

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-504645

(P2006-504645A)

(43) 公表日 平成18年2月9日(2006.2.9)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/10</b> (2006.01)	C07K 16/10	4 B02 4
<b>A61K 39/00</b> (2006.01)	A61K 39/00	4 B06 3
<b>A61K 39/395</b> (2006.01)	A61K 39/395	4 B06 4
<b>A61K 45/00</b> (2006.01)	A61K 45/00	4 B06 5
<b>A61P 31/14</b> (2006.01)	A61P 31/14	4 C08 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2004-519701 (P2004-519701)	(71) 出願人 50319973 ボード オブ トラスティーズ オブ リ ーランド スタンフォード ジュニア ユ ニバーシティ アメリカ合衆国 94304-1850
(86) (22) 出願日	平成15年6月27日 (2003.6.27)	カリフォルニア、スタンフォード、スイ ト350、ウェルチ ロード 900
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月18日 (2005.2.18)	(74) 代理人 100067817 弁理士 倉内 基弘
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/020580	(74) 代理人 100085774 弁理士 風間 弘志
(87) 國際公開番号	W02004/005316	(74) 代理人 100126527 弁理士 遠藤 朱砂
(87) 國際公開日	平成16年1月15日 (2004.1.15)	(74) 代理人 100130465 弁理士 吉田 匠
(31) 優先権主張番号	10/188,608	
(32) 優先日	平成14年7月2日 (2002.7.2)	
(33) 優先権主張国	米国(US)	

(54) 【発明の名称】立体構造及び直鎖状エピトープに対する抗体を用いたHCV感染の予防及び治療

## (57) 【要約】

C型肝炎ウイルス(HCV)のエンベロープタンパク質E1及びE2の立体構造エピトープについて、HCV感染者由来のモノクローナル抗体群を用いて同定し特徴を調べた。HCVタンパク質E1又はE2のこれらの保存立体構造及び直鎖状エピトープは、HCVに対するヒトの免疫応答において重要であり、ウイルスの中和に特に重要であると考えられる。これら立体構造エピトープの同定に基づいて、完全立体構造エピトープを有するペプチド及びミモトープを含むワクチンを調製し、HCV感染予防及び/又は治療のために患者に投与することができる。それぞれ特定のE1又はE2エピトープに対する、4種の異なるモノクローナル抗体グループを同定することで、HCVに対する感染者の応答に基づいて感染者を分類することができ、適当な治療投与計画を決めることができる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

C型肝炎ウイルス 1b の E 1 タンパク質のアミノ酸 206 ~ 313 内の立体構造エピトープに対する抗体。

**【請求項 2】**

多重 HCV 遺伝子型に由来する HCV E 1 タンパク質のアミノ酸 194 ~ 204 内の直鎖状エピトープに対する抗体。

**【請求項 3】**

H-114 により認識されるエピトープに対する抗体。

**【請求項 4】**

H-111 により認識されるエピトープに対する抗体。

**【請求項 5】**

請求項 1 又は 2 に記載の抗体を発現する細胞系。

**【請求項 6】**

B 細胞系である、請求項 5 に記載の細胞系。

**【請求項 7】**

ヒト細胞系である、請求項 5 に記載の細胞系。

**【請求項 8】**

哺乳類細胞系である、請求項 5 に記載の細胞系。

**【請求項 9】**

真核細胞系である、請求項 6 に記載の細胞系。

**【請求項 10】**

ハイブリドーマである、請求項 5 に記載の細胞系。

**【請求項 11】**

エブスタイン-バーウイルス (EBV) で形質転換されている、請求項 5 に記載の細胞系。

**【請求項 12】**

ウイルスで感染されている、請求項 5 に記載の細胞系。

**【請求項 13】**

ファージで感染されている、請求項 5 に記載の細胞系。

**【請求項 14】**

請求項 1 又は 2 に記載の抗体を提示するウイルス。

**【請求項 15】**

モノクローナル抗体である、請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 16】**

人体に適応させた抗体である、請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 17】**

哺乳類の抗体である、請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体。

**【請求項 18】**

HCV E 1 タンパク質又はペプチドを請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体に、抗体が HCV E 1 タンパク質又はペプチドに結合するのに十分な時間、接觸させ；

E 1 の推定受容体を発現する細胞と HCV E 1 タンパク質又はペプチドと抗体とを、タンパク質又はペプチドによる推定受容体への結合を可能にするのに充分な時間、接觸させ；

タンパク質又はペプチドによる細胞への結合を検出する（抗体の非存在下における結合と比較して細胞表面への結合が低下していた場合、受容体を HCV E 1 受容体と同定する）

段階を包含する、HCV E 1 タンパク質又はペプチドに対する受容体を同定する方法。

**【請求項 19】**

10

20

30

40

50

請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体を固体支持体に付着し；抗体を H C V E 1 タンパク質又はペプチドに、H C V E 1 タンパク質又はペプチドが抗体に結合してタンパク質又はペプチド-抗体複合体を形成するのに十分な時間、接触させ；ライプラリータンパク質又はペプチドが複合体に結合するのに十分な時間、複合体をライプラリータンパク質又はペプチドと接触させ；未結合のライプラリータンパク質又はペプチドを複合体から除去し；複合体に結合するライプラリータンパク質又はペプチドを同定する（ここで結合したライプラリータンパク質又はペプチドは推定 H C V E 1 受容体である）段階を包含する、H C V E 1 タンパク質又はペプチドに対する受容体を同定する方法。

## 【請求項 20】

請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体と、薬剤として許容される賦形剤とを含む薬剤組成物。

## 【請求項 21】

抗体が、H C V の E 1 及び E 2 タンパク質に対するものであることを特徴とする、2 種以上のモノクローナル抗体の組み合わせを含む薬剤組成物。

## 【請求項 22】

抗体が、単一 H C V 遺伝子型の E 1 及び E 2 タンパク質に対するものであることを特徴とする、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 23】

抗体が、多重 H C V 遺伝子型の E 1 及び E 2 タンパク質に対するものであることを特徴とする、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 24】

抗体が直鎖状エピトープに対するものである、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 25】

抗体が立体構造エピトープに対するものである、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 26】

抗体が直鎖状及び立体構造エピトープに対するものである、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 27】

H - 1 1 1 及び C B H - 5 を含む、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 28】

H - 1 1 1 及び C B H - 7 を含む、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 29】

H - 1 1 1 及び C B H - 4 G を含む、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 30】

H - 1 1 1 及び C B H - 8 C を含む、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 31】

H - 1 1 1 及び C B H - 1 7 を含む、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 32】

H - 1 1 1 及び C B H - 2 を含む、請求項 21 に記載の薬剤組成物。

## 【請求項 33】

H C V に感染した又は H C V に感染しやすい患者を提供し；そして患者に請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体を投与する段階を包含する、H C V に感染した患者を治療する方法。

## 【請求項 34】

H C V に感染した又は H C V に感染しやすい患者を提供し；そして患者に請求項 1、2、3 又は 4 のいずれかに記載の抗体を投与する段階を包含する、H C V に接触した患者を治療する方法。

## 【請求項 35】

1 種以上の異なる抗体を投与することを包含する、請求項 33 又は 34 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 6】

2種以上のモノクローナル抗体を患者に投与することを包含し、抗体がHCVのE1及びE2タンパク質に対するものであることを特徴とする、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

抗体が、単一HCV遺伝子型のE1及びE2タンパク質に対するものであることを特徴とする、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

抗体が、多重HCV遺伝子型のE1及びE2タンパク質に対するものであることを特徴とする、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

抗体が直鎖状エピトープに対するものである、請求項35に記載の方法。 10

## 【請求項 4 0】

抗体が立体構造エピトープに対するものである、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 4 1】

抗体が直鎖状及び立体構造エピトープに対するものである、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 4 2】

H-111及びCBH-5を含む、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 4 3】

H-111及びCBH-7を含む、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

H-111及びCBH-4Gを含む、請求項35に記載の方法。 20

## 【請求項 4 5】

H-111及びCBH-8Cを含む、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 4 6】

H-111及びCBH-17を含む、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

H-111及びCBH-2を含む、請求項35に記載の方法。

## 【請求項 4 8】

HCV1bE1タンパク質のアミノ酸206～313を含む、HCVのE1タンパク質の立体構造エピトープを含むペプチド。 30

## 【請求項 4 9】

アミノ酸が、HCV1bのE1タンパク質のアミノ酸206～313に類似していることを特徴とする、HCV E1のアミノ酸配列を含むペプチド。

## 【請求項 5 0】

HCV1bE1タンパク質のアミノ酸206～313に類似したアミノ酸を含む非HCVタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 5 1】

HCV1bE1タンパク質のアミノ酸206～313が天然の立体構造である、請求項50に記載の非HCVタンパク質又はペプチド

## 【請求項 5 2】

請求項49に記載のペプチドに少なくとも60%の同一性を有するペプチド。 40

## 【請求項 5 3】

請求項49に記載のペプチドに少なくとも70%の同一性を有するペプチド。

## 【請求項 5 4】

請求項49に記載のペプチドに少なくとも80%の同一性を有するペプチド。

## 【請求項 5 5】

請求項49に記載のペプチドに少なくとも90%の同一性を有するペプチド。

## 【請求項 5 6】

アミノ酸206～313を含むHCV E1の1b遺伝子型の立体構造エピトープに対して十分な三次元構造的類似性を有する作用物にして、該作用物の存在下で抗体へのエピ

トープの結合と競合させ、該作用物の非存在下での結合と比較するための作用物。

【請求項 5 7】

ペプチドである、請求項 5 6 に記載の作用物。

【請求項 5 8】

小分子である、請求項 5 6 に記載の作用物。

【請求項 5 9】

化合物である、請求項 5 6 に記載の作用物。

【請求項 6 0】

有機分子である、請求項 5 6 に記載の作用物。

【請求項 6 1】

無機分子である、請求項 5 6 に記載の作用物。

【請求項 6 2】

ミモトープである、請求項 5 6 に記載の作用物。

【請求項 6 3】

H C V 1 b の E 1 タンパク質のアミノ酸 2 0 6 ~ 3 1 3 内の立体構造エピトープを含む、H C V E 1 のペプチド断片を含むワクチン。

【請求項 6 4】

請求項 1 又は 3 に記載の抗体によって認識されるエピトープを含む H C V E 1 ペプチド断片を含むワクチン。

【請求項 6 5】

H - 1 1 4 及び H - 1 1 1 からなる群より選ばれてなるヒトモノクローナル抗体により認識されるエピトープを含む H C V E 1 のペプチド断片を含むワクチン。

【請求項 6 6】

請求項 4 8 に記載のペプチドを含むワクチン。

【請求項 6 7】

請求項 5 6 に記載の作用物を含むワクチン。

【請求項 6 8】

ヒトモノクローナル抗体により認識されるエピトープを含む H C V E 1 のペプチド断片少なくとも 1 個とヒトモノクローナル抗体により認識されるエピトープを含む H C V E 2 のペプチド断片少なくとも 1 個との組み合わせを含むワクチン。

【請求項 6 9】

ペプチド断片が单一 H C V 遺伝子型のものである、請求項 6 8 に記載のワクチン。

【請求項 7 0】

H C V E 1 及び E 2 のペプチド断片が多重 H C V 遺伝子型のものである、請求項 6 8 に記載のワクチン。

【請求項 7 1】

エピトープが、H C V E 1 及び E 2 のペプチド断片上の直鎖状エピトープである、請求項 6 8 に記載のワクチン。

【請求項 7 2】

エピトープが、H C V E 1 及び E 2 のペプチド断片上の立体構造エピトープである、請求項 6 8 に記載のワクチン。

【請求項 7 3】

エピトープが、H C V E 1 及び E 2 のペプチド断片上の直鎖状エピトープと立体構造エピトープとの組み合わせである、請求項 6 8 に記載のワクチン。

【請求項 7 4】

H - 1 1 1 及び C B H - 5 を含む、請求項 6 8 に記載のワクチン。

【請求項 7 5】

H - 1 1 1 及び C B H - 7 を含む、請求項 6 8 に記載のワクチン。

【請求項 7 6】

H - 1 1 1 及び C B H - 4 G を含む、請求項 6 8 に記載のワクチン。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7 7】

H - 1 1 1 及び C B H - 8 C を含む、請求項 6 8 に記載のワクチン。

## 【請求項 7 8】

H - 1 1 1 及び C B H - 1 7 を含む、請求項 6 8 に記載のワクチン。

## 【請求項 7 9】

H - 1 1 1 及び C B H - 2 を含む、請求項 6 8 に記載のワクチン。

## 【請求項 8 0】

H C V 感染患者から血清を得て；

請求項 1 又は 2 に記載の抗 H C V モノクローナル抗体によるそのエピトープへの結合について、患者血清による阻害を測定し；そして

治療投与の候補者として患者を同定する

段階を含む、H C V 感染患者を分類する方法。

10

## 【請求項 8 1】

患者に抗体を投与する段階を更に包含する請求項 4 4 に記載の方法。

## 【請求項 8 2】

個人を用意し；

請求項 1 又は 2 に記載の抗体を、抗体がその抗原に結合するのに好適な条件下で、該個人から得た体液に接觸させ；そして

抗体によるペプチドへの結合を検出する

段階を含む、H C V 感染を検出する方法。

20

## 【請求項 8 3】

個人を用意し；

請求項 1 に記載の抗体少なくとも 2 種を、抗体 / 抗原結合するのに好適な条件下で、該個人から得た体液に接觸させ；

抗体によるペプチドへの結合を検出し；そして

抗体結合の特性を分析して H C V の遺伝子型を決定する

段階を含む、H C V の遺伝子型を同定する方法。

## 【請求項 8 4】

体液が血液である、請求項 8 2 又は 8 3 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

米国政府は本発明について一括払いライセンスを有し、又、国立衛生研究所 (N I H) により授与された付与番号 D A 6 0 5 9 6 及び A I 4 7 3 5 5 の条件によって規定される正当な条件で、特許権所有者が他人に使用を許諾する必要のある限られた状況における権利を有する。

## 【0 0 0 2】

関連出願の相互参照

本出願は、特許出願 U.S.S.N. 0 9 / 1 8 7 , 0 5 7 (1998 年 1 1 月 5 日出願) の一部継続出願である、U.S.S.N. 0 9 / 4 3 0 , 4 8 9 (1999 年 1 0 月 2 9 日出願) の一部継続出願である、同時継続出願 U.S.S.N. 0 9 / 7 2 8 , 7 2 0 (2000 年 1 2 月 1 日出願) の一部継続出願である。これら出願はそれぞれここに参照して説明に代える。

40

## 【0 0 0 3】

技術分野

本発明は、構造が保存された H C V エピトープに対するヒトモノクローナル抗体 (H M A b) の調製に関する。このような抗体は患者内に多く見られるが、例えば H C V 感染の診断と治療に有用であり、患者にとって特定の治療法が有効であるかどうかを同定するのに用いられる。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 4】

50

### 発明の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)はエンベロープに包まれたウイルスであり、その遺伝子情報は9.5kbの正のRNAゲノム鎖によってコードされている。高度に保存された341bpの非コード領域はこのウイルスゲノムの5'末端に位置しており、それに約3,010アミノ酸のポリプロテインをコードする長い読み取り枠が続いている。エンベロープ糖タンパク質と推定されるE1(gp35)及びE2(gp72)の2種に、それぞれ5又は6個、及び11個のN結合型グリコシル化部位があることが分かっている。エンベロープ遺伝子には高レベルの遺伝子可変性がある。この可変性はE2遺伝子の5'末端で特に顕著であり、2個の超可変部(HVR1及びHVR2)が報告されている。細胞培養及びチンパンジーにおける予防研究で、HVR1に対する抗体がウイルス中和反応を引き起こすことが示されている(Farciら、1996 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 15394-15399; Shimizuら、1994 J.Virol.68: 1494-1500; それぞれここに参照して説明に代える)。残念なことにHVR1に対する抗体は単離体に特異的であり、既存の免疫応答が認識しない新たなウイルス変異体の複製をやがて引き起こす傾向がある(Farciら、1994 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91: 7792-7796; Weinerら、1992 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89: 3468-3472; Katoら、1993 J.Virol.67: 3923-3930; それぞれここに参照して説明に代える)。とはいえ、HVR1関連配列に対して広く免疫応答を誘導することについては研究が進んでいる(Puntorieroら、1998 EMBO Journal 17: 3521-3533; ここに参照して説明に代える)。グリコシル化した形状で発現したHCVエンベロープ抗原は、高い免疫原性を持つようである(da Silva Cardosoら、1997 Ann.Hematol.74: 135-7; ここに参照して説明に代える)。予備データは、E2タンパク質内に保存エピトープが存在することを示唆している(Lesniewskiら、1995 J.Med.Virol.45: 415-22; ここに参照して説明に代える)。感染者の血清中に中和抗体が存在することが示唆されている。

#### 【0005】

哺乳類細胞内で発現したHCV E1-E2タンパク質を用いた研究の結果、天然の状態で立体構造と直鎖状の両方をとりうるエピトープで部分的に構成されるHCV E2に対して、感染者が抗体応答を有するということが示された(Haradaら、1994 J.Gen.Virol. 76: 1223-1231; ここに参照して説明に代える)。HCV E2蛋白質に対するヒトモノクローナル抗体又は組み換え抗体の単離に関する研究の結果、これら抗体の実質的な断片が立体構造エピトープを認識することが分かった(da Silva Cardosoら、1998 J.Med.Virol. 55: 28-34; それぞれここに参照して説明に代える)。これら領域の生物学的機能に関してであるが、生体外でウイルスが増殖しないので、代理アッセイを用いることでウイルス中和反応の研究がなされている(Houghton, "Hepatitis C viruses". Fields, Knipe, Howley(編)Virology. Lippincott-Raven, フィラデルフィア、pp.1035-1058; ここに参照して説明に代える)。代理アッセイの一つ、結合中和(NOB)アッセイを用いて、所与の抗体又は血清がHCV E2タンパク質とヒトT細胞系との結合を阻害する能力について評価が行われている(Rosaら、1996 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93: 1759-1763; ここに参照して説明に代える)。予防接種したチンパンジーから得た血清抗体がNOBアッセイにおいて強い陽性を示したという知見は、このアッセイがウイルス中和反応活性を測定する手段として適当であるということを支持している(Rosaら、上記; Ishiiら、1998 Hepatology 28: 1117-1120; それぞれここに参照して説明に代える)。

#### 【0006】

ヒトテトラスパニン細胞表面タンパク質CD81(TAPA-1。詳しくはLevyら、1998 Ann.Rev.Immunol.16: 89-109参照; ここに参照して説明に代える)は、NOBアッセイにおいてHCV E2が結合する標的タンパク質である(Pileriら、1998 Science.282: 938-941; ここに参照して説明に代える)。更にヒトCD81は遊離ビリオンに結合するので、HCV受容体と考えられる(Pileriら、上述)。しかし異なる遺伝子型のHCV E2タンパク質中のNOB陽性抗体によって認識されるエピトープの保存については、詳しいことが分かっていない。

#### 【0007】

10

20

30

40

50

HCVを検出及び予防する他の方法には、ペプチドミメティックを作製するものがある。例えば検出アッセイ及び予防接種治療を目的とした、ランダムに作製した合成ペプチド及びファージディスプレーペプチドライブラーを通じて、A型及びC型肝炎ウイルスタンパク質のペプチドミメティックが作り出されている(Mattioliら、1995 *J.Virology* 69: 5294-5299; Prezziら、1996 *J.Immunol.* 156: 4504-4513; それれここに参照して説明に代える)。しかし効率的に行われているこれらミモトープ(mimotope)の抗体結合は、直鎖状に規定されたウイルスエピトープと比較されているにすぎない。診断アッセイにおいて、直鎖状に規定された免疫優性HCVエピトープ複数を配列組換え融合することが記載されている(Cheinら、1999 *J.Clin.Microbiol.* 37: 1393-1397; ここに参照して説明に代える)。しかし、直鎖状エピトープから設計したこの複数エピトープの融合抗原は、立体構造と類似の機能を有するように作られたものではない。すなわち、標的受容体への結合を阻害することを意図しているものではない。

10

20

30

40

## 【0008】

従って感染者由来の血清中にある中和抗体を同定することが重要である。ヒト細胞に由来する抗体は、診断や受動免疫療法において使用可能であり、特定の地域内での幅広い遺伝子型のウイルスを中和することが可能になる。治療上有効な中和抗体に重要なのは、複数のHCV遺伝子型に対する広い反応性と、HCVビリオンによる対象細胞への結合を阻害する能力との両方である。HCVエンベロープタンパク質の、ペプチド又は非ペプチド(有機)構造ミメティックの設計も又、重要なである。

## 【0009】

関連の参考文献

HCVに関する背景情報の文献としては、Abrignani 1997 *Springer Semin.Immunopathology* 19: 47-55; Simmonds, 1995 *Hepatology* 21: 570: 583; 及びMahaneyら、1994 *Hepatology* 20: 1405-1411が挙げられる(それれここに参照して説明に代える)。

## 【0010】

Deleersnyderら、1997 *J.of Virology* 71: 697-704には、E2反応性モノクローナル抗体についての記載がある。HCVに対する抗体の使用に関する他の文献としては、Akatsukaら、1993 *Hepatology* 18: 503-510; DeLallaら、1993 *J. Hepatol.* 18: 163-167; Mondeiliら、1994 *J Virol.* 68: 4829-4836; Siemoneitら、1994 *Hybridoma* 13: 9-13; 及びMoradpourら、1996 *J.Med.Viro.* 48: 234-241; ヒト抗体の産生については、Foungら、1990 *J.Immunol.Methods* 70: 83-90; Zimmermannら、1990 *J.Immunol.Methods* 134: 43-50; 組合せライブラーを用いた変形抗体の産生については、Burton及びBarbas, Dixon, FJ(編) *Advances in Immunology*, Vol.57, Vi+391p. Academic Press, Inc., カリフォルニア州サンディエゴ、191-280, 1994; Plaisantら、1997 *Res.Viro.* 148-169; 及びBarbas及びBurton, *Monoclonal Antibodies from Combinatorial Libraries*. Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor, ニューヨーク、1994が挙げられる。変形抗体は、突然変異誘発を行い、次いで望ましい特性(例えば標的抗原に対する高い親和性や広い又は狭い特異性)について生体外で選択することで産生できる。抗体は毒素や他の対生物作用のある分子によっても変形できる。もちろん、E1かE2のいずれかに対する抗体を産生することもできる。本章で引用した文献は、それれここに参照して説明に代える。

## 【0011】

HCV E2に結合する抗体のアッセイは、Rosaら、1996 *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93: 1759-1763に記載がある(ここに参照して説明に代える)。

## 【0012】

HCVゲノムの部分を含むワクシニアウイルス又はバキュロウイルスコンストラクトについては、Ralstonら、1993 *J.Virology* 67: 6733-6761及びLanfordら、1993 *Virology* 197: 225-235に記載がある(それれここに参照して説明に代える)。

## 【0013】

発明の概要

本発明の一つの形態は、殆どの地域で優性な型のHCVに結合する、ヒトモノクローナ

50

ル抗体を含むモノクローナル抗体を提供する。特に HCV E1 及び E2 タンパク質の保存された立体構造及び直鎖状エピトープに結合するモノクローナル抗体群を提供する。この抗体群は米国において優性な遺伝子型に結合する抗体を含むが、米国で診断された HCV 感染の殆ど全ての症例だけでなく他地域における症例の少なくともかなりの割合において結合可能な、実質的に汎用のモノクローナル抗体として用いることを企図する。モノクローナル抗体は、様々な診断アッセイに用いることができる。それに加えて、組換え HCV E1 及び E2 タンパク質及びその断片の保存発現は、アッセイ、薬剤のスクリーニング、ワクチン、診断アッセイや他の目的に用いることができる。本発明の抗体を受動免疫療法に用いて、感染者のウイルス量を減らし標的細胞の感染を阻害することができる。保存エピトープを認識する抗体は更に、ペプチド及び構造の判明したエピトープミメティック(例えば有機化合物、有機金属化合物、無機化合物、小分子)を理論的に設計する場合の鑄型として用いることができる。

10

## 【0014】

特に好ましい態様において本発明の抗体は、HCV の E2 又は E1 タンパク質の立体構造と直鎖状の両方のエピトープに対するものである。E2 の立体構造及び直鎖状エピトープは、モノクローナル抗体群及び E2 の欠失コンストラクト群を用いて同定されている。ある抗体群は、HCV1b 由来の E2 アミノ酸 411 - 644 の間の立体構造エピトープに結合することが分かっている。この群の抗体は、E2 と CD81 との相互作用を阻害することが知られている。又、別の抗体群は、HCV1b の E2 アミノ酸 470 - 644 の間の立体構造エピトープに結合することが分かっている。第3の抗体群は、HCV1b の E2 アミノ酸 470 - 644 の間の立体構造エピトープに結合するが、E2 と CD81 との結合を阻害しない。第4の抗体群は、HCV1b の E2 アミノ酸 644 - 661 の間のエピトープに結合する。第5の抗体群は、HCV1b の E1 アミノ酸 230 - 313 の間の立体構造エピトープに結合する。第6の抗体群は、多重遺伝子型に由来する直鎖状 HCV の E1 エピトープに結合する。特に好ましい態様において、抗体に対する立体構造エピトープが HCV 系統の間で保存されている。本発明の抗体は、薬剤として許容される賦形剤と組み合わせて薬剤配合物として提供してもよい。

20

## 【0015】

本発明の別の形態は、HCV タンパク質における立体構造エピトープを規定し、そのようなエピトープを含む組成物及び化合物を更に提供する。例えば本発明は HCV E1 又は E2 タンパク質の立体構造及び直鎖状両方のエピトープを含むタンパク質、ペプチド及び小分子を提供する。ペプチドは、図 23 に示すような欠失コンストラクトであってもよい。ペプチドは本発明の抗体により認識されるエピトープを 1 個以上含んでいても良い。ある好ましい態様においてタンパク質は連結したペプチド鎖であり、そのうち少なくとも 1 つが HCV の立体構造エピトープを含んでいる。ペプチド鎖は様々な立体構造又は直鎖状の HCV エピトープを含んでいてもよいし、同一型のエピトープを含んでいてもよい。ペプチド鎖は、天然に存在するのと実質的に同じ立体構造エピトープを提示するように、適切に折りたたまれているのが好ましい。このようなタンパク質とペプチドを用いて、ワクチンの配合や診断テストを行うことができる。

30

## 【0016】

本発明は又、HCV に対する免疫応答に基づいて患者を分類する方法、及び HCV 免疫療法を行えば効果があると思われる患者を同定する方法を提供する。例えば患者の血清を用いて特定の HCV エピトープに対する抗体の有無を調べ、そのエピトープに対する抗体が適当なレベルで血清に含まれていなければ、そのエピトープに対するヒトモノクローナル抗体を患者に投与する。

40

## 【0017】

## 定義

「動物」：本明細書でいう動物とは、ヒト及び非ヒト動物(例えば哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類及び魚類)のことをいう。好ましくは、非ヒト動物は哺乳類(例えば齧歯類、ネズミ、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、靈長類又はブタ)である。動物は、トランス

50

ジェニック動物であってもよい。

【0018】

「抗体」：本明細書でいう抗体とは、天然に存在するか、全体又は部分を合成した免疫グロブリンのことを意味する。特異的な結合能を保持するその誘導体及び断片も全て、この語に含まれる。この語は又、免疫グロブリン結合領域に相同性を有する又はおおよその相同性を有する結合領域を有する全てのタンパク質を含むものとする。これらのタンパク質は天然源由来のものであってもよいし、部分又は全体を合成したものであってもよい。抗体は単クローナル性であってもよいし、多クローナル性であってもよい。抗体は、ヒトの抗体クラス(IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE)を含む、どのような免疫グロブリンクラスに属するものであってもよい。しかしIgGクラスの派生物が、本発明では好みしい。

10

【0019】

「ペプチド」：本発明によると「ペプチド」とはペプチド結合で連結した少なくとも3個のアミノ酸の鎖が含むものとする。「ペプチド」は個々のペプチドを意味することもあるし、ペプチド群を意味することもある。本発明のペプチドは好ましくは天然アミノ酸のみを含むが、非天然アミノ酸(すなわち天然には起こりえないが、ポリペプチド鎖に組み込むことのできる化合物；例えば<http://www.cco.caltech.edu/dadgrp/Unnatstruct.gif>参照。機能性イオンチャネルに組み込むことができた非天然アミノ酸の構造が開示されている)及び/又は当分野で公知のアミノ酸類似体を用いてもよい。又、本発明のペプチドに含まれる1種以上のアミノ酸を、例えば炭水化物類、リン酸基、ファルネシル基、イソファルネシル基、脂肪酸類等の化学物質の添加や、結合用、機能化用又は他の変更用リンカーニによって変更してもよい。好みしい態様においては、ペプチドの変更はより安定したペプチドを作る(例えば生体内での半減期が長くなる等)ものである。これらの変更にはペプチドの環化、Dアミノ酸の組み込み等が含まれる。変更はいずれも、ペプチドの好みしい生物学的活性を実質的に阻害するものであってはならない。

20

【0020】

「ポリヌクレオチド」又は「オリゴヌクレオチド」：ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドとは、ヌクレオチドの重合体のことをいう。重合体は、天然に存在するヌクレオシド(すなわちアデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン及びデオキシシジチジン)、ヌクレオシド類似体(例えば2'-アミノアデノシン、2'-チオチミジン、イノシン、ピロール-ピリミジン、3'-メチルアデノシン、5'-メチルシチジン、C5'-プロモウリジン、C5'-フルオロウリジン、C5'-ヨードウリジン、C5'-プロピニル-ウリジン、C5'-プロピニル-シチジン、C5'-メチルシチジン、7'-デアザアデノシン、7'-デアザグアノシン、8'-オキソアデノシン、8'-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン及び2'-チオシチジン)、化学的修飾塩基、生物学的修飾塩基(例えばメチル化塩基)、分子挿入塩基、変更糖(例えば2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース及びヘキソース)又は変更リン酸基(例えばホスホロチオ酸類及び5'-N-ホスホロアミダイト結合)を含んでもよい。

30

【0021】

「小分子」：本明細書でいう「小分子」とは、比較的低い分子量であり、タンパク質、ポリペプチド又は核酸ではない、天然に存在するか又は(例えば化学合成によって)合成した有機化合物のことを意味する。通常、小分子の分子量は約1500g/mol未満である。又、小分子は通常、複数の炭素-炭素結合を有する。天然に存在する小分子で公知のものとしては、ペニシリノン、エリスロマイシン、タキソール、シクロスボリン及びラバマイシンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。合成の小分子で公知のものとしてはアンピシリノン、メチシリノン、サルファメトキサゾール及びスルホンアミドが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0022】

本発明の好みしい態様の詳細な説明

50

診断、治療及びワクチン開発に使用できる、1種以上の遺伝子型のC型肝炎ウイルスに結合するモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体(HMAb)が提供される。無症候のHCV感染者の末梢B細胞から得た、高い血清中和反応の結合価を有するヒトモノクローナル抗体(HMAb)群を產生し特徴を調べた。HCV E2に対するHMAb11種と、HCV E1に対するHMAb2種が產生された。ある抗体群はHCVの遺伝子型1及び2に結合し、別の抗体群は結合する遺伝子型の数が少なかった。HCV遺伝子型1と2は併せて、西半球と他地域において優性的に見られるウイルス型である。本抗体は立体構造及び直鎖状エピトープに結合するが、様々なウイルス型及び遺伝子型にわたってそれが保持されている。遺伝子型1a、1b、2a及び2bのHCV E2タンパク質に結合する抗体及びこれらの抗体のサブセットは、これらE2タンパク質とヒトCD81との相互作用を阻害する。又、HCV E1に対する2種のHMAbのうち1種は、多重遺伝子型のHCVに結合する。

10

## 【0023】

抗体に様々な結合特性があるので、複数の型と遺伝子型を検出する診断アッセイが可能になり、米国でみられるHCVに対する汎用抗HCV抗体が提供され、又、同時にサブトラクティブ(subtractive)解析により個々の遺伝子型を詳細に分析できるようになる。加えて、HCV感染の危険性のある者に対する予防治療又はHCV血清陽性者の治療として、ヒト抗体を用いた受動免疫を行うことができる。

## 【0024】

本発明のHMAbはHCVに対する既存のHMAbに比べ、幾つかの利点を有する。非相同的一次アミノ酸配列が免疫学的に同一の三次元タンパク質構造を規定しうるので、構造的に保存されたエピトープに結合するHMAbは、天然構造の様々な配列の多数のHCV遺伝子型を認識できる。これに対して、直鎖状又は変性エピトープのみを認識する抗体は上記を認識できない。特に抗HCV E1又はE2 HMAbの立体構造依存性かつ選択的直鎖依存性エピトープは、天然HCVとその細胞標的受容体との相互作用に効果的に干渉することができる。HMAbの立体構造依存性及び選択的直鎖依存性エピトープを用いて標的細胞受容体(CD81等)への天然HCVの結合能を能動的に阻害することで、感染者内のウイルス量を低減し、非感染者(特に臓器移植を行ったばかりのレシピエント、腎臓透析を行っている者、及び血友病又は他の血液凝固疾患の治療を受けている者)の器官の感染及び再感染を防ぐ、特異的な治療が行える(例えばa)異なるHCV遺伝子型によってコードされたHCV E1又はE2タンパク質を認識し；b)HCV粒子に結合し；c)HCVウイルス粒子の標的細胞への付着及び侵入を防ぐことで行う)。他のレシピエントとしてはHCV含有体液に接触して間もない者が挙げられる。個々のHCV HMAbと、数種のエピトープを認識する数種のHCV HMAb混合物との両方を、使用することができる。

20

## 【0025】

特定のHMAbサブセットは、CD81との直接の相互作用を阻害する以外のメカニズムで、E2関連ウイルス感染に干渉する。この抗体サブセットは、例えば共受容体タンパク質へのE2の結合の阻害、標的細胞への結合に必要なE1及び/又はE2タンパク質の立体構造変化、E1及びE2を媒介する標的細胞へのウイルス融合、そしてHCVビリオンのコーティング除去といった、多くの考えられるメカニズムによってウイルスの伝染性に干渉する。E2によるCD81への結合を直接阻害するHMAbサブセットは別々のエピトープに結合するので、治療、ワクチン、診断に用いるものとして、他のメカニズムで伝染性に干渉するサブセットのHMAbを補うことができる。

30

## 【0026】

HMAbはウイルスエピトープを認識し、ウイルス/標的受容体の相互作用とHMAbに結合するウイルスエピトープとに干渉するが、ウイルスエピトープのペプチド及び他の構造ミミックを理論的に設計する鑄型としても用いることができる。これらの抗HCV HMAbにより規定される構造的分子ミミックは、それら自体が標的受容体に結合して天然ウイルスによる標的受容体への結合を阻害する能力があるので有用である。

40

50

## 【0027】

ヒトモノクローナル抗体を産生することで、HCVに対するヒトの免疫応答を直接解析することが可能になる。重要なことに、ヒトモノクローナル抗体を用いた場合、抗体自身に対する異質抗原としての免疫応答は最小限であるが、非ヒト由来のモノクローナル抗体を用いた場合には、異質抗原として認識されるので激しい免疫応答が引き起こされる。ウイルス立体構造保存エピトープを認識するHMAbを選択することで、直鎖状又は変性エピトープにのみ結合することのできる抗体に比べ、これら抗体試薬をより幅の広いより効果的なHCV感染の改善又は予防治療に用いることが可能になる。HCVによる感染又は標的細胞内への侵入を阻害する特性を有すると上で説明した抗体は全て、超可変部として知られる、非常に変わりやすいHCV E2配列を認識する。これに対して、上記した抗体は立体構造と直鎖状エピトープの両方を認識するが、それらエピトープの殆どは、複数の異なる遺伝子型において高度に保存されたHCV E2タンパク質である。従って本明細書に記載する抗体には、文献にある中和抗体よりもより広い範囲のHCV単離体に対して作用するという利点がある。別の利点であるが、本明細書で説明する抗体により認識されるエピトープが高い保存性を有するということは、これらの抗体がHCV E1又はE2タンパク質内の機能的及び/又は構造的重要性を持つ配列を認識するということを示している。したがって、これらの抗体を用いて単離されるペプチド又は小分子は、高い確率でHCV E1又はE2内の機能領域を標的にすることができる。これは今日までに説明されてきた他のHCV抗体には当てはまらない。

10

20

30

## 【0028】

上記の検出抗体のうちCBH-4Gは、多重HCV遺伝子型を有するHCV E2-C D81複合体に対して本質的に等しい反応性を有するが、CBH-4Bは、HCV遺伝子型1a及び1bを認識する。HCV抗血清中に存在する阻害抗体のレベルは、きわめて低いことも示されている。従ってマイクロタイタープレートフォーマット内の試料中に存在する中和抗体のレベルを、複数のフローサイトメトリー解析に頼ることなく検定する簡単な手段を提供する。

## 【0029】

本発明のHMAbを作製するのに用いたアプローチの概要は以下の通りである。(1)HCVに接触したと分かっている者を同定し；(2)その末梢血液から抗原特異的B細胞を得て培養し生体外で活性化し；(3)好適なマウス-ヒトヘテロ骨髄腫で電気融合して、これらの細胞を不死化し；(4)ハイブリドーマを分泌する適当なヒト抗体を同定し；そして(5)適当なハイブリドーマをクローニングして安定化させた。このアプローチによって、HCV E2タンパク質に特異的なHMAbを同定した。それらの多くがHCV遺伝子型1a及び1b及びHCV遺伝子型2a及び2bのE2の立体構造エピトープに結合しており、米国及び他地域で最もよく見られる遺伝子型を1種類の抗体で認識できる。これに対して他の抗体は表記した遺伝子型の全てには結合しないので、上記抗体はHCV型又は遺伝子型の同定に有用である。本明細書に記すように、更に上記アプローチによって、HCV E1タンパク質に特異的なHMAbも同定した。

40

## 【0030】

例えば、無症候のHCV感染者の末梢B細胞と高い血清中和結合値とを用いて、ヒトモノクローナル抗体群を産生し特徴を調べた。HCV-1単離体の同じ領域に98%の相同性を有するアミノ酸配列を含む遺伝子型1a E2タンパク質を用いて最初のスクリーニングを行った(Lanfordら、1993 *Virology* 197: 225-235；ここに参照して説明に代える)。ドナーは1b単離体に感染していたので、遺伝子型1a及び1bの間に保存されたエピトープに対する抗体を選択する、偏ったスクリーニングアプローチをこの段階に用いた。全てのHMAbは、Q1b(HMAbの選択に用いたHCV1a単離体に79%の相同性を有する異種HCV1b単離体)のE2にも反応した。組換えE2を変性したところ11種のHCV HMAbのうち10種の反応性が完全に失われた。従ってHMAbの殆どが立体構造エピトープを認識した。

50

## 【0031】

5種のHMAb(CBH-4D、-4B、-4G、-9及び-17)はNOBアッセイにおいて陰性を示し、HCV E2-CD81複合体に反応した。これらの抗体のうちCBH-4G及びCBH-9の2種が、GNA及びCD81捕捉アッセイの両方において、遺伝子型1a、1b、2a及び2bのHCV E2タンパク質に反応した。他の3種の抗体CBH-4B、-4D及び-17は、遺伝子型1a及び1bのE2タンパク質に限られた反応性を示した。HMAbCBH-4B及びCBH-4DはそれぞれカッパL鎖及びラムダL鎖を有するが、おそらく異なるエピトープを認識する。HMAbCBH-17は、変性に無反応のエピトープを認識した唯一の抗体であった。従って各NOB陰性抗体が個別のエピトープを認識すると思われる。

## 【0032】

10

立体構造エピトープを認識する6種のHMAbであるCBH-2、-5、-7、-8C、-8E及び-11は、HCV1aE2タンパク質を用いた結合中和アッセイで試験したところ陽性であった。これらの抗体のうちHMAbCBH-2、-5、-7、-8C及び-8Eの5種が、試験した全ての遺伝子型のE2タンパク質と反応した。上記と同じ6種の抗体は、CD81-LELとの複合体を形成した遺伝子型1a、1b、2a又は2bのE2に結合しなかった。従ってHCV E2内でCD81結合部位に部分的又は完全に重なるエピトープは、天然状態で立体構造であり、かつ高度に保存されている。CD81結合部位において配列が高度に保存されているということは、HCV E2とCD81との間の相互作用が生物学的に関連しているという仮説に一致している。試験した4種のNOB陽性抗体のうちHMAbCBH-2及びCBH-5の2種が、未反応HCVビリオンによるCD81への結合を阻害することができた。複数の抗体がNOBアッセイにおいて同等の活性を示したにもかかわらず、HMAbCBH-7及びCBH-11はHCVビリオンによるCD81への結合を顕著に阻害した。このことは、HCVビリオンが表面にE1-E2複合体を有しており、そのような複合体ではE2に存在するエピトープの全てが外部に晒されているわけではない、という事実を反映していると思われる。これはHMAbとE1-E2複合体との試験によって解明されるであろう。あるいはNOBとビリオン阻害アッセイの結果の差は、HMAbによるE2タンパク質又はE1-E2複合体への親和性の差を反映しているとも考えられる。いずれにせよ、それ自体に強い結合中和活性があることが、抗体が完全HCVビリオンに結合することの確証にはならない。従っておそらく、E2タンパク質によるCD81-LELとの相互作用を生体外で阻害する抗体全てが生体内での伝染性を中和するわけではない。

20

30

40

50

## 【0033】

これら6種のNOB陽性抗体のうち5種が、本研究で用いた5種のHCV単離体の間で共通のエピトープに対するものである。残りの抗体CBH-11は2個の1a単離体に異なる反応性を示し、おそらくは他の抗体とは別のエピトープを認識する。実際、異なる1a単離体に対するCBH-11の反応が異なることが、ビリオン結合実験で得られた陰性の結果を説明している。CBH-2とCBH-7によるHCVビリオンへの異なる反応性、並びに競合実験の結果の両方が、CBH-2とCBH-7が別のエピトープを認識することを示している。競合実験は更に、HMAbCBH-5とCBH-2により認識されたエピトープは別のものであることを示唆している。しかしながら、CBH-2及びCBH-8Eが同一の又は非常に類似したエピトープを認識する可能性も残っている。別個のエピトープの総数を調べるには、ハイブリドーマで產生した抗体遺伝子の配列決定、競合研究や更に他のHCV単離体を用いた試験が必要であろう。

## 【0034】

競合解析(図22)を用いて、HCV E2の類似の結合部位に対する抗体を調べた。7種のHMAbをビオチン化し、様々な量の競合HCV HMAbの存在下でのビオチン化抗体によるHCV E2への結合を調べた。顕著な交差競合を示した抗体を同じグループに分類した。結合部位を含むHCV E2領域の位置を、HCV E2欠失コンストラクト群(図23)を用いて調べた。その結果4種の競合群が規定された。グループIは5種のHMAb、CBH-2、-8E、-5、-8C及び-11から構成される。このグループ

50

の抗体は、HCV E2によるCD81への結合を阻害し、HCV E2アミノ酸411～644に位置する保存エピトープを認識する。グループIIはHMAbCBH-7からなるが、HCV E2アミノ酸470～644の間に位置する高度に保存されたエピトープを認識する。グループI及びIIの抗体は、最小の交差競合を示した。グループIIIは3種の抗体CBH-4G、-4B及び-4Dより構成されるが、HCV E2によるCD81への結合を阻害せず、HCV E2アミノ酸470～644の間のエピトープを認識する。グループIVは1種の抗体CBH-17から構成されるが、これはHCV E2アミノ酸644～661間に位置するエピトープを認識する。グループI及びIIの抗体は、小動物モデルにおいてHCV複製を阻害しE2の超可変部外の2個の異なる保存結合部位を認識することが分かっている。グループI及びIIの抗体間の競合は程度が低いのでウイルス中和反応活性は増加するはずであり、これらの抗体が生体内で相乗的に作用する可能性を示している。

10

## 【0035】

これらの結果は、HCV E2内の幾つかの立体構造エピトープが様々なHCV遺伝子型の中で高度に保存されていることを示している。これらのエピトープを認識する抗体はHCV E2の構造をより詳しく規定する試薬として有用である。その上更に、HCVビリオンによるヒトCD81への結合を阻害する抗体CBH-2及びCBH-5は、ウイルス中和反応を媒介する第1の候補である。しかしウイルス中和反応には眞の意味での生体外モデルは存在しないので、選択したHMAbには適当な動物モデルにおいてHCV感染を予防する又は改善する能力がある、という基本的な証拠を示す必要がある。もしこれがうまくいけば、幅広い反応性を有する中和抗体を治療に用いることができるであろう。肝臓移植においてB型肝炎免疫グロブリンを用いて成功した例(Dickson, 1998 Liver Transp. Surg. 4(5 Suppl 1) : S73-S78 ; Markowitzら、1998 Hepatology 28 : 585-589 ; それぞれここに参照して説明に代える)と同様に、用途の一つとして、幅広い反応性を有する中和ヒトモノクローナル抗体を用いた肝臓移植レシピエントのHCV感染抑制が考えられる。

20

## 【0036】

上記した方法でHMAbを単離した結果、HCV E1タンパク質に特異的なHMAbが同定された。これらのHMAbは、E2に対するHMAbと同様に、HCV E1の立体構造と直鎖状の両方のエピトープに結合した。HCV遺伝子型1bのE1に対するHMAbが1種(H-114)が同定された。E1に対する他の抗体であるH-111は、4種以上の遺伝子型(1a、1b、2b及び3a)のエピトープを認識した。この幅広い特異性は、上記した診断及び治療用途に特に好ましい。H-114及びH-111HMAbの単離と特長については実施例10に記載する。

30

## 【0037】

本発明のHCV E1に対するHMAbはこれまでに同定されている抗E1抗体とは異なるエピトープを認識する。H-114は、E1の推定融合ペプチドを含むと思われる非直鎖状アミノ酸配列を認識する。ウイルスエンベロープと細胞膜との融合はウイルス感染開始において重要な段階であるので、H-114抗体を用いてこの段階に干渉し、細胞内侵入、脱外被及びビリオン組み立ての段階を含むHCV生活環を阻害できる。抗体H-111は、多重遺伝子型にわたって個々のアミノ酸を認識するという独特の特長を持っている。

40

## 【0038】

H-111及びH-114により認識されるエピトープは、ウイルス中和反応に新たな可能性を与える。E1及びE2は相互作用の結果、最終的にはビリオンエンベロープを構成する異質二量性無価E1-E2複合体を形成すると考えられている。H-111及びH-114には独特な結合活性があるので、これらの抗体を用いてビリオンにおけるE1/E2相互作用と成熟エンベロープの形成について詳しく調べることができる。

## 【0039】

本発明ではヒトモノクローナル抗体が提供されるが、本明細書に説明したヒト抗体が認識するのと同じエピトープを認識しうるので、他の供給源由来の他の抗体も用いることが

50

可能である。一般にネズミ、マウス、ラット、ウサギ目及び家畜動物由来の抗体が用いられる。これら哺乳動物由来の保存領域を有する抗体を産生することができる。例えば遺伝子工学を用いて本明細書で提供するHMAbの定常領域を置換するか、あるいは動物を免疫化する免疫原として下に述べるタンパク質を用い、次いで得られるB細胞を不死化し、類似の幅広い結合特異性を有するモノクローナル抗体を産生する不死化細胞について下に述べるようにスクリーニングする。本発明のHMAbを用いた競合アッセイでスクリーニングすることによって、非ヒト抗体が同じエピトープに結合するかどうかを調べることができる。

#### 【0040】

診断用途としては、様々な方法で抗体を用いて、循環HCVビリオン、E1又はE2タンパク質、あるいは抗E1又は抗E2抗体を捕捉及び/又は同定することができる。抗体は免疫療法、予防又は治療に用いることができる。抗体は又、HCVに対するワクチンの開発に用いることもできる。

#### 【0041】

単離した抗体はIgGクラスのものであった。HMAbのいくつかは、HCV E2タンパク質に対して良好な親和性を示した(抗体は1~20 μg/mlの濃度で最大のシグナルを示した)。これらの抗体はIgGクラス、特にIgG<sub>1</sub>のものである。以下に抗体と抗体が認識するHCV遺伝子型とを示す。下記のHMAbはHCV E1又はE2タンパク質に対して良好な親和性を示した。

#### 【0042】

#### 【表1】

HMAbの結合したHCV遺伝子型		
抗体	結合したタンパク質	結合した遺伝子型
CBH-2	E2	1a、1b、2a、2b
CBH-4D	E2	1a、1b
CBH-4B	E2	1a、1b
CBH-4G	E2	1a、1b、2a、2b
CBH-5	E2	1a、1b、2a、2b
CBH-7	E2	1a、1b、2a、2b
CBH-8C	E2	1a、1b、2a、2b
CBH-8E	E2	1a、1b、2a、2b
CBH-9	E2	1a、1b、2a、2b
CBH-11	E2	—、1b、2a、2b
CBH-17	E2	1a、1b
H-111	E1	1a、1b、2b、3a
H-114	E1	1b

#### 【0043】

抗体は天然に存在する形状で用いてもよいし、末端を切断してFab又はF(ab')<sub>2</sub>断片としてもよい。H鎖及びL鎖をコードする遺伝子を単離して様々な方法で改変しても良い。RT-PCRを用いて、以後の操作に都合のよいコンストラクト内にcDNAとして遺伝子を作製するのが一般的である。H及びL鎖の可変領域のヌクレオチド配列は単離することもできるし、直接に又は間接に又は3nヌクレオチド鎖を通じて(ここでnは少なくとも1かつ約60未満、通常約40未満であり、2個の可変領域間のアミノ酸リンカーを提供する)結合することもできる。鎖の長さは、最適な親和性や他の特性(例えばメル

10

20

30

40

50

カプト基、カルボキシル基やアミノ基を介したキレート化の連結や、表面又は他の分子への結合等)を得られるように経験によって決定することができる。加えて、表面への付着、同定用の標識、親和性単離のための配列等を提供するために、少なくとも可変領域を含む遺伝子の全体又は部分を他の配列に融合させてもよい。これら試薬のいずれも、例えばプロテアーゼ部位又は化学的リンカーといった切断可能なアームを持つ抗体に付加することができる。

## 【0044】

抗体をコードする遺伝子に標識を付加して、発現された抗体について特異的親和性単離を行えるようにしてもよい。あるいは標識化することで、単離抗体遺伝子の有用性を改善するようにしてもよい。標識の例としては、大腸菌ビオチンカルボキシラーゼ運搬タンパク質のビオチン化配列；固定化二価陽イオンを含むカラムへの抗体による付着に好適な6ヒスチジン配列又はヒスチジンとアスパラギン酸との交互配列；F L A GエピトープDYKD DDDK、T 7タグ配列MASMTGGQMG、Sタグ配列KETAAAKFERQHMDS等、親和性の高い公知の抗体エピトープのいずれかの配列、或いは特異的抗体との結合を可能にする公知のあらゆる配列；グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ストレプトアビジン、又は望ましい標的細胞に見られる細胞表面受容体に対するリガンドといった、融合蛋白質パートナー；及び蛍光性、放射性、発光性のあるいは酵素で検出可能な成分が挙げられる。

## 【0045】

標識がポリペプチドの場合、配列は抗体鎖のうちの1本の遺伝子に直接融合できる。いずれの場合も、マレイミド基とチオエーテルを形成するシステイン、金属をキレート化し様々な分子に結合するポリヒスチジン/システイン又はポリヒスチジン/アスパラギン酸、還元的アミノ化反応でアルデヒドと反応させるポリリジン等の、標識を連結する部位を備えた配列が提供できる。標識は酵素、キレート基、リガンド結合蛋白質(例えばビオチン及びストレプトアビジン、ジゴキシゲニン及び抗ジゴキシゲニン等)へ結合するリガンド、緑色蛍光タンパク質等を含んでいてもよい。大腸菌ビオチンカルボキシラーゼ運搬タンパク質(B C C P)のビオチン化配列を用いて、大腸菌内に発現された又は大腸菌溶解物に導入されたタンパク質の生体内ビオチン化を行うことができる。固定化二価陽イオンを含むカラムへの抗体による結合を可能にするのに好適な6ヒスチジン配列又はヒスチジンとアスパラギン酸との交互配列を用いることもできる。親和性の高いエピトープをコードする配列、例えばF L A GエピトープDYKDDDK(配列番号13)、T 7タグ配列MASMTGGQMG(配列番号14)、Sタグ配列KETAAAKFERQHMDS(配列番号15)を用いてもよいし、或いは相関する結合体又はタンパク質試薬への高い親和性結合を可能にする配列であれば他にどのようなものを用いてもよい。上記したものの他に、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ルシフェラーゼや、肝細胞、T細胞又は他に望ましい細胞標的の表面受容体に対するリガンド等の融合蛋白質を挙げることができる。このような融合体は一般にタンパク質の複機能性を促進する3~50アミノ酸のリンカー配列を介して連結される。これらの分子は切断可能なアーム(プロテアーゼ部位)又は他の手段を介して抗体に連結することができる。抗体は様々な毒素、例えばジフテリア毒素、リシン、アブリン、リボソーム不活性タンパク質、アポトーシスシグナリングタンパク質、穿孔タンパク質(例えばパーフォリン)等に化学的に連結又は融合してもよい。或いは、抗体をキレート化毒性重金属又は放射性同位体、特にテクネチウム、放射性ヨー素等に連結させてもよい。抗体はフルオロフォア又は化学発光分子に化学的に連結させてもよい。化学的カップリングとしては、システインと反応する活性化カルボン酸類又はビオチン-C 11-ヒドロキシスクシニミドエステルを用いたビオチン化；様々なビーズ(セファロース、アガロース、磁性、ポリスチレン等)又は表面のC N B r活性化を介した抗体とのカップリング；抗体を有用な化学基に架橋することを含む他のあらゆる方法(通常、リジン又は他の基本的残基を改変することによって、又は遊離スルフヒドリル基に特異的な試薬の使用を通じて達成される)が挙げられる。

## 【0046】

H鎖及びL鎖可変領域の遺伝子の使用に際して、特に可変領域の超可変部を公知の方法

10

20

30

40

50

で突然変異させ、抗体の結合親和性を強化したり反応性を幅広いものにすることができる。ファージディスプレー法、配列のランダム又は定方向突然変異誘発、又は他の類似の方法を用いて、最適な結合抗体を同定する生体外選択を行ってもよい。或いは超可変部のアラニン又はグリシン歩行を用いて必須アミノ酸を同定し、それら又は他の部位のアミノ酸を改変して、エピトープ結合の改善を同定するようにしてもよい。当分野で公知の他の方法を用いて突然変異誘発抗体を得てもよい。

【0047】

抗体供給源としてハイブリドーマを用いる代わりに、遺伝子を単離して適当な哺乳類宿主細胞、例えばC H O、ヒーラ、C V 1等に導入してもよい。好適な発現プラスミドの例としては、p c D N A 3 . 1 Z e o、p I N D (S P 1)、p R E P 8 (いずれもカリフォルニア州カールスバッドInvitrogen社)(実施例11参照)等が挙げられる。抗体遺伝子はウイルス又はレトロウイルスベクターを介して発現できるが、例としてはM L Vから作られるベクター、ワクシニアウイルスから作られるベクター等が挙げられる。同様に、抗体遺伝子は一連のp C O M B ベクターを用いて、後に復元して完全な抗体を形成しうる2個の独立した鎖としてM 1 3 ファージ表面上に発現してもよい。或いは、少なくとも可変領域を含む単鎖として抗体を発現してもよい。遺伝子は、リンパ球、筋細胞、繊維芽細胞等の適当な細胞に導入して遺伝子療法に用いることができる。この場合、抗体が構成的に又は誘導的に発現分泌され、宿主細胞の寿命に基づいて所与の連続時間又は間欠に抗体供給源となる。本発明の遺伝子は(例えば抗生物質耐性の)標識遺伝子と共に、対象者から細胞を得て、マーカーにより改変細胞を選択し、宿主に標識付き細胞を戻すことで導入できる。D N Aは、様々なプラスミドD N A、裸D N A、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス又はワクシニアウイルス等のD N Aウイルスコンストラクト、あるいは水疱性口内炎ウイルス、シンドビスウイルス及びセムリキ森林ウイルス等のR N Aウイルス(これらは僅かな例に過ぎないが)を用いて細胞に導入することができる。D N Aは、対象の細胞に転写因子が存在するあるいは誘導又は導入可能であるプロモーターを含むコンストラクトと、そのようなプロモーターの転写調節下にある遺伝子とを有していてもよい。例えば分泌リーダー、エンハンサー、R N A安定化配列等、他の調節配列が存在してもよい。

【0048】

診断目的として、抗体を様々なフォーマットで用いて、E 1又はE 2タンパク質を検出し、H C V遺伝子型を識別し、ビリオンと抗体を検出することができる(例えば米国特許第5,695,390号参照。ここに参考して説明に代える)。抗体は個別に用いてもよいし、他の本発明の抗体群又は他の抗体、E 1又はE 2に存在するグリコシル基と結合するレクチン、ビリオンエンベロープタンパク質又は、H C V E 1又はH C V E 2が複合する他のタンパク質(例えばH C V E 1 - H C V E 2複合体)と組み合わせて用いてもよい。診断目的として、これまでに述べたような様々な標識を用いることができる。例としてはフルオロフォア、化学発光体、放射性同位体、酵素、粒子(例えばコロイド状炭素及び金、ラテックス粒子等)、高い親和性の受容体が存在するリガンド、活性化すると検出可能なシグナルを発するプロラベル(prolabels)等が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0049】

一つの態様において、表面をタンパク質でコーティングする。この表面は、遊離又は循環タンパク質としての、又は完全なビリオンの部分又は部分的に完全なビリオンとしての、H C V抗原に結合する。1型及び2型両方のH C V又はレクチン(例えばGalanthus nivalisレクチン)に結合することのできる本発明の抗体を用いることができる。1、2及び3型に結合する本発明の抗体を用いてもよい。特に好ましい態様においては、本発明の抗体を少なくとも4種の遺伝子型に結合させる。特に好ましい態様において、本発明の抗体は遺伝子型H V C 1 a、1 b、2 b及び3 aのE 1に結合する。そのアッセイは、遊離又はビリオン関連タンパク質を含む媒体に表面を接触させる段階を含む。この媒体は試料であってもよいし、又は1種以上の公知の遺伝子型のE 1又はE 2の溶液であってもよい。保温し洗浄して非特異的結合タンパク質を除去した後は、検定するものに応じてアッセイ

10

20

30

40

50

は様々な段階を行うことができる。血清陽性と思われる血液試料を検定する場合には、試料を E 1 又は E 2 タンパク質層に接触させ、保温し、洗浄し、タンパク質層に結合したヒト抗体の存在を調べる。標識化抗ヒト抗体(本発明の抗体が最初に用いられた場合には、本発明の抗体のアイソタイプに対するもの以外のもの)を用いることができる。血清陽性を示した対象体の抗体を検定する場合、本発明の抗体は、そのような対象体の血清中のヒト抗 HCV の検出に使用したのと同じ試薬と共に、対照として用いることができる。試料中の抗体の特異性は、抗ヒト抗体とは異なる標識を付けた本発明の抗体を用い、試料中の抗体によってブロックされたかどうかを調べることによって確認することができる。

#### 【 0 0 5 0 】

試料を HCV E 1 又は HCV E 2 タンパク質について検定する場合、検出には標識化した本発明の抗体を用いる。選択する抗体は、興味の対象が E 1 又は E 2 タンパク質の遺伝子型を調べる場合と検出する場合とによって異なる。非特異的に結合した抗体を洗い流した後、公知の方法に従い標識の存在を検出することによって、標識化抗体の存在を調べた。あるいは、本発明の抗体が表面に結合している場合には、E 1 又は E 2 に対する標識化レクチンを用いて E 1 又は E 2 タンパク質の存在を検出してもよい。

#### 【 0 0 5 1 】

本発明の抗体を用いて、血清中の抗体、モノクローナル抗体、遺伝子工学操作の結果発現した抗体等、他の抗体の反応性を測定することができる。望ましくは HCV タンパク質ではなく完全ビリオンを用いるが、立体構造が保存されたエンベロープタンパク質を用いることもできる。ビリオン捕捉については、例えば Kimura ら、1998 J. Med. Virology 56 : 25-32 ; Morita ら、1996 Hapato-Gastroenterology 43 : 582-585 ; Sata ら、1993 Virology 196 : 354-357 ; 及び Hijikata ら、1993 J. Virology 67 : 1953-1958 が参考できる(それぞれここに参考して説明に代える)。実験手順の一例としては、まず固体支持体をレクチン(例えば GNA)でコーティングし、完全 HCV ビリオンを含む培養基(例えば血清陽性患者の血清)に支持体表面を接触させる。ビリオンを破壊しうる成分(例えば洗剤等)は添加してはならない。培養基を保温し洗浄して非特異的結合成分を除去した後、ビリオンを本発明の抗体と試料の抗体に接触させる。これは同時にあってもよいし連続的(ただし試料を最初に添加する)に行ってもよい。本発明の抗体の量は、別の抗体による置き換えに対して感度の高い量を用いる。この量は、本発明の抗体を様々な量で用いる一連の試験を行って、経験的に決定することができる。試料の非存在下又は存在下で得たシグナルを調べることによって、試料中の抗体の反応性又は結合親和性を決定することができる。様々な方法を用いて、ビリオンに結合した本発明の抗体の量を調べることができる。本発明の抗体が標識化されている場合、例えばビオチン又はジゴキシゲニン、ストレプトアビジン又はフルオロフォア標識化抗ゴキシゲニン又は検出可能なシグナルを発する基質に対する酵素は、主題の抗体の量を決定するのに用いることができる。

#### 【 0 0 5 2 】

受容体(抗体又はレクチン)を DNA 配列で標識化する場合、標識配列に相同性を有するプライマーを用いて PCR の標準的条件下で、直接的又は間接的(間接的とは、ビリオンに結合した受容体の空いた部位に結合することのできるリガンド - 核酸配列複合体の使用を意味する)のいずれにせよ、配列を伸長することができる。DNA は個別のハイブリダイゼーション反応又はアガロースゲル電気泳動によって検出できる。あるいは、一端に発光性標識(フルオロフォア又は発光体)を有し他端に消光基を有する、増幅した配列に相同性を有する内側標識化オリゴヌクレオチドプローブを使用する T a q m a n 法を用いることができる。断片が増幅されるにつれて、Taq ポリメラーゼの 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性がハイブリダイズオリゴヌクレオチドを分解してフルオロフォアが消光基から外れ、培養基に適当な波長の光を照射することでフルオロフォアを検出できるようになる。

#### 【 0 0 5 3 】

あるいは、サイクリングプローブ法を行うのに適当な標識化オリゴヌクレオチドプローブを用いることもできる。オリゴヌクレオチドを、標識に相同性を有し TM 45 の約 1

10

20

30

40

50

5-20 デオキシヌクレオチド、標識に相同意を有し  $T M 45$  の約 5 以上のリボヌクレオチド配列から構成する。完全なオリゴヌクレオチドは  $T M > 60$  である。オリゴヌクレオチドを上記したよう発光標識と消光標識で更に修飾する。過剰なオリゴヌクレオチドコンストラクトを結合標識に添加し、約 55 で結合標識にハイブリダイズさせた後、55 で活動的なリボヌクレアーゼ H を添加してリボヌクレオチドを分解する。変性時に発光標識は消光標識から解放され、光照射又は活性化により発光が調べられる。

#### 【0054】

あるいは、転写媒介増幅 (TMA) を用いてもよい。この場合、結合オリゴヌクレオチド標識は、T7ポリメラーゼ又は他の都合の良いポリメラーゼにより認識されるプロモーターを含んでいる。適当な条件下で T7 又は他の適当なポリメラーゼ及び rNTP を添加すると、結合オリゴヌクレオチドによるオリゴリボヌクレオチドへの転写が起こり、これを見れば電気泳動法等の簡単な手段で検出することができる。

#### 【0055】

標識化した主題の抗体を用いて、生検物質から HCV の存在を検定することができる。標識化抗体を、肝臓スライス等の固定化生検物質と主題の標識化抗体 1 種以上の溶液と共に保温する。非特異的結合抗体を洗い流した後、生検組織の細胞に結合した抗体の存在を、標識の性質に従って検出することができる。

#### 【0056】

立体構造の保存された遺伝子型 1a、1b、2a 及び 2b の E2 タンパク質 (後者 2 種は新規に発現された構成物である) が、ワクシニアウイルスコンストラクトから発現したタンパク質として提供される。これらの調製については実施例で説明する。E1 タンパク質のアミノ酸を含まないタンパク質を得るが、これは E1 及び E2 の両方をコードする遺伝子からも調製できる。この場合、得られる融合蛋白質を処理し、共有結合していないが複合体として存在する 2 つのタンパク質を得る。立体構造の保存された E1 遺伝子型タンパク質を、実施例で述べる pDisp1ay (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド) 等の哺乳類発現ベクターによって同様に調製することができる。タンパク質を溶解物から単離することができる。タンパク質は親和性クロマトグラフィー、HPLC 又は非変性ゲル電気泳動によって容易に精製できる。タンパク質は 95 wt % を超える、通常は少なくとも 99 wt % の純度で得ることができる。タンパク質は、HCV 感染患者から得た血清の遺伝子型決定アッセイ、親和性及び特異性についてのモノクローナル抗体のスクリーニング、タンパク質を標的とする薬剤の評価、抗血清及びモノクローナル抗体を産生させる哺乳類宿主の免疫化等に用いることができる。診断アッセイにおけるこれらの使用は今までに論じられてきたことである。

#### 【0057】

抗体は、結合対象である E1 又は E2 タンパク質上の構造エピトープを同定するのに用いることができる。モノクローナル抗体を用いた立体構造エピトープの同定には 2 つの基本的な方法が考えられる。第一に、HCV 単離体の天然変異体又は突然変異体解析を用いて領域を同定し、モノクローナル抗体により認識されるエピトープに含まれる個々のアミノ酸を最終的に同定する (Schwartzら、1999 J.Mol.Biol.287: 983-999; ここに参照して説明に代える)。多くの異なる HCV E1 又は E2 単離体について抗体をスクリーンし、個々の抗体に選択的に反応しない単離体を同定する。例えば HMAbCBH-11 による HCV E2 タンパク質 Q1a に対する反応性は HCV E2 Q2a に対する反応性よりも低い (図 9)。ある部分がある HCV 遺伝子型の E2 タンパク質由来であり、他の部分が他の HCV 遺伝子型の E2 タンパク質由来である「キメラ」 E2 エンベローピタンパク質を作製する。オーバーラップ断片を PCR 増幅することによって及び / 又は両方の E2 タンパク質に共通の制限酵素切断部位を利用して、これらのキメラ E2 タンパク質が作製できる。別法として生物工学会社 Maxy-Gen の開発した DNA シャッフリングがある。異なるキメラ E2 タンパク質による異なるモノクローナル抗体への結合反応性を調べることによって、立体構造エピトープの形成に欠かせない E2 タンパク質のアミノ酸領域を同定する。不可欠な領域を同定した後は、異なる遺伝子型間で異なる個々のアミノ酸を

10

20

30

40

50

突然変異させ、反応性 E 2 配列を作製する。突然変異体が完全な反応性を再現すれば、エピトープの形成に関与するアミノ酸であるとわかる。

【 0 0 5 8 】

立体構造エピトープを規定する第二の基本的な方法は、まず望ましい H C V E 1 又は E 2 配列をコードする 10 - 15 残基長のオーバーラップペプチド群を合成する。次いで、高濃度の抗体(多くの場合 100  $\mu$ g / ml 以上)に対してペプチドをスクリーンする。立体構造エピトープ全体を含む個々の領域は、検出可能な抗体に対する結合活性を持つ残基を保持していることが多い。これらの領域を同定した後は、10 - 15 残基のペプチドを含む突然変異を調べて、ペプチドの前後関係によって或いは立体構造的に完全な H C V

E 1 又は E 2 タンパク質内の置換によって、領域を確認することができる。この方法を改変したものが文献に説明されている(Reinekeら、1999 *Nature Biotechnology*, 17: 271-275; ここに参照して説明に代える)。

【 0 0 5 9 】

主題の抗体は、ミモトープのスクリーニングにも用いることができる。ミモトープはファージディスプレーを用い、主題の抗体でペプチドをスクリーンして調製することができる(Livnahら、1996 *Science* 273: 464-471; Prezziら、1996 *J. Immunol.* 156: 4504-4513; それぞれここに参照して説明に代える)。立体構造の保存された H C V エピトープを認識する抗体は、立体構造エピトープ又はミモトープのペプチド又は非ペプチド構造ミミックを理論的に設計するための鑄型として用いることができる。

【 0 0 6 0 】

ミモトープの作製は、生物学的に重要である。立体構造の判明したウイルスエピトープにミモトープの構造を似せることによって、ミモトープが受容体自体に結合し、ウイルスによる標的受容体への結合能を阻害することができる。例えば、モノクローナル抗体と腫瘍壞死因子(TNF)との界面を規定する結晶構造の分析によって、TNF受容体への結合を介して TNF の生物学的機能に拮抗することのできる、非ペプチドミメティックの理論的設計が可能になる(Takasakiら、1997 *Nat. Biotech.* 15: 1266-1270; ここに参照して説明に代える)。ペプチド構造ミメティックの設計用として、コンピューターを用いて、タンパク質内の一次アミノ酸配列の折り畳みを理論的に推定することができる。これについては Teichmannら、1999 *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 390-399 に記載がある(ここに参照して説明に代える)。立体構造保存エピトープの構造モデル作製にコンピュータープログラムを用いた実例は、Schwartzら、1999 *J. Mol. Biol.* 287: 983-999 を参照できる(ここに参照して説明に代える)。抗体エピトープのペプチド構造ミミックを理論的に作製する別 の方法としては、合成ペプチドを系統的に置換して不連続な抗体結合部位を線形に表現するもの(Reinekeら、1999 *Nat. Biotech.* 17: 271-275; ここに参照して説明に代える)が挙げられる。

【 0 0 6 1 】

モノクローナル抗体に対し特異的親和性を有するペプチド又はその他の小分子は、立体構造的に完全な E 1 又は E 2 タンパク質のエピトープと競合する。或いはペプチド又はその他の小分子は、モノクローナル抗体に対し特異的親和性を有し、かつ E 1 のエピトープが E 2 と複合したもの又は E 2 のエピトープが E 1 と複合したものと競合するものであってもよい。このようなペプチドはワクチンとして使用可能で、診断アッセイでは免疫化を行い特異的 H C V エピトープに対する抗体を産生するのに用い、競合アッセイでは遺伝子型を決定するのに用いる(例えば Puntorieroら、1998 *EMBOJ.* 17: 3521-3533; Meolaら、1995 *J. Immunol.* 154: 3162-3172; Tafiら、1997 *Biol. Chem.* 378: 495-502 参照)。

【 0 0 6 2 】

立体構造の保存された H C V エピトープの構造ミメティックを効率的に作製する別 の方法としては、立体構造依存性抗 H C V H M A b に対する抗イディオタイプ抗体の作製がある。抗イディオタイプ抗体は、天然ウイルスとその標的受容体との結合を効果的に阻害しうる(Chanhら、1987 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3891-3895; Kopeckyら、1999 *Intervirology* 42: 9-16; Xueら、1993 *J. Gen. Virol.* 74: 73-79; それぞれここに参照して説明に

10

20

30

40

50

代える)。抗 H C V H M A b C B H - 2、5、4 B、4 D、4 G、7、8 C、8 E、9 又は 1 1 のいずれかの立体構造結合部位を認識する抗イディオタイプ抗体は、E 2 による標的細胞タンパク質への結合に干渉することによって、あるいはビリオンによる標的細胞への付着に干渉することによって、ウイルス伝染性を阻害することができる。同様に、H C V H M A b H - 1 1 4 又は H - 1 1 1 のいずれかの立体構造結合部位を認識する抗イディオタイプ抗体も又、E 2 による標的細胞タンパク質への結合に干渉することによって、あるいはビリオンによる標的細胞への付着に干渉することによって、ウイルス伝染性を阻害することができる。

#### 【 0 0 6 3 】

本発明の抗体は、ウイルス量を低減したり、ウイルスによる標的タンパク質への結合を阻害したり、標的細胞とのウイルス媒介融合を阻害したり、細胞感染性に必要なウイルスエンベロープタンパク質の構造変化に干渉することができるので、予防治療又は H C V 感染治療に有用である。組成物としては、単一立体構造エピトープに対するモノクローナル抗体、又は 1 種以上のウイルスエンベロープタンパク質上の個々の立体構造エピトープを認識する相補的モノクローナル抗体の混合物を用いることができる。これらを用いて、感染過程中、複数のメカニズムに同時に干渉できる。

#### 【 0 0 6 4 】

体の部分、特に H C V 感染患者の体の部分のウイルス量を低減するために、表面に抗体を結合した装置に患者血液を通過させ、H C V を捕捉する。例えば米国特許第 5,698,390 号及び第 4,692,411 号が参考できる(それぞれここに参照して説明に代える)。同様の結果を得るために、文献にある他の様々な装置を本発明の抗体と共に用いることができる。体の部分としては、生物的液体、組織、器官(例えば肝臓)等が挙げらる。

#### 【 0 0 6 5 】

抗体は受動免疫療法又は他の生体内療法にも用いることができる。例えば Piazzia ら、1997 Arch Intern Med. 157: 1537-1544; Farcia ら、1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 15394-15399; al-Hemsi ら、1996 Clin. Transplant. 10: 668-675; Krawczynski ら、1996 J. Infect. Dis. 173: 822-828 が参考できる(それぞれここに参照して説明に代える)。このような治療で使用できるように、抗体を注射又は静脈内投与に都合のよいように調合することができる。リン酸緩衝食塩水、生理食塩水等の様々な媒体を用いることができる。抗体の量は、感染のレベル、抗体の親和性、投与方法、投与の頻度、患者の応答性、他の治療法の併用等によって異なる。一般に抗体の投与量は約 0.1 ~ 5 mg / kg である。例えば Andrus ら、1998 J. Infect. Dis. 177 及び Kreil ら、1988 J. Virology 72: 3076-3081 が参考できる(それぞれここに参照して説明に代える)。

#### 【 0 0 6 6 】

チンパンジーは H C V のワクチングクリーニング及び治療について一般に認められている動物モデルである(例えば Farcia ら、1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15394-15399; Farcia ら、1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7792-7796; Farcia ら、1992 Science 258: 135-140; Krawczynski ら、1996 J. Infect. Dis. 173: 822-828; Bassett ら、J. Virology 72: 2589-2599; それぞれここに参照して説明に代える)。抗体の効力は、定量 P C R 法を用いて H C V R N A の存在と力値をモニターすることで調べることができる。試験動物又は対象体についてウイルス量が減少したり感染予防が成功した場合、それは血清の H C V R N A を低減又は除去したことを意味する。アラニンアミノトランスフェラーゼの測定といった酵素試験及び/又は針を逐次刺す肝生検を用いて効力を調べることもできる。いずれにせよ評価が向上した場合、それはウイルスにより誘導された肝損傷が減少したことを意味する。

#### 【 0 0 6 7 】

#### ワクチン

H C V に対するワクチンを調合する場合、H C V E 1 又は H C V E 2 タンパク質のうち少なくとも 1 つの立体構造エピトープに似せたあらゆる作用物(agent)を用いること

10

20

30

40

50

ができる。例えば作用物は、ペプチド、タンパク質、小分子、ミモトープ、有機化合物、有機金属化合物、無機化合物等であってもよい。好ましい態様においては、ワクチンに含まれるエピトープは、感染を防ぐことが知られる抗体に対するエピトープを含む。他の好ましい態様においては、ワクチンに含まれるエピトープは、異なるウイルス遺伝子型間で又は異なるウイルス株間で保存されているエピトープを含む。本発明の特に好ましい態様において、立体構造の判明した H C V E 1 又は E 2 エピトープを含むペプチド又はタンパク質が、H C V 感染を防ぐ又は治療するためのワクチンの調合に用いられる。他の特に好ましい態様において、立体構造の判明したエピトープ(H C V の立体構造が判明した E 1 エピトープ少なくとも 1 個及び立体構造が判明した E 2 エピトープ少なくとも 1 個)を含むペプチド又はタンパク質が、ワクチンの調合に用いられる。或いは E 1 及び E 1 エピトープは直鎖状エピトープであってもよい。更に別の好ましい態様においては、E 1 及び E 2 エピトープは直鎖状及び立体構造エピトープの混合物であってもよい。ペプチド又はタンパク質の長さは好ましくは 100 アミノ酸未満、より好ましくは 50 アミノ酸未満である。特に好ましい態様において、ワクチン調合に用いられるペプチドは H C V E 1 又は E 2 タンパク質のペプチド断片である。好ましくはペプチドを、天然 E 1 又は E 2 タンパク質の折り畳みと同様に折り畳んで、立体構造エピトープの 3 次元構造を保持する。

## 【 0 0 6 8 】

ワクチンは更に、望まれる抗体に対する立体構造エピトープを有する連結したペプチドを含むタンパク質を含んでいてもよい。各ペプチドが異なるエピトープを含むように、あるいは同じペプチドがマルチマー内で 1 回以上用いられるように、数種のペプチドからなるマルチマーを用いてもよい。

## 【 0 0 6 9 】

本発明のペプチドはメリフィールド固相化学等、当分野で公知の方法を用いて合成することができる。ペプチドは E 1 又は E 2 タンパク質の切断と精製によって得てもよい。当分野で公知の技術を用いて、ペプチドを組換えて作製し、大腸菌、酵母菌(例えば *S.cerevisiae*)、昆虫細胞(例えば S f 9 細胞)、又は哺乳類細胞(例えば C H O 細胞)内に產生してもよい(Sambrookら ; Miller&Calos編, *Gene Transfer vectors for Mainmalian Cells*, 1987 ; Ausubelら編、*Current Protocols in Molecular Biology*, 1987 ; それぞれここに参照して説明に代える)。免疫原性、水溶液への溶解性を増加させるために、あるいは正しく折り畳まれる性質を高めるために、ペプチドを修飾してもよい。例えばペプチドをグリコシル化してもよいし、ファルネシル化、水酸化、還元、酸化してもよい。

## 【 0 0 7 0 】

特に好ましい態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 2 タンパク質のアミノ酸 4 1 1 ~ 6 4 4 を含む。別の態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 2 タンパク質のアミノ酸 4 7 0 ~ 6 4 4 を含む。更に別の態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 2 タンパク質のアミノ酸 6 4 4 ~ 6 6 1 を含む。当業者には理解できることであろうが、他の遺伝子型の H C V 由来の E 2 タンパク質の類似アミノ酸配列を用いることもできる。類似配列は、異なる H C V 株又は遺伝子型から得た複数の E 2 タンパク質配列を整列させることによって、調べることができる。望ましいエピトープを保存する相同配列もワクチンの調合に用いることができる。好ましくは配列は、H C V 1 b E 2 タンパク質由来の天然配列に対して、少なくとも 50 % の相同性、より好ましくは少なくとも 60 % の相同性、最も好ましくは少なくとも 70 % の相同性を有する。

## 【 0 0 7 1 】

特に好ましい態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 1 タンパク質のアミノ酸 1 9 2 ~ 3 8 3 を含む。別の態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 1 タンパク質のアミノ酸 1 9 2 ~ 3 4 0 を含む。更に別の態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 1 タンパク質のアミノ酸 1 9 2 ~ 3 5 2 を含む。更に別の態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 1 タンパク質のアミノ酸 1 9 2 ~ 3 6 6 を含む。更に別の態様において、ペプチドは H C V 遺伝子型 1 b の E 1 タンパク質のアミノ酸 1 9 2 ~ 3 7 0 を含む。当業者には理解できることであろうが、他の遺伝子型の H C V 由来の E 1 タ

10

20

30

40

50

ンパク質の類似アミノ酸配列を用いることもできる。類似配列は、異なるH C V株又は遺伝子型から得た複数のE 1タンパク質配列を整列させることによって、調べることができる。望ましいエピトープを保存する相同配列もワクチンの調合に用いることができる。好みしくは配列は、H C V 1 b E 1タンパク質由来の天然配列に対して、少なくとも50%の相同性、より好みしくは少なくとも60%の相同性、最も好みしくは少なくとも70%の相同性を有する。

#### 【0072】

特に好みしい態様において、ヒトに投与する前に、ペプチド又はペプチド群をアジュバントと、又は更に、薬剤として許容される他の賦形剤と混合する。

#### 【0073】

##### アジュバント

本発明の実施に用いられる組成物は、1種以上のアジュバント又はサイトカインを含んでいてもよいし、或いはそれらを含むプロトコルの一部として投与してもよい。本発明に従ってどのようなアジュバントを用いてもよい。多くのアジュバント化合物が知られており、そうした化合物の有用な目録に国立衛生研究所が作成したものがあり、インターネットで閲覧できる(<http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/pdf/compendium.pdf>、ここに参照して説明に代える；更にAllison Dev.Biol.Stand.92:3-11,1998；Unkelessら、Annu.Rev.Immunol.6:251-281,1998；及びPhillipsら、Vaccine 10:151-158,1992参照。それそことに参照して説明に代える)。数百種の様々なアジュバントが当分野で公知であり本発明の実施に用いることができる。

#### 【0074】

##### 投与

本発明に従って対象者に投与される抗体又はワクチンは、あらゆる種類の経路、プロトコル、用量配分で投与できることは、当業者に理解されよう。既知の投与経路の例としては、静脈内(I V)、腹腔内(I P)、胃内(I G)、皮下(S Q)、筋肉内(I M)、経口(P O)、直腸(P R)、髄腔内、腔内、鼻腔内、経皮、皮内が挙げられる。静脈内、筋肉内、経皮、皮内、鼻腔内及び経口投与が一般に好みしい。

#### 【0075】

##### 薬剤組成物

本発明に従って用いられる薬剤組成物は、薬剤として許容される賦形剤又は担体を含んでいてもよい。本明細書でいう「薬剤として許容される担体」とは、あらゆる種類の非毒性かつ不活性の固体、半固体又は液体のフィラー、希釈液、カプセル化材料又は調合補助剤を意味する。薬剤として許容される担体として使用できる材料の例としては、ラクトース、グルコース、スクロース等の糖；コーンスターク、ジャガイモ澱粉等の澱粉；ナトリウムカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、酢酸セルロース等のセルロースとその誘導体；粉末トラガカント；モルト；ゼラチン；タルク；カカオ脂や座薬蠍等の賦形剤；ラッカセイ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油及びダイズ油等の油類；プロピレングリコール等のグリコール類；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチル等のエステル類；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム等の緩衝剤；アルギン酸；バイロジエンを含まない水；等張性食塩水；リンガー溶液；エチルアルコール、リン酸緩衝液；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム等の非毒性で他に作用を及ぼさない潤滑剤；着色剤、解除剤、コーティング剤、甘味料、調味料、香料剤、保存料、酸化防止剤が挙げられ、調合者の判断で組成物に含ませることができる。本発明の薬剤組成物はヒト及び/又は動物に、経口、直腸、非経口、大槽内、腔内、鼻腔内、腹腔内、局所(粉末、クリーム、軟膏又は滴剤として)、口腔経由で、あるいは経口又は鼻腔スプレーとして投与することができる。

#### 【0076】

経口投与用の液体形状としては、薬剤として許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルが挙げられる。活性化合物に加えて、液体形状投与は例えば、水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤(エチルアルコール、イソブ

10

20

30

40

50

ロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油類(特に綿実、ラッカセイ、コーン、胚種、オリーブ、ヒマシ及びゴマ油)、グリセロル、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール、ソルビタンの脂肪酸エステルやそれらの混合物等)といった、当分野で一般的に用いられている不活希釈液を含んでいてもよい。経口用組成物は、不活希釈液のほか、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味料、調味料、香料剤等のアジュバントを含んでいてもよい。

## 【0077】

注射可能な調製物、例えば無菌で注射可能な水性又は油質懸濁液を、好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を用いて、公知の技術で調合することができる。無菌の注射可能な調製物は、非毒性の非経口で許容可能な希釈液又は溶媒に混合した、無菌の注射可能な溶液、懸濁液又はエマルジョン(例えば1,3-ブタンジオールに混合した溶液)の形状をとることができる。使用できる許容可能な賦形剤及び溶媒の例としては、水、リンガー溶液、U.S.P.及び等張塩化ナトリウム溶液が挙げられる。更に一般には、無菌の不揮発性油が溶媒又は懸濁用媒体として用いられている。これには合成モノ又はジ-グリセリド等の刺激の低い不揮発性油であればどのようなものを用いてもよい。更に、オレイン酸等の脂肪酸を注射可能物質の調製に用いることができる。

## 【0078】

注射可能な調合物は、例えばバクテリア捕捉フィルターによる濾過によって、又は使用前に無菌水又は他の無菌の注射可能な媒体に溶解又は分散することのできる、無菌の固体組成物形状の殺菌剤の添加によって、殺菌することができる。

## 【0079】

作用物の効果を長引かせるために、皮下又は筋肉内注射した薬剤の吸収を遅延させることが望まれる場合が多々ある。その場合には水溶性が低い結晶又はアモルファス材料の液体懸濁を使用する。すなわち作用物の吸収速度はその溶解速度、ひいては結晶の大きさと結晶の形状に依存することになる。或いは、油賦形剤に薬剤を溶解又は懸濁することによって非経口投与薬剤の吸収を遅延させることができる。ポリラクチド-ポリグリコリド等の生物分解性重合体内に薬剤をマイクロカプセル化した基質を形成することで注射可能な持続性薬剤が作製できる。重合体に対する作用物の割合や使用される特定の重合体の性質に応じて、作用物の放出速度を制御できる。他の生物分解性重合体の例としては、ポリオルトエステル及びポリ無水物が挙げられる。体組織に影響を与えないリポソーム又はマイクロエマルジョン内に薬剤を封じ込めて、注射可能な持続性薬剤調合物を調製することもできる。

## 【0080】

直腸又は腔内投与用の組成物は好ましくは座薬であり、本発明の化合物をカカオ脂、ポリエチレングリコール、又は座薬蠍等の好適な無刺激の賦形剤又は担体に混合して調製する。これらは周囲温度で固体だが体温で液体であり、すなわち直腸又は腔腔内で溶けて活性化合物を放出する。

## 【0081】

経口投与用の固体投薬形態としてはカプセル、タブレット、錠剤、粉末及び顆粒が挙げられる。このような固体投薬形態においては、活性化合物を少なくとも1種の、不活で薬剤として許容される賦形剤又は担体と混合する。例としてはクエン酸ナトリウム又はリン酸二カルシウム及び/又はa)澱粉、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトル及びケイ酸等のフィラー又は增量剤、b)カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース及びアラビアゴム等の結合剤、c)グリセロル等の湿潤剤、d)寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカ澱粉、アルギン酸、特定のケイ酸塩及び炭酸ナトリウム等の崩壊剤、e)パラフィン等の難溶(solution retarding)剤、f)第四アンモニウム化合物等の吸収促進剤、g)セチルアルコール及びモノステアリン酸グリセリン等の湿潤剤、h)カオリン及びベントナイトクレー等の吸着剤及びi)タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレ

10

20

30

40

50

ングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム等の潤滑剤、及びそれらの混合物が挙げられる。カプセル、タブレット及び錠剤の場合、服用形状は緩衝剤を更に含んでいてもよい。

【0082】

同タイプの固体組成物を、ラクトース又は乳糖、高分子量ポリエチレングリコール等の賦形剤を用いた軟及び硬ゼラチンカプセルに入れるフィラーとして用いてもよい。

【0083】

固体投薬形態のタブレット、糖衣錠、カプセル、錠剤及び顆粒は、腸溶性コーティング又は薬剤調合の分野で公知の他のコーティングといった、コーティング及びシェルを用いて調製できる。これらは更に乳白剤を含んでいてもよく、好ましくは腸管の特定の部位で場合によっては遅延するように、活性成分のみを放出する組成物から構成される。使用することのできる包埋組成物の例としては、重合体物質及び蠍が挙げられる。

10

【0084】

同タイプの固体組成物を、ラクトース又は乳糖、高分子量ポリエチレングリコール等の賦形剤を用いた軟及び硬ゼラチンカプセルに入れるフィラーとして用いてもよい。

【0085】

化合物は上記した賦形剤1種以上を用いたマイクロカプセルの形状をしていてもよい。固体投薬形態のタブレット、糖衣錠、カプセル、錠剤及び顆粒は、腸溶性コーティング、放出制御コーティング又は薬剤調合の分野で公知の他のコーティングといった、コーティング及びシェルを用いて調製できる。そのような固体投薬形態において、活性化合物を、スクロース、ラクトース又は澱粉等の少なくとも1種の不活希釈液と混合してもよい。そのような投薬形態は、一般に実施されているように、不活希釈液以外の物質、例えば錠剤化潤滑剤や他の錠剤化補助剤(ステアリン酸マグネシウム及び微結晶セルロース等)を含んでいてもよい。カプセル、タブレット及び錠剤の場合、投薬形態は緩衝剤を更に含んでいてもよい。あるいは更に乳白剤を含んでいてもよく、好ましくは腸管の特定の部位で場合によっては遅延するように、活性成分のみを放出する組成物からなる。使用することのできる包埋組成物の例としては、重合体物質及び蠍が挙げられる。

20

【0086】

本発明の薬剤組成物を局所又は経皮投与する場合の投薬形態の例としては、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、スプレー、吸入剤又はパッチが挙げられる。活性成分は、無菌条件下で、薬剤として許容される担体及び必要な保存料又は必要に応じて緩衝剤と混合する。眼用調合物、点耳剤及び点眼薬も本発明の範囲に含まれる。

30

【0087】

軟膏、ペースト、クリーム及びゲルは、本発明の活性化合物のほかに、動物及び植物油脂、油類、蠍、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ペントナイト、ケイ酸、タルク、酸化亜鉛又はそれらの混合物等の賦形剤を含んでいてもよい。

40

【0088】

粉末又はスプレーは、本発明の化合物のほかに、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウム、ポリアミド粉末、又はこれらの混合物等の賦形剤を含んでいてもよい。スプレーは更に、クロロフルオロ炭化水素等の一般的な噴霧体を含んでいてもよい。

40

【0089】

経皮パッチには、体内への化合物の取り込みが制御されるという利点がある。このような投薬形態は、適当な媒体に化合物を溶解する又は分散することによって作製することができる。吸収促進剤を用いて、皮膚を通過する化合物の流れを増加させることもできる。速度は、速度制御膜を用いるか、重合体マトリックス又はゲルに化合物を分散することによって制御することができる。

【0090】

患者の治療

本発明は、HCV感染患者を分類し或いは更に治療する方法を提供する。特に好ましい

50

態様において、患者に対しては治療投与計画が特に好適である。治療する患者を用意し、血清試料を患者から得る。中和抗体又はHCVタンパク質の特定の領域又はエピトープに結合する抗体等、特定の抗体の存在について血清を分析する。本明細書で説明したものを持む当分野で公知の方法(例えばELISAや競合アッセイ)を用いて、検出対象の抗体の存在を調べることができる。患者の血清中の抗体レベルに基づいて、その患者に対する治療を計画することができる。例えば、ビリオンによる天然受容体への結合を阻害するとわかっている抗体を持っていない患者を、このタイプのモノクローナル抗体で処理することができる。特に好ましい態様において、患者血清を1/200以上、より好ましくは1/500以上、もっとも好ましくは1/1000以上の希釈率で希釈して50%以上のE2結合阻害が得られた場合、HCV感染患者の血清に競合抗体が存在する(陽性である)とみなす。

10

#### 【0091】

本方法の利点の一つとして、治療を個人にあわせて調整できるということにある。患者に必要とされているが患者が自然に産生できない抗体のみを投与する。これによって不必要的投与治療によって起こりうる有害な反応を回避するかあるいは低減させることができる。本方法は又、そのような治療の利益を得られない患者に経費をかけなくて済むという利点もある。例えば、患者が特定のE2エピトープに対する抗体を既に産生している場合、エピトープに対する外生ヒトモノクローナル抗体を投与する必要はない。

#### 【0092】

新しい細胞に感染する可能性のある循環HCVビリオンの量を低減できる、1種又は数種のHCV-HMAbを患者に注入可能である、ということは当業者には理解されよう。この抗体治療は単独で行ってもよいし、他の治療と同時に行ってもよいし、他の抗ウイルス化合物による治療を終えてから行ってもよい。又、HCV-HMAbは、アポトーシス又は他の細胞死過程を誘導できる公知の毒素又はタンパク質に結合してもよい。HCV感染細胞を破壊する手段として、HCVを原因とする肝臓病の患者に上記改変HCV-HMAbを投与することができる。

20

#### 【0093】

別の特に好ましい態様において、本発明の治療には、患者に存在しないと判明した抗体の産生を誘導するように設計したワクチンを投与することが含まれる。最も効果的なワクチンは好ましくは、天然構造を有し、保護応答(相補的活性化又はウイルス中和反応等)を引き起こすか強い抗体応答を誘導できる抗原から構成される。特に好ましい態様において、対応する抗体を対象者が自然の状態では産生しない、エピトープ又はそのミモトープを、ワクチンが含んでいる。例えばHCV-HMAb、特に多重遺伝子型を認識するHCV-HMAbで単離した合成ペプチドミモトープは、ミモトープの最初の単離に用いた抗体に類似した強力な免疫応答を誘導する能力を持っている。そのようなワクチンを投与することで、患者の免疫系が投与エピトープに対する抗体群を産生し始める。本発明のミモトープ(又はエピトープ)は単独で用いてもよいし、組換えタンパク質と組み合わせて用いてもよいし、或いは数種類の異なるミモトープの混合物として用いてもよいことは理解されよう。

30

#### 【0094】

本発明において、HCV-E1又はHCV-E2タンパク質のいずれか1種に対するHMAbを含む薬剤組成物が提供される。ある好ましい態様において、薬剤組成物はHCV-E1及びE2の両方に対する抗体を含む。他の好ましい態様において、薬剤組成物はHCV-E1及びHCV-E2に対する抗体を2種類以上含む。本明細書に記載するように、HCV-E1及びE2抗体は、単一HCV遺伝子型又は多重HCV遺伝子型のE1又はE2エピトープに対するものとすることができる。本明細書に記すように、抗体を直鎖状又は立体構造エピトープのいずれかに対するものとすることができる、ということは理解されよう。特に好ましい抗体の組合せとしては、H-111といずれかの抗E2ヒトモノクローナル抗体との組合せが挙げられる。特に好ましい抗体の組合せとしては、H-111HMAbとCBH-5、CBH-7、CBH-4G、CBH-8C、CBH-17又は

40

50

C B H - 2 のいずれかから 1 種以上との組合せが挙げられる。

【 0 0 9 5 】

用途

本発明の H C V 抗体を用いて、H C V 受容体を同定することができる。これには多くの方法が使用できるということが当業者には理解されよう (Sambrook J., Fritsch E. 及び Maniatis T., Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 ; Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology, 1987 ; それぞれここに参照して説明に代える)。通常、タンパク質及びペプチド受容体、そして本発明の場合は H C V タンパク質及びペプチド(好ましくは E 1 及び E 2 )受容体を同定するには、H C V 感染しやすい細胞への H C V ビリオンによる付着を、E 1 又は E 2 に対する抗体が阻害できるかどうかを調べる。感染しやすい細胞を H C V 及び抗 H C V E 1 又は E 2 抗体と共に保温して細胞結合アッセイを行い、抗体の存在下で付着が減少したかどうかを調べる。

【 0 0 9 6 】

H C V に対する推定受容体を発現する細胞、又は H C V に対する推定受容体のライブラーを、H C V に対する結合能についてスクリーニングすることもできる。例えば、推定 H C V 受容体(例えば H C V E 1 又は E 2 に対する受容体)を発現する細胞を、抗体の存在下、H C V タンパク質又はペプチドが細胞表面上の推定受容体に結合するのに十分な時間及び条件下で、H C V タンパク質又はペプチドに接触させる。あるいは H C V タンパク質又はペプチド、H C V ビリオンを、細胞表面にある推定受容体に接触させる前に、抗体と共に予め保温することができる。結合は、例えばフローサイトメトリーといった当分野で公知のどのような技術を用いて検出してもよい(Ausubelら又は Sambrook ら、上述参照)。抗体が存在しない場合の細胞への結合と比べて、抗体の存在下における細胞表面への結合が減少していれば、それが H C V 受容体であるということになる。

【 0 0 9 7 】

E 1 又は E 2 受容体等の H C V 受容体を同定する他の方法としては、ビーズやカラム等の固体支持体を使用するものが挙げられる。例えば、H C V 抗体を固体支持体に付着させ次いで抗体と H C V タンパク質又はペプチドとを、H C V タンパク質又はペプチドが抗体に結合するのに十分な時間、接触させることによって、H C V タンパク質、ペプチド又は H C V ビリオンの受容体を同定することができる。これにより受容体による H C V タンパク質又はペプチドへの結合を可能にするのに十分な時間と条件下で、固体支持体上の抗体 - リガンド複合体に接触させることのできる推定 H C V 受容体に対する H C V タンパク質リガンドを提供することができる。タンパク質はライブラーから発現することもできるし、天然又は組換え細胞から調製した細胞抽出物又は精製タンパク質として提供することもできる。H C V タンパク質又はペプチドとの特異的結合複合体を形成した後、未結合の H C V タンパク質又はペプチド(例えば H C V タンパク質又はペプチド)を、例えば標準的な洗浄手順によって除去する。次いで結合タンパク質を、例えばゲル電気泳動法によって溶出及び同定する。

【 0 0 9 8 】

理解を深めるために本発明の上記及び他の形態を以下の実施例により更に詳しく述べるが、実施例は本発明の特定の態様を例証することを企図するものであって、請求項に規定される範囲を制限するものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 9 9 】

ワクシニアウイルス中の多重遺伝子型からの H C V E 2 タンパク質の產生

H C V 血清の反応性を解析し H C V H M A b 反応性の広さを調べるために、H C V 遺伝子型 1 a、1 b、2 a 及び 2 b の単離体から H C V の全コード配列をクローニングし、H C V 陽性血清から P C R 増幅し、p V O T E (Ward ら、1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 6773-6777 ; ここに参照して説明に代える) 転移ベクター(H C V 遺伝子型 1 a、1 b、2 a 及び 2 b それぞれについてコンストラクト Q 1 a、Q 1 b、Q 2 a 及び Q 2 b) を用

10

20

30

40

50

いてワクシニアウイルスで発現した。遺伝子型の選択は米国での HCV 感染者間におけるタイプと頻度 (Mahaneyら、1994 Hepatology 20: 1405-1411; ここに参照して説明に代える)に基づいて行った。オリゴヌクレオチドプライマーは、E 1 の最後の 39 アミノ酸、E 2 / p 7 の全て、及び NS 2 の N 末端の 98 アミノ酸を発現する断片を増幅するように設計した(表 2 の配列番号 18 ~ 27 参照)。

## 【0100】

詳しく述べると、HCV RNAについて PCR 陽性の者から血漿アリコートを得て、InnoLiPa HCV 遺伝子型アッセイ (Innogenetics、ベルギー国ヘント)をマニュアルに従って用い、遺伝子型を特定した。HCV 遺伝子型 1a、1b、2a 及び 2b 感染者の血漿 125 μl から、Puerescript RNA キット (Gentra Systems、ミネソタ州ミネアポリス)をマニュアルに従って用い、RNA を調製した。H<sub>2</sub>O を含まない 25 μl のリボヌクレアーゼに RNA ペレットを再懸濁し、10 μl について逆転写酵素 PCR を行った。逆 HCV 特異的プライマー HCV E 2 - R 1 5' - CGC GCA CrA AGT AsG GyA CT-3' (配列番号 16) を用い、MMLV 逆転写酵素によって、逆転写反応を行った。逆転写は 40 で 60 分行った。逆転写された cDNA を 98 で 5 分間保温して変性し、4 に冷却し、0.15 mM dNTP、3 μl の 10 × PCR 緩衝液、3 ユニットの Amp 1 itaq ポリメラーゼ及び正方向プライマー HCV E 2 - F 1 5' - CGC ATG GCI TG G GAy ATG ATG - 3' (配列番号 17) を含む PCR 混合物を添加した。増幅は 94 で 1 分間、55 で 3 分間、そして 72 で 3 分間のサイクルを 30 回行った。各遺伝子型のクローニングに適した正方向プライマーと内側逆方向プライマー INT - Reverse (表 2、配列番号 18 - 27)、或いは各遺伝子型に適した逆方向プライマー及び INT - Forward を用いた、2 順目の PCR 増幅に 2 ~ 8 μl の増幅産物を供した。PCR 増幅は、94 で 1 分間、60 で 2.5 分間、そして 72 で 2 分間のサイクルを 30 回行った。適当なサイズのバンド (遺伝子型特異的正方向プライマー及び INT - Reverse の場合は ~ 820 ヌクレオチド、INT - Forward 及び遺伝子型特異的逆方向プライマーの場合は ~ 1080 ヌクレオチド) を臭化工チジウム染色したアガロースゲルから切り取り、一般に入手可能な樹脂 (Qiagen、カリフォルニア州バレンシア) を用いて精製した。各遺伝子型に適した正方向及び逆方向プライマー (表 2) と、約 50 ng の各バンドを混合して再増幅した。PCR 増幅は、94 で 1 分間、55 で 2.5 分間、そして 72 で 2 分間のサイクルを 30 回行った。増幅した産物を臭化工チジウム染色したアガロースゲルから切り取り、精製し、適当な制限酵素で切断した。この三段階増幅の結果、標準的な二段階増幅より高い収率で全長挿入物を得た。切断した DNA を、同様に切断した pVOTE 1 又は pVOTE 2 ベクター (Wardら、1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6773-6777; ここに参照して説明に代える) 内に連結した。連結したプラスミドをコンピメント大腸菌内にトランスフェクトし、挿入部分を含むクローンを標準法により同定し増殖した (Sambrook J., Fritsch E. 及び Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; ここに参照して説明に代える)。HCV 遺伝子型 1a、1b、2a 及び 2b の全長 E 2 及び p 7 を発現するコンストラクトについて、得られたクローンをそれぞれ Q 1a、Q 1b、Q 2a 及び Q 2b と称した。

## 【0101】

10

20

30

40

## 【表2】

表2: HCV E 2タンパク質のクローニングに用いたプライマー\*

Gtyp	正方向プライマー	配列番号	逆方向プライマー	配列番号
1 a	CG AGG CIT <u>CAT ATG</u> ATC GCT GGT GCT TGG Nde I	1 8	CG GAA TCC <u>CTG CAG</u> CTA CAA ACT GGC TTG AAG AAT CCA Pst I	1 9
1 b	CG CAT ATG <u>GAG CTC</u> GCG GGG GCC CAC TGG GGA GT Sac I	2 0	GC TCT AGA <u>CTG CAG</u> CTA TAT GCC AGC CTG GAG CAC CAT Pst I	2 1
2 a	C GCT CGA <u>GCC ATG</u> GTT GGC GGG GCT CAT TGG GGC Nco I	2 2	TC GAA TTC <u>GGA TCC</u> TAC AAA GCA CCT TTT AGG AGA TAA GC Bam HI	2 3
2 b	C GCT CGA <u>GCC ATG</u> GTT TTC GGC GGC CAT TGG GTG Nco I	2 4	TC GAA TTC <u>GGA TCC</u> TAC AGA GAC GCT TTA AGG AGG TAG GC Bam HI	2 5
INT	TG GTT CGG BTG YWC ITG GAT GAA	2 6	TAA TGC CAi ARC CKR TAi GGG TAG TC	2 7

\*ワクシニアウイルスE 2コンストラクトのクローニングに用いた内側埋め込みプライマー。クローニングで用いた制限酵素切断部位を下線で示した。プライマーは5'末端に更に制限酵素切断部位を含む。プライマーは他の制限酵素切断部位も含む。G t y p =HCV遺伝子型。プライマーI NT-F及びINT-Rは縮重ヌクレオチドを含んでおり、全ての遺伝子型に使用した。PCR増幅条件は実施例1に記した。

## 【0102】

ワクシニアウイルスコンストラクトQ 1 a 及びQ 2 b による完全E 2タンパク質の発現を一時的発現アッセイで確認した。CV-1細胞を、5 プラーク形成単位(p f u)の野生型ワクシニアウイルス株VWA (Wardら、上述)で感染し、次いでTransfectam (Promega、ウイスconsin州マディソン)をマニュアルに従って用いてpVOTEプラスミドでトランスクレプトした。1 mM イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を追加した培養基で細胞を培養し、HCVタンパク質の発現を誘導した(Ward他、上述)。トランスクレプトの48時間後、培養細胞をPBSで洗浄して細胞を回収した。プロテアーゼ抑制剤Pefabloc (Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)、アブロチニン、ロイペプチド及びペプスタチニンを最終濃度がそれぞれ0.5 mg/ml、2 μg/ml、2 μg/ml 及び1 μg/ml になるように添加した溶解緩衝液(150 mM NaCl、20 mM Tris(pH 7.5)、0.5% デオキシコレート、1.0% ノニデット-P40、1 mM EDTA)に細胞を再懸濁した。回収した細胞3×10<sup>6</sup>個それぞれにつき100 μlの溶解緩衝液を添加した。18,000×g、40にて10分間遠心分離して核をペレット状にし、上澄みを直接用いるか、あるいは使用まで最長2日間、40で保存した。

## 【0103】

ウェスタンプロット法として、10 μlの溶解緩衝液抽出物を10 μlの2×SDS試料緩衝液(20%グリセロール、10% -メルカプトエタノール、4.8% SDS、0.125 mM Tris(pH 6.8))と混合し、95で5分間加熱し、12%ポリアクリルアミドゲルを用いた硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)(Laemmliら、1970 Nature 227: 680-685; ここに参照して説明に代える)で分別した。分別したタンパク質をニトロセルロースに通電転写し、ウェスタンプロットしたHCV E 2(スタンフォード大学H.Greenberg博士より入手)を認識するネズミモノクローナル抗体(mMab)2C8と共に一晩保温した。mMab 2C8をBLotto(2.5%脱脂粉乳、2.5%正常ヤギ血清、0.1% Tween-20(Sigma、ミズーリ州セントルイス)、0.02%アジ化ナトリウムを含むTBS: 150 mM NaCl、20 mM Tris、pH 7.5)で1:500に希釈した。精製したHCV又は対照抗体又はHMAbを含む培養基をBLottoでIgG濃度5 μl/mlに希釈した。プロットをTBSで3回洗浄し、ECLウェスタンプロットキット(Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ)をマニュアルに従って用い、結合抗体を検出した。

## 【0104】

コンストラクトQ 1 a 及びQ 2 b は、Mab 2C8に対して免疫反応性を有する約70 kDaのタンパク質を産生した(図1)。pVOTE系(Wardら、1995 Proc.Natl.Acad.Sci USA 92: 6773-6777; ここに参照して説明に代える)について予想されるように、HCV E 2タンパク質の発現は誘導因子IPTGの存在に強く依存していた。遺伝子型の特定された10種のHCV血清群を用いたIFAにより、4種のコンストラクト全てからも発現タンパク質を検出した(データ示さず)。コンストラクトはいずれもHCV陰性血清に

対して反応性を示さず、HCV抗血清はいずれも野生型ワクシニアウイルスで感染した細胞に反応しなかった。

【0105】

4種のクローニングそれぞれのHCV E2の中央部から得た160bp内側断片(HCV-1のスクレオチド2009~2168)のDNA配列決定を行って、クローニングしたE2タンパク質の遺伝子型を確認した。図2(配列番号9~12)、又はダイターミネーター法及び自動DNAシーケンサー(Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスター・シティ)を用いた挿入全体(コンストラクトQ1b)を参照されたい。この挿入体は、フレームシフトやナンセンス突然変異(termination mutations)を含まず、様々なデータベースから入手できる適当なHCV E2配列に高い相同意を有していた(図3、配列番号1~8参照)。これにより、pVOTEコンストラクトによって4種全ての遺伝子型のHCV E2が正確に発現されたことが明確に示された。完全HCVを産生したプラスミドを用いてワクシニアウイルス株VWAのヘマグルチニン座内に相同遺伝子組み換えすることによって、組換えワクシニアウイルスを産生した(Wardら、上述; Moss及びEarl, In F. Ausubel及びR. Brent及びR. Kingston(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley& Sons, New York, NY, 1994; それれここに参照して説明に代える)。標準法にてBSC-1細胞を感染し、キサンチン及びヒポキサンチンを含む媒体でグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ含有ウイルスを選択し、組換えワクシニアウイルスを同定した(Mossら、上述)。各組換えウイルスについて精製ウイルスストックを得た。BSC-1細胞を用いて測定した力価は $5 \sim 10 \times 10^8$ pfu/mlの範囲にわたった。

10

20

30

40

【実施例2】

【0106】

HCV E2陽性の可能性があるB細胞ドナーの抗体スクリーニング

HCVの増殖は生体外では確実ではないので、HCVタンパク質に対する強い力価を持つ個人を同定するためには、真核細胞内で発現される組換えエンベロープタンパク質を用いる必要がある。そのスクリーニングには、エンベロープタンパク質の天然構造を保存して立体構造エピトープに対する抗体の検出を可能にする方法を用いる必要がある。HCV

HMAb産生用の血清の同定には、免疫蛍光アッセイ(IF A)を用いる。アセトン固定した細胞を用いるこのアッセイは、ヒトTリンパ球向性ウイルスエンベロープタンパク質の立体構造エピトープに対する中和HMAbを産生する際に用いる方法に類似している(Hadlockら、1997 *J. Virology* 71: 5828-5840; ここに参照して説明に代える)。HCV用に、HCV E2エンベロープタンパク質を発現するアセトン固定細胞を用いた。E2タンパク質は、組換えバキュロウイルスを用いてSf9細胞内で、前述のように組換えワクシニアウイルスを用いてヒーラ細胞内で、又は市販のベクター(pDisp1ay、In Vitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)を用いてチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞内で、様々な時点で発現した。昆虫由来細胞は純粋な天然形状のウイルス性エンベロープタンパク質を発現しないので(Rosaら、上述; Arpら、1996 *J. Virology*, 70: 7349-7359; それれここに参照して説明に代える)、ワクシニアウイルス又は哺乳類細胞発現系の使用が好ましい。所与の血清に現れる蛍光を蛍光顕微鏡法により目視で数えるか、又、ある場合には様々な希釈度の血清を評価して、ドナー血清の希釈力価の終点を得た。

【0107】

免疫蛍光法で得た結果を確認するために、HCV E2に対する血清の反応性を評価するマイクロタイヤーブレートアッセイを行った。ヒーラ細胞の単層を80%コンフルエンスまで培養し、5pfu/細胞のVWA及び5pfu/細胞の組換えワクシニアウイルス、又は5pfuのVWAのみで感染した。ヘマグルチニンを持たないウイルスについて観察されたワクシニアウイルス誘導細胞変性効果を最小限におさえるために、完全なヘマグルチニン遺伝子を有する野生型ワクシニアとHCV組換えウイルスとを混合した(Sekiら、1990 *Virology* 175: 372-384; ここに参照して説明に代える)。感染の24時間後、細胞を回収した。PBSで細胞を洗浄して抽出物を調製し、 $30 \times 10^6$ 個の細胞を1mlの溶解緩衝液(150mM NaCl、20mM Tris(pH 7.5)、0.5%デオ

50

キシコレート、1.0%ノニデット-P40、1mM EDTA、0.5mg/ml Pefablock (Boehringer Mannheim、インディアナ州、インディアナポリス)、2μg/mlアプロチニン、2μg/mlロイペプチド及び1μg/mlペプスタチン)に再懸濁した。18,000×g、4にて10分間遠心分離して核をペレット状にした。抽出物を4で保存し、調製後24時間以内にELISAを行った。500ngの精製Galanthus nivalisレクチン(SIGMA、ミズーリ州セントルイス)を含む100μlのPBSを用いて、マイクロタイタープレート(Maxisorp、Nalge Nunc International、ニューヨーク州ロチェスター)の各ウェルを37で1時間コーティングした。次いでウェルをTBS(150mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH 7.5)で洗浄し、150μLのBLotto(TBSに0.1%Tween-20、2.5%正常ヤギ血清、2.5%脱脂粉乳を加えたもの)と共に室温で1時間保温してプロッキングした。プレートをTBSで2回洗浄し、BLottoで1:5に希釈したワクシニアウイルス感染ヒーラ細胞からの抽出物20μlを添加した。室温で1.5時間保温した後、プレートをTBSで3回洗浄し、BLotto 95μlにワクシニアウイルスVWA感染ヒーラ細胞からの溶解性抽出物5μlを加えたもので様々なレベルに希釈したHCV血清を添加した。溶解性抽出物の導入は、GNAレクチンによっても捕捉されうるワクシニアウイルスタンパク質への反応性を抑制した。プレートを1.5時間保温し、ウェルをTBSで3回洗浄し、BLottoで1/5000に希釈した抗ヒト-アルカリホスファターゼ複合体(Promega、ウィスコンシン州マディソン)100μlを添加した。室温で1時間保温した後、プレートをTBSで4回洗浄し、1mg/mlのリン酸p-ニトロフェニル(PNPP)溶液と共に保温した。基質の反応を30~45分進行させ、405nmにおけるウェルの吸光度をマルチウェルプレートリーダー(Du Pont Co.、デラウェア州ウィルミントン)で調べた。

#### 【0108】

典型的な結果を図4に示す。この実験において、遺伝子型の特定されたHCV血清5種及びHCV陰性の血液ドナー由来の血清1種を、遺伝子型1a、1b、2a及び2bのHCV E2タンパク質、ならびに非組換えワクシニアウイルスVWAで感染した抽出物から捕捉したタンパク質について滴定した。HCV E2に対する反応性が最小だったのは、非感染者の血清(陰性血清と記したグラフ)であった。加えてHCV感染者の血清5種全てが、野生型ワクシニアウイルスで感染した抽出物から捕捉したタンパク質に対する反応性を殆ど或いは全く示さなかった(全てのグラフにおける細い黒線)。HCV E2タンパク質に対する様々な血清反応性が試験した5種の血清について得られ、HCV 2a血清が全体で最も高い反応性を示したことがわかる。

#### 【0109】

HCV遺伝子型2b感染者から得た12種の血清について得た結果を図5に示す。このグラフでは、HCV E2タンパク質4種全てについて比OD値0.5の結果になる血清希釈度を比較した(比ODとはHCV E2コンストラクトの抽出物でコーティングしたウェルで得たODと、非組換えワクシニアウイルスからの抽出物でコーティングしたウェルで得たODとの比である)。血清12種全てについて、HCV 2b又は2a E2タンパク質への反応性がHCV 1a又は1b E2タンパク質への反応性に比べて顕著に大きかった。この結果は、HCV遺伝子型2a又は2bの感染者からHCVエンベロープを認識する抗体を検出するには、HCV遺伝子型2のE2タンパク質が優れていることを示している。又、グラフ右側に示した血清のドナーからは、遺伝子型2a又は2b E2タンパク質に存在するエピトープに特異的なHCV HMAbの単離がより確実である。

#### 【0110】

自己由来の抗体を投与する際に、第一世代HCVスクリーニングアッセイを行って、HCV HMAbの產生に用いたドナーがHCV血清陽性であることを確認した。投与グループについてアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)試験を行った結果、7種の投与のうち6種が正常範囲内(<45IU)だった。投与の1つはALT値が49であり、正常限界値を丁度上回っていた。それ以外については、ドナーは肝炎の外的徴候を示していなかった。このドナーは後にRocheアンプリコアHCVアッセイ(Roche Diagnostics、

ニュージャージー州プランチバーグ)を用いたPCRによりHCV陽性であることが確認され、Innolipaプローブアッセイ(Innogenetics、ベルギー国ヘント)により1b遺伝子型のHCVに感染していたことが確認された。このドナーは、HCV E2を認識することのできる抗体の力価が高いことがIFAによって判明した。結合中和アッセイ(下記参照)を行ったところ、このドナーが潜在的な中和抗体について高い力価を有することが示された。末梢血液B細胞をこの個人から単離し、ヒトハイブリドーマを分泌するHCV抗体の產生に用いた(下記参照)。

【実施例3】

【0111】

HCV E2抗原特異的ヒトモノクローナル抗体の產生

T細胞ロゼッティング(rosetting)によりドナーT細胞から末梢B細胞を精製した(Foundら、1984 J. Immunol. Methods 134: 35-42参照; ここに参照して説明に代える)。1×10<sup>4</sup>個のB細胞を含む培養それぞれをマイクロタイタープレート内にてEBVで活性化した。HCV特異的抗体を免疫蛍光アッセイ(IFA)で検出した。HCV E2タンパク質を発現する組換えワクシニアウイルス、HCV E2を発現する組換えバキュロウイルスで感染した細胞、及び/又は自身のDNAからHCV E2を発現するように遺伝子工学処理した哺乳動物細胞系を、HTC SuperCured 24スポットスライド上に固定した。細胞を100%アセトンで室温にて10分間定着させた。固定細胞を、希釈していないEBV活性化B細胞又はハイブリドーマの培養基と共に37℃で30分間保温し、リン酸緩衝食塩水(PBS)pH7.4で5分間洗浄した。次いでスライドを、エバンスブルー対比染色0.001%溶液及びフルオレセインイソチオシアネート(FITC)結合ヤギ抗ヒトIgG(Zymed、カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)と共に37℃で30分保温した。蛍光顕微鏡法によって結合抗体を検出した。

【0112】

HCV E2に対する顕著な免疫蛍光を示した99ウェルを540培養から同定し(収率~18%)、異なる免疫蛍光パターンを示した30個のEBV活性化培養を、マウス-ヒトヘテロ骨髄腫への電気融合用に選択した(Foundら、1990 J. Immunol. Methods 134: 35-42; Zimmermanら、1990 J. Immunol. Methods 134: 43-50; Perkinsら、1991 Hum. Antibod. Hybridomas 2: 155-159参照; それぞれここに参照して説明に代える)。12の融合体(幾つかの融合体は、1以上の陽性EBV活性化培養を含む)について、最初のハイブリドーマ培養456個のうち182が、IFAでHCV E2との反応性を示した(全体の収率40%)。HCV E2に対する反応性がウェスタンプロットで示された最初のEBV活性化培養の2種について、6種の融合体を追加で得た。(IFAでの反応性に加え)ウェスタンプロットで反応性を示すハイブリドーマ分泌HCV E2抗体を、2種の融合体から単離した。全部で30種のヒトハイブリドーマを冷凍した。12種の親ハイブリドーマから限界希釈クローンを単離し、11種のハイブリドーマからのHCV HMAbを後の研究用として大量に產生した。HCV HMAbのうち8種がカッパL鎖を有するIgG<sub>1</sub>であり、2種がラムダL鎖を有するIgG<sub>1</sub>であった。HMAbCBH-9はIgG<sub>1</sub>であったが、ラムダ又はカッパL鎖のいずれであるかは分からなかった。10種のHMAb(HMAbCBH-9を例外とする)のPCR及びDNA配列解析の結果、全てのHMAbがそれぞれ別のH鎖及びL鎖を発現したことが確認された。融合パートナー、IgGサブタイプ、並びにハイブリドーマを用いたIFAの結果を表3に示す。

【実施例4】

【0113】

HCV E2 ELISA

これまでの研究の結果、HCV E2タンパク質は高度にグリコシル化されており、Giantanthus nivalis(GNA)、Triticum vulgaris(WGA)及びRicinus communis等、数種のレクチンのいずれかに結合できることが示されている(Ralstonら、1993、上述; da Silva Cardosa、1998、上述; Satoら、1993 Virology 196: 354-357; それぞれここに参照して説明に代える)。そこで試薬としての2種のレクチンGNA及びWGAの有用性を、マ

10

20

30

40

50

イクロタイタープレート上でのHCV-E2タンパク質の捕捉で評価した。このアッセイの概要を図6に示す。

【0114】

ヒーラ細胞の単層を80%コンフルエンスまで成長させ、5pfu/細胞のVWA及び5pfu/細胞の組換えワクシニアウイルス、又は5pfuのVWAのみで感染した。ヘマグルチニンを有さないウイルスについて観察されたワクシニアウイルス誘導細胞変性効果を最小限におさえるために、完全なヘマグルチニン遺伝子を有する野生型ワクシニアとHCV組換えウイルスとを混合した(Sekiら、1990, *Virology* 175: 372-384; ここに参照して説明に代える)。感染の24時間後、細胞を回収した。PBSで細胞を洗浄して抽出物を調製し、 $30 \times 10^6$ 個の細胞を1mlの溶解緩衝液(150mM NaCl、20mM Tris pH 7.5、0.5%デオキシコレート、1.0%ノニデット-P40、1mM EDTA、0.5mg/ml Pefabloc(Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)、2μg/mlアプロチニン、2μg/mlロイペプチニン及び1μg/mlペプスタチン)に再懸濁した。18,000×g、4にて10分間遠心分離して核をペレット状にした。抽出物を4で保存し、調製後24時間以内にELISAを行った。

【0115】

【表3】

HCV-HMAbの特徴とIFA反応性

抗体 <sup>a</sup>	ヘテロ骨髄腫	サブタイプ		免疫蛍光			
		H鎖	L鎖	1a	1b	2a	2b
CBH-2	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	カッパ	++	++	++	++
CBH-4D	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	ラムダ	+	+	-	-
CBH-4B	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	カッパ	++	++	+/-	-
CBH-4G	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	カッパ	+	+	+/-	+/-
CBH-5	H73C11	IgG1	カッパ	++	++	++	++
CBH-7	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	カッパ	++	++	++	++
CBH-8C	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	カッパ	++	++	++	++
CBH-8E	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	カッパ	++	++	++	++
CBH-9	H73C11	IgG1	不明	+	+	+/-	+/-
CBH-11	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	カッパ	+	++	++	++
CBH-17	K <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /B5	IgG1	ラムダ	+	++	-	-
R04		IgG1	ラムダ	-	-	-	-

a 表記の遺伝子型を有するHCV-E2を発現する組換えワクシニアウイルスで感染したヒーラ細胞と、HCV-HMAbとのIFAによる反応性。反応性を++=強い陽性；+=陽性；+/-=弱い陽性；-=陰性で表した。抗体のH及びL鎖サブタイプを記した。R04はアイソタイプのマッチした対照抗体である。抗体は10μg/mlの量で試験した。

【0116】

500ngの精製レクチンを含む100μlのPBSを用いて、マイクロタイタープレート(Maxisorp, Nalge Nunc International、ニューヨーク州ロチェスター)の各ウェルを37で1時間コーティングした。次いでウェルをTBS(150mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH 7.5)で洗浄し、150μLのBLotto(TBSに0.1%Tween-20、2.5%正常ヤギ血清、2.5%脱脂粉乳を加えたもの)と共に室温にて1時間保温してブロッキングした。プレートをTBSで2回洗浄し、BLottoで1:5に希釈したワクシニアウイルス感染ヒーラ細胞からの抽出物20μlを添加した。室温で1.5時間保温した後、プレートをTBSで3回洗浄し、様々な濃度で非標識化抗体を含むBLotto100μlを添加した。プレートを1.5時間保温し、ウェルをTBSで3回洗浄し、BLottoで1/5000に希釈した抗ヒト-アルカリホスファターゼ複合体(Promega、ウィスコンシン州マディソン)100μlを添加した。室温

で1時間保温した後、プレートをTBSで4回洗浄し、1mg/mlのリン酸p-ニトロフェニル(PNPP)溶液と共に保温した。基質の反応を30~45分進行させ、405nmにおけるウェルの吸光度をマルチウェルプレートリーダー(Du Pont Co.、デラウェア州ウィルミントン)で調べた。

【0117】

組換えQ1aワクシニアウイルスにより產生したHCV1aE2をHCV E2の供給源として用い、6種のHCV HMAbを検出試薬として用いた(図7)。対照モノクローナルの場合、どのレクチンで捕捉されたタンパク質に対しても反応性が見られず、WGAで捕捉されたタンパク質について全てのHCV HMAbはバックグラウンドレベルの反応性を示しただけだった。これに対して、HCV HMAbCBH-2、CBH-5、CBH-7は全て、GNAで捕捉されたタンパク質に強い反応性を示した。更に、HCV HMAbCBH-17及びCBH-4Dは、GNA捕捉タンパク質に対する反応レベルが低かった。これはHCV HMAbCBH-11がこの特定のE2を認識しなかったことを示唆する。しかしHMAbによるHCV E2に対する反応性を分析するためには、GNA捕捉ELISAが極めて有用であることが明らかである。

【0118】

そこでHCV HMAbの反応性を、様々な遺伝子型のE2タンパク質を発現する組換えワクシニアウイルスで評価した(図8)。11種全てのHCV HMAbが2種以上のHCV E2コンストラクトに結合し、対照HMAbについては特異的信号は得られなかつた(R04と記した表)。4種全ての遺伝子型のE2タンパク質に対して最も高い相対親和性と最も高い反応性を有するHMAbは、CBH-7及びCBH-8Cであり、次にHMAbCBH-5、-2及び-8Eであった。HMAbCBH-4G及びCBH-9は遺伝子型2a及び2bのHCV E2タンパク質に対してより顕著な反応性を示したが、HMAbCBH-11はQ1aE2タンパク質に対する反応性が明らかに低かった。HMAbCBH-17と、又、より低いレベルであるがCBH-4D及びCBH-4Bは、遺伝子型2a又は2bのE2タンパク質に比較して遺伝子型1a及び1bのE2タンパク質に優先的に結合した。異なるE2タンパク質について得られた最大シグナルは全ての実験においてほぼ同等だったので、上記の多様性は異なるE2タンパク質を捕捉する効率の違いに由来するものではない。上記の結果は、同一のコンストラクトを用いたIFAの結果と一致した(表3上参照)。7種の抗体CBH-2、-4G、-5、-7、-8C、-8E及び-9は試験した全てのHCV E2コンストラクトに対して顕著な反応性を示したので、広い反応性を有するといえる。

【0119】

試験した全てのHMAbに、少なくとも2種のHCV遺伝子型への反応性があることは、HCV HMAbにより認識されるエピトープが高度に保存されていることを示唆している(図9参照)。HMAbにより認識されるエピトープが天然状態で立体構造であるか直鎖状であるかを調べることが重要である。これはHCV HMAbによる天然及び変性両方のHCV E2タンパク質に対する反応性を比較することによって直接調べられる(図9参照)。予想通り、11種全てのHCV HMAbがHCV1bE2を認識する。HCV E2を0.5%SDS及び5mMジチオスレイトールの存在下56℃で加熱処理した結果、11種のHCV HMAbのうち10種の反応性が完全になくなつた。唯一の例外がHMAbCBH-17で、変性E2タンパク質に対して反応性の約90%を保持した。ウェスタンプロット解析によりHMAbCBH-17が、vQ1a又はvQ1bによって発現されたHCVエンベロープタンパク質に対して弱い反応性を示すことが確認された(データ示さず)。残り10種のHMAbのいずれについても、ウェスタンプロットでのvQ1aに対する反応性は見られなかつた(データ示さず)。従つて11種のうち10種のHCV HMAbが立体構造エピトープを認識する。

【0120】

最後に、競合解析を用いて、どのHCV HMAbが同一の(又は空間的に非常に近い)エピトープを認識するかを調べた。このアッセイの概要を図10に示す。HCV HMA

10

20

30

40

50

b C B H - 5、 C B H - 2 及び C B H - 7 を標準法でビオチン化し、選択した H M A b の過剰な存在下におけるビオチン化 H M A b による H C V 1 型又は 2 型 E 2 に対する反応性を、全く抗体を添加しない試料における反応性と比較した。図 1 1 に見られるように、対照 H M A b R 0 4 及び H C V H M A b C B H - 4 D、 - 4 B、 - 4 G、 - 7、 - 9 及び - 1 7 は全て H M A b C B H - 5 結合を本質的に阻害しなかった。これに対して、 H M A b C B H - 5 はそれ自身の過剰分により 8 5 %、 H M A b C B H - 8 E は約 7 5 % が阻害された。 H M A b C B H - 8 C 及び C B H - 1 1 による H M A b C B H - 5 の阻害は他よりムラがあり、 H M A b C B H - 2 によっては約 5 0 % だけ阻害された。特に、 H M A b C B H - 2 で見られた競合は比較的曖昧で、 C B H - 2 が低い親和性で同じエピトープを C B H - 5 として認識したのか、空間的に近い別のエピトープを認識したのかははっきりしない。  
10

## 【 0 1 2 1 】

H M A b C B H - 2 による抗体競合解析(図 1 2)を行ったところ、 H M A b C B H - 2 結合が、それ自身並びに H M A b C B H - 5、 - 8 C 及び - 8 E によって 7 5 % 以上阻害された。これに対して、 C B H - 7 は Q 1 a タンパク質のみに対する結合を 6 0 % 阻害し、 C B H - 1 1 は Q 1 b 及び Q 2 a タンパク質のみに対する結合を阻害した。 H M A b C B H - 5 に関して、 H M A b C B H - 4 G、 - 4 D、 - 4 B、 - 9 又は - 1 7 との競合は見られなかった。 H M A b C B H - 7 の競合結果(図 1 3)を解析したところ、 C B H - 7 の結合を顕著に阻害した唯一の H M A b はそれ自身であったことが分かった。これらのデータは、幅広い反応性を示す H M A b のうち、 C B H - 2、 - 5、 - 1 1 及び - 7 が別個のエピトープを認識することを実証している。又、 C B H - 2、 - 8 C 及び - 8 E が同一のエピトープあるいは 2 種の異なるエピトープのいずれかを認識するという可能性が残っている。加えて C B H - 9 及び C B H - 4 G が同じエピトープ又は 2 種の異なるエピトープを認識する可能性があるが、 C B H - 2、 - 5 等と競合しなかったので、幅広い反応性を有する他の H M A b のように同じエピトープを認識するというわけではないことが確認された。従って、幅広い反応性を有する H M A b は少なくとも 5 種の異なるエピトープを認識する。  
20

## 【 実施例 5 】

## 【 0 1 2 2 】

結合中和アッセイにおける E 2 特異的 H M A b 活性の評価

結合中和( N O B )アッセイは、所与の抗体又は血清が、ヒト T 細胞系に発現した推定受容体に対する H C V E 2 タンパク質による結合を阻害することができるかどうかを調べるものである。文献の方法及び H C V E 2 タンパク質を用いて N O B アッセイを行った(Rosaら、上述； Ishiiら、上述)。以下簡単に述べると、哺乳類細胞で產生した 1  $\mu$  g の H C V E 2 1 a タンパク質(Rosaら、上述)を様々な希釈率の抗体(0.1 ~ 3 0 0  $\mu$  g / m l)と混合し、37 度 3 0 分保温した。M o l t - 4 細胞( $10^5$ )を混合物に添加し、氷上で 1 時間保温した。洗浄後、M o l t - 4 細胞に結合した H C V E 2 の量を文献のようにフローサイトメトリーで評価した(Rosaら、上述)。N O B 力価は、E 2 結合を 5 0 % 中和する血清希釈として定義した。  
30

## 【 0 1 2 3 】

C D 8 1 を発現する標的細胞への H C V 1 a E 2 による結合を阻害する H M A b の能力を、結合中和( N O B )アッセイ(Rosaら、上述)で評価した。 H M A b C B H - 4 D、 4 B、 4 G 及び 1 7 は、2 5  $\mu$  g / m l 未満の濃度では E 2 による標的細胞への結合をプロックしなかった。複数の実験において、 H M A b C B H - 2、 - 5、 - 7、 - 8 C、 - 8 E 及び - 1 1 は、1 ~ 1 0  $\mu$  g / m l の濃度で 5 0 % の阻害を達成した(表 4)。  
40

## 【 実施例 6 】

## 【 0 1 2 4 】

E 2 による C D 8 1 への結合に H C V H M A b が与える影響：マイクロタイタープレートアッセイ

近年、ヒトテトラスパニンタンパク質 C D 8 1 は、 H C V の潜在的受容体かつ H C V

E 2 の細胞標的タンパク質としてN O B アッセイで同定されている。C D 8 1 内のH C V E 2 に対する結合部位は、以前は細胞外ドメイン2又はL E Lと称されていた、大きな細胞外ドメインC D 8 1 - L E Lに位置することが分かっている(Pileriら、1998 Science 282: 938-941; ここに参照して説明に代える)。E 2 とL E Lとの混同を避けるために、この領域を大細胞外ドメイン(L E L)と称することにする。ヒトC D 8 1 の細胞外ドメイン(C D 8 1 - L E L)を、p G E X ベクター(G S T - 2 T)を用いてグルタチオン-S - トランスフェラーゼとの融合蛋白質として発現した。タンパク質の作製と精製は文献に従って行った(Flintら、1999 J.Virology 73: 6235-6244; ここに参照して説明に代える)。このC D 8 1 - L E L - G S T 融合蛋白質を用いて、どのH M A b がC D 8 1 - H C V

E 2 複合体を認識できるかを調べた。このアッセイの概要を図14に示す。マイクロタイアプレートウェルを、P B S で希釈した精製C D 8 1 - L E L又は非組換えG S T 1 0 0 n g でコーティングした。37 で2時間おいた後、ウェルをT B S で一回洗浄し、150 μ l のB L O T T O と共に室温で1時間保温してブロッキングした。H C V E 2 発現ワクシニアウイルスで感染したB S C 1 細胞からの抽出物を、試験抗体を含む100 μ l のB L O T T O と共にコーティングプレート内で合わせ、緩やかに攪拌しながら4 で一晩保温した。ウェルをT B S で3回洗浄し、実施例4 と同様に適当なアルカリホスファターゼ結合二次抗体及びP N P P 基質を添加した。

#### 【0125】

多重遺伝子型のE 2 タンパク質を用いたN O B の結果を確認するために、H C V E 2 とC D 8 1との相互作用をH C V H M A b が阻害できるかどうかを評価した。まずマイクロタイアプレートを精製C D 8 1 - L E L グルタチオン-S - トランスフェラーゼ融合蛋白質でコーティングしH C V H M A b の存在下に、過剰なH C V E 2 を添加した。H C V E 2 はヒトC D 8 1 と特異的に結合するが他のほぼ全ての靈長類のC D 8 1 タンパク質とは結合しないので(Rosaら、上述)、E 2 タンパク質をミドリザル肝細胞系B S C - 1 内で產生し、内因性のC D 8 1 による影響を最小限に抑えた。抗H C V 及び対照抗体の両方が、精製非組換えグルタチオン-S - トランスフェラーゼによって捕捉されなかった。野生型ワクシニアウイルスに感染させたB S C - 1 細胞の抽出物と併せた時、C D 8 1 によっても、H C V 又は対照抗体は捕捉されなかった(データ示さず)。

#### 【0126】

試験した4種全ての遺伝子型のE 2 タンパク質を同程度に含むC D 8 1 コートプレートにN O B 陰性H M A b C B H - 4 G を捕捉した。H M A b C B H - 4 B 、 - 4 D 及び - 1 7 はH C V 1 a 又は1 b E 2 タンパク質によって様々な程度でC D 8 1 コートプレート上に捕捉されたが、H C V 2 a 又は2 b E 2 タンパク質によっては捕捉されなかった。この結果は、これらH M A b が示したG N A 捕捉E 2 タンパク質に対する反応性と一致する(図15)。4種のN O B 陰性H M A b の滴定解析を行ったところ、1 ~ 10 μ g / m l の濃度にて最大50%の結合率で全てがH C V 1 b E 2 タンパク質に結合した(表4)。N O B 陽性抗体C B H - 2 、 - 5 、 - 7 、 - 8 C 、 - 8 E 及び - 1 1 はいずれもC D 8 1 及び試験した4種全ての遺伝子型のE 2 タンパク質によって捕捉されなかった(図15)。H C V 1 b E 2 タンパク質がC D 8 1 - L E L にすでに結合したウェルにH C V 抗体を添加したときにも同様の結果が得られた(データ示さず)。このことは、得られた結果がE 2 タンパク質及びH C V H M A b の添加とはそれぞれ関係がないことを意味する。H M A b C B H - 2 及び7はG N A 捕捉E 2 に対して強い反応性を示しC D 8 1 結合E 2 に対して陰性であるが、これら抗体の滴定解析を行ったところ、これらは25 μ g / m l の濃度までC D 8 1 - L E L E 2 複合体に結合しなかったことが確認された(データ示さず)。従って6種のH M A b が、多重遺伝子型のH C V E 2 によるC D 8 1 - L E L への結合を阻害した。

#### 【0127】

## 【表4】

表4：抗HCV-HMAbによるHCV-E2-CD81結合の阻害

HMAb	NOB1a <sup>a</sup>	CD81
		1bE2 <sup>b</sup>
CBH2	5 μg/ml	—
CBH5	2 μg/ml	—
CBH7	7 μg/ml	—
CBH8C	10 μg/ml	—
CBH8E	8 μg/ml	—
CBH11	3 μg/ml	—
		10
CBH4G	—	3 μg/ml
CBH9	—	1 μg/ml
CBH4B	—	0.4 μg/ml
CBH4D	—	2 μg/ml
CBH17	—	3 μg/ml
R04	—	—

<sup>a</sup> 表記のNOBアッセイにおけるHMAb反応性を、CD81発現T細胞へのE2結合を50%阻害した抗体量μg/mlとして示す。抗体は0.1~300μg/mlの濃度で試験した。(—)は陰性を示す。

<sup>b</sup> GNAにより捕捉されたE2又はCD81-LELにより捕捉されたE2に対する結合率が最大50%に達した、HMAb反応性を抗体の濃度(μg/ml)として示す。(—)は陰性を示す。

10

20

30

40

## 【実施例7】

## 【0128】

## HCV中和抗体のマイクロタイタープレートアッセイ

HCV感染者の治療と管理を補助するものとして、感染者が強力な抗ウイルス免疫応答を有するかを調べることが望ましい。上記した結合中和アッセイやチンパンジー接種前に行うエクスピボ中和等、中和抗体力値を測定できるアッセイが幾つかあるが、これらのアッセイはいずれも煩雑であり大量の試料を検査するのに適していない。従って、ヒト血清中の抗体等の結合を中和するレベルを調べる阻害アッセイにおいて、多重遺伝子型のHCV-E2タンパク質とのCD81複合体に対して同等の反応性を持つHMAbCBH-4Gを用いた。マイクロタイタープレートの各ウェルを、500ngの精製GNAレクチン又は100ngのGST-CD81-LEL融合蛋白質のいずれかで、37にて1時間コーティングした。ウェルをTBSで1回洗浄し、150μlのBLOTTTOで室温にて1時間ブロッキングした。次いでウェルをTBSで1回洗浄し、様々な希釈率の試験血清又はモノクローナル抗体を適当なウェルに添加して合計50μlとした。それとは別に各ウェル用に、15μlのHCV-E2タンパク質含有抽出物をHMAbCBH-4Gのビオチン化調製物4μg/mlと併せ、BLOTTTOで合計50μlとした。4で20分保温した後、すでに試験抗体を含んでいるマイクロタイタープレートウェルにE2とCBH-4Gの混合物を添加した。プレート全体を緩く攪拌しながら4で一晩保温した。翌朝ウェルの内容物を捨て、TBSで3回洗浄した。次に0.1%Tween-20(Sigma、ミズーリ州セントルイス)を含むPBSで1/1000に希釈したストレプトアビシン結合アルカリホスファターゼ(Amersham-Pharmacia、ニュージャージー州ピスキャタウェイ)100μlを添加した。プレートを室温で1時間保温した後、ウェルをTBSで4回洗浄し、実施例2及び4で述べたように、結合したビオチン化抗体をPNPP基質と共に保温して検出した。

## 【0129】

11種のHCV-HMAb群を試験抗体として用いた結果を図18に示す。この実験においては、20μg/ml濃度のHCV-HMAbが、HCV遺伝子型1aE2タンパク質によるヒトCD81-LELへの結合を阻害するかどうかを評価した。CD81-LEL

50

Lでコーティングしたウェルにおける結合阻害を、GNAレクチンでコーティングしたウェルにおいて同じ抗体で得た結果と比較した。GNAコーティングウェルにおいてE2結合が阻害されたことは、CBH-4G検出抗体と競合抗体との相互作用が阻害されていることを反映している。CD81-LELコーティングウェルにおける特異的阻害は、CD81とE2との相互作用の阻害を反映している。11種のHCV-HMAb又は対照抗体R04のいずれもが、GNAに捕捉されたE2へのCBH-4Gによる結合を50%以上阻害しなかった。これに対して、既に結合中和陽性であることが示された6種のHCV-HMAbのうち5種がCBH-4G-E2複合体によるCD81-LELへの結合を強く阻害した。唯一の例外はHMAbCBH-11で、遺伝子型1a E2タンパク質のQ1a単離体を効率よく認識しなかった。CD81-LEL-E2複合体を認識するHMAbCBH-4b、-4G、-4D、-9及び-17は全て、CBH-4G結合E2によるCD81-LELへの結合に最小限の影響しか与えなかった。従ってHMAbCBH-4Gは、HCV E2とCD81との相互作用を阻害可能な抗体と可能でない抗体とを効果的に識別することができる。

10

20

30

40

50

## 【0130】

## 【表5】

表5:HCV HMAbのエピトープ予備解析

エピトープ	タイプ <sup>1</sup>	HMAb	E2-CD81阻害 <sup>2</sup>	HCVビリオンへの結合	CBH2との競合	1a	1b	2a	2b
1	CONF	CBH2	+	+	+	+	+	+	+
		CBH8Ec	+	ND	+	+	+	+	+
2	CONF	CBH5	+	+	+/- <sup>3</sup>	+	+	+	+
3	CONF	CBH7	+	-	-	+	+	+	+
4	CONF	CBH11	+	-	+	-	+	+	+
5	CONF	CBH8C	+	NDn	+	+	+	+	+
6	CONF	CBH4G	-	ND	-	+	+	+	+
		CBH9	-	ND	-	+	+	+	+
7	CONF	CBH4B	-	ND	-	+	+	-	-
		CBH4D	-	ND	-	+	+	-	-
8	LIN	CBH17	-	ND	-	+	+	-	-

<sup>1</sup> CONF=立体構造エピトープを認識；LIN=直鎖状エピトープを認識<sup>2</sup> 上記したNOBアッセイ及びCD81-E2結合アッセイの結果をまとめた。<sup>3</sup> 相互を入れ替えたとき結果が一致しない、部分的競合が観察された。CBH-2は、CBH-5によるHCV1a又は1b E2タンパク質への結合を~50%のレベルで阻害する。CBH-5は、CBH-2による遺伝子型1a、1b、2a又は2bのHCV E2への結合を~80%阻害する。

## 【0131】

HCVと、HCV HMAbの代わりに対照血清とを用いて上記実験を繰り返した(図19)。6種の遺伝子型の特定されたHCV血清(遺伝子型1a血清3種及び遺伝子型2bの血清3種)及び2種のHCV陰性血清を、1/1000の希釈率で相同的E2タンパク質に対して試験した。HCV HMAbについてみられたように、GNAに対するHCV E2による結合の阻害は殆ど或いは全く見られなかった。陰性血清のいずれもが、HCV E2によるCD81-LELへの結合に顕著な影響を与えたなかった。これに対してHCV血清は、E2によるCD81-LELへの結合を幅広く阻害した。従ってマイクロタイプレートにおいては、HMAbCBH-4Gが推定受容体CD81に結合したといえる。

## 【0132】

上記結果から明らかなように、HCV感染の診断法と治療法の開発には、モノクローナル抗体も重要な役割を担う。遺伝子型1及び2を認識できるので、陰性の誤認がより少ないHCVアッセイを行うことができ、HCV感染を同定するアッセイは多量の抗体を必要としない。抗体は幅広い治療プログラムへの用途が期待できる。更に抗体を用いて、遺伝子型を同定し、ビリオン粒子を単離し、HCV RNAを単離し、血清又は他の試料から

抗原を捕捉し、(例えばランダムペプチドファージライブラリーをスクリーニングすることによって)ミモトープを同定又は単離することができる。ヒト由来なので、ウイルスに接触したと考えられる個人を保護する予防治療や、患者内の有効ウイルス量を低減させる治療に用いることができる。

#### 【実施例 8】

##### 【0133】

#### HCV 感染小動物モデルにおいて HCV 複製を阻害する HCV-E2 に対するヒトモノクローナル抗体の競合解析及びエピトープの位置解析

##### 材料及び方法

細胞系及びウイルス。10%牛胎児血清(FCS)及び2 mMグルタミンを追加した最小必要培地(MEM、Life Technologies、メリーランド州ベセズダ)でヒーラ細胞を培養した。10%牛胎児血清(GIBCO)及びL-グルタミン(2 mM)(GIBCO)を追加したダルベッコ改变最小必要培地(DMEM、Life Technologies、メリーランド州ガーラズバーグ)で、5%CO<sub>2</sub>にてヒト胚性腎臓(HEK-293)細胞を維持した。HCVエンベロープタンパク質を発現する組換えワクシニアウイルスを作製して増殖させた(HCV Jov 参照)。HCV1aH株の構造タンパク質を発現するワクシニアウイルス1488はCharles Rice博士より入手した。

##### 【0134】

モノクローナル抗体。HCV-HMAbの產生、精製及びビオチン化を行った(HCV Jov 参照)。Jane McKeating博士より得たHCV-E2に対するラットモノクローナル抗体3/11を前述のように培養した。インフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトープに対するラットモノクローナル抗体はRoche Diagnostics(インディアナ州インディアナポリス)より入手した。c-mycエピトープに対するネズミモノクローナル抗体はSanta Cruz Biotechnology(カリフォルニア州サンタクルーズ)より入手した。

##### 【0135】

競合アッセイ。ヒーラ細胞の単層を80%コンフルエンスまで培養し、HCV-E2を発現する組換えワクシニアウイルスで感染し、細胞質抽出物を調製した(HCV Jov 参照)。500 ngの精製Galanthus nivalis(GNA)レクチン(SIGMA、ミズーリ州セントルイス)を含む100 μlのPBSを用いて、マイクロタイタープレートのウェルを37で1時間コーティングした。ウェルをTBS(150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.5)で洗浄し、150 μlのBLotto(TBSに0.1%Tween-20、2.5%正常ヤギ血清、2.5%脱脂粉乳を加えたもの)と共に室温で1時間保温してブロッキングした。プレートをTBSで2回洗浄し、100 μlのBLottoに15 μlの抽出物を加えたものを、各ウェルに添加した。室温で1.5時間おいた後、プレートをTBSで3回洗浄し、様々な濃度の競合抗体を合計50 μl/ウェルとなるように添加した。プレートを30分保温し、ビオチン化試験抗体溶液8 μg/ml(CBH-4G)又は4 μg/ml(他のHMAb全て)を50 μl/ウェルとなるように添加した。室温で1.5時間保温した後、プレートをTBSで3回洗浄し、1/1000に希釈したアルカリホスファターゼ結合ストレプトアビシン(Amersham-Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスキャタウェイ)100 μlを添加した。室温で1時間おいた後、プレートをTBSで4回洗浄し、1 mg/mlのリン酸p-ニトロフェニル(PNPP)溶液と共に30分間保温した。405 nmにおけるウェルの吸光度をマルチウェルプレートリーダー(BioTek Instruments、バーモント州ウィヌースキ)で調べた。競合抗体が存在する場合にビオチン化試験抗体及びE2から得たシグナルを、競合抗体が存在しない場合に試験抗体及びE2から得たシグナルと比較した。

##### 【0136】

HCV-E2欠失コンストラクトの単離とクローニング。PureScript(Gentra systems、ミネソタ州ミネアポリス)をマニュアルに従って用い、HCV遺伝子型1b感染者の血清からHCV1bRNAを単離した。ワクシニアウイルス組換えQ1bと全てのHCV1b欠失コンストラクトの両方を同じ個人由来とした。ランダムプライマーと逆転写酵素(P

10

20

30

40

50

erkin-Elmer Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスター・シティー)をマニュアルに従って42、30分の条件で用い、HCV RNAをcDNAに変換した。HCV E1の断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅した。PCRにはpfu taqポリメラーゼ(Stratageneカリフォルニア州ラホーヤ)と、Bgl I I又はPst I制限酵素切断部位に挟まれた適当なオリゴヌクレオチドプライマー、cDNA(Integrated DNA Technologies、アイオワ州コールビルより入手)を用いた。HCV H株コンストラクトをワクシニアウイルスコンストラクトvv1488のウイルスストックからPCRで増幅した。次いで増幅したDNAを、Bgl I I及びPst Iで切断したpDisplayプラスミド(Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)内に連結した。全てのプラスミドは、標準的な工程を用いて作製した(28)。自動シーケンサー(PE-Applied Biosystems、カリフォルニア州フォスター・シティー)を用いてABI PRISM Dye terminator cycle配列決定を行い、枠内HCV挿入の存在を確認した。

## 【0137】

HCV E2欠失コンストラクトの発現。ヒト胚性腎臓(HEK)293細胞を培養して翌日までに60-70%コンフルエンスを得た。T-75フラスコのトランスフェクション用に、 $\mu$ gの適当なプラスミドDNAと $\mu$ gのPerfect Lipid Pfx-2(Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)との混合物を、m1の血清を含まない媒体と、1:6のDNA:脂質比(w/w)で混合した。37で4時間保温した後、トランスフェクション溶液を2.5m1の完全培地で置き換え、更に24時間、細胞を培養した。PBSで細胞を洗浄して細胞抽出物を調製し、1m1の溶解緩衝液(150 mM NaCl、20 mM Tris pH 7.5、0.5%デオキシコレート、1.0%ノニデット-P40、1 mM EDTA、0.5 mg/ml Pefabloc(Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)、2  $\mu$ g/mlアプロチニン、2  $\mu$ g/mlロイペプチド及び1  $\mu$ g/mlペプスタチン)に再懸濁した。18,000  $\times$  g、4にて10分間遠心分離して核をペレット状にした。ウェスタンプロット解析用に、抽出物を1対1で2×硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミド電気泳動試料緩衝液( SDS-SB; 20%グリセロール、10% -メルカプトエタノール、4.8% SDS、0.125 mM Tris pH 6.8)と混合した。タンパク質を95で5分加熱して変性し、変性した抽出物の20  $\mu$ lアリコートについて12%ポリアクリルアミドゲルで硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミド電気泳動法( SDS-PAGE)を行った。SDS-PAGE及びそれに続くウェスタンプロットには、標準法を用いた。

## 【0138】

マイクロタイタープレートアッセイ用に、500ngの精製Galanthus nivalis(GNA)レクチン(SIGMA、ミズーリ州セントルイス)を含む100  $\mu$ lのPBSを用いて、マイクロタイタープレートのウェルを37で1時間コーティングした。ウェルをTBS(150 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.5)で洗浄し、150  $\mu$ lのBLotto(TBSに0.1%Tween-20、2.5%正常ヤギ血清、2.5%脱脂粉乳を加えたもの)と共に室温で1時間保温してブロッキングした。ウェルをTBSで2回洗浄した後、75  $\mu$ lのBLottoで希釈したE2欠失コンストラクトでトランスフェクトしたHEK-293細胞の抽出物25  $\mu$ lを添加した。室温に1.5時間おいた後、プレートをTBSで3回洗浄し、様々な濃度でモノクローナル抗体を添加した。プレートを1.5時間保温し、TBSで3回洗浄し、マニュアルに従ってBLottoで希釈した100  $\mu$ lの適当なアルカリホスファターゼ結合二次抗体を添加した(抗ヒト及び抗マウス抗体についてはPromega(ウィスコンシン州マディソン)、抗ラット抗体についてはKirkegaard and Perry(カリフォルニア州サウスサンフランシスコ))。室温で1時間おいた後、プレートをTBSで4回洗浄し、1 mg/mlリン酸p-ニトロフェニル(PNPP)溶液で30分保温した。マルチウェルプレートリーダー(DuPont Co、デラウェア州ウィルミントン)を持ちいて、吸光度を405 nmで測定した。

## 【0139】

フローサイトメトリー解析。様々な希釈率で試験抗体を含む総量100  $\mu$ lの染色溶液

10

20

30

40

50

(P B S に 1 % F C S 及び 0.1 % アジ化ナトリウムを加えたもの)を、生存能力がある H C V E 1 発現又は対照 H E K - 2 9 3 細胞  $10^6$  個と混合し、100  $\mu$  l の染色溶液に再懸濁し、4 度で 45 分保温した。3 ml の染色溶液を更に添加した後、500  $\times$  g、室温にて 10 分間遠心分離して細胞をペレット状にした。ペレットを保存し、製造元のマニュアルにしたがって染色溶液で希釈した F I T C 結合二次抗体 100  $\mu$  l に再懸濁した (Jackson Immunoresearch laboratories、ペンシルバニア州ウエストグローブ)。4 度で 45 分間おいた後、900  $\mu$  l の染色溶液を添加し、上記したように細胞をペレット状にした。次いで細胞を 1 ml の定着溶液 (3.8 % ホルムアルデヒドを含む P B S) に再懸濁し、細胞表面に結合した H M A b の量を F A C S c a l i b u r (Becton-Dickinson、カリフォルニア州サンホゼ) で解析した。2 色染色用に二次抗体を R F I C O E R I T R I N と複合して蛍光を 606 nm でモニターする一方、E G F P 蛍光を 545 nm でモニターした。

10

## 【0140】

## 結果

H C V E 2 を認識するヒトモノクローナル抗体を 2 つの供給源から得た。10 種の H M A b (C B H - 2、C B H - 4 B、C B H - 4 D、C B H - 4 G、C B H - 5、C B H - 7、C B H - 8 C、C B H - 8 E、C B H - 1 1 及び C B H - 1 7) を、無症候な遺伝子型 1 b H C V 感染者から得た。抗体は異なる遺伝子型の H C V E 2 に対して様々な反応性を示し、H C V E 2 とヒト C D 8 1 との相互作用に対する阻害能は様々であった。H C V H M A b の呼称、反応性、特性を表 6 にまとめた。

20

## 【0141】

## 【表 6】

表 6 : H C V H M A b							
H C V E 2 抗体			E 2 反応性 <sup>3</sup>		機能アッセイ		
H M A b <sup>1</sup>	H鎖 <sup>2</sup>	L鎖	遺伝子型 1	遺伝子型 2	C D 8 1 阻害 <sup>4</sup>	ビリオン結合 <sup>5</sup>	トリメラ <sup>6</sup>
C B H - 2	V H 5 - 5 1	V $\kappa$ I I I A 2 7	7 (8)	2 (2)	++	++	++
C B H - 8 E	V H 1 - 6 9	V $\kappa$ I O 1 2	8 (8)	2 (2)	++	ND	ND
C B H - 5	V H 1 - 6 9	V $\kappa$ I L 1 2	8 (8)	2 (2)	++	+	+/-
C B H - 8 C	V H 4 - 5 9	V $\kappa$ I I I L 6	5 (8)	2 (2)	++	ND	ND
C B H - 1 1	V H 1 - 6 9	V $\kappa$ I L 1 2	4 (8)	2 (2)	++	-	ND
C B H - 7	V H 1 - 6 9	V $\kappa$ I O 1 2	8 (8)	2 (2)	++	-	++
C B H - 4 G	V H 1 - 9	V $\kappa$ I A 2 0	8 (8)	2 (2)	-	ND	ND
C B H - 4 B	V H 1 - 9	V $\kappa$ I I I A 2 7	8 (8)	0 (2)	-	ND	ND
C B H - 4 D	V H 1 - 9	V $\lambda$ 2 a 2	8 (8)	0 (2)	-	ND	ND
C B H - 1 7	V H 3 - 7 3	V $\lambda$ 3 h	7 (8)	0 (2)	-	ND	ND
3 / 1 1	ラット M A b		8 (8)	2 (2)	ND	ND	ND
H A	ラット M A b		2 (2)	0 (0)	-	ND	ND
R 0 4	I g G 1		0 (8)	0 (2)	-	-	ND

30

<sup>1</sup> C B H 抗体については Hadlock ら、J. Virol. 74 : 10407-10416、2000 (ここに参照して説明に代える) に詳しい記載がある。H A はいくつかの H C V E 2 コンストラクトに存在する合成エピトープを認識する。r M A b 3 / 1 1 は Jane McKeating 博士より入手した。

40

<sup>2</sup> 抗体配列は Chan HC ら、Press Blood から得た。

<sup>3</sup> 反応性 E 2 の数と、総試験数 (括弧内) を記した。

<sup>4</sup> ++ = E 2 による C D 8 1 への結合を阻害。- = 阻害なし。ND = 試験せず。

<sup>5</sup> ++ = 免疫沈降及び/又は C D 8 1 阻害アッセイにおいて H C V ビリオンと結合。

<sup>6</sup> ++ = トリメラ (Trimer) マウスにおいて血清 H C V レベルを顕著に阻害。試験 H M A b は、ヒト肝臓に接触させトリメラマウスに移植する前に、H C V 接種材料と共に予め保温する。移植の 1 5 ~ 2 0 日後に H C V 血清ウイルス量を調べた。1 種の H M A b のうち 10 種の I g G 1 遺伝子の配列解析を行ったところ、それぞれ別の B 細胞に由来することが判明した。なお、H M A b C B H - 4 B、C B H - 4 G、C B H - 4 D 及び C B H - 1 7 は全て、E 2 による C D 8 1 - L E L への結合を阻害しなかった (表 6)。

50

## 【0142】

競合アッセイを用いて、H M A b に反応性を有する E 2 内の異なる部位の数を調べた。各 H M A b を精製し、ビオチン化し、様々な濃度の競合抗体の存在下での抗体の結合を調べた。典型的な結合曲線を図 2 1 に記す。H M A b C B H - 2、C B H - 5、C B H - 8

C 及び C B H - 1 1 と H C V 1 b E 2 との結合は、過剰な H M A b C B H - 2 、 - 8 E 、 - 5 、 - 8 C 及び - 1 1 によって全て顕著に阻害された。概して H M A b C B H - 5 が最も高い阻害レベルを示し、C B H - 2 及び C B H - 8 E の阻害が最も低かった。H M A b C B H - 2 、 - 5 、 - 8 C 及び - 1 1 については、対照 H M A b R 0 4 又は H C V H M A b C B H - 7 、C B H - 4 B 及び C B H - 4 G での顕著な阻害が観察されなかった。これに対して、H M A b C B H - 7 はそれ自身により強く阻害され、H M A b C B H - 4 B によっては非常に弱く阻害され、H M A b C B H - 2 、 - 5 、 - 8 C 、 - 8 E 、 - 1 1 、 - 4 G 又は他の対照抗体の存在には影響を受けなかった。同様に H M A b C B H - 4 B は H M A b C B H - 7 、C B H - 4 B 及び C B H - 4 G について中程度の阻害を示した。H M A b C B H - 2 、 - 5 、 - 8 C 、 - 1 1 及び 8 E は互いにきわめて近接したエピトープ群を認識し、H C V E 2 の抗体結合部位であると考えられる。

10

## 【 0 1 4 3 】

一連の阻害実験の結果を図 2 2 に示す。立体構造エピトープを認識し E 2 と C D 8 1 - L E L との結合を阻害することのできる 5 種の抗体 C B H - 2 、 - 8 E 、 - 5 、 - 8 C 及び - 1 1 は全て、顕著に交差競合し、1 つの競合群を形成する(グループ I )。第二の競合群(グループ I I )には H M A b C B H - 7 が含まれる。第三の競合群は H M A b C B H - 4 G 、C B H - 4 B 及び C B H - 4 D により構成され、第四の競合群は抗体群の中で直鎖状エピトープを認識する唯一の抗体、C B H - 1 7 より構成される。グループ I 抗体の結合はグループ I I 抗体による影響を僅かに受け、グループ I I I 又は I V 抗体による影響を全く受けなかった。グループ I I I 抗体による E 2 への結合は他グループ抗体の存在によって影響を受けなかった。グループ I I I 抗体はグループ I 抗体の存在によって影響を受けず強く阻害もされず、C B H - 7 存在下での C B H - 4 G 結合の場合はグループ I I I 抗体の存在によって刺激された。H M A b C B H - 1 7 は他の抗体の結合に影響を与えたかった。従って 1 1 種の H C V H M A b によって、H C V E 2 における 4 個の比較的はっきりした抗体結合部位が規定された。

20

## 【 0 1 4 4 】

現在のところ、効率よく H C V を増殖できる培養系は存在しない。H C V 構造タンパク質が哺乳類由来細胞で発現された場合、タンパク質は通常、細胞内に保持される。しかし近年、いくつかのグループが哺乳類細胞表面での H C V E 2 発現に成功したと報じている。細胞表面で発現される H C V E 2 が、感染性ビリオン表面の H C V E 2 の構造をより忠実に再現するであろうことから、p D i s p l a y ベクターで H C V 1 b E 2 細胞外領域(アミノ酸 3 8 4 ~ 6 6 1 )を発現させた。H C V E 2 配列は、血小板由来成長因子受容体( P D G F R )の経膜領域と枠内で発現された。H C V E 1 タンパク質のカルボキシル末端のシグナル配列を、ネズミ I g K リーダー配列で置き換えた。インフルエンザウイルスヘマグルチニン( H A )及び c - m y c の非常にまっすぐなエピトープを、H C V 配列のそれぞれ直前と直後に位置させた。グリコシル化前の H C V 1 b コンストラクト s f 1 b ( H C V 1 b E 2 のアミノ酸 3 8 4 ~ 6 6 1 を発現する)の予想分子量は 4 2 k d であった。タンパク質発現をウェスタンプロットで解析したところ異なる 2 個の免疫反応性タンパク質が s f 1 b - E 2 細胞系で産生されていた。第一のタンパク質は 6 8 ~ 7 0 k d a 1 に泳動した比較的薄いバンドである。これは G N A レクチンを用いた親和性クロマトグラフィーで効率的に精製された。得られたのはマンノースに富んだ炭水化物鎖を有する、細胞内形状の E 2 であった。第二の免疫反応性タンパク質は 7 0 ~ 9 8 k d の範囲にわたる不均一な染色である。これは G N A レクチンクロマトグラフィーによって効率的に精製されなかった。このタンパク質は複雑な炭水化物鎖を有し細胞表面に存在する種類のうち主要なものであると推定される。D N A 配列決定を行ったところ、フレームシフトやナンセンス突然変異のない、期待通りの挿入物がクローニングされたことが確認された。

30

## 【 0 1 4 5 】

H C V E 2 コンストラクト s f 1 b - E 2 を C H O 細胞に導入し、タンパク質を発現する細胞系を得た。s f 1 b - E 2 発現細胞を H C V H M A b 又は対照抗体と混合し、細胞表面に発現される H C V E 2 への H M A b による結合能を調べた。H A エピトープ

40

50

に対するモノクローナル抗体で染色したところ、95%以上の細胞から強いシグナルが得られた。親CHO細胞からは特異的なシグナルは得られず、sf1b-E2発現細胞系又は対照抗体からは全くシグナルが得られなかった。HCV HMAbCBH-2、CBH-7及びCBH-4Bは全てsf1b-E2細胞系を染色したが、これはHAエピトープについての観察と一致した。これに対してHMAbCBH-11及びCBH-17は、細胞表面に発現されたE2タンパク質と反応性を有するが、他のHMAbと比較して染色は10分の1と低かった(表7)。従って11種のHCV HMAbのうち9種が細胞表面に発現されたE2タンパク質と強く反応し、2種のHMAbが細胞表面に発現されたE2に顕著に低い反応性を示した。

【0146】

10

【表7】

表7: HCV HMAbによる細胞内及び細胞外E2タンパク質への反応性

HMAb	sf1b		pDN-411		pDN-447		pDN-470		PDC-644		PDC-579	
	GNA <sup>1</sup>	フロー <sup>2</sup>	GNA	フロー <sup>3</sup>	GNA	フロー	GNA	フロー	GNA	フロー	GNA	フロー
CBH2	++	338	+		—		—		+		—	
CBH8E	++	408	+		—		—		+		—	
CBH5	++	546	++	17	—	2	—	2	++	28	—	2
CBH8C	++	282	++		—		—		++		—	
CBH11	++	43	++		—		—		++		—	
CBH7	++	303	++	19	++	26	++	14	++	27	—	2
CBH4G	++	175	++		++		++		++		—	
CBH4B	++	241	++	17	++	21	++	9	++	18	—	2
CBH4D	++	173	++		++		+		++		—	
CBH17	++	23	+		++		++		—		—	
HA	++	375	++	42	++	36	++	19	++	75	++	40
c-myc	++	68	++		++		++		++		++	
R04	—	3	—	2	—	2	—	2	—	2	—	2

<sup>1</sup> GNA捕捉アッセイの結果を、++=強い陽性(OD > 0.5)、+=陽性(OD 0.1 ~ 0.5)、-=陰性として記した。

<sup>2</sup> sf1b-E2コンストラクトを恒久的に発現する、表記のHMAbで染色したCHO細胞10ug/mlから得た蛍光の平均。

<sup>3</sup> 表記のHCV E2コンストラクトで一過的にトランスフェクトした、表記のHMAbで染色したHEK-293細胞10ug/mlから得た蛍光の平均。空欄はフローサイトメトリーでHMAbを試験しなかったことを意味する。

20

30

40

【0147】

次に、異なる4つのグループの抗体により認識される結合部位を含むHCV E2領域の位置を調べた。sf1b-E2のアミノ末端とカルボキシル末端から末端欠失を作製した。欠失の一つpDN411ではHCVsf1b-E2の超可変部を取り除いた。他の欠失ではsf1b-E2のアミノ又はカルボキシル末端から大部分を取り除いた。欠失E2をpDisp1ayベクター内に再クローニングし、挿入部の細胞表面発現を可能にした。遺伝子型1bからの配列を発現するHCV E2欠失コンストラクト及びHCV1aのH単離体を作製した(配列番号28~35)(図23)。HEK-293細胞内へトランスフェクトし、HAエピトープに対するモノクローナル抗体を用いた細胞質抽出物のウェスタンプロット解析を行って、E2欠失コンストラクトの発現を確認した(図24)。対照抗体によるCMVタンパク質に対する反応は観察されなかった(データ示さず)。sf1b-E2において見られたように、早く移動した薄いバンドと、ゆっくり移動した不均一な染色の両方が、全てのコンストラクトについて観察された。同様の結果がsf1a-E2及びpDNH-411について得られた(データ示さず)。DNA配列決定を行ったところ、コンストラクトそれぞれがフレームシフト又はナンセンス突然変異のない、期待通りの配列を発現したことが確認された。

【0148】

50

従って、HCV E2欠失コンストラクトをHEK-293細胞内にトランスフェクトし、細胞質抽出物を調製し、GNAレクチンを用いたマイクロタイタープレート上に細胞内形状のE2を捕捉した。次いで、GNAに捕捉されたE2に対するHCV HMAbによる反応性を調べた。予想通り、全てのHCV HMAbがsf1bE2タンパク質と反応し、mockトランスフェクトしたHEK-293細胞の抽出物から捕捉したタンパク質には反応しなかった(図25)。又、全てのHCV HMAbはpDN-411により産生されたE2と強く反応した。これは、HMAbにより認識されたエピトープがHVR-1を含んでいなかったことを示している。次に、同じ抗体群を、(sfH1a-E2)(配列番号29)を有する又は(pDNH-411)HVR1(配列番号30)を有さないH株に由来するHCV E2の細胞外領域について試験した。HCV HMAbCBH-8C及びCBH-11はsfH1a-E2とpDNH-411のいずれも認識しなかった。このことは、これら2個のHMAbにより認識されるエピトープがH株に由来するE2タンパク質において突然変異していたことを示唆している。HMAbCBH-2、CBH-8E及びCBH-5によるH株E2タンパク質への反応性も顕著に低下していた。これらのHMAbはHVR1コンストラクトpDNH-411との反応性を保持しており、これらのHMAbにより認識されるエピトープがHVR1の外側にあることが確認された。他のHCV HMAb及び対照抗体はH株由来E2タンパク質及び遺伝子型1bE2タンパク質に対して同等の反応性を示した。従って、11種のHCV HMAbのうち9種が、sf1b-E2とsfH1a-E2に保存されたエピトープを認識した。

## 【0149】

更にsf1b-E2配列からアミノ酸384-446(pDN-447)(配列番号31)又は384-469(pDN-470)(配列番号32)を欠失させたところ、グループIの全てのHMAb(CBH-2、-8E、-5、-8C及び-11)の反応性が失われた。又、これまでにHCV E2のアミノ酸384-445からなる直鎖状エピトープを認識することが判明しているラットMAb3/11は、pDN-447及びpDN-470に対して反応しなかった。これに対し、グループII、III及びIVのHCV HMAbは両方のコンストラクトpDN-447及びpDN-470に対する反応性を保持した。このことは、これらのグループのHMAbにより認識されるエピトープが、HCV E2のカルボキシル末端領域の中央に位置することを示している。最後に、カルボキシル末端領域に欠失を有するE2タンパク質を、HCV HMAbで評価した。CBH-17を除く全てのHCV HMAbが、HCV E2のアミノ酸384-644(pDC-644)(配列番号33)を発現するE2タンパク質に反応した。これに対して、いずれのHCV HMAbも、HCV E2のアミノ酸384-579(pDC-579)(配列番号34)を発現するコンストラクトに反応しなかった。HA又はc-mycエピトープに対して反応性を保持したように、ラットMAb3/11は両方のカルボキシル末端欠失E2タンパク質に反応性を保持した。従ってアミノ酸644-579の間のHCV E2配列の欠失は、立体構造エピトープを認識する10種全てのHCV HMAbの反応性を失わせるのに充分であった。

## 【0150】

GNAアッセイを行って、細胞内に存在する欠失に対するHCV HMAbの反応性を確認した。同一の欠失コンストラクトE2で細胞表面に発現されたものに対するHCV HMAbの反応性を確認するために、E2欠失コンストラクトを発現する細胞へのHMAbの結合をフローサイトメトリーで評価した。HMAbグループIのCBH-5、HMAbグループIIのCBH-7、HMAbグループIIIのHMAbCBH-4Bでコンストラクトを評価した。対照抗体にはラットMAb3/11及びHAを用いた。E2欠失コンストラクトpDN411及びpDN447を用いた結果を図25に示す。全てのE2欠失についての結果は表7に示す。一過性トランスフェクションによってE2欠失をHEK-293細胞に導入したので、約50-60%の細胞だけがプラスミドを取り込みE2タンパク質を発現した。従って、観察された蛍光の幾何平均(geometric means)は、クローンしたCHO細胞系について得られた結果に比べ、著しく低かった。にもかかわらず、フ

10

20

30

40

50

ローサイトメトリーにより H M A b C B H - 5、C B H - 7 及び C B H - 4 B について得られた結果は G N A 捕捉アッセイの結果と完全に一致した(表 7)。従ってグループ I I 及び I I I の H M A b は H C V E 2 のアミノ酸 4 7 0 ~ 6 4 4 の間に位置するエピトープを認識する。グループ I の H M A b は H C V E 2 のアミノ酸 4 1 1 ~ 6 4 4 の間に位置するエピトープを認識する。

【実施例 9】

【0 1 5 1】

H C V 感染を中和できる高レベルの抗体の、H C V 感染者における希少性患者及び方法

患者。1991 ~ 1999 年の C 型肝炎感染の調査分析又は追跡分析のために核酸検査を受けている個人から評価対象の血清を得た。全ての患者がサンフランシスコ湾地域の診療所で肝炎の治療を受けていた。被験者はポリメラーゼ連鎖反応による H C V R N A について陽性であり、B 型肝炎ウイルス表面抗原の存在については陰性であり、遺伝子型が特定されており、試料を採取した時点では抗ウイルス治療を受けていなかった。年齢、性別、診断の日付、これまでに受けたインターフェロン治療、アラニントランスアミナーゼ( A L T )値、及び可能性のある感染経路を含む、医療記録から人口統計的情報を得た。被験者の殆どについて、H C V 感染の危険因子が少なくとも 1 つあることが報告されていた。全ての情報が全ての被験者から入手できたわけではなかった。肝生検を行った場合には、組織学的活性指数( H A I )で記録した。Innogenetics( Innogenetics、ベルギー国ルヴェン)をマニュアルに従って用い、遺伝子型解析を行った。H C V ウィルス量は、COBAS Amplicor H C V モニターキット( Roche molecular systems、カリフォルニア州アラメダ)を用いて調べた。H C V 陰性対照血清は Stanford Medical School 血液センターへ提供された血液の血漿から得たものであり、標準的な抗体を用いたスクリーニングアッセイで調べたところ、輸血で伝染したウイルスの存在について陰性であった。

【0 1 5 2】

H C V 血清の E 2 抗体スクリーニング。ヒーラ細胞の単層を 8 0 % コンフルエンスまで培養し、H C V E 2 発現ワクシニアウイルスで感染した。感染の 2 4 時間後、細胞を回収し、抽出物を調製した(Hadlockら、2000 参照)。下記の要領で、H C V E 2 の反応性について E L I S A アッセイを行った。5 0 0 n g の精製 Galanthus nivalis レクチンを含む 1 0 0 m l の P B S を用いて、マイクロタイタープレートウェルを 3 7 で 1 時間コートイングした。次いでウェルを T B S で洗浄し、B L O T T O ( T B S に 0 . 1 % Tween-20、2 . 5 % 正常ヤギ血清、2 . 5 % 脱脂粉乳を加えたもの)と共に保温してプロッキングした。プレートを洗浄し、各ウェルに B L O T T O で希釈した H C V E 2 含有抽出物 1 5 m l を入れた。2 5 で 1 . 5 時間保温した後、ウェルを T B S で洗浄し、B L O T T O で様々なレベルに希釈した H C V 感染者又は非感染者の血清を添加した。3 0 分保温した後、ビオチン化した試験 H M A b を添加して最終濃度 2 m g / m l とした。プレートを 2 5 で 1 . 5 時間保温し、ウェルを T B S で 3 回洗浄し、1 0 0 m l のストレプトアビシン - A P 複合体を 2 5 で 1 時間添加した。ウェルを T B S で 4 回洗浄した後、P N P P を入れて保温した。基質の反応を 3 0 分進行させ、次いで 4 0 5 n m におけるウェルの吸光度をマルチウェルプレートリーダーで調べた。

【0 1 5 3】

競合血清の希釈それぞれについて、測定した光学濃度( O D )を、競合抗体を用いなかった場合のウェルについて得られた O D と比較した。希釈に対する結合抗体のパーセントをグラフにし、試験 H M A b 結合を 5 0 % 阻害した血清の希釈を計算した。5 0 % 阻害を達成しなかった血清は力価 4 0 が割り当てられたが、これは試験したうちで最低の希釈よりも低かった。試料血清反応性を評価した被験者には、試験試料中のウイルス量や治療状態は公開しなかった。InStat 及び Prism ソフトウェアパッケージ( Graph Pad Software Inc、カリフォルニア州サンディエゴ)を用いて統計分析を行った。

【0 1 5 4】

結果

10

20

30

40

50

この研究では、CBH-2 及びCBH-7によるHCV E2への結合を阻害することができる抗体の存在について、HCV感染者からの血清を評価した。ヒトモノクローナル抗体CBH-2 及びCBH-7を精製しビオチン化し、遺伝子型のマッチしたE2タンパク質へのCBH-2又はCBH-7による結合を50%阻害した血清希釈率を調べた。HCV陰性者からの血清を用いて、非特異的結合を測定し、臨界値を定めた。1/200以上の希釈率で50%以上のE2結合阻害が得られた場合には、競合抗体の存在についてHCV感染者の血清は陽性であるとみなした(図26及び27)。ウイルスRNAに陽性なHCV感染者から得た74種の血清のうち、35種(47%)がCBH-2結合を阻害する抗体について陽性であり、32種(43%)がCBH-7結合を阻害する抗体について陽性であった(図28及び29)。15種の血清(20%)がCBH-2及びCBH-7の両方を阻害する抗体の存在について陰性であった。19種(27%)がCBH-2又はCBH-7の結合を阻害する抗体について高い力値(>1/1000)を有していた(表8参照)。これらの者のウイルス量中央値は顕著に低かった( $2.4 \times 10^6$ 対 $4.7 \times 10^6$ 、p = 0.035)が、他の点では他のHCV感染者と同じだった。従って最もHCV感染レベルが高い者は、推定中和活性を有する血清抗体レベルが低いということで特徴づけられる。CBH-2又はCBH-7等のHMAbの量が低い個人は、簡単な阻害アッセイによって同定することができる。CBH-2やCBH-7等のHCV中和反応を有するヒトモノクローナル抗体を治療に用いれば、これらの感染者に有用であろう。

## 【0155】

【表8】

表8：HCV血清におけるCBH-7阻害力値の分布

特徴	N/値	CBH2/CBH7阻害力値	
		<1000	>1000
HCV血清	74	55 (73%)	19 (27%)
遺伝子型 1a/1b	36	26 (72%)	10 (28%)
遺伝子型 2a/2b	38	29 (76%)	9 (24%)
男性/女性	47/26	35/19	12/7
年齢	中央値 (N) 範囲	45 (54) 31-70	48 (20) 40-73
HCV+推定期間	中央値 (N) 範囲	5.0 (31) 0.5-28	5.0 (13) 1-32
インターフェロン治療経験	18	14 (78%)	4 (22%)
ウイルス量 (GeV/mL)	中央値 (N) 範囲	$4.7 \times 10^6$ (36) $1.8 \times 10^4 - 2.5 \times 10^7$	$2.4 \times 10^6$ (16) * $1.1 \times 10^5 - 6.7 \times 10^6$
ALT	中央値 (N) 範囲	97 (43) 19-4480	124 (15) 26-301
疾病重度 (HAI)	中央値 (N) 範囲	7.5 (31) 1-11	7.0 (11) 3-13
肝硬変	9	8 (86%)	1 (14%)

\*<1000のグループ、p = 0.035とは有意に異なった。マンホイットニー検定法を用いて有意性を検定した。

## 【実施例10】

10

20

30

40

50

## 【0156】

スクリーニング標的としてのHCV E1及びE2抗原の調製及びHCV E1タンパク質を標的とするヒトモノクローナル抗体の產生

## 材料及び方法

細胞系及び試薬。10%牛胎児血清(GIBCO、ニューヨーク州グランドアイランド)及びL-グルタミン(2 mM)(GIBCO)を追加したダルベッコ改变最小必要培地(DMEM)(GIBCO)で、5%CO<sub>2</sub>にてHEK-293細胞を維持した。10%牛胎児血清及びL-グルタミン(2 mM)を追加したハムのF12培地にCHO-K1細胞を保持した。様々な遺伝子型のHCVを含む臨床血清試料は、Gish博士より入手した。オリゴヌクレオチドプライマーをIDT(アイオワ州コールビル)によって合成した。

10

## 【0157】

抗体及び患者血清。インフルエンザヘマグルチニン(HA)エピトープに対するモノクローナル抗体を、ラット中に產生し、Roche Diagnostics(インディアナ州インディアナポリス)を用いて採取した。HCV E1(HCM-E1)に対するモノクローナル抗体をAustral Biologicals(カリフォルニア州サンラモン)から得た。c-mycエピトープに対するモノクローナル抗体はSanta Cruz Biotechnology(カリフォルニア州サンタクルーズ)より入手した。標準的な抗体を用いたスクリーニングアッセイによりHCVの存在について陽性であると評価された血液ドナーから、8種のHCV血漿試料を得た。Innolipaアッセイ(Innogenetics、ベルギー国ルヴェン)をマニュアルに従って用い、遺伝子型解析を行った。1996~1998年のC型肝炎感染の調査分析又は追跡分析のために核酸検査を受けている個人から16種のHCV1b血漿試料を追加で得た。被験者はポリメラーゼ連鎖反応によるHCV RNAについては陽性であり、B型肝炎ウイルス表面抗原の存在については陰性であり、HCV遺伝子型が特定されており、試料を得た時点では抗ウイルス治療を受けていなかった。Innolipaアッセイ(Innogenetics、ベルギー国ルヴェン)をマニュアルに従って用い、遺伝子型解析を行った。HCV陰性試料はStanford Medical School血液センターへ提供された血液の血漿から得たものであり、標準的な抗体を用いたスクリーニングアッセイで調べたところ、HCV、B型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス及びヒトT細胞白血病ウイルス1型の存在について陰性であった。

20

## 【0158】

HCV RNAの単離、增幅及びプラスミド作製。Pure Script(Gentra systems、ミネソタ州ミネアポリス)をマニュアルに従って用い、HCV RNAをヒト血清(遺伝子型1b)から単離した。ランダムプライマーとRT(Perkin-Elmer、コネチカット州ノーウォーク)をマニュアルに従って42、30分の条件で用いてHCV RNAの逆転写を行った。Bg1II又はPstI制限酵素切断部位に挟まれた適当なオリゴヌクレオチドを用いてcDNAからPCR(pfu、Stratagene)でHCV E1又はE2の断片を増幅した。全てのプラスミドを、標準的手順を用いて作製した(Maniatesら、1982)。親プラスミドpDisp1ay(Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)は、CMVプロモーターにより転写が引き起こされる、ネズミIgカッパ鎖V-J2-Cシグナルペプチドと血小板由来成長因子受容体経膜領域(PDGFR-TM)とをコードする配列と、それらの間の複数のクローニング部位とを含んでいた。Bg1II及びPstIクローニング部位を用いて、ヘマグルチニンA及びmycエピトープをコードする配列と同じ枠内にORFがあるHCV E1及びE2プラスミドを作製した。アミノ酸384~661に相当するE2断片をBg1II及びPstI(New England Nuclear、マサチューセッツ州ボストン)クローン部位に挿入して、HCV E2配列を含むプラスミド#38を作製した。アミノ酸192~383、192~370、192~366、192~352、192~340及び192~321に相当するE1断片をBg1II及びPstIクローニング部位に導入して、様々な長さのHCV E1を含むプラスミド46、115、113、107、102及び98を作製した。ABI PRISM Dye terminators cycle配列決定キット(Beckman center、Stanford)を用いて配列を確認した。

40

## 【0159】

50

HEK293から全RNAを単離したことを除いては、上記と同じ方法を用いてCD81コンストラクトを作製した。XhoI及びEcoRI制限酵素切断部位で挟まれたオリゴヌクレオチドを用いてcDNAからPCR(pfu、Stratagene)でCD81の断片を増幅した。スクレオチド239-950に相当する断片をBglII及びPstI(New England Nuclear、マサチューセッツ州ボストン)クローニングサイト内に挿入して、プラスミドCD81を作製した。

【0160】

トランスフェクション。トランスフェクションに先立って、HEK293細胞を培養し翌日までに細胞密度50-60%コンフルエンスを得た。Perfect Lipids(Invitrogen)(商品名)をマニュアルに従って用い一過性トランスフェクションを行った。6ウェルプレートトランスフェクション用に、5ugのDNAと脂質(Pfx-2)との1:6(w/w)混合物を、血清を含まない媒体に入れたものを用いた。トランスフェクションの4時間後、細胞を完全培地に移し変えた。トランスフェクションの24-48時間後、細胞表面発現についてアッセイを行った。EGFP(Clontech、カリフォルニア州パロアルト)はトランスフェクション効率の内部制御として用いた。

【0161】

安定した細胞系の作製(薬剤選択)。CHO-K1細胞をプレートに入れて培養し、1日後に50-60%コンフルエンスを得た。Perfect Lipid Pfx-8(Invitrogen)(商品名)をマニュアルに従って用い細胞をトランスフェクトした。100mmプレートトランスフェクション用に、血清を含まないハムのF12-K培地中で29ugのDNAをLipid Pfx-8と1:6(w/w)で混合し、細胞に添加した。5時間後、細胞を完全培地に移し変えた。37で5%CO<sub>2</sub>にて一晩保温した後、完全培地に450ug/mlのG418(Gibco BRL、メリーランド州ロックビル)を加えた選択培地で、完全培地を置き換えた。選択培地に2週間置いた後、多数の選択クローンを1つの個体群として回収した。次いで、様々な細胞密度の選択培地を含む100mmプレートに細胞を入れ、単離クローンの成長を促進した。10日後、単離クローンを標準法で24ウェルプレートに移した(Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology 2000, John Wiley&Sons Inc.)。等量の0.2%トリプシン及びウェルセン1:5000(Gibco BRL)で飽和した、無菌の1/8インチクローニングディスク(PGC Scientific、メリーランド州ガーサーズバーグ)を選択したクローン上に置いて転写した。室温で数分置いた後、回収した細胞を含むトリプシン/ウェルセン飽和フィルターそれを、24ウェルプレート上の選択培地を含むウェルに移した。細胞がほぼコンフルエンスに達したとき、細胞を回収し、12ウェルプレートに移し、ほぼコンフルエンスに達したとき再度回収した。回収した細胞をスライド上に置き、IFAを行った。最も強いIFA陽性を示したクローンを増殖し、培養基に保持した。なお、時間の経過と共にタンパク質発現レベルは低下したので、限界希釈によるクローニングを標準法で行った。簡単に述べると、選択培地を含む複数96ウェルの平底プレートに5、2、0.5及び0.1細胞/ウェルにて細胞を培養した。単クローンを含むウェルからの細胞を24ウェルプレートに移し、ほぼコンフルエンスとなるまで培養し、上記したIFA用に回収した。最も強いIFA陽性を示したクローンは下記に記す標準法を用いたフローサイトメトリー解析によっても試験した。すなわち、10ug/mlのCBH-5及びCBH-4G、一次抗体としての2種の抗E2HCVヒトモノクローナル抗体、二次抗体としてのFITCヤギ抗ヒトIgG(H及びL鎖)(Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州ウェストグローブ)で細胞を染色した。最も強い陽性を示したクローンの一つ、38-19/5G3をアッセイ用に増幅した。これは数ヶ月間高いレベルのHCV E2タンパク質を発現し続けた。

【0162】

ウェスタンプロット。HEK-293細胞を6ウェル組織培養プレートで培養し、上記したように様々なHCV E1コンストラクトでトランスフェクトした。24時間後、細胞をPBSで洗浄し、0.5mlの溶解緩衝液(150mM NaCl、20mM Tris pH 7.5、0.5%デオキシコレート、1.0%ノニデット-P40、1mM

10

20

30

40

50

EDTA、0.5 mg / ml Pefabloc (Boehringer Mannheim、インディアナ州インディアナポリス)、2 µg / ml アプロチニン、2 µg / ml 口イペプチド及び1 µg / ml ベプスタチン)に再懸濁した。18,000 × g、4 にて10分間遠心分離して核をペレット状にし、得られた細胞質抽出物を、1対1で2×硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミド電気泳動試料緩衝液 (SDS-SB; 20%グリセロール、10% - メルカプトエタノール、4.8% SDS、0.125 mM Tris pH 6.8)と混合した。あるいは、トランスフェクションの24時間後に細胞をPBSで洗浄し、100 µl のPBSに再懸濁し、100 µl の2×SDS-SBを添加した。タンパク質を95 で5分加熱して変性し、変性抽出物の20 µl アリコートについて12%ポリアクリルアミドゲルで硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) 10を行った。

#### 【0163】

フローサイトメトリー。一過的にトランスフェクトした細胞をウェルセン1:5000 (Gibco BRL)を含むウェル又はフラスコから取り出し、染色溶液 (1% FCS 及び0.1% アジ化ナトリウムを含むPBS)で洗浄し、約10(10<sup>6</sup>)細胞 / ml で再懸濁した。様々な希釈率で試験抗体を含む総量100 µl の染色溶液を、100 µl の染色溶液に再懸濁した10<sup>6</sup>個の生存能力があるトランスフェクト又は対照細胞と混合し、4 で45分保温した。全ての希釈と洗浄は染色溶液で行った。一次試験抗体は抗HA (Boehringer-Manheim)、抗E2 (Austral Biologicals)をいずれも5 µg / ml で用い、更に対照抗体の抗TRNAポリメラーゼ (Novagen、ウィスコンシン州マディソン)及び精製全ラットIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)をいずれも10 µg / ml で用いた。3 ml の染色溶液を更に添加した後、500 × g、室温にて10分間遠心分離して細胞をペレット状にした。ペレットを保存し、染色溶液で1対50に希釈したFITC結合ヤギ抗ヒトIgG 100 µl に再懸濁した。4 で45分間置いた後、3 ml の染色溶液を添加して細胞を上記したようにペレット状にした。第二段階の抗体はR-フィコエリトリン (R-PE)結合抗ラット、抗マウス及び抗ヒトIgG (H+L) (全てJackson ImmunoResearch Laboratoriesより入手)を用いた。標的抗原の表面発現をFACS Calibur フローサイトメーター (Becton-Dickinson、カリフォルニア州サンホゼ)で解析した。次いで細胞を1 ml の定着溶液 (3.8% ホルムアルデヒドを含むPBS)に再懸濁し、細胞表面に結合したHMAbの量をBecton-Dickinson FACS Vantage フローサイトメーター (Becton-Dickinson、カリフォルニア州サンホゼ)で解析した。 20

#### 【0164】

免疫蛍光アッセイ。HEK-293細胞を上記した様々なHCV E1コンストラクトでトランスフェクトし、100%アセトンで室温にて10分間おいてHTC Super Cured 24-スポットスライド (Cell-Line Associates、ニュージャージー州ニューフィールド) 上に固定した。固定細胞を、3~5 µg / ml の精製したモノクローナル抗体又は1~40倍にPBSで希釈したヒト血清と共に37 で30分保温した。次いでスライドをリン酸緩衝食塩水 (PBS) pH 7.4 で5~10分洗浄し、エバンスブルー対比染色 0.001% 溶液及び適当なフルオレセインイソチオシアネート (FITC)結合二次抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories、ペンシルバニア州ウェストグローブ)と共に37 で30分間保温した。Zeiss Universal顕微鏡を用いた蛍光顕微鏡法によって結合抗体を検出した。 30

#### 【0165】

#### 結果

HCV E1及びE1E2組換えタンパク質の作製。HCVの増殖は生体外では確実ではないので、HCV E1及びE2エンベロープタンパク質を発現する哺乳類細胞に対する抗体の結合差異を利用して、ドナー血漿から抗E1抗体をスクリーニングした。通常、哺乳類細胞の発現したHCV E1タンパク質は細胞表面に発現されたときに天然により近い形状をとる。これらの研究で用いられたHCVコンストラクトにより発現されたタンパク質配列を表す、HCVゲノムの構造タンパク質地図を図30に示す。E1及びE2遺 40

伝子のアミノ及びカルボキシル末端欠失変異体群を P C R で合成し、ヘマグルチニン A をコードする配列の 3' 末端と m y c エピトープをコードする配列の 5' 末端に融合した。配列決定により配列を確認した。プラスミドベクター p D i s p l a y (Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)は、ネズミ Ig カッパ鎖 V - J 2 - C シグナルペプチドと血小板由来成長因子受容体経膜領域 (P D G F R - T M )とをコードする配列を含んでいる。各プラスミドを H E K 2 9 3 細胞内に一過的にトランスフェクトした後、コンストラクトの発現をウェスタンプロットで確認し、コンストラクトの細胞表面発現をフローサイトメトリー解析で確認した。

#### 【 0 1 6 6 】

H C V 遺伝子型 1 b 感染者の血漿から H C V 配列を増幅した。E 1 領域の D N A 配列決定(図 3 1)の結果、H C V 1 b (2)の H P C J 4 9 1 単離体のアミノ酸配列と 9 2 % の同一性があり、H C V 1 a H 株について報告されている配列と 8 1 % の同一性があることが分かった(Ogataら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1991)88: 3329-3396)。これについてはこれまでに H C V E 1 / E 2 発現及びプロセッシングの研究が数多くなされている(Cocquerelら、J.Virol.(1999)73: 2641-2649; Deleersnyderら、J.Virol.(1997)71: 697-704; Dubuissonら、J.Virol.(1994)68: 6147-6160; Duvetら、J.Biol.Chem.(1998)273: 32088-32095; Flintら、J.Virol.(1999)73: 6782-6790; Flintら、J.Gen.Virol.(1999)80: 1943-1947; Meunierら、J.Gen.Virol.(1999)80: 887-896)。E 1 配列は、5 個の潜在的 N 結合型グリコシル化部位と、配列 N W S P を有するがグリコシル化しないことが実証されている 6 番目の部位とを含んでいた(Meunierら、J.Gen.Virol.(1999)80: 887-896)。内側の疎水性部位(アミノ酸 2 6 5 - 2 8 7)とカルボキシル末端疎水性部位(アミノ酸 3 5 4 - 3 7 7)は、はっきりと同定することができる。

#### 【 0 1 6 7 】

p D i s p l a y ベクターを用いて、H C V アミノ酸 1 9 2 ~ 3 2 1、1 9 2 ~ 3 4 0、1 9 2 ~ 3 5 2、1 9 2 ~ 3 6 6、1 9 2 ~ 3 7 0 及び 1 9 2 ~ 3 8 3 をそれぞれ発現する、6 種のコンストラクト E 1 - 3 2 1、E 1 - 3 4 0、E 1 - 3 5 2、E 1 - 3 6 6、E 1 - 3 7 0 及び E 1 - 3 8 3 を発現させた。全ての H C V 配列が血小板由来成長因子受容体 (P D G F R、表 9 参照)の経膜領域と枠内で発現された。コンストラクト E 1 - 3 2 1、E 1 - 3 4 0 及び E 1 - 3 5 2 は E 1 のカルボキシル末端疎水性部位を含んでいなかったが、他のコンストラクトはその部位の全て又は部分を含んでいた(表 9)。H C V キャプシドのカルボキシル末端におけるシグナル配列をネズミ Ig K リーダー配列と置き換えた。インフルエンザウイルスヘマグルチニン (H A) 及び c - m y c の非常にまっすぐなエピトープを、H C V 配列のそれぞれ N 末端及び C 末端の直ぐ隣に位置させた。コンストラクトの全てを D N A 配列決定したところ、フレームシフトやナンセンス突然変異のない、期待通りの挿入物が含まれていた。

#### 【 0 1 6 8 】

## 【表9】

表9. HCV E1コンストラクトの特徴

コンストラクト	リーダー <sup>1</sup>			HCV E1 <sup>2</sup>			経膜領域 <sup>3</sup>			タンパク質 <sup>4</sup>			
	IgK	HA	リンカ-	Fus	Pep	Gly(N)	TM(AA)	E1(AA)	リンカ-	myc	PDGFR-TM	全AA	計算 MW
E1 321	21	9	7	+		5	—	130	4	10	53	234	25
E1 340	21	9	7	+		5	—	149	4	10	53	253	28
E1 352	21	9	7	+		5	—	161	4	10	53	265	29
E1 366	21	9	7	+		5	14	175	4	10	53	279	30
E1 370	21	9	7	+		5	18	179	4	10	53	283	31
E1 383	21	9	7	+		5	31	192	4	10	53	296	32

<sup>1</sup>. IgKシグナルペプチド (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD)、ヘマグルチニン (HA) エピトープ (YPYDVPDYA) 及びリンカーアミノ酸の存在及びサイズ (アミノ酸数) を示す。

<sup>2</sup>. 推定 E1 融合ペプチド (Fus Pep) (Flint, M., Thomas, J.M., Maidens, C.M., Shotton, C., Levy, S., Barclay, W. S., 及び McKeating, J.A. (1999). Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J. Virol.* 73: 6782-6790) の存在、N結合グリコシル化部位 (Gly) の数、カルボキシ末端経膜領域のサイズ (—=存在せず、又はアミノ酸の数)、及びコンストラクトの E1 部分の全寸 (アミノ酸の数) を示す。

<sup>3</sup>. リンカーアミノ酸配列、c-myc エピトープ (EQKLISEEDL)、及び PDGFR 経膜領域

(AVGQDTQEIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIIILMLWQQKPR) の存在とサイズ (アミノ酸の数) を示す。

<sup>4</sup>. コンストラクトにより產生されたタンパク質全体の大きさと、非グリコシル化タンパク質の計算上の分子量 (単位 kDa) を示す。

10

20

30

40

50

## 【0169】

## HCV E1 及び E1 E2 組換えタンパク質の特徴

タンパク質発現解析。ヒト胚性腎臓 (HEK-293) 細胞を、HCV E1 pD1sp1ay コンストラクトで又は負の対照として HCV E1 ベクターのみでトランスフェクトした。24 時間後、細胞質抽出物を調製し、等量アリコートを SDS-PAGE によって分別し、ニトロセルロース上にプロッティングし、HCV 1a E1 タンパク質に対する HCM-E1 ネズミモノクローナル抗体 1 μg/ml と共に一晩培養してウエスタンプロット解析を行った (図 32A)。同様の結果が、インフルエンザヘマグルチニン (HA) エピトープに対するラットモノクローナル抗体について得られた。全ての E1 コンストラクトについて、見かけ上 40 ~ 46 kDa の分子量で移動した複数の免疫反応性バンドを得た。ベクターのみでトランスフェクトした細胞には反応性タンパク質が観察されなかった。CMV タンパク質を認識する対照モノクローナル抗体に対して反応性を有するコンストラクトもなかった (データ示さず)。観察されたサイズは、タンパク質のアミノ酸成分から予想されたサイズより約 12 - 15 kDa 大きかった。これはタンパク質が顕著にグリコシル化されていたことを示している。驚くべきことに、コンストラクトのうち最大の E1-383 は約 38 kDa で、見かけ上の分子量が最も小さかった。アミノ酸 384 で終わっている HCV E1 コンストラクトは短いコンストラクトよりも早く移動しうるという報告もある (Fournillier-Jacobら、J.Gen.Virol.(1996)77: 1055-1064)。あるいは、HCV E1 及び E2 が同一直線上に発現された場合、E1 と E2 との間の切断部位、グリシン 383 又はその近辺で、E1-383 コンストラクトが蛋白質分解切斷されうる (Dubuissonら、J.Virol.(1994)68: 6147-6160; Lanfordら、Virology(1993)197: 225-235; Matsuuraら、Virology(1994)205: 141-150; Ralstonら、J.Virol.(1993)67: 6753-6761; Spaeteら、Virology(1992)188: 819-830)。

## 【0170】

HCV E1 コンストラクトのグリコシル化。グリコシル基の存在を確認するために、HEK-293 細胞を E1 コンストラクトでトランスフェクトし、N結合型グリコシル化の開始段階を阻害するツニカマイシン (Kornfield and Kornfield Ann.Rev.Biochem.(1985)54: 631-664) の存在下又は非存在下で 24 時間培養した。HEK-293 細胞を pD1sp1ay ベクター又は表記の HCV E1 コンストラクトでトランスフェクトし、2 μg/ml ツニカマイシンの存在下又は非存在下で培養した。トランスフェクションの 24 時間後、全細胞抽出物を調製し、アリコートを SDS-PAGE によって分別し、ニトロセルロース上にプロッティングした。HA エピトープに対する 1 μg/ml の HArMAb と共に一晩培養して、ウェスタンプロット解析によって HCV E1 タンパク質を検出した (図 33B)。

## 【0171】

ツニカマイシンの非存在下で得たE1コンストラクトの分子量は40~46k<sub>d</sub>であったが、上記のように複数の免疫反応性バンドの発現はHAモノクローナル抗体についてあまり目立たなかった。グリコシル化を阻害した結果、反応性タンパク質E1-321、E1-340、E1-352、E1-366及びE1-370について観察された分子量は25~32k<sub>d</sub>であり、予想された5種の非グリコシル化形状コンストラクトそれぞれについて予想された分子量25、28、29、30及び31k<sub>d</sub>と一致した(表9)。ツニカマイシンの非存在下では、E1-383はあまり発現されず、見かけの分子量は約38k<sub>d</sub>であった。ツニカマイシンの存在下では、コンストラクトE1-383について非グリコシル化タンパク質は検出されなかった。この結果は、非グリコシル化E1-383が不安定であることを示している。

## 【0172】

HCV E1コンストラクトの細胞表面発現。HCV E1及びE1E2コンストラクトが細胞表面上で発現される能力について、FACSscan解析によって調べた。HEK-293細胞をHCV E1又はE1E2コンストラクトでトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、細胞を回収し、様々なモノクローナル抗体と共に保温し、フローサイトメトリーによって細胞表面染色の量を調べた。緑色蛍光タンパク質を発現するプラスミドで細胞を同時トランスフェクションすることによってトランスフェクションの効力をモニターした(データ示さず)。

## 【0173】

図33は、E1欠失コンストラクトでトランスフェクトしたHEK293細胞内で発現されたE1組換えタンパク質のFACSscan解析を示す。x軸は蛍光強度を示し、y軸は蛍光細胞の数を示す。HEK293及びR04(抗CMV)は、特異的一次抗体が存在しない条件で得られた蛍光を示す。右側へのエリアシフトは細胞表面でのタンパク質発現を示す。マーカー(M1)を用いてバックグラウンドを超えたと考えられる蛍光の範囲(0~100%)を示した。組換えのピークはHCM-E1ネズミMAbで検出した。

## 【0174】

図33に示すように、対照抗体R04(抗CMV)についてはバックグラウンドレベルの染色しか観察されなかった。組換えE1タンパク質に対するマウスHCV E1抗体(HCM-E1mMAb)については、コンストラクトE1-321、E1-340、E1-352及びE1-366で高いレベルの細胞表面発現が得られた。中程度の表面発現がコンストラクトE1-370について観察され、E1-383については細胞表面発現が観察されなかった。全てのコンストラクトについて得られたトランスフェクション効率は同様であり(~40%)、従ってE1-370及びE1-383について見られた低いレベルの細胞表面発現はトランスフェクション効率の違いによるものではないことが示唆される。加えて、固定細胞免疫蛍光により測定したコンストラクトの細胞内発現と同等であった(図34)。

## 【0175】

HCV陽性血清におけるE1ヒト抗体に対する免疫反応性。6種のE1コンストラクトのうち5種で有意な細胞表面発現を行った後、遺伝子型1HCV感染者の血清群についてE1コンストラクトへの免疫反応性を評価した(表10)。HEK-293細胞を各E1コンストラクトでトランスフェクトし、IFA用にガラススライド上に固定した。固定細胞をHAモノクローナル抗体と共に保温し、およよそのトランスフェクション効率を調べた。

## 【0176】

図34は、HCV血清を用いたIFAデータを示す。表記のコンストラクトでトランスフェクトしたHEK293細胞又はトランスフェクトしていないHEK293細胞をアセトンでスライド上に固定し、HAに対するラットモノクローナル抗体5mg/ml又は1:50の希釈度のHCV血清で染色した。スライドをエバンスブルー0.001%溶液で対比染色し、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)結合ヤギ-抗ヒト又は抗ラッ

10

20

30

40

50

ト Ig G で結合抗体を検出した。各コンストラクトについて、トランスフェクト細胞の約 50 % が濃く染色された。E 1 コンストラクトの全てについて、HCV 陰性血液ドナーからの血清 8 種ではいずれも染色が見られなかった(表 10)。E 1 コンストラクトでトランスフェクトした細胞を、1 : 40 の希釈度の HCV 1b 感染者血清で調べたところ、中レベルの陽性染色が得られた。血清について得られた染色を図 34 に示す。

#### 【0177】

血清のうち 1 種はトランスフェクトしていない HEK - 293 細胞に対して強い反応性を示した(表 10)。6 種の HCV E 2 コンストラクトのうち 5 種は試験した HCV 1b 血清の 54 ~ 71 % に反応性を有した(図 35 追加)。コンストラクト E 1 - 383 は少なくとも 33 % (24 血清のうち 8) が反応性を示した。E 1 - 383 を除いて、E 1 コンストラクトによる HCV 遺伝子型 1 抗血清に対する反応性は、分泌 E 1 タンパク質を用いた研究で観察された反応性と同様であった(Ganeら、Transplantation. (1999) 67 : 78-84)。E 1 - 352 は、HCV 陽性血清に対して高い反応性(71 %)を示したので、E 1 HMA b スクリーニング用の抗体として選択した。

#### 【0178】

HCV E 1 HMA b スクリーン用の血液ドナーの選択。試験した 17 種の HCV 1b 陽性血清(表 10)のうち、HCV E 1 コンストラクトに対する血清抗体の力価が高かったのはドナー HCV 29 であった。このドナーから末梢血液 B 細胞を単離し、ヒトハイブリドーマを分泌する HCV E 1 抗体の產生に用いた。

#### 【0179】

#### 【表 10】

表 10 HCV 血清による E 1 コンストラクトに対する反応性の概要

血清	N	HEK 293*	E 1 - 321	E 1 - 340	E 1 - 352	E 1 - 366	E 1 - 370	E 1 - 383
HCV 1b	17	1	12	13	14	12	13	8
HCV 1a	7	0	2	2	3	1	2	0
全 HCV	24	1	14	15	17	13	15	8
		(4 %)	(5.8 %)	(6.3 %)	(7.1 %)	(5.4 %)	(6.3 %)	(3.3 %)
HCV 陰性	8	0	0	0	0	0	0	0

数字は陽性血清の数(%)を示す。図 34 の HCV 1b 血清が示したのと同様の明らかな免疫蛍光をトランスフェクト細胞の 5 % 以上が示したと判断された場合、血清を陽性とした。

#### 【0180】

抗原特異的ヒトモノクローナル抗体の產生。E 1 コンストラクトの 2 種で有意な細胞表面発現を行った後、より大きなタンパク質 E 1 - 352 を用いて、HCV 感染者による E 1 への血清反応を評価した。すなわち E 1 - 352 を発現するプラスミドを HEK - 293 細胞に導入し、E 1 - 352 を発現する細胞系を得た。間接蛍光アッセイ(IF A)用に E 1 - 352 発現細胞をガラススライド上に固定した。HCV 遺伝子型 1 について PCR 陽性であると判明した血液ドナーからの血清群に対する、細胞の反応性を調べた。HCV 遺伝子型 1 で感染した血液ドナー 23 種のうち 11 種(48 %)が E 1 - 352 タンパク質に対して反応性を示した。これに対して HCV 陰性血液ドナーは 8 人のうち 0 人、C 型肝炎患者の場合は 9 人に 6 人(67 %)であった。E 1 - 352 に対する最も強い抗体応答を示したドナー(図 34 の HCV 1b の画像)を、ハイブリドーマ単離のための末梢 B 細胞供給源として用いた。このドナーから第二の血液アリコートを得て、血漿及び単核細胞の両方を単離した。このドナーは無症候の 51 歳のヒスパニック系男性で、血液提供するまで HCV 感染について気づかなかった。11 カ月後に再度試料を得て試験したところ、E 1 - 352 に対する強い抗体反応を維持していることが確認された。

#### 【0181】

末梢 B 細胞を単離し、エプスタイン - バーウイルスで活性化し、16 ~ 30 日間培養した。E 1 - 352 発現細胞について IF A を行った結果、417 ウェル中 7 個(~ 2 %)に、E 1 - 352 に対する抗体が含まれることが判明した。7 個の E 1 反応性ウェルから得

10

20

30

40

50

た E B V 活性化細胞 ( $2 \sim 13 \times 10^5$ ) とマウス - ヒトヘテロ骨髄腫融合パートナーである K<sub>6</sub>H<sub>6</sub> / D 5 とを、 E B V 活性化細胞 1 個 : K<sub>6</sub>H<sub>6</sub> / D 5 細胞 2 個の比で、低浸透圧 (125 L 3 又は 180 L 3) 又は等浸透圧 (300 L 3) 融合媒体内で融合した。クローニング後に 1 m l あたり 1 ~ 80 ug ヒト Ig G を分泌した 2 種のハイブリドーマが単離された。IFA で両方の抗体が E 1 - 352 に強い反応性を示した (図 36)。図 36 に示す実験において、同じ親ベクターの E 1 - 3 コンストラクト又は CD 4 コンストラクトでトランسفェクトした HEK 293 細胞を、 1 : 2 の比でアセトンを用いてスライドに固定し、 H - 111、 H - 114、 R 04 (抗 CMV HMAb) 10 ug / m l 又は HA に対するラットモノクローナル抗体 5 ug / m l で染色した。スライドをエバンスブルー 0.001 % 溶液で対比染色しフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 結合ヤギ抗ヒト又は抗ラット Ig G で結合抗体を検出した。ハイブリドーマ H - 111 は Ig G 1 (K 1) を発現したが、 H 鎖の配列決定を行ったところ、 VH 3 - 30 生殖細胞系配列に対して最も大きな相同性を示した。ハイブリドーマ 114 (H - 114) は Ig G 1 (K 2) を発現し、 H 鎖は VH 1 - 3 生殖細胞系配列に最も大きな相同性を示した。

10

20

30

## 【0182】

E 1 HMAb による HCV エンベロープタンパク質への反応性。固定細胞についての IFA の結果を確認するために、ウェスタンプロット及び免疫沈降アッセイを用いて、 HMAb H - 111 及び H - 114 による様々な E 1 タンパク質 / E 1 - 352 に対する反応性を調べた (図 37)。HEK - 293 細胞を mock トランسفェクト (0) あるいは表記した HCV E 1 コンストラクト又は pD 1 s p 1 a y E 2 (任意) でトランسفェクトし、 24 時間後に細胞質抽出物を調製した。材料と方法の項で述べたように、 5 ug の H - 111 又は H - 114 HMAb で抽出物のアリコートを免疫沈降した。次いで結合タンパク質を SDS 試料緩衝液で溶出し、 SDS - PAGE 及びウェスタンプロットを行った。プロッティングした E 1 タンパク質を 2 ug / m l の ECM E 1 ネズミ抗体で検出した。ウェスタンプロットとして、 HEK - 293 細胞を表記の HCV E 1 コンストラクトでトランسفェクトしたか、あるいは mock トランسفェクトした。トランسفェクションの 24 時間後、細胞質抽出物を調製し、等量アリコートを SDS - PAGE によって分別し、ニトロセルロース上にプロッティングした。5 ug / m l の HMAb H - 111 又は H - 114 と一緒に培養して、 HCV E 1 タンパク質を検出した。

30

40

50

## 【0183】

図 37 に示すように、 HMAb H - 111 はウェスタンプロット及び免疫沈降の両方で E 1 - 352、 E 1 - 340 及び E 1 - 321 に対して強い反応性を見せた。 HMAb H - 114 は免疫沈降で E 1 タンパク質に強く反応したがウェスタンプロットでは弱い陽性であった。アイソタイプ対照 HMAb は、ウェスタンプロット又は免疫沈降で E 1 コンストラクトのいずれにも反応しなかった。従って HMAb H - 111 は、 E 1 - 321 内の変性に反応しないエピトープを認識した。 HMAb H - 114 は、部分的に変性したように見える E 1 - 321 内のエピトープを認識した。

40

50

## 【0184】

細胞表面に高レベルで発現する E 1 コンストラクトを用いて、 E 1 HMAb を単離した。しかし IFA を用いて HMAb を同定したところ、 HMAb が細胞内形状の E 1 - 352 タンパク質に特異的であったという可能性が出てきた。 HCV HMAb が細胞表面の E 1 - 352 も認識することを示すために、 E 1 - 352 を発現する HEK - 293 細胞に対する E 1 HMAb の反応性を、フローサイトメトリーにより調べた。図 38 は、 HEK 293 細胞内に一過性発現された E 1 - 1 組換えタンパク質に対する HCV HMAb H - 111 及び H - 114 の FACS Scan 解析を示す。x 軸は蛍光強度を示し、 y 軸は蛍光細胞の数を示す。 R 04 (抗 CMV ) は、特異的一次抗体が存在しない条件で得られた蛍光を示す。右側へのエリアシフトは抗体結合を意味し、抗 HA は融合蛋白質としての HA タグ発現を表す。マーカー (M 1 ) を用いてバックグラウンドを超えたと考えられる蛍光の範囲 (0 - 100 %) を示した。図 38 のデータは、 H - 111 及び H - 114 の両方が、細胞表面発現 E 1 - 352 を認識したことを示している。

## 【0185】

多重遺伝子型から得たHCVエンベロープタンパク質単離体に対するHCV HMAbの反応性。HMAbエピトープの保存を調べるために、様々なHCV遺伝子型から単離したHCV RNAを逆転写し、アミノ酸192~352領域を増幅し、pDispalayベクター内にクローニングした。組換えプラスミドをHEK-293細胞内にトランスフェクトし、コンストラクトに対するHMAbの反応性をIFAで評価しウェスタンプロット解析で確認した。表記のHCV遺伝子型からクローニングしたE1遺伝子を含むHCV E1コンストラクトでHEK293細胞をトランスフェクトし、免疫蛍光アッセイ(IFA)で解析した。トランスフェクションの24時間後に調製した、トランスフェクト細胞のタンパク質抽出物をアセトンでスライドに固定し、HAに対するラットモノクローナル抗体2ug/ml、HMAb5ug/ml、或いはCMVに対するヒトモノクローナル抗体5ug/mlで染色した。スライドをエバンスブルー0.001%溶液で対比染色しフルオレセインイソチオシアネート(FITC)結合ヤギ抗ヒト又は抗ラットIgGで結合抗体を検出した。E1タンパク質群全てについて得られた結果を表11及び表12に示す。

10

20

30

## 【0186】

## 【表11】

表11 多重遺伝子型からのHCV E1タンパク質単離体に対するHMAbの反応性の概要

HCV E1 タンパク質	抗HA (正の対照)	HC-111 (HMAb)	HC-114 (HMAb)	抗CMV (負の対照)
HCV1b	+++	+++	+++	-
HCV1a	+++	+++	-	-
HCV2b	+++	+++	-	-
HCV2a	+++	-	-	-
HCV3a	+++	++	-	-
HCV4	+++	-	-	-

## 【0187】

【表12】

表12 遺伝子型研究に用いたHCV陽性血清

遺伝子型	血清	
HCV 1 b	HC-29	
	HC-03	
HCV 1 a	HC-06	
	HC-16	
	V5704	10
HCV 2 b	V6674	
	V3551	
	189	
	V3402	
HCV 2 a	V2238	
	S0208	
	S0223	
	2180	20
	1966	
HCV-3 a	2255	
	S0126	
	S0236	
HCV-4 a	S0159	
	S0652	

30

## 【0188】

トランスフェクトしたタンパク質の存在を H A M A b で確認した。20~40%の細胞が H A M A b について陽性であった。両方の H M A b が、B 細胞ドナー (H C - 2 9) から単離された E 1 タンパク質に対して反応性を有した。H M A b H - 1 1 1 は様々な感染者の E 1 タンパク質 (遺伝子型 1 a、1 b、2 b 及び 3 a 全てのタンパク質を含む) 19 種のうち 17 種に対して反応性を有していた。H M A b H - 1 1 1 は、5人の感染者から単離された遺伝子型 2 a の E 1 タンパク質 10 種とは反応性を示さなかった。従って H M A b H - 1 1 1 により認識されるエピトープは、遺伝子型 2 a において突然変異したと考えられる。H M A b H - 1 1 1 は遺伝子型 4 の E 1 タンパク質に対しても反応性を示さなかった。E 1 - 3 5 2 及び B 細胞ドナー (H C - 2 9) に対して単離されたものを除いて、H M A b H - 1 1 4 はどの E 1 タンパク質とも反応しなかった。従って H M A b H - 1 1 4 は H C V 1 b 特異的エピトープを発現する。

40

## 【0189】

E 1 H M A b のエピトープ位置決定。一連の欠失を E 1 - 3 5 2 のカルボキシル及びアミノ末端に導入して 2 個の H M A b に認識されるエピトープの位置を調べた。E 1 欠失コンストラクトを H E K - 2 9 3 細胞内にトランスフェクトし、タンパク質を含む抽出物を、H M A b H - 1 1 1 及び H - 1 1 4 を用いるウェスタンプロット及び I F A に供した。H A M A b を用いてタンパク質の発現を確認した。得られた結果の概要を図 3 9 に示す。H M A b H - 1 1 1 は、E 1 - 3 5 2 のアミノ末端の 20 アミノ酸に限られたコンストラクトを含むカルボキシル末端欠失コンストラクトの全てに反応性を示した。これに対し

50

、H M A b H - 1 1 4 は E 1 - 3 2 1 及びアミノ酸 1 9 2 ~ 3 1 3 を発現するコンストラクトに対して反応性を示したが、他のいずれのカルボキシル末端コンストラクトに対しても反応性を示さなかった。E 1 - 3 5 2 のアミノ末端からの僅か 5 アミノ酸が欠失しただけで、H M A b H - 1 1 1 の反応性が失われた。従って H M A b H - 1 1 1 のエピトープは、E 1 - 3 5 2 のアミノ末端に隣接した位置にある。これに対して、H M A b H - 1 1 4 はアミノ酸 1 9 2 ~ 3 1 3 、1 9 9 ~ 3 2 1 及び 2 0 6 ~ 3 2 1 を発現するコンストラクトに反応したが、アミノ酸 2 1 2 ~ 3 1 3 、2 4 4 ~ 3 1 3 及び 2 6 2 ~ 3 1 3 を発現するコンストラクトには反応しなかった。従って H M A b H - 1 1 4 のエピトープは E 1 - 3 5 2 のアミノ酸 2 0 6 ~ 3 1 3 の間に位置するが、それ以上は判明しなかった。

## 【0190】

H M A b H - 1 1 1 エピトープのペプチド競合解析。H M A b H - 1 1 1 の結合した H C V E 1 エピトープ(アミノ酸 1 9 2 - 2 1 1)は 2 個のグリコシル化配列を含んでいる。このエピトープは、E 1 アミノ末端アミノ酸配列に比較的広い多様性があるにもかかわらず、多くの H C V サブタイプにも保存されている。このことから、E 1 アミノ末端のグリコシル基が、H M A b H - 1 1 1 によって認識されるエピトープに関係しているという可能性がある。この可能性を調べるために H C V E 1 のアミノ末端の 7 ~ 1 4 アミノ酸を含む合成ペプチドを作製した(表 1 3)。

## 【0191】

## 【表 1 3】

表 1 3. エピトープ結合競合用の合成ペプチドのアミノ酸配列

ペプチドコード	ペプチド	アミノ酸配列
H-111-7	192-198	YEVRNVS
H-111-14	192-205	YEVRNVSGVYHVTN
H-114-12	304-315	CNCASIYPGHHVYG
H-114-6N	206-211	DCSNSS

## 【0192】

合成ペプチドはグリコシル化されないので、H M A b 結合についての競合がうまくいったことは、グリコシル化が抗体結合には必要ではなかったことを示している。トランスフェクト H E K - 2 9 3 細胞から產生した E 1 - 3 5 2 を、G N A レクチンを用いたマイクロタイタープレート上に捕捉した。H M A b H - 1 1 1 の結合を、様々な量の様々な合成ペプチドの存在下で評価した。H E K - 2 9 3 細胞を E 1 - 3 5 2 でトランスフェクトし、5 0 0 n g の G N A レクチンでコーティングしたマイクロタイタープレート上に E 1 糖タンパク質を捕捉した。ウェルを洗浄しプロッキングし、結合タンパク質を様々な量( x 軸)の対照合成ペプチド(  $\mu$  対照 H T L V ペプチド； E 1 ペプチド Y E V R N V S G Y H V T N )の存在下、1 0 u g / m l の H M A b H - 1 1 1 と保温した。 y 軸は複製ウェルから得た平均 O D 値を示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

## 【0193】

ペプチドの非存在下で、H M A b H - 1 1 1 は G N A 捕捉 E 1 - 3 2 1 に強い反応性を示した(図 4 0)。H T L V - 1 g p 4 6 由来の関係のないペプチドを添加したところ、H M A b H - 1 1 1 による E 1 - 3 2 1 に対する結合に影響はなかった。7 アミノ酸ペプチドも、H M A b H - 1 1 1 の結合に影響を与えたかった。これに対して、1 4 アミノ酸ペプチドを添加した場合、H M A b H - 1 1 1 による E 1 - 3 2 1 への結合は投与量に応じて阻害された。従って、H M A b H - 1 1 1 エピトープが認識されるのにグリコシル化は不需要であった。

## 【0194】

アラニンスキャニングによる H M A b H - 1 1 1 のエピトープ地図作製。E 1 糖タンパク質のアミノ酸 1 9 2 - 2 0 4 にわたる 1 4 量体ペプチド上の、H M A b H - 1 1 1 エピ

トープの細かい地図を得るために、この14量体競合ペプチドの11個の位置で保存的(アラニン)アミノ酸置換を導入した(位置192-Tyr、193-Glu、194-Val、195-Arg、196-Asn、197-Val、198-Ser、199-Gly、200-Val、201-Tyr及び202-His)(表14)。

## 【0195】

## 【表14】

表14. エピトープ地図作製

Y E V R N V S G V Y H V T N

コンストラクト	突然変異	IFAの評価		
		HA	H-111	R04
107	E1-352WT	+	+	-
783	E1-192Y/A	+	+	-
784	E1-192Y/A	+	+	-
787	E1-193E/A	+	+	-
789	E1-193E/A	+	+	--
792	E1-194V/A	+	弱+	-
793	E1-194V/A	+	弱+	-
796	E1-195R/A	+	+-	-
797	E1-195R/A	+	+-	-
798	E1-195R/A	+	+-	-
799	E1-195R/A	+	+-	-
800	E1-196N/A	+	-	--
801	E1-196N/A	+	-	--
802	E1-196N/A	+	-	--
803	E1-196N/A	+	-	--
804	E1-197V/A	+	+	-
805	E1-197V/A	+	+	-
808	E1-198S/A	+	弱 < 5 %	-
810	E1-198S/A	+	弱 < 5 %	-
811	E1-198S/A	+	弱 < 5 %	-
812	E1-198S/A	+	弱 < 5 %	-
813	E1-199G/A	+	弱 < 5 %	-
814	E1-199G/A	+	弱 < 5 %	-
815	E1-199G/A	+	弱 < 5 %	-
816	E1-199G/A	+	弱 < 5 %	-
886	E1-200V/A	+	+	-
887	E1-200V/A	+	+	-
890	E1-201Y/A	+	-	-
891	E1-201Y/A	+	-	-
894	E1-202H/A	+	+	-
895	E1-202H/A	+	+	-

## 【0196】

E1糖タンパク質上のH-111エピトープのアミノ酸配列を表14の上部に1文字コードで記した。4番目のR、5番目のN及び10番目のYは必須アミノ酸であり、3、7、8番目のVSGはHMAbH-111によるE1糖タンパク質への結合に重要なアミノ酸である。突然変異部位の数字は各コンストラクトにより発現されたアミノ酸を示し、全HCVポリプロテインを基準にしている。IFAにおいて、HAMMAB(正の対照)、HMAbR04(負の対照)又はH-111HMAbによる各タンパク質への反応性を、陽性(+)又は陰性(-)で表した。突然変異E1をCHO細胞で発現し、HMAbH-111及びmMABHAを正の対照として、又、抗CMVヒトモノクローナルである抗体R04を負の対照として用いて、IFA(表14)とウェスタンプロット(図41)の両方で解析した。全ての突然変異体は、野生型E1-352糖タンパク質とほぼ同じ分子量にて、いずれもほぼ等しい量でCHO細胞において発現された(図参照)。195-Arg、196-Asn及び201-Tyrにおけるアミノ酸置換はHMAbH-111によるE1糖タンパ

10

20

30

40

50

ク質への結合活性に顕著に影響を与える、194-Va1、198-Ser及び199-Glyの置換はHMAbH-111によるE1糖タンパク質への結合活性を顕著に弱めたが、完全に結合活性を失わせたわけではなかった。このことは14量体競合ペプチドの中央領域が、抗体とHCV-E1エンベロープタンパク質との相互作用に重要であることを示している。アミノ酸192-Tyr、193-Glu、197-Va1、200-Va1及び202-Hisに対応する置換は、HMAbH-111によるE1糖タンパク質への結合活性に影響を与えたかった。これらの結果は、HMAbH-111のエピトープは少なくとも5個のアミノ酸残基194-Va1、195-Arg、196-Asn、198-Ser、199-Gly及び201-Tyrから構成され、アミノ酸194~204の中に位置することを示唆している。

10

## 【0197】

HMAbH-114エピトープのペプチド競合解析。2個の不連続HMAbH-114エピトープ(C末端のCSIYPGHV及びN末端のDCSNSS)は、上記した欠失地図により、1個のグリコシル化配列(209-NSS)と、約100アミノ酸離れている2個のシステイン残基(Cys-306及びCys-207)から構成されると規定された。このことから、E1アミノ末端のグリコシル基がHMAbH-114により認識されるエピトープに関係している及び/又は分子内ジスルフィド結合形成がHMAbH-114のエピトープ認識に必要である、という可能性が考えられる。これらの可能性を調べるために、HCV-E1のアミノ末端の6又は12アミノ酸を含む2種の合成ペプチドを作製した(表13)。合成ペプチドはグリコシル化されないので、HMAb結合について競合があったことは、グリコシル化が抗体結合には必要ではなかったことを示している。

20

## 【0198】

末端を切断したE1-352及びE1糖タンパク質。トランスフェクトしたHEK-293細胞で產生した糖タンパク質を、500ngのGNAレクチンを用いてマイクロタイプレート上に捕捉した。様々な濃度の2種の合成ペプチドの存在下、HMAbH-114の結合を評価した。具体的には、ウェルを洗浄し、ブロッキングし、様々な量の対照合成ペプチド(x軸)の存在下、結合タンパク質を10ug/mlのHMAbH-114と共に保温した。(E1糖タンパク質のアミノ酸304~315のC末端領域に相当するペプチドH-114-12-C、及びE1糖タンパク質のアミノ酸206~211のN末端領域に相当するペプチドH-114-14-N)。これら2種の合成ペプチドを添加したところ、末端切断E1-352タンパク質に対するHMAbH-114の結合活性に明らかな影響はなく(図42)、HTLV-1gp46の免疫優性領域に相当する対照ペプチドに対しても影響がなかった。これらのデータは以下のことを示している。(i)2個の不連続のHMAbH-114エピトープは認識されるのにグリコシル化を必要とする；(ii)2個の不連続のHMAbH-114エピトープは抗体結合部位ではなく、結合部位はアミノ酸216~303にわたる2個のエピトープの間にある；そして(iii)欠失コンストラクトにより規定された108個のアミノ酸配列は、HMAbH-114により認識されるエピトープの提示に必要な折り畳み領域やジスルフィド結合といった構造上の特徴を有する。

30

## 【0199】

HMAbH-114エピトープのアミノ及びカルボキシル末端領域のセリン又はアラニンスキン。上記の可能性を区別するために、一連のセリン又はアラニン置換をアミノ酸206-211及び306-313に導入した。改変E1をHEK-293細胞内にトランスフェクトし、GNAレクチンでE1タンパク質をマイクロタイプレートに捕捉した。HMAbH-114による結合E1タンパク質に対する反応性を、アミノ末端のアミノ酸206~211又はカルボキシル末端のアミノ酸306~313の突然変異解析によって調べた(図43)。図43に示す置換体と共にE1タンパク質でHEK-293細胞をトランスフェクトし、500ngのGNAレクチンでコーティングしたマイクロタイプレート上にE1糖タンパク質を捕捉した。ウェルを洗浄しブロッキングし、結合タンパク質を5ug/mlのHAMMAb(黒棒線)又は10ug/mlのHMAbH-114と

40

50

共に保温した。結合抗体を、適當なアルカリホスファターゼ結合二次抗体及びPNPP基質で検出した。x軸は、野生型E1配列について得られたシグナルのパーセントとして表した、各突然変異体について得られたシグナルを示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。点突然変異に由来するタンパク質発現の多様性を調節するために、HMAbとのコンストラクトの反応性も調べた。得られたシグナルを非改変タンパク質E1-321のシグナルと比較した。

#### 【0200】

図43に示すように、アミノ末端配列DCSNSSのシステイン残基の置換は、HMAbH-114の結合を特異的に阻害したが、HA抗体についてはしなかった。これに対して、グリコシル化部位NSSのアスパラギン又はセリン残基の突然変異を行った結果、HA及びH-114抗体の両方においてシグナルの同等な低下が見られた。従って、アミノ末端グリコシル化部位はおそらくHMAbH-114エピトープに関与していない。同様に、配列CSIYPGHVについて、システイン残基の突然変異も、HAの結合に影響を与えることなく、HMAbH-114の結合を阻害した。配列CSISPGHVがHA結合を刺激する理由はわからなかった。しかしHMAbH-114の結合は影響を受けておらず、Y-309がH-114エピトープの部分ではないことを示唆している。

#### 【0201】

E1に対するHMAbH-114結合のジスルフィド依存性。HMAbH-114エピトープ保持に2個のシステインが必要であるということは、ジスルフィド結合形成がエピトープ提示に必要だということを示唆している。これらの条件下では、ジスルフィド結合がHMAbH-114結合を阻害するはずである。HMAbH-114による免疫沈降の前に、E1-321の細胞溶解物をDTTで予め処理することで上記を確認した(図44)。HEK-293細胞をE1-321でトランスフェクトし、トランスフェクションの24時間後に細胞質抽出物を調製した。抽出物のアリコートは、未処理のままにしたか、或いは5mMジチオスレイトールと共に56度15分間保温した。抽出物を氷冷BLOTTOで1:5に希釈し、様々な抗体(レーン上に表記)を用いた免疫沈降にかけた。次いで結合タンパク質をSDS試料緩衝液で溶出し、SDS-PAGE及びウェスタンプロットに供した。

#### 【0202】

E1-321の沈降は対照HMAbでは観察されなかった。DTT前処理を行わない場合、HMAbH-111及びH-114の両方が、E1に対するモノクローナル抗体に反応する46kdaのタンパク質を沈降した。56度5mMDTTにて予処理した後は、E1へのHMAbH-111の結合は影響を受けなかった。これに対して、HMAbH-114の結合は完全に阻害された。従ってHMAbH-114に認識されるエピトープは、C-207及びC-306を含むジスルフィド結合の形成に依存する。

#### 【0203】

内側E1システイン残基のアラニンスキャニング。E1糖タンパク質は、細胞内ジスルフィド結合を形成できる8個のシステイン残基を207、226、229、238、272、281、304及び306の位置に含んでいる。AをCに置換したE1突然変異体6種の発現を解析し(図45)、207-cys及び306-cys内側のシステイン残基が、HMAbH-114により認識されるエピトープの構造形成に関与するかどうかを調べた。まず対応するプラスミドで一過性トランスフェクトした後にE1突然変異体をCHO細胞内で発現し、IFAによって解析した。図45に示すように、全ての突然変異タンパク質が発現され正の対照としての標識エピトープを標的とするマウスマウントによって認識された。全ての突然変異タンパク質は、上記したように、アミノ酸192~211の間に位置するエピトープを標的とするHMAbH-111によって認識された。E1C/A突然変異体のうち207C、229C、238C及び304CはHMAbH-114によるE1突然変異タンパク質への結合活性に影響を与えたが、一方272C及び281Cは、HMAbH-114によるE1突然変異タンパク質への結合活性に影響を与えた。

#### 【0204】

10

20

30

40

50

HCV E1のHMAbH-114結合部位におけるアラニン突然変異の免疫沈降解析を行った。HEK-293細胞を突然変異体でトランスフェクトし、その24時間後に細胞質抽出物を調製した。抽出物を、HMAbH-114を用いた免疫沈降に供した。結合タンパク質をSDSサンプル緩衝液で溶出し、SDS-PAGE及びウェスタンプロットを行った。プロッティングしたE1タンパク質を2μg/mlのECM E1ネズミ抗体で検出した。図46に示すように、各レーン上の数字は、アラニンで置換したE1糖タンパク質上のシステイン残基の位置を示す。分子量標準の移動は左側に示す。タンパク質発現は、ウェスタンプロットによるHA標識化発現で評価した。これらの免疫沈降研究の結果、突然変異体207C、229C、238C及び304Cは明らかにH-114により検出されなかつたが、272C及び281CはHMAbH-114によるE1突然変異タンパク質に対する結合活性に影響を与えたことが確認された(図46)。

10

20

30

40

50

### 【実施例11】

#### 【0205】

##### 抗体産生

以下の実施例はHCV HMAbを産生する様々な方法を提供する。

プラスミドベクターからの抗体の発現及び精製。全抗体分子をコードする遺伝子をRT-PCRにより親ハイブリドーマから増幅し、構成的に又は誘導的に真核細胞系内で抗体を発現させることのできる異種発現カセット内にクローニングすることができる。例えば、pCDNA3.1Zeo、pIND(Sp1)又はpREP8(いずれもカリフォルニア州カールスバッドInvitrogen社)及びそれらの同等物といった、発現プラスミド中で抗体遺伝子を発現させることができる。あるいはMLVから作られたベクター、ワクシニアウイルスから作られたベクター又はアデノウイルスから作られたベクターといった、ウイルス又はレトロウイルスベクターを介して抗体遺伝子を発現させることもできる。同様に、抗体遺伝子はバキュロウイルスベクター等の昆虫ウイルスベクターにおいて発現することができる。一連のpCOMBベクター等の他のベクターを用いても、M13ファージ又はバクテリア表面における抗体H及びL鎖対又は単鎖抗体の発現が可能である。

#### 【0206】

発現された抗体は、例えばタンパク質-A又はタンパク質-Gセファロースを用いて精製できる。例えばビオチン-C11-ヒドロキシスクシンイミドエステルを用いたビオチン化；臭化シアンを介した様々なビーズ(例えばセファロース、アガロース、磁性、ポリスチレン)とのカップリング；或いは、例えばリジン又は他の基本的残基の改変による又は遊離スルフヒドリル基に特異的な試薬の使用を通じた、抗体の有用な化学基への架橋といった方法を用いて、精製抗体を化学的に又は酵素を用いて改変できる。

#### 【0207】

##### 他の態様

当業者は、これまでの記述が、単に本発明の特定の好ましい態様に過ぎないということを容易に理解できるであろう。上記した手順及び組成物の様々な改変が、請求の範囲に記す本発明の精神及び範囲から離れることなく達成可能である。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【0208】

【図1】本明細書に記載の幾つかのワクシニアウイルスコンストラクトによる、HCV E2タンパク質の発現を示すウェスタンプロットである。野生型ワクシニアウイルスに感染させ次いでpVOTE(wt)又は遺伝子型1a又は2bのHCV E2を発現する組換えpVOTE(Q1a又はQ2b)でトランスフェクトしたCV1細胞から、細胞質抽出物を得た。誘導物質IPTGの存在下(+)又は非存在下(-)で細胞を24時間培養した。2×10<sup>5</sup>個の細胞に相当する抽出物をSDS-PAGEにより分別し、ニトロセルロース上にプロッティングした。EC-L検出システム(Amersham)を用い、腹水で1/500希釈したmMAb E2Gと共に培養して、HCV E2タンパク質を検出した。分子量移動の標準を右に示した。

【図2】(配列番号9~12)は、HCV E2ワクシニアウイルスの中央領域か

ら増幅した配列を示す。適當なHCV遺伝子型の代表的配列と比較した、HCV E2ワクシニアコンストラクトQ1a、Q1b、Q2a及びQ2bの中央断片配列を示す。各遺伝子型の代表的配列の登録番号は下記の通りである。HCV1a=M62321、HCV1b=D10750、HCV2a=D00944、HCV2b=D10988。PHYLI PパッケージのCLUSTALV及びDNAPARSプログラムを用いて系統発生解析を行った。

【図3A】(配列番号1~8)は、最小の変化関係を示す(most parsimonious)樹形図を用いた、下記HCVの配列比較である。1a、Q1a-FR、1b、Q1b-FR、2a、Q2a-FR、2b、Q2b-FR。

【図3B】(配列番号1~8)は、最小の変化関係を示す(most parsimonious)樹形図を用いた、下記HCVの配列比較である。1a、Q1a-FR、1b、Q1b-FR、2a、Q2a-FR、2b、Q2b-FR。

【図4A】様々な遺伝子型のHCV E2タンパク質に対するHCV血清の反応性を示すグラフである。ワクシニアウイルスQ1a、Q1b、Q2a、Q2b又は非組換えワクシニアウイルスVWAに感染させた $6 \times 10^5$ 個のヒーラ細胞により発現されたHCV E2タンパク質を、500ngのGNAレクチンでコーティングしたウェルに捕捉した。ウェルを洗浄し、ブロッキングし、次いで結合したタンパク質を、遺伝子型の特定されたHCV血清又はHCV陰性血清(グラフ上部に記載)の様々な希釈(×軸)と共に保温した。数値は複製ウェルの平均吸光度である。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図4B】様々な遺伝子型のHCV E2タンパク質に対するHCV血清の反応性を示すグラフである。ワクシニアウイルスQ1a、Q1b、Q2a、Q2b又は非組換えワクシニアウイルスVWAに感染させた $6 \times 10^5$ 個のヒーラ細胞により発現されたHCV E2タンパク質を、500ngのGNAレクチンでコーティングしたウェルに捕捉した。ウェルを洗浄し、ブロッキングし、次いで結合したタンパク質を、遺伝子型の特定されたHCV血清又はHCV陰性血清(グラフ上部に記載)の様々な希釈(×軸)と共に保温した。数値は複製ウェルの平均吸光度である。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図5】HCV遺伝子型2b感染者から得た血清の、多重遺伝子型のHCV E2タンパク質に対する反応性を示す棒グラフである。HCV遺伝子型2b感染者から得た血清12種(×軸)を、遺伝子型1a(濃青の棒線)、1b(マゼンタの棒線)、2a(黄色の棒線)及び2b(薄青の棒線)のHCV E2タンパク質に対して滴定した。平均比吸光度(VWA抽出物について得られた平均比吸光度から、HCV E2を含む抽出物について得られた平均吸光度を引いたもの)が0.5となった血清の希釈をy軸に示す。この値は図4に示した滴定曲線データと類似のものから計算した。

【図6】図7、8及び9で説明する実験に用いた、HCV E2エンベロープタンパク質の立体構造エピトープを認識する抗体を評価する直接結合アッセイの概要を示す。GNAレクチンで固体表面をコーティングし、E2含有タンパク質抽出物を添加しレクチンで捕捉する。捕捉したE2に試験抗体を結合させ、過剰な未結合抗体を除去し、結合抗体を標識化二次抗体で検出する。

【図7】HCV HMAbによる、レクチンに捕捉されたHCV E2に対する反応性の棒グラフである。野生型ワクシニアウイルス(VWAと表記した棒線)又はHCV1a E2を発現するワクシニアウイルス(HCV1a)(HCVと表記した棒線)に感染させた $6 \times 10^5$ 個の細胞の細胞質抽出物から得たタンパク質を、500ngのGalanthus nivalis(GNA)又はTririticum vulgaris(WGA)でコーティングしたマイクロタイプレートに入れた。捕捉したタンパク質を表記のHMAb(×軸)5μg/mlと保温した。R04はアイソタイプが一致した対照である。抗ヒト抗体-アルカリホスファターゼ及び適當な基質で結合HMAbを検出した。棒線は複製ウェルの平均OD値を示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図8A】様々なHCV遺伝子型のE2タンパク質に対するHCV抗体反応性を示すグラフである。ワクシニアウイルスQ1a、Q1b、Q2a、Q2bに感染させた $6 \times 10^5$ 個のヒーラ細胞によって発現されたHCV E2タンパク質を、500ngのGNAレク

10

20

30

40

50

チンでコーティングしたウェル上に捕捉した。ウェルを洗浄しブロッキングし、表記した HCV HMAb (図 9 A - 9 J それぞれに記した HMAb) 及び CMV タンパク質に対する対照 HMAb (R04) (図 9 K) と共に捕捉タンパク質を保温した (Wardら、1995, Proc Natl Acad Sci USA. 92: 6773-6777; ここに参照して説明に代える)。数値は複製ウェルの特異的結合 (HCV E2 タンパク質を発現するワクシニアウイルスで感染した細胞の抽出物と野生型ワクシニア抽出物との比) の平均値である。野生型ワクシニアウイルスで感染した細胞から得たタンパク質に対する、HCV HMAb 及び対照 HMAb の反応性は、吸光度 0.04 を超えなかった。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図 8 B】様々な HCV 遺伝子型の E2 タンパク質に対する HCV 抗体反応性を示すグラフである。ワクシニアウイルス Q1a、Q1b、Q2a、Q2b に感染させた  $6 \times 10^5$  個のヒーラ細胞によって発現された HCV E2 タンパク質を、500ng の GNA レクチンでコーティングしたウェル上に捕捉した。ウェルを洗浄しブロッキングし、表記した HCV HMAb (図 9 A - 9 J それぞれに記した HMAb) 及び CMV タンパク質に対する対照 HMAb (R04) (図 9 K) と共に捕捉タンパク質を保温した (Wardら、1995, Proc Natl Acad Sci USA. 92: 6773-6777; ここに参照して説明に代える)。数値は複製ウェルの特異的結合 (HCV E2 タンパク質を発現するワクシニアウイルスで感染した細胞の抽出物と野生型ワクシニア抽出物との比) の平均値である。野生型ワクシニアウイルスで感染した細胞から得たタンパク質に対する、HCV HMAb 及び対照 HMAb の反応性は、吸光度 0.04 を超えなかった。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図 9】HCV HMAb による天然 (NAT) 及び変性 (DNT) HCV 1b E2 タンパク質に対する反応性を示す棒グラフである。ワクシニアウイルス Q1b 及び VWA 又は VWA のみに感染させた  $6 \times 10^5$  個のヒーラ細胞に由来する細胞質抽出物を、未処理のままにした (青の棒線) か、或いは 0.5% SDS 及び 5mM ジチオスレイトールと共に 56 度 15 分保温して変性した (黄の棒線)。処理後、タンパク質を BLOTTO で 1:5 に希釈し、500ng の GNA レクチンでコーティングしたウェル上に捕捉した。ウェルを洗浄しブロッキングし、表記した濃度の HCV HMAb 及び対照 HMAb (R04) と共に捕捉タンパク質を保温した。結合抗体を抗ヒト IgG アルカリホスファターゼ複合体及び PNP で検出した。発色を 45 分間行った。天然及び変性 HCV 1b の数値は複製ウェルから得たシグナル平均値である。VWA 感染ヒーラ細胞に由来する天然及び変性タンパク質の単ウェルからの信号は区別が付かず、これも平均値をとった (赤の棒線)。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図 10】図 11、12 及び 13 で説明する実験に用いた、競合結合解析の概要を示す。GNA レクチンで固体表面をコーティングし、次いで E2 含有タンパク質抽出物を添加しレクチンで捕捉する。捕捉 E2 に競合抗体を結合させ、過剰な未結合を除去し標識化試験抗体を添加する。

【図 11】HCV HMAb C BH-5 を用いた競合解析の棒グラフである。ワクシニアウイルス Q1a (青い棒線) 又は Q1b (赤い棒線) に感染させたヒーラ細胞の細胞質抽出物から得た HCV E2 タンパク質を、500ng の GNA で捕捉した。表記した HMAb ( $\times$  軸)  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の存在下、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  のビオチン化 C BH-5 で捕捉 HCV E2 を検出した。結果を、競合体の全く存在しない場合のビオチン化 C BH-5 の結合と比較した。棒線は複製ウェルから得た平均値を示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図 12】HMAb C BH-2 による多重遺伝子型の HCV E2 タンパク質への結合を阻害する、HCV HMAb の能力を示す競合解析である。ワクシニアウイルス Q1a (青い棒線)、Q1b (赤い棒線)、Q2a (黄色い棒線) 又は Q2b (薄青の棒線) に感染させたヒーラ細胞の細胞質抽出物から得た HCV E2 タンパク質を、500ng の GNA レクチンで捕捉した。HMAb C BH-4D、-4B 及び -17 は、遺伝子型 2 の E2 タンパク質への反応性が限られているため、HCV 1a 又は 1b E2 タンパク質についてのみ評価した。捕捉 HCV E2 を、表記した HMAb ( $\times$  軸)  $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  の存在下に、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  のビオチン化 C BH-2 で検出した。棒線は、競合抗体が全く存在しない状態

10

20

30

40

50

でのビオチン化CBH-2によるHCV-E2への結合に対する、表記した抗体の存在下での結合を示す(y軸)。R04はサイトメガロウイルスタンパク質を認識する対照HMAbである。棒線は複製ウェルから得た平均値を示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図13】HCV-HMAbCBH-7が独特なエピトープを認識することを示す競合解析である。ワクシニアウイルスQ1a(青い棒線)又はQ1b(赤い棒線)に感染させたヒーラ細胞の細胞質抽出物から得たHCV-E2タンパク質を、500ngのGNAレクチンで捕捉した。表記したHMAb(x軸)20μg/mlの存在下、2μg/mlのビオチン化CBH-7で捕捉HCV-E2を検出した。棒線は、競合抗体が全く存在しない場合のビオチン化CBH-7によるHCV-E2への結合に対する、表記した抗体の存在下での結合を示す(y軸)。R04はサイトメガロウイルスタンパク質を認識する対照HMAbである。棒線は複製ウェルから得た平均値を示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図14】図1で説明する実験に用いた、E2タンパク質へのCD81の結合を阻害する抗体の能力評価の概要を示す。組換えCD81で固体表面をコーティングする。次いでE2含有タンパク質抽出物を直接添加するか、試験抗体と共に予め保温した後に添加する。適当な標識化二次抗体を用いて、結合した試験抗体-E2複合体を検出する。

【図15】HCV-HMAbのサブセットがCD81-LELと結合したとき、HCV-E2と反応することを実証した棒グラフである。HCV-E2タンパク質を発現する組換えワクシニアウイルスに感染させたBSC-1細胞からの抽出物を、表記したHMAb(x軸)5μg/mlと混合して総量100μlとし、100ngのGST-CD81-LEL融合蛋白質又は非組換えGSTでコーティングしたマイクロタイターブレートウェル内で一晩保温した。ウェルを洗浄し、実施例6に更に記述するように、適当なアルカリホスファターゼ結合二次抗体及びPNPP基質を用いて結合抗体を検出した。数値は、1a(紫の棒線)、1b(赤い棒線)、2a(黄色い棒線)又は2b(緑の棒線)のE2タンパク質の存在下における、CD81に捕捉された抗体の平均OD値をGSTに捕捉された抗体の平均OD値で割ったものである。GSTコーティングウェルのOD値は、0.021~0.081の範囲であった。

【図16】図17で説明する実験に用いた、HCVビリオンへのCD81の結合を阻害する抗体の能力評価の概要を示す。組換えCD81で固体表面をコーティングする。HCVビリオンを試験抗体と共に予め保温し、次いで固定CD81に結合させる。結合HCVビリオンの検出を、定量PCRにより測定する。

【図17】HMAbCBH-2及びCBH-5がHCVビリオンによるCD81への結合を阻害することを実証する棒グラフである。HCV1aチンパンジー血清を表記の抗体(y軸)10μgと混合し、CD81-LELでコーティングしたポリスチレンビーズに結合させた後の、ビーズに結合したHCV-RNA分子の数を示す(x軸)。

【図18】HCV-E2によるCD81への結合を阻害する抗体の検出に、HMAbCBH-4Gが使用可能なことを示す棒グラフである。ワクシニアウイルスQ1aに感染させたBSC-1細胞の抽出物に由来するHCV1aE2タンパク質を、ビオチン化したHMAbCBH-4G調製物4μg/mlと共に4℃で20分間保温した。次いでE2-LEL複合体の50μlアリコートを、500ngのGNA(青い棒線)又は100ngのGST-CD81-LEL(赤い棒線)のいずれかでコーティングしたウェルに、40μg/mlの表記した抗体(x軸)50μlの存在下で添加した。R04はサイトメガロウイルスタンパク質を認識する対照HMAbである。実施例7で説明するように、4℃で一晩保温した後、ウェルを洗浄し、結合したビオチン化CBH-4Gを検出した。棒線は、競合抗体が全く存在しない状態で得たシグナルに対する、表記の抗体の存在下で複製ウェルから得た平均シグナルを示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図19】HCV感染者由来の血清からHCV-E2によるCD81への結合を阻害する抗体を検出するために、HMAbCBH-4Gが使用可能なことを示す棒グラフである。ワクシニアウイルスQ1a又はQ2bに感染させたBSC-1細胞の抽出物に由来するH

10

20

30

40

50

C V 1 a 又は 2 b E 2 タンパク質を、ビオチン化した H M A b C B H - 4 G 調製物 4  $\mu$  g / m l と共に 4  $\mu$ g で 20 分間保温した。左側の血清 4 種は H C V 1 a E 2 タンパク質で試験したものであり、右側の血清 4 種は H C V 2 b E 2 タンパク質で試験したものである。E 2 - C B H - 4 G 複合体を、500 ng の G N A (青い棒線) 又は 100 ng の G S T - C D 8 1 - L E L (赤い棒線) のいずれかでコーティングしたウェルに、遺伝子型の特定された H C V 感染者 (1 a 又は 2 b) 又は 非感染者 (N E G) 由来の表記の血清 (x 軸) を 1 / 500 希釀したものの存在下で添加した。実施例 7 で説明するように、4  $\mu$ g で一晩保温した後、ウェルを洗浄し、結合したビオチン化 C B H - 4 G を検出した。棒線は、競合血清が全く存在しない状態で得たシグナルに対する、表記の血清 (最終希釀 1 / 1000) の存在下で複製ウェルから得た平均シグナルを示す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。  
10

【図 20】競合アッセイを示す図である。プレートをまず G N A レクチンでコーティングする。この G N A レクチンに C H O 基を結合させることによって、マイクロタイタープレート上に細胞内 E 2 全長を捕捉する。G N A に捕捉された E 2 に競合 H M A b を接触させる。ビオチン化した試験 H M A b をプレートに添加し、ビオチン化試験 H M A b による E 2 への結合を、ストレプトアビジン - A P 複合体を用いて検出す。試験 H M A b の結合が阻害されたことは、同じ抗体結合領域にエピトープあることを示唆する。

【図 21 A】4 種の H C V ヒトモノクローナル抗体の競合解析を示す。G N A レクチンでコーティングしたマイクロタイタープレート上に H C V Q 1 b E 2 タンパク質を捕捉した。ビオチン化した試験抗体 (各グラフの上に表記) 2  $\mu$ g / m l を、表記した濃度 (x 軸) の競合ヒトモノクローナル抗体を含むウェルに添加した。結合したビオチン化試験抗体を、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ複合体で検出した。競合抗体の存在下で得られたシグナルは、競合抗体の非存在下で得たシグナルに対する、ビオチン化試験抗体により得られたシグナルのパーセントとして表した (y 軸)。各点は 2 個の複製ウェルから得た平均値を示す。棒線は平均からの標準偏差の一つを示す。競合抗体は右に示す記号表の通りである。  
20

【図 21 B】4 種の H C V ヒトモノクローナル抗体の競合解析を示す。G N A レクチンでコーティングしたマイクロタイタープレート上に H C V Q 1 b E 2 タンパク質を捕捉した。ビオチン化した試験抗体 (各グラフの上に表記) 2  $\mu$ g / m l を、表記した濃度 (x 軸) の競合ヒトモノクローナル抗体を含むウェルに添加した。結合したビオチン化試験抗体を、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ複合体で検出した。競合抗体の存在下で得られたシグナルは、競合抗体の非存在下で得たシグナルに対する、ビオチン化試験抗体により得られたシグナルのパーセントとして表した (y 軸)。各点は 2 個の複製ウェルから得た平均値を示す。棒線は平均からの標準偏差の一つを示す。競合抗体は右に示す記号表の通りである。  
30

【図 22 A】ヒトモノクローナル競合解析の結果を示す。示した結果は、競合抗体が全く存在しないウェルに対する、試験抗体の平均結合パーセントである。2 - 5 回の異なる実験から得た平均値を示す。遺伝子型 1 a 及び 1 b E 2 タンパク質の両方を試験した。N D は試験を行っていないという意味である。

【図 22 B】ヒトモノクローナル競合解析の結果を示す。示した結果は、競合抗体が全く存在しないウェルに対する、試験抗体の平均結合パーセントである。2 - 5 回の異なる実験から得た平均値を示す。遺伝子型 1 a 及び 1 b E 2 タンパク質の両方を試験した。N D は試験を行っていないという意味である。  
40

【図 23】本明細書に述べる H C V E 2 欠失コンストラクトを表す。E 2 コンストラクトの呼称を左側に記した。p D i s p l a y ベクターに由来する配列を黒い太線で示した。p D i s p l a y ベクターに存在する H A エピトープ及び c - m y c エピトープの位置も併せて記した。H C V 1 b E 2 由来の配列を白い四角で示す。H C V 1 b E 2 由来の配列を薄グレーの四角で示す。x 軸下部の数字は、H C V - 1 単離体のポリプロテインに準ずるものである。

【図 24】H C V E 2 欠失コンストラクトのウエスタンプロット分析を示しており、コ  
50

ンストラクトが効果的に発現されたことを示している。レーン上側に表記した HCV E 2 コンストラクトを HEK - 293 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後、細胞質抽出物を調製し、SDS-PAGE で分別した。分別したタンパク質をニトロセルロース膜に移し、HA エピトープに対するラットモノクローナル抗体 (HArMAb) 又は CMV タンパク質に対する HMAb (対照) のいずれかと共に保温した。結合抗体を適當な AP 結合抗血清で検出した。HEK は mock トランスフェクトした HEK - 293 細胞である。分子量マーカーの泳動を左側に記す。

【図 25 A】本発明の特定のヒトモノクローナル抗体による、様々な HCV E 2 欠失コンストラクトに対する反応性を示す。HEK - 293 細胞を mock トランスフェクトした (白い棒線)、あるいは表記の HCV E 2 コンストラクトでトランスフェクトした (各グラフの記号表参照)。トランスフェクションの 24 時間後、細胞質抽出物を調製し、同等のアリコートを上記したように GNA レクチンでコーティングしたマイクロタイターブレート上に捕捉した。捕捉された E 2 タンパク質を x 軸に表記の HCV HMAb と共に保温し、結合抗体の量を調べた。棒線は複製ウェルから得た平均吸光度を表す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図 25 B】本発明の特定のヒトモノクローナル抗体による、様々な HCV E 2 欠失コンストラクトに対する反応性を示す。HEK - 293 細胞を mock トランスフェクトした (白い棒線)、あるいは表記の HCV E 2 コンストラクトでトランスフェクトした (各グラフの記号表参照)。トランスフェクションの 24 時間後、細胞質抽出物を調製し、同等のアリコートを上記したように GNA レクチンでコーティングしたマイクロタイターブレート上に捕捉した。捕捉された E 2 タンパク質を x 軸に表記の HCV HMAb と共に保温し、結合抗体の量を調べた。棒線は複製ウェルから得た平均吸光度を表す。エラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図 26】HCV 感染者の血清が、CBH - 2 及び CBH - 7 を阻害する抗体を様々なレベルで含むことを実証するグラフである。相同 HCV E 2 タンパク質をウェル上に捕捉し、様々な希釈段階の HCV 1a、1b、2a 又は 2b 血清と共に保温した。数値は、個々の血清から得た、ビオチン化 CBH - 2 又は CBH - 7 結合の特異的阻害を表す。所与の希釈 (x 軸) について、複数の決定材料から得た阻害の平均パーセント (y 軸) をプロットした。8 種の陰性血清について得た特異的阻害の平均値も示した (用いた E 2 タンパク質の遺伝子型を記載した)。陰性血清上のエラーバーは平均からの標準偏差の一つを示す。

【図 27】HCV 感染者の血清が、CBH - 2 及び CBH - 7 を阻害する様々なレベルの抗体を含むことを実証したスキヤッタグラムを示す。スキヤッタグラムは試験 HMAb の阻害パーセントを示す。x 軸に表記した遺伝子型の HCV 血清又は対照血清 (NEG) を 1 : 200 に希釈し、遺伝子型がマッチし特定された E 2 タンパク質でコーティングしたウェル内でビオチン化試験 HMAb (グラフの上に表記) と共に保温した。ストレプトアビジン結合 AP を用いて試験 HMAb の結合を検出した。得られた結果を、競合物が存在しない場合の試験 HMAb の結合と比較した。記号はそれぞれ、一人の血清から得た結果を示す。線は阻害中央値パーセントを意味する。点線は、試験 HMAb の存在について血清が陽性であるとみなす限界値を示す。

【図 28】慢性肝炎患者 74 人から得た CBH - 2 阻害価のヒストグラムである。個々の血清について得た CBH - 2 阻害価を 100 につき 20 個の容器に入れこの 1 セットを > 2000 の力価まで全て用意した。棒線は、所与の容器セット中にある CBH - 2 阻害価を有する血清の数を示す。HCV 1a / 1b 血清の数を黒で示した。HCV 2a / 2b 血清の数を灰色で示した。低い阻害価 (< 200)、中間の阻害価 (200 - 1000)、高い阻害価 (> 1000) を有する血清の数を、グラフの下に示した。

【図 29】慢性肝炎患者 74 人から得た CBH - 7 阻害価のヒストグラムである。個々の血清について得た CBH - 2 阻害価を 100 につき 20 個の容器に入れこの 1 セットを > 2000 の力価まで全て用意した。棒線は、所与の容器中にある CBH - 7 阻害価を有する血清の数を示す。HCV 1a / 1b 血清の数を黒で示した。HCV 2a / 2b 血清の数を灰色で示した。低い阻害価 (< 200)、中間の阻害価 (200 - 1000)、高い阻害価

10

20

30

40

50

(>1000)を有する血清の数を、グラフの下に示した。

【図30】HCV E1及びE1E2コンストラクトの概要を示す。

【図31】HCV E1 1b (ZYK-E1)；全長HCV1b (HPCJ491)；及びHCV1aのH単離体 (HPCST90)から得たE1コンストラクトのアミノ酸配列の整列を示す。保存アミノ酸を点で示す。数字は、HCVポリプロテインの開始メチオニンから数えたものである。

【図32A】グリコシル化及び非グリコシル化E1コンストラクトのウェスタンプロット写真である。A. HEK-293細胞を、pDisplayベクター(VEC)又は表示のHCV E1コンストラクトでトランスフェクトした。B. HEK-293細胞を、ツニカマイシンの存在下(+)又は非存在下(-)、pDisplayベクター(VEC)又は表示のHCV E1コンストラクトでトランスフェクトした。

【図32B】グリコシル化及び非グリコシル化E1コンストラクトのウェスタンプロット写真である。A. HEK-293細胞を、pDisplayベクター(VEC)又は表示のHCV E1コンストラクトでトランスフェクトした。B. HEK-293細胞を、ツニカマイシンの存在下(+)又は非存在下(-)、pDisplayベクター(VEC)又は表示のHCV E1コンストラクトでトランスフェクトした。

【図33】E1欠失コンストラクトでトランスフェクトしたHKE293細胞内で発現されたE1組換えタンパク質の、FACScan解析を示すグラフである。

【図34】HCV血清を用いたIFAデータの写真である。

【図35】E1及びE1/E2コンストラクトによる、HCV陽性血清中のヒト抗体への免疫反応性を示す表である。

【図36】HCV抗E1HMAbH-111及びH-114のIFAデータの写真である。

【図37】HMAbH-111及びH-114を用いた、E1タンパク質のウェスタンプロットである。A. 免疫沈降反応。B. ウェスタンプロット。

【図38】HCV HMAbH-111及びH-114と、HEK-293細胞において一過性発現されたE1-1組換えタンパク質とのFACScanの解析を表すグラフである。

【図39】E1HMAbのエピトープ地図作成実験を示す図表である。

【図40】HMAbH-111エピトープのペプチド競合解析を例証するグラフである。

【図41】H-114によって認識された突然変異E1のウェスタンプロット写真である。

【図42】HMAbH-114のペプチド競合解析を例証するグラフである。

【図43A】HMAbH-114エピトープのアミノ及びカルボキシル末端領域における点突然変異の効果を例証しているグラフである。A. アミノ酸206～211の突然変異解析。B. アミノ酸306～313の突然変異解析。

【図43B】HMAbH-114エピトープのアミノ及びカルボキシル末端領域における点突然変異の効果を例証しているグラフである。A. アミノ酸206～211の突然変異解析。B. アミノ酸306～313の突然変異解析。

【図44】DTTの存在下又は非存在下での、HMAbH-114によるE1への結合の免疫沈降解析の写真である。

【図45】内側E1システイン残基についてのアラニンスキャニング実験の結果を示す表である。

【図46】様々なE1突然変異体のウェスタンプロットである。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Foung, et al.

<120> Prevention and Treatment of HCV Infection Employing  
Antibodies Directed Against Conformational and Linear  
Epitopes

<130> 2002850-0039

<140> TBA

<141> 2003-06-27

10

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Is a comparison  
of sequences of HCV

20

<400> 1

ctcaactgga ttcaccaaag tgtgcggagc gcctcattgt gtcatggag gggcgggcaa 60  
caacacccctg cactgcccca ctgattgctt ccgcaagcat ccggacgcca catactctcg 120  
gtgcggctcc ggtccctgga tcacacccag gtgcctggtc 160

<210> 2

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Is a comparison  
of sequences of HCV

30

<400> 2

ctcaactgga ttcaccaaagt gtgcggagcg ccccccgtg tcatggagg ggcgggcaac 60  
aacaccccttgc gctgcacccac tgatgttgc cgcaagcatc cggaagccac gtactctcg 120  
tgccggctccg gtcctggat tacgcccagg tgccctggtc 159

<210> 3

<211> 159  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Is a comparison  
of sequences of HCV

<400> 3  
tagtactggg ttcactaaga cgtcgccgac ccccccgtgta acatcgaaaa ggtcggttaac 60  
cgcaccttga tctgccccac ggactgtttc cggaaagcacc cccgaggctac ttacacaaaa 120  
tgtggctcgg ggccctgggtt gacgcctagg tgcctagta 159

10

<210> 4  
<211> 161  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Is a comparison  
of sequences of HCV

<400> 4  
tggcacaggg ttcactaaga ctgtgtggga gccccccatg taacatcgaa ggggtcggtt 60  
atcgcacattt gacttggccc acggactgtt tccggaagca ccccgaggctt acttacacca 120  
aatgtggttc gggcccttgg ctgacgccta ggtgcatagt t 161

20

<210> 5  
<211> 166  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Is a comparison  
of sequences of HCV

30

<400> 5  
tggcacaggg tacactaaga cttgtggcag accaccctgc cgcatttaggg ctgactttaa 60  
tgcgcagcatg gacttgggttgc gccccacggaa ctgttttagg aagcaccctg atactaccta 120  
catcaaatgt ggttctggc cttggctgac gccaagggtgc ataatt 166

<210> 6  
<211> 167  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Is a comparison  
of sequences of HCV

<400> 6  
tggcacaggt tacactaaga cttgtggcag accaccctgc cgcattaggg ctgacttaaa 60  
tgccagcacg gacttgtttg tgcccccacgg actgttttag gaagcaccct gaaactactt 120  
acatcaaatg tggttctggg cctctgtga cgccaaagtgc cataata 167

<210> 7  
<211> 166  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Is a comparison  
of sequences of HCV

<400> 7  
tggcacaggg tacactaaga catgtggtag accaccctgc cgcattagga aagactataa 60  
tggcagtatc gatttattgt gccccacaga ctgttttagg aagcaccctag atactaccta 120  
tctcaaatgt ggagcagggc ctctgttaac tccaaagtgc ataata 166

<210> 8  
<211> 166  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Is a comparison  
of sequences of HCV

<400> 8  
tggcacaggg tacactaaga catgtggtag accaccctgc cgcattagga aagactataa 60  
tggacagtc gacttattgt gccccacaga ctgttttaga aagcaccctag atactaccta 120  
tctcaaatgt ggagcggggc ctctgttgac cccaaaatgc ataata 166

<210> 9  
<211> 160  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Describes

10

20

30

sequences amplified from the central region of the HCV E2 vaccinia virus clones.

<400> 9  
ctcaactgga ttccaccaaaag tggcgccgagc gccccctgt gtcatcgag gggcgccaa 60  
caacaccccttg cgctgccccca ctgattgttt ccgcaagcat ccggaagccca cgtactctcg 120  
gtgcggctcc ggtcccttggaa ttacgcccag gtgcctggtc 160

<210> 10  
<211> 160  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Describes sequences amplified from the central region of the HCV E2 vaccinia virus clones.

<400> 10  
tggcacacggg ttccaccaaga cgtgtggggc ccccccattgt aacatcgggg gggtcggccaa 60  
taacaccccttg acttgcggccca cggactgttt ccggaagcac cccgaggccca cttacaccaa 120  
atgtgggtcg gggccttggc tgacacctag gtgcatagtt 160

<210> 11  
<211> 164  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Describes sequences amplified from the central region of the HCV E2 vaccinia virus clones.

<400> 11  
ctccactgtt tcacaaaaac ttgcggcgca ccacccctgcc gcacatcgagc tgactttaat 60  
gccagcacgg acctgctgtg ccccaacggac tgttcagga agcatcctga agccacttac 120  
atcaaatgtg gctctggggc cctgtgacgc caaaatgtt gata 164

<210> 12  
<211> 166  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Describes

10

20

30

sequences amplified from the central region of the  
HCV E2 vaccinia virus clones.

<400> 12  
tgggactggg ttcactaaga catgcggtgc accaccttgc cgcattagga gggactgcaa 60  
cggaaccctc gacctattgt gccccacaga ctgtttcaga aagcacccag atactaccta 120  
ccttaagtgt ggagcggggc cttgggtgac cccaaatgc atggta 166

<210> 13  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Flag epitope

<400> 13  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 . 5

<210> 14  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:The T7 tag  
sequence

<400> 14  
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Met Gly  
1 . 5 . 10

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

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:The S-tag  
sequence

<400> 15  
Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser  
1 . 5 . 10 . 15

10

20

30

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Reverse  
transcription reactions were performed using MMLV  
reverse transcriptase employing the reverse HCV  
specific primer

<400> 16  
cgcgcacraa gtasgggact

20

10

<210> 17  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:3 units of  
ampliTaq polymerase, and the forward primer HCV

<400> 17  
Cys Gly Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ile Thr Gly Gly Ala Tyr Ala  
1 5 10 15

Thr Gly Ala Thr Gly  
20

20

<210> 18  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
primers were designed to amplify fragments that  
expressed the final 39 amino acids of E1

30

<400> 18  
Cys Gly Ala Gly Gly Cys Ile Thr Cys Ala Thr Ala Thr Gly Ala Thr  
1 5 10 15

Cys Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Thr Gly Gly  
20 25

<210> 19  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
primers were designed to amplify fragments that  
expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 19  
cggaatccct gcagctacaa actgggttga agaattcca 38

<210> 20  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
primers were designed to amplify fragments that  
expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 20  
cgccatatggc gctcgcgggg gcccactggg gagt 34

<210> 21  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide  
primers were designed to amplify fragments that  
expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 21  
gctctagact gcagctatat gccagctgg agcaccat 38

<210> 22  
<211> 34

10

20

30

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide primers were designed to amplify fragments that expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 22

cgctcgagcc atggttggcg gggctcattg gggc

34

10

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide primers were designed to amplify fragments that expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 23

tcgaattcgg atcctacaaa gcacctttta ggagataaagc

40

20

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide primers were designed to amplify fragments that expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 24

cgctcgagcc atggtttcg gcgccattg ggtg

34

30

<210> 25

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Oligonucleotide primers were designed to amplify fragments that

expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 25

tcgaaattcgg atcctacaga gacgctttaa ggaggtaggc

40

<210> 26

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide  
primers were designed to amplify fragments that  
expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 26

Thr Gly Gly Thr Thr Cys Gly Gly Asx Thr Gly Tyr Trp Cys Ile Thr  
1 5 10 15

Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala

20

20

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide  
primers were designed to amplify fragments that  
expressed the final 39 amino acids of E1

<400> 27

Thr Ala Ala Thr Gly Cys Cys Ala Ile Ala Arg Cys Cys Lys Arg Thr  
1 5 10 15

30

Ala Ile Gly Gly Thr Ala Gly Thr Cys

20

25

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 28  
Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser  
1 5

<210> 29  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 29  
Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn  
1 5 10

10

20

<210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 30  
Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Tyr Gly  
1 5 10

30

<210> 31  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 31  
Asp Cys Ser Asn Ser Ser  
1 5

<210> 32  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

10

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 32  
Asp Cys Ser Asn Ser Ser  
1 5

20

<210> 33  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 33  
Cys Ser Ile Ser Pro Gly His Val  
1 5

30

<210> 34  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 34  
Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val  
1 5

<210> 35  
<211> 192  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

<400> 35  
Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn Asp Cys  
1 5 10 15  
Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr  
20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Thr Ser Arg Cys Trp  
35 40 45

Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr  
50 55 60

Ala Ala Ile Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Thr Ala Thr Phe  
65 70 75 80

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

Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His His Thr Val Gln Asp  
100 105 110

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

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

10

20

30

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Met Asp Met Val Ala Gly Ala  
 145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Ala Gly Asn  
 165 170 175

Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly  
 180 185 190

10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

&lt;400&gt; 36

Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys  
 1 5 10 15

Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Val Ile Met His Thr  
 20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp  
 35 40 45

Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asp Ala Ser Val Pro Thr  
 50 55 60

Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Thr Ala Ala Phe  
 65 70 75 80

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

Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp  
 100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met Ala

20

30

115

120

125

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

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala  
 145 150 155 160

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn  
 165 170 175

Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Ala Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly  
 180 185 190

10

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 193

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Shows an alignment of amino acid sequences of E1 constructs from HCV E1 1b (ZYK-E1); full-length HCV 1b (HPCJ491); and H isolate of HDV

20

&lt;400&gt; 37

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

Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr  
 20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Ser Asn Ser Ser Arg Cys Trp  
 35 40 45

30

Val Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr  
 50 55 60

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

Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Ile Phe Leu Val  
 85 90 95

Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp  
100 105 110

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

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

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Pro Ile Val Asp Met Ile Ala Gly  
145 150 155 160

Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly  
165 170 175

Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp  
180 185 190

Ala

<210> 38

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Indicates  
presence and size (in amino acids) of IgK signal  
peptide, hemagglutinin epitope and linker amino  
acids

20

<400> 38

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp

20

30

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Indicates

presence and size (in amino acids) of IgK signal peptide, hemagglutinin epitope and linker amino acids

<400> 39  
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
1 5

<210> 40  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Indicates presence and size (in amino acids) of linker sequence, c-myc epitope and PDGFR transmembrane domain

<400> 40  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
1 5 10

<210> 41  
<211> 49  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Indicates presence and size (in amino acids) of linker sequence, c-myc epitope and PDGFR transmembrane domain

<400> 41  
Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu  
1 5 10 15

Pro Phe Lys Val Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu  
20 25 30

Thr Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Leu Trp Gln Lys Lys Pro  
35 40 45

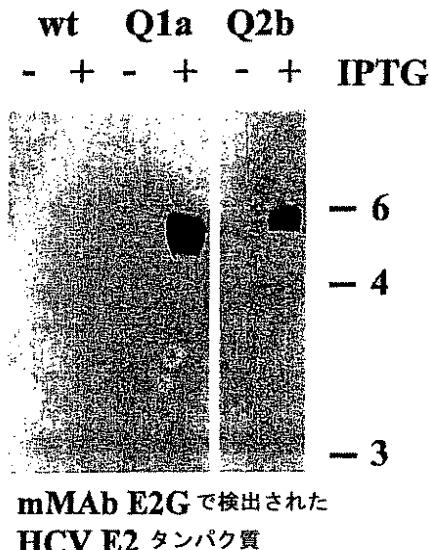
Arg

10

20

30

【 図 1 】



## mMAb E2G で検出された HCV E2 タンパク質

【 図 2 】

### HCV E2 ワクシニアウイルスクリーンの中央部から増幅した配列

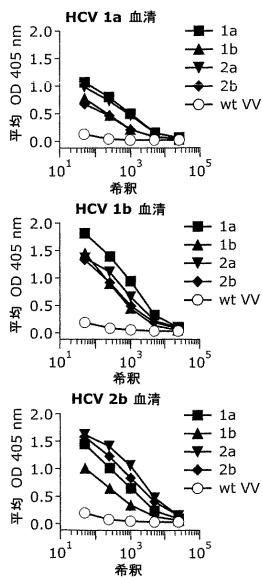
```
>hcv-1a3, (Q1a)
      CTCAACTGGATTACCAAAGTGTGCGGAGCGCCCCCTGTGTATCGGAGGGGCGG
      CAACAAACCTT      GCGCTGCCCCACTGTATTGTTCCGCAAGCATCCGGAAGCCAC
      CCGGATGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTT
```

```
>hcv-1b8, (Q1b)
      TGGCACAGGGTTCACCAAGACGTGTTGGGCCCCCATGTAACATCGGGGGGTCGG
      CAATAACACTT      GACTTGGCCCAAGGACTGTTCGGAAAGCACCAGGCCAC
      TTACACCAAATGTTGGCTGGGCTTGGCTGACACTTAAGGTGATAGTt
```

>hcv-2a-25, (Q2a)  
CTCCATCTGT TTACCAAAACTGGGGCGCACCCCTGGCGATCAGAGCTGAATT  
TAATGGCAGCAGGA CCTGCTGGCCCCAGGACTGTTTCAAGAACATCTGAAGCCAC  
TTACATCAAATGTGGCTCTGGCCCCGtgcacggccaaatgtccgtata

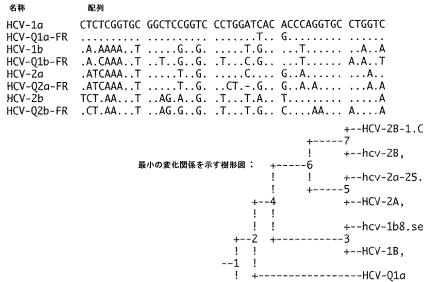
>HCV-2B-1, (Q26)  
TGGGACTGGTTCACTAACAGATCGCGTGACCACTTGCCTGAGGAGGACTG  
CAACGGAACTCgtCTATTGCCCCACAGACTGTTTCAAGAAAGCACCCAGATACTAC  
CTACCTTAAGTGTGGAGCGGGGCTTGGTTGACCCCAAATGCTGGTa

【 図 4 A 】

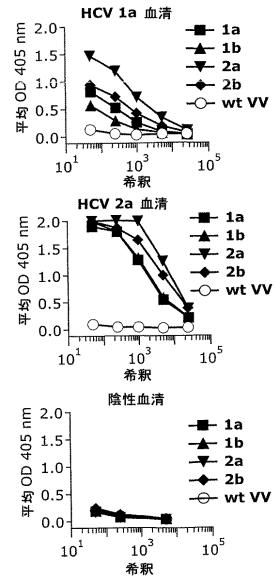


【 図 3 A 】

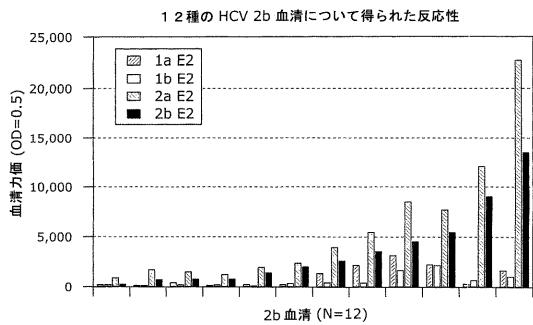
【 図 3 B 】



【 図 4 B 】

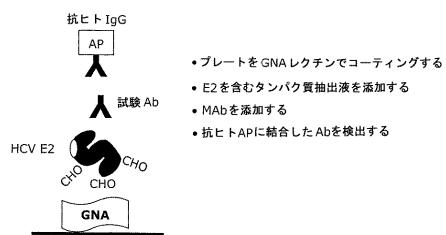


【 図 5 】

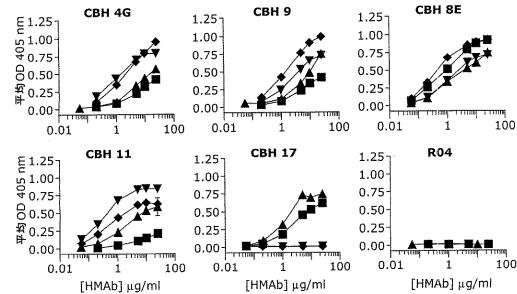


【図6】

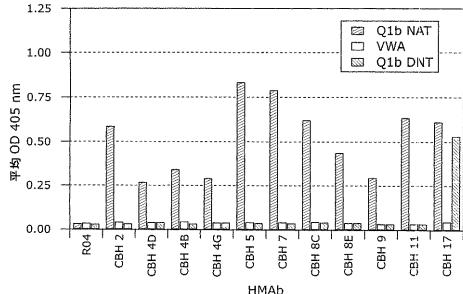
## HCV HMAbの結合解析



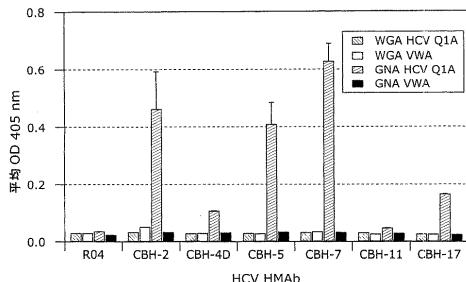
【 図 8 B 】



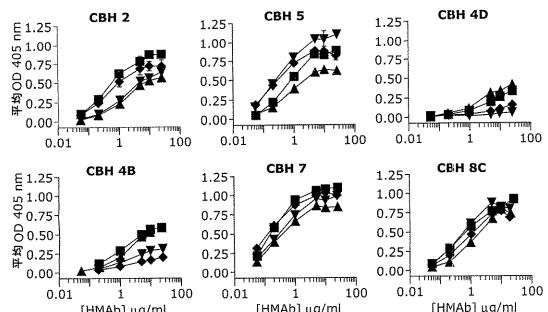
【 図 9 】



【 図 7 】

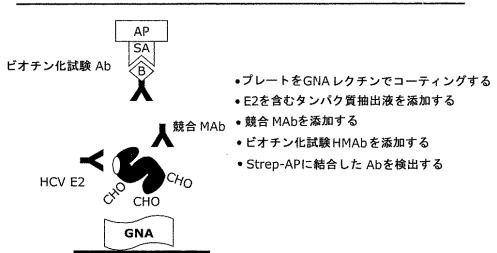


【 8 A 】

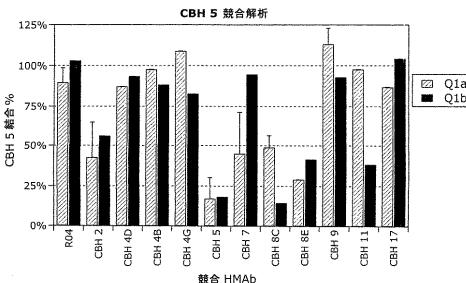


【 図 1 0 】

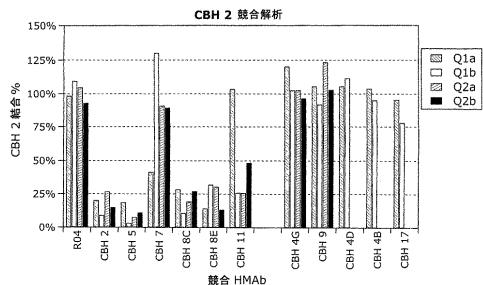
## 競合解析



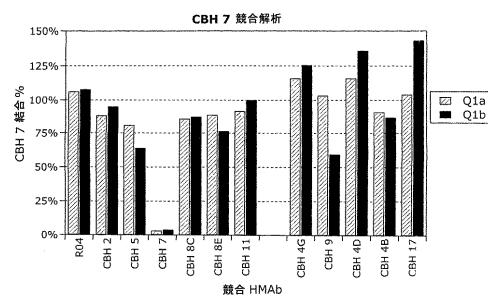
【 図 1 1 】



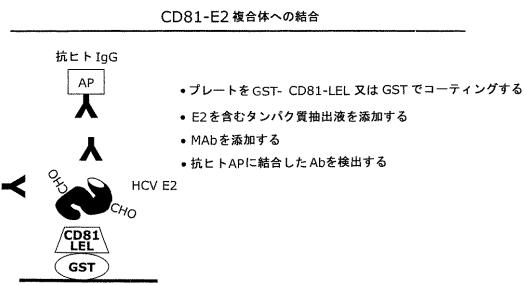
【図12】



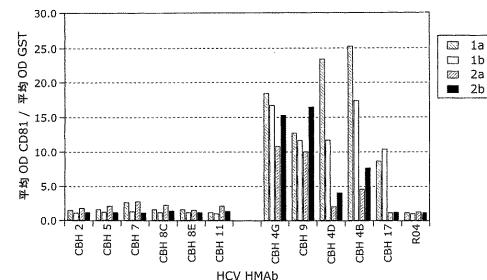
【図13】



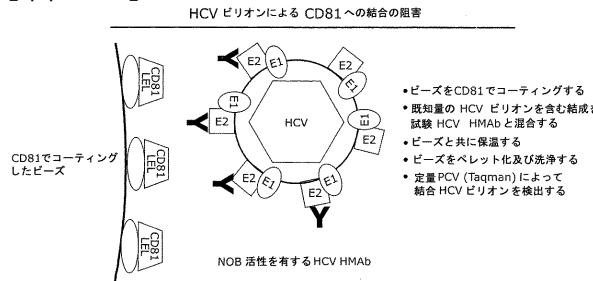
【図14】



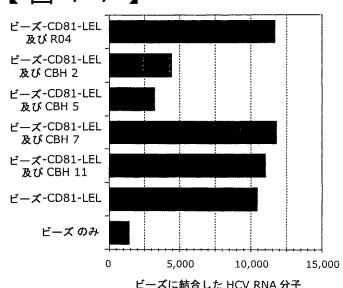
【図15】



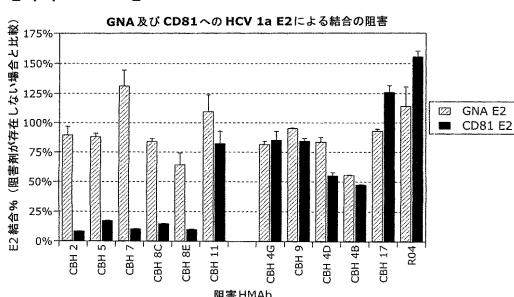
【図16】



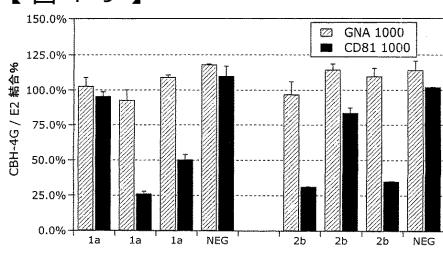
【図17】



【図18】

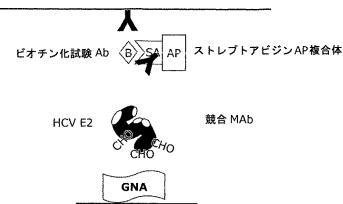


【図19】



【図20】

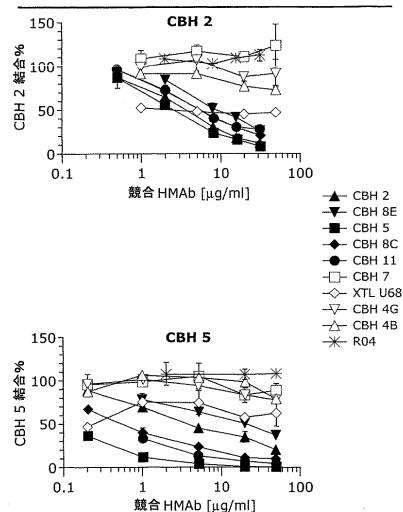
競合解析



- GNAレクチンでプレートをコーティングする
- CHO基とGNAレクチンの結合によって、全長細胞内E2をマイクロ孔プレート状に捕捉する
- 競合HMAbとGNA捕獲E2を混合する
- ビオチン化試験HMAbを添加する。
- ビオチン化試験HMAbによるE2への結合をストレプトアビジン-AP複合体で検出する
- 試験HMAbの結合阻害は、複数のエピトープが同一の抗体結合領域にあることを示唆する

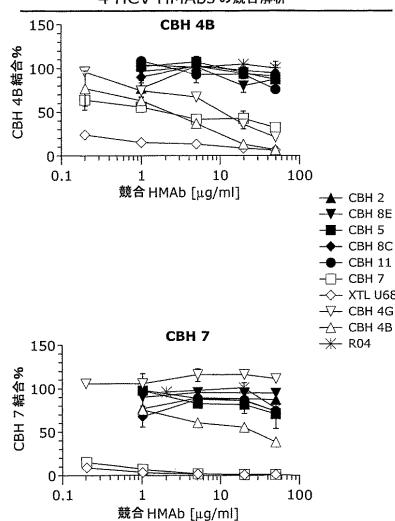
【図21A】

4 HCV HMAbsの競合解析



【図21B】

4 HCV HMAbsの競合解析



【図22A】

HMAb 競合解析の概要

競合グループ	E2	グループI					'9'~'7'II		グループIII		
		CBH 2	CBH 5	CBH 8C	CBH 11	CBH 7	CBH 4G	CBH 4B			
I	CBH 2	1a 18	39	51	ND	93	66	76	CBH 7	CBH 4G	CBH 4B
	CBH 2	1b 17	50	50	48	91	84	84			
	CBH 8E	1a 13	39	48	ND	79	63	80			
	CBH 8E	1b 23	45	57	51	91	87	78			
	CBH 5	1a 17	9	22	ND	71	60	74			
	CBH 5	1b 4	7	24	9	77	76	80			
	CBH 8C	1a 27	48	25	ND	85	74	84			
	CBH 8C	1b 11	23	33	23	84	87	86			
	CBH 11	1a 96	93	84	ND	97	72	87			
	CBH 11	1b 24	25	43	25	82	97	83			
II	CBH 7	1a 40	42	45	ND	2	251	11			
	CBH 7	1b 104	104	89	92	2	146	36			

【図22B】

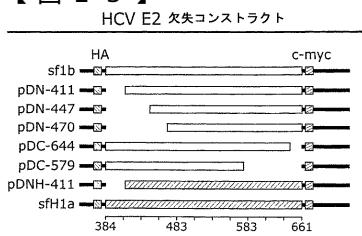
XTL U68	1a	60	63	108	ND	0	1	2	
XTL U68	1b	39	57	73	66	0	23	9	
III	CBH 4G	1a	107	95	85	ND	112	40	68
III	CBH 4G	1b	87	83	81	87	114	40	44
III	CBH 4B	1a	92	92	87	ND	85	24	29
III	CBH 4B	1b	78	93	66	81	63	34	13
III	CBH 4D	1a	98	86	90	ND	135	37	58
III	CBH 4D	1b	91	82	76	87	102	45	37
IV	CBH 17	1a	94	87	87	ND	114	102	103
IV	CBH 17	1b	73	101	88	95	92	89	64
C	R04	1a	98	91	92	ND	101	92	98
C	R04	1b	96	104	104	101	99	120	101

スケール &gt;140% 60%-140% 30%-59% 10%-29% &lt;10%

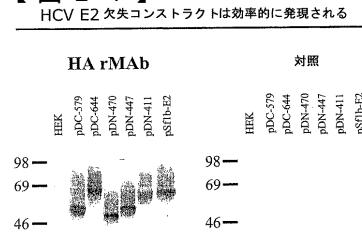
結果は競合抗体の存在しないウェルと比較した、試験抗体結合の平均パーセントを示す。  
結果は2~5回の実験結果の平均値である。1a及び1b両方のE2タンパク質を調べた。

ND=試験せず

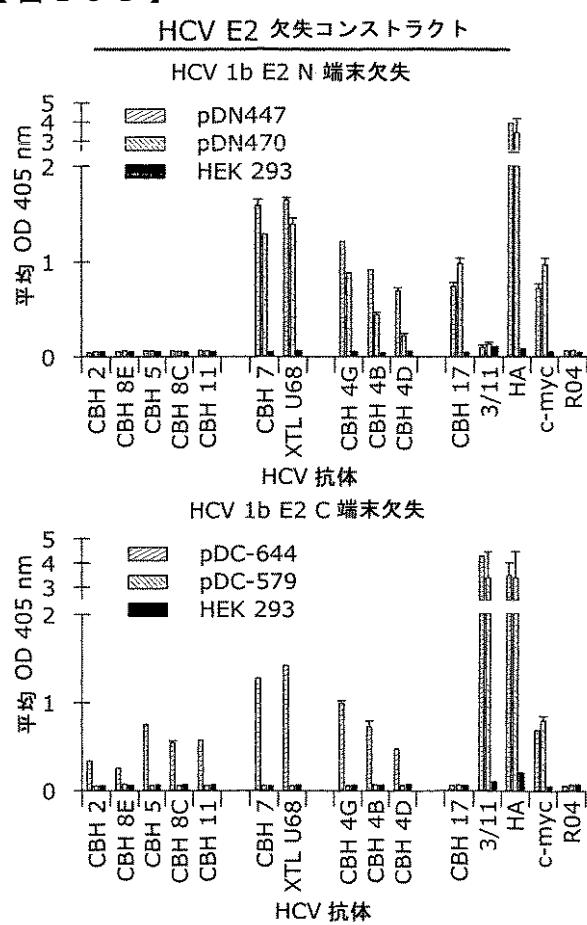
【図23】



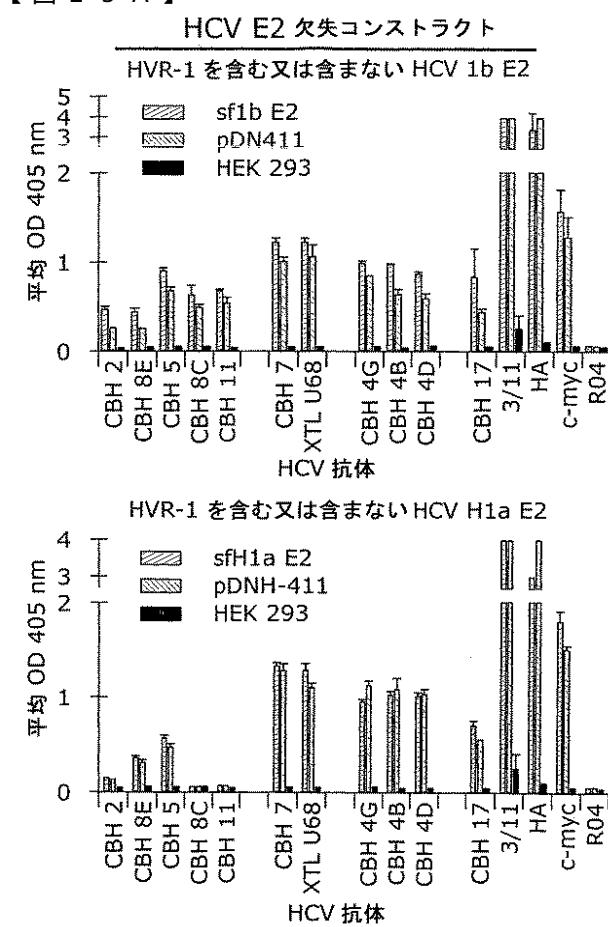
【図24】



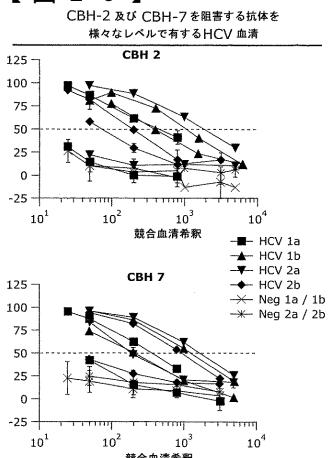
【図25B】



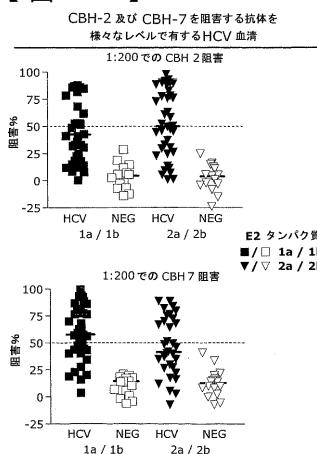
【図25A】



【図26】



【 図 27 】



【 図 2 8 】

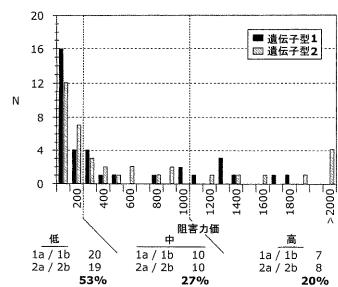
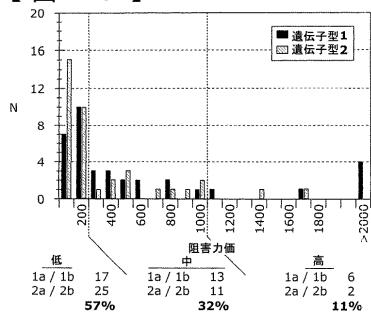
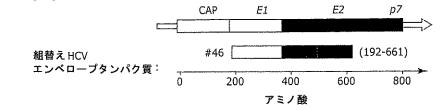


FIG. 32B

【 図 2 9 】



【 図 3 0 】



E1 欠失群 :		N 末端アミノ酸の位置		C 末端アミノ酸の位置	
E1 欠失 コンストラクト					
E1-1		192		321	
E1-2		192		340	
E1-3		192		352	
E1-4		192		366	
E1-5		192		370	
E1-F		192		383	

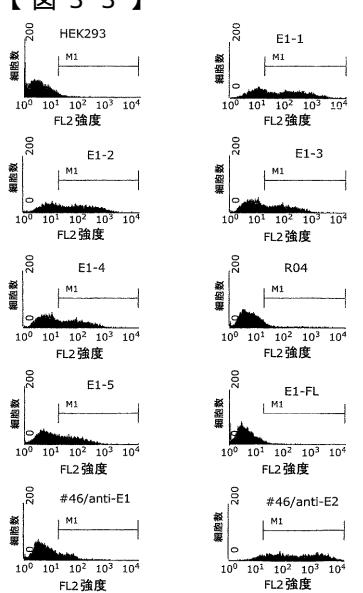
  

E1E2 コンストラクト :	
E2 <sub>661</sub>	192
E2 <sub>746</sub>	192

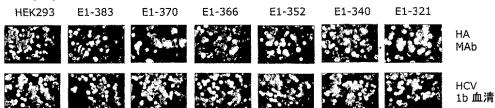
【 囮 3 1 】

名称	配剂				
ZYK-E1	200	210	220	230	240
YEVRNQSY YIVNTDENS SIVFEADML HTPGCPCPV REGNTKIV ALTPTLPAV					250
HPC491	.....	.....	.....	.....	.....
HPC590	.....	.....	.....	.....	.....
ZYK-E1	260	270	280	290	300
ASVPTAER HIDLWLVTAT FCSAMYVGL CGSFLVMSL FTFSPPRHT VDQCHS1YD					310
HPC491	.....	.....	.....	.....	.....
HPC590	.....	.....	.....	.....	.....
ZYK-E1	320	330	340	350	360
GHVTGHMRH DMMNNSPPTT ALVLSQNL PQQATVQMDAG AHVGLAGLA YSSYMMNWK					370
HPC491	.....	.....	.....	.....	.....
HPC590	.....	.....	.....	.....	.....

【 3 3 】



【 図 3 4 】



【図35】

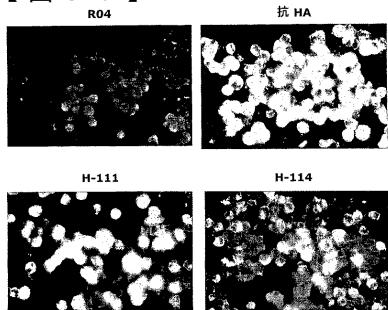
E1及びE1E2コンストラクトによる、HCV陽性血清中のヒト抗体に対する免疫反応性

試料	HCV E1コンストラクト						293細胞
	E1-321(1)	E1-340(2)	E1-352(3)	E1-366(4)	E1-370(5)	E1-383(FL)	
16型試料	+	0	+	0	+	0	+
212	+	+	+	+	+	+	0
2580	+	+	+	+	+	+	0
2527	0	+	+	+	+	0	0
2221	0	0	0	0	0	0	0
2614	0	0	0	0	0	0	0
2572	+	+	+	+	+	+	0
2260	+	+	+	+	+	0	0
2580	+	+	+	+	+	+	0
2755	+	+	+	+	+	+	0
HC04	+	+	+	+	+	+	+
HC07	+	+	+	+	+	+	0
HC10	0	0	0	0	0	0	0
HC15	+	0	0	0	0	0	0
HC26	+	+	+	+	+	+	0
HC29	+	+	+	+	+	+	0
	12/17 (70%)	12/17 (70%)	14/17 (82%)	12/17 (70%)	13/17 (76%)	9/17 (53%)	17/17 (100%)
	2/7 (29%)	2/7 (29%)	3/7 (43%)	1/7 (14%)	2/7 (29%)	0/7 (0%)	7/7 (100%)
	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/17 (6%)

注: \*全ての血清試料は1-40の希釈で検出した。

→試料HC04は抗細胞赤体を含んでいたと思われる。

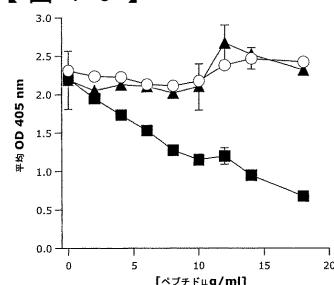
【図36】



【図37】



【図40】



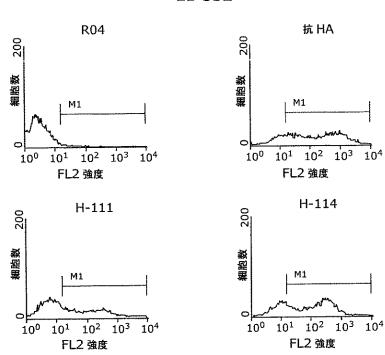
【図41】



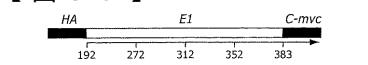
FIG. 41

【図38】

E1-352

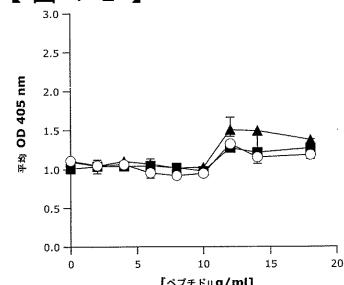


【図39】

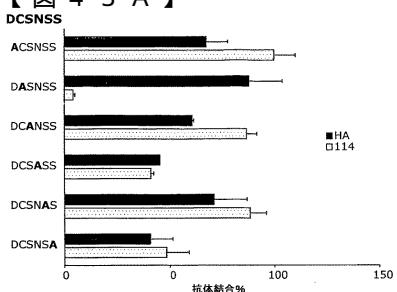


E1 欠失	IFA		
	HA	H-111	H-114
E1 (192-370)	+	+	+
E1 (192-366)	+	+	+
E1 (192-352)	+	+	+
E1 (192-340)	+	+	+
E1 (192-321)	+	+	+
E1 (192-296)	+	+	-
E1 (192-250)	+	+	-
E1 (192-231)	+	+	-
E1 (192-211)	+	+	-
E1 (296-321)	+	-	-
E1 (192-313)	+	+	+
E1 (192-305)	+	+	-
E1 (199-321)	+	-	+
E1 (206-321)	+	-	+
E1 (212-313)	+	-	-
E1 (244-313)	+	-	-
E1 (262-313)	+	-	-

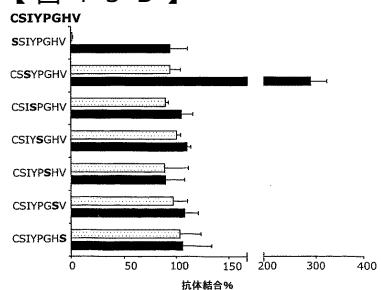
【図42】



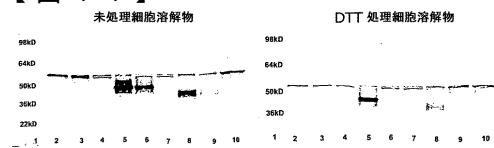
【図43A】



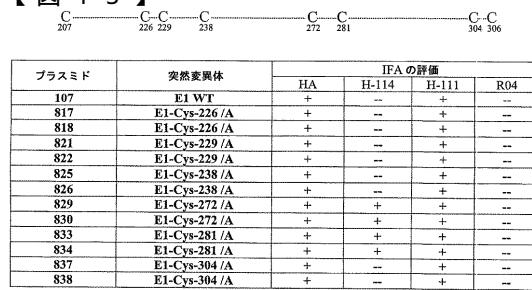
【図43B】



【図44】



【図45】



【図46】

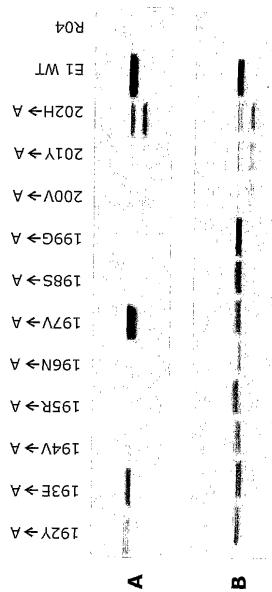
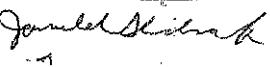


FIG. 46

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application PCT/US03/20580																								
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/70; C12N 7/00; A61K 39/42, 39/29 US CL : 435/5, 235.1; 424/149.1, 189.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/5, 235.1; 424/149.1, 189.1																										
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																										
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) ELSEVIER BIOBASE, PUBMED																										
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 6,150,134 (MAERTENS et al.) 21 November 2000 (21.11.2000), column 2, lines 6-30, column 3, lines 59-67, column 16, lines 9-29, column 18, lines 10-20.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">2, 4-10, 15-17, 19, 21-35, 42-55, 63-66, 68-84</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">US 5,670,153 (WEINER et al.) 23 September 1997 (23.09.1997), column 14, lines 20-67.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">14, 18,</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 5,876,961 (CROWE et al.) 2 March 1999 (02.03.1999), column 2, lines 14-52.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1, 3, 5-9, 15, 17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 6,146,629 (DAGAN) 14 November 2000 (14.11.2000), column 3, lines 18-41.</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">10-13, 18, 20, 33-41, 42-47</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">10-13, 18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">20, 33-45, 47</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">14</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 6,150,134 (MAERTENS et al.) 21 November 2000 (21.11.2000), column 2, lines 6-30, column 3, lines 59-67, column 16, lines 9-29, column 18, lines 10-20.	2, 4-10, 15-17, 19, 21-35, 42-55, 63-66, 68-84	X	US 5,670,153 (WEINER et al.) 23 September 1997 (23.09.1997), column 14, lines 20-67.	14, 18,	Y	US 5,876,961 (CROWE et al.) 2 March 1999 (02.03.1999), column 2, lines 14-52.	1, 3, 5-9, 15, 17	Y	US 6,146,629 (DAGAN) 14 November 2000 (14.11.2000), column 3, lines 18-41.	10-13, 18, 20, 33-41, 42-47	Y	TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88	10-13, 18	Y	TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88	20, 33-45, 47	Y	TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88	14
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X	US 6,150,134 (MAERTENS et al.) 21 November 2000 (21.11.2000), column 2, lines 6-30, column 3, lines 59-67, column 16, lines 9-29, column 18, lines 10-20.	2, 4-10, 15-17, 19, 21-35, 42-55, 63-66, 68-84																								
X	US 5,670,153 (WEINER et al.) 23 September 1997 (23.09.1997), column 14, lines 20-67.	14, 18,																								
Y	US 5,876,961 (CROWE et al.) 2 March 1999 (02.03.1999), column 2, lines 14-52.	1, 3, 5-9, 15, 17																								
Y	US 6,146,629 (DAGAN) 14 November 2000 (14.11.2000), column 3, lines 18-41.	10-13, 18, 20, 33-41, 42-47																								
Y	TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88	10-13, 18																								
Y	TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88	20, 33-45, 47																								
Y	TESSMANN. K. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase J. Virol. Meth. 2002, Vol. 103, pages 75-88	14																								
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																										
Date of the actual completion of the international search 04 April 2005 (04.04.2005)		Date of mailing of the international search report 26 MAY 2005																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Timothy M. Brown Telephone No. (571) 272-0773 																								

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US03/20520

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

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

1.  Claim Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
2.  Claim Nos.: 56-62 and 67  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Please See Continuation Sheet
  
  
  
3.  Claim Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/20580

**Continuation of Box I, Reason 2:**

Claims 56-62 and 67 are drawn to an agent having sufficient three-dimensional structural similarity to an HCV E1 conformational epitope. A meaningful search could not be carried out because the three-dimensional structure of the claimed epitope cannot be determined.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 14/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/18	4 C 0 8 5
<b>C 1 2 N 7/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/00	4 H 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
<b>G 0 1 N 33/576 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/576	Z
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
<b>C 1 2 N 5/06 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	E
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	B
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	

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

(74)代理人 100129333

弁理士 中島 拓

(72)発明者 スティーブン ケイ.エイチ.フーング

アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア、スタンフォード、メイフィールド アベニュー  
5 8 8

(72)発明者 ズエンyun ケック

アメリカ合衆国 9 4 0 6 5 カリフォルニア、レッドウッド シティ、ハーバー コロニー コ  
ート 6 1 7

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA33 BA51 CA02 CA11 DA02 EA04 GA11 HA01  
HA03 HA14  
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ13 QQ79 QR48 QR56 QR69 QR77  
QR80 QS32 QX01  
4B064 AG27 CA10 CA12 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA15  
4B065 AA91X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46  
4C084 AA17 MA17 MA23 MA24 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52  
MA55 MA56 MA59 MA60 MA63 NA14 ZB332  
4C085 AA03 AA14 BA92 BB11 EE01 GG01 GG08 KA04  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA02 DA76 DA86 EA29 EA31 EA53  
FA72 FA74 GA26