaa cgagcctcag gaatgtttga cagtgtagt ctttgtgagt gctacgacgc	4920
aggggctcgc tggtagatc tcacaccagc ggagaccacc gtcaggctta gagcgtattt	4980
caacacgccc ggcctaccg tgtgtcaaga ccatcttgaa ttttgggagg cagttttcac	5040
cggcctcaca cacatagacg cccacttcct ctcccaaaca aagcaagcgg gggagaactt	5100
cgcgtacct gtagcctacc aagctacggt gtgcgccaga gccaaaggccc ctccccgtc	5160

[0013]

ctgggacgcc atgtggaagt gcctggcccg actcaagcct acgcttgcgg gccccacacc	5220
tctcctgtac cgtttgggcc ctattaccaa tgaggtcacc ctcacacacc ctgggacgaa	5280
gtacatgcc acatgcatgc aagctgacct tgaggtcatg accagcacgt gggtcctagc	5340
tggaggagtc ctggcagccg tcgccgata ttgcctggcg actggatgcg tttccatcat	5400
cggccgcttg cacgtcaacc agcgagtcgt cgttgcgccg gataaggagg tcctgtatga	5460
ggcttttgat gagatggagg aatgcgcctc tagggcggct ctcatcgaag aggggcagcg	5520
gatagccgag atgttgaagt ccaagatcca aggcttgctg cagcaggcct ctaagcaggc	5580
ccaggacata caaccgcta tgcaggettc atggcccaaa gtggaacaat tttgggccag	5640
acacatgtgg aacttcatta gcggcatcca atacctcgca ggattgtcaa cactgccagg	5700
gaaccccgcg gtggcttcca tgatggcatt cagtgccgcc ctcaccagtc cgttgcgac	5760
cagtaccacc atccttctca acatcatggg aggctggta gcgtccaga tcgcaccacc	5820
cgcgggggcc accggctttg tcgtcagtgg cctgggtggg gctgccgtgg gcagcatagg	5880
cctgggtaag gtgctggtag acatcctggc aggatatggt gcgggcattt cgggggcctt	5940
cgtgcattc aagatcatgt ctggcgagaa gccctctatg gaagatgtca tcaatctact	6000
gcctgggata ctgtctccgg gagccctggt ggtgggggtc atctgcgcgg ccattctgcg	6060
ccgccacgtg ggaccggggg agggcgcggt ccaatggatg aacaggctta ttgcctttgc	6120
ttccagagga aaccagtcg ccctactca ctacgtgacg gagtcggatg cgtcgcagcg	6180
tgtgaccaa ctacttggt ctcttactat aaccagccta ctcagaagac tccacaattg	6240
gataactgag gactgcccc tccatgctc cggatcctgg ctccgcgacg tgtgggactg	6300
ggtttgcacc atcttgacag acttcaaaaa ttggctgacc tctaaattgt tcccaagct	6360
gcccggcctc cccttcatct cttgtcaaaa ggggtacaag ggtgtgtggg ccggcactgg	6420
catcatgacc acgcgtgcc cttgcggcgc caacatctct ggcaatgtcc gcctgggctc	6480

[0014]

tatgaggatc acagggccta aaacctgcat gaacacctgg caggggacct ttcctatcaa	6540
ttgctacacg gagggccagt gcgcgccgaa acccccacg aactacaaga ccgccatctg	6600
gagggtggcg gcctcggagt acgcggaggt gacgcagcat gggtcgtact cctatgtaac	6660
aggactgacc actgacaatc tgaaaattcc ttgccaacta ctttctccag agtttttctc	6720
ctgggtggac ggtgtgcaga tccataggtt tgcaccaca ccaaagccgt tttccggga	6780
tgaggctctg ttctgcgttg ggttaattc ctatctgtc gggtcccagc ttccctgtga	6840
acctgagccc gacgcagacg tattgaggtc catgctaaca gatccgcccc acatcacggc	6900
ggagactgcg gcgcggcgct tggcacgggg atcacctcca tctgaggcga gtcctcagt	6960
gagccagcta tcagcacctg cgtcggggc cacctgcacc acccacagca acacctatga	7020
cgtggacatg gtcgatcca acctgctcat ggaggcggt gtggctcaga cagagcctga	7080
gtccagggtg ccggttctgg actttctcga gccaatggcc gaggaagaga gcgacctga	7140
gcctcaata ccatcggagt gcatgctccc caggagcggg tttccacggg ccttaccggc	7200
ttgggcacgg cctgactaca acccgccgt cgtggaatcg tggaggaggc cagattacca	7260
accgccacc gttgctggtt gtgctctccc ccccccaag aaggccccga cgctcccc	7320
aaggagacgc cggacagtgg gtctgagcga gagcaccata tcagaagccc tccagcaact	7380
ggccatcaag acctttggcc agccccctc gagcggatg gcaggctcgt ccacgggggc	7440
gggcgccgc gaatccggcg gtccgacgtc cctggtgag ccggccccct cagagacagg	7500
ttccgcctcc tctatgcccc cctcagagg ggagcctgga gatccggacc tggagtctga	7560
tcaggtagag cttcaacctc cccccaggg ggggggggta gctcccggtt cgggctcggg	7620
gtcttggctt acttgtccg aggaggacga taccaccgtg tgctgtcca tgtcatactc	7680
ctggaccggg gctctaataa ctccctgtag cccgaagag gaaaagtgc caatcaacct	7740
tttgagtaac tcgctgttc gataccataa caaggtgtac tgtacaacat caaagagcgc	7800

[0015]

ctcacagagg gctaaaaagg taacttttga caggacgcaa gtgctcgacg cccattatga	7860
ctcagtctta aaggacatca agctagcggc ttccaaggtc agcgcaaggc tcctcacctt	7920
ggaggaggcg tgccagttga ctccacccca ttctgcaaga tccaagtatg gattcggggc	7980
caaggaggtc cgcagcttgt cggggagggc cgtaaccac atcaagtccg tgtggaagga	8040
cctcctggaa gaccacaaa caccaattcc cacaaccatc atggccaaaa atgaggtgtt	8100
ctgcgtggac cccgccaagg ggggtaagaa accagctcgc ctcatcgitt accctgacct	8160
cggcgtccgg gtctcgaga aaatggccct ctatgacatt acacaaaagc ttctcaggc	8220
ggtaatggga gcttcctatg gcttcagta ctcccctgcc caacgggtgg agtatctctt	8280
gaaagcatgg gcgaaaaaga aggaccccat gggtttttcg tatgataccc gatgcttcga	8340
ctcaaccgtc actgagagag acatcaggac cgaggagtcc atataccagg cctgctccct	8400
gcccaggag gcccgactg ccatacactc gctgactgag agactttacg taggaggggc	8460
catgttcaac agcaagggtc aaacctgcgg ttacagacgt tgccgcgcca ggggggtgct	8520
aaccactagc atgggtaaca ccatcacatg ctatgtgaaa gccctagcgg cctgcaaggc	8580
tgcggggata gtgcgcca caatgctggt atgcggcgat gacctagtag tcatctcaga	8640
aagccagggg actgaggagg acgagcggaa cctgagagcc ttcacggagg ccatgaccag	8700
gtactctgcc cctcctggtg atccccccag accggaatat gacctggagc taataacatc	8760
ctgttctca aatgtgtctg tggcgttggg cccgcggggc cgccgcagat actacctgac	8820
cagagacca accactccac tcgcccgggc tgctgggaa acagttagac actcccctat	8880
caattcatgg ctgggaaaca tcatccagta tgctccaacc atatgggttc gcatggtcct	8940
aatgacacac ttctttcca ttctcatggt ccaagacacc ctggaccaga acctcaactt	9000
tgagatgtat ggatcagtat actccgtgaa tcctttggac ctccagcca taattgagag	9060
gttacacggg ctgacgcct ttctatgca cacatactct caccacgaac tgacgcgggt	9120

[0016]

ggcttcagcc ctcagaaaac ttggggcgcc acccctcagg gtgtggaaga gtcgggctcg 9180
 cgcagtcagg gcgtccctca tctcccgtag agggaaagcg gccgtttgcg gccgatattc 9240
 ctccaattgg gcggtgaaga ccaagctcaa actcactcca ttgccggagg cgcgccctact 9300
 ggacttatcc agttgggtca ccgtcggcgc cgcggggggc gacatttttc acagcgtgtc 9360
 gcgcgcccga ccccgctcat tactcttcgg cctactccta cttttcgtag gggtaggcct 9420
 ctccctactc cccgctcggg agagcggcac aactaggta cactccatag ctaactgttc 9480
 cttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttttcttttt tttttttttc 9540
 cctctttctt cccttctcat cttattctac tttctttctt ggtggctcca tcttagccct 9600
 agtcacggct agctgtgaaa ggtccgtgag ccgcatgact gcagagagtg ccgtaactgg 9660
 tctctctgca gatcatgtct aga 9683

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 3
 cacaagcttg ccgaagtga gaacatcagt 30

<210> 4
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 4
 gctctagatt aatgagcccc gctaatgatg tc 32

[0017]

<210>	5	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
	cacaagcttc gcacccatac tggtgggg	28
<210>	6	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	6	
	gctctagatt accatcggac gatgtatttt gt	32
<210>	7	
<211>	162	
<212>	PRT	
<213>	丙型肝炎病毒株 J6CF	
<220>		
<223>	E1(1-162)	
<400>	7	
	Ala Glu Val Lys Asn Ile Ser Thr Gly Tyr Met Val Thr Asn Asp Cys	
	1 5 10 15	
	Thr Asn Asp Ser Ile Thr Trp Gln Leu Gln Ala Ala Val Leu His Val	
	20 25 30	
	Pro Gly Cys Val Pro Cys Glu Lys Val Gly Asn Ala Ser Gln Cys Trp	
	35 40 45	

[0018]

Ile Pro Val Ser Pro Asn Val Ala Val Gln Arg Pro Gly Ala Leu Thr
50 55 60

Gln Gly Leu Arg Thr His Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala Thr Leu
65 70 75 80

Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Met Leu Ala
85 90 95

Ala Gln Met Phe Ile Val Ser Pro Gln His His Trp Phe Val Gln Asp
100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly Thr Ile Thr Gly His Arg Met Ala
115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Thr Met Ile Leu Ala
130 135 140

Tyr Ala Met Arg Val Pro Glu Val Ile Ile Asp Ile Ile Ser Gly Ala
145 150 155 160

His Trp

<210> 8

<211> 337

<212> PRT

<213> 丙型肝炎病毒株 J6CF

<220>

<223> E2(1-337)

<400> 8

Arg Thr His Thr Val Gly Gly Ser Ala Ala Gln Thr Thr Gly Arg Leu
1 5 10 15

Thr Ser Leu Phe Asp Met Gly Pro Arg Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
35 40 45

[0019]

Ser	Leu	His	Thr	Gly	Phe	Ile	Ala	Ser	Leu	Phe	Tyr	Thr	His	Ser	Phe
50						55					60				
Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Pro	Glu	Arg	Met	Ser	Ala	Cys	Arg	Ser	Ile	Glu
65					70					75				80	
Ala	Phe	Arg	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Leu	Gln	Tyr	Glu	Asp	Asn	Val	Thr
				85					90					95	
Asn	Pro	Glu	Asp	Met	Arg	Pro	Tyr	Cys	Trp	His	Tyr	Pro	Pro	Arg	Gln
				100				105						110	
Cys	Gly	Val	Val	Ser	Ala	Lys	Thr	Val	Cys	Gly	Pro	Val	Tyr	Cys	Phe
				115			120						125		
Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Val	Gly	Thr	Thr	Asp	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro
				130			135						140		
Thr	Tyr	Thr	Trp	Gly	Glu	Asn	Glu	Thr	Asp	Val	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser
145					150					155					160
Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Trp	Phe	Gly	Cys	Thr	Trp	Met	Asn	Ser
				165					170						175
Ser	Gly	Tyr	Thr	Lys	Thr	Cys	Gly	Ala	Pro	Pro	Cys	Arg	Thr	Arg	Ala
				180				185						190	
Asp	Phe	Asn	Ala	Ser	Thr	Asp	Leu	Leu	Cys	Pro	Thr	Asp	Cys	Phe	Arg
				195			200						205		
Lys	His	Pro	Asp	Thr	Thr	Tyr	Leu	Lys	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu
				210			215						220		
Thr	Pro	Arg	Cys	Leu	Ile	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro
225					230					235					240
Cys	Thr	Val	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Lys	Ile	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly
				245					250					255	
Val	Glu	His	Arg	Leu	Thr	Ala	Ala	Cys	Asn	Phe	Thr	Arg	Gly	Asp	Arg
				260				265						270	
Cys	Asn	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	Gln	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	His

[0020]

275	280	285
Ser Thr Thr Glu Trp Ala Ile Leu Pro Cys Ser Tyr Ser Asp Leu Pro		
290	295	300
Ala Leu Ser Thr Gly Leu Leu His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val		
305	310	315 320
Gln Phe Met Tyr Gly Leu Ser Pro Ala Leu Thr Lys Tyr Ile Val Arg		
325	330	335
Trp		

<210> 9

<211> 473

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区

<400> 9

atggaatgga gctgggttat cctcttcctc ctgtcattaa ctgcagggtg cgatgcccag	60
ggtcagatgc agcaatctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc	120
tgcaagacta ctgacttcac cttcaacagg aactacataa gttggttgag gcaaaagcct	180
ggacagagcc ttgagtggat tgcatggatt tatgctggaa ctggtggtac taagtataat	240
cagaaattca caggcaaggc ccaaagact gtagacacat catccacac agcctacatg	300
caattcagca accigacaac tgaggactct gccgtctatt actgtgcacg atatctcttt	360
gatggttact acattcccct ctttgactac tggggtaag gcaccactct cacagtctcc	420
tcagccaaaa caacaccccc acccgtctat ccctggccc ctggaagctt ggg	473

<210> 10

<211> 477

<212> DNA

[0021]

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白 κ 链可变区

<400> 10

```

atgaggtccc cggtcagct tctgccagga cacagtttag atatgaggtt ccaggttcag      60
gttctggggc tccttctgct ctggatatca ggtgcccagt gtgatgtcca gataaccag      120
tctccatctt atcttgctgc atctccigga gaaaccattt ctattaattg caggggcaaat      180
aagagcattg acaaataatt agcctggtat caagagaaac ctgggaaaac taataaactt      240
cttatctact ctggatccac tttaaatctt ggagttccat caaagttcag tggcagtggga      300
tctggtacag atttcactct caccatcagt agcctggagc ctgaagattt tgcaatgtat      360
tattgtcaac aacataatga ataccgctc acgttcggtg ctgggaccaa gctggacctg      420
agacgggctg atgtgcacc aactgtatcc atcttccac catccagtaa gcttggg      477

```

<210> 11

<211> 457

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<223> P19-7D 免疫球蛋白 μ 链可变区

<400> 11

```

atggctgtct tagggtgtt cttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt cctgtcccag      60
gtgcagctga agcagtcagg acctggccta gtgcagccct cacagagcct gtccataacc      120
tgcacagtct ctggtttctc attaactacc tatggtgtac actgggttcg ccagtctcca      180
ggaaagggtc tggagtggct gggagtgata tggagagggt gaagcacaga ctacaatgca      240
gctttcttgt ccagactgag catcaccaag gacaattcca agagccaagt tttctttaaa      300
atgaacagtc tgcaacctga tgacactgcc atatactact gtgccaaaaa ttcctgggac      360

```

[0022]

ggggcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg cagccaaaac gacaccccca 420

cccgtttatc ccctggcccc tggaagcttg ggaaggg 457

<210> 12

<211> 447

<212> DNA

<213> 小鼠

<220>

<223> P19-7D 免疫球蛋白 κ 链可变区

<400> 12

atgaagttgc ctgtaggct gttgggtctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttcagat ctagtcagag ccttttacac agtaatggaa acacctatit acattggtac 180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

gggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggactatat ttctgtcttc aaaatacaca ttttcgtgg 360

acgttcggtg gaggcaccga gctggaaatc agtcgggctg atgctgcacc aacigtatcc 420

atcttccac catccagtaa gcttggg 447

<210> 13

<211> 157

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白 μ 2b 链可变区

<400> 13

Met Glu Trp Ser Trp Val Ile Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr Ala Gly

1

5

10

15

[0023]

Val Asp Ala Gln Gly Gln Met Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Thr Asp Phe Thr Phe
35 40 45

Asn Arg Asn Tyr Ile Ser Trp Leu Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Thr Gly Lys Ala Gln Met Thr Val Asp Thr Ser Ser His
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Phe Ser Asn Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Leu Phe Asp Gly Tyr Tyr Ile Pro Leu Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Pro Pro Pro Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Leu
145 150 155

<210> 14
<211> 159
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<223> P18-9E 免疫球蛋白 κ 链可变区

<400> 14

Met Arg Ser Pro Ala Gln Leu Leu Pro Gly His Ser Leu Asp Met Arg
1 5 10 15

Phe Gln Val Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Trp Ile Ser Gly Ala
20 25 30

[0024]

Gln Cys Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
35 40 45

Pro Gly Glu Thr Ile Ser Ile Asn Cys Arg Ala Asn Lys Ser Ile Asp
50 55 60

Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
65 70 75 80

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe
85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
100 105 110

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr
115 120 125

Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Arg Ala Asp
130 135 140

Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Lys Leu Gly
145 150 155

<210> 15
<211> 140
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<223> P19-7D 免疫球蛋白 γ 1 链可变区

<400> 15

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

Val Leu Ser Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser
20 25 30

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro
35 40 45

[0025]

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr
50 55 60

Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Leu Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn
65 70 75 80

Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp
85 90 95

Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys Asn Ser Trp Asp Gly Ala Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro
115 120 125

Pro Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Leu Gly Arg
130 135 140

<210> 16

<211> 149

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P19-7D κ 链可变区

<400> 16

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

[0026]

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys
100 105 110

Ser Gln Asn Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu
115 120 125

Glu Ile Ser Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser Lys Leu Gly
145

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区 FR1

<400> 17

Asp Ala Gln Gly Gln Met Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Thr Asp Phe Thr Phe Asn
20 25 30

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<223> P18-9E 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区 CDR1

<400> 18

Arg Asn Tyr Ile Ser

[0027]

1 5

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区 FR2

<400> 19

Trp Leu Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区 CDR2

<400> 20

Trp Ile Tyr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Thr
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区 FR3

<400> 21

[0028]

Lys Ala Gln Met Thr Val Asp Thr Ser Ser His Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

Phe Ser Asn Leu Thr Thr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区 CDR3

<400> 22

Tyr Leu Phe Asp Gly Tyr Tyr Ile Pro Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 2b 链可变区 FR4

<400> 23

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
1 5 10

<210> 24

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ κ 链可变区 FR1

<400> 24

[0029]

Ala Gln Cys Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gly Glu Thr Ile Ser Ile Asn Cys
20 25

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白κ链 CDR1 可变区 CDR1

<400> 25

Arg Ala Asn Lys Ser Ile Asp Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白γ κ链可变区 FR2

<400> 26

Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白κ链 CDR1 可变区 CDR2

[0030]

<400> 27

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 28

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ κ 链可变区 FR3

<400> 28

Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P18-9E 免疫球蛋白 κ 链 CDR1 可变区 CDR3

<400> 29

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ κ 链可变区 FR4

[0031]

<400> 30

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Arg
1 5 10

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 1 链可变区 FR1

<400> 31

Leu Ser Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly
1 5 10 15

Phe Ser Leu Thr
20

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P19-7D 免疫球蛋白 γ 1 链可变区 CDR1

<400> 32

Thr Tyr Gly Val His
1 5

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

[0032]

<223> 免疫球蛋白 γ 1 链可变区 FR2

<400> 33

Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly
1				5					10				

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P19-7D 免疫球蛋白 γ 1 链可变区 CDR2

<400> 34

Val	Ile	Trp	Arg	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Leu	Ser
1				5					10					15	

<210> 35

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 1 链可变区 FR3

<400> 35

Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	Lys
1					5				10					15	

Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Pro	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys
			20					25					30		

Asn

<210> 36

<211> 6

[0033]

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P19-7D 免疫球蛋白 γ 1 链可变区 CDR3

<400> 36

Ser Trp Asp Gly Ala Tyr

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 1 链可变区 FR4

<400> 37

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

1 5 10

<210> 38

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 1 轻链可变区 FR1

<400> 38

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

1 5 10 15

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys

20 25

<210> 39

[0034]

<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<223> P19-7D 免疫球蛋白 γ κ 链可变区 CDR1

<400> 39

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> 免疫球蛋白 γ 1 轻链可变区 FR2

<400> 40

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<223> P19-7D 免疫球蛋白 γ κ 链可变区 CDR2

<400> 41

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 42
<211> 32
<212> PRT

[0035]

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 1 轻链可变区 FR3

<400> 42

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<223> P19-7D 免疫球蛋白 γ 1 轻链可变区 CDR3

<400> 43

Ser Gln Asn Thr His Phe Pro Trp Thr
1 5

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 免疫球蛋白 γ 1 轻链可变区 FR4

<400> 44

Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Ser Arg
1 5 10

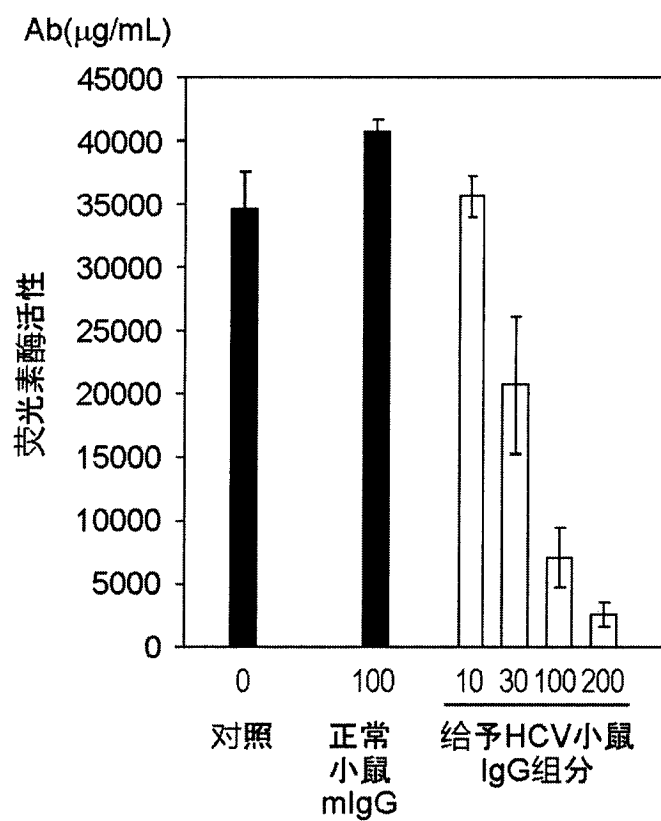


图 1

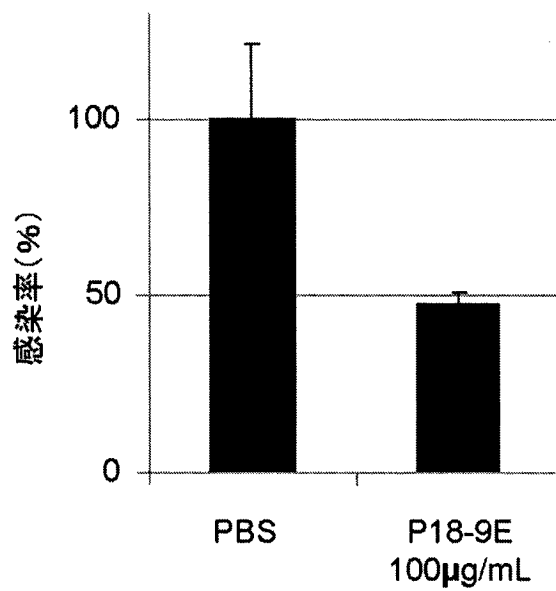


图 2

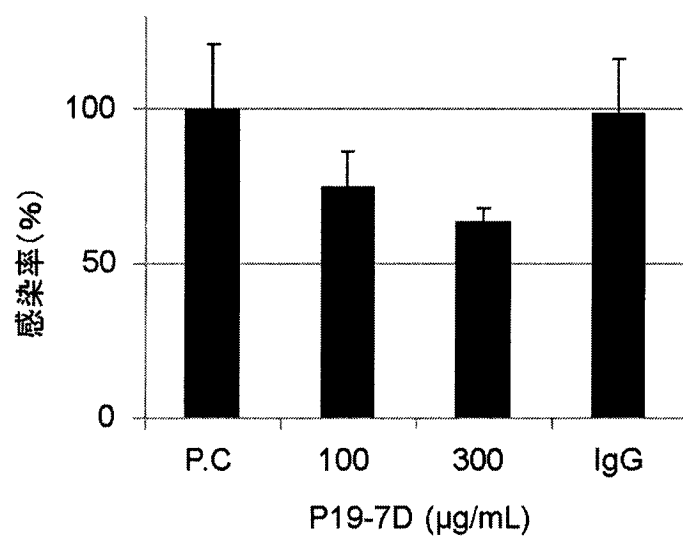


图 3

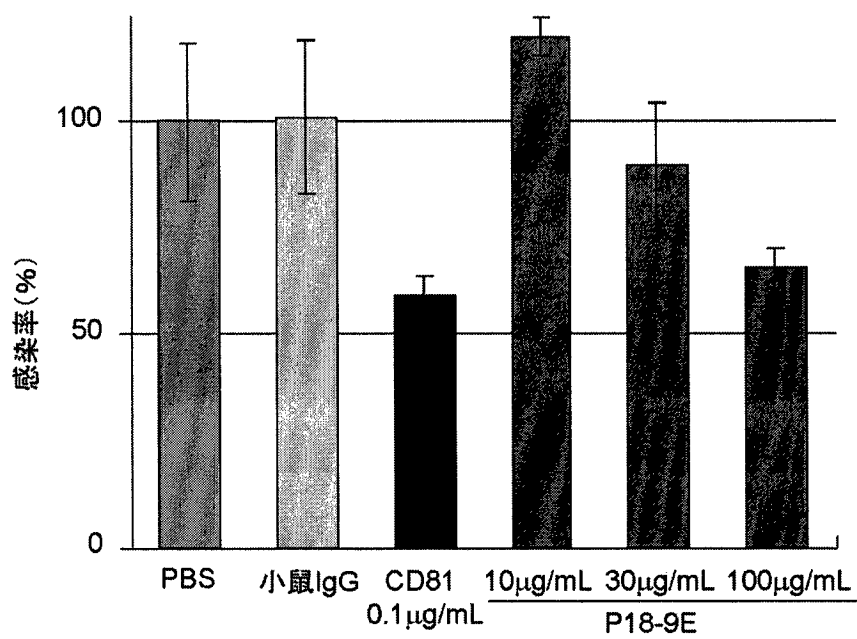


图 4

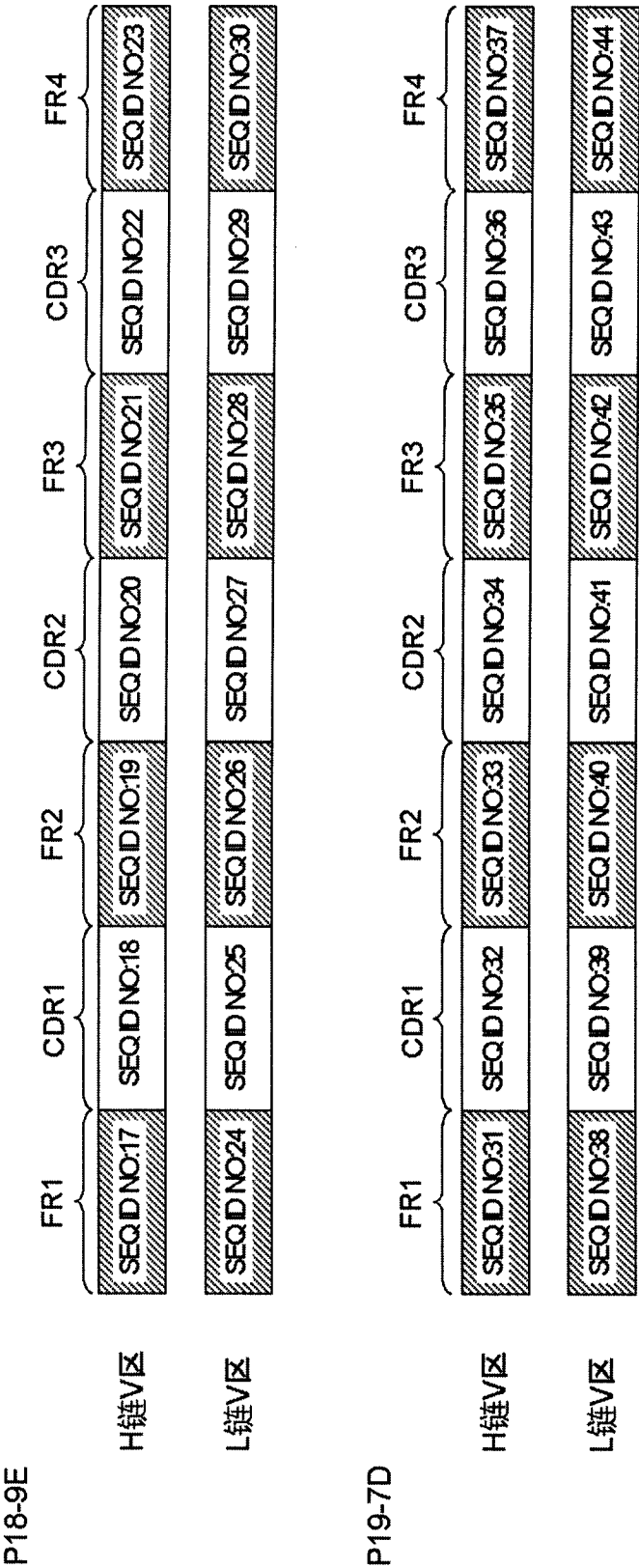


图 5

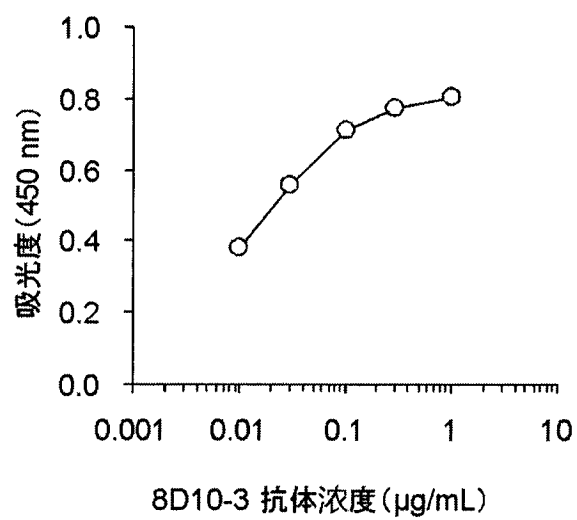


图 6

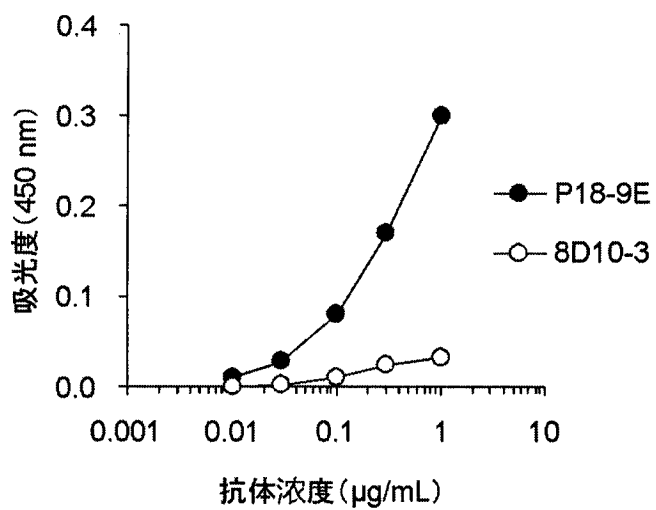


图 7

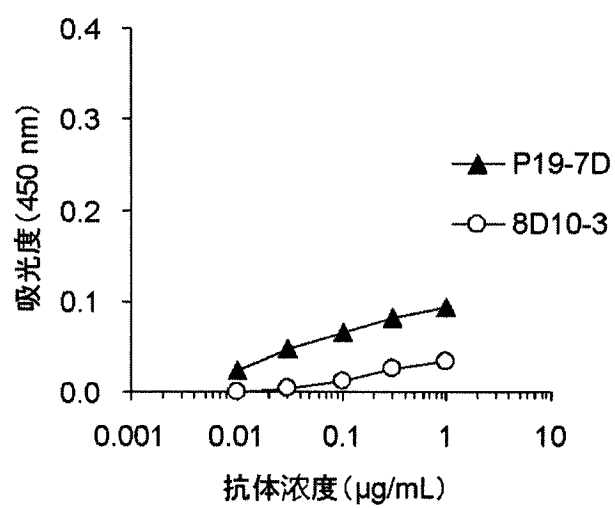


图 8