

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7068284号
(P7068284)

(45)発行日 令和4年5月16日(2022.5.16)

(24)登録日 令和4年5月6日(2022.5.6)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 1/113(2006.01)

C 0 7 K 1/113

Z N A

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

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

C 0 7 K 14/18 (2006.01)

C 0 7 K 14/18

請求項の数 6 (全82頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-517034(P2019-517034)

(86)(22)出願日 平成29年9月22日(2017.9.22)

(65)公表番号 特表2020-500837(P2020-500837
A)

(43)公表日 令和2年1月16日(2020.1.16)

(86)国際出願番号 PCT/AU2017/051037

(87)国際公開番号 WO2018/058177

(87)国際公開日 平成30年4月5日(2018.4.5)

審査請求日 令和2年9月18日(2020.9.18)

(31)優先権主張番号 2016903961

(32)優先日 平成28年9月29日(2016.9.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
オーストラリア(AU)

(73)特許権者 510332958

マクファーレン パーネット インスティ
テュート フォー メディカル リサーチ
アンド パブリック ヘルス リミテッド
MACFARLANE BURNET I
NSTITUTE FOR MEDICA
L RESEARCH AND PUBL
IC HEALTH LTD
オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア
州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100186897

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アセンブルした糖タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

天然低次抗原から細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法であって、前記方法が、以下のステップ：

(i) 低次抗原の1つ以上の天然システインを還元するために、チオール含有還元剤を含む溶液と、C型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質2 (H C V E 2) を含む低次抗原を含む溶液とを接触させること；

ならびに

(i i) 前記還元剤を除去もしくは希釈するか、または前記還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i) の低次抗原をアセンブルした高次抗原にアセンブリさせることを誘発すること；を含み、

前記高次抗原が三量体以上であり、前記低次抗原が単量体または二量体である、前記方法。

【請求項2】

(a) 低次抗原を高次抗原にアセンブリさせる方法の効率を向上させるために、ステップ(i) 及び(i i) が、ステップ(i i) の残りの低次抗原を含む溶液と共に繰り返される；および/または

(b) ステップ(i) 中またはステップ(i) の前に、低次抗原を含む前記溶液から、高次抗原を枯渇させるもしくは低次抗原を富化させる；および/または

(c) 前記低次抗原の少なくとも80%が、高次抗原に変換される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

(a) 前記アセンブルした高次抗原が、H C V E 2 の受容体結合ドメイン (R B D) である；および/または

(b) 前記アセンブルした高次抗原が、H C V E 2 であり、且つ、超可変領域 1 (H V R 1)、超可変領域 2 (H V R 2)、および/または遺伝子型間可変領域 (i g V R / V R 3) のうちの全部または一部を欠いている；および/または

(c) 前記アセンブルした高次抗原が、C 5 8 1、C 5 8 5、C 6 5 2、C 6 7 7、C 4 9 4、C 4 8 6、C 4 5 9、C 4 5 2、C 5 6 4、C 5 9 7、及び C 5 6 9 からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの 1 つ以上に、非システイン置換または変異を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

ワクチン組成物の製造方法であって、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法を含み、前記アセンブルした高次抗原が、薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合される、前記方法。

【請求項 5】

低次抗原の高次抗原へのアセンブリの方法の効率を向上させるために、ステップ (i) は、ステップ (i i) の前にステップ (i) を繰り返す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

天然低次抗原から細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法であって、前記方法が、以下のステップ：

20

(i) 低次抗原の 1 つ以上の天然システインを還元するために、チオール含有還元剤を含む溶液と、C 型肝炎ウイルスエンベロープ糖タンパク質 2 (H C V E 2) を含む低次抗原を含む溶液とを接触させること；

ならびに

(i i) 前記還元剤を除去もしくは希釈するか、または前記還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i) の低次抗原をアセンブルした高次抗原にアセンブリさせることを誘発すること；を含み、

前記高次抗原が三量体以上であり、前記低次抗原が単量体または二量体であり、前記低次抗原が、

(a) C 5 8 1、C 5 8 5、C 6 5 2、C 6 7 7、C 4 9 4、C 4 8 6、C 4 5 9、C 4 5 2、C 5 6 4、C 5 9 7、及び C 5 6 9 からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの 1 つ以上の非システイン置換または変異、及び/または

30

(b) H V R 1、H V R 2、および/または i g V R / V R 3 のうちの全部または一部の欠失

を含む改変 H C V E 2 を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は一般に、ワクチン及び診断用組成物に関する。特に、本明細書は、H C V エンベロープ 2 (E 2) 糖タンパク質及び H I V エンベロープタンパク質などの目的の高次形態の抗原の生成を容易にする。高次抗原は、ワクチン製造及び e x v i v o 結合用途に適する。

40

【背景技術】

【0002】

本明細書の参考文献の書誌詳細は、本明細書の最後にも記載される。

【0003】

本明細書におけるあらゆる先行技術への言及は、この先行技術があらゆる国において共通の一般知識の一部を形成するという知見または任意の形態の示唆でなく、それと見なされるべきではない。

【0004】

50

C型肝炎ウイルスは、世界人口の3%に慢性的に感染し、且つ慢性肝疾患の主要な原因である非常に多様な病原体である。HCVは、7の高度に分岐した遺伝子型（G1～G7）及び67を超えるサブタイプ（a、b、cなど）として広がり、このために、予防ワクチンが利用できない。近年、直接作用型抗ウイルス薬（DAA）が診療所に行き渡って、95%を超える処置された個人において、ウイルス除去を達成することができている。しかし、DAAは再感染を予防することができず、高コストのために、医療制度に大きな経済的負担がかかる。さらに、推定5000万人が感染症の診断を受けておらず、継続的なウイルス拡散の手段となっている。予防ワクチンは、新たな感染症、おそらく、再感染を防ぎ、DAAの使用を伴う除去プログラムを著しく強化するであろう。それ故、予防ワクチンは、開発にとって優先すべきものと、世界保健機関により認識されている。

10

【0005】

主要な表面糖タンパク質E2は、宿主細胞受容体CD81にビリオンを結合させ、遺伝子型特異的で広域（交差遺伝子型保護の）中和抗体（bNAb）を生じる。自然感染では、30%の個人が、自発的に感染を除去し、これは、bNAbの急速な誘導及び広範に反応性のあるT細胞応答と相関している。加えて、広域中和モノクローナル抗体（NMAb）のカクテルは、HCVの小動物モデルにおける確立されたHCV感染を予防及び除去し得る。しかし、全長または切断型のE2を含むワクチン及び第I相臨床試験の組み換えHCV糖タンパク質を使用して、動物で行われた従前のワクチン接種試験は、高力価NAbを誘発せず、非常に限られた交差遺伝子型の中和が観察された。HCV E2は、高度にグリコシル化され、急速な配列変化を受け、免疫回避に全て関与する複数の可変領域を有する。中和抗体の結合を阻害するために、非中和抗体が提案されている。

20

【0006】

改良されたHCVワクチンを開発する従来技術のアプローチは、CD81結合を保持しながら、可変領域を除去するようにE2を改変することに焦点を当てている。最近、オリゴマー、特に、高分子量のオリゴマー（HMW形態）が、所望の広域中和抗体応答を生じさせることにおいて、単量体よりも優れていると、本発明者らは結論付けた。本アプローチは、有望であるが、高分子量（HMW）形態の野生型HCV E2、及び超可変領域（例えば、デルタ123 HCV E2）を欠いている改変E2は一般に、低収量で発現され、構造的に不均一であり、これにより、ワクチン生成のための課題が生じた。現在では、オリゴマーは、E2を発現させるプラスミドの宿主細胞へのトランスフェクションにより産生され、細胞にE2を天然オリゴマーへとフォールディングさせることが可能になる。次に、オリゴマーは、必要に応じて、他の構成要素から分離される。

30

【0007】

この背景に対して、一部の実施形態では、コスト及び精製の複雑さの低減などの、市販のワクチン製造目的のためのいくつかの潜在的な利点を有するオリゴマー形態のE2を製造するための方策を、本発明者（複数可）は開発している。この方法は、任意の目的の抗原に、及びアSEMBルした高次形態の抗原の製造に、広く適用可能である。

【発明の概要】

【0008】

一態様では、本開示は、天然低次抗原から、細胞外でアSEMBルした高次抗原を調製する方法を可能にし、方法は以下のステップ：（i）1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、（ii）還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、（i）の低次抗原のアSEMBルした高次抗原へのアSEMBルを誘発すること、を含む。本方法の一実施形態では、少なくとも10%の低次抗原が、ステップ（ii）で高次抗原に変換される。本方法の一実施形態では、アSEMBルした高次抗原は、低次抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。本方法の一実施形態では、アSEMBルした高次抗原は、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

40

【0009】

一実施形態では、抗原は、ウイルスエンベロープ抗原である。一実施形態では、ウイルス

50

エンベロープ抗原は、H C VまたはH I Vである。

【 0 0 1 0 】

別の実施形態では、抗原は、癌抗原である。

【 0 0 1 1 】

一実施形態では、高次癌抗原は、四量体、五量体、六量体、十量体など、最大23量体である。

【 0 0 1 2 】

一実施形態では、天然低次抗原から細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法が提供され、方法は、以下のステップ：(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、(i i) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i) の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること；を含み、低次抗原の少なくとも10%は、ステップ(i i) で高次抗原に変換され、それにより、アセンブルした高次抗原は、低次抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

【 0 0 1 3 】

一実施形態では、高次抗原は、予防的または治療的ワクチンとして対象に送達される前に、精製され、薬学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合される。

【 0 0 1 4 】

一実施形態では、本開示は、天然低次H C V E 2から細胞外でアセンブルした高次C型肝炎ウイルス(H C V)エンベロープ糖タンパク質2(E 2)抗原を調製する方法を可能にし、方法は、以下のステップ：(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次E 2を接触させること；ならびに、(i i) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元されたE 2を酸化剤と接触させて、高次H C V E 2への(i) の低次E 2のリアセンブリを誘発すること、を含む。本方法の一実施形態では、低次E 2抗原の少なくとも20%が、ステップ(i i) で高次抗原にアセンブルする。一実施形態では、アセンブルした高次H C V E 2は、低次E 2と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

【 0 0 1 5 】

従って、一実施形態では、本開示は、天然低次H C V E 2から細胞外でアセンブルした高次C型肝炎ウイルス(H C V)エンベロープ糖タンパク質2(E 2)抗原を調製する方法を可能にし、方法は、以下のステップ：(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次E 2を接触させること；ならびに、(i i) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元されたE 2を酸化剤と接触させて、高次H C V E 2への(i) の低次E 2のリアセンブリを誘発すること、を含み、低次抗原の少なくとも20%が、ステップ(i i) で高次抗原にアセンブルし、それにより、アセンブルした高次H C V E 2は、低次E 2と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

【 0 0 1 6 】

別の一実施形態では、本開示は、天然低次H I V e n vから細胞外でアセンブルした高次H I Vエンベロープ糖タンパク質抗原を調製する方法を可能にし、方法は、以下のステップ：(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次H I V e n vを接触させること；ならびに、(i i) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元されたE n vを酸化剤と接触させて、高次H I V E n vへの(i) の低次E n vのリアセンブリを誘発すること、を含み、低次抗原の少なくとも10%は、ステップ(i i) で高次抗原にアセンブルする。

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、低次抗原の高次抗原へのアセンブリの方法の効率を向上させるために、ステップ(i i) の残りの低次抗原を含む溶液を用いて、第1のステップ(i) 及び(i

10

20

30

40

50

i) を繰り返す。

【0018】

驚くべきことに、さらに、本明細書に記載の方法を使用する、A1a7構築物などのシステイン改変バージョンのHCV E2単量体さえも、より高次形態にアセンブルする。A1a7などのシステイン改変形態は主に単量体型で組み換え発現されるので、例えば、HCV E2 RBD形態またはデルタ123形態で通常生成されるような異なる形態の混合物から単量体形態を精製するよりもむしろこの物質から高次形態を生成するのに有用である。従って、本方法において、システイン改変形態もアセンブルするという知見により、低次または単量体の有用な供給源を提供することによりワクチン製造が容易になる。さらに、本明細書で決定されるように、最初に高次形態にアセンブルしなかった低次抗原は、方法を繰り返した時に、高次形態を形成して、高収率の高次形態さえ可能にすることができる。

10

【0019】

本方法の一実施形態では、ステップ(i)中またはステップ(i)の前に、低次抗原を含む溶液は、天然オリゴマーまたは高次抗原がほぼ除去される。

【0020】

一実施形態では、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%以上の低次抗原が高次抗原に変換される。

【0021】

別の実施形態では、本発明者らは、高次抗原の収量における遺伝子型特異的な差異を見出した。従って、一実施形態では、方法は、最大収率のアセンブルしたオリゴマー抗原を生成するウイルスまたは抗原遺伝子型を選択することをさらに含む。

20

【0022】

一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、天然対照高次抗原が1つ以上の中和抗体に結合するか、またはこれを誘発する能力を保持するか、または上回る。

【0023】

一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、HCV E2の受容体結合ドメイン(RBD)である。

【0024】

一実施形態では、アセンブルした高次HCV E2抗原は、超可変領域1(HVR1)もしくはその一部、超可変領域2(HVR2)もしくはその一部、及び/または遺伝子型間可変領域(igVR/VR3)もしくはその一部のうちの1つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている。

30

【0025】

一実施形態では、アセンブルしたオリゴマー抗原は、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に、非システイン置換または変異を含む。本明細書で検討されるように、システイン改変形態の使用は、驚くべきことに、高次形態にアセンブルすることが可能な低次抗原の供給源を提供する。

40

【0026】

別の態様では、本開示は、以下のステップ：(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、(ii) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i)の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること、を含む本明細書に開示のアセンブリ方法を含むワクチン組成物を製造する方法を提供し、この後、アセンブルした高次抗原は、薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合される。

【0027】

一部の実施形態では、抗原は、ウイルスエンベロープ抗原または癌抗原である。

50

【 0 0 2 8 】

一部の実施形態では、ウイルスエンベロープ抗原は、肝炎ウイルス抗原またはH I V エンベロープ抗原である。

【 0 0 2 9 】

別の態様では、本開示は、以下のステップ：(i) 1 つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、(i i) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i) の低次抗原のアセムブルした高次抗原へのアセムブリを誘発すること、を含む本明細書に開示の方法により低次抗原から生成された、アセムブルした高次抗原、またはそれを含む組成物を提供する。

10

【 0 0 3 0 】

一実施形態では、高次の細胞外でアセムブルした抗原を含む組成物が可能である。一実施形態では、高次のアセムブルした抗原は、宿主細胞で産生される対照抗原と比較して、より好ましい免疫原性プロファイルを示す。一実施形態では、好ましい免疫原性プロファイルは、ウイルスエンベロープ抗原の、1 つ以上の非中和エピトープが、より閉じ込められ、及び/または1 つ以上の中和エピトープが、より露出することを含む。一実施形態では、好ましい免疫原性プロファイルは、宿主細胞の環境でアセムブルして高次抗原になる対照抗原と比較して、より有効な免疫応答を決定するアセムブルした抗原を含む。一実施形態では、好ましい免疫原性プロファイルは、対象の腫瘍発生を低減または防止することができる、より強い免疫応答を含む。一実施形態では、アセムブルした抗原は、天然対照高次(オリゴマー)抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を示すことで、天然対照高次抗原と区別可能である。結合の低下は、検出可能な結合を全く含まない(エピトープがアセムブルした抗原に閉じ込められて、非中和抗体と結合することができないが、エピトープが非中和抗体と結合する天然対照抗原に閉じ込められていない)。特に、抗体C B H 4 G により認識されるエピトープは、本明細書に記載のアセムブルしたE 2 中に閉じ込められる。

20

【 0 0 3 1 】

別の実施形態では、本開示は、高次の細胞外でアセムブルしたH C V E 2 糖タンパク質抗原を含む組成物を可能にし、アセムブルしたE 2 は、非中和抗体との結合の低下を示す。特に、非中和抗体C B H 4 G は、天然対照オリゴマーH C V E 2 と比較して、アセムブルしたE 2 との結合の低下を示した。この抗体は、文献、例えば、K e c k e t a l . P L o s P a t h o g e n s : 8 (4) e 1 0 0 2 6 5 3 , A p r i l 2 0 1 2 に記載される。また、抗体2 A 1 2 は、天然対照オリゴマーH C V E 2 と比較して、アセムブルしたE 2 との結合の低下を示した。抗体パネル及びそれらの生成の仕方は、参照により本明細書に組み込まれるV i e t h e e r e t a l . H e p a t o l o g y : 5 5 (4) , 1 1 1 7 - 1 1 3 1 , 2 0 1 7、ならびに、参考文献5、3 3 ~ 3 6、1 7、及び3 7 ならびに出版者から入手可能な補足資料などの本明細書で参照された参考文献に記載される。

30

【 0 0 3 2 】

従って、一実施形態では、アセムブルした抗原は、エピトープ及び/または抗体2 A 1 2 もしくは抗体C B H 4 G により結合されたエピトープ残基の露出を低下させているか、あるいは当該技術分野で既知の抗体2 A 1 2 または抗体C B H 4 G などの非中和抗体により認識されない。

40

【 0 0 3 3 】

別の実施形態では、本開示は、高次の細胞外でアセムブルした高次ウイルスエンベロープ抗原を含む組成物を可能にし、アセムブルしたウイルスe n v 抗原は、天然対照高次ウイルスエンベロープ抗原と比較して非中和抗体との結合の低下を示す。

【 0 0 3 4 】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー抗原は、(i) 対照天然抗原形態または単量体形態と比較して、非中和抗体との結合が低下した、

50

(i i) 対照天然抗原形態と比較して、中和抗体との結合が少なくともほぼ同じ、
(i i i) 対照天然抗原形態または単量体抗原と比較して、より低い力価の非中和抗体の
産生を誘発する、
(i v) 中和抗体の産生を誘発する、
(v) 広域中和抗体の産生を誘発する、
(v i) 任意に、より高い力価の中和抗体の産生を誘発する、
(v i i) 任意に、より高い力価の広域中和抗体の産生を誘発する、
からなる群より選択される少なくとも 1 つの特徴を示す。

【 0 0 3 5 】

別の実施形態では、本開示は、高次の細胞外でアセンブルした高次 H I V エンベロープ抗
原を含む組成物を可能にし、アセンブルした H I V e n v 抗原は、天然対照高次 H I V
エンベロープ抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

【 0 0 3 6 】

好適な対照は、本開示の文脈において当業者に十分に理解されるであろう。一実施形態で
は、対照抗原は、細菌もしくは哺乳動物、酵母、植物、または昆虫細胞などの宿主細胞中
で組み換え産生された目的の試験抗原と同じ遺伝子型である。

【 0 0 3 7 】

一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、H C V E 2 の受容体結合ドメイン (R B
D) である。

【 0 0 3 8 】

一実施形態では、H C V E 2 抗原は、超可変領域 1 (H V R 1) もしくはその一部、超
可変領域 2 (H V R 2) もしくはその一部、及び / または遺伝子型間可変領域 (i g V R
/ V R 3) もしくはその一部のうちの 1 つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠い
ている。H V R 1、H V R 2、及び i g V R / V R 3 配列の例は、図 1 2 に示される。

【 0 0 3 9 】

一部の実施形態では、E 2 抗原は、C 5 8 1、C 5 8 5、C 6 5 2、C 6 7 7、C 4 9 4
、C 4 8 6、C 4 5 9、C 4 5 2、C 5 6 4、C 5 9 7、及び C 5 6 9 からなる群より選
択されるアミノ酸残基のうちの 1 つ以上に、非システイン置換または変異を含む。一実施
形態では、この文脈での 1 つ以上のアミノ酸への言及は、2、3、4、5、6、または 7
つのアミノ酸が、非システイン置換であるか、または欠失もしくは別の方法で変異してい
ることを意味する。

【 0 0 4 0 】

一実施形態では、本開示は、アセンブルした高次 H C V E 2 抗原 (単量体 E 2 からアセ
ンブルした) ならびに薬学的または生理学的に許容される担体及び / または希釈剤を含む
組成物を提供する。

【 0 0 4 1 】

一実施形態では、組成物は、薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはア
ジュバントを含む。一実施形態では、抗原は、ワクチン組成物に適する任意の形態の担体
中で提示され得る。

【 0 0 4 2 】

一実施形態では、本開示は、H C V もしくは H I V 感染などのウイルス感染、または癌、
またはウイルスエンベロープもしくは癌抗原に関連する状態の処置または予防のための薬
品の調製における、本明細書に記載の組成物の使用を提示する。

【 0 0 4 3 】

一実施形態では、本開示は、アセンブルした高次抗原の使用、または診断もしくは E 2、
H C V 感染などの抗原と関連する状態の監視もしくは抗 H C V 処置プロトコールの監視の
ための診断薬の調製における組成物を提供する。

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、本開示は、対象または患者において免疫応答を誘発するための方法を提
供し、方法は、免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で、有効量の本明細書に記

10

20

30

40

50

載のアセンブルした高次抗原、または本明細書に記載の組成物を対象または患者に投与することを含む。

【0045】

一実施形態では、本開示は、アセンブルしたオリゴマー抗原、または本明細書に記載の組成物を対象に投与することを含む、HCVの感染に対して対象を免疫する方法を提供する。

【0046】

一実施形態では、本開示は、HCV感染を処置または予防するのに十分な時間及び条件下で、アセンブルしたオリゴマー抗原、または記載の組成物を対象に投与することを含む、対象のHCV感染を処置または予防するための方法を提供する。

【0047】

一実施形態では、組成物は、異なる病原体由来の第2の高次抗原をさらに含む。

【0048】

一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、検出可能タグまたは精製タグを含む。

【0049】

一実施形態では、本開示は、有効量の抗原を対象に投与すること、及び産生された抗体を精製することを含む、本明細書に記載の高次アセンブルした抗原に対する精製抗体の生成を提供する。

【0050】

一実施形態では、本明細書に記載のアセンブルした高次抗原/E2抗原を特異的に認識する抗体が提供される。代わりにまたは加えて、天然のアセンブルしていない抗原、またはアセンブルした、且つ天然でない抗原に曝露されたエピトープを認識する抗体を同定することができる。

【0051】

一実施形態では、本明細書に記載のアセンブルした高次抗原、または本明細書に記載の組成物を含むキット、または固体もしくは半固体基質が提供される。

【0052】

一実施形態では、本開示は、以下のステップ：(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、(ii) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i)の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること、を含む本明細書に開示の方法により低次抗原から生成されたアセンブルした高次抗原の使用を提示し、組成物は、高次の細胞外でアセンブルした高次癌抗原またはウイルスエンベロップ抗原を含み、アセンブルしたウイルスenv抗原は、抗原特異的免疫細胞と結合/これを検出するための天然対照高次ウイルスエンベロップ抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

【0053】

一実施形態では、主題の高次のアセンブルした抗原は、抗原に特異的なB細胞などの免疫細胞の検出及び/または単離に適するか、またはそれに使用される。一実施形態では、免疫細胞は、抗原に特異的なT細胞である。

【0054】

別の実施形態では、本開示は、i) 本明細書に記載のアセンブルした高次抗原を用いて、抗原に特異的な免疫細胞/B細胞を標識すること、ならびに、ii) 標識された免疫細胞/B細胞をサイトメトリーで検出及び/または単離すること、を含む、抗原に特異的な免疫細胞/B細胞の検出及び/または単離のための方法を可能にする。

【0055】

別の実施形態では、本開示は、i) アセンブルした高次形態の抗原を用いて、HCVまたはHIVなどの抗原に特異的な免疫細胞/B細胞を標識すること；ならびに、ii) 標識された免疫細胞/B細胞をサイトメトリーで検出及び/または単離すること、を含む、HCVまたはHIVなどの抗原に特異的な免疫細胞/B細胞の検出及び/または単離のための方法を可能にする。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

この発明の概要は、本明細書に記載の全ての実施形態の網羅的列挙ではない。

【 0 0 5 7 】

一部の図は、色表現または実体を含有する。カラー版の図は、要求に応じて特許権者から、または適切な特許庁から入手できる。特許庁から取得した場合、手数料が課され得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 8 】

【図 1】 1 2 3 含有プラスミドのアガロースゲル電気泳動を示す。上のバンドは、ベクター骨格を表し、下のバンドは、1 2 3 インサートを表す。これらを、制限酵素での消化によりベクターから単離した。p c D N A - H 7 7 c 1 2 3 - H I S 及び p c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S を両方ともに、N h e I 及び X b a I で消化し、一方、p c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S を、N h e I 及び X h o I で消化した。H 7 7 c、C o n 1、及び S 5 2 1 2 3 含有プラスミドから放出されるインサートの予想される長さは、それぞれ、7 6 2 b p、7 5 9、及び 7 1 0 b p である。サイズマーカー (M) として、G e n e R u l e r 1 k b D N A ラダーを使用した。

10

【図 2 - 1】 1 2 3 のトランスフェクション及び精製を示す。(A - B) サンドイッチ E L I S A により分析された、F S 2 9 3 F 細胞への、p c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S (A) 及び p c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S (B) の一過性トランスフェクションのタンパク質発現。トランスフェクション後の 3、5、7、及び 9 日目に採取した細胞培養上清を 2 倍希釈した後、これらの半対数段階希釈物を、二量体 M B P - C D 8 1 - L E L 1 1 3 - 2 0 1 でコーティングされた酵素免疫アッセイプレートに塗布した。単量体 H 7 7 c 1 2 3 (1 µ g / m L) 及び 6 × H I S タグを欠いている H I V g p 1 4 0 を含有する細胞培養上清の半対数段階希釈物がまた、それぞれ、陽性対照及び陰性対照として含まれた。これの後に、1 / 1 0 0 0 に希釈されたウサギ抗 H I S 抗体を添加し、1 / 1 0 0 0 に希釈された H R P コンジュゲートヤギ抗ウサギ免疫グロブリンの単一希釈物を用いて検出した。(C - D) 同様に行ったサンドイッチ E L I S A により分析された、アフィニティークロマトグラフィー後の C o n 1 1 2 3 (C) 及び S 5 2 1 2 3 (D)。細胞培養上清に含まれるタンパク質を、コバルト荷電 T A L O N ビーズに適用して、6 × H i s タグ付けした 1 2 3 の結合を可能にし、T A L O N 相互作用後の上清をフルースローとして収集した。次に、タンパク質を洗浄し、3 つの別々の画分に溶出させた。元の調製物と比較して、E L I S A について量を等しくするために、全ての試料を必要に応じて希釈した。

20

30

【図 2 - 2】 図 2 - 1 と同様である。

【図 3 - 1】 1 2 3 のゲル濾過プロファイルを示す。(A) F S 2 9 3 F 細胞における安定なトランスフェクションから産生され、且つ S u p e r d e x 2 0 0 を使用したゲル濾過クロマトグラフィーにより分析された、アフィニティー精製された H 7 7 c 1 2 3 糖タンパク質。点線及びピーク高さは、単量体 (7 8)、二量体 (7 0)、H M W 2 (5 9)、及び H M W 1 (4 6) 1 2 3 に対応する画分を示す。(B ~ C) F S 2 9 3 F 細胞へのラウンド 1 の一過性トランスフェクションから生成された、アフィニティー精製された C o n 1 1 2 3 (B) 及び S 5 2 1 2 3 (C) の、S u p e r d e x 2 0 0 を使用するゲル濾過クロマトグラフィーを示す。点線及びピーク高さは、それぞれ、C o n 1 及び S 5 2 の場合、番号 7 7、6 8、6 6、4 6、及び 7 8、6 9、6 5、4 6 とラベル付けされた、それぞれ、単量体、二量体、H M W 2、及び H M W 1 に対応する画分を示す。(D - E) F S 2 9 3 F 細胞への、C o n 1 1 2 3 (D) 及び S 5 2 1 2 3 (E) の一過性トランスフェクションを繰り返し (すなわち、ラウンド 2)、生成された 1 2 3 糖タンパク質を、アフィニティー精製した後、ラウンド 1 と同様に、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分析にかけたことを示す。

40

【図 3 - 2】 図 3 - 1 と同様である。

【図 4 - 1】 S D S - P A G E で分析された、分画された 1 2 3 のゲル濾過を示す。2 つの連続した画分のそれぞれから 2 0 u L がプールされ、且つ 5 ~ 1 2 % のポリアクリル

50

アミド勾配ゲル上にロードされ、ゲル濾過で分画した (A) CON 1 1 2 3 及び (B) S 5 2 1 2 3 の非還元 SDS - PAGE 及びクマシー染色。12% のアクリルアミドゲル上にロードされた非還元 SDS - PAGE と同じ量で、ゲル濾過分画した (C) Con 1 1 2 3 及び (D) S 5 2 1 2 3 の還元 SDS - PAGE 及びクマシー染色。Bio - Rad の広範囲 SDS - PAGE スタンダードをマーカー (M) としてロードした。

【図 4 - 2】図 4 - 1 と同様である。

【図 5 A】MA b が単量体及び HMW 1 1 2 3 に結合する能力の一例を示す。陰性対照としての単量体 1 2 3 (赤色) ($2 \mu\text{g} / \text{mL}$) 及び HMW 1 1 2 3 (青色) ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) 及び BSA (緑色) を酵素免疫アッセイプレートにコーティングした。次に、一次抗体の半対数段階希釈物を添加し、結合を適切な HRP コンジュゲート二次抗体で検出した。次に、この技術を使用して、各結合曲線の中点を比較することにより、HMW 1 1 2 3 に対するパネル MA b の相対的結合を計算し、これを、最高の光学濃度値の半分とした。表 7 の作成のために、単量体及び H 7 7 c HMW 1 1 2 3 と比較して、結合の倍数差を計算した。

10

【図 5 B】MA b のパネルに対する 1 2 3 の異なる株の反応性を示す。単一希釈点評価を実施し、それにより、H 7 7 c、Con 1、及び S 5 2 1 2 3 単量体 ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) 及び陰性対照としての BSA ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) を、酵素免疫アッセイプレートにコーティングした。一次抗体の単一希釈物を添加し、結合を HRP コンジュゲート二次抗体に特異的な適切な種で検出した。

【図 6】(A) は、小規模のトリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (TCEP) 還元を示す。PBS (pH 9.6) 中で調製された異なる濃度の TCEP (0 ~ 500 mM) を用いて、酵素イムノアッセイプレート上にコーティングされた H 7 7 1 2 3 単量体を 37 °C で 30 分間還元した。立体配座依存性マウス H 5 3 ($1 \mu\text{g} / \text{mL}$)、ならびにそれぞれ陽性及び陰性対照を表す、ウサギ抗 H I S (1 / 1000) 及びヒト抗 CMV R 0 4 (1 / 1000) を含む、一次抗体の単一希釈物を添加した。結合を適切な HRP コンジュゲート二次抗体で検出した。一次抗体のそれぞれに対する反応を、三連で試験し、標準偏差を示すエラーバーを有する線グラフとして、平均光学濃度値をプロットした。(B) は、TCEP 及び BMOE で処理された単量体 H 7 7 c 1 2 3 を示す。表 8 に記載される 1 ~ 7 とラベル付けされた異なる条件下での TCEP 還元及び BMOE 架橋剤を用いるリフォールディング後の単量体 H 7 7 c 1 2 3 ($10 \mu\text{g}$) の非還元 SDS - PAGE 及びクマシー染色。1 2 3 試料を、対照としての単量体及び HMW 1 H 7 7 c 1 2 3 (それぞれ、 $5 \mu\text{g}$) ならびに広範囲 SDS - PAGE マーカー (M) と一緒に、5 ~ 12% のポリアクリルアミド勾配ゲルにロードした。

20

【図 7 - 1】(A) は、グルタチオンで処理された単量体 H 7 7 c 1 2 3 を示す。表 9 に記載される 1 ~ 5 とラベル付けされた異なる条件下で、酸化還元シャフリングシステムを使用して、GSH 及び GSSG でリフォールディングした後の、単量体 H 7 7 c 1 2 3 ($10 \mu\text{g}$) の非還元 SDS - PAGE 及びクマシー染色。対照としての単量体及び HMW 1 H 7 7 c 1 2 3 (各 $5 \mu\text{g}$) ならびに広範囲 SDS - PAGE マーカー (M) と一緒に、H 7 7 c 1 2 3 試料を 5 ~ 12% のポリアクリルアミド勾配ゲルにロードした。(B) は、グルタチオンで処理された単量体 H 7 7 c 1 2 3 のゲル濾過プロファイルを示す。Superdex 200 を使用した、未処理単量体 H 7 7 c 1 2 3 のゲル濾過クロマトグラフィー。(C) は、Superdex 200 を使用した、 $10 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ の糖タンパク質を 2 mM の GSH 及び 0.4 mM の GSSG で処理した後の H 7 7 c 1 2 3 のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。点線及びピーク高さは、単量体 (78) 及び二量体 (69) に対応する画分を示す。

30

40

【図 7 - 2】図 7 - 1 と同様である。

【図 8 - 1】(A) は、小規模 DTT 還元を示す。酵素イムノアッセイプレート上にコートされた H 7 7 c 1 2 3 単量体を、pH 9.6 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液中で調製された異なる濃度の DTT (0 ~ 10 mM) で、37 °C で 30 分間還元した。立体配座依存性マウス H 5 3 ($1 \mu\text{g} / \text{mL}$)、ならびにそれぞれ陽性及び陰性対照を表すウサギ抗 H I

50

S (1 / 1 0 0 0) 及びヒト抗 C M V R 0 4 を含む、一次抗体の単一希釈物を添加した。結合を適切な H R P コンジュゲート二次抗体で検出した。一次抗体のそれぞれに対する反応を、三連で試験し、標準偏差を示すエラーバーを有する線グラフとして、平均光学濃度値をプロットした。(B) は、D T T で処理された単量体 H 7 7 c 1 2 3 を示す。異なる条件下 (1 ~ 1 2 とラベル付けされ、表 3 . 6 に記載される) での D T T 還元ならびに徐々に希釈する方法を使用したリフォールディング後の単量体 H 7 7 c 1 2 3 (1 0 μ g) の非還元 S D S - P A G E 及びクマシー染色。対照としての単量体及び H M W 1 H 7 7 c 1 2 3 (各 5 μ g) ならびに広範囲 S D S - P A G E マーカー (M) と一緒に、H 7 7 c 1 2 3 試料を 5 ~ 1 2 % のポリアクリルアミド勾配ゲルにロードした。(C) は、S u p e r d e x 2 0 0 を使用した未処理単量体 H 7 7 c 1 2 3 のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。(D) は、S u p e r d e x 2 0 0 を使用して、1 μ g / μ L の糖タンパク質を 1 m M の D T T で処理した後の H 7 7 c 1 2 3 のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。点線及びピーク高さは、単量体 (7 7 ~ 7 8) 、二量体 (6 9) 、及び H M W 1 2 3 (5 9) に対応する画分を示す。

【図 8 - 2】図 8 - 1 と同様である。

【図 9 - 1】D T T 処理 1 2 3 及び A L A 7 1 2 3 の抗原特性決定を示す。D T T 処理 1 2 3 及び A L A 7 1 2 3 は、実施例 1 5 に記載されるように、抗体 (A) A R 3 C (B) C B H 4 G (C) H C 8 4 . 2 7 及び (D) H C V 1 との結合の評価により特性決定されている。

【図 9 - 2】図 9 - 1 と同様である。

【図 1 0】ゲル濾過クロマトグラフィーを使用した、D T T 処理 1 2 3 のリフォールディングから生じた生成物の分析を示す。未処理単量体のプロファイルが示され、続いて、実施例 1 4 に記載されるような D T T での処理数 (1 、 2 、または 3 ヒット) を増加させる。

【図 1 1】実施例 1 4 に記載されるようなゲル濾過クロマトグラフィーを使用した、プロテアーゼ阻害剤の存在下での非リフォールディング 1 2 3 単量体のリフォールディング及び 1 2 3 のリフォールディングから生じた生成物の分析を示す。

【図 1 2】使用した H C V 分離株の対応する E 2 6 6 1 領域の C l u s t a l W アライメントを提示する。H 7 7 c (A F 0 0 9 6 0 6 、 G 1 a 、配列番号 1 1) 、 J 6 (A F 1 7 7 0 3 6 、 G 2 a 、配列番号 1 6) 、 s 5 2 (G U 8 1 4 2 6 3 、 G 3 a 、配列番号 1 3) 、 E D 4 3 (G U 8 1 4 2 6 5 、 G 4 a 、配列番号 1 0) 、 S A 1 3 (A F 0 6 4 4 9 0 、 G 5 a 、配列番号 1 2) 、 E U H K 2 (Y 1 2 0 8 3 、 G 6 a 、配列番号 1 4) 、 Q C 6 9 (E F 1 0 8 3 0 6 、 G 7 a 、配列番号 1 5) 。 H V R 1 、 H V R 2 、及び i g V R / V R 3 は、赤 / オレンジ色で示される。E D 4 3 のアミノ酸残基 G F L A S L F Y 、 Y T W G E N E T D 、及び Y R L W H F に対応する残基は、C D 8 1 結合領域である。

【図 1 3】1 2 3 A l a 7 コドン最適化に対するヌクレオチド構築物を示し；下線領域は、制限酵素部位 G G T A C C = K p n I 、 G G A T C C = B a m H I 、 C T C G A G = X h o I 、及び 1 2 3 A l a 7 のタンパク質配列に対応する。

【図 1 4 - 1】図 1 4 ~ 図 1 4 c は、タンパク質配列：A F 0 0 9 6 0 6 コード配列 (配列番号 6) 、A F 0 0 9 6 0 6 全長 E 2 (配列番号 7) 、A F 0 0 9 6 0 6 E 2 6 6 1 (配列番号 8) 、W T _ E 2 6 6 1 (配列番号 4) 、及び 1 2 3 (配列番号 3) の C l u s t a l O m e g a アミノ酸アライメントを示す。下線領域は、残基 6 3 0 ~ 6 3 5 に対応する。

【図 1 4 - 2】図 1 4 - 1 と同様である。

【図 1 4 - 3】図 1 4 - 1 と同様である。

【図 1 4 - 4】図 1 4 - 1 と同様である。

【図 1 4 - 5】図 1 4 - 1 と同様である。

【図 1 4 - 6】図 1 4 - 1 と同様である。

【図 1 4 - 7】図 1 4 - 1 と同様である。

【図 1 4 - 8】図 1 4 - 1 と同様である。

【図 14 - 9】図 14 - 1 と同様である。

【図 14 - 10】図 14 - 1 と同様である。

【図 14 - 11】図 14 - 1 と同様である。

【図 15】(A) は、異なる濃度のメルカプトエタノールで還元されて、アセンブルした試料の非還元 SDS - PAGE を示す。精密サイズマーカーは、左側に示され、分子量は、kDa で示される。右に示される単量体、二量体、及び高分子量形態の表示サイズ。(B) は、Superdex 200 を使用した、100 mM の BME で処理した後の単量体 123 (破線) または未処理の単量体 123 (実線) のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。

【図 16】アセンブルした HCV タンパク質でワクチン接種された動物の抗体価を示す。表 15 に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、単量体 123 タンパク質と結合する能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann - Whitney 独立 t 検定を使用する 2 - F 及び 4 - F + 5 - F の間の抗体価の差は統計的に有意であった ($p = 0.0281$)。プリズム v 7.0。

10

【図 17】アセンブルした HCV タンパク質でワクチン接種された動物のエピトープ I に対する抗体価を示す。表 15 に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、遺伝子型 1a H77c 配列の残基 409 ~ 428 を包含する合成ペプチドと結合するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann - Whitney 独立 t 検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズム v 7.0。

20

【図 18】アセンブルした HCV タンパク質でワクチン接種された動物のエピトープ I I に対する抗体価を示す。表 15 に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、遺伝子型 1a H77c 配列の残基 523 ~ 549 を包含する合成ペプチドと結合するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann - Whitney 独立 t 検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズム v 7.0。

【図 19】アセンブルした HCV タンパク質でワクチン接種された動物の遺伝子型 2a エピトープ I に対する抗体価を示す。表 15 に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、遺伝子型 2a J6 配列の残基 409 ~ 428 を包含する合成ペプチドと結合するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann - Whitney 独立 t 検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズム v 7.0。

30

【図 20】免疫血清が、HCV E2 及びその細胞内受容体 CD81 の相互作用を阻害する能力を示す。表 15 に列挙された抗原でワクチン接種された動物の最終採血を、(A) H77c G1a E2 及び CD81 と (B) J6 G2a E2 及び CD81 との間の結合を阻害するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann - Whitney 独立 t 検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズム v 7.0。

【図 21】免疫血清が肝細胞の遺伝子型 1a ウイルスによる感染を予防する能力を示す。表 15 に列挙された抗原でワクチン接種された動物の最終採血を、G1a HCV pp による感染を予防するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、その平均値である。

40

【図 22】HMW1 及び単量体免疫血清の特異性を示す。モルモット血清の段階希釈物を、一定量の HCV1 (A)、HC84 - 27 (B)、AR3C (C)、及び 2A12 (D) に添加した。抗体を単量体 123 に添加し、結合した MA b を抗ヒト Fab₂ で検出した。Mann - Whitney t 検定 (Prism v 7) を使用して、群を比較した。

【図 23】アセンブルした 123 を使用した、選別された B 細胞集団の FACS プロットを示す。CD19 陽性及び抗 E2 陽性 B 細胞を、抗 CD19 Cy7 抗体及びアセンブルした 123 で検出した。

50

【図 2 4】アセンブルしたタンパク質のサイズを決定するサイズ排除クロマトグラフィー - マルチアングル光散乱を示す。アセンブルした 1 2 3 A 7 (青) 及びアセンブルした 1 2 3 (赤) 試料の UV (A 2 8 0 n m) シグナル及びモル質量の重ね合わせ。

【図 2 5】D T T での第 2 ラウンドの変性についで、続いて、アセンブリした、D D T での処置の後に H M W 形態にアセンブルしていない 1 2 3 A 7 単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。単量体及び H M W 種は、矢印で示され、それぞれの % は、表に示される。

【図 2 6】D T T での変性についで、続いて、アセンブリした R B D 単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。単量体及び H M W 種は、矢印で示され、それぞれの % は、表に示される。

【図 2 7】D T T での変性についで、続いて、アセンブリした R B D A 7 単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。単量体及び H M W 種は、矢印で示され、それぞれの % は、表に示される。

【図 2 8】D T T での変性についで、続いて、アセンブリした e n v 単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。H M W 種は、矢印で示される。

【 0 0 5 9 】

表の簡単な説明

表 1 は、一過性トランスフェクション条件を示す。

表 2 は、M A b のリストを示す。

表 3 は、D T T 還元のための条件を示す。

表 4 は、グルタチオンによるタンパク質のリフォールディングの条件を示す。

表 5 は、T C E P 還元のための条件を示す。

表 6 は、異なるオリゴマー形態の 1 2 3 の発現を示す。ゲル濾過曲線上のそれらの対応するピークの下面積 (図 3 B ~ E) を全曲線下面積で除することにより、単量体、二量体、H M W 2、及び H M W 1 の百分率を計算した。G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e s の U N I C O R N 制御ソフトウェアを使用して、曲線下面積を定量した。

表 7 は、H M W 1 1 2 3 の抗原特性を示す。

表 8 は、1 2 3 の T C E P 還元及び B M O E 媒介リフォールディングの条件を示す。

表 9 は、グルタチオンを用いる H 7 7 c 1 2 3 リフォールディング条件を示す。グルタチオン処理された H 7 7 c 1 2 3 の非還元 S D S - P A G E 分析の単量体のデンストメトリーを二量体のデンストメトリーで除することにより、単量体対二量体の比を計算した (図 7 A)。L I - C O R O d y s s e y システムを使用して、デンストメトリーを定量した。

表 1 0 は、グルタチオン処理された単量体 H 7 7 c 1 2 3 からの多量体形成の定量を示す。曲線下総面積の百分率として計算されたゲル濾過曲線上の単量体及び二量体のピーク下面積 (図 7 B)、ならびに単量体のピーク下面積を二量体のもので除することにより計算された単量体対多量体の比。

表 1 1 は、D T T で処理された単量体 H 7 7 c 1 2 3 からの多量体形成の定量を示す。曲線下総面積の百分率として計算されたゲル濾過曲線上の単量体及び H M W のピーク下面積 (図 7 C ~ D)、ならびに単量体のピーク下面積を多量体のもので除することにより計算された単量体 (7 6 分) 対多量体 (5 8 分) の比。

表 1 2 は、D T T で処理された単量体 H 7 7 c 1 2 3 からの多量体形成の定量を示す。曲線下総面積の百分率として計算されたゲル濾過曲線上の単量体及び多量体のピーク下面積 (図 7 B)、ならびに単量体のピーク下面積を多量体のもので除することにより計算された単量体対多量体の比。

表 1 3 は、抗原 1 2 3 を使用して、リフォールディングタンパク質を生じた方法を示す。

表 1 4 は、異なるリフォールディング方法により生じた % リフォールディングタンパク質を示す。

表 1 5 は、免疫化群を示す。

表 1 6 は、単量体 1 2 3 に対する免疫血清反応性の統計分析を示す。

10

20

30

40

50

表 1 7 は、免疫血清が H 7 7 c エピトープ I と結合する能力の統計分析を示す。
 表 1 8 は、免疫血清が H 7 7 c エピトープ I I I と結合する能力の統計分析を示す。
 表 1 9 は、免疫血清が J 6 エピトープ I と結合する能力の統計分析を示す。
 表 2 0 は、免疫血清が H 7 7 c G 1 a E 2 の C D 8 1 との結合をブロックする能力の統計分析を示す。
 表 2 1 は、免疫血清が J F H - 1 G 2 a E 2 の C D 8 1 との結合をブロックする能力の統計分析を示す。
 表 2 2 は、免疫血清が H 7 7 c H C V ウイルスの肝細胞への感染を予防する能力の統計分析を示す。
 表 2 3 は、免疫血清が H C V 1 の結合を防止する能力の統計分析を示す。
 表 2 4 は、免疫血清が H C 8 4 - 2 7 の結合を防止する能力の統計分析を示す。
 表 2 5 は、免疫血清が A R 3 C の結合を防止する能力の統計分析を示す。
 表 2 6 は、免疫血清が 2 A 1 2 の結合を防止する能力の統計分析を示す。
 表 2 7 は、リアセンブルしたタンパク質の S E C - M A L S を示す。

【 0 0 6 0 】

配列表のキー

配列番号 1 : コドン最適化 1 2 3 A 1 a 7 に対する D N A 構築物。
 配列番号 2 : コドン最適化 1 2 3 A 1 a 7 をコードする D N A 配列。
 配列番号 3 : アミノ酸配列 1 2 3 A 1 a 7 。
 配列番号 4 : W T E 2 6 6 1 をコードするアミノ酸配列 (R B D) 。
 配列番号 5 : 1 2 3 E 2 6 6 1 。
 配列番号 6 : A F 0 0 9 6 0 6 コード配列に対応するアミノ酸残基。
 配列番号 7 : A F 0 0 9 6 0 6 全長 E 2 タンパク質配列に対応するアミノ酸残基。
 配列番号 8 : A F 0 0 9 6 0 6 E 2 6 6 1 に対応するアミノ酸残基。
 配列番号 9 : N 末端シグナル配列。
 配列番号 1 0 : アミノ酸配列 E D 4 3 。
 配列番号 1 1 : アミノ酸配列 H 7 7 c 。
 配列番号 1 2 : アミノ酸配列 S A 1 3 。
 配列番号 1 3 : アミノ酸配列 s 5 2 。
 配列番号 1 4 : アミノ酸配列 E U H K 2 。
 配列番号 1 5 : アミノ酸配列 Q C 6 9 。
 配列番号 1 6 : アミノ酸配列 J 6 。
 配列番号 1 7 : C 末端膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を欠いている H I V e n v に対応するアミノ酸残基。
 配列番号 1 8 : N 末端リーダー配列を有する H I V e n v に対応するアミノ酸残基。
 配列番号 1 9 : コドン H 7 7 c 1 2 3 をコードする D N A 配列。
 配列番号 2 0 : C o n 1 1 2 3 をコードする D N A 配列。
 配列番号 2 1 : s 5 2 1 2 3 をコードする D N A 配列。
 配列番号 2 2 : ヒトトリプシノーゲンシグナルペプチド。
 配列番号 2 3 : ヒト組織プラスミノーゲンアクチベーターシグナルペプチド (t P A) 。
 配列番号 2 4 : 6 H i s タグ。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 6 1 】

主題の開示は、薬剤についての特定のスクリーニング手順、薬剤の特定の製剤、及び種々の医学的方法論に限定されず、それ自体は変わり得る。

【 0 0 6 2 】

本明細書の各実施形態は、別途明記のない限り、他の全ての実施形態に準用されるべきである。

【 0 0 6 3 】

別途記載のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属

10

20

30

40

50

する当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の任意の物質及び方法を使用して、本発明を実施または試験することができる。実務家は、当該技術分野の定義及び用語ならびに当業者に既知の他の方法については、特に、Sambrook et al., 1989 (上掲), Coligan et al., Current Protocols In Protein Science, John Wiley & Sons, Inc., 1995 - 1997、特に、1章、5章、及び6章、ならびにAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 47, John Wiley & Sons, New York, 1999; Colowick and Kaplan, eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir and Blackwell, eds., Handbook of Experimental Immunology, Vols. I - IV, Blackwell Scientific Publications, 1986; Joklik ed., Virology, 3rd Edition, 1988; Fields and Knipe, eds., Fundamental Virology, 2nd Edition, 1991; Fields et al., eds., Virology, 3rd Edition, Lippincott - Raven, Philadelphia, Pa., 1996に導かれる。さらに、Staby, Rathore and Ahuga, eds Preparative Chromatography for Separation of Proteins; Whiley, 2017、特に、3章及び7章が参照されてもよい。さらに、Wen, Ellis, Pujar, eds, Vaccine Development and Manufacturing, Wiley, 2014、特に、4章、6章、8章、11章。さらに、方法及び物質については、WO2008022401、WO2012016290、及びWO2012068637が参照されてもよい。

【0064】

定義

本明細書を通して、文脈に別途要求のない限り、「含む (comprise)」という用語、または「含む (comprises)」もしくは「含むこと (comprising)」などの変形形態は、記載された要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を含むが、他の任意の要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を排除しないことを意味すると理解されるであろう。「からなる」は、「からなる」という語句の後に続くものはいかなるものを含み、且つそれに限定されることを意味する。従って、「からなる」という語句は、列挙された要素が必要または必須であること、及び他の要素が全く存在し得ないことを示す。「から本質的になる」は、本語句の後に列挙された任意の要素を含み、且つ列挙された要素に対し開示で指定された活性または作用を阻害または寄与しない他の要素に限定されることを意味する。

【0065】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈に別途明示のない限り、複数の態様を含む。従って、例えば、「1つの組成物」への言及は、単一の組成物及び2つ以上の組成物を含み；「薬剤」への言及は、1つの薬剤及び2つ以上の薬剤を含み；「本開示」への言及は、本開示の単一及び複数の態様などを含む。

【0066】

実施例は、単量体HCV E2由来のオリゴマーHCV E2のアセンブリ及び単量体HIV env由来のオリゴマーHIV envのアセンブリを説明するが、本開示は、これらの特定の実施例に制限されず、ワクチン産生のための、またはex vivo結合用途におけるウイルスエンベロープタンパク質及び癌抗原のアセンブリに拡張する。これに関して、方法は、低次抗原からの高次抗原の産生を提示する。「高次」抗原への言及は、三量体以上の倍数を意味するが、「低次形態」は、単量体または二量体を意味する。「抗原」、「種」、及び「形態」という用語は、互換的に使用される。

【0067】

10

20

30

40

50

「天然」への言及は、抗原が細胞内の細胞機序を使用してアセンブルしていることを意味する。「アセンブルした」及び「フォールディングした」または「リフォールディングした」という用語は、互換的に使用されるが、「アセンブルした」は、アセンブルした抗原の部分的な *de novo* 性質をもたらすために使用される。アセンブルしたへの言及は、「無細胞」アセンブルしたを意味する。一実施形態では、アセンブルした抗原は、それらの天然対応物と同程度に有効であるか、またはそれよりも有効である免疫原である。

【0068】

本明細書で使用される場合、「非中和抗体」は、ウイルス抗原と結合するが、ウイルス侵入を減少させないか、または阻害しない抗体を指す。一実施形態では、それは、E2と結合するがウイルス侵入を減少させないか、または阻害しない抗体を指す。癌抗原に関して、非中和抗体への言及は、腫瘍細胞死滅を媒介しない抗体を意味する。

10

【0069】

本明細書で使用される場合、「中和抗体」は、ウイルス抗原と結合し、且つ、結合時にウイルス侵入を阻害する抗体を指す。一実施形態では、E2と結合し、且つE2との結合時にウイルス侵入を阻害する抗体を指す。癌抗原に関して、中和抗体への言及は、直接的または間接的に腫瘍細胞死滅を媒介する抗体を意味する。

【0070】

本明細書で使用される場合、「広域中和抗体」は、抗原/HCV抗原の複数の遺伝子型またはサブタイプに対して交差防御を提供する抗体を指す。

【0071】

20

高次またはオリゴマー形態は、三量体及びより大きなフォールディング形態を含む抗原の構造形態である。高次抗原または形態または種は、低次形態、抗原、または種からアセンブルする。低次形態は、抗原の単量体または二量体形態を含む。

【0072】

「制御」への言及は、当業者により理解されることになり、本発明との関係で意味がある結果を生じることになるか、またはそれを生じる可能性がある比較器（複数可）を用いることを意味する。通常は、対照は、宿主細胞または無細胞発現系で産生される対応物である。

【0073】

本明細書に記載の方法を使用して、任意のウイルスエンベロープ抗原が操作されてもよい。ウイルスファミリーの非限定例としては、*Adenoviridae*、アフリカ豚コレラウイルス様ウイルス、*Arenaviridae*、アルテリウイルス、*Astroviridae*、*Baculoviridae*、*Birnaviridae*、*Bunyaviridae*、*Caliciviridae*、*Circoviridae*、*Coronaviridae*、デルタウイルス、*Filoviridae*、*Flaviviridae*、*Hepadnaviridae*、*Hepeviridae*、*Herpesviridae*、*Orthomyxoviridae*、*Paramyxoviridae*、*Picornaviridae*、*Poxviridae*、*Reoviridae*、*Retroviridae*、及び *Rhabdoviridae* が挙げられる。特定のウイルスエンベロープ抗原は、*Paramyxoviridae*、*Retroviridae*、及び *Filoviridae* に由来する。

30

【0074】

ウイルスエンベロープ抗原の非限定例は、インフルエンザヘマグルチニン（HA）などの病原性ウイルス；R2サブタイプもしくはHIV-2 gp125を含むHIV-1糖タンパク質（gp）120などのレンチウイルス；SARS-Si糖タンパク質などのコロナウイルス；呼吸器合胞体ウイルス（RSV）F2などのパラミクソウイルス；または Dengue ウイルスの E タンパク質などのフラビウイルスに由来する。

40

【0075】

1つの重要な群の抗原は、*Coccidioides immitis*、*Histoplasma capsulatum*、*Blastomyces dermatitidis*、

50

及び *Paracoccidioides brasiliensis* などのヒトの一次全身性真菌病原体などの病原体に由来する。免疫不全宿主に依存する傾向がある重要な日和見性真菌病原体は、*Cryptococcus neoformans*、*Pneumocystis jirovecii*、*Candida spp.*、*Aspergillus spp.*、*Penicillium marneffei*、及び *Zygomycetes*、*Trichosporon beigelii*、ならびに *Fusarium spp* を含む。幅広い病原性真菌は、とりわけ、エイズを有する対象、化学療法誘発性好中球減少症を有する対象、または造血幹細胞移植を受けている患者を含む免疫不全対象と関連する。

【0076】

一部の実施形態では、抗原は、細菌、真菌、ウイルス、藻類、寄生虫（外部寄生虫または内部寄生虫を含む）、プリオン、卵菌、粘菌、カビ、線虫、マイコプラズマなどを含む微生物に由来する。非限定例として、以下の：*Acinetobacter*、*Actinobacillus*、*Actinomyces*、*Actinomyces*、*Aeromonas*、*Bacillus*、*Bacteroides*、*Bordetella*、*Borrelia*、*Brucella*、*Burkholderia*、*Campylobacter*、*Citrobacter*、*Clostridium*、*Corynebacterium*、*Enterobacter*、*Enterococcus*、*Erysipelothrix*、*Escherichia*、*Francisella*、*Haemophilus*、*Helicobacter*、*Klebsiella*、*Legionella*、*Leptospira*、*Listeria*、*Micrococcus*、*Moraxella*、*Morganella*、*Mycobacterium*（結核）、*Nocardia*、*Neisseria*、*Pasteurella*、*Plesiomonas*、*Propionibacterium*、*Proteus*、*Providencia*、*Pseudomonas*、*Rhodococcus*、*Salmonella*、*Serratia*、*Shigella*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas*、*Streptococcus*、*Treponema*、*Vibrio*（コレラ）及び *Yersinia*（伝染病）、*Adenoviridae*、アフリカ豚コレラウイルス様ウイルス、*Arenaviridae*（例えば、ウイルス性出血熱、ラッサ熱）、*Astroviridae*（アストロウイルス科）*Bunyaviridae*（ラクロス）、*Caliciviridae*（ノロウイルス）、*Coronaviridae*（コロナウイルス）、*Filoviridae*（例えば、エボラウイルス、マールブルグウイルス）、*Parvoviridae*（B19ウイルス）、*Flaviviridae*（例えば、C型肝炎ウイルス、デングウイルス）、*Hepadnaviridae*（例えば、B型肝炎ウイルス、デルタウイルス）、*Herpesviridae*（単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス）、*Orthomyxoviridae*（インフルエンザウイルス）、*Papovaviridae*（パピローマウイルス）、*Paramyxoviridae*（例えば、ヒトパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、ヒトRSウイルス）、*Picornaviridae*（風邪ウイルス）、*Poxviridae*（天然痘ウイルス、伝染性膿疱性皮膚炎ウイルス、サル痘ウイルス）、*Reoviridae*（ロタウイルス）、*Retroviridae*（ヒト免疫不全ウイルス）、*Paroviridae*（パルボウイルス）、*Papillomaviridae*（パピローマウイルス）、アルファウイルス、*Rhabdoviridae*（狂犬病ウイルス）、*Trypanosoma*、*Leishmania*、ジアルジア、トリコモナス症、*Entamoeba*、*Naegleria*、*Acanthamoeba*、*Plasmodium*、トキソプラズマ、*Cryptosporidium*、*Isospora*、*Balantidium*、*Schistosoma*、*Echinostoma*、*Fasciolopsis*、*Clonorchis*、*Fasciola*、*Opisthorchis*、*Paragonimus*、*Pseudophyllidea*（例えば、*Diphyllbothrium*）、*Cyclophyllidea*（例えば、*Taenia*）の目、属、または種のうちの1つ以上から選択される。病原性線虫は、*Rhabditida*（例えば、*Strongyloides*）

10

20

30

40

50

、*Strongylida* (例えば、*Ancylostoma*)、*Ascaridia* (例えば、*Ascaris*、*Toxocara*)、*Spirurida* (例えば、*Dracunculus*、*Brugia*、*Onchocerca*、*Wuchereria*)、ならびに *Adenophorea* (例えば、*Trichuris* 及び *Trichinella*)、*Prototheca*、*Pfiesteria*、*Absidia*、*Aspergillus*、*Blastomyces*、*Candida* (酵母)、*Cladophialophora*、*Coccidioides*、*Cryptococcus*、*Cunninghamella*、*Fusarium*、*Histoplasma*、*Madurella*、*Malassezia*、*Microsporum*、*Mucor*、*Paecilomyces*、*Paracoccidioides*、*Penicillium*、*Pneumocystis*、*Pseudallescheria*、*Rhizopus*、*Rhodotorula*、*Scedosporium*、*Sporothrix*、*Trichophyton*、ならびに *Trichosporon* 目由来の種を含む。誤解を避けるために、病原体は、新たな病原体を含んでもよい。

【0077】

例示的な癌抗原としては、CD 抗原、糖タンパク質、糖脂質 (ガングリオシド)、炭水化物 (Lewis - Y) 血管標的 (VEGF / R)、成長因子及び間質または細胞外マトリックス抗原 (FAP、Tenascin) などが挙げられる。例えば、以下のもの：KS 1 / 4 汎癌腫抗原、卵巣癌腫抗原 (CA125)、前立腺酸性リン酸塩、前立腺特異抗原、メラノーマ関連抗原 p97、メラノーマ抗原 gp75、高分子量のメラノーマ抗原 (HMW - MAA)、前立腺特異的膜抗原、癌胎児性抗原 (CEA)、多形上皮ムチン抗原、ヒト乳脂肪球抗原、結腸直腸腫瘍関連抗原、CEA、TAG - 72、LEA、Burkitt リンパ腫抗原 38.13、CD19、ヒトBリンパ腫抗原 CD20、CD33、メラノーマ特異的抗原、ガングリオシド GD2、ガングリオシド GD3、ガングリオシド GM2、ガングリオシド GM3、腫瘍特異的移植型の細胞表面抗原 (TSTA)、ウイルス誘導腫瘍抗原、T 抗原 DNA 腫瘍ウイルス、RNA ウイルスウイルスのエンベロープ抗原、癌胎児性抗原 - - フェトプロテイン、大腸 CEA、膀胱腫瘍癌胎児性抗原、分化抗原、ヒト肺癌抗原 L6、L20、線維肉腫の抗原、ヒト白血病 T 細胞抗原 - Gp37、ネオ糖タンパク質、スフィンゴ脂質、乳癌抗原、EGFR (上皮成長因子受容体)、HER2 抗原、多形上皮ムチン、悪性ヒトリンパ球抗原 - APO - 1、胎児赤血球に見出された I 抗原、一次内胚葉、成人赤血球に見出された I 抗原、着床前の胚、胃腺癌に見出された I (Ma)、M18、乳房上皮に見出された M39、骨髓細胞に見出された SSEA - 1、VEP8、VEP9、My1、VIM - D5、結腸腺癌で見出された Du56 - 22、TRA - 1 - 85 (血液型 H)、結腸腺癌で見出された C14、肺腺癌で見出された F3、胃癌で見出された AH6、Yハプテン、胎児性癌細胞で見出された LeY、TL5 (血液型 A)、A431 で見出された細胞 EGF 受容体、膀胱癌で見出された E1 シリーズ (血液型 B)、胎児性癌細胞で見出された FC10.2、胃腺癌抗原、腺癌で見出された CO - 514 (血液型 Lea)、腺癌で見出された NS - 10、CO - 43 (血液型 Leb)、A431 細胞の EGF 受容体で見出された G49、結腸腺癌で見出された MH2 (血液型 Aleb / Ley)、結腸癌で見出された 19.9、胃癌ムチン、骨髓細胞で見出された TsA7、メラノーマで見出された R24、胎児性癌細胞で見出された 4.2、GD3、D1.1、OFA - 1、GM2、OFA - 2、GD2、及び M1:22:25:8 を含む分化抗原、ならびに 4 ~ 8 細胞期の胚で見出された SSEA - 3 及び SSEA - 4 が記載される。

【0078】

本明細書で使用される場合、「ヒト免疫不全ウイルス」または「HIV」という用語は、レンチウイルス属のエンベロープ陽性一本鎖 RNA メンバー及び Retroviridae ファミリーの一部を指す。経時的に、HIV は、後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こす。本明細書で使用される場合、用語は、例えば、限定されないが、HIV 1 もしくは HIV 2、またはそれらの任意の群もしくはサブタイプを含む任意の HIV 遺伝子

10

20

30

40

50

型を指す。一実施形態では、H I V - 1 は、M 群、N 群、O 群、または P 群由来である。一実施形態では、H I V - 1 は、A、B、C、D、E、F、G、H、J、K、またはそれらの循環組み換え形態 (C R F) から選択されるサブタイプである。H I V は、エンベロープタンパク質糖タンパク質 (g p) 1 2 0 及び e n v をコードする。

【0079】

本明細書で使用される場合、「C 型肝炎ウイルス」または「H C V」という用語は、F l a v i v i r i d a e ファミリーのヘパシウイルス属に属するエンベロープ陽性センス一本鎖 R N A ウイルスを指す。本明細書で使用される場合、用語は、任意の遺伝子型の H C V、例えば、限定されないが、H C V 遺伝子型 1 (G 1)、H C V 遺伝子型 2 (G 2)、H C V 遺伝子型 3 (G 3)、H C V 遺伝子型 4 (G 4)、H C V 遺伝子型 5 (G 5)、H C V 遺伝子型 6 (G 6)、H C V 遺伝子型 7 (G 7) の株、を指し、それらの任意のサブタイプ、例えば、サブタイプ a、b、c、d、e などを含み得る。H C V は、宿主細胞へのウイルス侵入に必要とされる 2 つの糖タンパク質 E 1 及び E 2 をコードする。

10

【0080】

本明細書で使用される場合、「E 2」とも呼ばれる「H C V E 2」は、H C V の任意の遺伝子型 / サブタイプ由来の E 2 ポリペプチドを含む。一実施形態では、E 2 は、H C V 遺伝子型 G 1、G 2、G 3、G 4、G 5、G 6、G 7、またはそれらのキメラバージョンに由来する。由来するは、これらの遺伝子型のうちの 1 つ以上に直接的または間接的に基づくものを意味する。遺伝子型は、自然に変化し、人によりさらに改変され得、保存的変異を通常含む、このような機能的多様体が包含される。1 つ以上のアミノ酸変異を含む機能的多様体は、当業者に既知であり、組み換え E 2 細胞外ドメインを含む機能的多様体を含んでもよい。用語は、例えば、受容体結合を媒介する全長 E 2 ポリペプチドの一部、立体配座もしくは他のエピトープを認識し及び / または E 1 E 2 二量体形成を媒介する 1 つ以上の抗体による抗体結合、を含む多様体をさらに含む。用語は、免疫原性を増加させるための改変 (デルタ 1 2 3 形態) または単量体産生を増加させるための改変 (例えば、「A 1 a 7」) などの E 2 の改変形態を含む。

20

【0081】

1 つの例示的な親 H C V E 2 ポリペプチドは、遺伝子型 H 7 7 1 a のアミノ酸 3 8 4 ~ 6 6 1 (E 2 6 6 1 もしくは E 2 e) を含む E 2 ポリペプチドの受容体結合部分、または別の H C V 遺伝子型由来の対応する部分である。従って、使用可能な E 2 ポリペプチドは、膜貫通ドメインがない時、C D 8 1 結合に必要とされる細胞外ドメインの全部または一部を含む。さらなる多様体は、切断または分泌に必要な配列の付加または欠失 / 破壊を含んでもよい。例えば、シグナルペプチド切断及び糖タンパク質分泌を改変するために、E 3 8 4 T H が含まれるか、欠失しているか、または改変され得る (M c C a f f r e y e t a l . , 2 0 0 7)。一実施形態では、E 2 ポリペプチドは、1 つ以上の超可変領域またはその一部を欠いている。一実施形態では、E 2 は、超可変領域、例えば、超可変領域 1 (H V R 1) またはその一部、超可変領域 2 (H V R 2) またはその一部、及び遺伝子型間可変領域 (i g V R / V R 3) またはその一部：のうちの 1 つ以上、を欠いている。

30

【0082】

一実施形態では、E 2 は、H V R 1、H V R 2、及び i g V R / V R 3 を欠いている。一実施形態では、E 2 は、1 2 3 である。一実施形態では、E 2 は、配列番号 3、4、5、6、7、もしくは 8 に記載の配列；または C D 8 1 結合活性を保持するそれらのフラグメント；またはそれらと少なくとも 5 0 %、もしくは少なくとも 5 5 %、もしくは少なくとも 6 0 %、もしくは少なくとも 6 5 %、もしくは少なくとも 7 0 %、もしくは少なくとも 7 5 %、もしくは少なくとも 8 0 %、もしくは少なくとも 8 5 %、もしくは、少なくとも 9 0 %、もしくは少なくとも 9 5 %、もしくは少なくとも 9 7 %、もしくは少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % 同一の配列を含む。

40

【0083】

一実施形態では、E 2 は、0 または 1 つ以上の変異型または破壊型システイン (複数可)

50

を含む。従って、一実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のシステインが欠失しているか、または破壊されている。一実施形態では、これらは、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、C569、及び/またはC620から選択される。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C486、C581、及びC652である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C581、C585、及びC652である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C452、C486、C581、及びC652である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C569、C581、C585、及びC652である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C486、C581、及びC652である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C452、C486、C569、C581、C585、及びC652である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C452、C486、C569、C581、C585、C597、及びC652である。特許請求の範囲を含む本明細書を通して、HCV糖タンパク質E2のポリペプチド残基の全ての番号付けは、図14に示されるプロトタイプHCV-H77ポリペプチド配列、Genbankアクセッション番号AF009606(配列番号6)に基づく。E2の成熟形態は、配列番号7に別々に提示される、配列番号6のアミノ酸残基384~746に包含される。配列番号6に示され、且つ図14に示されるようなアミノ酸番号付けに関して、本明細書で言及され改変がなされる。

10

【0084】

1つの例示的なシステイン変異バージョンのE2661は、以下のシステイン：C581、C585、C652、C486、C452、C597、及びC569の変異または破壊を含む。この変異体は、「Ala7」と呼ばれる。さらなるシステイン改変バージョンのE2は、全体が本明細書に組み込まれている国際公開第WO2012/016290号に記載される。

20

【0085】

本明細書で使用される場合、「CD81」は、テトラスパニンスーパーファミリーの膜貫通タンパク質であり、且つHCV宿主受容体である分化抗原群81を指す。

【0086】

HCV E2の受容体結合ドメイン(RBD)は、CD81結合モチーフを含み、異なるジスルフィド及びグリカン配置をそれぞれ含有する異なる種の領域へとフォールディング及びオリゴマー化する。単量体及び二量体WTE2661及び123E2661上のジスルフィド結合配置を同定するためかなりの作業を、本発明者(複数可)は行っており、このことは、これらのタンパク質の両方が、単量体タンパク質としてでさえ、実際に不均一であり、複数の交互に分子内でジスルフィド結合した形態で存在することを示唆する。

30

【0087】

HCV E2が組み換え的に産生される時、用いられる遺伝子型に応じて(本明細書で決定されるように)、一般に20~30%がオリゴマー性であり、およそ70%が単量体性である。Ala7などのシステイン改変形態を用いて、より多くの単量体を産生する。

40

【0088】

一例として、FS293F細胞へのデルタ123の遺伝子型1aH77c配列の安定なトランスフェクションから生じた、「デルタ123」または「123」と呼ばれる、超可変領域1(HVR1)、超可変領域2(HVR2)及び遺伝子型間可変領域(igVRまたはVR3)が除去されているE2受容体結合ドメイン(残基384~661)のおよそ20%にすぎない形態のみが、単量体の場合の64.9%と比較して、HMW形態のものである(図3A)。本明細書に示される場合、この百分率は、増加した量のオリゴマー形態を生成する遺伝子型を選択することにより増加させることができる。

【0089】

従来、還元及びリフォールディング方法は、望ましくない凝集物から低次種を再生するた

50

めに使用されている。本発明によれば、還元及びリフォールディングを用いて、単量体からオリゴマーを生じるか、または単量体及びオリゴマーからオリゴマーを生じる。

【0090】

一実施形態では、本発明は、天然HCV E2からリフォールディングした組み換えオリゴマーC型肝炎ウイルス(HCV)エンベロープ糖タンパク質2(E2)を調製する方法を提供し、該方法は、以下のステップ：

(i) 1つ以上の天然システイン(またはジスルフィド結合)を還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、天然E2を接触させること；ならびに、

(ii) 還元剤を除去するか、または還元された天然E2を酸化剤と接触させて、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2への還元された単量体E2のリフォールディングを誘発すること；を含み、

少なくとも20%の単量体が、ステップ(ii)でオリゴマーに変換され、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、単量体E2と比較して非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。

【0091】

一実施形態では、ステップ(i)は、ステップ(ii)の前に2回実施される。一実施形態では、ステップ(ii)は、ステップ(ii)の前に3回以上実施される。一部の実施形態では、ステップ(i)及び(ii)は、2回以上繰り返される。

【0092】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、以下：

(i) 対照天然HCV E2形態または単量体E2と比較して、非中和抗体との結合が低下した、

(ii) 対照天然HCV E2形態と比較して、中和抗体との結合が少なくともほぼ同じ、

(iii) 対照天然HCV E2形態または単量体E2と比較して、より低い力価の非中和抗体の産生を誘発する、

(iv) 中和抗体の産生を誘発する、

(v) 広域中和抗体の産生を誘発する、

(vi) 任意に、より高い力価の中和抗体の産生を誘発する、

(vii) 任意に、より高い力価の広域中和抗体の産生を誘発する、

からなる群より選択される少なくとも1つの特性を示す。

【0093】

天然HCV E2単量体は、異なるHCV E2種の混合物から効率的に産生され、効果的に精製することができる。本明細書に記載の、または当技術分野で既知の、天然単量体HCV E2の産生。本明細書に記載の、または当該技術分野で既知の、天然単量体及びオリゴマーHCV E2の産生。通常は、タンパク質は、HCV E2をコードする好適な発現ベクターで形質転換された宿主細胞において組み換え産生される。

【0094】

好適な哺乳動物細胞株としては、BHK、VERO、HT1080、293、293T、FS293F、Exp1293、RD、COS-7、CHO、Jurkat、HUT、SUPT、C8166、MOLT4/クローン8、MT-2、MT-4、H9、PML、CEM、骨髓腫細胞(例えば、SB20細胞)及びCEMX174が挙げられるが、これらに限定されず、例えば、ATCCから入手可能である。他の宿主細胞としては、酵母、例えば、Pichia pastoris、またはSf9細胞などの昆虫細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0095】

細胞は、500mL、1L、1.5L、2L、2.5L、または3Lの体積で培養され得る。一例では、細胞は、バッチ細胞培養プロセスを使用して培養される。一例では、細胞は、灌流細胞培養プロセスを使用して培養される。一例では、細胞は、種培地及び産生培地で培養される。一例では、細胞は、攪拌槽型反応器で培養される。一例では、反応器の容積は、約1L～約2500Lである。一例では、反応器は、1Lの反応器、1.5Lの

10

20

30

40

50

反応器、2 Lの反応器、2.5 Lの反応器、または3 Lの反応器である。一例では、細胞は、ウェーブバイオリアクターで培養される。一例では、細胞は、セルファクトリーシステム、例えば、Nuncセルファクトリーシステム、で培養される。

【0096】

合成DNAは、好適なプロモーター及び他の好適な転写制御エレメントを含有する発現ベクターへの分子クローニングにより組み換え発現させ、原核生物または真核生物宿主細胞に移して組み換えタンパク質を産生させ得る。このような操作のための技術は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y., 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988. に記載される。

10

【0097】

例えば、酵母内で発現させるための構築物は、好ましくは、合成遺伝子を含有し、プロモーター（例えば、GAL10、GAL7、ADH1、TDH3、またはPGK）及び終結配列（例えば、S. cerevisiae ADH1ターミネーター）などの関連転写及び翻訳制御配列が合成遺伝子に作動可能に連結される。酵母は、Saccharomyces cerevisiae、Hansenula polymorpha、Pichia pastoris、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、及びSchizosaccharomyces pombeからなる群より選択することができる。Yeast Genetics: Rose et al., A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1990も参照のこと。核酸分子は、当該技術分野で既知の酵母内での発現に最適化されたコドンとし得る（Sharp and Cowe, Yeast, 7: 657-678, 1991を参照）。所与の任意の細胞型に適するベクター及び制御エレメントは、本明細書の教示及び発現ベクターについて当該技術分野で既知の情報を考慮して当業者が選択することができる。

20

【0098】

宿主細胞株におけるクローニング及び発現のために入手可能なベクター、当該技術分野で周知であり、哺乳動物細胞株または酵母（真菌）の細胞におけるクローニング及び発現のためのベクター、細菌細胞株におけるクローニング及び発現のためのベクター、ファージにおけるクローニング及び発現のためのベクター、ならびに、昆虫細胞株におけるクローニング及び発現のためのベクターを含むが、これらに限定されない。発現されたタンパク質は、標準的なタンパク質精製方法を使用して回収することができる。翻訳制御エレメントは、M. Kozak（例えば、Kozak, Mamm Genome, 7(8): 563-74, 1996; Kozak, Biochimie., 76(9): 815-21, 1994; Kozak, J Cell Biol, 108(2): 229-241, 1989; Kozak and Shatkin, Methods Enzymol, 60: 360-375, 1979）に概説されている。

30

40

【0099】

HCV E2をコードする例示的なポリヌクレオチドは、配列表に提示されており、配列番号1または2に示されるポリヌクレオチド配列を含む。

【0100】

天然HCV E2は、100 kDaを超えるか、または200 kDaを超える分子量を有する形態（例えば、HMW1またはHMW2形態）を含む、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、最大約23merであり得る。単量体形態及びオリゴマー形態は、サイズ、ゲル濾過特性、抗体反応性などに基づいて選択され得る。発現タンパク質は、抗体アフィニティークロマトグラフィーなどのアフィニティークロマトグラフィーにより細胞構成

50

要素から精製され得る。

【 0 1 0 1 】

一実施形態では、方法は、本明細書に記載の方法で処理する前に、天然 H C V E 2 と比較して、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 の純度を増加させる。一実施形態では、方法は、細胞培養物から単離された天然オリゴマー H C V E 2 と比較して、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 の純度を増加させる。本明細書で使用される場合、「精製された」または「純粋」という用語は、汚染物質、すなわち、細胞またはウイルス汚染物質、例えば、限定されないが、タンパク質、脂質、核酸、及び炭水化物、からのオリゴマー H C V E 2 の分離を指す。

【 0 1 0 2 】

さらに、一実施形態では、方法は、試料中のオリゴマー H C V E 2 の濃度を増加させ、すなわち、単量体 H C V E 2 を含有する試料から、本明細書に記載の方法を用いる試料の処理は、オリゴマーの H C V E 2 の濃度を少なくとも 1 0 % の、または少なくとも 2 0 % 、または少なくとも 3 0 % 、または少なくとも 4 0 % 、または少なくとも 5 0 % 、または少なくとも 6 0 % 、または少なくとも 7 0 % 、または少なくとも 8 0 % 、または少なくとも 9 0 % 、または少なくとも 9 5 % 増加させる。一実施形態では、方法は、二量体の濃度を少なくとも 1 0 % 、または少なくとも 2 0 % 、または少なくとも 3 0 % 、または少なくとも 4 0 % 、または少なくとも 5 0 % 、または少なくとも 6 0 % 、または少なくとも 7 0 % 、または少なくとも 8 0 % 、または少なくとも 9 0 % 、または少なくとも 9 5 % 増加させる。一実施形態では、方法は、三量体及び / または高次形態の濃度を少なくとも 1 0 % 、または少なくとも 2 0 % 、または少なくとも 3 0 % 、または少なくとも 4 0 % 、または少なくとも 5 0 % 、または少なくとも 6 0 % 、または少なくとも 7 0 % 、または少なくとも 8 0 % 、または少なくとも 9 0 % 、または少なくとも 9 5 % 増加させる。

【 0 1 0 3 】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 は、天然対照オリゴマー H C V E 2 と比較して、安定性の改善、すなわち、熱力学的安定性及び / または動的安定性の改善、を示す。一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 は、天然対照オリゴマー H C V E 2 と比較して、安定性の増加を示す。

【 0 1 0 4 】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 は、天然オリゴマー H C V E 2 と同等の、非中和抗体との結合を示す。実施形態では、オリゴマーは、二量体、または三量体、または四量体、または五量体、最大 2 3 m e r である。

【 0 1 0 5 】

H C V E 2 単量体の部分還元が好ましい。立体構造エピトープを認識する抗体との一部の抗体反応性が保持される時、部分還元が達成される。例えば、1 0 % 、2 0 % 、または 3 0 % のタンパク質立体配座は、本明細書で使用する部分還元プロトコールにおいて保持され得る。

【 0 1 0 6 】

一実施形態では、還元条件は、使用される還元剤に応じて約 7 を超える p H を含む。

【 0 1 0 7 】

「オリゴマー」または「多量体」という用語は、三量体、四量体など、または高分子量 (H M W) 形態としてフォールディングさせる抗原または E 2 のバージョンを含む。異なる形態は、例えば、非還元ゲル電気泳動におけるそれらの移動パターンにより、またはゲル濾過クロマトグラフィーにより、もしくはそれらの抗体反応性により同定される。一実施形態では、単量体、二量体、H M W 2 、及び H M W デルタ 1 2 3 形態は、それぞれ、約 4 6 、9 7 、2 3 9 、及び 2 4 0 0 の分子量を有する。

【 0 1 0 8 】

特定の一実施形態では、低次形態が二量体形態を含むか、または低次形態が単量体形態を含む。

【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

50

一実施形態では、オリゴマー形態は、三量体形態である。

【0110】

一実施形態では、オリゴマー形態は、三量体形態及び/または高次形態である。

【0111】

一実施形態では、オリゴマーは、本明細書に記載のH M W 2もしくはH M W、または本明細書に記載のその改変型などの、より高次の形態を形成する。

【0112】

一実施形態では、天然E 2は、受容体結合ドメインを含み、且つステム領域及び膜貫通ドメインを欠いているE 2の改変形態である。

【0113】

当技術分野で知られている通り、膜貫通ドメインは、残基715～746であり、ステム領域は、残基662～714である。一実施形態では、この形態は、W T E 2 6 6 1である。

【0114】

本明細書に記載されるように、H C V E 2の全ての天然形態は、異なる分子内及び(二量体以上の場合)分子間ジスルフィド結合形態を含む。本開示の一実施形態によれば、単量体が還元されて、オリゴマーにリフォールディングするか、オリゴマーが還元されて、オリゴマーにリフォールディングするか、または単量体及びオリゴマーが還元されて、二量体またはオリゴマーにリフォールディングする。

【0115】

本方法の一実施形態では、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%の単量体が、オリゴマーに変換される。

【0116】

別の実施形態では、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、または少なくとも86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%の単量体が、オリゴマーに変換される。

【0117】

一実施形態では、オリゴマーは、100kDaを超える見かけの分子量を有する。一実施形態では、オリゴマーは、200kDaを超える見かけの分子量を有する。一実施形態では、オリゴマーは、2000kDaを超える見かけの分子量を有する。

【0118】

一実施形態では、方法は、最大収量のリフォールディングしたオリゴマーH C V E 2を生じるH C V 遺伝子型を選択することをさらに含む。一実施形態では、H C V 遺伝子型は、G 1、G 2、G 3、G 4、G 5、G 6、G 7、及び/または他のH C V 遺伝子型から選択される。例示的で非限定的な実施形態では、H C V 遺伝子型は、C o n 1またはS 5 2である。

【0119】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーH C V E 2は、単量体リフォールディングで調製されていない対照オリゴマーH C V E 2と比較して、抗体C B H 4 Gとの結合の低下を示す。天然オリゴマーは、細胞外単量体のリフォールディングで調製されていない対照オリゴマーH C V E 2の例である。

【0120】

本方法の一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーH C V E 2は、対照オリゴマーH C V E 2が中和抗体に結合する能力をほぼ保持する。本方法の一実施形態では、オリゴマーH C V E 2は、対照オリゴマーH C V E 2が広域中和抗体と結合する能力をほぼ保持する。

【0121】

一実施形態では、還元剤は、可逆的還元剤であり、例えば、D T Tまたは2-メルカプト

10

20

30

40

50

エタノール、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、または他のチオール含有剤から選択される。

【０１２２】

本方法の一実施形態では、還元剤は、約 ０．１～１．０ mM で用いられて、天然 E ２の部分還元を引き起こすジチオスレイトールである。

【０１２３】

本方法の一実施形態では、溶液は、７～９を超える pH の緩衝液である。

【０１２４】

一実施形態では、抗原濃度は、pH ９．６の炭酸緩衝液中 １ mg / ml である。０．６ mM の DTT（最終濃度）が使用され、インキュベーションは、３７℃で１時間である。溶液を pH ６．８の PBS で徐々に希釈して、抗原濃度及び緩衝液を pH ６．８の PBS と交換する。

10

【０１２５】

一実施形態では、天然 E ２（及びその結果としてリフォールディングしたオリゴマー）は、超可変領域 １（HVR １）もしくはその一部、超可変領域 ２（HVR ２）もしくはその一部、及び／または遺伝子型間可変領域（IgVR / VR ３）もしくはその一部のうちの １つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている。

【０１２６】

受容体結合ドメインは、ウイルス侵入に必須ではない領域に免疫応答を集中させること及び広域中和抗体のエピトープを遮蔽することによる免疫回避に参与している可変領域 HVR １、HVR ２、及び IgVR を含む。HVR ２及び／または IgVR 及び／または HVR １の少なくとも一部の欠失を生じさせて、広域中和抗体を誘発する保存エピトープに免疫応答を集中させる。

20

【０１２７】

RBD を含み、且つ ３つ全ての可変領域を欠いている構築物は、WO 2008 / 022401 に記載されるように、E 2661 デルタ 123 または 123 と呼ばれる。欠失した領域は、Gly、Ser、Ala、及び Arg（例えば、GSSG または ETHGSSG）を含む群より選択される残基を含む最大 20 アミノ酸のペプチド配列などの WO 08 / 022401（全体が本明細書に組み込まれる）に記載のフレキシブルなリンカー配列と任意に置換される。

30

【０１２８】

一実施形態では、天然 E ２は、精製を助けるシグナル配列またはタンパク質タグを含む。一実施形態では、シグナル配列は、細胞からのタンパク質の分泌をもたらす。一実施形態では、シグナル配列は、配列番号 9 に提示されるアミノ酸配列「MNPILLITFVAAALA」を含む N 末端シグナル配列である。一実施形態では、タンパク質タグは、C 末端 His タグである。一実施形態では、C 末端 His タグは、アミノ酸配列「HHHHHH」を含む。

【０１２９】

単量体 E ２でさえ不均一であり、異なる分子内ジスルフィド配置を示すことを、本発明者らは発見している。単量体の還元により、より均一なオリゴマーをリフォールディングするための良い出発点が提供されると、本発明者らは判断した。

40

【０１３０】

一実施形態では、天然 E ２は、C 581、C 585、C 652、C 677、C 494、C 486、C 459、C 452、C 564、C 597、C 569、及び／または C 620 から選択される １つ以上のアミノ酸残基に非システイン置換または変異を含む。驚くべきことに、（「Ala 7」と呼ばれる）非システイン残基と置換された 7 つのシステイン残基である C 452、C 486、C 569、C 597、C 581、C 585、C 652 の非システイン置換を有する HCV E 2 単量体でさえ、より高レベルのオリゴマーにリフォールディングする。

【０１３１】

50

E 2 は、糖タンパク質の三次構造を足場にする E R 中で 9 個の分子内ジスルフィド結合を形成する 1 8 の高度に保存されたシステイン残基を含む。W O 1 2 / 0 1 6 2 9 0 (全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるように、これらのジスルフィドの一部は、C D 8 1 結合及び M A b H 5 3 結合には重要でない。また、7 つのシステイン残基の除去を含むシステイン改変形態は、単量体産生を有意に増加させ、オリゴマーの産生を減少させる。通常、E 2 は、宿主細胞中で組み換え産生される時、異なる単量体及びオリゴマー形態の混合物を産生する。W O 1 2 / 0 1 6 2 9 0 は、種々のシステイン改変 H C V E 2 の生成について記載していた。C 4 5 2、C 4 8 6、C 5 6 9、及び C 5 9 7 から選択される 2、3、または 4 つのシステインが変異または破壊されている A 1 a 置換形態などの W O 1 2 / 0 1 6 2 9 0 に開示の他の構築物が本明細書では考えられる。E 2 6 6 1 は、C 6 7 7 のシステインを欠いており、1 7 のシステインを有する。

10

【 0 1 3 2 】

一部の実施形態では、天然 H C V E 2 は、発現される時、天然形態中に少なくとも 4 0 % の単量体及び 7 0 % 未満のオリゴマー、または、少なくとも 5 0 % の単量体及び 5 0 % 未満のオリゴマーを組み換え産生する A 1 a 4、A 1 a 5、A 1 a 6、または A 1 a 7 改変形態の H C V E 2 などのシステイン改変形態である。

【 0 1 3 3 】

本明細書で決定されるように、C 6 2 0 - A 1 a の変異導入は、高分子量のオリゴマー形成をブロックする。従って、高次形態の産生のための天然 H C V E 2 形態は一般に、C 6 2 0 である。

20

【 0 1 3 4 】

別の幅広い態様では、本明細書は、単量体エンベロープ糖タンパク質から組み換えオリゴマーウイルスエンベロープ糖タンパク質を調製する方法を提供し、該方法は、以下のステップ：

(i) 1 つ以上のジスルフィド結合を部分的に還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、天然 E 2 を接触させること；ならびに

(i i) 還元剤を除去するか、または (i) の E 2 を酸化剤と接触させて、オリゴマーエンベロープ糖タンパク質への単量体 E 2 のリフォールディングを誘発すること；を含み、少なくとも 2 0 % の単量体がステップ (i i) でオリゴマーに変換され、オリゴマーが単量体糖タンパク質と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。

30

【 0 1 3 5 】

一実施形態では、ステップ (i) は、ステップ (i i) の前に 2 回実施される。一実施形態では、ステップ (i i) は、ステップ (i i) の前に 3 回実施される。

【 0 1 3 6 】

別の実施形態では、本明細書は、本明細書で上述した還元及びリフォールディング方法により産生された、組み換えリフォールディングしたオリゴマー C 型肝炎ウイルス (H C V) E 2 糖タンパク質を含む組成物を可能にする。

【 0 1 3 7 】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマータンパク質は、配列番号 3、4、5、6、7、8 のうちの 1 つに提示されるアミノ酸または切断バージョンもしくは改変バージョン、またはそれらの機能的多様体を含む。機能的多様体及び改変型は、前改変形態または任意の他の好適な対照と比較して、増強された免疫原性を示し得る。

40

【 0 1 3 8 】

一実施形態では、組成物は、本明細書に記載の還元及びリフォールディング方法で生成された組み換えリフォールディングしたオリゴマー C 型肝炎ウイルス (H C V) E 2 糖タンパク質を含み、オリゴマーの H C V E 2 は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照 H M W E 2 と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

【 0 1 3 9 】

一実施形態では、組成物は、本明細書に記載の還元及びリフォールディング方法で生成されたリフォールディングした組み換えオリゴマー C 型肝炎ウイルス (H C V) E 2 糖タン

50

パク質を含み、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照HMW E2と比較して、抗体CBH4GまたはAR3Cとの結合の低下を示す。

【0140】

一実施形態では、組成物は、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含み、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照HMW E2と比較して、抗体CBH4Gとの結合の低下を示す。

一実施形態では、組成物は、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含み、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照HMW E2と比較して、抗体AR3Cとの結合の低下を示す。

10

【0141】

一実施形態では、組成物は、単量体リフォールディングしたオリゴマーHCV E2、ならびに、薬学的または生理学的に許容される担体及び/または希釈剤を含む。

【0142】

一実施形態では、組成物は、アジュバントをさらに含む。

【0143】

アジュバントは組成物が免疫応答を誘導する能力を増強する任意の薬剤とし得ることを、当業者は理解するであろう。一実施形態では、アジュバントは、抗原に対する免疫応答を増加させることにより作用し得る。一実施形態では、アジュバントは、Th1及び/またはTh2免疫応答を増加し得る。一実施形態では、アジュバントは、Petrovsky et al (2004) 及びWilson-Welder et al. (2009) に記載されるようなミョウバン塩もしくは他のミネラルアジュバント；張力活性剤；細菌誘導体；ビヒクルもしくは徐放物質、またはサイトカインとし得る。一実施形態では、アジュバントは、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム（ミョウバン）、リン酸カルシウム、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、MF-59、サポニン、QS-21、リボ多糖体（LPS）、モノホスホリルリピドA（MPLA）、Th1活性化ペプチド（例えば、IMP321）、TLR-2リガンド（例えば、OspA、ムラミルジペプチド（MDP）、マクロファージ活性化リボペプチド-2（MALP-2）、CpGアジュバント、百日咳毒素、熱感受性毒素（LTk63及びLT-R192G）、ジフテリア毒素、イミキモド、Addavax、ISCOMAATRIX、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、IL-12、IL-6、IL-4、IL-2、IL-1、IFN-g、AS04（MPLA及びQS-21を含有するリボソーム製剤）、グリセリン、ならびにパラフィン、鉱油、ラノリン、スクアレン、ISA-70、及びモンタニドなどの油性エマルジョンから選択され得る。例示的な一実施形態では、アジュバントは、サポニン系アジュバントである。関連する態様では、アジュバントは、コレステロール及びステロールをさらに含むサポニン系アジュバントであり、これの例示的实施例は、ISCOMATRIXアジュバントである。例示的な一実施形態では、アジュバントは、MF59である。例示的な一実施形態では、アジュバントは、Addavaxである。一実施形態では、アジュバントは、炭水化物アジュバント、例えば、グルカン、デキストラン、レンチナン、グルコマンナン、またはガラクトマンナンである。

20

30

40

【0144】

一実施形態では、本明細書は、HCV感染の処置もしくは予防における、またはこのための薬品の調製における、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物の使用を提示する。

【0145】

一実施形態では、本明細書は、HCV感染の診断もしくは監視または抗HCV処置プロトコルの監視における、あるいはこのための診断薬の調製における、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物の使用を提示する。

【0146】

50

一実施形態では、組成物は、70重量%を超える、または80重量%を超える三量体または三量体及び高次形態のHCV E2を含む。

【0147】

一実施形態では、組成物は、70重量%を超える、または80重量%を超える二量体HCV E2を含む。

【0148】

一実施形態では、組成物は、70重量%を超える、または80重量%を超える高次形態のHCV E2糖タンパク質を含む。

【0149】

一実施形態では、本明細書は、方法は、対象または患者において免疫応答を誘発するための方法を提供し、方法は、免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で、本明細書に記載のリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む有効量の組成物を対照または患者に投与することを含む。

10

【0150】

これらの実施形態によれば、組成物は一般に、広域中和抗体の生成を含む免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で投与される。本発明の組成物は、単回投与または適用として投与され得る。あるいは、組成物は、反復投与または適用を含んでもよく、例えば、組成物は、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回またはそれ以上投与され得る。

【0151】

20

本発明はさらに、対象または患者において免疫応答を誘発するための方法を提供し、方法は、対象または患者に、本明細書に記載のリフォールディングオリゴマーHCV E2を含む組成物を有効量投与することを含む。さらに、本明細書に記載のリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含むC型肝炎ウイルスの感染に対して対象を免疫するための組成物、特に、ワクチン組成物が、本発明では考えられる。

【0152】

本明細書で使用される「ワクチン」という用語は、対象において免疫学的応答を誘導する少なくとも1つの免疫学的に活性な構成成分及び必ずしもそうとは限らないが、該活性構成成分の免疫学的活性を増強する1つ以上の追加の構成成分（例えば、アジュバント）を含む医薬組成物を指す。さらに、ワクチンは、医薬組成物に典型的なさらなる構成成分を含んでもよい。ワクチンの免疫学的に活性な構成成分は、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2組成物などの高次のアセンブルした抗原を含む。「ワクチン」及び「ワクチン組成物」という用語は、本発明では互換的に使用される。

30

【0153】

本発明で考えられる「対象」は、ヒト、または実験室もしくは技術分野で認められた試験もしくはビヒクル動物を含む動物である。「患者」は、処置または予防処置を必要とするヒト対象を含む。

【0154】

一実施形態では、本明細書は、抗原に関連する状態に対して対象を免疫するための方法も可能にし、方法は、本明細書に記載のアセンブルまたはリフォールディングしたオリゴマー抗原を含む組成物を対象に投与することを含む。

40

【0155】

一実施形態では、本明細書はまた、本明細書に記載の細胞外でリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物を対象に投与することを含む、HCVの感染に対して対象を免疫する方法を可能にする。

【0156】

一実施形態では、本明細書はまた、HCV感染を処置または予防するのに十分な時間及び条件下で、本明細書に記載の細胞外でリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物を対象に投与することを含む対象のHCV感染を処置または予防するための方法を可能にする。

50

【 0 1 5 7 】

本明細書で使用される「治療の有効量」及び「予防の有効量」を含む「有効量」という用語は、一部の対象において望ましい治療的、予防的、または生理学的効果を提供する、単回投与での、または一連のもしくは徐放系の一部としての、本発明の組成物の十分な量を意味する。望ましくない効果、例えば、副作用は、望ましい治療効果と共に現れることがある：従って、実務家は、適切な「有効量」を決定する際に、潜在的なリスクに対する潜在的な利益のバランスをとる。必要とされる組成物の正確な量は、対象の種、年齢及び全身状態、投与様式などに応じて、対象ごとに変動するであろう。従って、正確な「有効量」を特定することが不可能であり得る。しかし、任意の個々の場合における適切な「有効量」は、日常的な技術または実験を使用して当業者により決定され得る。当業者は、組成物または他の薬剤の事前投与、対象のサイズ、対象の症状の重症度または感染集団における症状の重症度、ウイルス負荷、及び選択された特定の組成物または投与経路のような要因に基づいて必要量を決定することが可能であろう。

10

【 0 1 5 8 】

「処置」という用語は、E 2 抗原などの抗原に関連する状態の1つ以上の症状及びH C V 感染症の、またはH C V の進行した症状を発症するリスクもしくは子孫に伝わるH C V のリスクのある、少なくとも一部の対象における任意の測定可能なまたは統計的に有意な改善を指す。

【 0 1 5 9 】

「予防」及び「予防処置」などの用語は、交換可能に使用され、H C V 感染に関連する状態または状態の兆候の、予防、またはその後の感染を減弱させること、または感染するリスクを低減すること、または重症度もしくは発症を低減させることのために、H C V に感染していることが知られていない対象への本発明の組成物の投与を含む。

20

【 0 1 6 0 】

ワクチン組成物の投与は一般に、予防目的のためである。組成物の予防的投与は、その後のあらゆる感染を予防または減弱させるのに役立つ。一実施形態では、ワクチン組成物は、病原体による対象の再感染を予防するものである。「薬理学的に許容される」組成物は、レシピエント患者により忍容されるものである。有効量のワクチンが投与されると考えられる。「有効量」は、十分な体液性または細胞性免疫を誘導するなどの所望の生物学的効果を達成するのに十分な量である。これは、ワクチンの種類、レシピエントの年齢、性別、健康状態、及び体重に依存し得る。所望の生物学的効果の例としては、症状が生じないこと、症状の低減、組織中のウイルス価の低減、または鼻分泌物、C 型肝炎ウイルスによる感染に対する完全な防御、及びC 型肝炎ウイルスによる感染に対する部分的な防御が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 1 6 1 】

一部の実施形態では、本発明のワクチンまたは組成物は、その存在が、感染性C 型肝炎ウイルスの少なくとも1つの株に対する少なくとも1つの一次または二次体液性または細胞性免疫応答を増強するか、またはこれにおける増強を示すレシピエント患者の生理学の検出可能な変化をもたらす場合、生理学的に有意である。ワクチン組成物は、ウイルス感染を防ぐために投与される。「防御」は絶対的なものである必要はなく、すなわち、C 型肝炎感染は、対照集団または患者群と比較して統計的に有意な改善がある場合、完全に予防または根絶される必要はない。防御は、C 型肝炎ウイルス感染の症状の重症度または発症の早さを低減することに限定され得る。

40

【 0 1 6 2 】

一実施形態では、本発明のワクチン組成物は、感染症の発症前に（予想される感染を防止または減弱させるように）、または感染の開始後のいずれかで、対象に提供され、それにより、ウイルス感染を防ぐ。一部の実施形態では、本発明のワクチン組成物は、対象間のウイルス伝染を低減させるために、感染症の発症の前または後に対象に提供される。

【 0 1 6 3 】

本発明の組成物は、C 型肝炎感染もしくはH C V 感染に関連する症状などのウイルス性も

50

しくは癌状態を処置もしくは予防するために、単独で活性な医薬品として投与することができるか、または1つ以上の薬剤と組み合わせて使用することができることがさらに理解されるであろう。本発明の組成物または組成物の組み合わせと併用で投与されるべき他の薬剤としては、HCV感染により引き起こされる疾患に対する療法、または直接的もしくは間接的な機序によりHCVウイルス複製を抑制する療法が挙げられる。これらの薬剤としては、宿主免疫調節剤（例えば、インターフェロン-アルファ、ペグ化インターフェロン-アルファ、コンセンサスインターフェロン、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、CpGオリゴヌクレオチドなど）；イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼなどの宿主細胞機能を阻害する抗ウイルス化合物（例えば、リバビリンなど）；免疫機能を調節するサイトカイン（例えば、インターロイキン2、インターロイキン6、及びインターロイキン12）；1型ヘルパーT細胞応答の発生を増強する化合物；干渉RNA；アンチセンスRNA；HCV抗原またはHCVに対する抗原アジュバントの組み合わせを含むワクチン；HCVウイルス複製の内部リボソーム進入部位（IRES）開始翻訳ステップを阻害することにより、ウイルスタンパク質合成をブロックするために、または、ウイルス粒子の成熟をブロックするために、宿主細胞構成要素と相互作用する、且つ、例えば、HCV P7などの膜タンパク質のピロポリンファミリーを標的とする薬剤と共に放出する薬剤；ならびにNS3/NS4Aプロテアーゼ、NS3ヘリカーゼ、NS5Bポリメラーゼ、NS4Aタンパク質、及びNS5Aタンパク質の阻害剤などの、ウイルス複製に関与するウイルスゲノムの他のタンパク質を標的とすることにより、HCVの複製を阻害し、及び/または他のウイルス標的の機能を干渉する任意の薬剤または薬剤の組み合わせ、が挙げられるが、これらに限定されない。

【0164】

さらに別の実施形態によれば、本発明の医薬組成物は、限定されないが、ヘリカーゼ、ポリメラーゼ、メタロプロテアーゼ、NS4Aタンパク質、NS5Aタンパク質、及び内部リボソーム進入部位（IRES）を含むHCVライフサイクルにおける標的の他の阻害剤（複数可）をさらに含み得る。

【0165】

投与は一般に、E2特異的抗体の生成または細胞性免疫応答を含む免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下のものである。免疫原性組成物は、経肺、経口、静脈内（水溶性の場合）、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、髄腔内、もしくは座薬経路、または（例えば、徐放製剤を使用する）移植などによる都合の良い方法で投与され得る。投与は、全身または局所であり得る。但し、全身がより都合が良い。他の考えられる投与経路は、パッチ、細胞移植、インプラント、舌下、眼内、局所的、経口、直腸内、経膈、経鼻または経皮によるものである。

【0166】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」は、抗体を生成すること及び組成物に対して免疫を高めることを含む、本発明の組成物の存在に対する身体全体の反応を指す。従って、抗原に対する免疫応答は、目的の抗原に対する体液性及び/または細胞性免疫応答の対象における向上も含む。「体液性免疫応答」は、形質細胞により産生される抗体により媒介される。「細胞性免疫応答」は、Tリンパ球及び/または他の白血球により媒介されるものである。本明細書で使用される場合、「抗体価」は、各対象について免疫前の試料の値よりも大きい値をもたらした、免疫後の血清中の最高希釈倍数として定義することができる。

【0167】

本発明の実施形態はまた、HCV E2などのリフォールディングしたオリゴマー抗原に対する免疫応答を評価するためのアッセイを提供する。アッセイは、抗体応答及び遅延型過敏反応を測定するためのアッセイなどのin vivoアッセイを含み得る。一実施形態では、抗体応答を測定するためのアッセイは、主に、B細胞機能及びB細胞/T細胞相互作用を測定し得る。抗体応答アッセイのために、血液中の抗体価は、抗原チャレンジ後に比較され得る。

【 0 1 6 8 】

本明細書は、対象に H C V E 2 などのリフォールディングしたオリゴマー抗原を有効量投与すること、及び産生された抗体を精製することを含む、本明細書に記載の H C V E 2 などのリフォールディングしたオリゴマー抗原に対する精製抗体を生成するための方法を提供する。

【 0 1 6 9 】

別の実施形態では、本発明は、H C V E 2 などのリフォールディングしたオリゴマー抗原に対して惹起された抗体を提供する。特異的抗体は、天然抗原を認識できないが、アセンブルした抗原を認識し、及び/または、逆もまた同様で、抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナルとし得る。さらに、抗体は、当業者らに既知の基準を通常使用して、診断、予後、治療、予防、及びスクリーニング目的のために選択され得る。

10

【 0 1 7 0 】

「抗体」(複数可)という用語は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、ならびに、限定されないが、全長抗体(例えば、インタクトな F c 領域を有する)を含む、モノクローナル抗体に由来する全ての種々の形態、例えば、F v、F a b、F a b'、及び F (a b') . s u b . 2 フラグメントを含む抗原結合フラグメント、ならびに単鎖抗体などの組み換え方法を使用して産生される抗体由来ポリペプチドを含む。本明細書で使用される「抗体」(複数可)という用語は、例えば、トランスジェニック動物において、またはファージディスプレイを介して、産生されるヒト抗体、ならびに抗体、ヒトもしくはヒト化抗体、霊長類化抗体、または脱免疫化抗体を指す。それは、治療上許容され得る他の形態の抗体及びそれらの抗原結合フラグメント、例えば、軟骨性海洋動物もしくは C a m e l i d a e 由来の、またはこのような抗体に基づくライブラリー由来の単ドメイン抗体、も含む。フラグメント形態または改変形態の抗体の選択は、フラグメントまたは改変形態が、抗体またはフラグメントの半減期に与えるあらゆる影響を考慮することも含み得る。

20

【 0 1 7 1 】

一部の実施形態では、抗体は、薬学的または薬理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と共に提供される。他の実施形態では、診断または予後のために、抗体が選択される。一部の実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー形態の H C V E 2 糖タンパク質抗体を含むキットが提供される。

【 0 1 7 2 】

「薬学的に許容される担体及び/または希釈剤」は、別の理由で望ましくないわけではない物質からなる医薬ビヒクルである。すなわち、それは、それ自体でまたは活性組成物と実質的に有害な反応を引き起こす可能性が低い。担体は全て、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、及び抗真菌剤、等張性を調整するための薬剤、吸収もしくはクリアランス速度を増加もしくは減少するための薬剤、p H を維持するための緩衝剤、キレート剤、膜またはバリア横断剤を含み得る。薬学的に許容される塩は、別の理由で望ましくないものではない塩である。薬剤または薬剤を含む組成物は、酸付加塩または金属錯体などの薬学的に許容される無毒の塩の形態で投与され得る。

30

【 0 1 7 3 】

経口投与のために、組成物は、カプセル剤、丸剤、錠剤、甜剤、散剤、懸濁剤、または乳剤などの固体または液体調製物に製剤化することができる。組成物を経口剤形に調製する際には、経口液体調製物(例えば、懸濁液、エリキシル剤、及び溶液)の場合には、例えば、水、グリコール、油、アルコール、着香剤、防腐剤、着色剤、懸濁剤など通常の薬学的媒体;または、経口固体調製物(例えば、散剤、カプセル剤、及び錠剤)の場合には、デンプン、糖、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などの担体のいずれかが用いられてもよい。投与が容易であるので、錠剤及びカプセル剤は、最も有利な経口投薬単位形態に相当し、その場合には、固体の薬学的担体が当然用いられる。錠剤は、トラガカント、コーンスターチ、またはゼラチンなどの結合剤;アルギン酸などの崩壊剤;及びステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤を含有してもよい。必要に応じて、錠剤は、標準的な技術により糖衣または腸溶コーティングされ得る。活性組成物は、胃腸管を通過す

40

50

るのを安定させるためにカプセル化することができる。例えば、国際特許公開第W O 9 6 / 1 1 6 9 8 号を参照のこと。

【 0 1 7 4 】

非経口投与のために、組成物は、担体に溶解され、溶液または懸濁液として投与され得る。経粘膜または経皮（パッチを含む）送達のために、当該技術分野で既知の適切な浸透剤が、組成物を送達するために使用される。吸入のために、送達は、乾燥粉末エアロゾル、液体送達システム、エアジェットネブライザー、噴射剤システムなどの任意の都合の良いシステムを使用する。例えば、製剤はエアロゾルまたはミストの形態で投与することができる。組成物はまた、持続送達または持続放出形式で送達され得る。例えば、生分解性ミクロスフェアまたはカプセルまたは持続送達が可能な他のポリマー構造を製剤に含めることができる。製剤は、薬物動態及び生体内分布を変更するように改変することができる。薬物動態の一般的な考察については、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, U.S.A. 1990（上掲）を参照のこと。一部の実施形態では、製剤は、リボソームまたはミセルなどの脂質単層または二重層に組み込まれ得る。当該技術分野で既知の標的化療法は、特定の種類の細胞または組織により特異的に薬剤を送達するために使用され得る。

10

【 0 1 7 5 】

投与される活性剤の実際の量ならびに投与の速度及び時間経過は、疾患の性質及び重症度に依存するであろう。処置の処方、例えば、投与量、時期など、の決定は、一般実務家または専門家の責任の範囲内であり、通常は、個々の患者の状態、送達の部位、投与方法、及び他の実務家に既知の要因を考慮に入れる。技術及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990（上掲）に見出すことができる。

20

【 0 1 7 6 】

調製され得る徐放性調製物は、免疫応答を誘導するのに特に都合が良い。徐放性調製物の例としては、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセタート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ならびにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日を超える分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、タンパク質をより短い期間放出する。小さい（約200～800オングストローム）単層型のリボソームが使用され得、これの中で、脂質含有量がコレステロールの約30%よりも大きく、選択された割合は、最適な療法のために調整される。

30

【 0 1 7 7 】

タンパク質の安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、含水量を制御し、適切な添加剤を使用し、且つ特定のポリマーマトリックス組成物を開発することにより達成され得る。タンパク質のin vivo半減期は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）基などの他の要素の結合によることを含む、当該技術分野に既知の技術を使用して延長され得る。

40

【 0 1 7 8 】

当該技術分野において開示されているようなブライムブースト免疫化方策が考えられる。例えば、国際公開第W O / 2 0 0 3 / 0 4 7 6 1 7 号を参照のこと。従って、組成物は、ワクチン、初回免疫剤、または追加免疫剤の形態のものとし得る。

【 0 1 7 9 】

一実施形態では、本明細書は、本明細書に記載されるように、還元されて、リフォールディングしたオリゴマーH C V E 2 形態を含む組成物を含むキット、または固体もしくはは

50

半固体の基質を提供する。

【0180】

「単離された」という用語は、その本来の状態であってそれに通常付随する構成成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を意味する。例えば、「単離された核酸分子」は、天然に存在する状態でそれに隣接する配列から単離された核酸またはポリヌクレオチド、例えば、フラグメントに通常隣接する配列から除去されているDNAフラグメント、を指す。限定されないが、単離された核酸、ポリヌクレオチド、ペプチド、またはポリペプチドは、精製により単離される天然配列、または組み換えもしくは合成手段により産生される配列を指すことができる。一部の実施形態では、精製リフォールディングしたオリゴマーHCVE2は、少なくとも95～99%の純度である。

10

【0181】

本明細書に記載の方法により製造されたリフォールディングしたオリゴマーHCVE2は、例えば、以下のステップ：遠心分離、精密濾過、抗体精製、深層濾過、限外濾過、ダイアフィルトレーション、沈殿、ビーズクロマトグラフィー（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、またはアフィニティークロマトグラフィー）、膜吸着剤（例えば、イオン交換クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィー）のうちの1つ以上を含む、当業者に既知の任意の方法により精製できることを、当業者は理解するであろう。一例では、本明細書に記載の方法により生成されるリフォールディングしたオリゴマーHCVE2は、リフォールディングしたオリゴマーHCVE2の精製を助けるHISタグなどのタンパク質タグを含む。

20

【0182】

一実施形態では、本明細書は、組み換えHCVE2のリフォールディングした組み換えオリゴマーC型肝炎ウイルス(HCV)エンベロープ糖タンパク質2(E2)を調製する方法を可能にし、組み換えE2は、単量体E2であるか、または単量体及びオリゴマー組み換えE2の混合物を含み、該方法は、以下のステップ：(i) 1つ以上の単量体ジスルフィド結合を還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、組み換えE2を接触させること；ならびに(ii)還元剤を除去するか、または単量体を酸化剤と接触させて、オリゴマーHCVE2への組み換えE2のリフォールディングを誘発すること；を含み、リフォールディングした組み換えオリゴマーE2は、リフォールディング(ii)前の組み換えE2よりも少なくとも20%多いオリゴマーを含み、リフォールディングしたオリゴマーHCVE2は、組み換え単量体E2と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

30

【0183】

一部の実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーE2は、二量体、三量体、及び/または高次形態のE2を含む。

【0184】

別の態様では、本明細書は、天然エンベロープ糖タンパク質から、リフォールディングした組み換えオリゴマーウイルスエンベロープ糖タンパク質を調製する、より一般的な方法を提供し、該プロセスは、以下のステップ：(i) 1つ以上の単量体ジスルフィド結合または天然システインを部分的に還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、天然E2を接触させること；ならびに

40

(ii)還元剤を除去するか、または還元された天然HCVE2を酸化剤と接触させて、オリゴマーエンベロープ糖タンパク質への還元された単量体エンベロープ糖タンパク質のリフォールディングを誘発すること；を含み、単量体の少なくとも20%は、ステップ(ii)で、リフォールディングしたオリゴマーに変換され、オリゴマーは、単量体糖タンパク質と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。

【0185】

記載されるような一旦生成された高次抗原が、当業者に既知の任意の方法により精製され得ることを、当業者は理解するであろう。例えば、「精製すること」または「精製」は、

50

以下のステップ：遠心分離（例えば、超遠心分離）、クロマトグラフィー（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、もしくはアフィニティークロマトグラフィー）、及び／または膜吸着剤（例えば、イオン交換クロマトグラフィーもしくはアフィニティークロマトグラフィー）、濾過（例えば、膜濾過、限外濾過、もしくは透析濾過）のうちの１つ以上を含んでもよい。

【 0 1 8 6 】

精製された高次抗原がワクチン組成物などの医薬製剤に製剤化され得ることを、当業者は理解するであろう。このような組成物は、アジュバント、賦形剤、結合剤、防腐剤、担体カップリング剤、緩衝剤、安定化剤、乳化剤、湿潤剤、非ウイルスベクター、及びトランスフェクション促進化合物のうちの１つ以上を含み得る。このようなワクチン組成物が凍結乾燥することができることを、当業者はさらに理解するであろう。一実施形態では、生成されたワクチン組成物は、ヒトでの使用に適する。別の実施形態では、ワクチンは、獣医学的使用に適する。

10

【 0 1 8 7 】

本明細書に記載の高次抗原または組成物は、抗原特異的免疫細胞と結合する／これを検出するために使用され得る。一実施形態では、免疫細胞は、Ｂ細胞である。一実施形態では、免疫細胞は、Ｔ細胞である。抗原性免疫細胞の検出は、対象が抗原に関連する病原体に感染していること、及び／または対象が抗原でワクチン接種されていることを示す。一実施形態では、本明細書に記載の高次抗原、または本明細書に記載の組成物は、エンベロープウイルスに特異的なＢ細胞の検出及び／または単離のために使用され得る。一実施形態では、エンベロープウイルスは、ＨＣＶである。一実施形態では、エンベロープウイルスは、ＨＩＶである。

20

【 0 1 8 8 】

本発明の高次抗原が診断アッセイ及び／または免疫細胞の単離での使用に適することを、当業者は理解するであろう。一実施形態では、高次抗原は、フローサイトメトリーにおける免疫細胞の染色またはマーカーとして使用され得る。一実施形態では、フローサイトメトリーを使用する検出を可能にするために、高次抗原は、マーカー、染料、または蛍光団と複合化される。一実施形態では、マーカーは、d - ビオチンである。

【 0 1 8 9 】

免疫細胞（複数可）の単離は、例えば、Altmanら（１９９６）、Vollersら、２００８年及びDoltonら、２０１５年に記載されるように、「四量体アッセイ」または「四量体染色」を含み得、本明細書に記載の高次抗原は、アッセイにおける主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）四量体の役割を置き換える。

30

【 0 1 9 0 】

一実施形態では、本発明は、i) 本明細書に記載の高次抗原を用いて、ＨＣＶに特異的な免疫細胞／Ｂ細胞を標識すること；ならびに、ii) 標識された免疫細胞／Ｂ細胞をサイトメトリーで検出及び／または単離すること、を含む、ＨＣＶに特異的な免疫細胞／Ｂ細胞の検出及び／または単離のための方法を提供する。

【 0 1 9 1 】

多様体への言及は、部分、誘導体、及び化学的アナログを含む。考えられる化学的アナログは、側鎖の修飾、合成中の非天然アミノ酸及び／またはそれらの誘導体の取り込み、ならびに、リンカーもしくはクロスリンカーまたはとりわけ、立体配座の制約を課す他の方法の使用を含む。

40

【 0 1 9 2 】

本開示は、アセンブリ方法及びアセンブルした高次抗原の特徴の以下の非限定例で完了される。上述したように、本開示は、肝炎抗原及びＨＩＶエンベロープ抗原を使用して説明されるが、本発明は、主題の方法を使用して産生された抗原に拡張して、抗原の抗原性及び免疫原性を増強するために低次抗原から高次オリゴマーを形成する。本明細書に記載されるように、高次抗原は、当該技術分野で既知の一連の技術を使用してさらに特性決定される。しかし、今日までの分析は、本明細書に記載の還元及びアセンブリ方法により生成

50

された、アセンブルしたオリゴマーが、細胞内で産生された対照抗原には見られない抗体結合プロファイルを示し、それにより、本組成物が、これに基づき、先行技術の抗原と区別することができることを示す。

本発明は以下の態様を含みうる。

[1]

天然低次抗原から細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法であって、前記方法が、以下のステップ：

(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること、

ならびに

(i i) 前記還元剤を除去もしくは希釈するか、または前記還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i) の低次抗原をアセンブルした高次抗原にアセンブリさせることを誘発すること；を含み、

前記低次抗原の少なくとも10%がステップ(i i) で高次の抗原に変換され、それにより、前記アセンブルした高次抗原が、前記低次抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する、前記方法。

[2]

低次抗原を高次抗原にアセンブリさせる方法の効率を向上させるために、第1ステップ(i) 及び(i i) が、ステップ(i i) の残りの低次抗原を含む溶液と共に繰り返される、上記[1]に記載の方法。

[3]

ステップ(i) 中またはステップ(i) の前に、低次抗原を含む前記溶液から、天然オリゴマーまたは高次抗原をほぼ枯渇させる、上記[1]または[2]に記載の方法。

[4]

前記低次抗原の少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%以上が、高次抗原に変換される、上記[1]~[3]のいずれかに記載の方法。

[5]

天然対照高次抗原が1つ以上の中和抗体に結合するか、またはこれらを誘発する能力を、前記アセンブルした高次抗原が保持するか、または上回る、上記[1]~[4]のいずれかに記載の方法。

[6]

前記アセンブルした高次抗原が、HCV E2の受容体結合ドメイン(RBD)である、上記[1]~[5]のいずれかに記載の方法。

[7]

前記アセンブルした高次抗原が、超可変領域1(HVR1)もしくはその一部、超可変領域2(HVR2)もしくはその一部、及び/または遺伝子型間可変領域(igVR/V R3)もしくはその一部のうちの1つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている、上記[6]に記載の方法。

[8]

前記アセンブルしたオリゴマー抗原が、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に、非システイン置換または変異を含む、上記[6]または[7]に記載の方法。

[9]

ワクチン組成物の製造方法であって、上記[1]~[8]のいずれかに記載の方法を含み、前記アセンブルした高次抗原が、薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合される、前記方法。

[10]

前記抗原が、ウイルスエンベロープ抗原または癌抗原である、上記[1]に記載の方法。

[11]

前記ウイルスエンベロープ抗原が、肝炎ウイルス抗原またはHIVエンベロープ抗原である、上記[10]に記載の方法。

[12]

上記[1]~[11]のいずれかに記載の方法により低次抗原から産生される、アセンブルした高次抗原またはそれを含む組成物。

[13]

組成物であって、高次の細胞外でアセンブルした抗原を含み、前記アセンブルした抗原が天然対照高次抗原と比較して非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す、前記組成物。

10

[14]

前記アセンブルした高次抗原が、HCV-E2またはHCV-E2の受容体結合ドメイン(RBD)である、上記[13]に記載の組成物。

[15]

前記E2高次抗原が、超可変領域1(HVR1)もしくはその一部、超可変領域2(HVR2)もしくはその一部、及び/または遺伝子型間可変領域(igVR/VR3)もしくはその一部のうちの1つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている、上記[14]に記載の組成物。

[16]

前記E2抗原が、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に、非システイン置換または変異を含む、上記[14]または[15]のいずれかに記載の組成物。

20

[17]

薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントを含む、上記[12]~[16]のいずれかに記載の組成物。

[18]

前記抗原と関連する状態もしくはHCV感染の処置もしくは予防における、またはこのための薬品の調製における、上記[12]~[17]のいずれかに記載の組成物の使用。

[19]

HCV感染の診断もしくは監視または抗HCV処置プロトコルの監視のための診断薬の調製における、上記[12]に記載のアセンブルした高次抗原または上記[13]~[17]のいずれかに記載の組成物の使用。

30

[20]

対象または患者における免疫応答を誘発するための方法であって、前記方法が、免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で、前記対象もしくは患者に、上記[12]に記載のアセンブルした高次抗原または上記[13]~[17]に記載の組成物を有効量投与することを含む、前記方法。

[21]

HCVの感染に対して対象を免疫するための方法であって、上記[12]に記載のアセンブルしたオリゴマーE2抗原、または上記[13]~[17]のいずれかに記載の組成物を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

40

[22]

対象のHCV感染症を処置または予防するための方法であって、HCV-E2及びHCV感染などの抗原に関連する状態を処置または予防するのに十分な時間及び条件下で、上記[12]に記載のアセンブルしたオリゴマー抗原、または上記[13]~[17]のいずれかに記載の組成物を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

[23]

前記アセンブルした高次抗原が検出可能なタグまたは精製タグを含む、上記[13]~[16]のいずれかに記載の組成物。

50

[2 4]

上記[1 3] ~ [1 6]のいずれかに記載の高次のアセンブルした抗原に対する精製抗体を生成するための方法であって、対象に有効量の抗原を投与すること、及び産生された前記抗体を精製することを含む、前記方法。

[2 5]

上記[1 2] ~ [1 6]に記載のアセンブルした抗原を特異的に認識する抗体。

[2 6]

上記[1 2]に記載のアセンブルした高次抗原、または上記[1 3] ~ [1 6]のいずれかに記載の組成物を含むキット、または固体もしくは半固体基質。

[2 7]

抗原特異的免疫細胞と結合する / これを検出するための、上記[1 2]に記載のアセンブルした高次抗原、または上記[1 3] ~ [1 6]のいずれかに記載の組成物の使用。

[2 8]

前記抗原に特異的なB細胞などの免疫細胞の検出及び / または単離のための、上記[1 2]に記載のアセンブルした高次抗原、または上記[1 3] ~ [1 6]のいずれかに記載の組成物の使用。

[2 9]

H C V に特異的な免疫細胞 / B細胞の検出及び / または単離のための方法であって、
i) 上記[1 3] ~ [1 6]に記載のアセンブルした高次E 2抗原を用いて、H C V に特異的な免疫細胞 / B細胞を標識すること ; ならびに
i i) 前記標識された免疫細胞 / B細胞をサイトメトリーで検出及び / または単離すること、を含む、前記方法。

【実施例】

【 0 1 9 3 】

実施例 1 : 発現ベクター及びプラスミド
クローニング

H C V E 2 1 2 3 のDNA配列をC末端6 × ヒスチジン (H I S) タグ (配列番号 2 4) と融合させ、p c D N A 3 . 1 哺乳動物発現ベクター (I n v i t r o g e n) にクローニングした。C o n 1 遺伝子型 1 b (G 1 b) 1 2 3 (配列番号 2 0) を、C S L によりクローニングした。H 7 7 c 遺伝子型 1 a (G 1 a) 1 2 3 (配列番号 1 9) もまた、C S L によるが、独自のC S L 改変p c D N A 3 . 1 ベクターにクローニングした。得られたH 7 7 c 1 2 3 及びC o n 1 1 2 3 を含有するプラスミドを、それぞれ、p c D N A - H 7 7 c 1 2 3 - H I S 及びp c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S と命名した。T 4 DNAリガーゼを使用して、S 5 2 G 3 a 1 2 3 のDNA配列 (配列番号 2 1) をp c D N A 3 . 1 のN h e I 及びX b a I 部位にライゲーションして、p c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S を生成した。

【 0 1 9 4 】

DNAの発現及び精製

ヒートショック法を使用して、p c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S 及びp c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S をD H 5 E . c o l i に形質転換し (F r o g e r 及びH a l l 、 2 0 0 7) 、次に、L u r i a - B e r t a n i (L B) アンピシリン (1 0 0 μ g / m L) アガープレート上で成長させた。単一のコロニーを、アンピシリン含有 (1 0 0 μ g / m L) のL B ブロス中で培養し、製造者の推奨に従ってQ I A G E N プラスミドマキシプレップキットを使用して、DNAプラスミドを抽出した。クローン化プラスミドの良好なライゲーション及びスケールアップを確認するために、マキシプレップのp c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S 及びp c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S を、それぞれ、N h e I 及びX h o I ; ならびにN h e I 及びX b a I 制限酵素で消化した。次に、得られた消化物をアガロースゲル電気泳動にかけ、G e l D o c X R + システム (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s) 及びQ u a n t i t y O n e 1 - D 分析ソフトウェア (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s) を使用して、ゲルを観察して、予

10

20

30

40

50

想される制限パターンを確認した。さらに、BigDye Terminator v3.1 化学を使用して、プラスミドを (Micromon により) 配列決定し、CLC Sequence Viewer (QIAGEN) 及び FinchTV (Geospiza) を使用して、配列を解析した。

【0195】

実施例 2：タンパク質発現及び精製

一過性トランスフェクション。

ヒト胚腎臓 293 細胞株由来の FreeStyle 293 - F (FS293F) 細胞 (Invitrogen) を、1 L の Erlenmeyer 細胞培養フラスコ (Corning) で 150 mL 中 1×10^6 生細胞/mL で播種し、FreeStyle 293 (FS293) 発現培地 (Invitrogen) 中で維持した。Steri - サイクル CO₂ インキュベーター (Thermo Electron Corporation) を使用して、4 × 相対遠心力 (RCF) で回転するオービタルシェーカー上で、細胞を 8 % の CO₂ を伴う加湿雰囲気中 37 °C でインキュベートした。表 1 に示される体積を使用して、製造者の使用説明書に従って、293fectin トランスフェクション試薬 (Invitrogen) を使用して、FS293F 細胞への、pcDNA - Con1 123 - HIS 及び pcDNA - S52 123 - HIS の一過性トランスフェクションを実施した。トランスフェクション後 1 日目に、100 mL の FS293 発現培地を添加し、総トランスフェクション容量を 250 mL に上げた。さらに、細胞培養物に、0.5 % のルピンペプトン (Solabia Biotechnology) 及び 0.02 % の Pluronic F - 68 (Gibco) を補充した。トランスフェクション後 3、5、及び 7 日目に、半分の培地交換を実施し、それにより、300 × RCF で 5 分間遠心分離することにより、細胞培養上清の半分 (125 mL) を採取した。ペレット化された細胞を、125 mL の新しい FS293 発現培地に再懸濁させ、さらに、0.5 % のルピンペプトン及び 0.02 % の Pluronic F - 68 を補充し、次に、細胞培養フラスコに戻した。最後に、トランスフェクション後 9 日目に、細胞培養上清 (250 mL) の完全採取を実施した。回収した全てのの上清を、15,344 × RCF で 30 分間さらなる遠心分離にかけ、ペレットを廃棄して残留細胞及び細胞片を除去した。トリパンブルー染料排除法及び血球計を使用して、細胞計数を収集日ごとに実施して、細胞密度及び生存率を決定した。

【0196】

アフィニティークロマトグラフィー

分泌された HIS タグ化 123 糖タンパク質を含有する細胞培養上清を、10 mL (すなわち、1 カラム体積) のコバルト荷電 TALON 金属親和性樹脂 (Clontech) に、室温 (RT) のロッカーで 2 時間適用して、HIS タグ付きタンパク質の結合を可能にした。ビーズを、5 mL / 分の流速の洗浄緩衝液の 20 カラム体積 (50 mM のリン酸ナトリウム、300 mM の塩化ナトリウム、pH 7.0) で 2 回洗浄し、1 mL / 分の流速の 5 カラム体積の溶出緩衝液 (50 mM のリン酸ナトリウム、300 mM の塩化ナトリウム、200 mM のイミダゾール、pH 7.0) で溶出した。30 kDa の分子量カットオフ (MWCO) を有する Amicon Ultra 遠心分離フィルターユニット (Merck Millipore) を使用して、溶出液中に含有されるタンパク質を濃縮し、塩酸 (HCl) を使用して pH 6.8 に調整したリン酸緩衝食塩水 (PBS、Gibco) (pH 6.8 の PBS) で洗浄し、使用するまで 4 °C で保存した。

【0197】

実施例 3：ゲル濾過クロマトグラフィー

AKTA 高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) システム (GE Healthcare) を使用して、タンパク質を、Superdex 200 prep grade 16 / 600 カラム (GE Healthcare) のゲル濾過クロマトグラフィーにかけた。ランニング緩衝液として濾過及び脱気された pH 6.8 の PBS を使用して、流出を流速 0.5 mL / 分で行った。所望のオリゴマー種を含有する画分をプールし、次に、10 kDa の MWCO を有するアミコンウルトラ遠心式フィルターユニットを使用して

10

20

30

40

50

濃縮し、使用するまで、 $\text{pH } 6.8$ の PBS の中に保存した。 1 cm の経路長を有するキュベットを使用する 280 nm ($\text{OD } 280$) の光学密度の分光光度法により、タンパク質濃度を決定し、以下の式を使用して、 mg/ml で計算した。

吸光係数 $\times \text{OD } 280$ での吸光度

【0198】

123 のアミノ酸配列を使用して、吸光係数を決定した。以下の式を使用して、これを計算した。

分子量 (Da) / ($(5690 \times \# \text{トリプトファン}) + (1280 \times \# \text{チロシン})$)

【0199】

実施例 4：ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

10

必要に応じて、還元条件下または非還元条件下で、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - PAGE を介してタンパク質を分析した。SDS - PAGE を還元させるために、 2% (v/v) の β -メルカプトエタノールを含有する $1 \times$ 試料緩衝液中のタンパク質試料を 100°C で 5 分間加熱し、次に、広範囲 SDS - PAGE スタンダード (Bio-Rad Laboratories) と共に 12% のアクリルアミドゲルにロードした。 $1 \times$ ランニング緩衝液 (25 mM の Tris 塩基、 192 mM のグリシン、 0.1% の SDS、 $\text{pH } 8.3$) 中で垂直電気泳動装置 (CLP) を使用して、電気泳動を 180 V で約 1.5 時間行った。 $4 \sim 12\%$ ポリアクリルアミド勾配ゲルを用い、且つ試料緩衝液中に β -メルカプトエタノールを含まない以外は、非還元 SDS - PAGE を同様に実施した。ゲルを 0.25% (v/v) のクマシーブリリアントブルー R-250 (Bio-Rad Laboratories)、 10% (v/v) の酢酸、及び 50% (v/v) のメタノールで染色し、次に、 10% (v/v) の酢酸及び 50% (v/v) のメタノールで脱色し、Odysey 赤外線イメージングシステム (LI-COR) を使用して、スキャンした。Odysey システムを使用して、バンド強度を定量した。

20

【0200】

実施例 5：抗体

モノクローナル抗体 (MAb) AR3A、AR3B、AR3C、及び AR3D は、The Scripps Research Institute (Law et al., 2008) の Mansun Law 博士からの親切な贈物であった。CBH-4B、CBH-4D、HC-11、及び HCV-1 は、Stanford 大学の Steven Foun 博士からの親切な贈物であった。H52 及び H53 は、Jean Dubuisson 博士及び Harry Greenberg 博士の親切な贈物であった。MAb 1、7、10、12、16、20、24、及び 60 を、CSL Ltd と共同で発明者らの研究室で生成した (表 2)。好適な抗体パネルは、文献、例えば、Keck et al. PLoS Pathogens: 8(4) e1002653, April 2012 に記載される。また、抗体 2A12 は、天然対照オリゴマー HCV E2 と比較して、アセンブルした E2 との結合の低下を示した。抗体パネル及びそれらをどのように生成するかは、参照により本明細書に組み込まれる Vietheer P. et al. Hepatology: 65(4), 1117-1131, 2017、ならびに、参考文献 5、33~36、17、及び 37、ならびに出版者から入手可能な補足資料などの本明細書で参照された参考文献に記載される。

30

40

【0201】

実施例 6：酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)

サンドイッチ ELISA。

良好なタンパク質発現及び精製を確認するために、Maxisorb 平底 96 ウェルプレート (Nunc) を使用して、サンドイッチ ELISA を実施した。ウェルを、 $\text{pH } 9.6$ の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 50 mM 中の $5 \mu\text{g/ml}$ の二量体マルトース結合タンパク質 (MBP) - CD81 - LEL113-201 でコーティングし、次に、4 晩インキュベートした。このステップ及びその後の洗浄ステップで、 0.05% の Tween 20 を含有する PBS (PBST) 中でプレートを 4 回洗浄し、次に、PBS 中 10 mg

50

/mLのウシ血清アルブミン(BSA、Sigma-Aldrich)(BSA10PBS)で1時間室温でブロックした。洗浄後、5mg/mLのBSAを含有するPBST(BSA5PBST)中で、組織培養上清の半対数段階希釈を実施し、続いて、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、BSA5PBST中のウサギ抗6xHISエトープタグ抗体(Rockland Immunochemicals)の単一希釈物を添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ免疫グロブリン(Dako)の単一希釈物を添加した。洗浄後、製造者の使用説明書に従って、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質(Sigma-Aldrich)を使用して、ELISAの発色を実施し、反応物を1MのHClで停止させた。最後に、Multiskan Ascentマイクロプレートリーダー(Thermo Electron Corporation)を使用して、光学濃度を450nmで測定した。

10

【0202】

単一希釈点評価及び直接ELISA。

実施例5/表2に記載の抗体パネルなどの当該技術分野で既知の抗体のパネルに対する123の反応性を評価するために、単一希釈点評価を最初に実施し、それにより、Maxisorb平底96ウェルプレートを5µg/mLの単量体123で直接コーティングし、次に、4で一晩インキュベートした。BSA10PBSで洗浄及びブロッキングした後、一次抗体の単一希釈物、続いて、洗浄しながら二次抗体(Dako)を添加し、各添加の間は室温で1時間インキュベーションした。サンドイッチELISAのために、上記のように、プレートを発色させて測定した。直接ELISAを同じ方法で実施したが、必要に応じて、ウェルを2µg/mLの単量体123または5µgのHMW1123のいずれかでコーティングし、一次抗体をBSA5PBSTの半対数段階希釈にかけた。

20

【0203】

実施例7：タンパク質還元及びリフォールディング

小規模還元

タンパク質還元中使用される最適DTT(Pierce)濃度を決定するために、Maxisorb平底96ウェルプレートを、pH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液50mM中の5µg/mLの単量体H77C123でコーティングし、RTで最低2時間インキュベートした。PBSTで4回洗浄した後、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中で調製された異なる濃度のDTT(0~10mM)を添加し、37で30分間インキュベートした。次に、プレートを直ちにPBSTで6回洗浄して、DTTを除去し、続いて、BSA10PBSでブロッキングした。実施例6に記載のように、抗HIS、H53、及びR04を含む一次抗体、続いて、適切な二次抗体を添加した。最後に、結合抗体を、実施例6に記載されるように、検出及び測定した。還元剤としてTCEPを使用して、同じ実験を繰り返した。

30

【0204】

溶液中のDTTを用いる還元及びリフォールディング

炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中で調製したH77c123単量体を、異なる条件(表3)下でDTT還元に向け、最適なHMW123形成のための要件を決定した。タンパク質のリフォールディングは徐々に希釈することにより行われた。pH6.8のPBSを最初の試料量の半分である一定量で3回段階的に添加することにより、これを達成した。例えば、pH6.8のPBS4x200µLを、400µLの試料に添加する。各添加後、室温で15分間インキュベートした。10kDaのMWCOを有するAmicon Ultra遠心フィルターユニットを使用して、DTTを除去し、続いて、pH6.8のPBS中で2回すすいだ。次に、リフォールディングしたタンパク質を、実施例4に記載のように非還元SDS-PAGEにより分析した。実施例3に記載されるように、多量体が良好に形成され、且つゲル濾過クロマトグラフィーにより分析された場合、より大規模なリフォールディングが行われた。

40

【0205】

酸化還元シャフリリングシステムを使用する還元及びリフォールディング

50

1 : 5 の比の酸化 L - グルタチオン (G S S G 、 P i e r c e) 対還元 L - グルタチオン (G S H 、 P i e r c e) を、炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液中で調製された H 7 7 c 1 2 3 単量体に添加し、異なる条件 (表 4) を調べた。実施例 7 に記載されるように、L - グルタチオンを除去することにより反応を停止させ、次に、リフォールディングしたタンパク質を分析した。実施例 3 に記載されるように、多量体が良好に形成され、且つゲル濾過クロマトグラフィーにより分析された場合、より大規模なリフォールディングが行われた。

【 0 2 0 6 】

ビスマレイミドエタン (B M O E) を用いるトリス (2 カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩 (T C E P) 還元タンパク質の架橋

異なる濃度の T C E P を、異なる濃度の p H 6 . 8 の P B S 中で調製された H 7 7 c 1 2 3 単量体に添加し (表 5)、3 7 で 3 0 分間インキュベートした。次に、使用直前にジメチルスルホキシド (S i g m a) に溶解させた B M O E (S i g m a) を、0 . 2 m M の最終濃度まで添加し、製造者の指示に従って、R T で 1 時間インキュベートした。実施例 7 に記載されるように、B M O E 及び T C E P を除去することにより、反応を停止させ、次に、リフォールディングしたタンパク質を分析した。

【 0 2 0 7 】

実施例 8 : 1 2 3 の産生

H 7 7 c 株、C o n 1 株、及び S 5 2 株由来の 1 2 3 の D N A 配列を、p c D N A 3 . 1 系ベクターに組み込み、以下のプラスミド : p c D N A - H 7 7 c 1 2 3 - H I S 、 p c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S 、及び p c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S を生じさせた。これらのプラスミドは、アガロースゲル電気泳動で予想される制限パターンを示し、H 7 7 c 、C o n 1 、及び S 5 2 1 2 3 インサートを表すバンドは全て、それぞれ、7 6 2 、7 5 9 、及び 7 1 0 b p の予想された長さに相当する (図 1)。H 7 7 c 1 2 3 を独自の C S L 改変 p c D N A 3 . 1 ベクターにクローニングして、それぞれ同じ水平位置に移動した C o n 1 及び S 5 2 を含有する標準 I n v i t r o g e n ベクターと比較して、観察されたより大きなベクターサイズを説明する (図 1)。

【 0 2 0 8 】

哺乳動物 F S 2 9 3 F 細胞への、C o n 1 及び S 5 2 1 2 3 プラスミドの一過性トランスフェクションを実施して、1 2 3 糖タンパク質を産生した。細胞を流体力学的な力から保護する P l u r o n i c F - 6 8 、及び成長効率を高めるためのルピナスペプトンが補充された F S 2 9 3 発現培地中、懸濁状態で、細胞を維持した。細胞を 1×10^6 生細胞 / m L で播種し、トランスフェクション後 0 ~ 9 日目に、細胞生存率を約 9 0 % に維持した。1 2 3 糖タンパク質の良好な発現を確認するために、細胞培養上清を、サンドイッチ E L I S A により分析した (図 2 A ~ B)。トランスフェクション後の 3 、5 、7 、及び 9 日目に採取した上清の半対数段階希釈物を、二量体 M B P - C D 8 1 - L E L 1 1 3 - 2 0 1 でコーティングされた酵素免疫アッセイプレートに塗布し、捕捉された 1 2 3 糖タンパク質を、ウサギ抗 h i s 抗体及び H R P コンジュゲートヤギ抗ウサギ免疫グロブリンで検出した。最初のウェルに $1 \mu g / m L$ の濃度の単量体 H 7 7 c 1 2 3 は、陽性対照として役立つが、最初のウェルで 1 / 2 に希釈した H I V エンベロープタンパク質 g p 1 4 0 含有上清は、陰性対照として役立つ。全ての細胞培養上清は、C D 8 1 との陽性結合を示し、上清中の 1 2 3 糖タンパク質の存在、それによる、良好なタンパク質発現を示す。さらに、細胞培養上清を表す曲線は、陽性対照より上に現れ、 $1 \mu g / m L$ を超える 1 2 3 糖タンパク質 - C o n 1 及び S 5 2 の場合、それぞれ、およそ $4 \mu g / m L$ 及び $20 \mu g / m L$ の収率を示した。光学密度 (O D) 値は、5 日目及び 7 日目で実施された採取について最も高く、タンパク質発現がこれらの中間時点で幾分より効率的であったことが示唆された。S 5 2 1 2 3 トランスフェクションからの上清は、C o n 1 1 2 3 のものと比較して、より高いレベルの C D 8 1 結合を実証し、S 5 2 株の場合、より効率的なタンパク質発現が示唆されたこと、または S 5 2 1 2 3 が、C D 8 1 に対してより強い親和性を有することも認められていた。

【 0 2 0 9 】

細胞培養上清から 123 糖タンパク質を単離するために、コバルトを充填したセファロースマトリックスである TALON ビーズを使用して、アフィニティークロマトグラフィーを実施し、これは、従来のニッケル親和性支持体よりも高い特異性で his タグ化タンパク質と効率的に結合する。タンパク質精製の有効性も、細胞培養上清について行われたのと同じ方法で、サンドイッチ ELISA で分析した (図 2 C ~ D)。溶出液を 3 つの別々の画分に順次収集し、最初の画分に溶出されたタンパク質は、精製前の上清と同様のレベルの CD81 結合を示し、画分 1 が大部分の 123 糖タンパク質を含有したことが示された。画分 2 で溶出されたタンパク質は、CD81 結合の減少を示し、より少ない量の 123 が存在したことが示されたが、画分 3 のものは、ごくわずかな CD81 結合を示し、HIV gp140 陰性対照と位置合わせされた曲線を生成した。精製後の上清 (すなわち、フロースルー) 及び S52 123 精製の洗浄液は、陽性対照と結合する CD81 とほぼ同程度のレベルを示したが、Con 1 123 のものに対して低いレベルが観察され、Con 1 123 精製がより効果的に実施されたことが示された。

【0210】

実施例 9: 123 発現プロファイル

ゲル濾過クロマトグラフィーによりアフィニティー精製された H77c 123 の発現の分析前の株由来の 123 の DNA 配列は、H77c 123 が異なるサイズの種の領域として存在することを明らかにした (図 3 A)。これらは、それぞれ、46、97、239、及び 2402 kDa の分子質量を有する単量体、二量体、HMW2、及び HMW1 123 から成り、抗原性及び免疫原性が変化する (H. Drummer、未発表データ)。HMW 種は、bNAb を誘導することができるが、単量体は、型特異的 NAb を誘導する (H. Drummer、未発表データ)。しかし、H77c 123 の FS293F 細胞への安定なトランスフェクション (本プロジェクトの開始前に Dr. Rob J. Center で実施された) から生じた 123 の 23.13% のみが、モノマーの場合の 64.90% と比較して、HMW 形態のものであった (図 3 A 及び表 6)。

【0211】

任意の遺伝子型からの 123 は、E2 の最も保存された領域を含むので、bNAb を同様に引き出すことができるはずである。しかし、WT E2 及び 123 の発現プロファイルは、異なる遺伝子型間で変動するであろう。Con 1 123 及び / または S52 123 が、より高収率の HMW 種を発現するかどうかを判定するために、FS293F 細胞への一過性トランスフェクションからのアフィニティー精製された 123 糖タンパク質を、AKTA FPLC システムを使用する Superdex 200 prep grade 16/600 カラムでのゲル濾過クロマトグラフィーにより分析した。UNICORN ソフトウェアを使用して、ピーク下面積を定量すると、Con 1 (図 3 B) 及び S52 (図 3 C) 株の両方が実際に、より高い収率の HMW 123 を生じ、H77c の 23.13% と比較して、HMW 形態 (組み合わせた HMW1 及び HMW2) の、生成された全 123 糖タンパク質の 46.02% (Con 1) 及び 44.88% (S52) であったことが明らかにされた。(表 6)。

【0212】

これらの結果の再現性を評価するために、一過性トランスフェクション及び 123 の精製を繰り返し、ゲル濾過クロマトグラフィーを再度実施して、123 発現を分析した。第 2 ラウンドでは、y 軸の目盛りで示されるように、Con 1 123 の発現レベルは、ラウンド 1 のもののおよそ 2 倍であったが、S52 123 の発現レベルは、比較的安定したままであった (図 3 D ~ E)。発現レベルの変動にもかかわらず、Con 1 及び S52 123 の発現プロファイルは、ラウンド 1 及びラウンド 2 の両方に対して類似したままであったことに留意することが重要であった。H77c と比較して、HMW 123 の収率の改善が再び観察され、第 2 ラウンドで生成された HMW 種は、同様の割合であり、Con 1 が 46.98%、S52 が 41.56% であった (表 6)。

【0213】

ゲル濾過分画された 123 糖タンパク質を SDS - PAGE で分析した。5 ~ 12% の

ポリアクリルアミド勾配ゲル上での非還元 SDS - PAGE は、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を補強し、123 が種々のジスルフィド結合オリゴマー形態として存在することを再度実証し、バンド強度と分子量の反比例関係を示した（図 4 A ~ B）。さらに、ジスルフィド結合を破壊する還元剤である -メルカプトエタノールを使用して、還元 SDS - PAGE 分析を 12% のアクリルアミドゲル上で行った。 -メルカプトエタノールは、順次、疎水性接触も破壊する、結果により、ジスルフィドが -メルカプトエタノールにより開裂されると、全てが単量体として移動するので、ジスルフィド結合は、高次構造の形成及び安定化に不可欠であることが明らかにされる（図 4 C ~ D）。疎水性相互作用は、高次種の形成に寄与し得る。

【 0 2 1 4 】

これらのデータにより、Con 1 及び S 5 2 株は実際に、H 7 7 c と比較して、高収率の HMW 123 を発現することが明らかにされ、HMW 123 産生を改善する 1 つの可能な方法を実証する。

【 0 2 1 5 】

実施例 10：HMW 123 の抗原特性決定

Con 1 及び S 5 2 株により生成された HMW 123 が、H 7 7 c のものの抗原性パターンを反復するかどうかを評価するために、3 つの株全てのゲル濾過分画単量体及び HMW 123 を、ELISA フォーマットで立体配座感受性及び非感受性 MA b のパネルに対して試験した（図 5 A）。迅速試験として単一希釈点評価（図 5 B）を最初に実施して、H 7 7 c の 123 ならびに Con 1 及び S 5 2 の一方または両方に対して、どの MA b が陽性反応性を示すかを判定し、それにより、株間の抗原性を比較することが可能になった。この基準を満たす MA b を直接 ELISA でさらに試験し、それにより、MA b の半対数段階希釈物を、単量体及び HMW 123 で別々にコーティングされた酵素免疫アッセイプレートに塗布し、続いて、適切な HRP コンジュゲート二次抗体で検出した。次に、各結合曲線の間接点を比較することにより、最大光学濃度値の半分とされた、HMW 123 に対する各 MA b の相対結合を計算した（表 7）。

【 0 2 1 6 】

単一希釈点評価は、立体配座感受性マウス H 5 3 及び MA b 1、7、12、16、及び 20 が全て、H 7 7 c 123 に対して陽性反応性を示したが、Con 1 及び S 5 2 123 に対してごくわずかな反応性が実証され、これらの MA b s の標的エピトープを認識できないようにし、且つこれらの MA b が型特異的であるように、これらの 2 つの株のエピトープの完全性を変更したことが示された。この反対は、Con 1 及び S 5 2 123 に対する陽性反応性があるが、H 7 7 c に対してはない場合、立体配座感受性ヒト AR 3 A により示された（図 5 B）。

【 0 2 1 7 】

直接 ELISA でさらに試験された 11 の MA b のうちの、8 つ（AR 3 B、AR 3 C、AR 3 D、CBH - 4 B、CBH - 4 D、HC - 11、MA b 10、及び 60）は、単量体形態（表 7）と比較した時、123 の HMW 形態との結合の低下を示し、標的エピトープがより閉じ込められていたことが示された。マウス H 5 2 のみが、3 つの株全てに対して、HMW 123 と結合する能力の著しい増強を実証し（表 7）、残基 C 6 5 2 へのアクセスの改善が示唆された。

【 0 2 1 8 】

各 MA b が HMW 形態の Con 1 及び S 5 2 に結合する能力を、H 7 7 c のものと比較する時、試験された 11 の MA b のうち 5 つ（HC V 1、AR 3 B、AR 3 C、CBH - 4 D、HC - 11）は、増加したまたは同等の結合レベルを示した。さらに、結合の増加が、AR 3 D 及び H 5 2 により実証されたが、Con 1 123 に対してのみであり、一方、MA b 10 及び 24 は、両方の株に対して結合のレベルの低下を示した（表 7）。

【 0 2 1 9 】

実施例 11：TCEP 及び BMOE を使用した 123 の還元及びリフォールディング
単量体 123 を部分的に還元して、遊離スルフヒドリルを生じ、続いて、これらのスル

10

20

30

40

50

フヒドリルを、多量体形成を媒介することになる分子間ジスルフィド結合に再共役させることにより、 123 単量体を単量体にリフォールディングする能力を評価した。

【0220】

スルフヒドリルを含まない還元剤であるTCPEPを使用した 123 の小規模還元を迅速試験として試行して、 123 の部分還元に必要なTCPEPの最適濃度を決定した(図6)。酵素イムノアッセイプレート上にコーティングされた単量体H77c 123 を、異なる濃度のTCPEP(0~500mM)に37℃で30分間曝露させ、還元が起こる時間を与えることにより、これを実行した。TCPEP還元から生じる構造変化の程度を判定するために、立体構造依存性マウスH53抗体の単一希釈物をプレートに塗布し、結合をHRPコンジュゲート抗マウス抗体で検出した。10~500mMのTCPEPで処理されたH77c 123 は、H53との結合が漸進的に低下し、全ての光学密度値は、R04陰性対照(ヒトサイトメガロウイルスに対するヒトMAb)のものよりも大きかった。これらの結果は、H53認識がある程度保持されているため、 123 の立体配座が完全には破壊されていないことを示し、部分還元が達成され、且つ還元がTCPEP濃度の増加と共に漸進的に増加したことが示される。さらに、陽性抗HIS結合は、異なる濃度のTCPEPの存在下で一貫して起こり、結合 123 の喪失がH53結合の低下の原因となり得る可能性が排除された。 123 立体配座の保持は、 123 の抗原性及び免疫原性特性を保持し、且つHMW 123 への後続の再形成を可能にするために必要と考えられたので、10~200mMのTCPEP濃度がさらなるタンパク質還元実験に適していたことが判定された。

10

20

【0221】

酵素イムノアッセイプレート結合タンパク質における還元は、多数の試薬濃度の迅速な試験を可能にする。しかし、潜在的なワクチン生成の点から、溶液中の還元がより適切である。従って、TCPEPは、6~8の範囲のpHで最も効果的であるので、H77c 123 単量体を、pH6.8のPBS中で調製した。最初に存在する異なる量のタンパク質が、単量体のHMW形態への変換効率に影響を与えるかどうかを調べるために、種々の濃度の 123 も調製した。次に、従前の小規模還元実験により導かれた濃度で、TCPEPを添加した。続いて、部分還元された 123 単量体をHMW 123 に変換するために、還元後に、タンパク質リフォールディング、ジスルフィド再形成、及びリシャフリングを伴うプロセスが続いた。6.5~7.5のpH範囲で遊離スルフヒドリルと共にチオエーテル結合を形成する、短いホモ二官能性マレイミド架橋剤BMOEの添加により、これを促進した。その結果、スルフヒドリル基が共役され、それにより、ジスルフィド再形成を再現する。また、TCPEPは、スルフヒドリルを含まず、それにより、スルフヒドリル反応性BMOE架橋剤と組み合わせて使用するのに適切であり、この実験では還元剤としてTCPEPの使用が正当化される。

30

【0222】

リフォールディングした 123 糖タンパク質を非還元SDS-PAGEで分析した(図6B)。全ての試料は、単量体対照及びモック対照と同様の移動パターンを示し、さらに、これを、TCPEP及びBMOEの不存在下であったが、還元及びリフォールディング手順にかけた(図6B及び表8のレーン7)。HMW 123 対照のバンドと位置合わせしたバンドはなく、TCPEP還元及びBMOEを使用したリフォールディングが、単量体 123 をHMW 123 に変換するのに失敗したことが明らかにされた。

40

【0223】

実施例12：酸化還元シャフリングシステムを使用した還元及びリフォールディング
酸化還元シャフリングシステムを利用して、還元されたスルフヒドリル間の酸化を促進し、それにより、還元及びリフォールディングを、還元剤(GSH)及び酸化剤(GSSG)の両方の存在下で同時に行った。高pH環境が、それぞれ、GSH及びGSSGの還元能力及び酸化能力を促進するので、pH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中でH77c 123 単量体を調製することにより、これを実施した。凝集効率に対するタンパク質濃度の影響を調べるために、H77c 123 単量体も種々の濃度で調製した(表9)。次に

50

、2 mMのG S H及び0.4 mMのG S S Gの最終濃度と等しい5 G S H：1 G S S Gの比を添加し、これらは、市販のタンパク質リフォールディングキットで通常使用される濃度であり、90%を超えるタンパク質をリフォールディングすると報告されている（Thermo Fisher Scientificにより提供される情報）。次に、これら123試料を37で種々の時間インキュベートして（表9）、この直後に、pH6.8のP B Sで50倍希釈し、遠心フィルターユニットを使用してグルタチオンを除去して、反応を停止させた。

【0224】

123試料を非還元S D S - P A G Eで分析し（図7A）、これにより、二量体バンドの出現及び二量体よりもサイズが大きい高次構造の存在により示されるように、単量体123の二量体123及び高次種への良好なリフォールディングが明らかにされた。単量体対照及びモック対照はそれぞれ、予想通りに、単量体123のサイズに対応するバンドを生成した。しかし、モック対照に対し、かすかな二量体バンドが観察された（図7Aのレーン1）。これは、単量体123のゲル濾過プロファイルと一致しており（図7B）、これは、少量の混入二量体123も示した。未処理123単量体を4で蓋付きチューブ中に予め保存していたので、二量体の検出は、空気またはより高温への曝露の結果としての自発的タンパク質凝集も示唆し得る。さらに、ゲルにロードする前に試料をボイルすると、凝集を促進することができる。L I - C O R O d y s s e yシステムを使用して単量体及び二量体バンドのデンストメトリーを定量すると、モック対照は、二量体の4.65倍多い単量体を含有することが示された。1 μ g / μ Lの単量体123をグルタチオンで処理された時、大部分の単量体は高次種にリフォールディングすることができず、単量体は、モック対照に対して記録された量より多かった二量体の6.89倍多い。対照的に、より高濃度（5及び10 μ g / μ L）を使用すると、多くの二量体形成がもたらされ、多量のタンパク質の存在下でのリフォールディングが123凝集効率を増強したことが示された。インキュベーション時間を2時間から24時間に増加させると、図7Aの条件3及び5を並置することにより実証された、より多くの二量体の形成が誘導された。試験された全ての条件のうち、10 μ g / μ Lの単量体123を24時間グルタチオン処理にかけた時、単量体から二量体への変換が最も効率的であった。それ故、これらの条件を利用する実験のスケールアップした反復を実施し、ゲル濾過クロマトグラフィーで分析した。

【0225】

反復実験の123のゲル濾過プロファイルは、非還元S D S - P A G Eからの結果（図7A）と一致する単量体及び二量体のピークを示した（図7C）。二量体ピーク上のショルダーも観察され、高次種の一部の形成が示された。U N I C O R Nソフトウェアを使用する曲線下面積の定量により、ほぼ半分の123単量体が、多量体にリフォールディングして、二量体が大部分のタンパク質を含むことが明らかにされた（表10）。全体として、これらの結果は、酸化還元シャフリングシステムの使用が実際に、グルタチオン還元123単量体間の分子間ジスルフィド結合形成をもたらしことを実証した。主に、これらの実験は、二量体の形成をもたらしした。

【0226】

実施例13：ジチオスレイトール（D T T）を使用する還元及び徐々に希釈することによるリフォールディング

123凝集についての本発明者らの研究を拡大するために、異なる還元剤及びリフォールディング技術：それぞれ、D T T及び徐々に希釈することを用いた。T C E Pと同様に、E L I S Aフォーマットにおける123の小規模D T T還元を最初に試行して、123の部分還元を達成するのに必要な最適D T T濃度を決定した（図8A）。酵素免疫アッセイプレート上にコーティングされたH 7 7 c 123単量体を、異なる濃度のD T T（0～10 mM）に、37で30分間曝露することにより、これを実行した。次に、プレートを洗浄してD T Tを除去し、それにより、さらなる還元を停止させ、続いて、ブロックし、一次抗体（抗H I S、H 5 3、及びR 0 4）を添加し、適切なH R Pコンジ

ユゲート二次抗体で検出した。2 mMを超えるDTTを用いて、123のほぼ完全な還元を達成した。0.1 ~ 1.0 mMのDTTで処理された123は、H53結合の漸進的低下を示し、これらの濃度をその後のDTT還元実験でさらに調べた。均一な抗HIS結合が全てのDTT濃度で観察され、H53結合の低下の要因としての結合123の喪失が排除された。

【0227】

次に、溶液中のDTT還元を調査し、それにより、種々の濃度のH77C 123単量体(表11)を、pH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中で調製し、DTTに曝露した。DTTは、7を超えるpHで還元能力を保持する。還元されたスルフヒドリルは最終的に、還元剤の不存在下で自発的酸化を受け、ジスルフィド結合の再形成がもたらされる。このプロセスを可能にするために、続いて、還元された123糖タンパク質を、徐々に希釈することによるリフォールディングにかけた。徐々に希釈することは、pH6.8のPBSを123試料に段階的に添加することを含む。さらに、この手順は、pH環境を徐々に中和することによりDTTを希釈し、その活性を減弱させ、それにより、スルフヒドリルの酸化を促進する。

【0228】

リフォールディングした123糖タンパク質を非還元SDS-PAGEで分析した(図8B)。二量体バンドが単量体対照において観察されなかったため、モック対照は、予想通りの単量体バンド、及び二量体またはおそらく自発的タンパク質凝集を含む低レベルの混入物を示す二量体123に対応するおよそ100 kDaのかすかなバンドを生じた。単量体及び二量体バンドのデンストメトリーを定量すると、モック対照が二量体タンパク質の3.41倍多い単量体タンパク質を含有することが示された(図8B及び表11のレーン1)。全ての試験条件下で還元及びリフォールディングを受けた123試料に対して増加した量のオリゴマーが記録され(図8B)、成功した分子間ジスルフィド結合形成の結果として、123単量体の割合が実際に多量体に変換されたことが明らかにされた。DTT添加後30分間インキュベートされた試料に対して、単量体対二量体の比の有意な低下が記録され、これは、二量体タンパク質の2倍未満多い単量体をもたらした。2時間以上のインキュベーションは、30分のインキュベーションと比較して、より多量体形成を生じさせなかったため、インキュベーション時間を延長したが、123凝集を増強することはできなかった。グルタチオン処理からの結果とは対照的に、1 µg / µLの単量体123をDTTで処理した時、低い単量体対二量体の比が記録された。1 µg / µLの単量体123を0.1 mMのDTTで30分間処理した時、1.33の最低値が記録され(図8B及び表11のレーン11)、これらの条件を使用する二量体への変換が最も効率的であることが示された。1 µg / µLの単量体123を1 mMのDTTで30分間処理した時、高次種の形成は、非還元SDS-PAGEで最も明白であった(図8Bのレーン9)。

【0229】

多量体形成のための最適条件(30分間、1 mM DTT)を使用して、スケールアップした反復実験を実施した。次に、リフォールディングした123糖タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーで分析して、非還元SDS-PAGEでの観察を補強し、生成されたオリゴマー種のそれぞれについて、より正確な測定値を得た(図8C~D)。DTT処理後の単量体ピークの保持により示されるように、単量体の割合は、影響を受けなかった。ゲル濾過プロファイルは、少量のタンパク質が二量体123に対応する領域内に溶出したため、二量体123の一部の形成も示し、これは、処理前のゲル濾過プロファイルのものよりも顕著である。最も重要なことには、HMW 2123について観察された溶出時間と同様に、200 kDaを超えるサイズに対応する広いピークがおよそ59分で溶出し、より大きな多量体への良好な123凝集が確認された。ピーク下面積を定量すると、およそ5分の1の単量体がHMW 123に凝集したことが明らかにされた。単量体123をHMW 123に変換するために用いられた3つの方法のうち、DTT還元、続いて、徐々に希釈することが最も効果的であった。

【0230】

実施例14：リフォールディングD T T処理 123から生じた生成物のサイズの分析
以下のプロトコールを使用して、リフォールディングD T T処理 123から生じた生成物のサイズを分析した。

物質：

単量体 123

pH9.6の炭酸水素塩緩衝液

ジチオトレイトール(D T T)

pH6.8のリン酸緩衝生理食塩水(P B S)

【0231】

単量体 123を還元させるために、1 mLの単量体 123を、炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液中で5 mLの黄色の蓋付きチューブ中で1 mLの総体積に調製した。プロテアーゼ阻害剤の存在下でリフォールディングする場合、5 μ g/mLのアプロチニン、8 μ g/mLのロイペプチン、及び5 μ Mのキフェネンシンも添加した。D T TをM i l l i - Q水に溶解させ、0.3 mMの最終濃度(すなわち、100 mMのD T T 3 μ L)でチューブに添加した。次に、混合物を37 で30分間インキュベートした。2回のD T T処理の場合、インキュベーション後、100 mMのD T T 3 μ Lをチューブに添加し、混合物を37 で30分間インキュベートした。3回のD T T処理の場合、2回目のインキュベーション後、100 mMのD T T 3 μ Lをチューブに添加し、混合物を37 で30分間再度インキュベートした。

【0232】

リフォールディングのために、0.5 mLのP B Sを添加し、タンパク質を室温で15分間インキュベートした。このステップを3回繰り返した。A m i c o n U l t r a遠心フィルターユニット(10 kのM W C O)を使用することによりD T Tを除去し、タンパク質をP B S中で2回すすいだ。

【0233】

サイズ分析のために、タンパク質は、1.5 mLのエッペンドルフチューブに移し、13,000 rpm、4 で10分間遠心分離した。次に、16/600 S u p e r d e x 200 p r e p g r a d eカラムを使用して、ゲル濾過クロマトグラフィーを実施した。

【0234】

D T T処理により、単量体 123が高次種にリフォールディングし、59分及び54分の溶出時間でピークを形成し得ることが明らかにされた(図10)。D T T処理数を増加させると、1ヒットで観察された59分の溶出時間から、2または3ヒット後の54分までのH M W様ピークの左へのシフトがもたらされた(図10)。一方で、単量体ピークについて、1、2、及び3ヒット(複数可)に対してそれぞれ77~76~75の溶出時間からの右へのわずかなシフトが観察された。プロテアーゼ阻害剤を添加すると、75分で残りの単量体ピークの溶出(図11、下の実施例)がもたらされ、リフォールディングした多量体が54分で溶出し、プロテアーゼ阻害剤がこのプロセスに有益であり得ることが示唆された。

【0235】

残りのリフォールディングしていない単量体タンパク質がリフォールディングすることが可能かどうかを検討するために、2回のD D T処理で処理され、且つA m i c o n U l t r a遠心式フィルターユニット(10 KのM W C O)を使用して濃縮された、上記の実施例の残りの単量体種(プールされたゲル濾過画分72~81)を収集した。試料を上記のようにD T Tで2回再処理し、リフォールディングを実施し、タンパク質をサイズ分析にかけた。

【0236】

リフォールディングしていない単量体 123をリフォールディングすると(図11、上の実施例)、37%の二量体形成及びわずかなH M W様形成がもたらされたが、63%は単量体として残り、123単量体の分集団のリフォールディングが困難であることが示

10

20

30

40

50

された。単量体ピークの右への比較的短いピークの形成も認められた。しかし、プロテアーゼ阻害剤の存在下でリフォールディングさせると、このピークのサイズに減少をもたらした。

【 0 2 3 7 】

結果は、本発明の方法を使用して少なくとも 60 ~ 70 % のオリゴマー (100 MW または 200 MW を超える) の収率が生じ得ることを実証している。

【 0 2 3 8 】

実施例 15 : D T T 処理 1 2 3 及び A L A 7 1 2 3 の抗原性の特性決定

以下のプロトコールを使用して、下記の抗体のパネルを使用して、D T T 処理 1 2 3 及び A L A 7 1 2 3 の抗原性を比較した。

物質 :

試薬 :

p H 9 . 4 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液

E L I S A 洗浄液 (P B S T)

E L I S A 過酸化水素ブロック (B S A 10 P B S)

E L I S A 希釈剤 (B S A 5 P B S T)

クエン酸リン酸緩衝液 ; 3 , 3 , 5 , 5 - テトラメチルベンジジン (T M B)

塩酸 (H C l)

タンパク質 :

H M W 1 1 2 3

リフォールディング前の単量体 1 2 3

リフォールディング耐性 1 2 3

リフォールディングした多量体 1 2 3

リフォールディング前の単量体 A L A 7 1 2 3

リフォールディング耐性 A L A 7 1 2 3

リフォールディングした多量体 A L A 7 1 2 3

B S A

抗体 :

一次抗体 A R 3 C 、 C B H 4 G 、 H C 8 4 . 2 7 、 H C V 1

二次抗体抗ヒト H R P コンジュゲート

【 0 2 3 9 】

N u n c M a x i s o r p 平底 96 ウェルプレート を、p H 9 . 6 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 50 m M 中で調製した 5 μ g / m L の上記のタンパク質でコーティングし、4 で一晩 (一晩) インキュベートした。翌日、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、100 μ L / ウェルの B S A 10 P B S で室温で 1 時間ブロックした。次に、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、資料中に列挙された 1 ° 抗体の半対数段階希釈を行い、室温で 1 時間インキュベートした。次に、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、資料に記載される 2 ° 抗体を 50 μ L / ウェル加え、室温で 1 時間インキュベートした。次に、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、100 μ L / ウェルの T M B で発色させ、続いて、50 μ L / ウェルの H C l を添加した。結果は、図 9 に示す通りである。リフォールディングした 1 2 3 は、単量体 1 2 3 対照及びリフォールディング耐性 1 2 3 対照と比較して、A R 3 C 及び C B H 4 G との結合を低下させており、H M W 1 2 3 に特有のプロファイルである、標的エピトープがリフォールディングした 1 2 3 中に、より閉じ込められていたことが示された。リフォールディングした A L A 7 1 2 3 は、単量体 A L A 7 1 2 3 対照及びリフォールディング耐性 A L A 7 1 2 3 対照と比較して、A R 3 C 及び C B H 4 G との結合を低下させており、高分子量形態のタンパク質に特有のプロファイルである、標的エピトープがリフォールディングした A L A 7 1 2 3 中に、より閉じ込められていたことが示された。リフォールディングした 1 2 3 及びリフォールディングした A L A 7 1 2 3 に対する C B H 4 G の反応性の減少により、非中和エピトープが天然 H M W 物質中よりも、リフォールディングした物質中に閉じ込められていることが示され得る。非中和抗体応

10

20

30

40

50

答の発生が抑制される可能性があるのも、これは、リフォールディングした物質が免疫原として使用される時、利点を提供し得る。

【0240】

実施例16：リフォールディング実験

上記で行ったさらなるリフォールディング実験の結果は、表13及び14にまとめられる。

【0241】

要約すれば、アフィニティー精製された123のゲル濾過クロマトグラフィーにより、優勢な単量体形態に加えて、ジスルフィド結合二量体及び高次HMW多量体の不均一混合物の存在が明らかになる。HMW123は、魅力的なワクチン候補である。しかし、HMW形態の123の魅力は、比較的低い発現収率及び混入タンパク質の存在により幾分弱められる。ワクチン製造に有益であると思われるHMW123産生の収率を改善するいくつかの方法を調べた。

【0242】

ヒト由来のFS293F細胞における一過性トランスフェクションからの123の発現を評価し、123を捕捉するためにCD81-LEL113-201を利用するサンドイッチELISAを介して、良好な123産生及び精製を確認した。

【0243】

ゲル濾過クロマトグラフィーから得られた結果は、Con1及びS52株の両方が一貫して高い割合のHMW123を発現し、Con1及びS52についてそれぞれおよそ23%及び20%の増加を示し、H77c株により生成されるHMW123の割合をほぼ2倍にした。さらに、これらの結果は、異なるHCV株が様々な量のHMW123を産生することが明らかにされる。結果は、トランスフェクション及び精製の独立した2ラウンドから生成されたCon1及びS52123の両方について再現性があった。

【0244】

コバルト荷電TALONビーズを使用するアフィニティークロマトグラフィーは細胞培養上清から分泌された123糖タンパク質を効率的に精製するが、これらのビーズからのコバルト浸出はワクチン生成に使用すると健康上の問題を引き起こし得る。より安全な代替法は、123を精製する時、抗体アフィニティークロマトグラフィーを使用することであり得る。

【0245】

HMW123の構造は未定義のままであるが、本明細書に記載の結果は、分子間ジスルフィド結合が、WTE2及び単量体123において予め接近可能であった非特異的及びタイプ特異的中和領域を閉じ込める独特のフォールディング配置を媒介することを示唆する。単量体がbNAbを生成しなかったが、HMW形態が7つ全てのHCV遺伝子型を中和することができる抗体を誘発することが可能だったことを実証することにより、H77c123の免疫原性試験は、このことをサポートし、これらの抗体応答が、これらの領域の閉じ込めにより、非中和エピトープから離れる方向に向かい、従って、代わりに広域中和エピトープに標的化されることが示された(H. Drummer、未発表データ)。

【0246】

単量体は、異なる123種の不均一混合物から効率的に生成され、効果的に精製され得るので、単量体123をHMW形態にリフォールディングするための方策を評価した。遊離スルフヒドリルを生じる単量体の部分還元、続いて、これらのスルフヒドリルの共役または再酸化は、H77cHMW123中のジスルフィド配置を再現するようにジスルフィド結合のリシャフリングをもたらすと仮定された。従来、望ましくないタンパク質凝集体から、特に、細菌封入体から低次種(単量体/二量体/三量体)を再生するために還元及びリフォールディング方法が採用される(Singh and Panda、2005)。

【0247】

ホモ二官能性BMOE架橋剤は、遊離スルフヒドリルと反応して、それらの共役をもたらす。さらに、共役が個々の123サブユニット間で起こる場合、HMW123への凝

10

20

30

40

50

集を媒介する分子間相互作用が確立されることになる。しかし、リフォールディングプロセスにおいてBMOE架橋剤を利用すると、分子間ジスルフィド結合形成を促進することができなかった。これにより、おそらく立体障害または実験誤差のために、試行された条件に対してBMOEが123単量体を架橋しなかったことが示唆される。さらに、BMOE処理陽性対照が存在しないと、これらのBMOEリフォールディング実験の有効性を評価することは非常に困難になった。これは、他の架橋剤が架橋多量体を生成せず、且つ生成に有用な方法ではないということではない。逆に、DTT還元、続いて、徐々に希釈する方法、ならびにグルタチオンベースの酸化還元シャフリングシステムを使用すると、二量体及び高次種の形成がもたらされ、遊離スルフヒドリルが分子間ジスルフィド結合に酸化されたことが示された。具体的には、システイン残基452、486、569、及び597のスルフヒドリルは、個々の123サブユニットと一緒に架橋することに直接関与し得るが、これは、これらの残基がE2RBDの構造的完全性にとって必須ではないからである。

10

【0248】

試験した3つの方法のうち、DTTを使用した還元及び徐々に希釈することによるリフォールディングは、単量体123をHMW種に変換することにおいて最も有効な方法であった。この方法は、およそ5分の1の123単量体のHMW種への変換を可能にした。酸化還元シャフリングシステムを使用すると、二量体ではあるが、およそ50%の123単量体においてリフォールディングが達成された。

【0249】

20

実施例17： -メルカプトエタノール(ME)を使用した還元及びアセンブリ

MEを使用した部分還元による123単量体の還元及び高分子量のオリゴマーへのアセンブリを評価した。

【0250】

単量体123(20 µg)をPBS中で調製して、各チューブ中の総体積を20 µLとした。MEを、最終濃度が0~100 mMとなるように添加し、室温で15分間インキュベートした。タンパク質をリアセンプルさせるために、10 µLのPBSを添加し、タンパク質を室温で7分間インキュベートし、2回繰り返した。Amicon Ultra遠心フィルターユニット(30 kのMWCO)を使用して、MEを除去し、タンパク質を、PBSで2回すすいだ。タンパク質を非還元SDS-PAGEで分析した。ME処理123 123 3及びHMW1 123及び2 µLのタンパク質標準の試料をウェルに別々にロードし、次に、ゲル電気泳動を120 Vで実施した。染料の先端が分離ゲルの頂部に移動すると、電圧を160 Vに増加させた。クマシー(0.25%のクマシーブリリアントブルーG-250、50%のメタノール、及び10%の酢酸)でゲルを1時間染色し、次に、ゲルの背景が透明になるまで脱色した(50%のメタノール及び10%の酢酸)。最終的に、Li-Cor Odysseyイメージングシステムを使用して、ゲルを観察した。

30

【0251】

処理及び未処理タンパク質を、非還元条件下でSDS-PAGEで分析した。結果(図15A)は、未処理の単量体123がほとんどの場合は、単量体として移動し、少量の二量体が存在し、SDS-PAGEへの添加前の試料のポイリングの結果の可能性あることを示す。高濃度のMEでは、図15Aに示すように、より大きいHMWオリゴマーを観察することができる。それらの存在を確認するために、123単量体を100 mMのMEで還元し、ゲル濾過クロマトグラフィーでの分析前にアセンブルさせた。結果(図15B)は、網掛け領域で示されるように、小さなショルダーが、100 mMのMEで処理された123単量体上に存在したことを示す。これは、非効率的ではあるが、MEが、123をより高次のオリゴマーにリアセンプルさせることができることを示唆する。

40

【0252】

実施例18：アセンブルした糖タンパク質の免疫原性

50

アセンブルしたタンパク質が単量体抗原と比較して、動物において、より免疫原性であるかどうかを判定するために、アジュバントとして *Addavax* を使用して、非近交系モルモットに3週間間隔で $100 \mu\text{g}$ のタンパク質を4回ワクチン接種した(表15)。最終ワクチン接種の2週間後にモルモットから採血し、免疫血清を分析して、123単量体タンパク質に対する抗体価を決定した。

【0253】

Nunc MaxiSorp 平底96ウェルプレートに、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルの $\text{pH } 9.6$ の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 50 mM 中で調製された $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の単量体 *H77c E2* 123でコーティングし、4で一晩インキュベートした。翌日、プレートを *PBS-T* で4回洗浄し、 $100 \mu\text{L}$ /ウェルの *BSA* 10 PBS で室温で1時間ブロックした。*PBS-T* で4回洗浄した後、 $1/100$ で開始するモルモット血清の半対数段階希釈物を、プレートに室温で2時間添加した。プレートを *PBS-T* で4回洗浄し、 $1/1000$ の抗 *HIS* 抗体を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを *PBS-T* で4回洗浄し、 $100 \mu\text{L}$ /ウェルの *TMB* で発色させ、続いて、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルの *HCL* を添加した。 $450 \text{ nm} \sim 650 \text{ nm}$ の時の光学密度は、連続希釈に対する (*y* 軸) をプロットし、 0.5 単位の光学濃度を得るために必要な逆数希釈を使用して、抗体価を決定した。群4-F及び5-Fはそれぞれ4匹の動物を有し、両方とも単量体バージョンの *HCV* タンパク質を投与されるので、これらの群からの結果を、他の群との比較のために組み合わせた。

【0254】

結果は、リフォールディングした123及び123A7タンパク質でワクチン接種された動物が、これらのタンパク質の単量体形態でワクチン接種された動物よりも高い抗体価を生じたことを示す(組み合わせられた123及び123A7単量体群の場合、 $123 = 41826$ 、 $123A7 = 28686$ 対 21756) (図16)。これらの群の平均力価もまた高かった。アセンブルした123群の場合、幾何平均抗体価は、天然123 *HMW* ワクチン接種群より高かった(表16)。アセンブルした123を投与された動物は、単量体抗原を投与された動物よりも統計的に有意に高い抗体価を有した ($p = 0.0286$) (図16)。

【0255】

実施例19：抗体応答の特異性

アセンブルした抗原が抗体の異なる特異性を生じたかどうかを決定するために、*HCV* による感染を予防する広域中和抗体の標的である *E2* 糖タンパク質の主要抗原領域を表す合成ペプチドに対して血清を試験した。エピトープIは、残基412~423にわたり、マウス *AP33* (*Owsianka et al.*, 2001; *Owsianka et al.*, 2005; *Tarr et al.*, 2006); ラット3/11 (*Tarr et al.*, 2006; *Flint et al.* 2009); ヒト *HCV1* 及び95-2 (*Broering et al.* 2009); ヒト *HC33.1* 及び関連抗体 (*Keck et al.*, 2013); *H77.39* (*Sabo et al.*, 2011); *MRC10.v362* 及び *hu5B3.v3* (*Pantua et al.*, 2013); ならびに *MAb24* (*Alhammad et al.*, 2015) などの広域中和抗体のエピトープを包含する。合成ペプチドは、このような特異性及びスパン残基408~428を検出するために使用され、モルモット血清中のポリクローナル抗体の反応性を特性決定するために以前に使用されている (*Vietheer* ら、2017)。

【0256】

Nunc MaxiSorp 平底96ウェルプレートに、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルの $\text{pH } 9.6$ の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 50 mM 中で調製された $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の *H77c* エピトープIペプチド(408~428)でコーティングし、4で一晩インキュベートした。翌日、プレートを *PBS-T* で4回洗浄し、 $100 \mu\text{L}$ /ウェルの *BSA* 10 PBS で室温で1時間ブロックした。*PBS-T* で4回洗浄した後、モルモット血清の半対数段階希釈物を、 $1/5$ から開始して加え、1時間結合させた。*PBS-T* で4回洗浄した後、 $50 \mu\text{L}$ /ウェ

ルの抗モルモットHRP抗体を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗浄し、100 μ L/ウェルのTMBで発色させ、続いて、50 μ L/ウェルのHClを添加した。

【0257】

結果は、アセンブルした123及び123A7でワクチン接種された動物が、これらの単量体形態の抗原でワクチン接種された動物よりも有意に高い抗体価を有することを示す(図17)。アセンブルした123の場合には、平均力価は、単量体群の1.5倍高く、天然123がワクチン接種された群の1.15倍高かった。アセンブルした123A7の場合、平均力価は、単量体群の5倍高かった。データは、自然にフォールディングした状態(この実施例では、HCV E2の単量体である)から高次オリゴマーに抗原をアセンブルすると、広域中和抗体エпитープに対する抗体の力価を増加させることにより抗原の免疫原性を有意に改善したことを示唆する。

10

【0258】

実施例20：抗体応答エпитープIIIの特異性

アセンブルした抗原が異なる特異性の抗体を生じたかどうかを決定するために、残基523～549にわたるCD81結合ループを表す合成ペプチドに対して、血清を試験した。この抗原領域は、抗原領域3の一部を含み、中和抗体の標的である。

【0259】

Nunc MaxiSorp平底96ウェルプレートを、50 μ L/ウェルのpH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液50mM中で調製された5 μ g/mLのH77cエпитープIIIペプチド(523～549)でコーティングし、4で一晩インキュベートした。翌日、プレートをPBSTで4回洗浄し、100 μ L/ウェルのBSA10PBSで室温で1時間ブロックした。PBSTで4回洗浄した後、モルモット血清の半対数段階希釈物を、1/5から開始して加え、1時間結合させた。PBSTで4回洗浄した後、50 μ L/ウェルの抗モルモットHRP抗体を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗浄し、100 μ L/ウェルのTMBで発色させ、続いて、50 μ L/ウェルのHClを添加した。

20

【0260】

結果(図18)は、アセンブルした123及び123A7を投与された動物が、H77cエпитープIIIに対する高力価の抗体を生じ、123でワクチン接種された動物の平均及び幾何平均が、自然にフォールディングした単量体物質を投与された動物よりも高いことを示す(表18)。加えて、アセンブルした123及び123A7タンパク質を投与される動物における抗体価は、単量体物質を投与される動物で観察された抗体価の広がりとは対照的に、一貫して高かった(123及び123A7の場合の力価の5～6倍の範囲、対、単量体の場合の200倍)。これは、アセンブルしたタンパク質が、ワクチン接種された動物において一貫した免疫応答を誘導することができた一方、単量体出発物質が、この領域に特異的な抗体を一貫性なく生成したことを示唆する。

30

【0261】

実施例21：エпитープIに対する抗体応答の交差反応性

H77cエпитープIに対して生じた抗体が異なる遺伝子型の同等の配列と交差反応性であるかどうかを決定するために、残基408～428にわたる遺伝子型2aJ6ペプチドを使用して、ELISAを実施した。

40

【0262】

Nunc MaxiSorp平底96ウェルプレートを、50 μ L/ウェルのpH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液50mM中で調製された5 μ g/mLのJ6エпитープIペプチドでコーティングし、4で一晩インキュベートした。翌日、プレートをPBSTで4回洗浄し、100 μ L/ウェルのBSA10PBSで室温で1時間ブロックした。PBSTで4回洗浄した後、モルモット血清の半対数段階希釈物を、1/5から開始して加え、1時間結合させた。PBSTで4回洗浄した後、50 μ L/ウェルの抗モルモットHRP抗体を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗浄し、1

50

00 μ L / ウェルの TMB で発色させ、続いて、50 μ L / ウェルの HCl を添加した。

【0263】

結果 (図 19) は、123 及び 123A7 でワクチン接種された動物において生じた抗体は、エプトープ I の遺伝子型 2a 株 J6 配列と交差反応性であり、これらの群の抗体の平均及び幾何平均力価は、天然単量体形態のこれらの抗原でのワクチン接種により達成されたものよりも高かったことを示す (表 19)。123 でワクチン接種された動物の平均抗体価は、123 タンパク質を発現するプラスミドがトランスフェクトされた 293FS 細胞から直接採取された天然高分子量形態の 123 でのワクチン接種を介して達成されたもののほぼ 2 倍高かった (表 19)。

【0264】

実施例 22: HCV E2 CD81 阻害の特性決定

HCV E2 は、細胞受容体 CD81 を使用して細胞に結合する。本発明者らの研究室では、本発明者らは、免疫血清中に存在する抗体が可溶性 E2 の組み換え CD81 への結合を妨げる能力を判定するためのアッセイを従前に用いている。

【0265】

Nunc MaxiSorp 平底プレート を、pH 9.6 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 50 mM 中で調製された 5 μ g / mL の MBP - CD81 LEL でコーティングし、4 で一晩保存した。翌日、プレートを、100 μ L / ウェルの BSA 10 PBS で 1 時間ブロックし、PBST 中で X4 回洗浄した。BSA 5 PBST 中、1 / 5 で開始するモルモット免疫血清の半対数段階希釈物 50 μ L を、全てのウェルの 1 μ g / mL の分画されていない E2 RBD (別々に、G1aH77c 及び G2a JFH1) 50 μ L に添加し、次に、室温で 1 時間インキュベートした。80 μ L の E2 RBD - 血清混合物を CD81 がコーティングされたプレートに添加し、4 で一晩インキュベートした。プレートを PBST で 4 回洗浄した後、1 / 500 の 50 μ L / ウェルのマウス抗 HIS を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBST で 4 回洗浄し、100 μ L / ウェルの TMB で発色させ、50 μ L / ウェルの 1 M の HCl を添加して、反応を停止させた。結果は、アセンブルした 123 及び 123A7 でワクチン接種された動物が、H77c G1a E2 と CD81 の相互作用を妨げることができる高力価の抗体を生じ、天然 123 HMW タンパク質を投与されたマウスに存在するレベルと同様の、且つ単量体形態のこれらの抗原でワクチン接種されたマウスで達成された平均レベルと同様のレベルで存在したことを示す (図 20A 及び表 20)。

【0266】

免疫血清が CD81 と結合する G2a E2 の結合を阻害する能力を評価した (図 20B)。アセンブルした 123 及び 123A7 でワクチン接種された動物の抗体価は、これらの抗原の単量体形態でワクチン接種された動物及び天然 123 HMW でワクチン接種された動物と同様であった。これらのデータは、アセンブルした形態の 123 及び 123A7 が、細胞表面受容体 CD81 への異種遺伝子型の HCV の結合を妨げる交差反応性抗体を生じるのに、より有利であることを示唆する。

【0267】

実施例 23: 相同遺伝子型 1a ウイルスの中和

生じた抗体が肝細胞株の HCV による感染を防止する能力をもたらしたかどうかを判定するために、相同遺伝子型 1a 偽型ウイルスを使用して、中和アッセイを実施した。

【0268】

G1a 由来の E1E2 ヘテロ二量体を組み込む HCV pp を産生するための発現ベクターは、pE1E2H77c であった (Drummer et al., 2003)。pNL4-3.Luc.R.E.-(pNL43) を、the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH の Nathaniel Landau 博士から入手した (Connor et al., 1995; He et al., 1995)。6 μ g の E1E2H77c DNA を、1.5 mL のエッペンドルフチューブ中で 6 μ g の pNL43 DNA と混合した。空ベクター対照のために、1

10

20

30

40

50

μg の pcDNA4c を $1\mu\text{g}$ の pNL43DNA と混合した。 $312\mu\text{L}$ の FUGENE6 を $5200\mu\text{L}$ の $\text{Opti-MEM} (+\text{グルタマックス})$ に添加し、次に、室温で5分間インキュベートし、この混合物 $600\mu\text{L}$ を DNA 混合物に添加した。 $100\mu\text{L}$ を空対照に添加した。これらを室温で20分間インキュベートした。 PC3 実験室では、8本のチューブの内容物を、ステップ1の別々の 293T 細胞含有皿に滴加した。空対照を、ステップ1の 293T 細胞含有プレートの1つのウェルに添加した。 $\text{Fugene6} / \text{Optimem} / \text{DNA}$ 混合物を 37°C 及び 5% の CO_2 で20分間インキュベートした後、 293T 細胞に滴加した。細胞を 5% の CO_2 中 37°C で3日間インキュベートした。3日後、感染性 E1E2 偽型ウイルス (HCVpp) または空ベクター偽型ウイルス (Emptypp) を含有する上清液を除去し、中和アッセイでの使用の準備ができている $0.45\mu\text{M}$ のフィルターを通して濾過した。

10

【0269】

熱不活化モルモット血清の半対数段階希釈を、 $1/20$ から開始して行い、 $250\mu\text{L}$ の血清を、 $250\mu\text{L}$ の HCVpp に添加し、1時間インキュベートした。 $150\mu\text{L} / \text{ウェル}$ の血清 - ウイルス混合物を3連で Huh7.5 細胞に添加した。 $150\mu\text{L} / \text{ウェル}$ の空対照を、無抗原群のプレートの最下段に3連で添加した。次に、プレートを 37°C 及び 5% の CO_2 でインキュベートした。

【0270】

42時間後、培地を Huh7.5 細胞から除去し、次に、これを $1\times\text{PBS}$ 中で1回洗浄した。 $50\mu\text{L} / \text{ウェル}$ の $1\times$ 細胞培養溶解試薬を添加し、細胞溶解物を U底96ウェル プレートに移した。溶解物 $5\mu\text{L}$ を 384 ウェル白色プレートに移し、 CLARIOstar プレートリーダーで読み取った。3連の値の平均を血清希釈物に対してプロットし、非線形回帰分析を使用して、曲線フィッティングをし、ウイルス感染細胞の 50% の阻害用量を達成するのに必要な血清の逆数希釈を計算した (プリズムV7)。

20

【0271】

結果 (図21) は、アSEMBルした 123 及び 123A7 でワクチン接種された $8/8$ の動物が、 G1a HCVp による感染を予防することができる抗体を生じたことを示す。対照的に、単量体抗原を投与された群の $7/8$ の動物のみが中和抗体を生じた。 123A7 を投与された群の平均及び幾何平均抗体価は、単量体抗原を使用して達成されたものよりも高く、アSEMBルの方法により抗原のサイズを増加させると、免疫原性が改善されることが示唆された (表22)。アSEMBルを通じて達成された抗体中和価は、天然 HMW 形態の抗原を使用して達成されたものと同様の範囲にあり (表22)、本方法が HCV の相同株に対して有効な中和抗体を生成する少なくとも同等の能力を有する抗原を産生し、且つ単量体抗原を超えて改善したことが示唆された。

30

【0272】

実施例24：免疫血清が E2 に対するヒトモノクローナル抗体の結合を阻害する能力
モルモットで生じた抗体が既知のヒト広域中和抗体のものと類似のエピトープを認識するかどうかに関して抗体応答の特異性をさらに調べるために、競合的酵素免疫アッセイを実施した。

【0273】

組織プラスミノーゲンアクチベーター (tPA) リーダーの指示の下で IgG1 を発現させるために、 VH 及び VL 領域 (Geneart) の合成ならびにそれぞれ pcDNA3-tPA-LC 及び pcDNA3-tPA-HC へのクローニングにより、ヒト抗体 HCV-1 ($\text{Broering et al.}, 2009$)、 HC84-27 ($\text{Krey et al.}, 2013$)、 AR3C ($\text{Law et al.}, 2008$)、及び 2A12 ($\text{Khan et al.}, 2014$) を生成させた。重鎖及び軽鎖をコードするプラスミドを、 IgG 産生のために FS293F 細胞にトランスフェクトした。

40

【0274】

一定量の MAb 及び各モルモット血清の半対数段階希釈物をブロックされたウェルに同時に加え、プレート結合単量体 123 に添加する前に室温で2時間インキュベートした。

50

残留M A b結合を抗ヒトF a b 2で検出した。曲線を、非線形回帰によりフィットし、各血清試料についてI D 5 0を決定するために使用した。血清試料が試験した最高濃度（1 : 1 0希釈、 $\log 1 0^1$ ）でI D 5 0を達成できなかった場合、 $\log 1 0^0.5$ の値をその血清に割り当てた。

【0275】

結果は、アセンブルした 1 2 3 及び 1 2 3 A 7 でワクチン接種された動物が、4 1 2 ~ 4 2 3 領域を認識する抗体H C V 1のエピトープ（エピトープI）と重複する抗体のより高い平均及び幾何平均力価を有することを示す（表23及び図22A）。H C V 1抗体は、チンパンジーのH C Vを予防及び処置することが示されている（M o r i n e t a l . , 2 0 1 2）。さらに、力価は天然H M W 1 2 3を使用して達成されたものと同様であり、本方法が同等の抗原を産生することが示される。1 2 3を投与された動物における抗体価は、単量体ワクチン接種群におけるものよりも統計的に高かった（図22A）。

10

【0276】

結果は、単量体ワクチン接種者または天然H M Wワクチン接種者と比較して、アセンブルした 1 2 3 でワクチン接種された動物は、E 2 の4 3 0 ~ 4 4 6 領域を認識し、且つ細胞受容体C D 8 1と接触している領域の一部を含む抗体H C 8 4 - 2 7のエピトープと重複する抗体の、より高い平均及び幾何平均力価を有したことを示す（表24及び図22B）。この抗体特異性は、広域中和であり、H C V エスケープ変異体の生成を妨げる（K r e y e t a l . , 2 0 1 3 ; K e c k e t a l . , 2 0 1 2）。このデータは、アセンブリ方法が、H C 8 4 . 2 7により認識されるエピトープと重複する抗体の生成に関して改善された抗原を生成することを示す。1 2 3を投与された動物における抗体価は、単量体ワクチン接種群におけるものよりも統計的に高かった（図22B）。

20

【0277】

結果は、単量体ワクチン接種者と比較して、アセンブルした 1 2 3 及び 1 2 3 A 7 でワクチン接種された動物が、抗体A R 3 Cのエピトープと重複する抗体の、より高い平均及び幾何平均力価を有したことを示す（表25及び図22C）。1 2 3の場合、平均及び幾何平均力価は、同等の天然H M W抗原で生成されたものよりも高かった（表25）。

【0278】

結果は、単量体ワクチンと比較して、アセンブルした 1 2 3 及び 1 2 3 A 7 でワクチン接種された動物は、非中和抗体2 A 1 2の結合を妨げることができる抗体の、より低い平均及び幾何平均力価を有したことを示す（表26及び図22D）。データは、単量体1 2 3 及び 1 2 3 A 7 のアセンブリが、H C V の中和（Z h a n g e t a l . , 2 0 0 9）及び中和抗体の生成（V i e t h e e r e t a l . , 2 0 1 7）を妨げることが示されている非中和エピトープを閉じ込めることを示唆する。

30

【0279】

実施例25：E 2 特異的B細胞を検出するアセンブルしたタンパク質の使用

アセンブルしたH C Vタンパク質が、抗原に特異的な抗体を有する免疫細胞を同定するために使用することができるかを決定するために、慢性感染者から単離されたP B M Cを使用して、以下のものを実施した。

凍結P B M CからのB細胞の濃縮

40

試薬

【表1】

| | | |
|------------------------------|-----------------|------------------|
| MiniMACS Separator | Miltenyi Biotec | カタログ#130-042-102 |
| MACS MultiStand | Miltenyi Biotec | カタログ#130-042-303 |
| MS Columns | Miltenyi Biotec | カタログ#130-042-201 |
| Dead Cell Removal Kit | Miltenyi Biotec | カタログ#130-090-101 |
| B Cell Isolation Kit II (ヒト) | Miltenyi Biotec | カタログ#130-091-151 |

50

【 0 2 8 0 】

H C V 感染個体由来の P B M C を室温で解凍した。D e a d C e l l R e m o v a l k i t (# 1 3 0 - 0 9 0 - 1 0 1 M i l t e n y i B i o t e c) を使用して、死細胞を除去した。総細胞 10^7 当たり、 $20\times$ 結合緩衝ストック溶液 0.25 ml を 4.75 ml の滅菌水で希釈する。総細胞 10^7 当たり、 100 ul の D e a d C e l l R e m o v a l M i c r o b e a d s を添加し、混合し、室温で15分間インキュベートした。死細胞を M A C S S e p a r a t o r で除去した。細胞を M A C S 緩衝液 (P B S 、 0.5% の B S A 、 2 mM の E D T A) : 50 ml の冷 P B S + 0.25 g の B S A 、及び 0.2 ml の 0.5 M E D T A 中に再懸濁させた。全細胞 10^7 当たり、M A C S 緩衝液 40 ul 及び全細胞 10^7 当たりビオチン抗体カクテル 10 ul を添加し、冷却装置中で10分間インキュベートした。総細胞 10^7 当たり、M A C S 緩衝液 30 ul を添加する。 20 ul の抗ビオチンマイクロビーズを冷却装置中で20分間添加した。 500 ul の M A C S 緩衝液に再懸濁させ、M A C S S e p a r a t o r の M S カラムで非 B 細胞集団を除去する。細胞は、以下の通りの F A C S A r i a S o r t のための染色細胞であった。

10

【表 2】

| | | |
|---|---------------|--------------|
| CD19 Pe-Cy7 マウス抗ヒト(SJ25C1) | BD Pharmingen | カタログ #557835 |
| 精製された CD81 マウス抗ヒト(JS-81) | BD Pharmingen | カタログ #555675 |
| CD81 APC マウス抗ヒト(JS-81) | BD Pharmingen | カタログ #551112 |
| デルタ 3 E2-HIS タンパク質 0.59 mg/ml | Drummer Lab | |
| Penta-HIS Alexa Fluor488 | Qiagen | カタログ #35310 |
| Alexa Fluor488 ヤギ抗マウス IgG | Life Tech | カタログ #A11001 |
| FACS 緩衝液 (PBS、 2% の FCS、 1 mM の EDTA) : 50 ml の冷 PBS + 1 ml の FCS + 0.5 M の EDTA 0.1 ml | | |

20

【 0 2 8 1 】

F A C S 緩衝液中の 100 ul の C D 1 9 P E - C y 7 抗体 ($1 : 50$) で、細胞を標識した。よく混合し、冷却装置中で30分間インキュベートする。F A C S 緩衝液中で2回洗浄した後、再懸濁した細胞ペレットを F A C S 緩衝液中の精製 C D 8 1 抗体 ($1 : 50$) 100 ul で4 で30分間染色した。2回洗浄した後、再懸濁した細胞ペレットを F A C S 緩衝液 100 ul 中のデルタ 3 タンパク質 20 ug で4 で30分間インキュベートした。細胞を F A C S 緩衝液 500 ul で、 300 g 、5分間2回洗浄した。再懸濁した細胞ペレットを、F A C S 緩衝液中の 100 ul の C D 8 1 A P C 抗体 ($1 : 50$) 及び P e n t a - H I S 4 8 8 ($1 : 100$) で4 で30分間染色した。細胞を F A C S 緩衝液 500 ul で、 300 g 、5分間2回洗浄した後、細胞を F A C S 緩衝液 200 ul で再懸濁させ、直ちに、F A C S S o r t に進む。

30

【表 3】

| | | |
|--|-----------|-----------------|
| 10% の FCS、1% の NEAA、 2 mM の L-グルタミン、 0.1 mg/ml のゲンタマイシン、 1 ug/ml のミノサイクリンが補充された RPMI-1640 培地。 | | |
| R848 (1 mg/ml) | Invivogen | カタログ #tlrl-r848 |
| IL-2 ヒト | GenScript | カタログ #Z00368 |

40

【 0 2 8 2 】

結果 (図 2 3) は、C 末端 h i s タグの複数コピーを含有するアセンブルした 1 2 3 が E 2 反応性 B 細胞を効率的に検出することができることを示す。B 細胞集団のおよそ 0.5% が、E 2 特異的であった。これは、免疫マーカー検出のための多価タンパク質として作用するアセンブルしたタンパク質の使用を実証する。

50

【0283】

実施例26：アセンブルしたタンパク質のサイズ

SEC-MALS分析を使用して、アセンブルした 123A7 及びアセンブルした 123 タンパク質のモル質量を決定した。

【0284】

試料ロード前に、Wyatt WTC-030-N5 4.6/300カラムをMT-PBSで平衡化した。流速は0.2ml/分であった。DAWN Heleos MALS検出器を、Agilent 1200シリーズUVダイオードアレイ検出器及びOptilab T-rex RI検出器と直列にして使用した。BSAを使用して、MALS検出器を正規化した。

10

【0285】

262~675kDaの範囲にわたるMW種を含有するアセンブルした 123A7 試料は、多分散である。重量平均モル質量は、409kDaである。210~744kDaの範囲にわたるMW種を含有するアセンブルした 123 試料は、多分散である。重量平均モル質量は、408.7kDaである。アセンブルした 123A7 試料中のE2プロトマーの範囲は、5~15であり、123中では4~16であり、各場合で平均は9であった。

【0286】

実施例27：タンパク質のアセンブリ

還元剤DTTを使用して達成することができるアセンブリの範囲を検討するために、複数の独立したアセンブリ実験を実施した。結果は、単量体 123A7 を最大80%の効率でリフォールディングすることができるが、最大71%の 123 をHMW形態にアセンブルすることができることを示す。

20

【0287】

残存単量体種をDTTで処理し、HMW形態にアセンブルさせることができるかどうかを評価した。従前の実験からHMW形態にアセンブルしなかった単量体 123A7 の1mg/mlの溶液を、0.6mMのDTTの最終濃度で37℃で30分間処理した。さらに3ulの100mMのDTTをタンパク質調製物に添加し、混合し、37℃でさらに30分間インキュベートした。次に、1xPBS(pH6.8)250ulを添加し、室温で15分間インキュベートし、さらに2回繰り返した。次に、タンパク質を緩衝液交換し、4mlのAmiconウルトラ遠心式デバイス(30KのMWCO)を使用して濃縮し、500ulの体積が達成されるまで、pH6.8の1xPBSで2回洗浄し、エペンドルフチューブに移した。ゲル濾過クロマトグラフィーを使用して、処理されたタンパク質を分析した。結果は、残存単量体 123A7 の30%が、HMW形態にアセンブルすることができたことを示した(図25)。これは、本方法を使用して、単量体HCVE2タンパク質をHMW形態にアセンブルする能力に制限がなく、且つ実際には、最大100%の単量体形態がアセンブルしたHMW形態に変換することができることを示唆する。

30

【0288】

実施例28：他のタンパク質のアセンブリ

同じ方法を使用して、他の形態のHCVE2をHMW種にアセンブルすることができるかどうかを検討した。実施例25に記載のように、残基384~661を含む単量体H77c E2をDTTで処理し、HMW形態にアセンブルした。ゲル濾過クロマトグラフィーは、およそ40%がHMW形態にアセンブルしていることを明らかにした(図26)。C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569(A7)にCys-Ala変異を含有する残基384~661を含む単量体H77c E2を同じ方法で処理したRBD A7タンパク質を使用して、同じプロセスを実施した。本実施例では、およそ10%をHMW形態にアセンブルした(図27)。

40

【0289】

方法が他のタンパク質から高次種をアセンブルすることに広く適用可能であるかどうかを

50

調べるために、上記方法を使用して A D 8 配列から C 末端膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を除去するように切断された大部分が単量体の H I V エンベロープタンパク質 (E n v) を使用した。D T T での処理及びアセンブリの後、e n v の H M W 種の形成に対応する、ゲル濾過プロファイルのわずかなシフトが観察された (図 2 8)。高次オリゴマーは、広域中和抗体の結合を保持することが示されており、広域中和抗体の産生のための好ましいワクチン候補であるので、高次オリゴマー、特に、三量体の形成は、H I V にとって望ましい (d e T a e y e e t a l . , 2 0 1 5)。このデータは、方法が、単量体または低次種からの高次オリゴマーの形成が抗原産生にとって望ましい他のタンパク質に適用できることを示唆する。

【 0 2 9 0 】

本発明の範囲から逸脱することなく、多くの変更が当業者らには明らかであろう。

【表 4】

表 1 :

| トランスフェクション容量 | 総細胞数 | DNA の量 | DNA 希釈量 (Opti-MEM 中) | 293 フェクチンの量 | 293 フェクチン希釈量 (Opti-MEM 中) |
|--------------|-------------------|-------------|----------------------|-------------|---------------------------|
| 150mL | 1.5×10^8 | 150 μ g | 3mL | 150uL | 3mL |

10

20

30

40

50

【表 5】

表 2 :

| 抗体 | 種 | N11 活性 ¹ | エピトープ ² 種類 ² | 残基 ³ | E2-CD81 ⁴ |
|--------|-----|---------------------|---------------------------------------|---|----------------------|
| 抗 HIS | ウサギ | No | C | C 末端 6×HIS | No |
| HCV1 | ヒト | Yes | C | L413、N415、W420 | Yes |
| AR3A | ヒト | Yes | DC | S424、G523、P525、 G530、D535、V538、 N540 | No |
| AR3B | ヒト | Yes | DC | Q412、T416、G418、 N423、S424、G523、 P525、G530、D535、 N540 | Yes |
| AR3C | ヒト | Yes | DC | S424、H488、G523、 P525、G530、D535、 V538、N540 | Yes |
| AR3D | ヒト | Yes | DC | Q412、S424、G523、 G530、D535 | Yes |
| CBH-4B | ヒト | No | DC | R587-R596 | No |
| CBH-4D | ヒト | No | DC | V536、P612、L615、 R587-R596 | No |
| HC-11 | ヒト | Yes | DC | S424、T425、A426、 L427、N428、C429、 Y527、W529、D535、 V536 | Yes |
| H52 | マウス | No | C | C652 | No |
| H53 | マウス | No | DC | N540、W549 | No |
| 1 | マウス | No | DC | N/D | Yes |
| 7 | マウス | No | DC | N/D | Yes |
| 10 | マウス | Yes | DC | N/D | Yes |
| 12 | マウス | No | DC | N/D | Yes |
| 16 | マウス | No | DC | N/D | Yes |
| 20 | マウス | No | DC | N/D | Yes |
| 24 | マウス | Yes | C | N/D | Yes |
| 60 | マウス | | | N/D | |

¹MAb が少なくとも型特異的中和を誘導する能力。²標的エピトープは、連続的／立体配座非依存性（C）または不連続／立体配座依存性（DC）のいずれかである。³標的アミノ酸残基。測定なしは、N/Dと略す。⁴MAb が E2-CD81 相互作用をブロックする能力。

【表 6】

表 3.

| | 単 量 体 H77 Δ 123 の濃 度 (μ g/ μ L) | DTT の 濃 度 (mM) | インキュベーション時 間 (h) | 時間 (°C) |
|-----|---------------------------------------|-------------------|---------------------|---------|
| 1. | 1 | 0.00 | 24.0 | 37 |
| 2. | 10 | 0.10 | 24.0 | 37 |
| 3. | 5 | 1.00 | 24.0 | 37 |
| 4. | 5 | 0.50 | 24.0 | 37 |
| 5. | 5 | 0.10 | 24.0 | 37 |
| 6. | 5 | 0.10 | 2.0 | 37 |
| 7. | 5 | 0.10 | 0.5 | 37 |
| 8. | 1 | 0.10 | 2.0 | 37 |
| 9. | 1 | 1.00 | 0.5 | 37 |
| 10. | 1 | 0.30 | 0.5 | 37 |
| 11. | 1 | 0.10 | 0.5 | 37 |
| 12. | 1 | 0.05 | 0.5 | 37 |

10

20

【表 7】

表 4.

| | 単 量 体 H77c Δ 123 の 濃 度 (μ g/ μ L) | それぞれ、GSH 及びGSSGの濃 度 (mM) | インキュベーション時 間 (時間) | 温度 (°C) |
|----|--|--------------------------------|----------------------|---------|
| 1. | 1 | 0.0, 0.0 | 24 | 37 |
| 2. | 10 | 2.0, 0.4 | 24 | 37 |
| 3. | 5 | 2.0, 0.4 | 24 | 37 |
| 4. | 1 | 2.0, 0.4 | 24 | 37 |
| 5. | 5 | 2.0, 0.4 | 2 | 37 |

30

40

50

【表 8】

表 5.

| | 単量体 H77c Δ 123 の濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | TCEP の濃度 (mM) |
|----|---|---------------|
| 1. | 1 | 10 |
| 2. | 1 | 50 |
| 3. | 1 | 100 |
| 4. | 1 | 200 |
| 5. | 5 | 50 |
| 6. | 5 | 200 |
| 7. | 1 | 0 |

10

【表 9】

表 6.

| 株 | ラウンド | % 単量体 | % 二量体 | % HMW2 | % HMW1 | 合計% HMW |
|------|------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
| H77 | N/A | 64.90 | 11.67 | 18.90 | 4.23 | 23.13 |
| Con1 | 1 | 25.46 | 28.52 | 40.62 | 5.40 | 46.02 |
| Con1 | 2 | 14.37 | 38.64 | 44.56 | 2.42 | 46.98 |
| S52 | 1 | 35.29 | 19.05 | 36.74 | 8.14 | 44.88 |
| S52 | 2 | 34.81 | 23.59 | 39.77 | 1.79 | 41.56 |

20

30

40

50

【表 10】

表 7.

| 抗体 | NAb 活性 ¹ | エピトープ ² 種類 ² | 対応する株の単量体 Δ 123 に 対する結合 ³ | | | H77cHMW1 Δ 123 に 対する結合 ⁴ | |
|--------|---------------------|---------------------------------------|---|--------|-------|--|-------|
| | | | H77c | Con1 | S52 | Con1 | S52 |
| HCV1 | Yes | C | 1.21 | 1.46 | 0.92 | 2.05 | 2.08 |
| AR3B | Yes | DC | <0.37 | 0.17 | <0.09 | <6.58 | <1.68 |
| AR3C | Yes | DC | 0.18 | 0.13 | 0.54 | 3.92 | 6.17 |
| AR3D | Yes | DC | <0.17 | 0.08 | | 4.73 | N/A |
| CBH-4B | No | DC | <0.27 | <0.24 | <0.62 | <1.00 | <1.00 |
| CBH-4D | No | DC | <0.27 | <0.11 | <0.07 | <1.23 | <1.68 |
| HC-11 | Yes | DC | 0.21 | 0.28 | <0.20 | 6.97 | 1.00 |
| H52 | No | C | <9.53 | <11.19 | <6.14 | 1.47 | 0.56 |
| 10 | Yes | DC | <0.07 | <0.07 | <0.25 | <0.45 | <0.45 |
| 24 | Yes | C | 3.03 | 0.82 | 0.52 | 0.67 | 0.28 |
| 60 | | | <0.47 | <0.57 | — | <1.00 | N/A |

¹MAbs が少なくとも型特異的中和を誘導する能力。²標的エピトープは、連続的／立体配座非依存性（C）または不連続／立体配座依存性（DC）のいずれかである。³単量体 Δ 123 と比較したMAb のHMW1 Δ 123 への結合。元のELISA結果については図 6 Aを参照のこと。青色は、単一希釈点評価（図 6 B）及びELISAでの中止試験の結果を表し、+は、陽性反応性を示し、-は、ごくわずかな反応性を示す。⁴H77c HMW1 Δ 123 と比較したMAb のCon1及びS52 HMW1 Δ 123 への結合。該当なしは、N/Aと略す。

【表 11】

表 8.

| | 単量体 H77c Δ 123 の濃度 (μg/μL) | TCEP の濃度 (mM) | BMOE の濃度 (mM) |
|----|-------------------------------|---------------|---------------|
| 1. | 1 | 10 | 0.2 |
| 2. | 1 | 50 | 0.2 |
| 3. | 1 | 100 | 0.2 |
| 4. | 1 | 200 | 0.2 |
| 5. | 5 | 50 | 0.2 |
| 6. | 5 | 200 | 0.2 |
| 7. | 1 | 0 | 0.2 |

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 9.

| | 単 量 体 H77c Δ 123 の 濃 度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | それぞれ、GSH 及びGSSGの濃 度 (mM) | インキュベーション時間 (時 間) | 温度 (°C) | 単量体対 二量体の 比 |
|----|---|--------------------------------|----------------------|---------|-------------------|
| 1. | 1 | 0.0, 0.0 | 24 | 37 | 4.65 |
| 2. | 10 | 2.0, 0.4 | 24 | 37 | 2.51 |
| 3. | 5 | 2.0, 0.4 | 24 | 37 | 2.99 |
| 4. | 1 | 2.0, 0.4 | 24 | 37 | 6.89 |
| 5. | 5 | 2.0, 0.4 | 2 | 37 | 3.36 |

10

【表 1 3】

表 1 0.

| H77c Δ 123 | 単量体の% | 多量体の% | 単量体対多量体 の比 |
|------------|-------|-------|---------------|
| 未処理 | 87.52 | 2.59 | 33.82 |
| GSH/GSSG | 52.68 | 43.13 | 1.22 |

20

【表 1 4】

表 11.

| | 単 量 体 H77c Δ 123 の 濃 度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | DTT の 濃 度 (mM) | インキュベーション時間 (時 間) | 温度 (°C) | 単量体対 二量体の 比 |
|-----|---|-------------------|----------------------|---------|-------------------|
| 1. | 1 | 0.00 | 24.0 | 37 | 3.41 |
| 2. | 10 | 0.10 | 24.0 | 37 | 3.02 |
| 3. | 5 | 1.00 | 24.0 | 37 | 2.35 |
| 4. | 5 | 0.50 | 24.0 | 37 | 2.32 |
| 5. | 5 | 0.10 | 24.0 | 37 | 2.55 |
| 6. | 5 | 0.10 | 2.0 | 37 | 2.66 |
| 7. | 5 | 0.10 | 0.5 | 37 | 1.91 |
| 8. | 1 | 0.10 | 2.0 | 37 | 2.16 |
| 9. | 1 | 1.00 | 0.5 | 37 | 1.51 |
| 10. | 1 | 0.30 | 0.5 | 37 | 1.45 |
| 11. | 1 | 0.10 | 0.5 | 37 | 1.33 |
| 12. | 1 | 0.05 | 0.5 | 37 | 1.95 |

30

40

50

【表 15】

表 12.

| H77c Δ123 | 単量体の% | 多量体の% | 単量体対多量体の比 |
|-----------|-------|-------|-----------|
| 未処理 | 87.52 | 2.59 | 33.82 |
| DTT | 69.51 | 28.84 | 2.41 |

【表 16】

表 13.

| 還元剤 | リフォールディング方法 | 抗原 | 分析方法 (SDS-PAGE 及び/またはゲル濾過) | リフォールディングしたタンパク質の生成 (Yes/No) |
|------------------|---------------------------------|------|-------------------------------|---------------------------------|
| 0 ～ 500mM の TCEP | 0.2mM の BMOE 架橋剤 | Δ123 | SDS-PAGE | No |
| 2.00mM の GSH | 酸化還元シャフリンクシステム w. 0.4mM GSSG | Δ123 | SDS-PAGE 及びゲル濾過 | Yes |
| 0～1.00mM の DTT | 徐々に希釈すること | Δ123 | SDS-PAGE 及びゲル濾過 | Yes |

10

20

30

40

50

【表 17】

表 14.

| 還元剤 | 抗原 | 溶出時間(分) | %リフォールディング ^a | 利用可能な抗原性の特性決定(Yes/No) |
|---------------------|-------------------------------|---------|-------------------------|-----------------------|
| 2.0mM の GSH | Δ 123 | 69.00 | 43.13 | No |
| 0.3mM の DTT の 1 ヒット | Δ 123 | 59.44 | 50.15 | No |
| 0.3mM の DTT の 2 ヒット | Δ 123 | 54.48 | 62.81 | Yes |
| | Δ 123(反 復 1) | 53.93 | 50.13 | No |
| | D123w. フォテアセ ^b 阻害剤 | 54.55 | 52.67 | No |
| | RBD | 57.77 | 39.75 | No |
| | ALA7 Δ 123 | 52.97 | 47.41 | Yes |
| | ALA7RBD | 59.46 | 10.38 | No |
| 0.3mM の DTT の 3 ヒット | Δ 123 | 53.95 | 54.47 | No |

10

20

【表 18】

表 15.

| 群の名称 | 抗原# | 動物の数 |
|------|-----------------|------|
| 1-F | 天然 Δ 123HMW | 8 |
| 2-F | アセンブルした Δ 123 | 8 |
| 3-F | アセンブルした Δ 123A7 | 8 |
| 4-F* | 単量体 Δ 123 | 4 |
| 5-F* | 単量体 Δ 123A7 | 4 |
| 6-F | 無抗原 | 6 |

30

3 週間隔で 4 回、等量の A d d a v a x と共に投与された 100 μg の抗原。最終免疫化の 2 週間後の最終採血。

40

*データの分析のために、群 4 及び 5 からの結果を組み合わせ、動物の均等な大きさの群を作成した。

50

【表 1 9】

表 1 6 .

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|-------|-------|-------|---------|
| 幾何平均 | 30162 | 41866 | 28686 | 21756 |
| 平均 | 34701 | 44460 | 32444 | 24898 |

【表 2 0】

表 1 7 .

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|------|------|------|---------|
| 幾何平均 | 3756 | 2176 | 1339 | 232 |
| 平均 | 4588 | 5289 | 1763 | 344. 4 |

10

【表 2 1】

表 1 8 .

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|--------------|------|-------|------|---------|
| 幾何平均 | 3051 | 4627 | 1888 | 1191 |
| 平均 | 3638 | 5413 | 2150 | 3599 |
| 最小値 | 600 | 1800 | 900 | 90 |
| 25%の百分位 数 | 2125 | 3250 | 1200 | 400 |
| 中央値 | 4500 | 4250 | 1950 | 1000 |
| 75%の百分位 数 | 5000 | 8000 | 2400 | 4375 |
| 最大値 | 5000 | 12000 | 5000 | 18000 |

20

30

【表 2 2】

表 1 9 .

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|--------|--------|--------|---------|
| 幾何平均 | 483. 3 | 439. 8 | 100. 4 | 26. 24 |
| 平均 | 587. 5 | 1100 | 162. 5 | 52. 5 |

40

【表 2 3】

表 2 0 .

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|--------|--------|--------|---------|
| 幾何平均 | 308. 3 | 246. 4 | 188. 1 | 238. 2 |
| 平均 | 326. 3 | 261. 3 | 215 | 307. 5 |

50

【表 2 4】

表 2 1.

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|-------|-------|-------|---------|
| 幾何平均 | 39.92 | 51.36 | 41.33 | 39.94 |
| 平均 | 41.25 | 58.75 | 45 | 46.25 |

【表 2 5】

表 2 2.

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|-------|-------|-------|---------|
| 幾何平均 | 692.1 | 266.6 | 342.6 | 278.6 |
| 平均 | 773.1 | 361.7 | 484.6 | 430.6 |
| 最小値 | 220.3 | 43.31 | 102.1 | 20 |
| 最大値 | 1231 | 627.5 | 1521 | 1122 |

10

【表 2 6】

表 2 3.

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|-----|-----|-----|---------|
| 幾何平均 | 118 | 104 | 79 | 45 |
| 平均 | 121 | 106 | 81 | 47 |
| 最小値 | 55 | 54 | 47 | 21 |
| 最大値 | 195 | 191 | 129 | 155 |

20

【表 2 7】

表 2 4.

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|-----|-----|-----|---------|
| 幾何平均 | 18 | 20 | 12 | 14 |
| 平均 | 19 | 20 | 12 | 14 |
| 最小値 | 10 | 16 | 10 | 10 |
| 最大値 | 35 | 27 | 17 | 39 |

30

【表 2 8】

表 2 5.

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|-----|-----|-----|---------|
| 幾何平均 | 46 | 50 | 38 | 33 |
| 平均 | 48 | 51 | 39 | 35 |
| 最小値 | 17 | 26 | 28 | 14 |
| 最大値 | 87 | 102 | 56 | 110 |

40

50

【表 2 9】

表 2 6 .

| | 1-F | 2-F | 3-F | 4-F+5-F |
|------|-----|-----|-----|---------|
| 幾何平均 | 119 | 207 | 222 | 353 |
| 平均 | 124 | 213 | 228 | 362 |
| 最小値 | 46 | 71 | 105 | 191 |
| 最大値 | 303 | 432 | 814 | 756 |

10

【表 3 0】

表 2 7 .

| | 保 持 時 間 (分) | モル質量の範囲 kDa | E2 範 囲 の単位 | モル質量 kDa Mw | E2 の平均 単位 |
|---------|----------------|----------------|---------------|----------------|--------------|
| Δ 123A7 | 12~14.5 | 674.8~262.2 | 5~15 | 408.7 | 9 |
| Δ 123 | 12.5~15.5 | 744~210 | 4~16 | 408.7 | 9 |

20

【 0 2 9 1】

参考文献

Alhammad et al (2015) J Virol . 2015 ; 89 (24) : 12245 - 61 . doi : 10 . 1128 / JVI . 02070 - 15 . PubMed PMID : 26378182 ; PubMed Central PMCID : PMC4665232 .

Altman et al (1996) Science 274 (5284) : 94 - 96 .
Broering et al (2009) J Virol . 2009 ; 83 (23) : 12473 - 82 . Epub 2009 / 09 / 18 . doi : 10 . 1128 / JVI . 01138 - 09 JVI . 01138 - 09 [pii] . PubMed PMID : 19759151 ; PubMed Central PMCID : PMC2786766 .
Connor et al (1995) Virology . 206 (2) : 935 - 44 . doi : 10 . 1006 / viro . 1995 . 1016 . PubMed PMID : 7531918 .

30

de Taeye et al (2015) Cell ; 163 (7) : 1702 - 15 . doi : 10 . 1016 / j . cell . 2015 . 11 . 056 . PubMed PMID : 26687358 ; PubMed Central PMCID : PMC4732737 .

Dolton et al (2015) Immunolog . y 146 (1) : 11 - 22 /

40

Drummer et al (2003) FEBS Lett . 546 (2 - 3) : 385 - 90 . PubMed PMID : 12832074 .

Flint et al (1999) J Virol . 73 (8) : 6235 - 44 . PubMed PMID : 10400713 ; PubMed Central PMCID : PMC PMC112700 .

He et al (1995) J Virol . 69 (7) : 4587 - 92 . PubMed PMID : 7769729 .

Keck et al (2012) PLoS Pathog . 8 (4) : e1002653 . Epub 2012 / 04 / 19 . doi : 10 . 1371 / journal . ppa

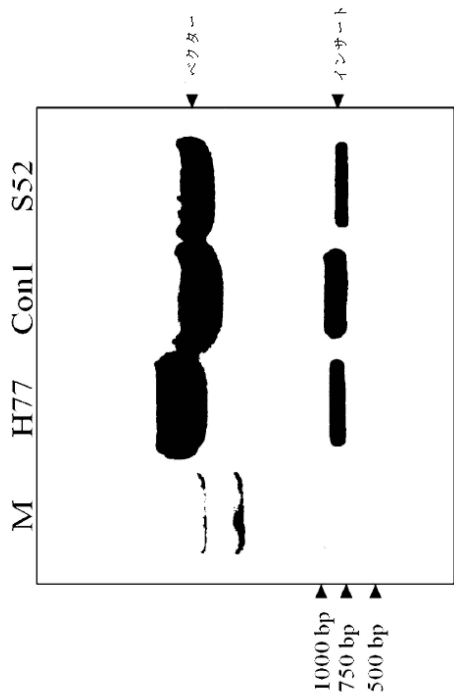
50

- t . 1 0 0 2 6 5 3 P P A T H O G E N S - D - 1 1 - 0 2 1 6 2 [p i i] . P u b
Med PMID: 2 2 5 1 1 8 7 5 ; P u b M e d C e n t r a l P M C I D : P M
C 3 3 2 5 2 1 6 .
- Khan et al (2014) Nature . 2014 . doi : 10 . 1038 / n
ature13117 . PubMed PMID: 2455313 .
- Krey et al (2013) 9 (5) : e1003364 . doi : 10 . 1371
/ journal . ppat . 1003364 . PubMed PMID: 236967
37 ; PubMed Central PMCID: PMC3656090 .
- Keck et al (2013) J Virol . 2013 ; 87 (1) : 37 - 51 .
Epub 2012 / 10 / 26 . doi : 10 . 1128 / JVI . 01941 - 12 10
JVI . 01941 - 12 [pii] . PubMed PMID: 23097455 ; P
ubMed Central PMCID: PMC3536422 .
- Law et al (2008) Nat Med . 2008 ; 14 (1) : 25 - 7 . E p
ub 2007 / 12 / 08 . doi : nm1698 [pii]
10 . 1038 / nm1698 . PubMed PMID: 18064037 .
- McCaffrey et al (2007) J Virol 81 : 9584 - 9590 .
- Morin et al (2012) PLoS Pathog . 8 (8) : e100289
5 . Epub 2012 / 09 / 07 . doi : 10 . 1371 / journal . pp
at . 1002895 P P A T H O G E N S - D - 12 - 01073 [pii] . Pub
Med PMID: 22952447 ; PubMed Central PMCID: PM 20
C3431327 .
- Owsianka et al (2001) J Gen Virol . 82 (Pt 8) :
1877 - 83 . Epub 2001 / 07 / 18 . PubMed PMID: 11457
993 .
- Owsianka et al (2005) J Virol . 79 (17) : 11095 -
104 . PubMed PMID: 16103160 .
- Pantua et al (2013) J Mol Biol . 2013 ; 425 (11)
: 1899 - 914 . Epub 2013 / 03 / 06 . doi : 10 . 1016 / j .
jmb . 2013 . 02 . 025 S0022 - 2836 (13) 00127 - 7 [pi
i] . PubMed PMID: 23458406 . 30
- Petrovsky et al (2004) Immunol Cell Biol . Oc
t ; 82 (5) : 488 - 96 .
- Sabo et al (2011) J Virol . 2011 ; 85 (14) : 7005 -
19 . Epub 2011 / 05 / 06 . doi : 10 . 1128 / JVI . 00586
- 11 JVI . 00586 - 11 [pii] . PubMed PMID: 2154349
5 ; PubMed Central PMCID: PMC3126585 .
- Tarr et al (2006) Hepatology . 43 (3) : 592 - 601 .
Epub 2006 / 02 / 24 . doi : 10 . 1002 / hep . 21088 . Pu
bMed PMID: 16496330 .
- Viethier et al (2017) Hepatology . 2017 ; 65 (4)
: 1117 - 31 . doi : 10 . 1002 / hep . 28989 . PubMed PM
ID: 27997681 ; PubMed Central PMCID: PMCPMC54
08392 . 40
- Vollers et al (2008) Immunology . 123 (3) : 305 -
313 .
- Wilson-Welder et al (2009) J Pharm Sci . Apr ;
98 (4) : 1278 - 316 . doi : 10 . 1002 / jps . 21523 .
- Zhang et al (2009) Proc Natl Acad Sci U S A .
106 (18) : 7537 - 41 . Epub 2009 / 04 / 22 . doi : 0902
749106 [pii] 10 . 1073 / pnas . 0902749106 . PubMe 50

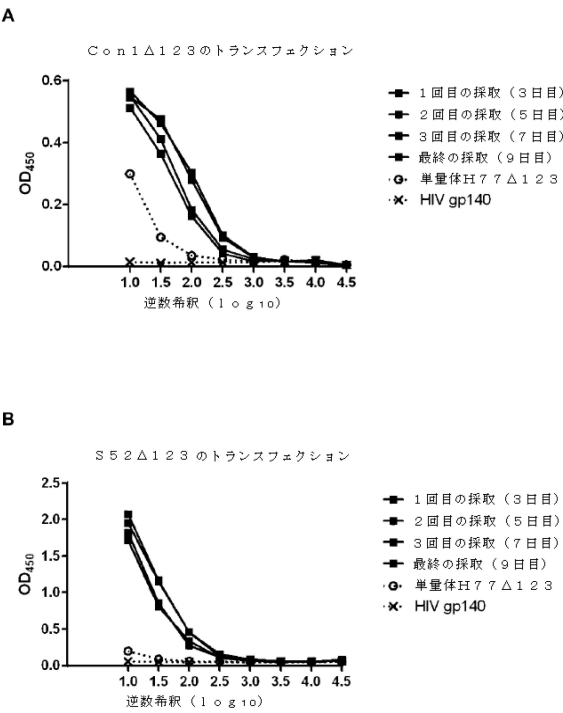
d PMID: 19380744; PubMed Central PMCID: PMC 2670884.

【図面】

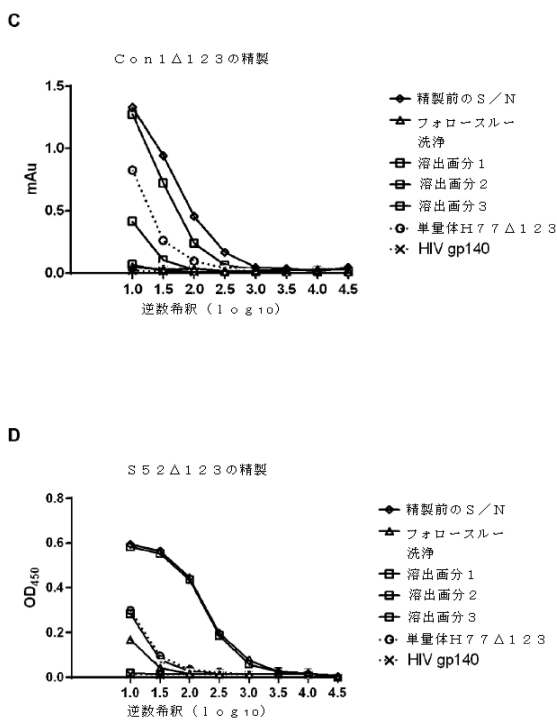
【図 1】



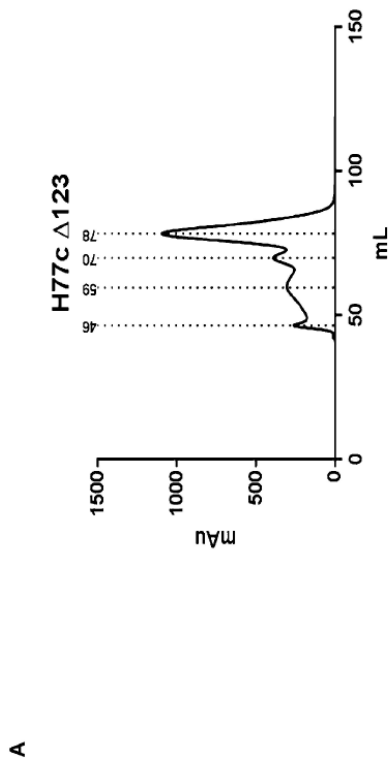
【図 2 - 1】



【図 2 - 2】



【図 3 - 1】



10

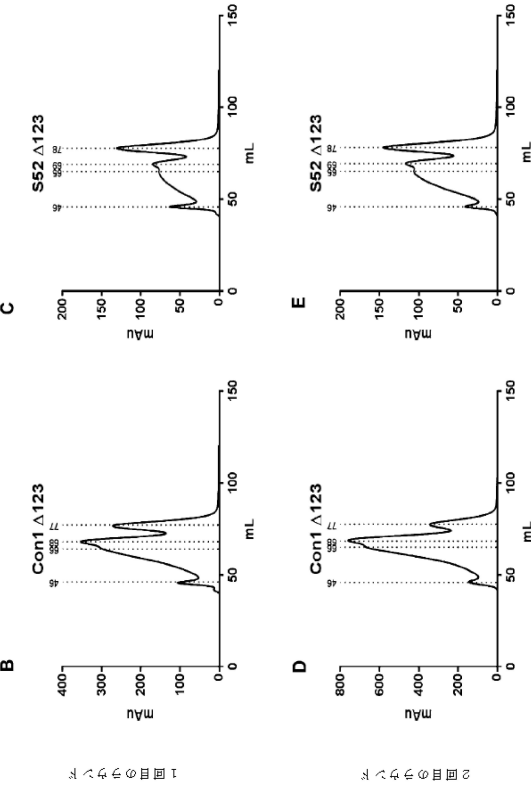
20

30

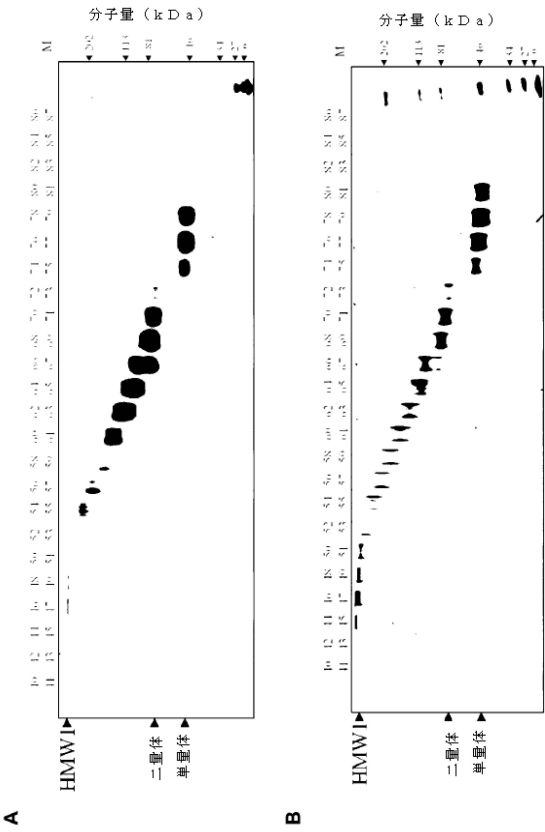
40

50

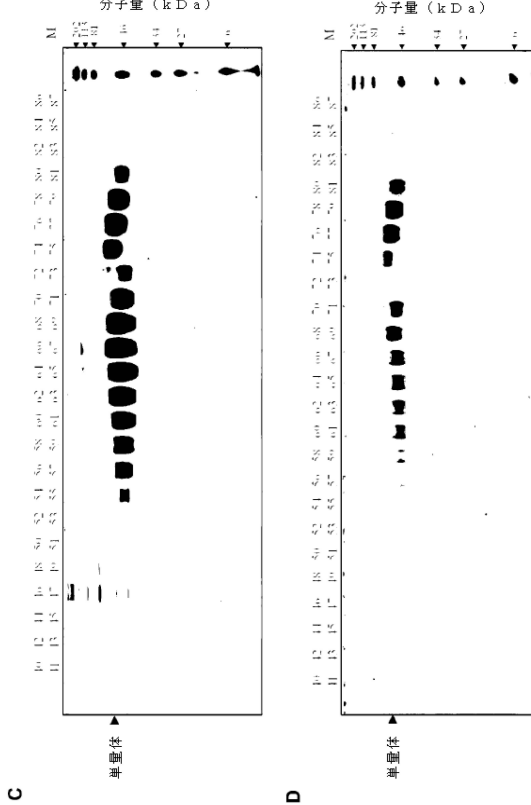
【図 3 - 2】



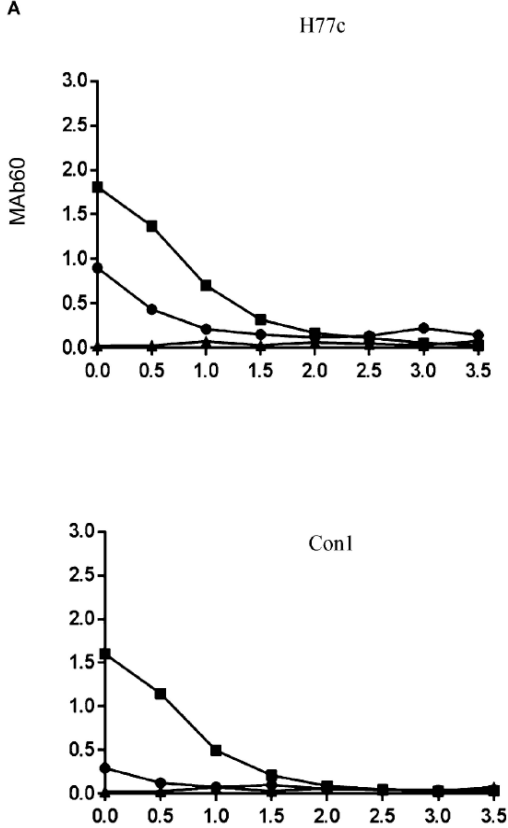
【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 5 A】



10

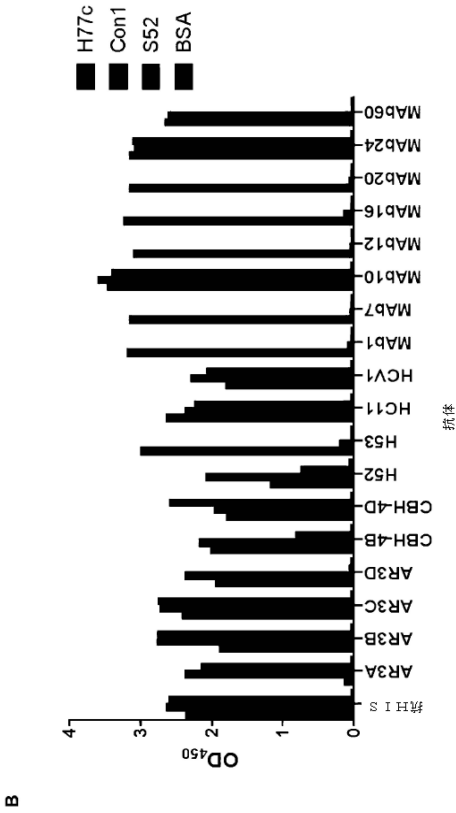
20

30

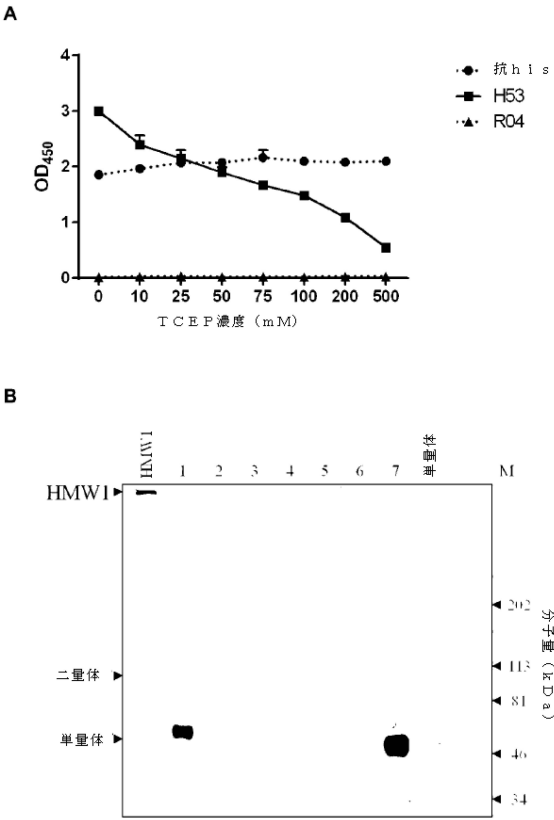
40

50

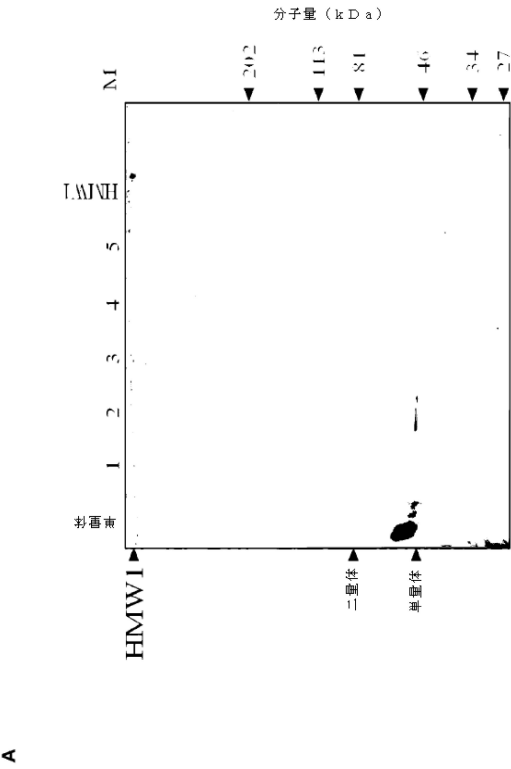
【 図 5 B 】



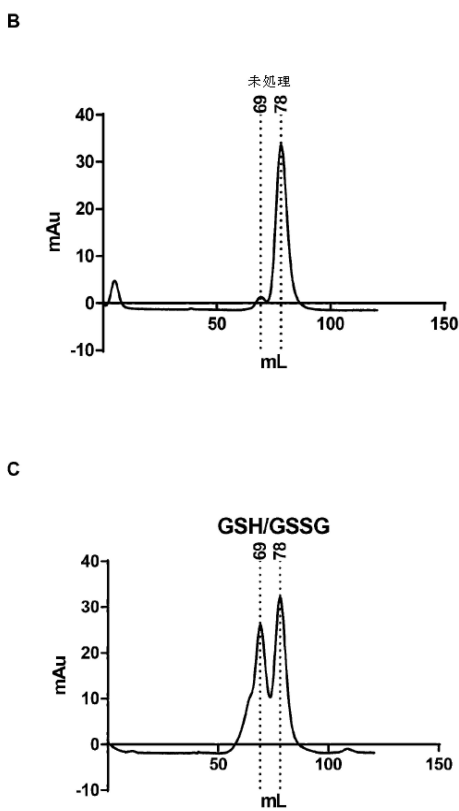
【 図 6 】



【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】



10

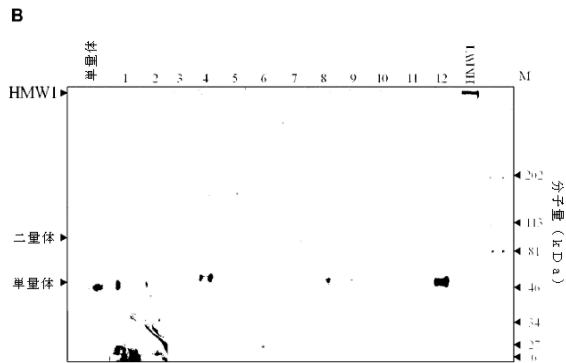
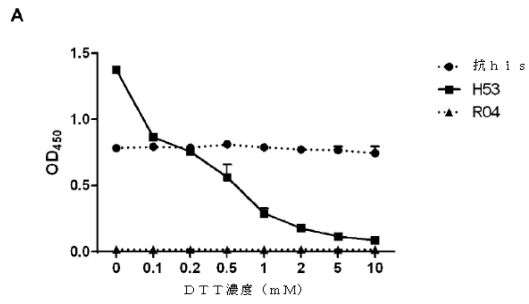
20

30

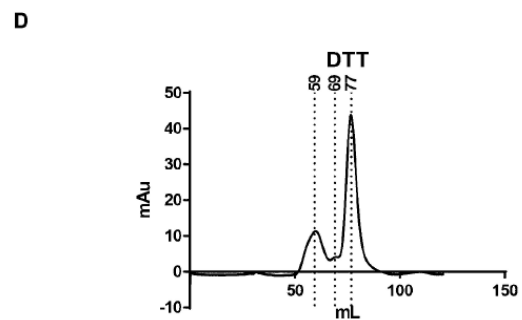
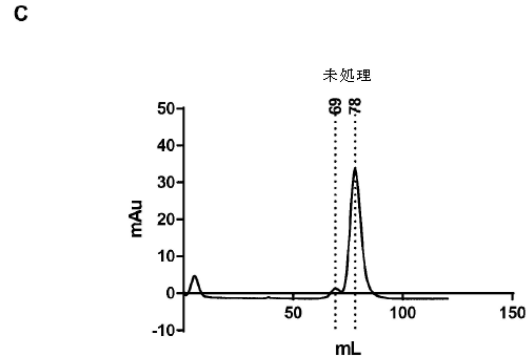
40

50

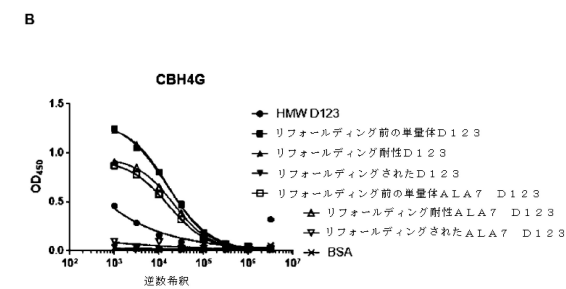
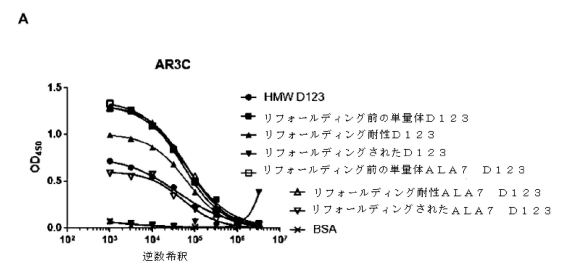
【図 8 - 1】



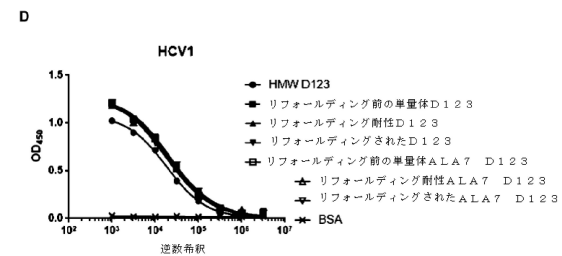
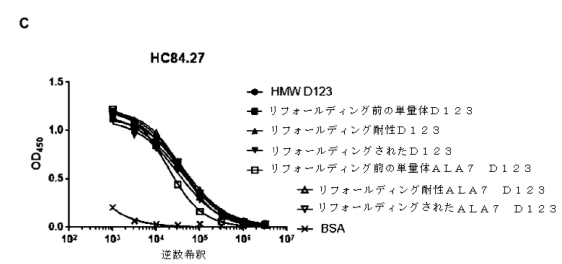
【図 8 - 2】



【図 9 - 1】



【図 9 - 2】



10

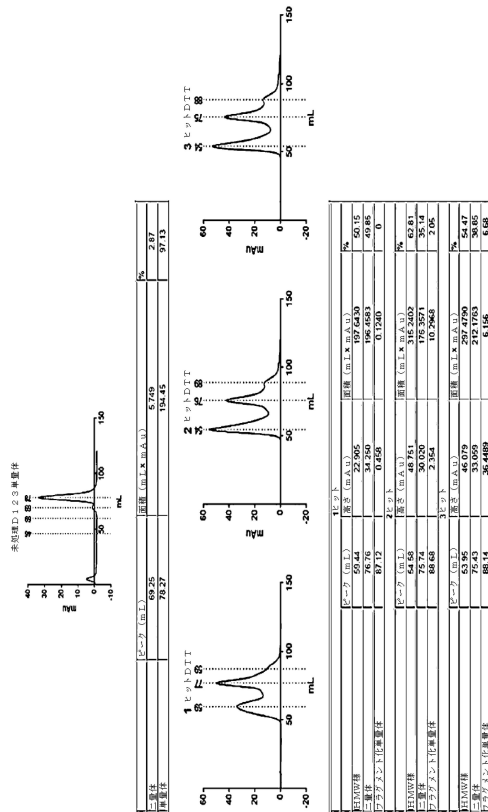
20

30

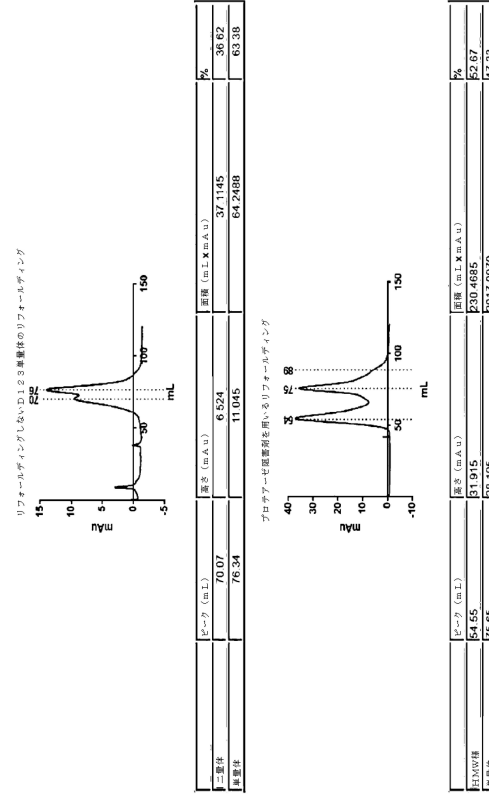
40

50

【図 1 0】



【図 1 1】



【図 1 2】

ED43 YFSMGNWAKVILVLFAGVDAITVGGALVGRSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
H77c YFSMGNWAKVILVLFAGVDAITVGGALVGRSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
SA13 YASAGNWKVILVLFAGVDAITVGGALVGRSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
S52 YFSMGNWAKVILVLFAGVDAITVGGALVGRSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
EUHK2 YFSMGNWAKVILVLFAGVDAITVGGALVGRSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
QC69 YFSMGNWAKVILVLFAGVDAITVGGALVGRSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
J6 YFSMGNWAKVILVLFAGVDAITVGGALVGRSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW

ED43 HINRTALNCNDSINTGFLASLYTHKFNSSGCPRLASGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
H77c HINRTALNCNDSINTGFLASLYTHKFNSSGCPRLASGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
SA13 HINRTALNCNDSINTGFLASLYTHKFNSSGCPRLASGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
S52 HINRTALNCNDSINTGFLASLYTHKFNSSGCPRLASGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
EUHK2 HINRTALNCNDSINTGFLASLYTHKFNSSGCPRLASGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
QC69 HINRTALNCNDSINTGFLASLYTHKFNSSGCPRLASGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
J6 HINRTALNCNDSINTGFLASLYTHKFNSSGCPRLASGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW

ED43 LNSRPPHGAWFGCTWMNSTGFTKCGAPPCVLTGCGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
H77c LNSRPPHGAWFGCTWMNSTGFTKCGAPPCVLTGCGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
SA13 LNSRPPHGAWFGCTWMNSTGFTKCGAPPCVLTGCGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
S52 LNSRPPHGAWFGCTWMNSTGFTKCGAPPCVLTGCGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
EUHK2 LNSRPPHGAWFGCTWMNSTGFTKCGAPPCVLTGCGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
QC69 LNSRPPHGAWFGCTWMNSTGFTKCGAPPCVLTGCGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW
J6 LNSRPPHGAWFGCTWMNSTGFTKCGAPPCVLTGCGCLVSTAGLNLVSSGKQNLQINSNGSW

ED43 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
H77c YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
SA13 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
S52 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
EUHK2 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
QC69 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
J6 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN

ED43 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
H77c LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
SA13 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
S52 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
EUHK2 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
QC69 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
J6 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA

【図 1 3】

Δ123A1a7ロドン最適化マクロド配列
GGTACCGCTAGCGCCACCATGAACCCCTGCTGATCCTGACCTTTGTGGCCGCTGCCCTGGCCGAGACAC
ACGAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGCTGGCACATCAACAGCACCCTGAACCTGCAACG
AGAGCTGACACAGGCTGGCTGGCCGCGCTGTTACACAGCAACAGTTCAACAGCAGCGAGCCGCCG
AGAGACTGGCTCTTGTGGATCTTCTGGCGCTGGCAGTACCCCTAGACCTTGTGAATCGTGCCCG
CAAGAGCTGGCTCTTGTGGATCTTCTGGCGCTGGCAGTACCCCTAGACCTTGTGAATCGTGCCCG
GGCGCCCTACCTATTCTGGCGCGCCAGCAGCAGCTGTTGCTGCTGAACAAACCCCGGCCACCC
TGGCAATTTGTTGCTGCTGACCTGGATGAACCTCAGCCGCTACCAAAAGTGTGGCGCTCTCTGCTG
CGGATCCAGCGGAGCAGCTACCGACGCTTCAAGAAAGCAGCCGAGGCACTACTAGAGCCGATC
TGCCTCTGGATCAACCCAGATGATGCTGGATGACCTACCCCTAGCCGCTGTGGATCATCTCTGACCATC
AGCTACCATCTTCAAGTGGGATGCTGCTGGCGCGCTGGAAACAGACTGGAAAGCCGCTGCAAC
TGGACCAAGGCGAGAGACCCGACCTGGAAGATCGGACAGAGCGAGCACCACCATCACCACCTG
ATGACTCGAG

Δ123A1a7タンパク質配列
ETHNQILQIN TNGSWHINST ALNCNDSINT GWLAGLYQH FKNSSGAPER LASCSSGAW
HYPPRCGIV PAKSVCGPVY CFTSPVVVG TDRSGAPTY SWGANDTDV FLNNTRPLG
NWFCTWMS TGFTKVCAP PAGSSGAPD AFRKHPEATY SRAGSGPWT PRCMVDYPYR
LWHPCTINY TIKVRMYVG GVEHRELAAC NWTGERADL EDRDRSE

ED43 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
H77c YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
SA13 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
S52 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
EUHK2 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
QC69 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN
J6 YACGSGFWLTPRCLVDYPRLMHYPCTVNTFKVEMTVGGVHRLEACNNTTRGRCN

ED43 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
H77c LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
SA13 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
S52 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
EUHK2 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
QC69 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA
J6 LEDRDRSELPLLSHTTQWAILPCSFTEPALSTGLIHLHQNIVDQVLYLGVSSVSWA

【 図 1 4 - 1 】

| | | |
|----------------|-------------|-----|
| AF009606 | Fulllength2 | 60 |
| AF009606_E2661 | | 0 |
| WT_E2661 | | 0 |
| Delta123 | | 0 |
| AF009606 | Fulllength2 | 120 |
| AF009606_E2661 | | 0 |
| WT_E2661 | | 0 |
| Delta123 | | 0 |
| AF009606 | Fulllength2 | 180 |
| AF009606_E2661 | | 0 |
| WT_E2661 | | 0 |
| Delta123 | | 0 |
| AF009606 | Fulllength2 | 240 |
| AF009606_E2661 | | 0 |
| WT_E2661 | | 0 |
| Delta123 | | 0 |
| AF009606 | Fulllength2 | 300 |
| AF009606_E2661 | | 0 |
| WT_E2661 | | 0 |
| Delta123 | | 0 |

【 図 1 4 - 3 】

| | | |
|----------------|-------------|-----|
| AF009606 | Fulllength2 | 660 |
| AF009606_E2661 | | 277 |
| WT_E2661 | | 277 |
| Delta123 | | 226 |
| AF009606 | Fulllength2 | 720 |
| AF009606_E2661 | | 337 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |
| AF009606 | Fulllength2 | 780 |
| AF009606_E2661 | | 363 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |
| AF009606 | Fulllength2 | 840 |
| AF009606_E2661 | | 363 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |

14 (続き)

【 図 1 4 - 2 】

| | | |
|----------------|-------------|-----|
| AF009606 | Fulllength2 | 360 |
| AF009606_E2661 | | 0 |
| WT_E2661 | | 0 |
| Delta123 | | 0 |
| AF009606 | Fulllength2 | 420 |
| AF009606_E2661 | | 37 |
| WT_E2661 | | 37 |
| Delta123 | | 15 |
| AF009606 | Fulllength2 | 480 |
| AF009606_E2661 | | 97 |
| WT_E2661 | | 97 |
| Delta123 | | 56 |
| AF009606 | Fulllength2 | 540 |
| AF009606_E2661 | | 157 |
| WT_E2661 | | 157 |
| Delta123 | | 113 |
| AF009606 | Fulllength2 | 600 |
| AF009606_E2661 | | 217 |
| WT_E2661 | | 217 |
| Delta123 | | 166 |

【 図 1 4 - 4 】

| | | |
|----------------|-------------|------|
| AF009606 | Fulllength2 | 900 |
| AF009606_E2661 | | 363 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |
| AF009606 | Fulllength2 | 960 |
| AF009606_E2661 | | 363 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |
| AF009606 | Fulllength2 | 1020 |
| AF009606_E2661 | | 363 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |
| AF009606 | Fulllength2 | 1080 |
| AF009606_E2661 | | 363 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |
| AF009606 | Fulllength2 | 1140 |
| AF009606_E2661 | | 363 |
| WT_E2661 | | 278 |
| Delta123 | | 227 |

14A

14

14 (続き)


10

20

30

40

50

【 1 4 - 5】


| | |
|------|--|
| 1200 | PVRRKSGSLLSPRFISYLGSSGGPLCPAGHAGLFRAAVCTRGVAKAVDFIPVEN |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1260 | LETRRSPVFTDMSFPAYVTSQVAHLHAPTSGSKSKVPAAVAAQGVKVLVNFVAA |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1320 | TUGGAYMSKAGVDPNIRTVITTTGSEPTVSYGKFIANGCGGAYDIIICDECHS |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1380 | TQTSILGIGTVLDAQTAGRLVVLATATPFGSVTVSHNIEVALTTGFIFFYKAI |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1440 | PLEVTKGZRHLPCHSKKCCDELANKLVGINNAVYRGLDVSVPTSGVVVVSTAL |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |

14A (続き)

【 1 4 - 6】

| | |
|------|---|
| 1500 | MTGTSQPSFVLDKNTCVTQTVDSLDPTFTTETTLTPQDANSYQRRGTGKPGIYR |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1560 | FVAFGRPSGMSFSSVLCEYDAGCAWVELTFAETTVRLRAYNTPGLPYQDHLFEWEG |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1620 | VFTGLTHIDAHFTLSQTKSGENFFYIAYQATVCARQAQPPSWQDQWKKCJIKLKPTJHG |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1680 | PTLLYRLGAVONIVLTTHPIIKYINTCKSADLEWVTSRWLVGVLAALAAVCLSTGV |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |

14A (続き)

【 1 4 - 7】

| | |
|------|--|
| 1740 | VIVGRIVLSGKPAIIPDREVLVQEFDEMECSQHLFYIEQGMFLAFQFKQALGLIQTAS |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1800 | ROAEVITPAVTNQKLEVENAKIMNFI SGIOVLAGLSTLGNPAISLMAFTAAVTSP |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1860 | LTGQTLFNLIGWVAAQIAAFQATAFVGAAGAGISVGLGKVLVDIAGVGAVA |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1920 | GALVAFKIMSCEVPSTEDLVNLLPALLSGALVGVGVCAALIKRHV/GHGEGVQWNRLL |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 1980 | AFASRGNHVSPTHVPESDAARVTAISSLVTPQLLRHLOWISSECTPCSSMLRDI |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |

14B

【 1 4 - 8】

| | |
|------|--|
| 2040 | WMIWELVSDFKTMIKAKIMPOLPGIFVYSCQGVYGRWKGDIHHTCHGAEIIGHVK |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 2100 | NGTMRIVGRTCRNMSGTFPINAYTTGCTFLPAPIYKFAIMVSAEYVIRRVGDFH |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 2160 | YVSGMTTUNLKCFQIPSPHEFFTELDGVLHRFAPCKPLLRNVSFNVGLHEYVPVGSOL |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 2220 | PCPEPDAVLSMLTDFSHLTAAAGRLARGSPMSASSASQISLAKTCATANH |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |
| 2280 | SPDAELIENLLRWQENGNITVISENVVILDFDLVAEDEHVSFPAETIRKSR |
| 363 | ----- |
| 278 | ----- |
| 278 | ----- |
| 227 | ----- |

14B (続き)

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123

AF009606
AF009606_FulllengthE2
AF009606_E2661
WT_E2661
Delta123


10

20

30

40

50


【 1 4 - 9】

| | |
|------|--|
| 2340 | FAHALPYWRPYNPFIETWKKPDYEPYVHGCLPPHSPVPPPRKKKTYVLTSTLL |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |
| 2400 | STALAEATKSGSSSTSGITGDNWTTTSEDPASGCPDSDSVESYSMEPLEGEGDPDL |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

| | |
|------|---|
| 2460 | SDGSMSTVSSGADTEVDCSSMSYMTGALVTPCAAEQKIPINALSNSLLRHHNLVYST |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

| | |
|------|--|
| 2520 | TSRSACQRKRVTFDLQVLDSHYQDVLEKVAASKVANKLLSVIEACSLTFPHSAKSK |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

14B (続き)

【 1 4 - 1 0】

| | |
|------|--|
| 2580 | FGYGAIVKCHAKVAHINSVKDLLEDSVTPIDTITAKNEVFCVQPKGKPKARLLI |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |


| | |
|------|--|
| 2640 | VFDGLVRYCEKIALYDVWSKLEIAWGSYGFQYSPQRVEFTVQAWKSKTNGFSYD |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

| | |
|------|---|
| 2700 | TRGFDSVTESDITETFAIYQCCDLDPQARVAIKSLTERLYVGGPIITNSGKNGCYRRCR |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

| | |
|------|--|
| 2760 | ASSVLTTSGNTJTYIKARACRAAGLQDCTMLYCGEDDLVIVICESAGVDEASRAFT |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

| | |
|------|---|
| 2820 | EAMTRYSAFPDGPQPYDLELITSCSSNVSVANDGAGKRVYITFDPTTPIAANETA |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

14C


【 1 4 - 1 1】

| | |
|------|--|
| 2880 | RHFPVNSLGNINFAFTLWARKLTKCHEFSVLIARDGLEALNCEIYGRCSYIEPLDLP |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |
| 2940 | PIIORLHGI.SAFSLHSYSFGEINRVACLRKILGYPFLEMRHRSVRARLLSRGGRMAI |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

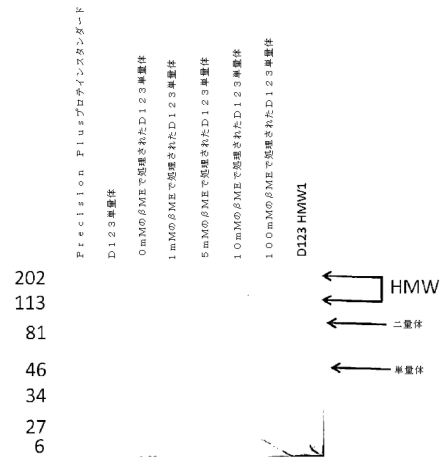
| | |
|------|--|
| 3000 | CGKYLENNAVRKTLKLTPIAMAGRLDLSGNETAGYSGGDIYHSVSHARPWFECILLIA |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

| | |
|------|--------------|
| 3011 | AGVGIIYLENRR |
| 363 | ---- |
| 278 | ---- |
| 278 | ---- |
| 227 | ---- |

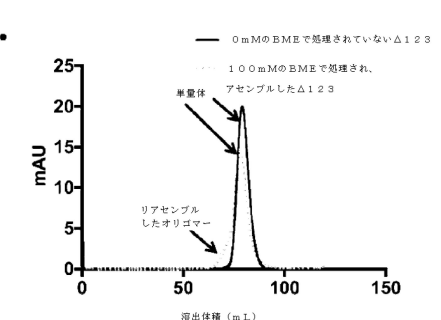
14C (続き)

【 1 5】

A.



B.



10

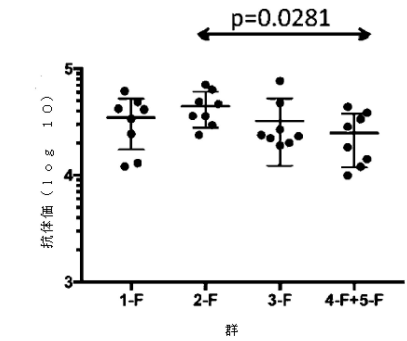
20

30

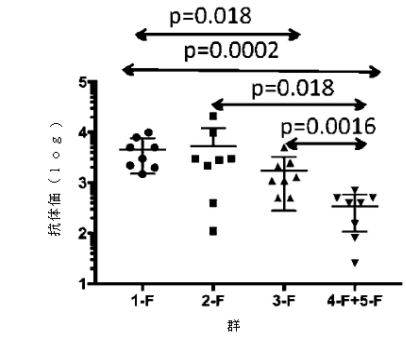
40

50

【図 16】

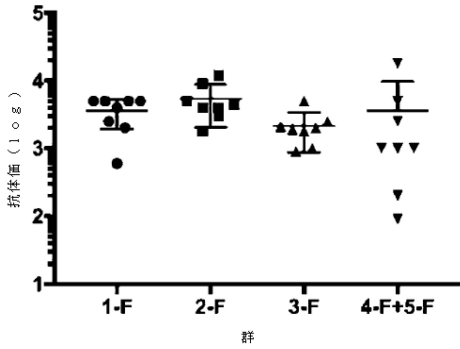


【図 17】

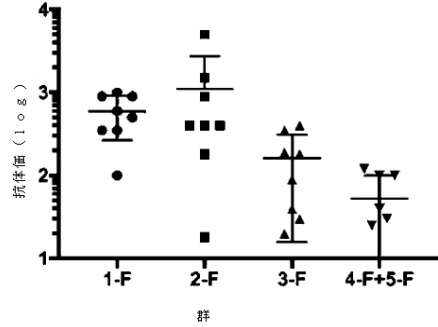


10

【図 18】



【図 19】



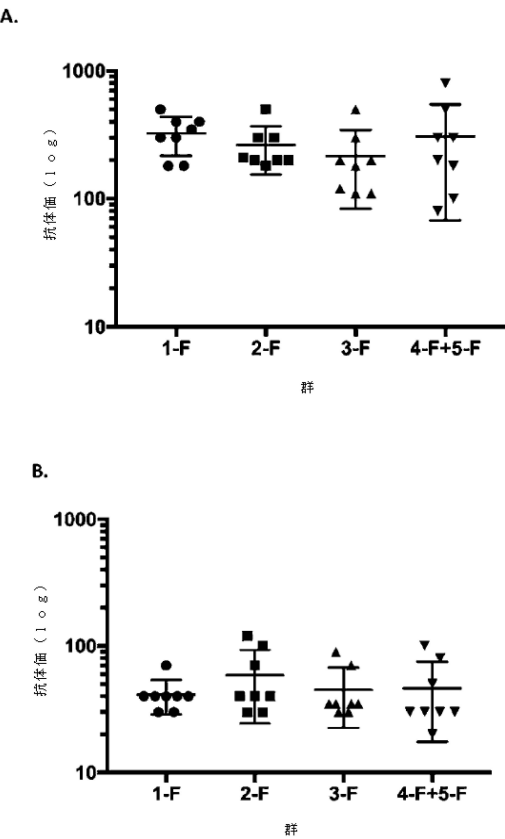
20

30

40

50

【図 2 0】



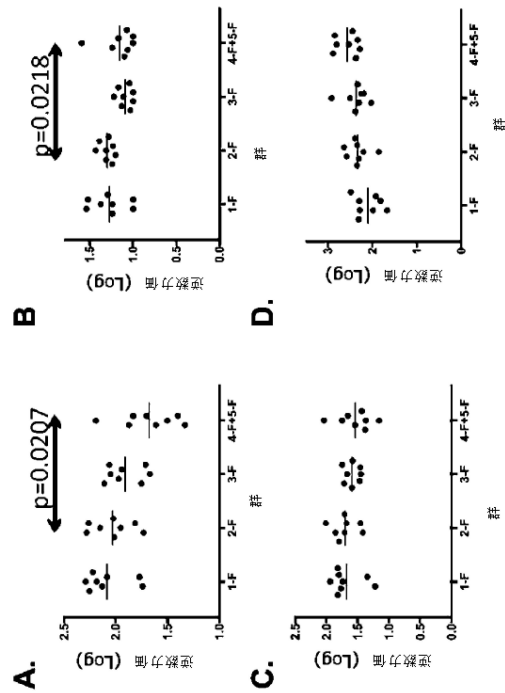
【図 2 1】



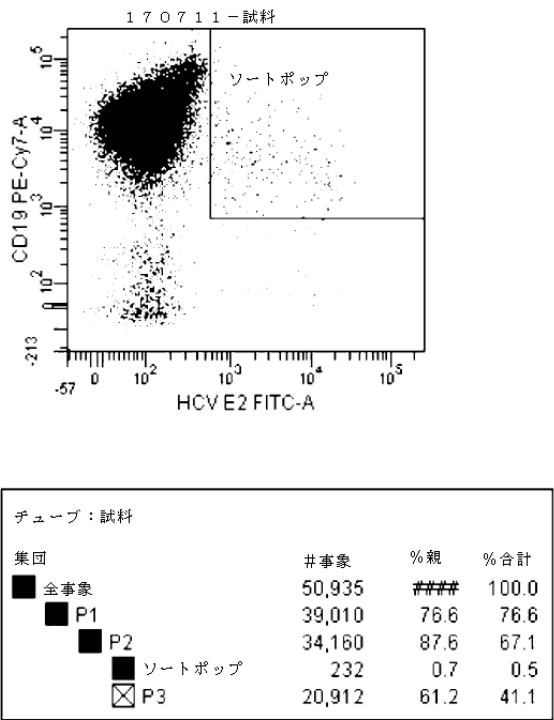
10

20

【図 2 2】



【図 2 3】

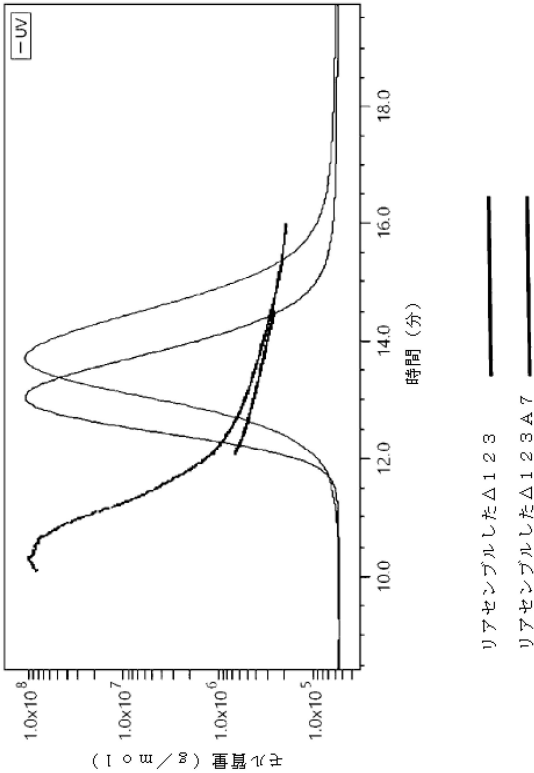


30

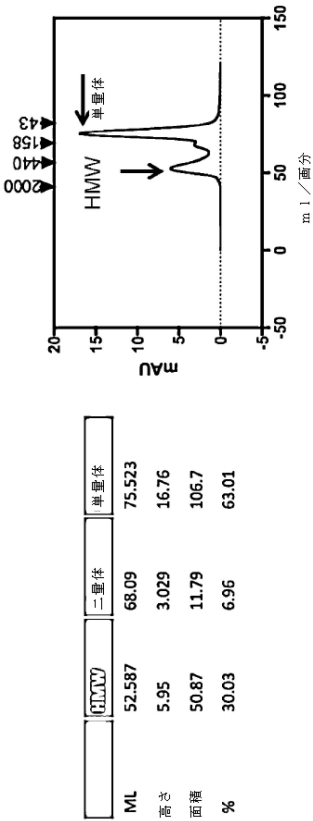
40

50

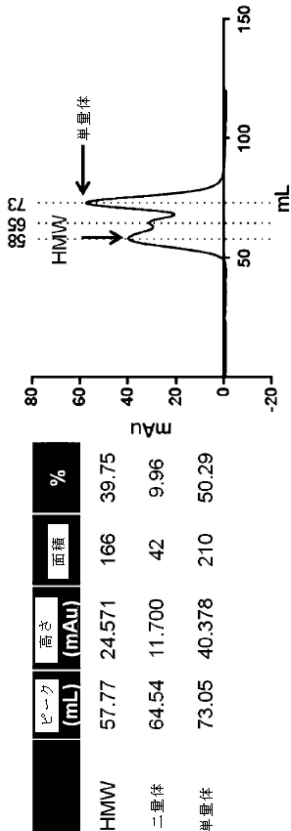
【図 2 4】



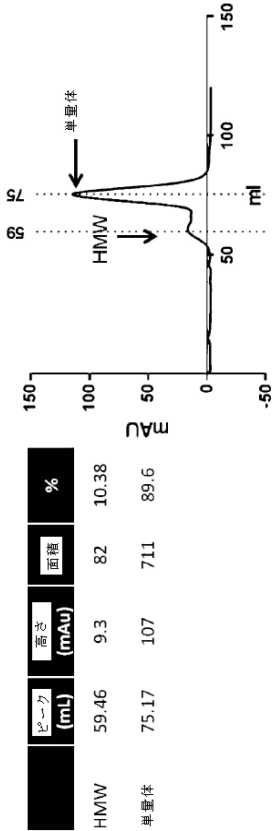
【図 2 5】



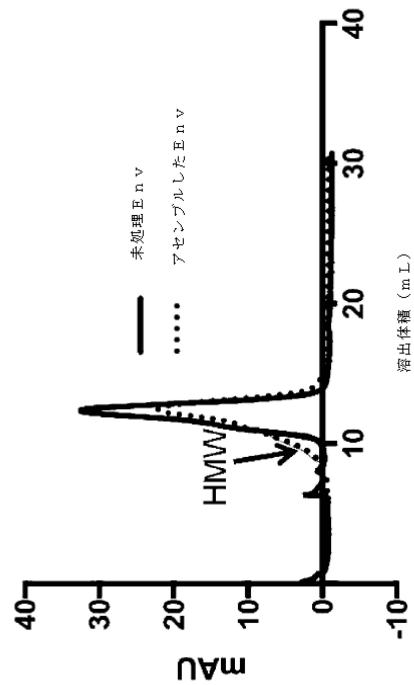
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 28】



【配列表】

[0007068284000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/51 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/51

弁理士 平川 さやか

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ドラマー, ヘイジ

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクファーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリック ヘルス リミテッド内

(72)発明者 ポームボーリス, パンテリス

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクファーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリック ヘルス リミテッド内

(72)発明者 センター, ロバート

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクファーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリック ヘルス リミテッド内

審査官 山 崎 真奈

(56)参考文献

特表平09 - 503396 (JP, A)

特表2014 - 502959 (JP, A)

国際公開第2012 / 016290 (WO, A1)

特開2014 - 240427 (JP, A)

特表2005 - 516939 (JP, A)

米国特許出願公開第2006 / 0165715 (US, A1)

Krey T. et al. , Structural basis of HCV neutralization by human monoclonal antibodies resistant to viral neutralization escape. , PLoS Pathog. , 2013年 , 9(5) , e1003364.

McCaffrey, Kathleen et al. , Role of conserved cysteine residues in hepatitis C virus glycoprotein E2 folding and function. , Journal of Virology , 2012年 , 86(7) , 3961-3974

Martinez-Donato G. et al. , Multimeric HCV E2 protein obtained from Pichia pastoris cells induces a strong immune response in mice. , Mol Biotechnol. , 2007年 , 35(3) , 225-235

FENOUILLET Emmanuel et al. , Contribution of Redox Status to Hepatitis C Virus E2 Envelope Protein Function and Antigenicity. , Journal of Biological Chemistry , 2008年 , 283(39) , 26340-26348

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)