

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4593780号
(P4593780)

(45) 発行日 平成22年12月8日 (2010. 12. 8)

(24) 登録日 平成22年9月24日 (2010. 9. 24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/00 (2006. 01)

C O 7 K 14/18 (2006. 01)

C O 7 K 19/00 (2006. 01)

C 4 O B 40/10 (2006. 01)

C 4 O B 30/04 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A

C O 7 K 14/18

C O 7 K 19/00

C 4 O B 40/10 Z C C

C 4 O B 30/04

請求項の数 80 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-549738 (P2000-549738)
 (86) (22) 出願日 平成11年5月14日 (1999. 5. 14)
 (65) 公表番号 特表2002-515249 (P2002-515249A)
 (43) 公表日 平成14年5月28日 (2002. 5. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1999/003344
 (87) 国際公開番号 W01999/060132
 (87) 国際公開日 平成11年11月25日 (1999. 11. 25)
 審査請求日 平成18年3月23日 (2006. 3. 23)
 (31) 優先権主張番号 9810756.8
 (32) 優先日 平成10年5月19日 (1998. 5. 19)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 500029969
 イスティトゥ ディ リチエルケ ディ
 ビオロジア モレコラーレ ビー. アン
 ジェレッティ ソチエタ ペル アツィオ
 ニ
 イタリア国, イー〇〇〇4〇 ポメツィア
 , ビア ポンティナ カッパエンメ. 3〇
 . 6〇〇
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H C V の E 2 糖タンパク質の超可変部 1 のミモトープおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

各々が以下の式 I :

【化 1】

Q T H V T G G S A A R T T S G L T S L F S P G A S Q N
 T T T V V Q G H A A H S V G R L P K K
 R Q V S Q V R R R S S Q
 Q

の アミノ酸配列を有する少なくとも 10^5 の異なるペプチドのライブラリー。

【請求項 2】

各々が前記式の アミノ酸配列を有する少なくとも 10^6 の異なるペプチドを含有する請求項 1 のライブラリー。

【請求項 3】

各々が前記式の アミノ酸配列を有する少なくとも 10^7 の異なるペプチドを含有する請求項 2 のライブラリー。

【請求項 4】

ペプチドが各々、以下の式 I I I :

【化 2】

Q T H T V G G Q A S H Q A S S L T S L F S P G A K Q N
 T V T S Q G A T H G V G S S K
 V V A T V R R P Q

のアミノ酸配列を有する請求項 1 のライブラリー。

【請求項 5】

式 III のアミノ酸配列を有する少なくとも 10^6 の異なるペプチドを有する請求項 4 のライブラリー。 10

【請求項 6】

バクテリオファージ粒子の表面に表示される請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のライブラリー。

【請求項 7】

C 型肝炎ウイルス (HCV) 株の超可変領域 1 (HVR1) 中のエピトープと免疫学的に交叉反応性であるエピトープを含有する 1 又は複数のペプチドを得るための方法であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチドのライブラリーおよび HCV 株の前記 HVR1 を結合し得る抗体分子を接触させ、そして選択された 1 又は複数のペプチドとして前記抗体分子に結合し得るライブラリーの 1 又は複数のペプチドを選択することを含んで成る方法。 20

【請求項 8】

前記選択された 1 または複数のペプチドが、2 以上の HCV の株の HVR1 と免疫学的に交叉反応性であるエピトープを含有する請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のペプチドのライブラリーと、2 以上の HCV 株の HVR1 に集合的に結合し得る複数の抗体分子とを接触させることを含んで成る請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記複数の抗体分子が HCV に感染した個体の血清から得られる請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ライブラリーがバクテリオファージ粒子の表面に表示され、各粒子がその表面に表示されるペプチドをコードする核酸を含有する請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 12】

前記核酸を単離することをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記核酸から発現することによる前記選択されたペプチドを産生することをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ペプチド合成により、前記選択されたペプチドを産生することをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。 40

【請求項 15】

前記選択されたペプチドのアミノ酸配列を有するペプチド、前記複数のペプチド、又は単離形態の前記複数のペプチドの混合物が、少なくとも 1 つの付加的構成成分を含有する組成物に製剤化される請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

前記選択された 1 又は複数のペプチドが、製薬上許容可能な賦形剤を含有する組成物に製剤化される、請求項 7 ~ 13、又は 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

前記選択された 1 又は複数のペプチドが、アジュバントを含有する組成物に製剤化され 50

る、請求項 7 ~ 13、又は 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記選択されたペプチドのアミノ酸配列が付加的アミノ酸との融合体で提供される請求項 7 ~ 13、又は 14 に記載の方法。

【請求項 19】

前記融合体が、選択されたペプチド及び HCV エンペロープタンパク質及び HVR1 部分に当該ペプチドを有する非構造タンパク質 1 (E2/NS1) を含有する請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記融合体が、少なくとも 1 つの付加的構成成分を含有する組成物に製剤化される請求項 18 または 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記融合体が製薬上許容可能な賦形剤を含有する組成物に製剤化される、請求項 18 又は 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記融合体がアジュバントを含有する組成物に製剤化される、請求項 18 又は 19 に記載の方法。

【請求項 23】

前記融合体が組換え HCV 中に含まれる請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記組換え HCV が少なくとも 1 つの付加的構成成分を含有する組成物に製剤化される請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記組換え HCV が、製薬上許容可能な賦形剤を含有する組成物に製剤化される、請求項 23 又は 24 に記載の方法。

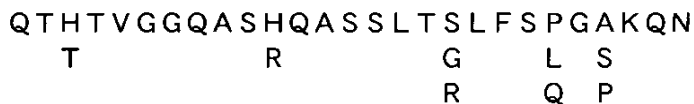
【請求項 26】

前記組換え HCV が、アジュバントを含有する組成物に製剤化される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

1 または複数の前記選択されたペプチドが、以下の式 II :

【化 3】

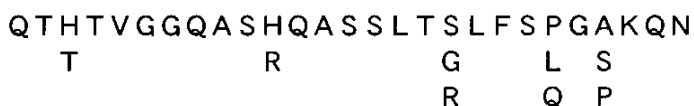


のアミノ酸配列を各々有する、請求項 7 ~ 13、14、16 ~ 19、21 ~ 23、25 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

10^8 の異なるペプチドの混合物であって、その各々が、以下の式 II :

【化 4】



10

20

30

40

50

のアミノ酸配列を有する、混合物。

【請求項 29】

1 又は複数のペプチドを含有する組成物であって、そのペプチドの各々が、以下の式 I I :

【化 5】



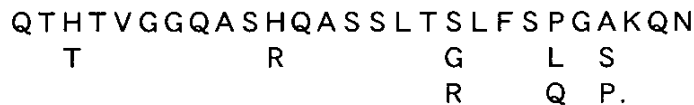
10

により提供されるアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項 30】

前記組成物が、2 ~ 10 の異なるペプチドからなり、その各々が、以下の式 I I :

【化 6】



20

により提供されるアミノ酸配列を有する、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

以下のペプチド：

【化 7】

G31 THTTVGGSVARQVHSLTGLFSPGPQQK
F78 QTHTTGGQAGHQAHS�TGLFSPGAKQN
R9 QTTVVGGQSHTVRGLTSLFSPGASQN
D6 QTTTTGGQVSHATHGLTGLFSLGPQQK
M122 QTTTTGGSASHAVSSLTGLFSPGSKQN; 及び
H1 QTHTTGGVVGHATSGLTSLFSPGPSQK.

30

のうちのいずれか 1 又は複数を含む、請求項 1 に記載のライブラリーから得られる 1 又は複数のペプチドを含む組成物。

【請求項 32】

以下のペプチド：

【化 8】

F78 QTHTTGGQAGHQAHS�TGLFSPGAKQN
R9 QTTVVGGQSHTVRGLTSLFSPGASQN
D6 QTTTTGGQVSHATHGLTGLFSLGPQQK; 及び
H1 QTHTTGGVVGHATSGLTSLFSPGPSQK.

40

50

を含有する請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

以下のペプチド：

【化 9】

G31 TTHTVGGSVARQVHSLTGLFSPGPQQK; 及び
M122 QTTTTGGSASHAVSSLTGLFSPGSKQN.

10

を含有する請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

下記ペプチド：

【化 1 0】

G31 TTHTVGGSVARQVHSLTGLFSPGPQQK
F78 QTHTTGGQAGHQAHS�TGLFSPGAKQN
R9 QTTVVGGQSHTVRGLTSLFSPGASQN
D6 QTTTTGGQVSHATHGLTGLFSLGPQQK
M122 QTTTTGGSASHAVSSLTGLFSPGSKQN; 及び
H1 QTHTTGGVVGHATSGLTSLFSPGPSQK.

20

を含有する請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

1 又は複数の前記ペプチドが付加的アミノ酸との融合体中に存在する請求項 2 9 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記融合体が、選択されたペプチド及び H C V エンベロープタンパク質、及び HVR1 部分に当該ペプチドを伴う非構造タンパク質 (E2/NS1) タンパク質からなる、請求項 3 5 に記載の組成物。

30

【請求項 3 7】

前記融合体が組換え HCV 中に含入される請求項 3 6 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

少なくとも 1 つの付加的構成成分を含有する請求項 2 9 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 9】

前記組成物が製薬上許容可能な賦形剤をさらに含有する請求項 2 9 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 4 0】

前記組成物がさらにアジュバントを含有する請求項 2 9 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 4 1】

以下の式 I I：

【化 7】

Q T H T V G G Q A S H Q A S S L T S L F S P G A K Q N
 T R G L S
 R Q P.

により提供されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

【請求項 4 2】

10

以下の式 I :

【化 8】

Q T H V T G G S A A R T T S G L T S L F S P G A S Q N
 T T T V V Q G H A A H S V G R L P K K
 R Q V S Q V R R R S S Q
 Q.

により提供されるアミノ酸配列を含む、ペプチド。

20

【請求項 4 3】

以下 :

【化 1 3】

2.11 QTHTVGGVQGRQAHSLTSLFSPGASQN	
D6 QTTTTGGQVSHATHGLTGLFSLGPQQK	
D18 QTHTTGGASASHQASGLTRLFSQGPSQN	
F63 QTHVVGGQGRQVSSLVSLFSPGASQK	
G31 TTHTVGGSVARQVHSLTGLFSPGPQQK	
L13 QTHTVGGSQAHAAHSLTRLFSPGSSQN	10
M69 QTTVVGGSQARAAHGLVSLFSLGSKQN	
Z61 QTHVVGGVQGRQTSGLVGLFSPGSKQN	
R9 QTTVVGGSQSHTVRGLTSLFSPGASQN	
B26 TTTTTGGQAGHQAHSLSLTPGASQK	
B22 QTHVVGGVQSHQTSGLTSLFSPGASQK	
335 QTHTTGGVQGHQTSRLTSLFSPGPSQN	
D29 TTTVVGGQAAHQTHSLTSLFSPGAKQN	20
D33 TTTTTGGQQSHTVHGLVGLFSPGSKQN	
E26 QTHTVGGVQAHTVRGLTSLFSPGSSQN	
F80 QTHTTGGQAGHTASSLTGLFSPGAKQN	
F19 QTTTVGGVASHQAHSLSLTPGAKQK	
F78 QTHTTGGQAGHQAHSLSLTPGAKQN	
H1 QTHTTGGVVGHATSGLTSLFSPGPSQK	
L76 TTTTVGGQASHQTSSLTGLFSPGSKQN	
B24 TTTTVGGQASHTTSSLTGLFSPGASQK	30
M63 QTHTTGGVVSHQTRSLVGLFSPGPQQN	
M27 QTTTTGGVASHAAHRLTSLFSPGPQQK	
M122 QTTTTGGASASHAVSSLTGLFSPGSKQN	
M129 QTTVVGGASAGHTASSLVGLFSPGSKQN	
M119 TTTTVGGQASHTTSSLTGLFSPGSQQN	
R5 QTHTTGGQASHQVSSLVSLFSPGAKQK	
R6 TTTTTGGQVGHQTSGLTGLFSPGAQQN	
R27 TTHVVGGASASHAVRGLTSLFSPGSSQN.	40

から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 4 2 のペプチド。

【請求項 4 4】

以下のアミノ酸配列：

【化 1 4】

B14 QTTVTGQASHTTSSLTGLFSPGASQK ;
 B33 ATHATGGQAAHSTHSLTSLFSPGASQK ;
 F81 QTHVTGGSAAHQTGGLTGLFSPGPKQN ;
 B18 QTTVVGGQASHVSRLTGLFSPGSSQK ;
 E19 TTHTGGQQAHTTSRLVSLFSPGASQK ;
 L72 QTTTAAHTTSGLTGLFSPGAKQN ;
 D20 QTHVTGVAGRQTSGLVSLFSPGSSQN ; 及び
 D30 QGGVQGHTTSSLVGLFSPGSQQN .

10

のいずれかであるペプチド。

【請求項 4 5】

請求項 4 2 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載のペプチドを含有する組成物。

【請求項 4 6】

請求項 4 2 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の複数のペプチドを含有する組成物。

20

【請求項 4 7】

前記ペプチドが、さらなるアミノ酸と融合している請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載のペプチド。

【請求項 4 8】

前記融合が、H V R 1 位置において、前記ペプチドと、前記ペプチドを有する H C V E 2 / N S 1 タンパク質からなる、請求項 4 7 に記載のペプチド。

【請求項 4 9】

請求項 4 8 に記載の前記融合体を含む組み換え H C V。

【請求項 5 0】

少なくとも 1 つの付加的構成成分を含有する請求項 4 5 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 5 1】

請求項 4 1 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の前記ペプチド、及び製薬上許容可能な賦形剤を含有する組成物。

【請求項 5 2】

請求項 4 1 ~ 4 3 及び 4 7 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の 1 以上の前記ペプチド、及びアジュバントを含む組成物。

【請求項 5 3】

請求項 4 1 ~ 4 3、及び 4 7 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする核酸。

40

【請求項 5 4】

コードされたペプチドの発現のために調節配列を作用可能に連結する請求項 5 3 に記載の核酸。

【請求項 5 5】

請求項 5 4 の核酸を含有する宿主細胞。

【請求項 5 6】

請求項 5 4 の核酸から発現させることを包含するペプチドの製造方法。

【請求項 5 7】

前記ペプチドの産生のための条件下で請求項 5 5 に記載の宿主細胞を培養することを含んで成るペプチドの製造方法。

50

【請求項 5 8】

前記ペプチドの単離および／または精製をさらに含んで成る請求項 5 6 または 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記 1 または複数のペプチドを少なくとも 1 つの付加的構成成分を含有する組成物に製剤化することを含んで成る請求項 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記ペプチドが製薬上許容可能な賦形剤を含有する組成物に製剤化される、請求項 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記ペプチドがアジュバントを含有する組成物に製剤化される請求項 5 6 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 2】

2 以上の HCV 株の HVR1 のエピトープに結合可能な結合部位を含有する 1 又は複数の抗体分子の産生方法であって、抗体分子の集団および請求項 4 1 ～ 4 3 及び 4 7 ～ 4 8 のいずれか 1 項に記載の 1 以上のペプチドを抗体分子の集合と接触させ、そして前記 1 以上のペプチドの少なくとも 1 以上を結合できる集合の 1 又は複数の抗体分子を選択することを含んで成る、方法。

【請求項 6 3】

前記 1 または複数のペプチドを非ヒト哺乳類に投与して、そして当該 1 又は複数のペプチドに結合し得る 1 又は複数の抗体分子を哺乳類から単離する、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記 1 または複数のペプチドを非ヒト哺乳類に投与して、当該 1 または複数のペプチドの少なくとも 1 以上に結合し得る 1 以上の抗体分子を産生する細胞を哺乳類から単離する請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記細胞またはそれらの子孫が、当該 1 以上の抗体分子を産生する条件下で培養される請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記哺乳類が屠殺される請求項 6 3 ～ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

抗体分子の集団がバクテリオファージ粒子の表面に表示され、各粒子がその表面に表示される抗体分子をコードする核酸を含有する請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記 1 または複数のペプチドを結合し得る抗体分子を提示するバクテリオファージ粒子から核酸を単離することをさらに含んでなる、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記単離された核酸からの発現により、抗体分子をさらに生成することを含んでなる、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記 1 又は複数の抗体が、製薬上許容可能な賦形剤を含有する組成物に製剤化される、請求項 6 2 及び 6 3 ～ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 1】

HCV HVR1 エピトープを結合し得る抗体を哺乳類中で生じさせるための薬剤の製造における請求項 2 9 ～ 4 0 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 7 2】

HCV HVR1 エピトープを結合し得る抗体を哺乳類中で生じさせるための薬剤の製造における請求項 4 1 ～ 4 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドの使用。

【請求項 7 3】

10

20

30

40

50

HCV HVR1エピトープを結合し得る抗体を哺乳類中で生じさせるための薬剤の製造における請求項 4 5 に記載の組成物の使用。

【請求項 7 4】

HCV HVR1エピトープを結合し得る抗体を哺乳類中で生じさせるための薬剤の製造における請求項 5 3 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の核酸の使用。

【請求項 7 5】

HCV HVR1エピトープを結合し得る抗体を哺乳類(ヒトを除く)中で生じさせる方法であって、請求項 2 9 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の組成物を哺乳類(ヒトを除く)に投与することを含んで成る方法。

【請求項 7 6】

HCV HVR1エピトープを結合し得る抗体を哺乳類(ヒトを除く)中で生じさせる方法であって、請求項 4 1 ~ 4 3 及び 4 7 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載のペプチドを哺乳類(ヒトを除く)に投与することを含んで成る方法。

【請求項 7 7】

HCV HVR1エピトープを結合し得る抗体を哺乳類(ヒトを除く)中で生じさせる方法であって、請求項 5 1 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の組成物を哺乳類(ヒトを除く)に投与することを含んで成る方法。

【請求項 7 8】

HCV HVR1エピトープを結合し得る抗体を哺乳類(ヒトを除く)中で生じさせる方法であって、請求項 5 3 又は 5 4 のいずれか 1 項に記載の核酸を哺乳類(ヒトを除く)に投与することを含んで成る方法。

【請求項 7 9】

予防的である請求項 7 5 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

哺乳類(ヒトを除く)がHCV感染を有する請求項 7 5 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ペプチド、特に C 型肝炎ウイルス (HCV) の推定上のエンベロープタンパク質 E 2 の超可変部 1 (HVR1) のミモトープ (mimotope) であるペプチドに関する。技術の組合せを用いて、天然HVR1配列のコンセンサス分析、および天然ではそのいずれのペプチドも生じない、異なる単離体に対する抗体との交叉反応性の実験的確定を基礎にした配列を有する多数のペプチドを、本発明者は創案した。ペプチドは、in vitro (例えば診断的) および in vivo 目的のために抗体を生じさせそして得るのに個々に有用であり、ペプチドのライブラリーは、異なるHCV 株の複数のHVR1を結合し得る抗体との特定の交叉反応性についてペプチドを同定する場合に有用である。ペプチドは、それ自体で、または融合タンパク質の一部として、例えば組換え体HCV 粒子中に組み込まれ得る組換え体HCV E2ポリペプチドにおいて用い得る。

【0002】

HCV のHVR1領域は、全ウイルスゲノム中で最も可変性の抗原断片であり、主として感染ウイルスの個体間および個体内の大きな不均一性に関与する。それは、主要中和エピトープを含有し、宿主免疫反応からの逸脱のメカニズムにおいて大きな役割を演じるものであると提案されている。抗HVR1抗体は、今日まで防御活性を保有することが示された唯一の種であるため、有効な予防療法の開発は非常に難しい仕事である。

【0003】

本発明を創案する場合、発明者は、異なるウイルス単離物からの 200 以上のHVR1配列からコンセンサスプロフィールを引き出すことによりHVR1変動性の問題にアプローチし、このコンセンサスを合成HVR1代用物の多大な貯蔵所を生成するための鑄型として用いた。これらは、バクテリオファージ粒子の表面に表示するための M 13 バクテリオファージの主要コートタンパク質 I I I との融合物として提供された。このライブラリーは、感染患者

10

20

30

40

50

からの多数の異なる血清を用いてアフィニティー選択された。患者の血清と高頻度の反応性を示すが、非感染対照からの血清とは高頻度の反応性を示さないファージが同定された。選定配列は、天然HCV 変異体からHVR1を再生産するペプチドの大型パネルと交叉反応する血清抗体を結合することが示された。

【0004】

これらの「ミモトープ」では、観察された交叉反応性に関与する配列パターンが同定された。実験動物に注入されると、最高の交叉反応性を有するミモトープは、天然HVR 変異体の同一パネルを認識し得る抗体を誘導した。

【0005】

C型肝炎ウイルス (HCV) は、全世界的な輸血関連および散発性の両方の非 A 非 B 肝炎の主な病因であり、血液供与者集団の有病率は 0.4 ~ 2 % であると概算される (Choo et al., 1989)。HCV 感染は、少なくとも 70 % の症例にウイルス存続および慢性疾患をもたらし、この中で、有意の割合がついには肝硬変および肝細胞癌を発症する (総説のためには H. Alter, 1995 参照)。HCV 診断のための信頼できる血清学的試験の有効性にもかかわらず、全世界的に、コミュニティ獲得性感染が依然として一般的で、有意の罹病率および死亡率を引き起こす (Mast and Alter, 1993)。さらに、現時点で利用可能な唯一の抗ウイルス療法であるインターフェロン治療は、患者の 20 ~ 30 % に有効であるに過ぎない (Fried and Hoofnagle, 1995)。したがって、HCV ワクチンの開発は、本分野では高度の優先プロジェクトを代表するものである。

【0006】

広範な体液性および細胞性宿主免疫応答にもかかわらず、ウイルスが存続性感染を確立する高頻度は、HCV に対する防御免疫の存在についていくつかの問題を過去に提起した (Farci et al., 1992)。實際上、同種ウイルスを用いた試験に対する防御免疫は、推定上のエンベロープタンパク質 E1 および E2 の組換え体形態を用いて、チンパンジー (HCV 感染に罹りやすい唯一のその他の種) のワクチン接種により誘導され得た (Choo et al., 1994)。しかしながら、この応答が異種ウイルス接種物に対してどれだけ有効であるかは未だ確定されていない。

【0007】

HCV は、主に免疫圧力 (immune pressure) (Weiner et al., 1992; Kato et al., 1993; Kojima et al., 1994; Shimizu et al., 1994; van Doorn et al., 1995; Weiner et al., 1995) の結果として疾病の経過中に変動するクアシスペシス (quasispecies) として (Weiner et al., 1991; Martell et al., 1992; Martell et al., 1994; Kurosaki et al., 1994; Bukh et al., 1995)、感染患者の血流中に存在する。明らかに成りつつある見解は、HCV による慢性感染が体液性または細胞性応答の欠乏のためではなく、むしろこのような応答がウイルスの高突然変異率により無効にされるためで、これが逸脱変異体 (escape variant) の出現をもたらす、というものである。

【0008】

中和抗体の存在およびウイルス感染からの防御におけるそれらの役割は、チンパンジーに注入する前に血統の明らかなウイルス接種物の ex vivo 中和により実証された (Farci et al., 1994)。それにもかかわらず、この中和抗体は単離物特異的で、対応する体液性応答の開始前に存在したウイルス変異体だけを遮断し得ると思われる (Farci et al., 1994)。このような中和抗体の特異性が十分明らかにされていない場合でも、免疫学的および分子的証拠はともに、中和抗体により認識されるエピトープが HCV ゲノムの超可変部 1 (HVR1) に局在することを示す (Farci et al., 1994)。これは、全体的 HCV ポリタンパク質の最も可変性の領域である E2 糖タンパク質の N 末端 27 アミノ酸から成る。ウイルスクリアランスにおける抗 HVR1 抗体の役割に関する直接的証拠は近年、ex vivo 中和実験から得られた。感染性 HCV 接種物の優勢変異体に対して生じたウサギ抗 HVR1 高度免疫血清は、あるチンパンジーにおけるその感染性を無くし、接種物中に存在する主要変異体の増殖を遮断することにより第二代目の動物を部分的に防御した (Farci et al., 1996)。

【0009】

したがって、証拠は、HVR1がHCV に対する主要中和決定因子を含有し、その変動性の問題を克服し得る場合、それが無細胞HCV ワクチンの必須構成成分を構成するにちがいないということである。この問題に関連するのは、ヒト血清からの抗HVR1抗体が異なるHVR1変異体に対してある程度の交叉反応性を示すという観察である (Scarsell et al., 1995)。

【 0 0 1 0 】

W O 94/26306 (Chiron Corporation) は、1993年5 月12日のものと同様であると分かっていたといわれる9 0 株に関する配列比較を基礎にして、HCV のHVR1内のコンセンサス配列を同定する試みを開示する。開示された式は、以下の配列を含むペプチドのものである：aa1-aa2-aa3-aa4-aa5-aa6 (ここで、aa1 は S、G、A、D、K、R または T であり；aa2 は L、F、I、M または W であり；aa3 は F または L であり；aa4 は任意のアミノ酸であり；aa5 は任意のアミノ酸であり；aa6 は G または A である；が但し、そのモチーフは1993年5 月12日までにHCV 単離物の天然 E 2 H V ドメインの3 1 アミノ酸内に含入されない)。さらなる実施態様では、aa7 が存在して、aa6 に結合されており、aa7 は A、P または S である。6 アミノ酸モチーフは、約55,000の異なる配列を示す。7 アミノ酸モチーフは、約165,000 の異なる配列を示す。

【 0 0 1 1 】

本発明の局面は、HVR1のいくつかの位置が他の位置より低可変性であることを明示し、これは実際の構造的および免疫学的変動性が一次配列における異種性により示唆されるよりもさらに限定されることを示唆するHVR1の変動性の厳密な検査を一部基礎にしている。本発明は、種々の局面において、複数の、好ましくは多数の天然HVR1変異体と免疫学的に同様であり、したがって、異なるHCV 変異体の、好ましくはほとんどまたはすべてと交叉反応する中和抗体を誘導するために用い得るHCV HVR1の「合成変異体」の提供に関する。下記でさらに説明するように、本発明のペプチドに関して到達された式は、W094/26306で提供されたものとは異なり、配列比較によるよりもむしろ、実際の交叉反応性評価に基づいている。

【 0 0 1 2 】

ペプチドライブラリーを表示したファージは、周期的選択 / 救済 / 増幅手法によりペプチド配列の大型コレクション (10^8 またはそれ以上) を迅速に探索する独特の機会を提供する。それらは、線状ペプチドから折り畳まれたタンパク質ドメインまで、そして炭水化物でさえも範囲の任意の種類の連結物に関するリガンドの同定を可能にする (Cortese et al., 1994、Cortese et al., 1996)。これらのリガンドは、それらが元のエピトープの同一アミノ酸配列を必ずしも共有しないが、しかしそれらはその結合特性が類似するので、真のミモトープである。

【 0 0 1 3 】

免疫および非免疫個体からの臨床的に特性化された血清のみを利用する、疾病特異的ファージ表示ミモトープの同定のための戦略が過去に報告されている (Folgori et al., 1994、この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる)。さらに、良好な免疫原性であることが立証された疾病特異的ミモトープは、それらは異なる動物に注入された場合に天然抗原に対して特異的免疫応答を誘導することができたので、天然抗原によく似ている (Folgori et al., 1994 および Meola et al., 1995 (ともにその記載内容は、引用により本明細書中に含まれる)、Prezzi et al., 1996、Mecchia et al., 1996)。したがって、ファージライブラリーは、疾病特異的抗体により認識される人工リガンドの供給源として用いられ、付加的に望ましい特徴が作られるという利点を有するが、但し、それらはライブラリー濃厚化中に選択され得る。

【 0 0 1 4 】

本発明を行うに際して、発明者は、バクテリオファージM13 の主要コートタンパク質 (pV III) との融合物としてHVR1代用物の多大な貯蔵を作ることにより、HVR1変動性の問題にアプローチした。選択力および臨床的に特性化されたHCV 感染個体からの多数の血清を用いて、多数の天然HCV 変異体の良好な抗原性および免疫原性類似体であることが明示されたペプチドを単離した。

【 0 0 1 5 】

実験の詳細を以下に示す。

本発明の種々の局面によれば、個々のペプチドが複数のHCV HVR1エピトープと交叉反応性であるエピトープを含有する多数の異なるペプチド、ならびにこのような異なるペプチドの混合物を含有するペプチドのライブラリーが提供される。本発明の一局面は、以下のコンセンサスプロフィールと一致するペプチドのライブラリーを提供する：

【 0 0 1 6 】

【 化 8 】

Q T H V T G G S A A R T T S G L T S L F S P G A S Q N

10

T T T V V Q G H A A H S V G R L P K K

R Q V S Q V R R R S S Q

Q

【 0 0 1 7 】

このプロフィールは、 9×10^7 の個々の配列の全体、即ち今日のDNAクローニングおよび形質転換技術の実施上限（約 10^8 ）に非常に近い数字を表す。後述するように、このコンセンサスプロフィールは、M13 に関してファージミドベクター中で主コートタンパク質（pVIII）をコードする遺伝子の5'末端との融合物として縮重合成オリゴヌクレオチドをクローニングすることにより27aaペプチドライブラリーの構築に用いられた。ライブラリーはヒト血清を用いて広範にスクリーニングされ、 100 より多い異なるクローン（ミモトープ）がそれらの特徴に関して選択されて、ヒト抗HCV-HVR1抗体を特異的に認識した。ほぼすべてのこれらのミモトープが異なるアミノ酸配列を有し、そのどれもが、発表済み（98年1月まで）の天然HVR1に対応することが見出されなかった。

20

【 0 0 1 8 】

本発明のペプチドライブラリーの好ましい実施態様では、少なくとも約 10^5 の、好ましくは少なくとも約 10^6 の、さらに好ましくは少なくとも約 10^7 の、例えば約 9×10^7 の異なるペプチドが存在する。ペプチドのライブラリーは、バクテリオファージ、特に糸状バクテリオファージ、例えばfdまたはM13の表面に、例えばこのようなバクテリオファージの主コートタンパク質（pVIII）との融合物として、表示され得る。ペプチドのファージ表示は当業界では標準であり、その力は、その表面に表示されるペプチドをコードする核酸が各粒子内にパッケージされるようにバクテリオファージ粒子が構築されるという事実にある。1つ又はそれ以上の抗体（例えば、HCVの異なる系統のHVR1の多数のエピトープを結合し得る抗体）を結合し得るペプチドのような当該ペプチドを表示するファージ粒子の選定後、表示ペプチドをコードする核酸が回収され、そのアミノ酸配列を有するさらなるペプチドの産生に使用され得る。

30

【 0 0 1 9 】

下記の実験作業において、本発明者はヒト血清のパネルを用いて本発明のライブラリー中のミモトープを試験し、血清との反応性の異なる全体的頻度を有するものとして個々のミモトープを特徴付けた。3未満の血清と反応しただけの24のクローンは「弱」と定義され、一方11より多い血清と反応する27のクローンは「強」と定義した。

40

「強」および「弱」クローンのコンセンサス配列の統計的分析により、ヒト血清との高頻度反応と相関するHVR1の配列モチーフ、ヒト抗HVR1抗体との交叉反応性ならびに実験動物における高交叉反応性血清の誘導が発見された。

本発明のペプチドおよびそれらの混合物は、以下のように定義され得るが、これは後述の実験の項でさらに詳細に説明する：

【 0 0 2 0 】

50

(1) 次式 (「 式 I 」) により詳細に説明されるペプチドのライブラリー :

【化 9】

Q T H V T G G S A A R T T S G L T S L F S P G A S Q N
 T T T V V Q G H A A H S V G R L P K K
 R Q V S Q V R R R S S Q
 Q

10

【 0 0 2 1 】

これは以下のように表記し得る :

(aa1)T(aa3)(aa4)(aa5)GG(aa8)(aa9)(aa10)(aa11)(aa12)(aa13)(aa14)(aa15)L(aa17)(aa18)LF(aa21)(aa22)G(aa24)(aa25)Q(aa27)

(式中、aa1 は Q または T であり ; aa3 は H、T または R であり ; aa4 は V または T であり ; aa5 は T または V であり ; aa8 は S、V または Q であり ; aa9 は A、Q または V であり ; aa10 は A、G または S であり ; aa11 は R または H であり ; aa12 は T、A または Q であり ; aa13 は T、A または V であり ; aa14 は S、H または R であり ; aa15 は G、S または R であり ; aa17 は T または V であり ; aa18 は S、G または R であり ; aa21 は S または R であり ; aa22 は P、L、S または Q であり ; aa24 は A、P または S であり ; aa25 は S、K または Q であり ; aa27 は N または K である) 。

20

(2) このようなライブラリーから得られる 27 の「強」ペプチドは本発明の種々の観点の好ましいペプチドであり、以下のようなアミノ酸配列を有する :

【 0 0 2 2 】

【化 10】

2.11 QT H TVGGVQG R QAHS LT S LF S P G A SQN
 D6 QT T TTGGQVS H ATHGLT G LF S L G P QQK
 D18 QT H TTGGSAS H QASGLT R LF S Q G P SQN
 F63 QT H VVGQQG R QVSSLV S LF S P G A SQK
 G31 TT H TVGGSVA R QVHSLT G LF S P G P QQK
 L13 QT H TVGGSQA H AAHSLT R LF S P G S SQN
 M69 QT T VVGGSQA R AAHGLV S LF S L G S KQN
 Z61 QT H VVGGVQG R QTSGLV G LF S P G S KQN
 R9 QT T VVGGSQS H TVRGLT S LF S P G A SQN
 B26 TT T TTGGQAG H QAHS LT S LF S P G A SQK
 B22 QT H VVGGVQS H QTSGLT S LF S P G A SQK
 B35 QT H TTGGVQG H QTSRLT S LF S P G P SQN
 D29 TT T VVGQA H QTHSLT S LF S P G A KQN
 D33 TT T TTGGQQS H TVHGLV G LF S P G S KQN
 E26 QT H TVGGVQA H TVRGLT S LF S P G S SQN
 F80 QT H TTGGQAG H TASSLT G LF S P G A KQN
 F19 QT T TVGGVAS H QAHS LT G LF S P G A KQK
 F78 QT H TTGGQAG H QAHS LT G LF S P G A KQN
 H1 QT H TTGGVVG H ATSGLT S LF S P G P SQK

10

20

30

【 0 0 2 3 】

【 化 1 1 】

L76 TT T TVGGQAS H QTSSLT G LF S P G S KQN
M27 QT T TTGGVAS H AAHRLT S LF S P G P QQK
M122 QT T TTGGSAS H AVSSLT G LF S P G S KQN
M129 QT T VVGGSAG H TASSLV G LF S P G S KQN
M119 TT T TVGGQAS H TTSSLT G LF S P G S QQN
R5 QT H TTGGQAS H QVSSLV S LF S P G A KQK
R6 TT T TTGGQVG H QTSGLT G LF S P G A QQN
R27 TT H VVGGSAS H AVRGLT S LF S P G S SQN

10

【 0 0 2 4 】

本発明のさらに好ましいペプチドは、以下の配列のいずれかを有する：

【 化 1 2 】

20

B14 QT T VTG_QAS H TTSSLT G LF S P G A SQK
B33 aT H aTGGQAA H STHSLT S LF S P G A SQK
F81 QT H VTGGSAA H QTgGLT G LF S P G P KQN
B18 QT T VVGQAS H _VSRLT G LF S P G S SQK
L72 QT T T____AA H TTSGLT G LF S P G A KQN
D20 QT H VTG_VAG R QTSGLV S LF S P G S SQN
D30 Q_ _ _GGVQG H TTSSLV G LF S P G S QQN
E19 TT H T_GGQQA H TTSRLV S LF S P G A SQK
B24 TT T TVGGQAS H TTSSLT G LF S P G A SQK
M63 QT H TTGGVVS H QTRSLV G LF S P G P QQN

30

40

【 0 0 2 5 】

下方の文字は式 1 から変化したアミノ酸残基を特定するために用いられ、一方、下線を施した空間は、式 1 と比較した場合に欠失を意味するためであるが、くっつけて表記したアミノ酸はもちろん、関連ペプチド内で連続している。

これらは本発明のライブラリーから得られるペプチドの変異体であり、それ自体は式 I と一致しない。それらは、下記で確認された実験の途中で同定されたもので、ライブラリー増幅中の PCR エラーにより生じた（材料と方法「HVR1ライブラリーの構築」参照）。

【 0 0 2 6 】

（ 3 ）前記（ 2 ）の高交叉反応性ペプチドのコンセンサスから得られた「強コンセンサス

50

」(「式ⅠⅠ」)。

25「弱」の頻度と比較した場合の27「強」の任意の位置のaaの頻度の統計的分析を表ⅠⅠに示し、実験の項でさらに考察する。

【0027】

式ⅠⅠ：

QT(aa3)TVGGQQS(aa11)QVHSLT(aa18)LF(aa21)(aa22)G(aa24)SQN

(式中、aa3はHまたはTであり；aa11はHまたはRであり；aa18はG、SまたはRであり；aa21はSであり；aa22はP、LまたはQであり；aa24はA、SまたはPであって、これは以下のように表記される：

【0028】

【化13】

10

QT H TVGGQAS H QASSLT S LF S P G A KQN

T

R

G

L

S

R

Q

P

【0029】

イタリック体で示した残基は、それらは低頻度を有するがしかし試験した最良反応性ミモトープ(前記ⅠⅠにおいて27「強」ペプチド中で星印で目立たせた)のいくつかで見出されるために、含めた。

式ⅠⅠを導くために用いた27ミモトープはその中にある。

108個のペプチドが式ⅠⅠと一致し、各々が本発明の1つの観点である。その配列を以下に示す：

【0030】

【化14】

20

30

40

21 QTHTV GGQAS HQASS LTRLF SPGPK QN
22 QTHTV GGQAS HQASS LTRLF SLGAK QN
23 QTHTV GGQAS HQASS LTRLF SLGSK QN
24 QTHTV GGQAS HQASS LTRLF SLGPK QN
25 QTHTV GGQAS HQASS LTRLF SQGAK QN
26 QTHTV GGQAS HQASS LTRLF SQGSK QN
27 QTHTV GGQAS HQASS LTRLF SQGPK QN
28 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SPGAK QN
29 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SPGSK QN
30 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SPGPK QN
31 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SLGAK QN
32 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SLGSK QN
33 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SLGPK QN
34 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SQGAK QN
35 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SQGSK QN
36 QTHTV GGQAS RQASS LTSLF SQGPK QN
37 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SPGAK QN
38 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SPGSK QN
39 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SPGPK QN
40 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SLGAK QN

10

20

30

【 0 0 3 2 】

【 化 1 6 】

40

41 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SLGSK QN
42 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SLGPK QN
43 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SQGAK QN
44 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SQGSK QN
45 QTHTV GGQAS RQASS LTGLF SQGPK QN
46 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SPGAK QN
47 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SPGSK QN
48 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SPGPK QN
49 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SLGAK QN
50 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SLGSK QN
51 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SLGPK QN
52 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SQGAK QN
53 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SQGSK QN
54 QTHTV GGQAS RQASS LTRLF SQGPK QN
55 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SPGAK QN
56 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SPGSK QN
57 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SPGPK QN
58 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SLGAK QN
59 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SLGSK QN
60 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SLGPK QN

10

20

30

【 0 0 3 3 】

【 化 1 7 】

40

61 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SQGAK QN
62 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SQGSK QN
63 QTTTV GGQAS HQASS LTSLF SQGPK QN
64 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SPGAK QN
65 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SPGSK QN
66 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SPGPK QN
67 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SLGAK QN
68 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SLGSK QN
69 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SLGPK QN
70 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SQGAK QN
71 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SQGSK QN
72 QTTTV GGQAS HQASS LTGLF SQGPK QN
73 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SPGAK QN
74 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SPGSK QN
75 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SPGPK QN
76 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SLGAK QN
77 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SLGSK QN
78 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SLGPK QN
79 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SQGAK QN
80 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SQGSK QN

10

20

30

【 0 0 3 4 】

【 化 1 8 】

40

81 QTTTV GGQAS HQASS LTRLF SQGPK QN
82 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SPGAK QN
83 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SPGSK QN
84 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SPGPK QN
85 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SLGAK QN
86 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SLGSK QN
87 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SLGPK QN
88 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SQGAK QN
89 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SQGSK QN
90 QTTTV GGQAS RQASS LTSLF SQGPK QN
91 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SPGAK QN
92 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SPGSK QN
93 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SPGPK QN
94 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SLGAK QN
95 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SLGSK QN
96 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SLGPK QN
97 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SQGAK QN
98 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SQGSK QN
99 QTTTV GGQAS RQASS LTGLF SQGPK QN
100 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SPGAK QN

10

20

30

【 0 0 3 5 】

【 化 1 9 】

40

101 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SPGSK QN
 102 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SPGPK QN
 103 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SLGAK QN
 104 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SLGSK QN
 105 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SLGPK QN
 106 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SQGAK QN
 107 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SQGSK QN
 108 QTTTV GGQAS RQASS LTRLF SQGPK QN

10

【 0 0 3 6 】

20

(4) 式 I I の配列を含めた式 I のライブラリー内のペプチドのさらなるライブラリー、
 2.5×10^6 の配列を定義し、以下の式 I I I と一致する：

【 化 2 0 】

Q T H T V G G Q A S H Q A S S L T S L F S P G A K Q N
 T T V T S Q G A T H G V G S S K
 V V A T V R R P Q

30

【 0 0 3 7 】

本発明のペプチドは、付加的アミノ酸との融合体で提供され得る。付加的アミノ酸は、ペプチドのN末端およびC末端の一方または両方で融合される。付加的アミノ酸はHCV E2タンパク質の断片でないアミノ酸配列であり得るか、またはそのタンパク質の一部であるアミノ酸配列であり得る。さらに、本発明のペプチドを含めた融合体は、HVR1位置に該ペプチドアミノ酸配列を有するHCV E2/NS1タンパク質を含み得る。即ち、本発明のミモトープHVR1ペプチドは天然HVR1配列に取って代わる。これを表現する別の方法は、「本発明のペプチドがHVR1に取って代わる組換えHCV E2/NS1タンパク質」と呼ばれるものである。

【 0 0 3 8 】

40

下記のように、本発明のペプチドおよびポリペプチド（融合体を含む）をコードする核酸は、本発明のペプチドがHVR1に取って代わる組換えHCV E2/NS1タンパク質の産生、ならびに集合HCV 粒子中への組換えタンパク質の組み入れを提供するために、例えばE2/NS1コード配列内に本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列を含めた組換えHCV ゲノムであり、本発明のさらなる観点として提供される。本明細書中に開示したような1つ又はそれ以上のペプチドまたはポリペプチドを含めた組合せHCV 粒子は、本発明のさらなる観点として提供される。

一般に、本発明のペプチドは免疫原性であるか、または個体への投与時に免疫応答を生じ得るか、あるいはHCV の複数の系統のエピトープと免疫学的に交叉反応性であるエピトープを含む。

50

【 0 0 3 9 】

本発明の別の観点は、HCV 株のHVR1中のエピートープと免疫学的に交叉反応性であるエピートープを含有する1つ又はそれ以上のペプチドを得るための方法であって、開示したようなペプチドのライブラリーと、HCV 株の前記のHVR1と結合し得る抗体分子とを接触させ、そして前記の抗体分子に結合し得るライブラリーの1つ又はそれ以上のペプチドを選択することを含んで成る方法を提供する。選択される単数または複数のペプチドは、HCV の複数の株のHVR1と免疫学的に交叉反応性であるエピートープを含有し得る。

【 0 0 4 0 】

このような方法は、ペプチドのライブラリーと、HCV の複数の株のHVR1を集合的に結合し得る複数の抗体分子とを接触させることを含んで成る。一実施態様では、前記の複数の抗体分子は、HCV に感染した個体の血清から得られる。

10

前述したように、前記のライブラリーはバクテリオファージ粒子の表面に表示され、各粒子はその表面に表示されるペプチドをコードする核酸を含有する。選択後、前記の選択されたペプチドを表示するバクテリオファージ粒子から、核酸が採取される。前記の選択されたペプチドを表示するバクテリオファージ粒子から採取された核酸の配列を有する核酸は、発現によりこのようなペプチドの産生に用い得る（当業界での標準として、そしてさらに後述する組換えDNA技術を使用）。

【 0 0 4 1 】

前記の選択されたペプチドのアミノ酸配列を有するペプチドは、例えばコード核酸からの発現によるその産生後に、単離形態で提供され得る。さらに後述するように、本発明の1つ又はそれ以上のペプチドは、ペプチド合成により提供され得る。

20

選択された異なるペプチドのアミノ酸配列を各々有する複数のペプチドは、別々にまたは混合物中に、単離形態で提供される。

選択された1または複数のペプチドは、各々、前記の式IIのアミノ酸配列を有する。式IIの108の異なるペプチドはすべて、混合物として提供され、さらに各々は別々に本発明の一局面を表す。これら108のペプチドは各々、多数のHCV 株のE2/NS2タンパク質のHVR1においてエピートープと交叉反応性である高い確率を有し、したがって抗体を得るために、そうでなければ免疫応答を生じるために特に有用である。

【 0 0 4 2 】

本発明の組成物は、式IIの108のペプチドの混合物から得られる複数のペプチドを含み得る。このような組成物は、前記の混合物から得られる2～約20、15、10、9、8、7、6、5、4または3つの異なるペプチドを含み得る。

30

混合物中にまたは別々に提供され得る好ましいペプチドとしては、G31、F78、R9、D6、M122およびH1と呼ばれるものが挙げられる。これらのアミノ酸配列は、図7(A)に示されている。

好ましい混合物は、ペプチドR9、F78、H1およびD6を含み（「ミックス1」）、ペプチドM122およびG31（「ミックス2」）を含み、またはペプチド31、F78、R9、D6、M122およびH1（「ミックス3」）を含む。

【 0 0 4 3 】

本発明の各ペプチドとHCV 株のHVR1との免疫学的交叉反応性は、以下で例示するように、実験的に査定され得る。これらのペプチドの種々の混合物が作製され、以下で実験的に例示するように同様に試験され得る。

40

本発明の直鎖または分枝鎖（例えばMAP）ペプチドおよびポリペプチド（例えば前記のようなペプチドを含めた融合分子）は、当業者の思い通りの種々の技術のいずれかを用いて製造され得る。

直鎖または分枝鎖ペプチドは、標準ペプチド化学を用いて、例えばAtherton and Sheppard (1989), Solid Phase Peptide Synthesis, a Practical Approach, IRL Press, Oxfordに記載されているようなFmoc（フルオレニルメトキシカルボニル）t-Bu（tert-ブチル）を用いる一般法により、合成され得る。

【 0 0 4 4 】

50

本発明のペプチドまたはポリペプチドを生成するための便利な方法は、発現系においてそれをコードする核酸を用いることにより、その核酸を発現することである。

したがって、本発明は、（開示したような）ペプチドまたはポリペプチドの製造方法であって、ペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸（一般的に本発明の核酸）からの発現を含めた方法も含む。これは、ポリペプチドの発現を引き起こすかまたは可能にする適切な条件下でこのようなベクターを含有する宿主細胞を培養液中で増殖させることにより便利に成し遂げられる。ペプチドおよびポリペプチドは、網状赤血球溶解物のような *in vitro* 系でも発現され得る。

【0045】

本発明のペプチドおよびポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のさらなる観点を示す。1つの観点において、開示したようなペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。さらに別の観点では、開示したような融合物、特にHVR1ーに本発明のペプチドのアミノ酸配列を含むHCV E2/NS1タンパク質をコードするポリヌクレオチドが提供される。さらに別の観点では、本発明のペプチドまたは開示したような融合体、特にHVR1に関連ペプチドアミノ酸配列を有するHCV E2/NS1タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する組換えHCV ゲノムが提供される。

さらに別の観点では、本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードする複数のヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドが提供される。これは、単一発現反応におけるペプチドまたはポリペプチドの混合物の産生を可能にする。

【0046】

本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸は、治療的または予防的のためにヒト個体のような哺乳類で、またはこのような目的のために非ヒト哺乳類で免疫応答を起こすために、あるいはその後の操作および/または使用（例えば、さらに後述するような診断的または治療的状况で）のための抗体を産生するために、核酸免疫感作に用いられる。

【0047】

本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸は、HCV 感染の予防および/または治療における遺伝子療法の方法に用いられる。これは、発現のための適切な調節要素の使用、ならびに宿主細胞への発現ユニット（コード配列および調節要素）の輸送のための適切なベクターを要する。ウイルスベクターおよびプラスミドベクターの両方の種々のベクターが、当業界で知られている（例えば米国特許第5,252,479号およびWO 93/07282参照）。特に、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、例えばHSV およびEBV、ならびにレトロウイルスを含めた多数のウイルスが遺伝子運搬ベクターとして用いられてきた。従来技術の多数の遺伝子療法プロトコルは、無力化ネズミレトロウイルスを用いてきた。種々のアデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスベクターが開発されてきた。ウイルスベクターの代替物としては、リポソームおよび直接DNA取込みによる運搬媒介、ならびに受容体介在性DNA運搬が挙げられる。

【0048】

本発明のペプチドまたはポリペプチド（またはそれらの混合物）をコードする核酸を含有する宿主は、それ自体、HCV 感染のためのまたはそれに対する個体の治療的または予防的処置（即ちHCV 感染を有する個体の治療的処理またはHCV 感染前の個体の予防的処置）に用い得る。

核酸は一般に、DNAまたはRNAとして提供されるが、しかし1つ又はそれ以上のヌクレオチド類似体を含有し得るし、全体的にまたは部分的に合成し得る。本発明の核酸分子およびベクターは、単離および/または精製形態で、例えば実質的に純粋なまたは均質の形態で提供され得る。「単離物」という用語は、これらの可能性のすべてを反映するように用いられる。例えば形状に関して、DNA配列が特定される場合、RNA等価物を要する状況でない限り、UがTに取って代わるということが起こることも包含される。

【0049】

コード核酸からペプチドまたはポリペプチドを発現するのが望ましい場合、核酸は適切な

10

20

30

40

50

調節制御配列を含む。適切な調節配列、例えばプロモーター配列、ターミネーター断片、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー配列および適切な場合にはその他の配列を含有する適切なベクターが選択されるかまたは構築され得る。ベクターは、プラスミド、ウイルス、例えば「ファージ」、または適切な場合にはファージミドであり得る。さらなる詳細に関しては、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press を参照されたい。例えば、核酸構築物の調製、突然変異誘発、配列決定、DNAの細胞中への導入および遺伝子発現における核酸の操作、ならびにタンパク質の分析に関する多数の既知の技術およびプロトコルは、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992 に詳細に記載されている。

10

【0050】

種々の異なる宿主細胞中でのポリペプチドのクローニングおよび発現のための系が周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、真核生物細胞、例えば哺乳類、酵母菌、ならびにバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドの発現のために当業界で利用可能な哺乳類細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ハムスター乳仔腎細胞、COS細胞および多数のその他の細胞が挙げられる。一般的な好ましい細菌宿主は、大腸菌である。

【0051】

本発明のさらに別の観点は、本明細書中に開示したような核酸を含有する宿主細胞を提供する。本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば染色体）中に組み込まれ得る。組み込みは、標準技法にしたがって、ゲノムによる組換えを促進する配列の含入により促され得る。核酸は、細胞内の染色体外ベクター上に存在し得る。

20

【0052】

さらに別の観点は、核酸を宿主細胞中に導入することを含む方法を提供する。（特にin vitro導入に関して）一般的に「形質転換」のような制限を伴わないといわれている導入は、任意の利用可能な技術を用い得る。真核生物細胞に関しては、適切な技術としては、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン、電気穿孔、リポソーム媒介性トランスフェクション、およびレトロウイルスまたはその他のウイルス、例えばワクシニアを、あるいは昆虫細胞に関してはバキュロウイルスを用いる形質導入が挙げられる。細菌細胞に関しては、適切な技術としては、塩化カルシウム形質転換、電気穿孔、およびバクテリオファージを用いるトランスフェクションが挙げられる。あるいは、核酸の直接注入を用い得る。当業界で周知のように、当該核酸を含有するクローンを同定する場合には、抗生物質耐性または感受性遺伝子のようなマーカー遺伝子を用い得る。

30

【0053】

導入後は、例えばコードされたペプチドまたはポリペプチドが産生されるように、遺伝子の発現のための条件下で、宿主細胞（実際に形質転換された細胞を含み得るが、しかし細胞は形質転換細胞の子孫である方が多いと思われる）を培養することにより、核酸からの発現が引き起こされるかまたは可能にする。ペプチドまたはポリペプチドが、適切なシグナルリーダーペプチドと結合して発現されると、細胞から培地中に分泌され得る。発現による産生後、ペプチドまたはポリペプチドは宿主細胞および/または培地から単離および/または精製されて、1つ又はそれ以上の製薬上許容可能な賦形剤、ビヒクルまたは担体を含む製剤組成物のような1つ又はそれ以上の付加的構成成分を含み得る組成物の処方に用い得るし、所望により実質的に用いられる（例えば、下記参照）。

40

【0054】

本発明のペプチドまたはポリペプチドは、免疫原として、またはそうでなければ結合抗体を産生する場合に用い得る。抗体は、ポリペプチドおよびペプチドの精製およびその他の操作に、診断的スクリーニングおよび治療的状况に、例えば受動免疫に有用である。これについて以下で考察する。

本発明のさらなる1つの観点に従うと、複数のHCV菌株のHVR1内のエピトープと結合できる結合部位を含む1又は複数の抗体分子を得る方法において、抗体分子の個体群と本発明

50

に従うペプチドを接触させる段階及び前記ペプチドと結合できる 1 又は複数の抗体分子を該個体群から選択する段階を含む方法が提供されている。

【 0 0 5 5 】

この方法は、本発明に従う複数のペプチドと抗体個体群を接触させることを含むであろう。

指摘したとおり、ペプチドは付加的なアミノ酸と融合した状態で提供されてもよい。

1 又は複数のペプチドをヒト以外の哺乳動物に投与してそれらをその哺乳動物の免疫系により産生される抗体分子の個体群と接触させ、その後、1 又は複数のペプチドと結合できる 1 又は複数の抗体分子を哺乳動物から取り出すこともでき、或いは又、かかる抗体分子を産生する細胞を哺乳動物から取り出すこともできる。

10

【 0 0 5 6 】

該哺乳動物を屠殺することもできる。

哺乳動物から細胞をとり出す場合には、抗体分子を前記細胞又はその子孫から取り出すことが可能である。特にかかる子孫はハイブリドーマ細胞を含むであろう。

動物を免疫化するか否かは別として、開示されている通りの抗体獲得方法は、含有するバクテリオファージ粒子の表面上に抗体分子の個体群を表示させることを含み、ここで各々の粒子はその表面上に表示された抗体分子をコードする核酸を含有している。コードされた抗体分子又はその誘導体（例えば融合タンパク質、定常領域又はその他のアミノ酸を含む分子など）の産生における使用及び/又は操作のため、問題の 1 又は複数のペプチドと結合できる抗体分子を表示するバクテリオファージ粒子から、核酸をとり出すことができる。表示のためにバクテリオファージを使用する代りに、例えば US-A-5643768, US-A-5658754, WO95/ 11922 の中で開示されているようにリボソーム又はポリソームを使用することもできる。

20

【 0 0 5 7 】

抗体分子は、個別にか又は混合物として、分離形態で提供され得る。分離形態で、複数の抗体分子を提供することが可能である。

本発明に従う好ましい抗体は、その他のポリペプチドと結合できる抗体といったような汚染物質を含まずかつ/又は血清成分を含まないという意味で、分離されている。いくつかの用途についてはモノクローナル抗体が好まれるが、ポリクローナル抗体も本発明の範囲内に入る。実際、ここで論述されているように、いくつかの実施形態においては、本発明に従った 1 又は複数のペプチド又はポリペプチドと結合する能力をもつポリクローナル抗体が好まれる。かくして、さらにもう 1 つの態様において本発明は、本発明に従う 1 又は複数のペプチド又はポリペプチドと結合する能力をもつ異なる抗体の混合物に向けられている。このような混合物は、薬学的に受容可能な賦形剤又はビヒクルのごとき少なくとも 1 つの付加的な成分を内含する組成物の形で提供され得る。

30

【 0 0 5 8 】

本発明は同様に、本発明の 1 又は複数のペプチド又はポリペプチドを獲得しそして/又はかかるペプチド又はポリペプチドに対する抗体を生じさせる方法にまで拡張される。かかる方法には、哺乳動物に対しペプチド又はポリペプチド又はそれらの混合物を投与することが含まれる。治療又は予防という状況の下では、この哺乳動物はヒトであってもヒト以外の動物であってもよい。分離されさまざまな用途のうちのいずれかのために使用されるべき抗体又は抗体産生細胞の産生のためには、ヒト以外の哺乳動物の屠殺段階が含まれてよい。かかるヒト以外の哺乳動物は、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ、ヒツジ、ラクダ、旧世界ザル、チンパンジー又はその他の霊長類であってよい。抗体は、当該技術分野において既知のさまざまな技術のいずれかを用いて免疫化された動物から得ることができ、又好ましくは注目のペプチド又はポリペプチドに対する抗体の結合を用いてスクリーニングすることができる。例えば、ウエスタンブロット技術又は免疫沈降法などを使用することができる (Armitage et al, Nature, 357:80-82, 1992)。

40

【 0 0 5 9 】

50

ポリクローナル又はモノクローナル抗体の生産は、当該技術分野において充分確立されている。もとの抗体の特異性を保持するその他の抗体又はキメラ分子を産生するべくモノクローナル抗体を組換え型DNA技術の技法に付すことが可能である。このような技術には1つの抗体の免疫グロブリン可変領域又は相補性決定領域(CDR)をコードするDNAを、異なる免疫グロブリンの定常領域に又は定常領域及びフレームワーク領域に導入する段階が含まれてよい。例えば、EP-A-184187,GB-A-2188638又はEP-A-239400を参照のこと。

【0060】

ヒト以外の親抗体より免疫原性が低い抗体を提供するべく、典型的にはフレームワークアミノ酸残基のいくつかの変更を伴って、ヒト以外の供給源からのCDRがヒトフレームワーク領域上に移植されているヒト化抗体も同様に、本発明の範囲内に含まれる。本発明に従うモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、産生された抗体の結合特異性を変性する可能性もしない可能性もある遺伝子突然変異又はその他の変化を受け得る。キメラ抗体のクローニング及び発現については、EP-A-0120694及びEP-A-0125023の中で記述されている。

10

【0061】

ペプチドで哺乳動物を免疫化することに代えて、又はそれに加えて、タンパク質に特異的な抗体を、発現される免疫グロブリン可変ドメインの組換え産生されたライブラリーから、例えばその表面上に機能的免疫グロブリン結合ドメインを表示するバクテリオファージ(例えばWO92/01047参照)又は上述のとおりのリボソーム/ポリゾームを用いて、得ることもできる。このライブラリーはナイーブであることができ、すなわち、いずれのタンパク質(又はフラグメント)によっても免疫化されていない生体から得られた配列から構築されてもよいし、或いは又、注目の抗原に暴露された生体から得られた配列を用いて構築されたものであってもよい。

20

【0062】

本発明に従った抗体は、数多くの方法で修飾され得る。実際、「抗体」という語は、必要とされる特異性をもつ結合ドメインを有するあらゆる結合物質を網羅するものとみなされるべきである。かくして、本発明は、1つの抗原又はエピトープとの結合を可能にする抗体の形状を模倣した形状をもつ分子及び合成分子を含めた、抗体フラグメント、抗体の誘導体、機能的等価物及び相同体を網羅する。

30

【0063】

抗原又は他の結合パートナーと結合する能力をもつ抗体フラグメントの例として、VL, VH, C1及びCH1ドメインから成るFabフラグメント; VH及びCH1ドメインから成るFdフラグメント; 抗体の単一のアームのVL及びVHドメインから成るFvフラグメント; VHドメインから成るdAbフラグメント; ヒンジ領域でジスルフィド橋によりリンクされた2つのFabフラグメントを含む2価のフラグメントであるF(ab')₂フラグメント、及び分離されたCDR領域、がある。単鎖Fvフラグメントも同様に含まれる。

【0064】

望ましい結合特性をもつ抗体を産生することのできるハイブリドーマは、(抗体フラグメントを含めた)抗体をコードする核酸を含有しそれらの発現能力をもつ真核性又は原核性の宿主細胞と同様に、本発明の範囲内に入るものである。本発明は同様に、抗体が産生され好ましくは分泌される条件の下で抗体を産生する能力をもつ細胞を増殖させる段階を含む、抗体産生方法をも提供する。

40

【0065】

(例えば診断試験における)標本に対する抗体の反応性は、任意の適切な手段により決定することができる。個々のリポーター分子でのタグ付けも1つの可能性である。リポーター分子は直接的又は間接的に、検出可能なそして好ましくは測定可能なシグナルを生成することができる。リポーター分子の連結は、直接でも間接でもよく、例えばペプチド結合を介して共有結合によるものであっても又は共有結合によらないものであってもよい。ペ

50

プチド結合を介しての連結は、抗体及びリポーター分子をコードする遺伝子融合体の組換え発現の結果としてもたらされてもよい。

【0066】

1つの好ましい様式は、スペクトル的に隔離された吸収又は発光特性をもつ個々の蛍光色素、リン又はレーザー染料と各々の抗体の共有結合によるものである。適切な蛍光色素としては、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン及びテキサスレッドが含まれる。適切な色素産生染料としてはジアミノベンチジンが含まれる。

その他のリポーターとしては、磁性又は常磁性の着色されたラテックスビードといった分散粒子又は巨大分子コロイド粒子、及び直接的又は間接的に検出可能シグナルを視覚的に観察し、電氣的に検出し又はその他の形で記録することのできるようにする生物学的又は化学的に活性な作用物質が含まれる。これらの分子は、発色もしくは変色させるか又は例えば電氣的特性などを変更させる反応の触媒として作用する酵素であってもよい。これらは、分子的に励起可能で、そのためエネルギー状態間の電子遷移が、特徴的スペクトル吸収又は発光をもたらすものであろう。これらは、バイオセンサーと合わせて使用される化学物質を含んで成ることができる。又ピオチン/ アビジン又はピオチン/ ストレプトアビジン及びアルカリ性ホスファターゼ検出系を利用することもできる。

10

【0067】

結合を決定する様式は、本発明の1特長ではなく、当業者であれば、自らの好み及び一般的知識に従って適切な様式を選ぶことができる。

本発明に従う抗体を、例えば論述した通りに細胞又は細胞溶解産物を含むテスト標本中のペプチド又はポリペプチドの存在についてスクリーニングを行なう上で使用することが可能であり、又例えば、ペプチドをコードする核酸からの発現によるポリペプチドの産生に続いて、本発明に従ったペプチド又はポリペプチドを精製及び/又は分離する上でこれを使用することもできる。

20

【0068】

抗体は同様に、受動免疫化として予防法においても、又治療法においても有用である。抗体を投与すべきである場合、例えば本発明に従った複数のペプチドと集合的に交叉反応性をもつ抗体といった抗体の混合物を含むことが好ましいであろう。

本発明に従うペプチドと結合する抗体はそれ自体、抗イディオタイプ抗体の産生における免疫原として使用されうる。これらは、例えば治療及び/又は予防目的で、個体内の免疫応答を高める上でペプチドエピトープを模倣するのに使用することができる。

30

【0069】

抗体は、例えばテスト標本中の特定の物質の存在を決定する上でのその抗体の使用のための説明書を含みうる1つのキットの形で提供され得る。標識付け分子、緩衝溶液、溶離剤などといった1又は複数のその他の試薬を含めてもよい。試薬は、密封されたバイアルといった、外部環境からそれらを保護する容器内に入れて提供されてもよい。

診断方法は、1又は複数のHCV 菌株を含む可能性のある個体からの生体標本を使用する。生体標本の例としては、血液、血漿、血清、尿及び唾液といった流体及び組織標本が含まれる。

【0070】

特定のペプチド又はポリペプチドがテスト標本内に存在するかしないかを決定するためにはさまざまな方法が存在し、これには検出されるべきポリペプチドが抗体である方法も含まれる。

40

本発明の1又は複数のペプチドに向けられた抗体（又は抗体混合物）といった特異的結合構成要素の存在について標本をテストすることができる。

本発明に従うペプチドは、標本内に存在する場合の抗HCV E2HVR1抗体に対する該ペプチドの結合を査定することによって、テスト標本内のHCV 菌株に対する抗体の存在又は不在を決定するために使用することができるものである。

【0071】

理論上は、本発明の1又は複数のペプチドに向けられた抗体（又は抗体混合物）といった

50

特異的結合構成要素について結合パートナーが標本中に存在することを識別することが可能であろう。しかしながら、今までのところ、HCV ウイルス粒子をヒト標本から分離するのに成功した者はいない。将来、ヒト標本中にHCV ウイルス粒子を同定しかつ/ 又はかかるウイルス粒子を免疫学的に検出することが可能であることが実証された場合には、本発明のペプチドそして特にそれに向けられた抗体がかかる検出において有用となるであろう。

【 0 0 7 2 】

HCV に対する抗体の検出のためには、例えば論述されているようなりポーター系を用いて、特異的結合のための適切な条件下で本発明の 1 又は複数のペプチドと接触させ、その後

10

に結合を測定することによって、生体又はその他の標本をテストすることが可能である。一群のペプチドを使用する場合には、各々の結合を測定することができるよう、各ペプチドについて異なるリポーター標識を利用することができる。

ペプチドといった特異的結合構成要素を用いて、その結合パートナー抗体をテスト標本から分離しかつ/ 又は精製し、抗体の配列及び/ 又は生化学分析を可能にすることができる。

アミノ酸配列決定は、自動化された配列決定機を用いて、当該技術分野においてはありきたりの作業である。

【 0 0 7 3 】

標準的免疫検定は、標本中に適切な抗体が存在する場合に免疫複合体の形成を可能にするような条件下で本発明のペプチドとテスト標本とをインキュベートする段階、及び免疫複合体の存在又は不在を検出する段階を含むであろう。

20

ここで記したとおり、今のところ技術的に実現可能ではないものの、原理的には、本発明の抗体は、標本中に存在する場合のE2HVR1エピトープに対する抗体の結合を試験することにより、テスト標本中のHCV 菌株の存在又は不在を測定するために使用することができる。

【 0 0 7 4 】

標準的免疫検定には、標本中に適切な抗体が存在する場合免疫複合体の形成を可能にするような条件下で本発明のペプチド又は抗イディオタイプ抗体と共にテスト標本をインキュベートする段階、及び免疫複合体の存在又は不在を検出する段階が含まれるであろう。

本発明の 1 又は複数のペプチドに対して導かれた抗体の存在について、1 もしくは複数のこのようなペプチド（又はかかるペプチドを含有するポリペプチド）又は 1 もしくは複数の抗イディオタイプ抗体を用いて、標本をテストすることができる。例えば論述されているようなりポーター系を用いて、特異的結合のための適切な条件下でペプチドもしくはポリペプチド又は抗イディオタイプ抗体と接触させ、次に結合を測定することによって、生体又はその他の標本をテストすることが可能である。

30

【 0 0 7 5 】

本発明の免疫検定における結合複合体の形成の検出は、本発明の範囲を制限することなく、利用可能なあらゆる技術を用いて実施可能である。いくつかの適切な技術については、抗体標識付けを参考にして前述されている。検定には、場合によって、当業者の手に入るラテックス粒子、磁性又は非磁性ビーズ、膜、チップ、プラスチック、金属、シリコン又はガラス表面又はその他のあらゆる適切な材料といった適切な固相又は支持体上に抗体又はペプチドを固定化することが含まれるであろう。検出は、定性的であっても定量的であってもよい。標準的な実施方法に従って、1 又は複数の適切な対照を含めることが可能である。

40

【 0 0 7 6 】

すでに記した通り、本発明のペプチド、ポリペプチド、抗体及び核酸を組成物の形に処理することができ、これらは薬学的分野において有用である。これらの組成物は、上述の物質のうちの 1 つに加えて、当業者にとっては周知のものである薬学的に受容可能な賦形剤、担体、緩衝液、安定剤又はその他の材料を内含してよい。かかる材料は、非毒性でなくてはならず、また有効成分の効力と干渉してはならない。担体又はその他の材料の正確な性質は、例えば経口、静脈内、経皮又は皮下、経鼻、筋肉、腹腔内といった投与経路

50

によって異なる可能性がある。

【0077】

経口投与のための組成物は、錠剤、カプセル、粉末又は液体形態でありうる。錠剤には、ゼラチンといった固体担体又はアジュバンドが含まれてよい。液体薬学組成物には一般に、水、石油、動物又は植物油、鉱油又は合成油といった液体担体が内含されていてよい。生理食塩溶液、デキストロース又はその他の糖類溶液又はエチレングリコール、プロピレングリコール又はポリエチレングリコールなどのグリコールを内含させることもできる。

【0078】

静脈内、経皮又は皮下注入のためには、有効成分は、発熱素を含まず適切なpH、等張力及び安定性をもつ非経口的に受容可能な水溶液の形をとることになる。当業者であれば、例えば塩化ナトリウム注射液、リンガー液、乳酸加リンガー液、保存剤、安定剤、緩衝液、酸化防止剤といった等張性ビヒクルを用いて適切な溶液を充分調製でき、必要とあらばその他の添加剤も内含させることができる。

単独か又は適切な担体にリンクされた状態で、免疫原調製のためMAP (Tam, J.P. 1988) といった有枝ペプチドを使用することができる。

【0079】

免疫応答を発生させる上で使用するための線状ペプチドを、適切な担体に連結することも可能である。ジスルフィド形成試薬(ここでペプチドにはシステインが含まれるか又はこの目的でペプチドに対しシステインが添加される)、チオ-エーテル形成カップリング剤を含め、その他の分子にペプチドをカップリングするさまざまな方法が、当該技術分野において知られている。担体には、ヒト血清アルブミン(HSA)、破傷風トキソイド、生理学的条件下で適正な半減期を有するその他のかなり大きなタンパク質、及び多糖類及びアミノ酸共重合体といったような安定した非タンパク様分子が含まれる。

【0080】

アジュバンド、例えばミョウバン、水中油型乳剤又はフロインドアジュバンド(完全又は不完全)を含ませることもできる。ペプチド又はポリペプチド組成物の免疫原性を強化するためにサイトカインを使用することもできる。

免疫系に対する1又は複数のエピトープの適正な提示のため天然の折畳み環境を使用する目的で、HCV 外被(E2)タンパク質の環境にミモトープ配列をクローニングすることが可能である。

免疫化のためには裸のDNAを使用することができ(例えばCohen, J.1993参照)、1又は複数のミモトープ配列を適当なベクター内にクローニングすることができる(例えばMajor et al.,1995参照)。裸のDNAは、直接的注入を用いてか又は遺伝子ガン(Yang et al.,1990)又はその他の任意の適切な技法を用いて送達できる。

【0081】

個体に対し与えるべきものが本発明のポリペプチド、抗体、ペプチド、核酸分子、小分子又はその他の薬学的に有用な化合物のいずれであろうと、投与は、その個体における免疫(特に抗体)応答を高めるのに充分である免疫原性量で行なうか、或いは又「予防的に有効な量」又は「治療上有効な量」(場合に応じて、ただし、予防法を治療法とみなすこともできる)で行なうことができる。予防的効果は、HCV,E2HVポリペプチド又はHVR1ペプチドでのその後の抗原投与に対する又はその後のHCV 感染に対する個体の免疫応答を強化するのに充分であり、好ましくは後者のケース(HCV 感染)ではその感染を全体的又は部分的に拮抗するのに充分である。

【0082】

最も好ましくは、効果は、個体が、その後のHCV 感染の結果としての1又は複数の臨床的症候を予防しかつ/又は個体をC型肝炎から保護するのに充分である。治療的効果は、予め存在するHCV 感染に対する個体の免疫応答を強化するのに充分なものである。最も好ましくは、効果は、単数又は複数の慢性症候を改善し、かつ/又はC型肝炎を治療しかつ/又は個人におけるウイルス力価を低減させるのに充分である。投与される実際量、及び投与の速度及び時間的経過は、処置されているものの性質及び重症度に左右されることにな

10

20

30

40

50

る。処置の処方例えば用量についての決定などは一般開業医及びその他の医師の責任の範囲内に入り、標準的には、処置すべき障害、個々の患者の身体条件、送達部位、投与方法及び開業医にとって周知のその他の要因が考慮される。上述の技法及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Science, 第16版、Osai A.(ed), 1980の中で見い出すことができる。

【0083】

本発明のさらなる態様は、提供されたままの状態でのペプチド、ペプチド混合物、抗体分子又は抗体分子混合物の投与を含む処置方法；このようなペプチド、ペプチド混合物、抗体分子又は抗体分子混合物を含む薬学組成物；及び投与用薬剤の製造、例えば薬学的に受容可能な賦形剤を用いて特異的結合構成要素を処方することを含む薬剤又は薬学組成物の製造方法といった、投与のための薬剤の製造におけるこのようなペプチド、ペプチド混合物、抗体分子又は抗体分子混合物の使用、を提供する。

10

【0084】

組成物は、単独で投与することもできるし、また処置すべき身体条件及び代替的処置又は付加的処置の利用可能性に応じて同時又は逐次的にその他の処置と組合わせて投与することもできる。

本発明の1つの態様は、HCV HVR1エピトープと結合できる抗体を哺乳動物の体内で発生させるための薬剤の製造における、開示された通りのペプチドの使用を提供する。

もう1つの態様は、HCV 感染に対し哺乳動物を免疫化する方法において、哺乳動物に対してペプチド又はペプチド混合物を投与する段階を含んで成る方法を提供している。

20

【0085】

さらにもう1つの態様は、HCV 感染に対し哺乳動物を（受動）免疫する方法において、本発明に従った抗体又は抗体混合物を哺乳動物に投与する段階を含んで成る方法を提供している。

同様にして、本発明のさらなる態様は、HCV 感染を患う哺乳動物の処置方法において、本発明に従ったペプチド又はペプチド混合物又は抗体又は抗体混合物を哺乳動物に投与することを含んで成る方法を提供している。

抗体は、抗イディオタイプ抗体であってよい。

本発明の態様及び実施形態について、ここでさらに詳しく説明し、さまざまな図面を参考にしながら実験的に例証する。本発明のさらなる態様及び実施形態が、当業者にとって明白なものとなるだろう。

30

【0086】

例1．HVR1の変異性を模倣する特定化されたファージライブラリの設計と構築

配列データベースから抽出された234のHVR1ユニーク配列の多配列アラインメントを、HCVE2 糖タンパク質のN末端の27の位置の各々における残基組成の変異を特徴づける目的で作製した。この分析から1つの配列パターン（図1A）が現われ、変更したコンセンサス配列の定義づけを可能にしている。

残りの位置での観察された天然の変異性を再現しながらこのような保たれた制約条件を含むような形で、HVR1配列の合成レパートリーが設計された。

40

【0087】

各位置において最も頻度の高い残基を選択することによって全配列変異性の約80%を説明する「コンセンサス - プロファイル」が誘導された。一定の与えられた位置で類似のアミノ酸が存在した時には、変異性を表わすものとして1つのみが選択され、より効率良く相互作用を形成できるような残基が好まれた。例えば、5の位置では、天然のレパートリー内に Ser及び Thrの両方が存在するが、ライブラリーを設計するには Thrのみが選択された（図1）。いくつかのケースにおいては、全体的変異性をより良く映し出すようにライブラリー内にはコンセンサス内に存在しない残基が含まれた。例えば、HVR1の天然のレパートリー内の Ser, Thr, Asnの存在を説明するよう、3の位置に Thrが含まれた。

【0088】

結果として得られた最終的コンセンサスプロファイル（図1B）は、現行のDNAクロー

50

ニング及び形質転換技術の実践的上限（約 10^8 ）に非常に近い 9×10^7 の複雑性をもつ。天然のレパートリー内で最も頻繁に観察されるアミノ酸は、（Gluが最も頻繁に観察されるアミノ酸であるものの Gln及び Thrが選択された）位置1を除いて、つねに含まれた。234の天然HVR1変異体全体を通して局所的配列保存が高いことから、8つの位置（2, 6, 7, 16, 19, 20, 23及び26）は、定常に保たれた。同様に特記に値するのは、負の電荷を受けた残基が全く存在しないということである。His, Glu, Asp, Gln, Asp 基を代表するのに Glnが選択された位置1を除いて、80%分画内にはいかなる酸性残基も存在しなかった。定性的には、プロファイルは、保存された要素を含むN末端及びC末端尾部によりフランキングされた一般により可変的な中央領域として、描くことができる。

10

【0089】

ライブラリーの構築は、M13表示のためのファージミドベクター内の主要外皮タンパク質（pV III）をコードする遺伝子の5'末端に対する融合として縮重した合成オリゴヌクレオチドをクローニングすることによって進められた。約 2×10^8 の独立した形質転換体を得られた。ライブラリー（HVR1ライブラリー）の質及び複雑性を確認するため、56の無作為選択された個々のクローンのインサートが配列決定された。この分析は以下の結果を導いた。

【0090】

（1）全てのクローンは異なる配列を表示した；
 （2）63%のクローンが全長インサートを含有し、一方残りのクローンは小さい欠失を有していた；
 （3）1998年3月15日に探索されたウイルス分離株からの既知のHVR1に対応するペプチドをコードする、配列決定されたクローンは存在しなかった。
 これらのデータから、このライブラリーは、個々の形質転換体の数に近い複雑性を有することが推論された。

20

【0091】

実施例2．HCV 患者の血清と高頻度で反応するHVR1ミモトープの同定

選択に使用された抗体のレパートリーがより複雑かつ多様になると、HVR1エピトープに対する多くの様々な抗体によって認識されるファージを豊富にする可能性がより高められるはずである。慢性的に感染したウイルス血症患者は、多くのHCV 変異体が生成されかつ免疫系が攻撃される間に、比較的長期のウイルス残存性を有し、おそらく高度に異種性の抗-HVR1 抗体群の蓄積に至るので、これらの患者から得た血清は前述の要件に合致するように見える。

30

【0092】

5種の異なる遺伝子型のウイルス：1a、1b、2a、2b、3a（Simmondsら、1993）に感染した慢性患者から得た8種の血清を用いて、HVR1ライブラリーの6種のアフィニティー選択を行った（表1）。対照として、感染していない患者の血清も使用した。全7種の選択から得られたファージのプールを増幅し、かつELISAにおいて選択される血清の各々に対するファージプールの反応性を試験した。この実験の結果は、選択されなかったライブラリーに対する反応性の増加によって立証されるように、セクター抗体によって認識されたファージの顕著な増加を示した（図2）。

40

【0093】

ほとんどの場合、HCV 血清によって豊富にされたファージプールは、1名以上の患者の血清と反応した。HCV 感染とは無関係な抗体によって認識されたペプチドも、このライブラリーから豊富にされた。実際、対照血清で選択されたファージプールは、選択されないライブラリーよりも、この血清とのより高い反応性があった（図2）。しかし、健常者の血清では、HCV 血清によって豊富にされたファージプールとの反応性が検出されなかったので、患者の血清はHCV - 関連ミモトープの選択へと向けられた（図2 及びデータは示さず）。

【0094】

50

様々な患者の血清で選択されたミモトープの反応性頻度に対する洞察を得るために、2つのプール（4R及び2R、表1）から40の個体クローンを無作為に選択し、かつ選択のために採用した患者とは異なるHCV感染患者から得た20種の血清のパネルにより、ELISAにおけるそれらの反応性を試験した。感染していない健常者の対照から得た同数の血清を用いて、抗-HCV抗体に対する特異性を評価した。24のクローンがHCV-特異性であることがわかった。これらのクローンの患者血清との反応性頻度の関数としてのそれらの分布を、図3（上側パネル）に示した。それらの中に、1種以上の血清と反応しているファージが確認された；これらの一部は、試験した血清の最高55%によって認識された。

【0095】

多くの異なる抗-HVR1抗体と反応するミモトープの単離を更に改善するために、豊富にしたファージプールについて、第1ラウンドに使用したものと異なる患者血清を使って親和性選択の第2ラウンドを行った。ここでは、9種の新規のプールを作成し（表1）、かつELISAによって分析した。前述のように、セクター抗体との反応性の一般的な増大が認められた。それに加えて、第2ラウンドのファージプールは全て、いずれかの選択に使用されたものと異なるHCV感染患者から得た血清のパネルと、第1ラウンドで選択されたプールよりもより頻繁に反応し、このことは、単離されたペプチドがより高い認識頻度を持つことを反映している。

【0096】

これは、第1ラウンドの親和性選択後に溶出されたものの中から無作為に選択されたクローンのHCV血清との反応性（図3、上側パネル）を、第2ラウンドの異なる血清によるそれらの再選択によって得られたもの（図3、下側パネル）とを比較することによって確かめられた。反応性の頻度だけでなく反応性の分布も、第2ラウンドの選択工程の後、かなり異なるように思われた。最初の選択からのファージの認識がかなり分散しているように見える一方、第2ラウンドの選択を通して単離されたクローンは、反応性頻度のベル形の分布を示し（図3、下側パネル）、平均値は60%であり、このことは、全てのファージ群が、要求された結合特性以上のものを実際に得たことを示している。増幅時の、生物学的に好ましいファージへのバイアスの導入を避けるために、追加の選択サイクルを省略することを決定した。

【0097】

HCV血清とだけ反応する合計171のクローンを、全ての第2ラウンドのプールをスクリーニングすることによって同定した。HCV血清による認識頻度の関数としてのそれらの分布は、図3の下側パネルに示されるサブセットのそれを反映し、そして、最良のクローンは試験した検体の80%と反応した。更に重要なことは、選択されたミモトープの反応性のプロファイルは、関連する別の特徴を強調していることである。HCV血清による全般的な認識の頻度は量的に類似しているにもかかわらず、異なるクローンは反応性の特徴的パターンを示し（図4A）、全ての試験した血清中の抗-HVR1抗体の存在についてスコア化することができるミモトープはほとんどないという正味の結果を示した。

【0098】

次に、観察されたHCV血清による認識の高い頻度が、試験された患者群に限られたものであるかどうか、あるいは、それが選択されたミモトープの固有の特性を反映したものであるかどうかを確かめた。この目的のために、感染した患者から得た血清のもう一つのセットをELISAによって分析し、各個々のファージの反応性頻度及び血清の全てを対象とすること(coverage)の両方について変化がないままであったことを明らかにしている（図4B）。

【0099】

感染が治癒したHCV感染患者は、多分比較的少ない数のウイルス変異株と接触し、かつおそらく慢性的感染患者よりも狭い変異株に特異的な抗-HVR1抗体のスペクトルを示すであろう。これは、感染治癒患者からの血清が、慢性的に感染したウイルス血症患者と比べて、非常に稀に天然型単離体のHVR1を再生する合成ペプチドと反応するという知見（Scarselliら、1995）によって裏付けられる。従って、ウイルス血症でない血清は、種々の抗-H

10

20

30

40

50

VR1 抗体とHVR1ミモトープの交叉反応性を分析するための、より良好でよりストリンジェントな試験を構成することができる。

【 0 1 0 0 】

こうして選択されたミモトープの一部を、血中にウイルスRNA が存在しないことが繰り返してわかっているHCV 血清反応陽性の患者から得た41検体について試験した。この場合もミモトープは、ウイルス血症患者から得た血清で認められたものよりもより低い頻度であっても、これらの血清の多くと反応した（図4(A)、4 (B) 及び4 (C) を比較）。これらのデータは、選択されたミモトープの多数の異なる抗-HVR1 抗体と交叉反応する能力の指標を提供する。

【 0 1 0 1 】

実施例 3 . 選択されたHVR1ミモトープの配列と血清HCV との反応性頻度の間の
相関関係の決定

本発明者らは、選択されたクローンのアミノ酸配列が、それらの反応性頻度と相関するかどうかについて確かめようとした。配列の目で見た比較では、明らかなパターンは認められなかったので、最低及び最大の頻度で反応しているクローンの配列パターンを分析することを決めた。

3 種未満の血清とのみ反応する24クローンを「弱い」と定義し、11種以上の血清と反応する27クローンを「強い」と定義した。弱いクローン及び強いクローンの各位置でのアミノ酸頻度は、下記の「材料及び方法」の項、及び表IIに記した。

【 0 1 0 2 】

弱いクローン及び強いクローンのセットにおいて、異なるアミノ酸で占有されるいくつかの位置に関して明らかな傾向があり、かつこれは我々に「材料及び方法」に記した位置を基にしたスコア化システムの発見に役立つ定義を与えた（下記参照）。クローンのスコア（S-スコア）が高ければ高いと、その配列は、強いクローンの配列とより多く類似し、弱いクローンの配列とはより異なる。図5 で示すように、S-スコアは、合理的に各クローンの実験的に決定された反応性頻度とよく相関している（相関係数= 0.75）。S-スコアが「弱い」クローン及び「強い」クローン（171 の中の51）の配列だけを使って計算されたことは強調されなければならないが、しかし、これは全てのクローンの反応性頻度とも良く相関している。興味深いことに、弱い及び強いミモトープの残基の優先性が最も異なる6箇所の位置（位置3、11、18、21、22、24）だけを使っても、ほとんど同じ結果（相関係数= 0.72）を得ることができる。

【 0 1 0 3 】

実施例 4 . HCV 単離体由来の多数のHVR1変異株と抗原性が似たHVR1ミモトープ

本発明者らは、ミモトープを認識するヒト抗体と、天然に生じるHVR1を表している配列との交叉反応性を計ることを試みた。この目的のために、感染した患者の血清中に存在する多量の抗-HVR1 から特異抗体を精製するための免疫吸着剤として、ミモトープを使用した。この実験のために、最も高いHCV 血清との反応性頻度を示したミモトープであることから、ミモトープ R9、F78、M122、R6、B14、G31、H1及びD6（図7）を選んだ。平均的な「よい」ミモトープよりもかなり低い率のHCV 血清によって認識されたミモトープであるN5も使用した（各々、60～80% 及び35%）。

【 0 1 0 4 】

いくつかのリンパ球細胞株がHCV の限定的複製を支えることが示されているが（Shimizuら、1992）、これらのシステムは、ウイルス増殖及び抗-HVR1 抗体の交叉反応性の詳細な研究のためには適していない。従って、観察された配列の変異性をほぼカバーする天然のHVR1変異株を再生する合成ペプチドのパネル上で免疫学的に精製された抗体の交叉反応性を決定した。

【 0 1 0 5 】

この目的のために、多次元クラスタ解析（Casariら、1995）を、ライブラリーの構築のために使用した234 の並置した天然のHVR1配列と同じセットについて行なった。これらの中から、HVR1 “配列空間” にわたってほとんど均一に分布された43の配列を選択し（下記「

10

20

30

40

50

材料及び方法」を参照のこと)、かつ多抗原性ペプチド (MAP ; Tam 、J.P.、1988 ; Pessi ら、1990) として合成した。43のMAP の全パネルと集合的に反応している感染した患者からの8 種の血清のプールを、抗体の供給源として使用した。免疫学的に精製した抗体は、全血清と比較して、精製のために使用したミモトープに対し同じ反応性を示した。対照的に、組換え型HCV コア抗原又は市販のキット (下記「材料及び方法」参照) に含まれた抗原に対する反応性は、精製後は維持されることはなく、従ってこの精製の有効性及び特異性を証明している。

【 0 1 0 6 】

全ての免疫学的に精製された抗体は、著しい数の天然のHVR1配列と反応し、ミモトープ R9 は天然のHVR1の79% と交叉反応する抗体を生じた (図6)。更にほとんどの免疫学的に精製された抗体が、天然の配列とは少しも重なることのない反応性を示したので、わずかに3 つの異なるミモトープ (R9、F78 及びM122、図6) から精製された抗体の個々の反応性の値を合計することで、全体的な交叉反応性のさらにより高いレベル (88%) に到達することができる。これらのデータから、HVR1ミモトープの限られたセットで、多数の天然のHCV HVR1変異株の抗原性を模倣することができるということが結論された。

【 0 1 0 7 】

より高いS-スコアを持つミモトープによって免疫学的に精製され、その結果より高い反応性頻度を持つような抗体も、より交叉反応性であることが示された。8 種のミモトープを使用したところ、図7Bで示すように、この配列に関連したスコアと対応する抗体の交叉反応性の間の相関性は、非常に良好であった ($r = 0.86$; 図7B)。

【 0 1 0 8 】

実施例 5 . 多くの天然のHVR1変異株を認識する抗体を誘発するHVR1ミモトープ

本発明以前の問題点は、最大数のHCV HVR1の天然の変異株と交叉反応する抗体を誘発することができる免疫原の作成であった。最良のHVR1ミモトープ (R9、F78、M122、G31、H1及びD6) のいくつかの免疫原性の可能性を、全ての精製されたファージとして、及び選択された当初の範疇外ではあるがMAP としての両方で、マウスにこれらを注射することにより調べた。

【 0 1 0 9 】

質量分析により示されるように、おそらく各ファージへのHVR1ペプチドの不十分な負荷 (loading) のために (全pVIII 含量の1%未満)、MAP の方がはるかに有力な免疫原であることがわかった。力価の違いで示されるような免疫感作効率の若干の変動性がミモトープ間で認められ、F78 は、免疫感作のために使用したものと同じペプチド上でのELISA による測定により、1/100,000 より高い抗体力価を誘発することができた (図8A)。

【 0 1 1 0 】

その後抗-HVR1 ミモトープ血清を、天然の単離体からのHCV 配列を再生する43のMAP のパネル上で、ELISA によって、異種HVR1変異株を認識するそれらの能力について調べた。反応性は無関係な対照ペプチド上では認められなかったが、これらのMAP の大半が免疫血清によって認識された (図8A)。

ミモトープで免疫感作したマウス血清の交叉反応性は、同じミモトープで免疫学的に精製したヒト抗体の交叉反応性のようにはランク付けしなかった。しかし、両種のアッセイにおいて顕著に低い反応性レベルを示したミモトープ N5 は、非常に効率の低い免疫原であることが明らかにされ、このことは天然のHVR1配列の少数のみを認めることができる抗-HVR1 の応答をもたらしている (図8A)。

【 0 1 1 1 】

ほとんどの場合、より高い力価は交叉反応性のより高いレベルに相当しているので (図8A)、免疫血清の交叉反応性の程度は、一般に個々のMAP の免疫原性を反映している。それにもかかわらず、抗-F78より低い力価を持つが、非常に多くの天然のHVR1ペプチドと反応するような抗-G31血清の場合に明確に示されるように、必ずしも力価単独では、交叉反応性の違い、及びミモトープ誘発性血清によって示される反応性のパターンの違いを説明することができない。同様に、抗-D6 血清は、力価が1/3 であるにもかかわらず、抗-R9 の

交叉反応性と同じレベルを示す（図8A）。

【0112】

各種抗血清によって示される反応性のパターンは、部分的に他のパターンと重なっているだけであり、そして、一部の場合、独自の反応性が認められた。誘発された血清のこの特徴の結果として、全ての反応性を合計することによって、ほぼ全ての天然のHVR1ペプチドが認められる（91%、図8A）。この知見は、広く反応する抗体を生成する目的にとって意味のある改良であり、ミモトープの混合液による一回の免疫感作で交叉反応性の同様の増加を得ることができる。従って、Balb/cマウスの3群を、ミモトープ混合物で免疫感作した。

【0113】

混合物1は、ミモトープ R9、F78、HI及びD6を含み；混合物2は、ミモトープ M122及びG31から成り、混合物3は6種全てのミモトープを含んだ。3つの混合物は全て、免疫原性であり、かつ高度に交叉反応性の抗血清を誘発した（図8B）。これら3つの抗血清の各々は、この混合物中に含まれる各ミモトープによって誘発される抗血清の反応性を合計して測定されたものと同じか、もしくはより高くさえある交叉反応性を示した（混合物1について84%対84%、混合物2について84%対81%、混合物3について95%対91%、図8B）。これらの血清の力価が高いにもかかわらず、これは個々のMAPで得られた値より低かった。従って、高い交叉反応性の応答を誘発する能力は、単純に免疫感作の効率の結果ではないと結論した。

【0114】

材料及び方法

ヒト血清

HCV-感染患者由来の血清及び健常者由来のヒト血清を、第二世代のHCV ELISA 試験システム（Ortho-HCV ELISA、オルト・ダイアグノスティック・システム(Ortho Diagnostic System)社、ベルセー、ベルギー）によって、及び第一世代のドットプロット・イムノアッセイ（RIBA-HCV試験、キロン(Chiron)社、エメリービル、CA）によって、HCV に対する抗体の存在について特徴づけた。HCV RNA の存在は、ウイルスゲノムの5'-非コード領域に局在化された保存されたプライマー及び先に記された100 µl の血清から抽出された全RNA を使用する入れ子式逆転写-PCRによって検出した（Siliniら、1995）。

【0115】

HVR1ライブラリーの構築

図1Bに関して先に記したコンセンサス配列(profile)を対応するヌクレオチド配列に逆翻訳するために、大腸菌コドンの利用表を用いて、高度に発現された遺伝子における最も頻度の高いコドンを選択した。ファージミドベクターへのこのライブラリーの挿入を促進するために、制限酵素PacI及びNotIの認識部位を含む別の2つの定常配列を、各々、81bpセグメントの5'-及び3'-に追加し、合計116bpとした。コンセンサス配列の逆翻訳においてNotI及びPacI制限部位が存在しないことは、コンピューターを利用した配列解析によって証明した。

【0116】

化学合成のために、コドンに基づいた「split-and-pool」法（Cormackら、1993）を利用し、ライブラリーの組成及び複雑度を要求されたレベルに保った。116bpのオリゴヌクレオチドは、9600型DNA サーマルサイクラー（パーキンエルマーセタス社、フォスターシティ、CA）を用いて、隣接する定常配列に相補性のプライマーで増幅した。PCR産物を制限酵素PacI及びNotIで消化し、ゲルにより精製した。回収したDNAフラグメントを、下流にpelB分泌リーダー配列及び上流に全遺伝子のVIIIコード配列のあるpel8PNファージミドベクター（pc89誘導体；Feliciら、1991）のPacI及びNotI部位の間にクローニングした。組換え型ファージミドを、DH10Bコンピテント細胞に電気穿孔した。DH10B細胞は、繊維状ファージによって感染することができず、かつ青色/白色選択ができないので、形質転換された細胞を収集し、かつプラスミドDNAを調製した。このDNAを用いて、XL1-Blueコンピテント細胞の電気穿孔により形質転換した。

【0117】

アンピシリン耐性コロニーをプレートからこすり落とし、かつLB/100 µg アンピシリン/ml 及び10% (v/v) グリセロール中に再浮遊させ。この細菌の浮遊液の一部を、100 µg アンピシリン/ml を含有する6LのLB培地にOD600nm が0.05であるように接種し、OD600nm が0.25に到達するまで激しく振盪しながら増殖した。その後この培養液を、M13K07ヘルパーファージで重感染し、更に5時間増殖し、上澄み中にファージ粒子を得た。既報のように (Feliciら、1991)、ファージをポリエチレングリコールで二回沈殿させ、CsClで平衡密度勾配遠心分離することにより精製した。アプライド・バイオシステム社の373DNAシーケンサを使い、既報のように (Bartoliら、1996)、DNAの塩基配列決定を行った。

【0118】

ライブラリーのアフィニティー選択

ELISA用のマルチウェルプレート (ヌンク・マキシソープ (Nunc Maxisorp) 社、ロッキルド、デンマーク) を、50mM NaHCO₃、pH9.6中の0.5 µg/mlの抗ヒトポリクローナル抗体 (Fc特異性) (免疫学的に純粋なヤギの抗ヒトIgG Fc-特異性; ピアス社、ロックフォード、IL) と共に、4℃で一晩被覆した。このプレートをPBS/0.1% Tween20 (洗浄バッファー) で洗浄し、かつ阻害バッファー (5% 脱脂粉乳、PBS / 0.05% Tween20) の100 µl / ウェルと共に、37℃で1時間インキュベーションした。PBS / 0.1% BSA で1:100に希釈したヒト血清1 µl を、各ウェルに添加し、かつ4℃で一晩インキュベーションした。洗浄後、PBS / 0.1% Tween20、0.01% BSA で希釈した紫外線で死滅したM13K07の粒子10¹²個を、次に各ウェルに添加し、4℃で4時間インキュベーションした。

【0119】

このプレインキュベーションの後、HVR1ライブラリーの1012粒子 / ウェルを加え、かつ4℃で一晩インキュベーションした。未結合のファージを取り除き、数回洗浄した。結合したファージは、溶出バッファー (グリシンでpH 2.5に調節した0.1M HCl、1mg/ml BSA) 200 µl で溶出し、2M Tris-HCl pH 9で中和した。溶出したファージは、細菌XL1-Blueの感染によって力価決定し、かつ増殖性挿入物を含むクローンの割合を、X-gal / IPTGインジケータプレートの上に、感染された細菌を塗布して決定した (Feliciら、1991)。増幅後 (上記参照)、増えたファージを、同じ手順に従って親和性選択の第二サイクルで処理した。

【0120】

ミモトープの配列分析及びS-スコアの定義

合計193の選択されたクローン中171が、点突然変異 (最初のライブラリーデザインに関して) 又は欠失が見られず、これらを3種類のクラスに分類した: 24の弱いクローン (20種の被験血清中3種未満と反応する)、27の強いクローン (少なくとも12種の血清と反応する)、及び中程度 (残りのクローン)。

27-mer アミノ酸配列の位置 *i* での各アミノ酸について、本発明者らは、強い及び弱いクローンのセットの位置 *i* の中に同じアミノ酸が認められる頻度を、それぞれ、Fs(*i*, aa) 及び Fw(*i*, aa) と称した。この頻度の値を表IIに示した。

【0121】

次にS-スコア(*i*) を、Fs(*i*, aa) 及び Fw(*i*, aa) の平方根の差として定義した。S-スコア(*i*) の全27-mer配列の合計が、我々の配列ベースのS-スコアである。実際には:

$$S\text{-スコア} = \sum_i (Fs(i, aa) - Fw(i, aa))$$

(式中、aaは、S-スコアを計算する配列の位置 *i* の中に認められたアミノ酸である。)。頻度の平方根は、差を増大するために使用した。点突然変異又は欠失が起こったクローンについては、対応する位置をスコアの計算において省略した。

【0122】

天然HVR1配列を代表するセットの選択

HCV BK株 (残基384-411) に由来するNS1 HVR1配列を用いて、いろいろなデータベースを検索し (1995年12月13日)、タンパク質 (SwissProt、PIR 及び Genpept、後者は Genbank 及び EMBL からの割り当てられたオープンリーディングフレームを表している) 及びヌ

10

20

30

40

50

クレオチド配列 (EMBL、Genbank 及び EST) の両方を検索した。234 の天然の HVR1 配列の独自のセットを得るために、重複した配列及び不完全な配列は、配列に合致したリストから削除した。

【 0 1 2 3 】

主要成分分析 (Principle component analysis) を用いて、このセット全体に均等に分布された 40 の配列を選択した。最初に、234 の配列の間の全ての対の距離を、Sequencespace を使って算出した最初の 6 個の固有値を使って計算した (Casari ら、1995)。40 の配列のみが残るまで、近隣の配列との距離が最小であるような配列を、段階的に除外していった。Eigenvectors の全ての可能なペアに沿った二次元への投影は、40 の配列のセットが塊とならず、均等に分布されたことを示した。

10

寄託番号及び配列は、以下の通りである：

【 0 1 2 4 】

【 化 2 1 】

- 1 Genbank:D12967 QTRTVGGQMGGHGVRLTSLFSAGSARN bp 46- bp 126
- 2 PIR:PC1193 STHVTGALQGAAAYGITSFLSHGPSQK aa 16- aa 42
- 3 Genbank:D00574 HTRVTGGVQGHVTSTLTSLFRPGASQK bp1240- bp1320
- 4 Genbank:L19383 ETHTSGGSVARAAFGLTSLFSPGAKQN bp 46- bp 126
- 5 Genbank:M62381 ETHVTGGSAGRTTAGLVGLLTPGAKQN bp1426- bp1506
- 6 Genbank:U24616 ATYTTGGSAAKTAHRLASFFTVGPKQD bp 22- bp 102
- 7 PIR:C48776 DTHVVGATERTAYSLTGLFTAGPKQN aa 13- aa 39
- 8 Genbank:U24607 GTTCQGGVYARGAGGIASLFSVGANQK bp 22- bp 102
- 9 PIR:D48766 RTLSFGGLPGHTTHGFASLSAPGAKQN aa 13- aa 39
- 10 Genbank:X60573 RTILMAGRQAEVTQSFPGLFSLAPSQK bp 46- bp 126
- 11 Genbank:D43650 NTHAMGGVVARSAIRITSFLSPGAAQN bp 1- bp 81
- 12 PIR:PQ0835 STRITGGSMARDVYRFTGFFARGPSQN aa 6- aa 32
- 13*Genbank:S73387 GTHTIGGSQAQQANRFVSMFSRGPSQK aa 190- aa 216
- 14 Genbank:D10934 NTYVTGGAARGASGITSLSFRGPSQK bp1491- bp1571
- 15 Genbank:D31972 NTYASGGAVGHQTASFVRL LAPGPQQN bp1409- bp1489
- 16 Genbank:U14231 ETHTTGGGAARTTLGIASLFTSGANQK bp 103- bp 183
- 17 Genbank:U24602 ETHTTGGSAAARATFGIANFFTPGAKQN bp 22- bp 102
- 18 Genbank:L19380 EYTTSGGSAAHTTSGFVSFFSPGAKQN bp 46- bp 126
- 19 Genbank:M74888 GTTRVGGAAARTTSSFASLLTHGPSQN bp1147- bp1227
- 20 Genbank:L12354 NHTVGAASRSTAGLTSLFSIGRSQK bp1468- bp1548
- 21 Genbank:X79672 NTRVTGGVQSRTTGTFFVGLFTPGPSQR bp 1- bp 81

20

30

40

【 0 1 2 5 】

【 化 2 2 】

50

22	PIR:A48776	NTHVSGGRVGHTRSLTSFFTPGPQQK	aa	13-	aa	39	
23	Genbank:D12952	STRVSGGQQGRAAHSLSLFTLGASQN	bp	46-	bp	126	
24	Genbank:D16566	STRITAQAEGRGASTLSLFTSGASQK	bp	8-	bp	88	
25	Genbank:M84754	STIVSGGTVARTTTHSLASLFTQGASQK	bp1491-	bp1571			
26	Genbank:D14853	ETRVGTGAAGHTAFGFASFLAPGAKQK	bp1491-	bp1571			
27	Genbank:S24080	NTYVTGGSAGRAVAGFAGLLQPGAKQN	bp	46-	bp	126	10
28	Genbank:S35631	ETHSVGGSAAHTTSRFTSLFSPGPQQN	bp	580-	bp	660	
29	Genbank:S62395	ETHVTGGSAASTTSTLTKLFMPGASQN	bp	43-	bp	123	
30	Genbank:S70291	QTRTVGGANARNTYGLTTLFTTGPKQN	bp	1-	bp	81	
31	Genbank:D88472	GTTTVGSAVSSSTTYRFAGMFSQGAQQN	bp1485-	bp1565			
32	Genbank:D10687	NHTTVGGTEGFATQRLTSLFALGPSQK	bp1180-	bp1260			20
33	Genbank:D43651	NTHVTGGVVARNAYRITTFLNPGPAQN	bp	39-	bp	119	
34	Genbank:D14305	HTYTTGGTASRHTQAFAGLFDIGPQQK	bp1427-	bp1507			
35	Genbank:X60590	KTHVTGMVAGKNAHTLSSIFTSGPSQN	bp	46-	bp	126	
36	Genbank:D30613	GTHVTGGKVAYTTQGFSTFFSRGPSQK	bp1491-	bp1571			
37	Genbank:X53131	ETYTSGGNAGHTMTGIVRFFAPGPKQN	bp	802-	bp	882	
38	Genbank:U24619	STYSMGGAAAHNARGLTSLFSSGASQR	bp	22-	bp	102	
39	Genbank:M62382	ETHVTGGSAGRSVLGIASFLTRGPKQN	bp1426-	bp1506			30
40	Genbank:D88474	ETYIIGAATGRTTAGLTSLFSSGSQQN	bp1488-	bp1568			

【 0 1 2 6 】

* 配列13は、Genbank 登録S73387のCDS 特徴において報告される翻訳されたアミノ酸配列 (aa190-aa216) に相当する。

更に3 つの追加配列が、MAP として合成された : 2 つの配列は、系統付けられたHCV 接種菌H77 に由来し (Farci ら、1994、図2) :

【 0 1 2 7 】

【 化 2 3 】

41 (H77-1)	ETHVTGGNAGRRTTAGLVGLLTPGAKQN	bp	1-	bp	81
42 (H79)	ETHVTGGSAGHTAAGIASFFAPGPKQN	bp	1-	bp	81

【 0 1 2 8 】

1 つの配列は、免疫応答が特徴づけられた患者の主要単離物に由来した (Scarselli ら、1995。) :

【 化 2 4 】

10

20

30

40

50

43 Genbank:X79669 NTRVTGGVQSHTTRGFVGMFSLGPSQR bp 1- bp 81

【 0 1 2 9 】

ファージ調製及びELISA

ファージの上澄みを、先に記したように、XL-1 Blue に感染した細胞から調製した (Folgori ら、1994)。ELISA は、Dente らの (1994) 方法に従い、25 μ l ファージ上澄み / ウェルを使って行った。特に具体的に記さない限りは、血清は種 - 特異的抗-IgG (Fc特異性) アルカリホスファターゼが結合した二次抗体 (シグマ社、A-9544; ELISA 阻害バッファ 10
ー中で1 : 5000に希釈) の添加により、1:100 に希釈した。結果は、自動化されたELISA リーダー (ラボシステム・マルチスキャン・ピクロマティック (Labsystems Multiskan Bi chromatic) 社、ヘルシンキ、フィンランド) によって、OD405nm とOD620nm の間の差として記録した。

【 0 1 3 0 】

ファージプールによるELISA を、CsCl精製 (上記参照) の後、増幅したファージの当量 (1010のアンプシリン導入単位) を使うことによって同様に実行した。天然のHVR1配列を表しているMAP の100 μ l を用いて、被覆バッファ (50mM NaHCO₃、pH9.6) 中の最終濃度が10 μ g/mlになるようにELISA プレート (ヌンク・マキシソープ社、ロッキルド、デン 20
マーク) を被覆した。自由な結合部を阻害した後、血清又はアフィニティー精製した抗体を100 μ l / ウェルで加えた。

【 0 1 3 1 】

マウス及びウサギの血清は、阻害バッファー中に最終的に1 : 100 になるよう希釈して試験し; アフィニティー精製した抗体は、最終濃度150ng/mlで試験した。プレートは4 で一晩インキュベーションした。洗浄後、アルカリホスファターゼが結合した二次抗体 (ヤギ抗マウスIgG シグマ社のA-7434を1 : 2000希釈したもの; ヤギ抗ウサギIgG シグマ社のA-8025を1 : 5000希釈したもの; ヤギ抗ヒトIgG シグマ社のA-9544を1 : 5000希釈したもの) 100 μ l / ウェルを添加し、かつ室温で1 時間インキュベーションした。プレートを洗浄し、かつ前述のようにアルカリホスファターゼを明らかにした。

【 0 1 3 2 】

ヒト血清由来の抗体のアフィニティー精製

種々のミモトープの配列を再生している多抗原性ペプチドは、ELISA においてHCV 血清とファージと同じ結合プロファイルを示すが、抗体の親和性選択においてより有効であることがわかっているため、これらを用いた。活性化されたCHセファロース4Bカラム (ファルマシア・バイオテック社、17-0490-01) に、結合バッファ (0.1M NaHCO₃、pH8 / 0.5M NaCl) 中1g乾燥セファロース / 1mg MAPの比で、対象のMAP を結合した。結合の後、0.1M Tris-HCl、pH8 で、遊離アミノ基をブロッキングした。試料は、結合バッファで1 : 5 に希釈した8 種のHCV 血清のプールとして流した。室温で吸着し、多量のPBS で洗浄した後、結合した抗体を、最終濃度が10 μ g/mlになるようにBSA を添加した0.1Mグリシン-HCl、pH2.7 で溶出し、直ちに2M Tris-HCl、pH9.4 で中和した。 40

【 0 1 3 3 】

溶出した抗体の濃度は、ヒトIgG 標準 (シグマ社、I-2511) を用いるELISA によって決定した。アフィニティー精製した抗体を、精製に使用したミモトープを用いるELISA において、それらの反応性について調べ (MAP 及びファージの両方の形)、かつ対照としてHCV と無関係のMAP についても調べた。精製の特異性は、更に溶出した抗体を、HCV コアタンパク質を細菌により発現した組換え体上のELISA により (Prezzi ら、1996) 試験すること、及び第二世代のHCV ELISA 試験 (オルソ・ダイアグノスティック・システム、ベルギー) によって、確認した。血清プールの標準量1ml から各アフィニティー精製により回収されるイムノグロブリンの総量は同等であり、0.8 ~1.5 μ g の範囲であった。被験MAP 上のELISA については、濃度を全ての場合で150ng/mlに調節した。 50

【 0 1 3 4 】

動物の免疫感作

免疫感作するファージを、先に説明したように精製したXL1-Blueに感染した細胞及びCsClから調製した（Feliciら、1991）。3～5週齢のメスのBALB/Cマウス（チャールズ・リバー、コモ、イタリア）を、第0、21及び42日目に、抗原溶液100 µlを腹腔内投与することによって免疫感作し、かつ第52日目（3回目の採血）及び第148日目（4回目の採血）に採血した。ファージは、アジュバントなしで、濃度約0.3mg/ml（ 2.5×10^{13} ファージ粒子/ml）で、0.9% NaCl懸濁液として注射した。

【 0 1 3 5 】

ペプチドの免疫感作のために、MAP を、PBS を溶媒として最終的な総濃度400 $\mu\text{g/ml}$ になるよう溶解し、かつフロイント完全アジュバント（初回免疫）又はフロイント不完全アジュバント（追加免疫）の両方において1 : 2 希釈物として注射した。4 ~ 7 週齢のメスのBalb/cマウス4匹（チャールズ・リバー、Como、イタリア）に、第0、3及び6週目に、抗原液100 μl を腹腔内注射することによって免疫感作し、かつ各追加注射の後0日目（プレ採血）及び10日目に採血した。1個以上のペプチドを免疫感作に使用する場合は、各ミモトープを等量混合し、かつ400 $\mu\text{g/ml}$ 溶液の100 μl を使用した。

【 0 1 3 6 】

実施例 6 . ペプチド及び E 2 組み換え体蛋白の免疫原特性。in vivo での D N

A 免疫感作

選択された幾つかのHVR1ミモトープの免疫原特性について、それ単独またはE2蛋白エクドメインのN-末端との融合体の場合について調べた。

一般に、hcv E2蛋白はHCV ポリ蛋白のアミノ酸384ないしアミノ酸809に広がるペプチドとして認識されている。一般に、HVR1領域はアミノ酸384ないし410として認識されている。以下の実施例では、E2はHCV ポリ蛋白のaa411 ないしaa683 に相当するペプチドである。

【 0 1 3 7 】

組み換え体プラスミドの構築

3種類のプラスミドを作成し、その構造を図9に報告する：

(i) p E2-HVR1 および C 末端疎水性領域の両方を欠失している E 2 蛋白断片 (HCV 株 N, Nishihara ら、 ; Gene; 1993; 129pp207-214; HCV ポリ蛋白の aa411 ないし aa683) 合成用 ;

(i i) HVR1ミトトープの一つを発現する第2プラスミド p F 7 8 ;

(i i i) 1 1 種類 の HVR1 をコードする DNA 配列が、プラスミド p E2 内の E2 コード配列の 5' 末端で融合している 1 1 種類の構築体 (pMimoE2) のセット。

【 0 1 3 8 】

全ての組み換え体は、抗原スクリーニングが実施できるよう組織プラスミノーゲンアクチベーター（TPA）シグナル配列の下流のフレーム内にクローニングされている。

E2 遺伝子（即ちaa411 ないしaa683 の範囲のペプチドをコードしている）を、E2N 株を含むベクター（Nishiharaら;Gene;1993;129pp207-214）をPCR の鋳型に用いてクローニングした。PCR断片は合成オリゴヌクレオチドプライマー（オリゴfwd=GCGAGATCTTAA TTAACGATATCCAGCTTATAAAC;オリゴrev=TCCGGATCCTTAGTGGTGTTGGTGTTGGTGCGGLAG）を利用して得た。

【 0 1 3 9 】

これらプライマーを利用して得たPCR 産物は、E2遺伝子に加えて5'末端のBglII、PacI及びEcoRV 制限酵素部位、6個のヒスチジン残基をコードする配列(His tag)、及び3'末端のBamHI 制限酵素部位が続くTAA終止コドンをもっている。次に、このPCR産物をBglIIとBamHIで切断し、TPAリーダ配列を持つフレームの中でV1JnsTPAベクター(J.J.Donnellyら。The Journal of Infect.Diseases;1996;713;pp314-320)のBglII部位と接続し、プラスミドV1JnsTPA-E2(図9中、pE2と認める)。

【 0 1 4 0 】

HVR1ミモトープ配列を、pE2内のE2遺伝子の5'末端にサブクロニングした。HVR1

【 0 1 4 1 】

10

【 0 1 4 2 】

20

【 0 1 4 3 】

30

【 0 1 4 4 】

【 0 1 4 5 】

40

【 0 1 4 6 】

50

ョンし、F78E2 または E2蛋白を作製した。10倍濃縮された上清をELISAの標的抗原として用いた。各蛋白/ウエルの飽和量を、ブロッキング緩衝液中、3時間、室温でGNAコートプレートと反応させた。

【0147】

免疫血清の希釈系列(1:100ないし1:72900)を、mockをトランスフェクトした293細胞より得た1 μ l/ウエルの10倍濃縮上清のブロッキング緩衝液と、2時間、室温で前反応した。血清反応を4で行った。室温1時間のI_{lab}反応(マウスIgG Fc特異的AP標識、SIGMA 7434、ブロッキング干渉液で1:2000に希釈)後、プレートを30分間37で発色させた。

各血清に関しMAP形式が相同であるペプチド配列を利用したELISAアッセイを用い、抗HVR1ミモトープ抗体の力価検定を行った(1:100ないし1:72900の血清希釈)。

いずれの場合も、吸光度が0.30.D.(ほぼバックグラウンド値の6倍)となる最大希釈率を抗体力価とした。

【0148】

交叉反応アッセイ

材料と方法に記載した43種類の代表的なMAPSのセットを用いて、血清の持つ各種HVR1の天然変異体に対する交叉反応性を調べた。

構築体をコードするミモトープの筋肉内注射は強い体液性反応を誘導する。

プラスミドpE2およびpF78E2を用い、体液性反応誘導の最適条件を確立した。HVR1の外側に位置するエピトープに対する抗体の誘導は、一過性にトランスフェクトした293細胞より発現されるE2蛋白を利用したELISAを用い調べた。

【0149】

Balb/C及びC57黒マウスを免疫し、各種遺伝的バックグラウンドに於けるミモトープをコードした構築体の免疫原性を試験した。注射回数(1回から4回)と注射DNA量の両方が抗体反応の強さに直接関連した。E2蛋白に対する最高の抗体力価は、マウス当たり50 μ gまたは100 μ gのpE2DNAを、3週間隔で3回注射した時得られた。それ以上注射しても、力価は改善しなかった。マウスをプラスミドpF78E2で免疫感作した場合にも、

E2蛋白に対する抗体誘導について同様の動態が観察された。後者の動物群に於ける抗HVR1抗体の誘導は、MAPF78のELISAにより試験した。免疫感作の最適条件に関する限り、調べ範囲で2種類の株間に有意な差は認められなかったが、C57黒マウスの方が平均して反応は良好であった。

【0150】

F78 HVR1ミモトープのみを発現する構築体(pF78)で感作したマウスの抗血清もまた特異的反応を誘導したが、その力価は関連するpF78E2構築体を利用し得た抗血清に比べて遙かに低かった。F78ミモトープ単独に比べて融合構築体で強い反応が得られるのは、その発現レベル、組み換え体産物の立体構造、またはより強いTヘルパーエピトープの存在といった複数のファクターが関係していると考えられた。

【0151】

抗ミモトープ抗血清は各種天然HVR1変種との交叉反応する

DNAをベースとした免疫感作による交叉反応性反応を惹起するミモトープ/E2融合体の能力を、天然分離株のHVR1を再現した43種類の合成ペプチドのパネルを固相抗原とするELISA(材料と方法を参照)を用いて評価した。表IIIには、各種プラスミド単独またはプラスミド混合体でBalb/cマウス(上)及びC57黒マウス(下)を免疫感作した時の平均力価を示す。交叉反応性は、試験した43種類の内陽性とスコアされたペプチドの数として示されている。

【0152】

関連血清中には、相同的なミモトープ配列を提示するペプチドに対し特異的な抗体が有意レベル存在しているにも関わらず、pB14E2及びpB24E2プラスミドは交叉反応性免疫反応を誘導しなかった(表III)。多くの全ての構築体は、天然HVR1配列の幾つかに対し交叉反応する抗血清を惹起し、抗F78血清は試験したペプチドの28%を認識できた。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 3 】

一般的に、免疫血清の交叉反応性の広さは個々のプラスミドの免疫原性を反映しており、多くの場合力価が高い程交叉反応性はのレベルも高い（表ⅠⅠⅠ）。しかし、プラスミド pR6E2 は pD6E2、pH1E2 及び pM63E2 に比べ誘導力価は低いものの、それで免疫されたマウスの血清はより多くの天然 HVR1 ペプチドと反応することから分かる様に、必ずしも力価のみかで交叉反応性の違いを説明することはできない。同様に、pF7E2、pM122E2 及び pR9E2 で免疫されたマウスの血清は、同様の力価を持つ pG31E2 免疫血清に比べて 2 倍高い交叉反応性を示した（表ⅠⅠⅠ）。

C57 黒マウスに pF78E2 キメラ遺伝子を注射した場合、Balb/C マウスに比べてより高い交叉反応性を持つ、より強い反応が起こった（49% 対 28%）。

10

【 0 1 5 4 】

プラスミドの混合体による免疫感作は反応の交叉反応性を改善する

各マウスに総量 100 µg DNA / 注射を行い、3 群の Balb / C マウスをミモトープ / E2 キメラをコードするプラスミドの混合体で免疫した。

混合体 A は E2 に D6、F78、G31、H1、M122 及び R6 が融合したものをコードするプラスミドを含む。混合体 B はさらに交叉反応性抗体を誘導する別の 3 種類の構築体、pE19E、pM63E2 及び pR9E2 も含んでおり、一方混合体 C は 11 種類全てのプラスミドを含んでいる。（混合体 A、混合体 B 及び混合体 C それぞれによるペプチド及びペプチドをコードする核酸の混合体は、本発明の別の観点を表す。）

【 0 1 5 5 】

3 種類の混合体全てが免疫源性を有しており、高い交叉反応性抗血清を誘導した（表ⅠⅠⅠ）。混合体 A にて免疫された動物の抗体は、該混合体に含まれる個別のプラスミドを注射した時に得られる抗体に比べて交叉反応性は高く無かった。しかし、前者の力価はおおよそ 50 倍低いことから、免疫の効率を上げれば混合体 A がより広い交叉反応性反応を誘導できることが示唆されていることを強調する必要がある。混合体 B による結果はさらにこの仮説を支持している。プラスミドの第 2 混合体を投与されたマウスは交叉反応性の実質増加を示しており、試験した天然 HVR1 配列の約 50% を認識できる抗血清を生じた。またこの場合、個別のプラスミドで免疫された動物より得た最も交叉反応性の広い抗血清に比べて平均力価が一桁低かった（表ⅠⅠⅠ）。

20

【 0 1 5 6 】

ミモトープ / E2 キメラをコードする全てのプラスミドを含む最も複雑な混合体を筋肉内に投与しても、得られた血清の反応性がこれ以上改善されることはなかった。この結果は、この混合体中に存在する 2 種類の追加構築体（pB14E2 及び pB24E2）で動物を免疫しても、交叉反応性が認められないことと一致した。

同様のデータは C57 黒マウスの免疫でも得られた。

30

【 0 1 5 7 】

参考資料

Alter, H.J. (1995) Blood 85, 1681-1695.

Bartoli, F. ら (1996) BioTechniques 20 554-558.

Bukh, J., (1995) Seminars in Liver Disease 15, 41-63.

Casari, G. ら (1995) Nature Structural Biology. 2, 171-178.

Choo, Q.L., ら (1989) Science 244, 359-362.

Choo, Q.L., ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1294-1298.

Cohen, J. (1993) Science 259:1691-1692.

Cormack, B.P. と Struhl, K. (1994). Science 262 244-248.

Cortese, R., ら (1994) Tibtech 12, 262-266.

Cortese, R., ら (1996) Current Opinions in Biotechnology 7, 616-621.

40

【 0 1 5 8 】

Dente, L., ら (1994) Gene 148, 7-13.

Farci, P., ら (1992) Science 258 135-140.

50

- Farci,P,ら (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91,7792-7796.
 Farci,P,ら (1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96,15394-15399.
 Felici,F,ら (1991) J.Mol.Biol.222,301-310.
 Folgori,A,ら (1994) EMBO J.13,2236-2243.
 Fried,M.W.とHoofnagle,J.H.(1995)Seimin.Liver Dis.15,82-91.
 Kato,N,ら (1993) J.Virol.67,3923-3930.
 Kojima,M,ら (1994) Virology 204、665-672.
 Kurosaki,M,ら (1994) Virology205,161-169.
 Major,M.E,ら (1995) J.Virol.69,5798-5805.
 Martell,M,ら (1992) J.Virol.66,3225-3229.

10

【 0 1 5 9 】

- Martell,M,ら (1994) J.Virol.68,3425-3436.
 Mast、E.E とAlter,M.J.(1993)Semi.Virol.4,273-283.
 Mecchia,M.ら (1996).J.Immunol.,157,3727-3736.
 Meola,A.,ら (1995).J.Immunol.154,3162-3172.
 Pessi,A.ら (1990).J.Chem.Soc,Chemical Communications、1,8-9.
 Prezzi,C.ら (1996).J.Immunol.156,4504-4513.
 Scarselli、E.ら (1995) J.Virol.69,4407-4412.
 Shimizu、Y.K.ら (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89,5477-5481.

20

【 0 1 6 0 】

- Shimizu、Y.K.ら (1994).J.Virol.65,1494-1500.
 Shimizu、Y.K.ら (1997).J.Virol.71,5769-5773.
 Silini,E.ら (1995) Hepatology 21,285-290.
 Simmonds,P.ら (1993).J.Gen.Vir.74,2391-2399.
 Tam,J.P.(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5409-5413.
 van Doorn,L.ら (1995) J.Virol.69,773-778.
 Weiner,A.J.ら (1991) Virology 180,842-848.
 Weiner,A.J.ら (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89 3468-3472.
 Weiner,A.ら (1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92、2755-2759.
 Winter,GとMilstein、C.(1991) Nature 349,293-299.
 Yang,N.S.ら (1990).Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:9568-9572.

30

【 0 1 6 1 】

表 I - 選択のスキーム

表上部にはHCV 感染患者の血清による第一回及び第二回のHVR1ライブラリー濃縮を示す。
 左のカラムには、血清名と対応する感染ウイルスの遺伝子型(カッコ内)を示す。右カラムには得られたファージプールの名称を示す。

【 0 1 6 2 】

表 I I - " 強 " 及び " 弱 " 交叉反応性ミモトープのセットに観察されたアミノ酸頻度

i はアミノ酸の場所を示す(1ないし27); aaは標準1文字コードによるアミノ酸を示す; Fs(i,aa)は、" 強 " ミモトープ中 i 位置のアミノ酸 a a の頻度であり; Fw(i,aa)は、" 弱 " ミモトープ中 i 位置のアミノ酸 a a の頻度である。

40

【 0 1 6 3 】

【 表 1 】

表 I

第一選択			第二選択		
血清／遺伝子型		ファージ プール	血清／遺伝子型		ファージ プール
$\sigma 4R$	(1b)	4R	$\sigma 2$	(1b)	B
$\sigma 3R$	(3a)	3R	$\sigma 1$	(1a)	D
$\sigma 3$	(2a)	3	$\sigma 2$	(1b)	E
$\sigma 2R$	(3a)	2R	$\sigma 3$	(2a)	R
$\sigma 1$	(1a)	1	$\sigma 4$	(2a)	F
			$\sigma 2$	(1b)	H
$\sigma 2P$	(2b)	2P	$\sigma 2$	(1b)	G
			$\sigma 1$	(1a)	L
			$\sigma 4$	(2a)	M
σN		N			

10

20

【 0 1 6 4 】

【 表 2 】

30

表 II

i	aa	Fs (i,aa)	Fw (i,aa)
1	Q	0.70	0.64
	T	0.30	0.36
2	T	1.00	1.00
3	H	0.52	0.28
	T	0.48	0.12
	R	0.00	0.60
4	T	0.70	0.52
	V	0.30	0.48
5	V	0.56	0.36
	T	0.44	0.64
6	G	1.00	1.00
7	G	1.00	1.00
8	Q	0.41	0.24
	S	0.30	0.56
	V	0.29	0.20
9	A	0.48	0.28
	Q	0.37	0.40
	V	0.15	0.32
10	S	0.44	0.64
	G	0.37	0.32
	A	0.19	0.04
11	H	0.82	0.40
	R	0.18	0.60
12	Q	0.52	0.44
	A	0.26	0.20
	T	0.22	0.36
13	A	0.37	0.28
	T	0.33	0.52
	V	0.30	0.20
14	S	0.48	0.32
	H	0.41	0.32
	R	0.11	0.36

i	aa	Fs (i,aa)	Fw (i,aa)
15	S	0.52	0.32
	G	0.41	0.24
	R	0.07	0.44
16	L	1.00	1.00
17	T	0.78	0.52
	V	0.22	0.48
18	S	0.48	0.24
	G	0.45	0.36
	R	0.07	0.40
19	L	1.00	1.00
20	F	1.00	1.00
21	S	1.00	0.20
	R	0.00	0.80
22	P	0.89	0.32
	L	0.07	0.28
	Q	0.04	0.32
	S	0.00	0.08
23	G	1.00	1.00
24	A	0.41	0.04
	S	0.37	0.20
	P	0.22	0.76
25	K	0.41	0.32
	S	0.41	0.36
	Q	0.18	0.32
26	Q	1.00	1.00
27	N	0.67	0.52
	K	0.33	0.48

【 0 1 6 5 】

【 表 3 】

10

20

30

40

表Ⅲ

プラスミド	タイター	陽性ペプチド n	
pB14E2	270	0	
pB24E2	189	0	
pD6E2	4222	3	10
pE19E2	990	2	
pF78E2	31812	12	
pG31E2	31251	5	
pH1E2	2977	1	
pM63E2	3888	2	
pM122E2	41360	10	20
pR6E2	1923	6	
pR9E2	21092	11	
mF78	110	2	
MIX	684	11	
MIX	1224	19	
MIX	610	18	30
プラスミド	タイター	陽性ペプチド n	
pF78E2	41547	21	
MIX	20381	24	

40

【図面の簡単な説明】

【図 1 (A)】 図 1 (A) は、この研究作業において使用されている HCV HVR1 配列の 2 3 4 の天然の変異体のコンセンサスパターンの誘導体化を例示する。囲み内の影の無い残基は単独で、観察された変異体の約 8 0 % を説明している。残基は、上から下へ観察された頻度の下降順で列挙されている。

【図 1 (B)】 図 1 (B) は、バクテリオファージ上で表示された初期 HVR1 ペプチドライブラリー内の組成を示す。

【図 2】 図 2 は、アフィニティー選択の第 1 ラウンドにより得られたファージプールの、選択血清中に存在する抗体に対する反応性を示す。各々の血清標本 (1 , 4 R , 3 , 2 P , 2 R , 3 R 及び N) について、ファージプール (プール 1 , 4 R 3 ,

50

2 P, 2 R, 3 R 及び N), 野生型ファージ (wt) 及び未選択ライブラリー (HVR1 lib) の抗体認識が測定された。2つの独立した実験からの平均値 (A 4 0 5 nm) が決定された。

【図 3】 図 3 は、感染を受けた患者からの血清とその反応性頻度の関数として、HVR1 ライブラリーから選択された HCV 特異的ファージの分布を示している。選択のために使用したものとは異なる 20 のヒト血清の中に存在する抗体に対して 1 (上図版) 又は 2 (下図版) サイクルのアフィニティー選択により富化されたファージについて結合が示されている各々の血清について、2つの独立した実験からの平均値 (A405nm) が、選択されたファージ及び野生型ファージ上で決定された。値は、野生型ファージについて観察された背景シグナルから $3 \max(p < 0.003)$ 以上異なるとき、統計学的に有意であるとみなされた。各々のヒストグラムは、示された数の血清と反応するファージの数 (垂直軸に示されている) を、テスト標本合計数 (水平軸として表現された) に対する百分率として、表わしている。

10

【図 4】 図 4 は、選択されたミモトープが、HCV 感染患者からのヒト血清の中に存在する抗体によって頻繁に認識されることを示している。ヒト血清中に存在する抗体に対する選択されたミモトープの結合は、固定化されたファージ上での ELISA によって検出された。ミモトープの名前は、各列の上部に示されている。(各行の左側に示されている) 各血清について、2つの独立した実験からの平均値 (A405nm) が決定された。結果は、テストされたファゴトープの平均値と野生型ファージの平均値の間の差異として表現されている。正の値は、太字で表わされている。値は、野生型ファージについて観察された背景シグナルと $3 \max(p < 0.003)$ 以上異なっているとき、統計学的に有意であるとみなされた。各ミモトープの反応性の頻度及び 4 つのミモトープ全てで観察された反応性の合計の結果得られた頻度は、各図版の下部に示されている。

20

【図 4 (A)】 図 4 (A) は、スクリーニング段階のために用いられた 20 人の HCV 患者の一群の血清と選択されたミモトープの反応性を示す。

【図 4 (B)】 図 4 (B) は、HCV 感染したウイルス血症患者からの付加的な一群の血清と選択されたミモトープの反応性を示す。

【図 4 (C)】 図 4 (C) は、市販のキットを用いて抗 HCV 抗体について陽性と評点の付いた非ウイルス血症患者からの血清との反応性を示す。

【図 5】 図 5 は、S 評点と、選択されたミモトープの反応性頻度の間の相関関係を示す。直線はデータの線形最小自乗適合度を表わす。相関係数は 0.79 である。

30

【図 6】 図 6 は、選択されたミモトープが、天然に発生する多数の HVR1 の抗原模倣物であることを示している。HCV 感染患者の血清プールの抗体は、選択されたミモトープの配列 (図の上部に表わされている) を再現する MAP 上で免疫精製された。免疫精製された同量の抗体の反応性は、(左列に示されている) MAP として合成された HVR1 配列の代表的なパネル上で ELISA により測定された。2つの独立した実験からの平均値が決定された。値は、(1) それぞれが 2 つの無関係のペプチド上で観察される背景シグナルと $3 \max(p < 0.003)$ 以上異なっていた; (2) それぞれが、天然の HVR1 を表わす各ペプチド上で未感染個体からの血清を用いて観察された平均シグナルと $3 \max(p < 0.003)$ 以上異なっていた、という 2 つの基準が同時に満たされたときに、充分に有意であるものとみなされた。灰色の囲みは、0.15 ~ 0.50D(405nm) の間で、無関係の MAP 上で観察されたシグナルと異なるシグナルを示す。黒色囲みは、0.50D(405nm) 以上異なる値を表わす。免疫精製された抗体の各プールの交叉反応性レベルは、各列の下部に示されている。

40

【図 7】 図 7 は、ミモトープ配列と交叉反応性の相関関係を示す。

【図 7 (A)】 図 7 (A) は、分析中で使用されたミモトープの配列を示す。

【図 7 (B)】 図 7 (B) は、ミモトープの S 評点と、43 の天然 HVR1 配列のパネルと、免疫精製されたヒト抗体の交叉反応性の間の相関関係を示す。直線は、データの線形最小自乗適合度を表わしている。相関係数は 0.86 である。

【図 8】 図 8 は、選択されたミモトープが天然に発生する多数の HVR1 の免疫原性模倣物であることを示している。

50

MAP の形での単一のHVR1ミモトープ（図 8（A））及びミモトープ混合物（図 8（B））で免疫化されたマウスからの血清の反応性を、（左列に示した）天然のHVR1の配列のパネル上でELISA により検定した。免疫化用ミモトープは最初の列に示されている。HIX1はミモトープ R 9 , F 7 8 , H 1 及び D 6 を含む；MIX2は、M122及び G 3 1 ペプチドを含有する；MIX3は 6 つのMAP で構成されている。力価（相同なペプチド上でのELISA において最大シグナルの半分を得るのに必要とされる希釈度として定義される）は、第 2 列に示されている。血清は、1 : 1 0 0 の割合で希釈した。2 つの独立した実験からの平均値が決定された。値は、2 つの無関係なペプチド上で得られた背景シグナルと 3 max($p < 0.003$) 以上異なるときに統計学的に有意であるとみなされた。灰色の囲みは 0.15 ~ 0.50D(405nm) の間で、無関係なMAP 上で観察されたものと異なっているシグナルを表わし、黒色囲みは、0.50D(405nm) 以上異なる値を表わしている。各血清の交叉反応性レベルは各列の下部に示されている。

10

【図 9】 図 9 は、例 6 で記述されたインビボでの核酸免疫化実験で利用されたプラスミドを例示する。

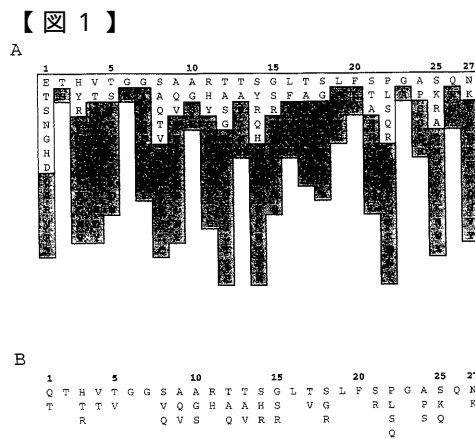


Fig. 1

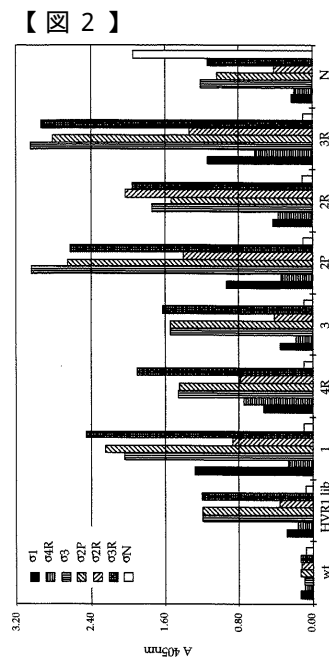


Fig. 2

【図 3】

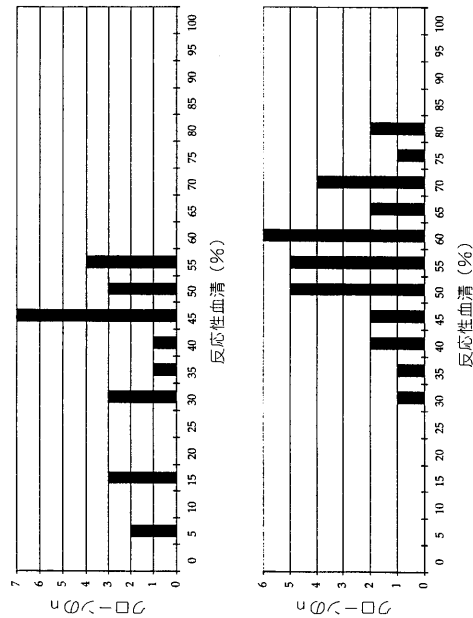


Fig. 3

【図 4】

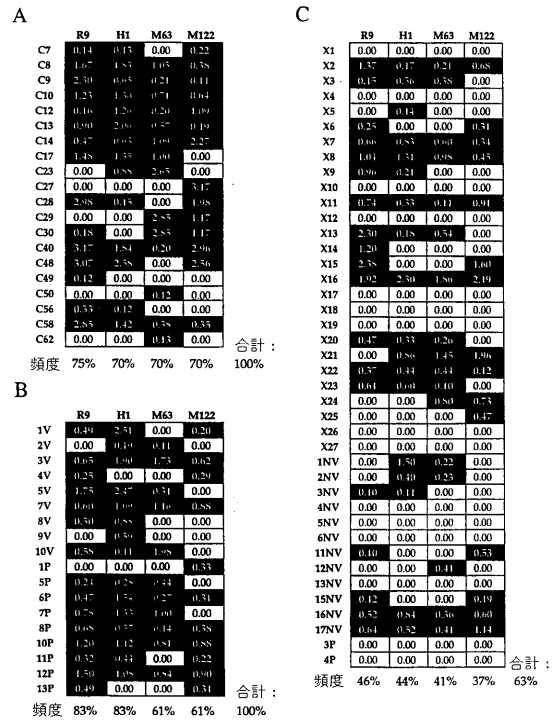


Fig. 4

【図 5】

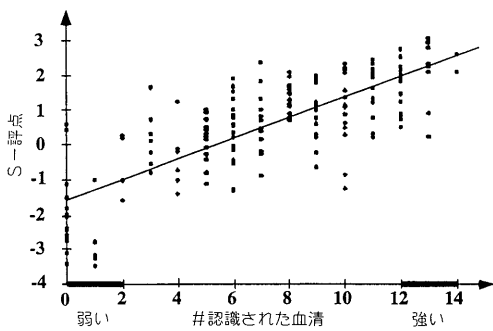


Fig. 5

【図 6】

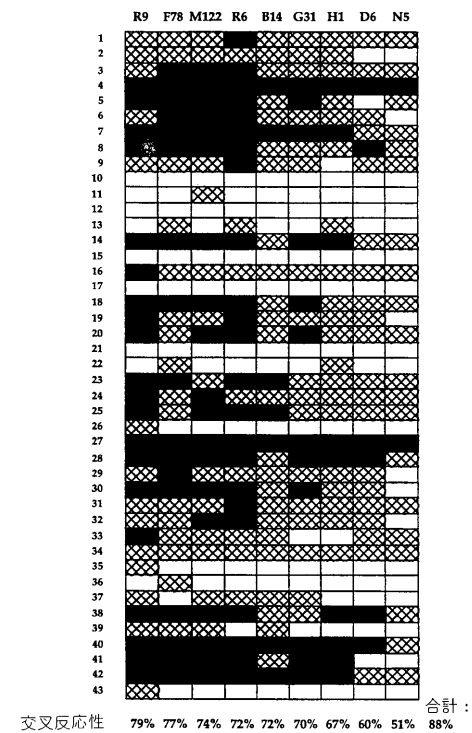


Fig. 6

【図 7】

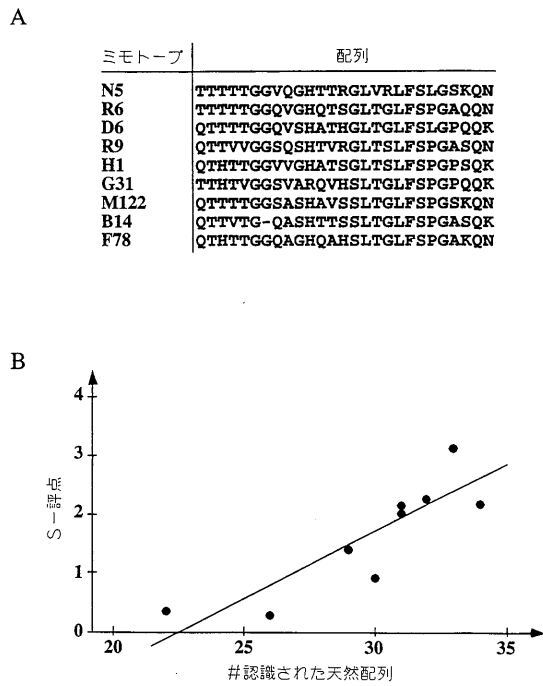


Fig. 7

【図 8】

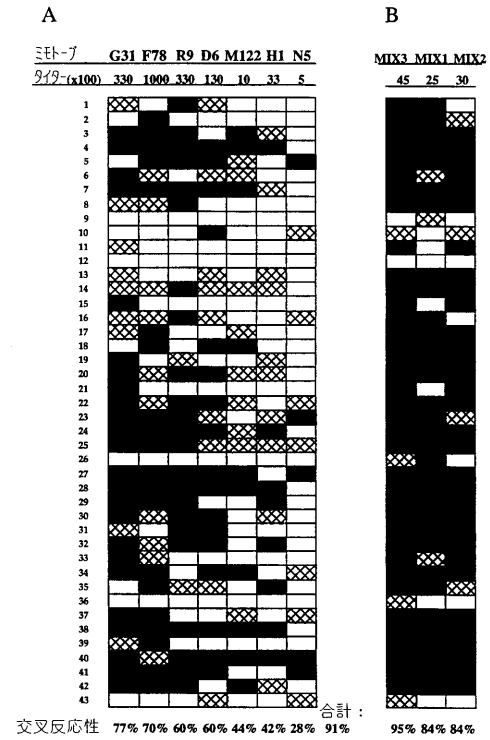


Fig. 8

【図 9】

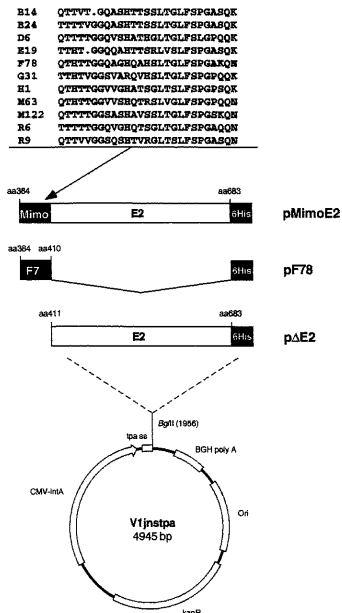


Fig. 9

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/29	(2006.01)	A 6 1 K 39/29	
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 ニコシア, アルフレド

イタリア国, イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア, ピア ポンティナ カッパエンメ . 3 0 . 6 0 0 , イ
ステイトウト ディ リチエルケ ディ ビオロジア モレコラーレ ピー . アンジェレッティ
ソチエタ ペル アツィオニ

(72)発明者 ラーム, アルミン

イタリア国, イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア, ピア ポンティナ カッパエンメ . 3 0 . 6 0 0 , イ
ステイトウト ディ リチエルケ ディ ビオロジア モレコラーレ ピー . アンジェレッティ
ソチエタ ペル アツィオニ

(72)発明者 ترامオンターノ, アンナ

イタリア国, イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア, ピア ポンティナ カッパエンメ . 3 0 . 6 0 0 , イ
ステイトウト ディ リチエルケ ディ ビオロジア モレコラーレ ピー . アンジェレッティ
ソチエタ ペル アツィオニ

(72)発明者 コルテセ, リッカルド

イタリア国, イ - 0 0 0 4 0 ボメツィア, ピア ポンティナ カッパエンメ . 3 0 . 6 0 0 , イ
ステイトウト ディ リチエルケ ディ ビオロジア モレコラーレ ピー . アンジェレッティ
ソチエタ ペル アツィオニ

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表平 0 8 - 5 1 0 2 4 0 (J P , A)

Biol. Chem. , 1 9 9 7 年 , vol.378, no.6, p.495-502

J. Virol. , 1 9 9 7 年 , vol.71, no.5, p.4123-4127

EMBO J. , 1 9 9 4 年 , vol.13, no.9, p.2236-2243

J. Immunol. , 1 9 9 6 年 , vol.156, no.11, p.4504-4513

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

C07K 14/00-14/19

CA/BIOSIS/MEDLINE/

WPIDS/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed