

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99808641. X

[51] Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1325517C

[22] 申请日 1999.7.20 [21] 申请号 99808641. X

[30] 优先权

[32] 1998. 7. 21 [33] EP [31] 98113595.7

[86] 国际申请 PCT/EP1999/005173 1999.7.20

[87] 国际公布 WO2000/005266 英 2000.2.3

[85] 进入国家阶段日期 2001.1.15

[73] 专利权人 展马博联合股份有限公司

地址 丹麦哥本哈根

共同专利权人 国家健康及医学研究院 (INSERM)

[72] 发明人 C·赖特尔 F·哈伯泽策尔

A·富尔尼勒 C·特列波

C·德格朗热 G·安绍斯普

[56] 参考文献

WO9740176A1 1997.10.30

EP0520499A 1992.12.30

审查员 郝建欣

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 33 页 附图 7 页

[54] 发明名称

抗丙型肝炎病毒抗体及其用途

[57] 摘要

叙述了一种新颖的抗体，该抗体特异性识别 HCV 糖蛋白 E2 的构象依赖性表位，并能中和 E2 蛋白与易感性细胞的结合。另外，提供了上述抗体识别的抗原和表位，以及编码所述抗体的多核苷酸。还提供了载体，其包含所述多核苷酸和被其转化的宿主细胞，以及其在所述抗体产生中的用途。另外，提供了药物和诊断组合物，其包含任何上述的抗体、抗原、表位、多核苷酸、载体或细胞。还叙述了上述抗体、抗原、多核苷酸和载体在继承性免疫治疗，优选在治疗或预防肝移植中 HCV 感染的用途。

1. 一种抗体，其特征在于，该抗体具有 VH 序列和 VL 序列，其中所述抗体包含 SEQ ID NO:4 的重链可变区的互补决定区 1、互补决定区 2 和互补决定区 3，和 SEQ ID NO: 2 的轻链可变区的互补决定区 1、互补决定区 2 和互补决定区 3，所述氨基酸序列特异性识别丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 的构象依赖性表位，而且能沉淀共价或非共价结合的 E2/E1 复合物。

2. 如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，该抗体包含如 SEQ ID NO: 4 的重链可变区。

3.如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，该抗体含有 SEQ ID NO: 4 的重链可变区和 SEQ ID NO: 2 的轻链可变区。

4. 如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，该抗体含有 SEQ ID NO: 4 的重链可变区和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。

5. 如权利要求 1-4 任一所述的抗体，其特征在于，所述抗体在 VH 或 VL 区中含有一个氨基酸取代，所述取代不改变抗体的功能性质。

6.一种载体，其特征在于，该载体包含编码 SEQ ID NO:2 或 6 的 VL 区的多核苷酸联合编码 SEQ ID NO:4 的 VH 区的多核苷酸。

7. 一种宿主细胞，其特征在于，该细胞包含权利要求 6 所述的载体。

8. 一种制备能识别丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 或免疫球蛋白链的抗体的方法，其特征在于，该方法包括：

(a)培养权利要求 7 所述的细胞，和

(b)从培养物中分离所述抗体或其功能性片段或免疫球蛋白链。

9. 一种药物组合物，其特征在于，该药物组合物含有治疗量的权利要求 1 到 5 任一项所述的抗体和药物学可接受的运载体。

10. 一种诊断组合物，其特征在于，该诊断组合物包含权利要求 1 到 5 任一项所述的抗体和在免疫诊断方法中常规使用的合适试剂。

11. 一种体外测定体外样品中和丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 在靶细胞上的结合的免疫试验，其特征在于，用权利要求 1 到 5 任一项所述的抗体来测试所述体外样品。

12. 一种检测丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 存在的体外免疫试验，其特征在于，该

方法测量所述糖蛋白 E2 和权利要求 1 到 5 任一项所述的抗体在非还原条件下的共沉淀。

13. 一种检测来自病人的体外样品中抗丙型肝炎病毒的抗体的方法，其特征在于，该方法包括使来自所述个体的体外样品与针对权利要求 1-5 任一所述的抗体的抗原接触；并检测与所述抗原结合的抗体的存在。

14. 权利要求 1 到 5 任一项所述的抗体的用途，其特征在于，该用途是制备药物组合物，用于治疗或预防个体中丙型肝炎病毒感染，或预防丙型肝炎病毒感染的复发。

15. 如权利要求 14 所述的用途，其特征在于，所述药物组合物用于肝脏移植的个体。

抗丙型肝炎病毒抗体及其用途

发明领域

本发明涉及能特异性结合丙型肝炎病毒（HCV）糖蛋白 E2 的构象依赖性表位的人抗体，及其各种用途。

在本说明书中引用了数篇文献。各篇文献在此引入以供参考（包括制造厂商说明书、指南等）；然而，并不认为所引用的任何文献确实是本发明的现有技术。

发明背景

丙型肝炎病毒（HCV）是非甲非乙型肝炎的主要病原体。已估计献血者人群中的 HCV 感染流行率在 0.4 到 2% 范围内 (Choo 等, 1989)。在 70% 以上的病人中，急性 HCV 感染引起慢性肝炎的产生，它能向肝硬化和肝细胞癌演化 (Saito 等, 1990)。HCV 是一种具有包膜的、正链 RNA 病毒，归类于黄病毒科 (Francki 等, 1991, Miller 等, 1990)。它含有约 9,500nts 的基因组，编码 3010 到 3033 个氨基酸的一种多蛋白。宿主和病毒蛋白酶对该多蛋白的加工导致产生结构蛋白和非结构（NS）蛋白 (Rice 等, 1996)。结构蛋白包括核衣壳和两个推定的病毒粒子包膜糖蛋白 E1 和 E2 (Miyamura 等, 1993)。非结构蛋白包括 NS2 到 NS5 抗原。

在一些人中，急性感染成功的缓解，表明 HCV 可被宿主免疫系统控制。宿主克服 HCV 感染的机制仍然未知。以前的报道强烈提示，人和黑猩猩能产生病毒中和性抗体 (Choo 等, 1994, Farci 等, 1994, 1996, Shimizu 等, 1994)。在用重组 E1 和 E2 蛋白免疫接种后，已成功实现了体内的保护黑猩猩防止被同源 HCV 分离物初次感染 (Choo 等, 1994)。在该研究中，只有那些显示抗 E2 抗体高滴度的黑猩猩受到了保护。虽然未鉴定出未识别中和抗原结构域，但推测免疫原的构象对中和性抗体的诱导是关键。

由于到目前为止，尚无培养病毒和开发中和试验的有效体外复制系统，因此正在积极寻找评估抗-E1/E2 抗体的生物学功能的其它试验。已在初步的研究中描述了对病毒附着于推测的易感细胞上的预防方法 (Shimizu 等, 1994, Zibert 等, 1995)。更近的，已开发了一种“体外”中和结合（NOB）的试验，其利用了高度

纯化的 E2 蛋白与易感性靶细胞的特异性结合(Rosa 等, 1996)。该试验使得能定量评价能中和 E2 与这些细胞的结合的 NOB 抗体。用该系统, Rosa 等已显示, 只有用 E1 和 E2 蛋白免疫, 产生抗-NOB 高滴度的黑猩猩才受到保护, 对抗攻击性感染(Rosa 等, 1996), 提示 NOB 活性可能是“体内”病毒感染被中和的一种指标。在 HIV 感染中, 一种类似的模式最近已显示, 抗体与包膜糖蛋白寡聚物结合的亲和力和是病毒中和的良好预告(Fouts 等, 1997)。另一种评估抗-E1 和/或抗-E2 抗体的生物学活性的方法包括, 测试这些抗体识别据信存在于病毒颗粒表面的天然结构的能力。体外研究已显示, E1 和 E2 相互反应, 形成非共价连接的复合物(Deleersnyder 等, 1997, Ralston 等, 1993)。已提出这些复合物代表 HCV 病毒颗粒的功能性亚基(Deleersnyder 等, 1997, Dubuisson 等, 1994, Dubuisson 和 Rice, 1996, Ralston 等, 1993)。对病毒感染中 B 细胞所有组成成分的探测, 对于理解与这些感染有关的病理是关键的。人单克隆抗体提供了另一种方法。对于 HCV, 仅报道了对有限数目的病毒抗原的这类抗体的分离和特性分析。这些包括核衣壳、NS3 和 NS4 蛋白质(Akatsuka 等, 1993, Cerino 等, 1991, 1993, Chan 等, 1996, Mondelli 等, 1994)和最近的是糖蛋白 E2(Chan 等, 1996)。对于后一种情况, 作者使用了噬菌体展示技术, 与合成肽的使用结合, 来筛选抗-E2 免疫反应性, 并能获得特异性 IgG 单链 Fvs, 其识别 E2 序列。虽然鉴定到了一种特异性线性表位序列, 但未描述过该抗-E2 抗体的生物学活性, 并且该抗体在控制感染进程中的推定作用仍然未限定。最近, W097/40176 描述了从一组合文库中获得的免疫球蛋白分子, 其能特异性与 HCV E2 抗原结合。虽然显示这些免疫球蛋白的 Fab 片段在中和结合试验中具有结合活性, 但发现重组表达的 Fab 克隆和对应的完整 IgG 分子在中和 HCV E2 多肽的结合中是无效的。

发明简述

本发明涉及新颖抗体, 其包括人抗体可变区的至少一个互补决定区(CDR), 能特异性识别 HCV 糖蛋白 E2 的构象依赖性表位。另外, 本发明涉及被所述抗体识别的抗原。此外, 本发明涉及编码上述抗体或抗原的多核苷酸、含有所述多核苷酸的载体, 以及含有上述多核苷酸或载体的细胞。本发明的另一个方面是一种制备能识别 HCV 糖蛋白 E2 构象依赖性表位, 并能中和 E2 蛋白与易感性细胞结合的抗体的方法。本发明还涉及含有上述抗体、抗原、多核苷酸、载体或细胞的药物

和诊断组合物，以及上述化合物在各种治疗和诊断应用中的用途。

发明详述

因此，本发明的技术问题是提供治疗和预防人 HCV 感染的工具和方法。

该技术问题的解决是通过提供权利要求中确定特征的实施例而实现，即提供以下抗体，其 1) 能识别构象依赖性决定簇，2) 能识别衍生自不同 HCV 基因型的抗原，和 3) 能沉淀据信存在于病毒颗粒表面上的非共价结合的 E1E2 复合物；和 4) 能中和 E2 蛋白与易感性细胞的结合，这提示该抗体体内中和的能力。这些抗体对发展战胜高度易变因子(如 HCV)感染的治疗性或预防性策略特别有用。

因此，本发明涉及一种抗体，其包含至少一个(优选两个，更优选三个、四个或五个，和最优选六个)人抗体 V_H 和/或 V_L 区的互补决定区(CDR)，所述 V_H 和/或 V_L 区包含图 5 (V_L) (SEQ ID NO: 1) 和图 6 (V_H) (SEQ ID NO: 3) 描述的 DNA 序列编码的氨基酸序列，其特异性识别丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 的构象依赖性表位，并能沉淀共价或非共价结合的 E2/E1 复合物。另外，和/或本发明的抗体还包含人免疫球蛋白链 V_L 区的至少 1, 2 或 3 个 CDR，包含 SEQ ID: 6 的氨基酸序列，并由 SEQ ID NO: 5 (代表编码 SEQ ID NO: 1 (图 5) 的 V_L 等位变体) 描述的 DNA 序列编码。

本领域技术人员知道，抗体的各可变区(重链 V_H 和轻链 V_L) 包含三个高变区，有时称为互补决定区或“CDR”，侧接 4 个相对保守的构架区，或“FR”。可测定本发明抗体可变区中包含的 CDR，如根据 Kabat，免疫学感兴趣的蛋白质序列(U. S. Department of Health and Human Services, 3rd edition, 1983, 4th edition, 1987, 5th edition 1990)。本领域技术人员可轻易理解，可使用具有上述可变区的抗体可变区，来构建其它具有所需特异性和生物功能的多肽或抗体。因此，本发明还包括含有至少一个上述可变区的 CDR，并有利的，具有与本文所附实施例中描述的抗体结合性能基本相同或相似的多肽和抗体。本领域技术人员将易于理解，使用上述可变区或 CDR，可根据本领域已知方法，如 EP-A1 0 451 216 和 EP-A1 0 549 581 中所述的方法构建上述抗体。

术语“丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 的构象依赖性表位”指被本发明的抗体识别的表位的非线性性质。这意味着该表位的抗原决定簇是由 HCV 糖蛋白 E2 的三维结构提供的，而不是由其氨基酸序列提供的。

术语“能沉淀共价或非共价结合的 E2/E1 复合物”指本发明的抗体沉淀 E1 和 E2 非共价结合复合物的能力，据信该复合物存在于病毒颗粒上。

术语“能中和 E2 蛋白和易感性细胞的结合”描述了候选抗体中和高度纯化的 E2 与对 HCV 感染易感性细胞结合（结合的中和或 NOB）的能力；也见实施例 4。有利的，本发明的抗体在浓度为约每毫升 1 微克，优选浓度为每毫升 0.1 微克，和最优选的浓度为每毫升约 0.03 微克时具有 NOB 活性。

根据本发明，选择一种不需要抗原纯化，特异性检测能识别直接在细胞中表达的 E2 的抗-E2 抗体的筛选试验，来鉴定和纯化针对构象决定性决定簇的抗体。该试验还能根据基因型 1a 衍生抗原的表达，从而确定交叉反应性抗-E2 抗体和表位的特征。用该方法，已从两个 HCV 慢性感染病人获得了两种产生抗-E2 抗体的克隆。第一个克隆（克隆 503）获自被基因型 4 分离物感染的病人（病人 1），而第二个克隆（克隆 108）衍生自被基因型 1b 分离物感染的病人（病人 2）。另外显示对基因型 1b 抗原良好反应性的 HMAb 表明，在全世界发现的至少两种主要流行性病毒亚型（亚型 1a 和 1b）中，这些抗体靶向的决定簇是保守的。根据上文，可合理的预计，本发明的抗体也能与其它基因型，如 2, 3a, 4, 5 和/或 6 的抗原反应。与这些基因型有关的本发明抗体的结合活性可易于根据实施例中叙述的方法来测试。

本发明获得的结果表明，本发明 HMAb 识别的决定簇位于 E2 的构象依赖性区域，因为各种使用表达的截短的蛋白质结构域的筛选方法（包括肽扫描、蛋白质印迹和免疫荧光分析）不能用来鉴定线性决定簇；见实施例 2。另一方面，在还原条件或非还原条件下进行的免疫沉淀研究表明，HMAb 识别一种构象依赖性决定簇。在非还原条件下，这些抗体沉淀共价和非共价结合的 E1E2 复合物；见实施例 3.2。相信后者是掺入病毒颗粒中的功能性亚基(Deleersnyder 等, 1997)。具体从表位形成的动力学分析获得的现存数据强烈表明，这两个 HMAb 识别 E2 蛋白质看来早折叠的区域。这些区域随该在蛋白质的进一步成熟将维持可及，直到它采取了其最终构象特征（存在于病毒颗粒表面的易感性 E2 形式）。动力学分析和 NOB 数据（即抗体 503，显示 NOB 活性）还提示这两个抗体识别不同决定簇；见实施例 4。另外，抗体对 E2 蛋白质的亲和力也不同。

本发明获得的最鼓舞人心的结果是，证明了 HMAb 之一显示强 HOB 活性。这

些观察，结合 Rosa 等(Rosa 等, 1996)的观察，表明 NOM 抗体识别的决定簇可能是 E2 的构象依赖性区域，看来是在不同基因型之间保守的功能域。这些区域似乎与已显示含有中和表位的高变区 1 (HVR) 不同。在最近研究中，Zibert 等(Zibert 等, 1997)已能使针对 HVR 中发现的非构象性结构的抗体早期出现与急性自身限制性感染关联起来。该研究结果提示，针对 E2 线性决定簇的抗体在 HCV 感染控制中的关键性存在和作用，该观察与最初在黑猩猩模式中 Farci 等(Farci 等, 1996)进行的研究结果一致。在后来一研究中，作者诱导出了针对 HVR 中肽的超免疫血清，血清含有能体外中和明确特性的接种物感染力的抗体。Shimizu 等也进行了相似的实验(Shimizu 等, 1996)。因此，所有这些研究强烈提出，HCV 的中和大部分是类特异性的，涉及可变的非保守表位的参与。不过，最近的观察已开始提出存在其它中和决定簇，具有交叉反应性，并不针对 HVR。在 Choo 等的疫苗研究中，诱导的中和抗体不针对 E2 的 HVR，而明显针对该抗原携带的其它决定簇(Choo 等, 1994)。Abrignani 最近已观察到，在慢性感染的自发缓解和抗-NOB 抗体高滴度之间的关系(Abrignani, 1997)。在本文下文实施例所述的病人中，对 E2 结合的高的或可测量的中和能力并不限于被基因型 1a 分离物感染的病人血清，从而提示交叉反应性表位（如本申请中所述的那些）的存在。由于在纯化的 Mab 的 NOB 滴度和病人（我们的研究中的病人都具有相似的大于 1: 1000 的 NOB 血清滴度）血清中发现的滴度之间，寻找直接关系困难，但因此令人惊讶的是，抗体 503 在极低浓度下(0.03 微克/毫升)可检测的，提供强大活性的 NOB 活性；见实施例 4。

预期本发明产生的 HMAb 生物合成，HCV 糖蛋白的生物合成，折叠和装配，以及对病毒颗粒结构和推定的细胞表面受体进行特性分析的有用工具。由于以 Ab 503 作示范的本发明的抗体代表迄今描述的第一种具有 NOB 活性的 HMAb，该抗体对被动免疫研究特别有用。对于慢病毒而言，抗体灌注研究已证明，施用中和性抗体在不同动物模型中控制和预防感染的有益作用(Conley 等, 1996, Emini 等, 1992, Putkonen 等, 1991)。

在本发明的优选例中，所述抗体是单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体、人源化抗体、或其片段，它们能特异性结合所述的 HCV E2 糖蛋白，还包括双特异性抗体、合成抗体、抗体片段，如 Fab、Fv 或 scFv 片段等，或这些抗体任何一种的化学修饰衍生物。可通过 Köhler 和 Milstein, 自然 256(1975), 495, 和 Galfré ,

酶学方法 73(1981), 3, 首先描述的技术(其包含将小鼠骨髓瘤细胞和衍生自接种过的哺乳动物的脾细胞融合), 以及本领域所发展的改良)来制备单克隆抗体。另外, 可用 Harlow 和 Lane “抗体, 实验手册”, CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 描述的方法, 获得针对上述表位的抗体及其片段。当用噬菌体展示技术获得所述抗体的衍生物时, 可用如 BIAcore 系统中使用的表面细胞质基因组共振, 来提高能与构象依赖性 HCV 糖蛋白 E2 表位的某表位结合的噬菌体抗体的效力 (Schier, 人抗体杂交瘤 7(1996), 97-105; Malmberg, 免疫学方法杂志, 183(1995), 7-13)。在例如 W089/09622 中描述了嵌合抗体的产生。在 EP-A1 0 239 400 和 W090/07861 中描述了产生人源化抗体的方法。本发明所用的另一个抗体来源是所谓的异种抗体。在 W091/10741, W094/02602, W096/34096 和 W096/33735 中描述了产生异种抗体, 如在小鼠中产生人抗体的一般原理。如上所述, 本发明的抗体可以以完整抗体之外的各种形式存在; 包括例如: Fv、Fab 和 F(ab)2, 以及单链; 见例如 W088/09344。对于双特异性抗体, 其中一种特异性针对 HCV E2 糖蛋白表位, 而另一种优选针对 T 细胞抗原(如 CD3), 为了捕捉病毒或受 HCV 感染并能被高效摧毁的靶细胞, 识别病毒表位的结合位点具有高亲和力是有利的。另一方面, 识别 T 细胞的结合位点的亲和力必须是天然 T 细胞受体/配体相互作用, 或 T 细胞共刺激分子与其受体相互作用中发现的亲和力的数量级。

可单用或联用本领域已知的常规技术, 使用例如氨基酸缺失、插入、取代、加成、和/或重组, 和/或任何本领域已知的其它修饰方法, 来进一步修饰本发明的抗体或其对应的免疫球蛋白链。在作为免疫球蛋白的氨基酸序列基础的 DNA 序列中引入这种修饰的方法对本领域技术人员是熟知的; 见例如, Sambrook, 分子克隆: 实验手册, Cold Spring Harbor Laboratory(1989)N. Y.。

在一具体优选例中, 本发明的抗体分别包含图 5 和 6 中描述的 V_H 和/或 V_L 区的氨基酸序列。

在另一个优选例中, 本发明涉及一种抗原或其表位, 其被本发明的抗体识别。所述抗原或表位可以是糖基化的、未糖基化的或部分去糖基化的。如本文所讨论的, 和实施例中解释的, 本发明的特征是由上述抗体识别的新颖抗原。为了鉴定和分离本发明的抗原和表位, 可通过将各种 cDNA 注入卵母细胞, 经充分时间来表达 cDNA 基因产物, 并用本发明的抗体测试所要的 cDNA 表达产物的存在, 来筛选

cDNA 文库。

另外，可用本发明的抗体，对大肠杆菌中的 cDNA 表达文库间接筛选具有至少一个本发明的表位的肽(Chang 和 Gottlieb, 神经科学杂志, 8: 2123, 1988)。在揭示了这些抗原的结构后，可合理设计结合伙伴和/或区域。例如，可用合适的计算机程序，来进行结构基序的折叠模拟和计算机重设计(Olszewski, 蛋白质 25(1996), 286-299; Hoffman, 计算机应用生物科学 11(1995), 675-679)。另外，可用计算机来对详细的蛋白质模型进行构象和能量分析(Monge, 分子生物学杂志, 247(1995), 995-1002; Renouf, 高等实验医学生物学(1995), 37-45)。

在本发明的另一个实施例中，涉及编码本发明上述任何抗体免疫球蛋白链的至少一个可变区的多核苷酸。免疫球蛋白的一种形式构成抗体的基本结构单元。该形式是四聚体，由两对相同的免疫球蛋白链构成，每对具有一条轻链和一条重链。在各对中，轻链和重链可变区或功能域都负责结合抗原，而恒定区负责抗体的效应器功能。除了抗体，免疫球蛋白还存在各种其它形式（包括比全长短，但保留所要的活性的形式），包括 Fv, Fab, 和 F(ab')₂，以及单链抗体(如 Huston, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(1988), 5879-5883 和 Bird, 科学 242(1988), 423-426); 也见上。免疫球蛋白轻链或重链可变区由三个高变区（也称为 CDR）间的“构架”区构成；见上。

还可通过单独或联合表达编码本发明的抗体免疫球蛋白的重链或轻链的重组 DNA 节段产生本发明的抗体。

本发明编码上述抗体的多核苷酸可以是例如：DNA、cDNA、RNA 或合成产生的 DNA 或 RNA 或重组产生的嵌合核酸分子，包含任何单独或联合的那些多核苷酸。所述多核苷酸优选是载体的一部分。这些载体还可包含其它基因，如标记基因，其使所述载体能在合适的宿主细胞中，和合适的条件下被选择。优选的，本发明的多核苷酸可和能使基因在原核或真核细胞中表达的表达控制序列操作性连接。所述多核苷酸的表达包括多核苷酸转录成可翻译的 mRNA。本领域技术人员对确保在真核细胞，优选哺乳动物细胞中表达的调控元件是熟知的。它们通常包括确保转录起始的调控序列，和可任选的确保转录终止和转录稳定的聚腺苷酸化信号。其它调控元件可包括转录和翻译增强子，和/或天然结合的或异源启动子区域。就此而言，本领域技术人员易于理解，编码至少一条轻链和/或重链可变区的多核苷

酸可编码两条免疫球蛋白链或仅一条链的可变区。类似的，所述多核苷酸可受同一启动子的控制，或可分别受控制进行表达。允许在原核宿主细胞中表达的可能调控元件包括例如：大肠杆菌的 PL、lac、trp 或 tac 启动子，而允许在真核宿主细胞中表达的调控元件例子是酵母的 AOX1 或 GAL1 启动子，或 CMV-、SV40-、RSV-启动子（Rous 肉瘤病毒），CMV-增强子，SV40-增强子或哺乳动物和其它动物细胞中的珠蛋白内含子。除了负责转录起始的元件以外，这些调控元件还可包含在多核苷酸下游的转录终止信号，如 SV40-聚腺苷酸位点或 tk-聚腺苷酸位点。另外，根据所用的表达系统，可将能将多核苷酸指向细胞区室，或将其分泌入介质的前导序列加到本发明多核苷酸的编码序列上，这是本领域熟知的。前导序列在适当的时象与翻译、起始和终止序列装配在一起，而且优选能指导翻译的蛋白质或其部分分泌入（周质）空间或胞外介质的前导序列。可任选的，异源序列能编码一种融合蛋白，该蛋白包括能赋予所需特征，如稳定性或简化表达的重组产物纯化过程的 C-和 N-末端识别肽。就此而言，合适的表达载体是本领域已知的，例如 Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (Pharmacia)，pCDM8，pRc/CMV，pcDNA1，pcDNA3(In-vitrogene)，或 pSPORT1 (GIBCO BRL)。

优选表达控制序列将是在载体中能转化或转染真核宿主细胞的真核启动子系统，但也可使用原核宿主的控制序列。一旦载体被掺入合适宿主，将宿主维持在适合高水平表达核苷酸序列的条件下，而且如需要，可收集和纯化免疫球蛋白轻链、重链、轻/重链二聚物或完整抗体，结合性片段或其它免疫球蛋白形式；见 Beychok，免疫球蛋白合成的细胞，Academic Press, N.Y. (1979)；还可见例如附加实施例。

如上所述，可单独或作为载体的一部分使用本发明的多核苷酸，来在细胞中表达本发明的多肽，用于与 HCV 感染有关疾病的基因治疗或诊断。将本发明的多核苷酸或载体引入细胞，进而产生抗体。根据采用体外或体内技术，将治疗性基因引入细胞的基因治疗是最重要的基因转移的应用之一。在文献中描述了体外或体内基因治疗的合适方法和载体，它们对本领域技术人员是已知的；见例如 Giordano，天然药物 2(1996)，534-539；Schaper，Circ.Res. 79(1996)，911-919；Anderson，科学 256(1992)，808-813；Isner，Lancet 348(1996)，370-374；Muhlhauser，Circ. Res. 77(1995)，1077-1086；Wang，天然药物 2(1996)，

714-716; W094/29469; W0 97/00957 或 Schaper, 生物技术的当前观点 7(1996), 635-640, 和其中引用的文献。可设计本发明的多核苷酸和载体, 用于直接引入或通过脂质体或细菌载体(如腺病毒、反转录病毒)引入细胞。优选所述细胞是种系细胞, 胚胎细胞, 或卵细胞或其衍生物, 最优选的所述细胞是种系细胞。

另外, 本发明涉及载体, 特别是在基因工程中常规使用的质粒、粘粒、病毒和噬菌体, 其包含编码本发明抗体免疫球蛋白链的可变区的多核苷酸; 可任选的联合编码本发明抗体的其它免疫球蛋白链可变区的, 本发明的多核苷酸。优选所述载体是表达载体和/或基因转移或靶向载体。可使用衍生自反转录病毒、痘苗病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒、或牛乳头瘤病毒的表达载体, 来将本发明的多核苷酸或载体传递入靶细胞群。可使用本领域技术人员熟知的方法, 来构建重组病毒载体; 见例如, Sambrook, 分子克隆: 实验手册, Cold Spring Harbor Laboratory(1989)N.Y. 和 Ausubel, 分子生物学现有方案, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)描述的技术。另外, 可将本发明的多核苷酸和载体重新构建入脂质体来传递给靶细胞。可将含有本发明的多核苷酸的载体(如免疫球蛋白重链和/或轻链可变区编码序列和表达控制序列)用熟知的方法(其根据细胞宿主的类型而不同)转移入宿主细胞。例如, 对于原核细胞常用氯化钙转染, 而对于其它细胞宿主可用磷酸钙处理或电穿孔; 见 Sambrook, 上文。

本发明还涉及用本发明的多核苷酸或载体转化的宿主细胞。所述宿主细胞可以是原核或真核细胞。存在于宿主细胞中的多核苷酸或载体存在于宿主细胞中, 可以整合入宿主细胞的基因组或可维持在染色体外。

宿主细胞可以是任何原核或真核细胞, 如细菌, 昆虫, 真菌, 植物, 动物或人细胞。优选真菌细胞是例如: 酵母属, 特别是酿酒酵母种的细胞。术语“原核”指能用 DNA 或 RNA 转化或转染, 来表达本发明抗体或对应的免疫球蛋白链的细菌。真核宿主可包括革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌, 例如大肠杆菌、鼠伤寒杆菌、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和枯草芽胞杆菌。术语“真核”指包括酵母、高等植物、昆虫和优选哺乳动物的细胞。根据在重组产生程序中使用的宿主, 本发明的多核苷酸编码的抗体或免疫球蛋白链可以是糖基化或非糖基化的。本发明的抗体或对应的免疫球蛋白链还可包括起始甲硫氨酸残基。可用本发明的多核苷

酸，使用任何本领域技术人员通常已知的技术来转化或转染宿主。另外，制备融合的可操作性连接的基因和在哺乳动物细胞和细菌等中表达它们的方法是本领域熟知的 (Sambrook, 分子克隆：实验手册, Cold Spring Harbor Laboratory(1989)N.Y.)。可利用本文所述的基因构建物和方法，来在真核或原核宿主中表达本发明的抗体和对应的免疫球蛋白链。一般与宿主联系，使用含有启动子序列，促使插入的多核苷酸有效转录的表达载体。表达载体通常含有复制起始点，启动子和终止子，以及能提供转化细胞的表型选择的特异性基因。另外，可用含有本发明细胞的转基因动物，优选哺乳动物来大量产生本发明的(多)肽。

因此，在另一个实施例中，本发明涉及产生能识别丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 的构象依赖性表位的抗体，或其功能性片段或免疫球蛋白链的方法，该方法包括

(a)培养本发明的细胞；和

(b)从培养物中分离所述抗体或其功能性片段或免疫球蛋白链。

转化的宿主可在发酵罐中生长，并根据本领域已知的技术培养，以实现最佳细胞生长。一旦表达，可根据本领域的标准程序，包括硫酸铵沉淀，亲和柱，柱层析，凝胶电泳等纯化本发明的完整抗体、其二聚物、独立的轻链和重链，或其它免疫球蛋白形式；见 Scopes “蛋白质纯化”，Springer-Verlag, N.Y. (1982)。然后，可从生长培养基、细胞裂解液、或细胞膜组分中分离出本发明的抗体或其对应的免疫球蛋白链。可通过任何常规方法，如与针对本发明抗体恒定区的单克隆和多克隆抗体的使用有关的，制备性层析分离和免疫学分离来分离和纯化微生物表达的抗体或免疫球蛋白链。对本领域技术人员清楚的是，本发明的抗体可进一步与其它分子偶联，用于药物靶向和显影应用。可在抗体或抗原表达后，用化学方法将其交联到结合位点，或可将偶联产物经基因工程在 DNA 水平改造入本发明的抗体或抗原。然后在合适的宿主细胞中表达该 DNA，如需要，收集表达的蛋白质并复性。

对于药物学使用，优选至少约 90 到 95%均一性的基本纯化的免疫球蛋白，最优选是 98 到 99%或以上的均一性。一旦部分纯化（或按所需纯化至均一）可用该抗体治疗（包括体外）或用于开发和进行试验程序。

本发明还涉及产生能表达本发明的抗体或其对应的免疫球蛋白链的细胞的方法，包括用本发明的多核苷酸或载体基因工程改造细胞。可使用本发明方法获得

的细胞，来测试本发明抗体与其抗原的相互作用。

另外，本发明涉及由本发明的多核苷酸编码，或可由上述方法获得的，或从上述方法产生的细胞获得的本发明抗体或其片段。本发明的抗体通常在对单克隆抗体治疗敏感的疾病的基本治疗中是有用的。特别是，可使用免疫球蛋白通过补体介导的裂解等，被动免疫或除去 HCV 或其它不需要的细胞或抗原，均不会发生与许多前抗体有关的大的免疫反应（如过敏性休克）。对于本发明的抗体，适于治疗的典型疾病状态包括慢性 HCV 感染。

本发明的抗体、抗原和表位可治疗性用于患 HCV 感染的病人。可通过施用本发明的抗体、抗原和表位来完成这种治疗。这种施药可利用未标记的和标记的抗体或抗原。例如，当使用未标记的抗原或表位有利时，其形式例如，抗原可以是小到以至于不能刺激免疫应答，但足够大，能结合或封闭 HCV 通过 E2 糖蛋白停靠在靶细胞上的片段。

另外，可施用标记了治疗剂的本发明的抗体、抗原和表位。这些药剂可直接或间接的与本发明抗体或抗原偶联。间接偶联的一个例子可使用间隔分子。另外，本发明的抗体还可包含一个区域，所述区域用共价或非共价键联接。联接可根据本领域已知的和上述的方法作基因融合，或如 W094/04686 所述作化学交联。融合蛋白中存在的，包含本发明抗体的其它功能域可优选通过可弯曲接头连接，有利的是多肽接头连接，其中所述多肽接头包含多个亲水性肽键氨基酸，具有足够跨越所述功能域的 C-末端和本发明抗体的 N-末端距离（反之亦然）的长度。上述融合蛋白还可包含可切割接头或蛋白酶的切割位点。这些间隔分子可以是不溶性的或是可溶性的 (Diener 等，科学 231: 148, 1986)，而且可被选来使药物在靶位点从抗原上释放。能与本发明的抗体、抗原和表位偶联，用于免疫治疗的治疗剂例子是药物、放射性同位素、凝集素和毒素。可与本发明抗体、抗原和表位交联的药物包括以下化合物：经典的药物，如丝裂霉素 C、道诺红霉素和长春花碱等化合物。在使用放射性同位素偶联的本发明的抗体、抗原或表位作免疫治疗中，某些同位素可能比其它的更优选，这取决于白细胞分布和稳定性以及发射等因素。由自身免疫应答决定，某些发射物可能比其它的更优选。一般在免疫治疗中，发射 α 和 β 粒子的放射性同位素是优选的。优选短射程、高能 α 发射物，如 ^{212}Bi 。可与本发明的抗体、抗原或表位结合，用于治疗目的的放射性同位素的例子是

^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{212}At 、 ^{211}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 和 ^{188}Re 。其它可与本发明的抗体、抗原或表位偶联的治疗剂，以及体外和体内治疗方案是已知的，或易于由本领域技术人员确定。在任何合适的情况下，本领域技术人员可使用本发明编码任何上述抗体、抗原或表位或的多核苷酸，或对应的载体，来代替蛋白质材料本身。

另外，本发明涉及药物组合物，包含上述本发明的抗体、抗原或表位、多核苷酸、载体或细胞。本发明的药物组合物还可包含药物学上可接受的运载体。合适的药物学上可接受的运载体的例子是本领域熟知的，包括：磷酸缓冲盐溶液、水、油/水乳剂等乳剂、各种湿润剂、无菌溶液等。可用熟知的常规方法配制含有这些运载体的组合物。可以合适的剂量将这些药物组合物施给人。可经不同途径施用合适的组合物，如静脉内、腹腔内、皮下、肌肉内、外用或透皮施用。由参与的生理和临床因素确定剂量疗法。如医学领域熟知的，任一病人的剂量取决于许多因素，包括病人的大小、体表面积、年龄、要施用的具体化合物、性别、施药的时间和途径、健康状况、和其它同时施用的药物。典型的剂量可以是，如 0.001 到 1000 微克范围内（或该范围内用于表达或抑制表达的核酸）；然而，低于或高于该示范性范围的剂量也是可预料的，尤其要考虑上述因素时。一般，有规律的施用该药物组合物的疗法应在每天 1 微克到 10 毫克单位范围内。如果该疗法是连续输液，它还应在每千克体重每分钟 1 微克到 10 毫克范围内。可用周期性评估来监控进程。剂量不同，但静脉内施用 DNA 的优选剂量是从大约 10^6 到 10^{12} 个 DNA 分子拷贝。本发明的组合物可局部或全身施用。施用一般是胃肠外的，如静脉内；DNA 还可直接施用到靶位点，如通过生物弹射法(biolistic)传递到内部或外部的靶位点，或通过导管传递到动脉内的位点。胃肠外施药的制备物包括无菌水溶液或非水溶液、悬液和乳剂。非水溶剂的例子是丙三醇、聚乙二醇、橄榄油等植物油、和油酸乙酯等可注射有机酯。水相载体包括水、乙醇/水溶液、乳剂或悬液，包括盐和缓冲介质。胃肠外载体包括氯化钠溶液、Ringer's 葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳化 Ringer's，或不挥发油。静脉内载体包括液体和营养补液，电解补液（如基于 Ringer's 葡萄糖的那些）等。防腐剂和其它添加剂也可存在，如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、和惰性气体等。另外，本发明的药物组合物可以包括其它试剂，如白介素或干扰素，视药物组合物的用途而定。例如，如上所述本发明的药

物组合物可与其它抗病毒剂联用。这些药剂包括（不限于）：干扰素，其它抗 HCV 单克隆或多克隆抗体、核苷类似物，DNA 聚合酶抑制剂，和如实施例 6 中所述的药剂。就这种联合治疗而言，可同时施用抗体和抗病毒剂或顺序在用抗病毒剂治疗之前或之后施用抗体。还可将药物组合物来免疫肝脏移植病人，以消除这些病人复发 HCV 感染的可能性。另外，还可将药物组合物配制成疫苗，例如，如果本发明的药物组合物包含如上所述，能诱导针对 HCV 的有效免疫应答的抗原。有利的，本发明的药物组合物将用于肝脏移植。另外，预期本发明的抗体能用于防止 Tupaia-肝细胞被 HCV 感染性人血清感染。

本发明预料，各种本发明的多核苷酸和载体可用标准载体和/或基因传递系统，单独或组合施用，并可任选的和药物学上可接受的运载体或赋形剂一起施用。施用后，所述多核苷酸或载体可稳定整合入个体的基因组中。另一方面，可使用病毒载体（它们对某些细胞或组织是特异性的，并在所述细胞中维持）。合适的药物学运载体和赋形剂是本领域熟知的。可用根据本发明制备的药物组合物来预防或治疗，或延迟 HCV 感染。另外，将本发明包含本发明的多核苷酸或载体的药物组合物用于基因治疗是可能的。合适的基因传递系统可包括脂质体、受体介导的传递系统、裸露 DNA、和病毒载体，如疱疹病毒、反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒等；见上。将核酸传递到体内的一个特异性位点，用于基因治疗，也可用生物弹射 biolistic 传递系统完成，如 Williams 所述（Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88(1991)，2726-2729）。

在本发明的另一个实施例中，涉及一种在人中预防丙型肝炎病毒（重）感染的方法，包含：施用本发明的抗体、多核苷酸或载体的步骤。还包含一种在人中减轻慢性丙型肝炎的方法，包含步骤：用本发明上述化合物与药物学上可接受的运载体联用，治疗所述病人。

在本发明的另一个实施例中，涉及一种诊断组合物，它包含任何一种上述的本发明的抗体、抗原、多核苷酸、载体或细胞，并可任选的合适检测工具。本发明的抗原和抗体适合用于免疫试验，其中可以水相或结合于固相载体上利用它们。可利用本发明抗原的免疫试验的例子是直接或间接形式的竞争性和非竞争性免疫试验。这些免疫试验的例子是放射性免疫测定（RIA），夹心法（免疫测量试验）和蛋白质印迹试验。本发明的抗原和抗体可与许多不同的运载体结合，并用来分

离与这些多肽特异性结合的细胞。熟知的运载体的例子包括玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、右旋糖苷、尼龙、直链淀粉、天然和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁。对于本发明的目的，运载体的性质可以是可溶的或不溶的。

本领域普通技术人员知道，有许多不同的标记物和标记方法。可在本发明中使用的标记物类型的例子包括酶、放射性同位素、胶体金属、荧光化合物、化学发光化合物和生物发光化合物；也见上文讨论的实施例。

在另一个实施例中，本发明的抗体还可用于诊断个体中 HCV 感染的方法，通过从被测试的个体中获得体液样品，其可以是血样、淋巴样品或任何其它体液样品，并将该体液样品与本发明的抗体在能形成抗体-抗原复合物的条件下接触。然后通过本领域已知的方法，测定这些复合物的水平，比对照样品中形成的水平显著高，表明被测试个体有 HCV 感染。以同样的方式，也可用被本发明的抗体特异性结合的抗原来诊断个体中的 HCV 感染，通过使被测个体的体液样品与上述抗原接触，并测定样品中抗原-抗体复合物的形成。因此，本发明涉及一种测定丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 的体外免疫试验，其特征是优选在非还原条件下，测量其与本发明抗体的共沉淀。另外，本发明包括一种诊断病人中慢性丙型肝炎的方法，其特征在于用本发明的抗体测试所述病人的样品中丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 在靶细胞上的结合能否被中和。因此，本发明还涉及一种用本发明的抗体抑制丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 在靶细胞上的结合的中和试验。

本发明还包含检测样品（如细胞样品）中 HCV 抗原存在的方法，包括：从人体获得细胞样品，使所述样品与上述抗体之一接触，优选在允许抗体与抗原结合的非还原条件下，并用放射性免疫试验或酶联免疫试验等免疫试验技术来检测被结合抗体的存在。另外，本发明涉及一种检测人体中抗丙型肝炎病毒的自身抗体的方法，包括：使病人的样品与本发明的抗原接触，并检测与所述抗原结合的抗体的存在。

在另一个优选例中，本发明涉及上述抗体、抗原、多核苷酸、载体或细胞用于制备药物组合物，治疗或预防人体中 HCV 感染，或防止 HCV 感染复发的用途。优选所述药物组合物是设计成在肝脏移植之前、之中或之后施用的。

本发明的药物组合物、方法和用途可理想的用于人。虽然本文所述的方法和

用途也包括动物治疗。

本发明的描述和实施例公开并包括了这些实施例和其它的实施例。关于任何一种根据本发明使用的抗体、方法、用途和化合物的文献可从公共图书馆和数据库获得，用于示范性的电子装置。例如可用在互联网上可得到的公共数据库“Medline”，例如在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>。其它数据库和网址，如<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，<http://www.infobiogen.fr/>，http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html，<http://www.tigr.org/>，是本领域技术人员已知的。而且还可用例如<http://www.lycos.com>获得。在 Berks, TIBTECH 12(1994), 352-364 中给出了对于生物技术专利信息的综述，以及对回顾性检索和目前了解有用的专利信息有关来源的评述。

上述公开内容总体上描述了本发明。参考下列具体例子可获得更完整的理解。这些例子是为了说明而提供的，不是要限制本发明的范围。

附图显示：

图 1：间接免疫荧光分析。用如前所述的 SVE2 重组病毒感染 CV-1 细胞 (Fournillier-Jacob 等, 1996)，用病人血清(1:20 稀释度)或产生 HMAb 的细胞系的上清液进行免疫荧光分析。用与荧光素偶联的山羊抗人 IgG 免疫血清进行染色。(A)病人 1 的血清；(B)病人 2 的血清；(C)HMAb 503；(D)HMAb 108；(E)与 HCV 无关的慢性肝炎的病人血清。额外的阴性对照(F)含有用 SVE1 重组病毒(表达 E1)感染的 CV-1 细胞，并用 HMAb503 或 108 染色(结果只显示 HMAb503)。

图 2：在表位作图研究中使用的质粒。(A)代表编码病毒核衣壳(C)、糖蛋白 E1 和 E2，以及非结构蛋白 p7、NS2 和 NS3 的 HCV 基因组功能域(Rice 等, 1996)。标出了蛋白酶切割位点的氨基酸位置。(B)不同表达质粒编码的序列的图上位置和氨基酸边界。

图 3：E2 的免疫沉淀和 E1 共沉淀，以及在还原和非还原条件下表位形成分析。脉冲标记了用 vTF7-3 和 vHCV1-1488(vHCV)共感染或用 TF7-3 单独(M)感染的细胞，跟踪指定的时间(小时)。用 HMAb108, 503 和小鼠 MAb H2(Dellersnyder 等, 1997)免疫沉淀 E2 糖蛋白。在还原或非还原条件下，通过 SDS-PAGE (10% 丙烯酰胺)分析免疫沉淀物。在图左侧标出了 HCV 特异性蛋白的预期位置。

图 4：E2 结合被 HCV-E2 HMAb 中和的百分数。测试了各种浓度的抗-E2

HMAb503 和 108 中和纯化的 CHO 表达的 E2 蛋白与 MOLT-4 细胞结合的能力。如所述计算了中和作用 (Rosa 等, 1996), 标出 50% 中和滴度。

图 5: HMAb503 轻链可变区 (V_L) 的核酸序列和氨基酸序列。

图 6: HMAb503 重链可变区 (V_H) 的核酸序列和氨基酸序列。

实施例说明了本发明。

实施例 1: 病人的筛选和产生人单克隆抗体的 B 细胞 (LCL) 的产生

两个病人加入了本研究。用 RIBA III 试验 (Abbott Laboratories) 测定了 HCV 感染。在 PBMC (外周血单核细胞) 无限增殖时, 如用组织学检查和阳性 PCR 试验测定所显示, 两个病人都患有慢性肝炎。用 bDNA 试验 2.0 版 (quantiplex HCV RNA 试验, Chiron Diagnostics) 测定血清病毒负荷。用三种不同方法测定了 HCV 基因型。第一种是根据检测基因型特异性的, 针对非结构抗原 4 (NS4) 的抗体, 并用 MUREX 1-6 血清定型试验, 按厂商说明书 (MUREX Diagnostics SA, Bhattacharjee 等, 1995) 测定。第二种是根据从基因组的 5' 非编码区 (NCR), 用基因型/亚型特异性探针扩增病毒序列, 并用 INNO-LIPA 试验 (Innogenetics S.A.) 进行。在这两个病人之一中, 病人 1: 尽管用 PCR 可在血清中检测到 HCV RNA, 血清 ALT (丙氨酸转移酶) 水平是正常的, 而且保持正常 (轻度肝炎)。相反, 在病人 2 中 ALT 水平保持持续上升, 该病人中的感染特征是肝硬化。

如前所述进行了产生 HMAb 细胞系的生成 (Boyer 等, 1991, Desgranges 等, 1988, Seigneurin 等, 1983)。简单说, 在 Ficoll 分离后, 使 PBMC 与 EBV 培养上清液 (1 毫升 B95.8 株的上清液, 具有 10^{-3} TD₅₀/ml 对 5×10^6 PBMC 的滴度) 在室温下接触。培育后, 将它们稀释在培养液中, 浓度范围为每孔 50 到 100×10^3 细胞。2 到 4 周后, 用 SVE2 CV-1 IFA 筛选上清液的抗-E2 反应性。已报道抗-E2 抗体的检测是严格依赖于抗原产生方法的 (Chien 等, 1993, Hsu 等, 1993, Lesniewski 等, 1995)。已显示 HCV E2 的真核表达, 而不是原核表达使该蛋白能正确加工并糖基化 (Selby 等, 1993)。在我们的研究中, 我们用作抗-E2 抗体的筛选试验的是, 一种真核表达的 E2 抗原, 以天然形式, 即通过免疫荧光试验 (IFA) 可见的形式分析。先前 Fournillier-Jacob 等曾用过这种检测试验, 并显示对抗体检测特别有效 (Fournillier-Jacob 等, 1996)。

简单说, 用来自原型 H 株(基因型 1a)的重组质粒 pCW18 E2(表达 HCV E2 氨基酸序列 371 到 746), 和辅助性 SV40 突变病毒一起转染 CV-1 细胞, 来产生重组病毒表达的 E2 的储备原液(SVE2, Fournillier-Jacob 等, 1996, Wychowski 等, 1986)。用 SVE2 病毒来进一步感染 CV-1 细胞, 并用感染病人的血清和 EBV-无限增殖的 B 细胞的上清液, 如前所述进行免疫荧光分析(Fournillier-Jacob 等, 1996)。在分析前, 将细胞固定在甲醇: 乙酮(3: 7)中。

以每孔 2 到 20 个细胞, 用 50×10^3 个射线照射的(2, 500rad)同种异体 PBMC 进一步亚克隆两次 LCL。获得自两个病人衍生的两个保持阳性的克隆。表 1 总结了两个病人和两种淋巴类 B-细胞系产生的 HMAb, 称为 503 和 108 的特性。这两个克隆的培养上清液的分析揭示这两个克隆都仅分泌 IgG1。用 IFA 在用重组 SVE2 病毒感染的 CV-1 细胞上测试了各个克隆的上清液, 用对人 IgM、IgG 或 IgA(Byosis)、IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚类(Sigma Immuno Chemical Co.) 和 λ 和 κ 轻链(Dakopatts)特异性的第二抗体来揭示染色情况。

表 1 病人抗体和衍生的人抗-E2 单克隆抗体的特征

病人	基因型 ^a	病毒负荷 ^b eq/ml $\times 10^5$	组织学诊断	HMAb	同种型 ^c
1	4	5.2	轻度肝炎	503	IgG1 λ
2	1b	21.8	肝硬化	108	IgG1 λ

^a用从病人 EBV-PBMC 转化之日和从后来两年随访中两个不同时间点得到的样品进行分析。不同时间点和不同试验之间的结果是一致的。

^b用 Quantiplex bDNA 试验(Quantiplex HCV RNA 试验, Chiron Diagnostics, Emeryville)在血清中定量。

^c通过 IFA 在 CV-1 感染的细胞上, 用重组 SVE2 病毒测试了各个克隆的上清液, 用对人 IgM、IgG、IgA、IgG1-4 亚类的特异性第二抗体揭示了染色。

用蛋白 A(Pharmacia)柱亲和纯化产生 HMAb 的上清液。用 ELISA 如前述进行培养上清液中抗体浓度的测定(Boyer 等, 1991)。每毫升常规培养液中 LCL 产生 2 到 5 微克 Ab。用两种不同试验, 在 PBMC 无限增殖和在无限增殖前两年中的两个不同时间测定感染病人 1 和 2 的病毒基因型。两个试验都给出一致的结果, 表明病人 1 被基因型 4 的分离物所感染, 而病人 2 被基因型 1b 的分

离物所感染。由于商业上可购得的 HCV 基因定型试验可能缺少特异性，并为了排除双重感染的可能性，我们进一步对 PCR 衍生的序列作图分析 HCV 基因组的 5' 非编码区，来确定上述结果。将衍生自克隆的准种的核苷酸序列与公布的数据库比较(Bukh 等，1992)，结果证实了用商品基因定型试验获得的结果，即两个病人被单一病毒型感染。图 1 表明在 IFA 中用病人血清(A 和 B)或纯化的单克隆抗体(C 和 D)观察到的，SVE2 感染的 CV-1 细胞的染色。该反应性定位在细胞膜上，具有占优势的核周围分布。

实施例 2: HMAb 的免疫学特征

用不同方法确定产生的抗体的免疫反应性。使用原始病人血清，LCL 的上清液，和纯化抗体，在变性条件下，用含有亚型 1a 和 1b 衍生的 E2 蛋白质的制备物进行蛋白质印迹分析(Nakano 等，1997)。对于蛋白质印迹分析，如前所述使用了来自基因型 1a 和 1b 序列的杆状病毒表达的 E2 蛋白质(Nakano 等，1997)。使用了病人血清(1: 50)、两个克隆的上清液，和纯化的 HMAb(在高达 10 微克/毫升浓度下测试)。用全套合成肽(包括整个 E2 开放阅读框)如前所述，用病人血清和纯化的抗体进行表位作图(Courtesy A. M. Prince, Wang 等，1996)。合成肽大多是在连续肽之间有 6 个氨基酸重叠的 12 聚物，对应于 HCV-H 株(基因型 1a) E2 蛋白的序列。总共有 57 条 E2 肽(aa 384-727)，所有都由 AnaSpec 合成。

虽然两个感染 HCV 病人的血清都和 E2 1a 和 1b 衍生蛋白质反应，但没有一个培养上清液或纯化的 HMAb 给出阳性信号，即使在浓度高达 10 微克/毫升时测试也没有。在肽扫描 ELISA 中，用一组覆盖 E2 1a 序列的合成肽测试培养上清液或纯化抗体时，也观察不到反应性。

由于上述观察提示，识别的决定簇可以是非线性的，因此在 IF 试验中分析了不同样品的免疫反应性。用表达不同 E2 功能域的全套质粒转染细胞(见图 2)，来尝试鉴定限制性决定簇序列。用 IFA 在 LTK 细胞(已经用表达截短的 E2 蛋白功能域(见图 2)的全套载体转染过)上评估获得的这两种 HMAb 的反应性。在 pcDNA3 质粒(Promega)的 CMV 启动子控制下直接克隆 E2 序列，产生质粒 pCIE2 和 pCIE2t，或作为与乙型肝炎病毒表面抗原的融合蛋白表达产生质粒 pS2S.E2A-E，用标准技术和如前所述的技术表达(Sambrook 等，1989，

Nakano 等, 1997)。用 Qiagen 纯化柱(Qiagen)根据厂商说明书产生所有的 DNA 制备物。用 1.0 微克 DNA 在 Lipofectamin(Gibco BRL)存在下转染 LTK 细胞。通过 IFA 在感染后 48 小时, 如前所述测试了细胞上清液和纯化的 HMAb 的免疫反应性(Major 等, 1995)。阳性对照包括采用直接注射质粒 pCiE2t 免疫的小鼠产生的反应性超免疫血清(Nakano 等, 1997)。阴性对照包括使用未感染的 LTK 细胞和用表达 E1 的重组 SV40 病毒感染的 CV-1 细胞(Fournillier-Jacob 等, 1996)。

表 2: 病人血清和纯化的单克隆抗体(HMAb)针对截短的 E2 功能域的免疫反应性

HCV 构建物 ^a		A	B	C	D	E	pCiE2 ^a	pCiE2t	pcDNA3
病人 1 ^b	血清	+	-	+	-	-	+	+	-
	HMAb 503	-	-	-	-	-	-	+	-
病人 2 ^c	血清	-	-	-	-	-	-	+	-
	HMAb 108	-	-	-	-	-	-	+	-
小鼠多克隆 Ab ^d		+	+	+	+	+	+	+	-

^a 用标出的质粒瞬时转染 LTK 细胞, 并如 Major 等所述(1995), 在 48 小时后进行 IFA。pS2. SE2A-E 质粒是根据 Nakano 等(Nakano 等, 1997)。用 pcDNA3 质粒(Promega)作为阴性对照。

^b 以 1/20 稀释度测试病人血清; 以高达 10 微克/毫升的浓度在至少两个独立进行的实验中使用了 LCL 上清液或纯化的 HMAb。

^c 在所有情况下, 采用直接注射质粒 pCiE2t 免疫的小鼠获得的反应性超免疫血清, 评估了转染的效率和质粒的正确表达(Nakano 等, 1997)。

表 2 总结了 IF 研究的结果。病人 1 的血清识别了各种 E2 表达质粒表达的序列中(作图)的多个决定簇。相反, 该病人衍生的 HMAb503 仅识别将近全长的 E2 表达形式(由质粒 pCiE2t 编码), 但不识别该抗原较小的任何表达形式。对于病人 2, 血清和衍生的 108 抗体都仅和最大的 E2 表达形式反应。因此, 用该方法, 不可能鉴定出两种纯化抗体之一所识别的限制性决定簇序

列。所有上面的实验与亚型 1a 衍生抗原有关。此外评估了纯化的单克隆抗体识别亚型 1b 衍生的 E2 的能力，作为评估其交叉反应性能的一种方法。通过免疫沉淀，用被重组新培斯病毒，Sinrep/HCV-BK1-1207(表达该抗原)感染的细胞测试了 HMAb 的反应性。两种抗体都能识别该抗原，如观察到强特异性信号所显示的那样。

联合上面的结果，这些数据提示 HMAb 能识别至少两种不同 E2 亚型(1a 和 1b)衍生抗原的特异性决定簇。另外，它们强烈提示该二抗体可能识别构象依赖性决定簇。

实施例 3：免疫沉淀研究

在蛋白质印迹中和在用一组表达不同截短的 E2 部分载体转染的 LTK 细胞上进行 IFA 中 HMAb 缺乏反应性，提示该抗体识别构象依赖性表位。因此，进一步在脉冲跟踪实验中评估了 HMAb 对 E2 的识别。另外，由于先前报道已提出，E1 和 E2 相互反应形成复合物被假设成是掺入病毒颗粒中的功能性亚基(Deleersnyder 等，1997)，还评估了 HMAb 识别这些复合物的能力。这些 E1E2 复合物是非共价结合的，或因分子间二硫键而稳定，形成 E1E2 聚集物。还已报道，共价结合的 E1E2 复合物据信不是病毒颗粒的功能性亚基部分(Dubuisson 等，1994，Grakoui 等，1993，Ralston 等，1993)。对于本发明的目的，使用了不同的重组病毒。这些包括：1)重组痘病毒 vTF7.3，表达 T7 DNA-依赖性 RNA 聚合酶(Fuerst 等，1986)，2)全套重组痘病毒，表达 HCV-H 氨基酸序列，vHCV 170-809，vHCV 371-809，vHCV 1-1488 和 vHCV 370-661(Grakoui 等，1993，Michalak 等，1997，Fournillier-Jacob 等，1996，Major 等，1995)和 3)重组新培斯病毒(Sinrep/HCV-BK1-1207)，表达基因型 1b 株的结构蛋白，BK 株(Dubuisson 等，1994)。如所述在 CV-1 单层(对于痘病毒)或在 BHK-21 细胞(对于新培斯病毒)中产生病毒储备原液。(Dubuisson 等，1994，Bredenbdeek 等，1993)。感染细胞并用 35S-转标记(ICN)进行代谢标记细胞，方法如前所述(Dubuisson 等，1994，Dubuisson 和 Rice，1996)。用 10mM Tris-HCl(pH 7.5)，150mM NaCl 和 2mM EDTA 配的 0.5%NP-40 裂解细胞。在实验用的裂解缓冲液中加入 20mM 碘化乙酰胺，在其中分析了二硫键的形成。如所述进行免疫沉淀(Dubuisson 等，1994，Dubuisson 和 Rice，1996)。对

于定量实验，用密度测量法分析放射性自显影照片。

3.1 HMAb 识别 E 的早折叠功能域

进行免疫沉淀来分析由这些 HMAb 识别的蛋白的特征(图 3)。用针对构象非依赖性 (MAb A11) 或构象依赖性 (MAb H2) 表位的小鼠抗-E2 MAb 作比较 (Dubuisson 等, 1994, Deleersnyder 等, 1997)。在还原条件下, HMAb108 和 503 在脉冲中不沉淀 E2 蛋白, 但在跟踪 30 分钟后, 一条对应于 E2 的条带开始被检测到, 60 分钟后强度增大 (图 3, 还原 HMAb108 和 503)。这与用小鼠 MAb A11 (针对构象依赖性表位) 获得的结果相反 (图 3, 还原, MAb A11)。如先前用这后一种抗体观察到的那样, 在脉冲过程中检测到异源 E2 相关产物, 可能是在 E2-NS2 前体的 NS2 区合成中翻译暂停的结果 (Dubuisson 等, 1996)。对于 MAb A11, 在跟踪 30 分钟后, E2-NS2 前体沉淀的强度非常高, 并随时间下降, 而对于被 HMAb108 和 503 沉淀的 E2-NS2 蛋白来说, 它是低而恒定的, 表明 E2 在从 E2-NS2 前体上切下后, 主要被该抗体所沉淀。与用构象依赖性 MAb H2 进行的免疫沉淀比较, 表明在 E2 检测中的极大延迟 (图 3, 还原, MAb H2)。这些观察表明, 确实 HMAb 识别 E2 的构象依赖性区域, 该区域在 E2 蛋白的成熟加工过程中早期出现。两种 HMAb 表位形成的估计半衰期是大约 15 分钟 (数据未显示)。

3.2 HMAb 可沉淀非共价 E1E2 复合物

在非还原条件下进行了其它脉冲跟踪实验, 并与那些在还原条件下进行的比较 (图 3)。在还原条件下, 两种 HMAb 协同沉淀了 E1, 表明它们识别 E1 和 E2 复合物, 当在阻止二硫键稳定 E1E2 复合物的非还原条件下进行免疫沉淀时, 在凝胶顶部还检测到缓慢移动的条带。后面的这些观察提示, 沉淀的 E1E2 复合物是由非共价结合的异二聚物和异源连接的聚集物构成的。如先前所观察, 对于已显示能识别 E2 天然形式的 MAb H2, 仅在那时候在凝胶上检测到对应于 E1 和 E2 的条带 (图 3, 非还原, H2, Deleersnyder 等, 1997)。在非还原条件下, E1 单体形式和 HMAb 108 的共沉淀更少, 与 HMAb 503 比较, 仅在延长接触时间后才检查到一条特异性条带。因此, 这两种 HMAb 都识别 E2 蛋白的功能域 (该功能域呈现早折叠, 而且在蛋白形成其最终构象中保持可接触), 如非共价结合的 E1E2 复合物的共沉淀所提示的。

总的说, 上述数据表明, HMAb108 和 503 识别一个或多个构象依赖性决定簇, 并能沉淀据信存在于病毒颗粒上的 E1 和 E2 非共价结合的复合物。

实施例 4: E2 与细胞结合的中和

Rosa 等(Rosa 等, 1996)最近开发的试验使得能以定量方式评估候选抗体中和高度纯化的 E2 与 HCV 感染易感性细胞的结合(中和结合或 NOB)的能力。在该试验中评估了两种 HMAb。在 Rosa 等(Rosa 等, 1996)最近开发的试验中评估了 HMAb 中和 E2(中和结合或 NOB)与 MOLT 4 细胞结合的能力。该试验在 96U-底微量滴定板中进行。简单说, 将 20 微升重组 CHO E2₃₈₄₋₇₁₅ 蛋白(0.5 微克/毫升)与各种稀释度抗 E2 HMAb 和对照 HMAb 混合(Rosa 等, 1996, Boyer 等, 1991)。4℃培育 1 小时后, 将混合物加到 MOLT-4 细胞(每孔 105 个细胞)中。洗涤后, 随后用 1/100 稀释度的人血清(含有识别结合靶细胞的 E2 的抗-E2 免疫球蛋白)培育细胞。洗涤细胞, 并用异硫氰酸盐偶联的抗 IgG 血清培育细胞。用 FACScan 流式细胞计数器分析荧光。如下计算特异性中和: $((\text{阳性对照 MFI} - \text{实验 MFI}) / (\text{阳性对照 MFI} - \text{阴性对照 MFI})) \times 100$, 其中(MFI)=细胞群的平均荧光强度, 其直接与荧光标记的、与细胞结合的 HCV 蛋白的表面密度相关。比较了用或不用 HCV 蛋白, 和用 HCV HMAb 或 HCV-阴性 HMAb, 或免疫前血清培育的细胞的 MFI 值(Rosa 等, 1996)。对于各实验, 不用 HCV 蛋白, 用流式细胞计数器分析(未结合 HCV 蛋白的)细胞设置阳性阈值, 这些细胞已用抗 HCV 蛋白的抗血清, 和异硫氰酸荧光素标记过。对于竞争结合分析, 抗体被如下生物素化: 用 2 毫克/毫升的 N-, N-二甲基甲酰胺生物素 4℃培育以 0.4M 磷酸缓冲液配的 1 毫克/毫升抗体 2 小时, 并以 PBS 充分透析过夜。用两种抗体进行 NOB 活性试验, 所用的竞争物标记的抗体为 2.5 微克/毫升。

图 4 显示了不同浓度的抗体获得的中和百分数。结果表明 HMAb 503 显示 NOB 活性, 而且 50% 结合的中和是在 0.03 微克/毫升的浓度下实现的。对于 HMAb 108, 在任何测试浓度下都未检测到 NOB 活性。因此, 具有 NOB 活性的 HMAb 503 是第一种迄今为止描述的这样的抗体。感兴趣的是, 产生的克隆(503)衍生自被基因型 4 感染的病人, 而试验所用的是基因型 1(a)衍生抗原, 从而证实了该抗体的交叉反应能力。数据还提示, 具有 NOB 活性的抗体看来是靶向不

同病毒基因型之间保守的决定簇的。

进行了竞争实验，来测定两种抗体是否与相似的或拓扑图不同的表位结合。HMAb 不阻止（即不竞争）503Ab 中和活性的检测。这些结果强烈提示，HMAb108 和 503 识别 E2 蛋白质上的不同表位。

实施例 5：预防肝脏移植中的 HCV 感染

下文描述了丙型肝炎病毒（HCV）感染的病例下的肝脏移植，其中施用了本发明的一种抗体，来避免植入器官的再感染。

病人的准备：剃去全身体毛，灌肠，取血（定量测定 HCV-RNA），在药物的帮助下净化肠道。

捐献者的准备（证实大脑死亡，心脏还在跳动）：取血（检查抗乙肝、丙肝；HIV、巨细胞病毒的抗体），取下器官，在储藏液中保藏，以转运到 Wisconsin 大学（储藏液为富含钾的电解溶液，保存在 4℃），并转运给病人。在手术室中对病人施用常用麻醉药和免疫抑制（约 1 克脱氢皮质醇+FK506 或环孢菌素 A+可任选的硫唑嘌呤+可任选的抗胸腺细胞球蛋白）；打开胃（剖腹术）；将一条旁路固定在股静脉（脊）和腋静脉（腋）之间，来稳定血循环；从周围组织中分离肝脏，准备输入和输出血管（肝动脉、肝门静脉、胆总管、肝静脉），并剥离肝脏（*Pringle-Manöver*）。钳住血管，取出肝脏。

在该阶段：施用抗体：将作为冻干液或作为浓缩溶液的 100—200 毫克抗体+500 毫克人血清白蛋白，溶于 100 毫升等渗盐溶液中或 5%葡萄糖溶液中，用 2 小时输入。在输液过程中，将捐献者的器官放入病人的腹部区域。将血管交叉合流（缝合），再次取血样（测定 HCV-RNA 滴度）。输液结束后，重新灌注血管，并检查闭合度。如果它们是闭合的，将肝脏置于腹部区。灌注开始一小时后，进行肝脏活体标本检查，闭合腹腔。免疫组织化学分析活检标本，是否抗原已到达靶部位。

将病人送到重病监护室，保持麻醉，并给予人工呼吸。密切监视肝功能、继发性出血、静脉闭塞、感染状态、血抗体浓度和 HCV-RNA 滴度（HCV-RNA 滴度的正常过程：几天后低于其在约 1 周后增高的示范水平）。

长期过程：在时间的第一阶段，每天施用 100 毫克脱氢皮质醇，在 3 个月的过程中剂量减至 5 毫克；在病人一生中都施用不同剂量的脱氢皮质醇和

FK506 或环孢菌素，仅在前 4 周施用硫唑嘌呤和/或抗胸腺细胞球蛋白。每 6 到 8 周更新一次治疗性抗体（输入 100—200 毫克）；每 4 周测定 HCV—RNA 滴度和抗体浓度。如果对该抗体有更好的了解，就不需要再测量。病人一生都监测肝功能、感染和可能的排斥反应（活体检查）。接触前预防（受感染人的配偶；如不要怀孕，通常用阴茎套保护）：每 6 到 8 周肌肉内（如可充分接受）或通过输液施用 100—200 毫克抗体丸剂。监测血液抗体浓度。

对于接触前预防（被针等刺伤的护士），取血（HCV—RNA 滴度），在有结果前，通过输液施用 100—200 毫克抗体。

实施例 6：人抗-HCV 抗体的功能性免疫球蛋白可变区序列的克隆和测定，以及在 CHO—细胞中的表达

从产生抗体的 EBV 转化的人 B 细胞系中，按照 Chomczynski 方法（分析生物化学 162(1987)156-159）制备总 RNA。

然后，根据标准方案（Sambrook，分子克隆：实验手册，Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989，第二版）合成 cDNA。

用表 3 中列出的寡核苷酸引物组，和从所述人 B 细胞系合成的 cDNA 作为模板，扩增了编码人抗 HCV 抗体的 λ 轻链和 γ 1—重链 Fd—节段（VH+CH1）的 DNA 区域。该引物组产生了重链 Fd—节段的 5'—*Xho*I 和 3'—*Spe*I 识别位点，和 λ 轻链的 5'—*Sac*I 和 3'—*Xba*I 识别位点。对于 PCR 扩增编码重链 Fd 节段的 DNA 片段，将 5 个不同 5'—VH—引物（VH1, 3, 5, 7, VH2, VH4, VH4B 和 VH6）分别与 3'—VH 引物 CGd1 联合；对于 PCR 扩增 λ 轻链片段，将 8 个不同 5'—VL 引物（VL1—8）各与 3'—VL 引物 CL2 联合。

用下列 PCR 程序来扩增：94℃变性 20 秒；52℃引物退火 50 秒，72℃引物延伸 60 秒。进行 40 轮循环，最后 72℃最终延伸 10 分钟。

在琼脂凝胶上跑 PCR 产物，分离合适大小的 DNA 条带。然后用限制性酶 *Xho* I 和 *Spe* I（对于重链片段）或用 *Sac* I 和 *Xba* I（对于轻链片段）消化各分离的 DNA 条带，并克隆入质粒载体 Bluescript（Stratagene），该载体是已用 *Xho* I 和 *Spe* I 消化或用 *Sac* I 和 *Xba* I 切割制备的。

然后对克隆的重链和轻链片段的质粒制备物进行序列分析。选择两条分别编码功能性免疫球蛋白重链或轻链可变区（VH 和 VL）的序列；这样可鉴定正好一条功能性 VH 和一条功能性 VL 区域。在图 5（SEQ ID NOS：1 和 2）和 6（SEQ ID NOS：

3 和 4) 中描述了功能性 VL-和 VH-序列。通过与人 V 基因序列数据库 (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/>) 提供的对应种系序列比较, 完成了成熟 N-末端的氨基酸序列。

根据标准方法 (Sambrook, 分子克隆: 实验手册, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 第二版) 进行克隆和测序。

为了克隆含有人抗-HCV 抗体的重链和轻链的原始 N-末端的 VL-和 VH-片段, 进行了下列实验:

用 MMLV 反转录酶 SuperscriptII(Gibco BRL, Eggenstein)根据标准方案 (Sambrook, 分子克隆: 实验手册, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989, 第二版) 反转录总 RNA。用两种寡核苷酸 CGd1(对于重链)和 CL2(对于轻链)进行 cDNA 特异性引发。

然后用末端转移酶(Pharmacia, Freiburg)根据标准方案对 cDNA 的第一链加 poly-A 尾。用含有 poly-C 延伸的有义引物 PCR 扩增加尾的 cDNA, 根据 Gilliland, L.K 等公布的锚定引物序列(组织抗原 47, 1-20, 1996)和指定的 5'-AncTail(CGTCGATGAGCTCTAGAATT CCCCCCCCCCCCCD)。该锚定引物和对编码 λ 轻链恒定区 (CL2) 或 IgG1-CH1 重链区 (CGd1)C 末端的核苷酸序列分别有特异性的反义引物联合。

如下进行 PCR: 初次变性: 94°C 4 分钟; 扩增 30 轮: 93°C 30 秒; 55°C 30 秒; 72°C 30 秒; 终末延伸: 72°C 3 分钟。这些引物各含有限制性酶切位点 (5'-AncTail:*EcoRI*; CL2: *XbaI*; CGd1: *SpeI*), 使对应的 PCR 片段分别克隆入用 *EcoRI/XbaI* 或 *EcoRI/SpeI* 消化的质粒载体中; 为此, 使用了 bluescript KS+质粒载体(Genebank 登录号 X52327), 因为它使得能使用常用的测序引物, 易于对得到的插入物进行序列分析。证明几个重链和轻链片段的克隆分别具有相同序列, 并能被鉴定成编码功能性 VL 区或 VH 区。证明 VH 序列与上述方法克隆的相同。将 VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6) 和上述方法获得的 VL 序列比较, 证明其在成熟 N-末端的位置 2 上有一个氨基酸替换。

根据标准程序, 用 PCR 将包含天然前导肽的完整 λ 轻链克隆入哺乳动物表达载体 pEF-ADA 中(见 PCT/EP98/02180)。根据标准程序用 PCR, 还将 VH 克隆入 PCT/EP98/02180 中所述的哺乳动物表达载体 pEF-DHFR 中的人 $\gamma 1$ -重链

的基因组中。

通过稳定转染 CHO—细胞然后基因扩增，如（PCT/EP98/02180）所述进行完整人 IgG1 λ -抗体的表达。通过 PCT/EP98/02180 中所述的蛋白 A 亲和层析从细胞培养上清液中纯化该抗体。

表 3：引物表

5' -VH 引物组：

VH1,3,5,7: AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG

VH2: CAG(AG)TCACCTTGCTCGAGTCTGG

VH4: CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG

VH4B: CAGGTGCAGCTACTCGAGTGGGG

VH6: CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG

3'-VH 引物：

CGd1 GCATGTACTAGTTTTGTCACAAGATTG

5' VL 引物组：

VL1: AATTTTGAGCTCACTCAGCCCCAC

VL2: TCTGCCGAGCTCCAGCCTGCCTCCGTG

VL3: TCTGTGGAGCTCCAGCCGCCCTCAGTG

VL4: TCTGAAGAGCTCCAGGACCCTGTTGTGTCTGTG

VL5: CAGTCTGAGCTCACGCAGCCGCCC

VL6: CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC

VL7: CAGGTTGAGCTCACTCAACCGCCC

VL8: CAGGCTGAGCTCACTCAGCCGTCTTCC

3' VL 引物：

CL2: CGCCGTCTAGAATTATGAACATTCTGTAGG

参考文献

- Abrignani, Springer Semin.免疫病理学. 19 (1997), 47-55.
- Akatsuka, 肝脏病学 18 (1993), 503-510.
- Bhattacharjee, 遗传病毒学杂志. 76 (1995), 1737-1748.
- Bergeron, 生物化学科学趋势 19 (1994), 124-129.
- Boyer, 临床实验免疫学 83 (1991), 452-459.
- Bredenbeek, 病毒学杂志 67 (1993), 6439-6446.
- Bukh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 (1992), 4942-4946.
- Cerino, 免疫学杂志 147 (1991), 2692-2696.
- Cerino, 免疫学杂志 151 (1993), 7005-7015.
- Chan, 遗传病毒学杂志 77 (1996), 2531-2539.
- Chien, 柳叶刀 342 (1993), 933.
- Choo, 科学 244 (1989), 359-362.
- Choo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 (1994), 1294-1298.
- Conley, 病毒学杂志 70 (1996), 6751-6758.
- Deleersnyder, 病毒学杂志 71 (1997), 697-704.
- Desgranges, 柳叶刀, 8591 (1988), 935-936.
- Dubuisson, 病毒学杂志 68 (1994), 6147-6160.
- Dubuisson, 病毒学杂志 70 (1996), 778-786.
- Emini, 自然 355 (1992), 728-730.
- Farci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 (1994), 7792-7796.
- Farci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1996), 15394-15399.
- Fournillier-Jacob, 医学病毒学杂志 50 (1996), 159-167.
- Fournillier-Jacob, 遗传病毒学杂志 77 (1996), 1055-1064.
- Fouts, 病毒学杂志 71 (1997), 2779-2785.
- Francki, 经典病毒学 2 (1991), 223-233.
- Fuerst, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1986), 8122- 8126.

- Gakoui, 病毒学杂志 67 (1993), 1385-1395.
- Hsu, 肝脏病学 17 (1993), 763-771.
- Fuerst, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 (1986), 8122-8126.
- Lesniewski, 医学病毒学杂志 45 (1995), 415-422.
- Lanford, 病毒学 197 (1993), 225-235.
- Major, 病毒学杂志 69 (1995), 5798-5805.
- Michalak, 遗传病毒学杂志 78 (1997), 2299-2306.
- Miller, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 (1990), 2057-2061.
- Miyamura, 微生物学趋势 1 (1993), 229-231.
- Mondelli, 病毒学杂志 68 (1994), 4829-4836.
- Nakano, 病毒学杂志 71(1997), 7101-7109.
- Putkonen, 自然 352 (1991), 436-438.
- Ralston, 病毒学杂志 67 (1993), 6753-6761.
- Rice, Fields 病毒学, 第三版 Raven Press, New York (1996).
- Rosa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1996), 1759-1763.
- Saito, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 (1990), 6547-6549.
- Sambrook, 分子克隆: 实验手册, 第二版 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York (1989).
- Seigneurin, 科学 221 (1983), 173-175.
- Selby, 遗传病毒学杂志 74 (1993), 1103-1113.
- Shimizu, 病毒学杂志 68 (1994), 1494-1500.
- Shimizu 病毒学 223 (1996), 409-412.
- Weiner, 病毒学 180 (1991), 842-848.
- Wang, 传染病杂志 173 (1996), 808-821.
- Wychowski, EMBO J. 5 (1986), 2569-2576.
- Zibert, 病毒学 208 (1995), 653-661.
- Zibert, 肝脏病学 25 (1997), 1245-1249.

序列表

<110> 康耐克斯研究发展优化有限公司

<110> 国家健康及医学研究院 (INSERM)

<120> 抗丙型肝炎病毒抗体及其用途

<130> B3070PCT

<150> EP 98 11 35 95.7

<151> 1998-07-21

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 324

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 1

tct tac gag ctc acg cag ccg ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag	48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aag caa tat gct	96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala	
20 25 30	
tac tgg tat cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg ttg gtg ata tat	144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr	
35 40 45	
aaa gat aat gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc	192
Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
agg tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa	240
Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu	
65 70 75 80	

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt tct tcc 288
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
 85 90 95

tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 324
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人类

<400> 2

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
 85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 3

<211> 351

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 3

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tat ggt ggg tcc tta agt ggt tac 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Gly Tyr
 20 25 30

ttc tgg acc tgg atc cgc cag tcc ccc ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
 Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg gaa agc aat tat agt gga agt acc agg tac aac ccg tcc ctc aag 192
 Gly Glu Ser Asn Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc cag aac cag ttc tcc ctg 240
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gta tat tac tgt gcg 288
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

aga ggt tgg gcg gtg gac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg 336
 Arg Gly Trp Ala Val Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

gtc acc gtc tcc tca 351
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 4
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Gly Tyr
 20 25 30

Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ser Asn Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Trp Ala Val Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 324

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 5

```

tcc tct gag ctg aca cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag   48
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
   1             5             10            15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aag caa tat gct   96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
      20             25            30

tac tgg tat cag cag aag cca ggc cag gcc cct gtg ttg gtg ata tat   144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
      35             40            45

aaa gat aat gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc   192
Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
      50             55            60

agg tca ggg aca aca gtc acg ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa   240
Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
      65             70            75            80

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gca gac agc agt ggt tct tcc   288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
      85             90            95

tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta                   324
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
      100            105

```

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> 人类

<400> 6

Ser Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Arg Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Ser Ser Gly Ser Ser
85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105



A



B



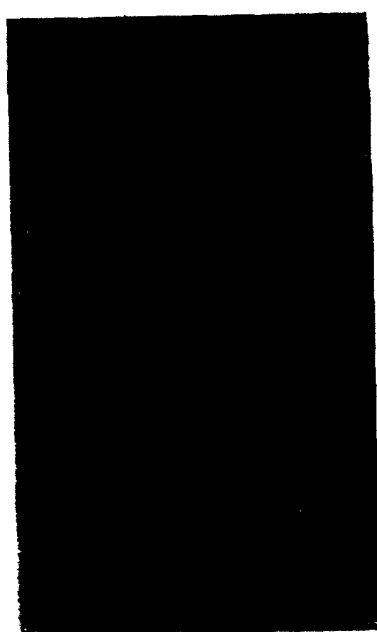
C



D

图

1

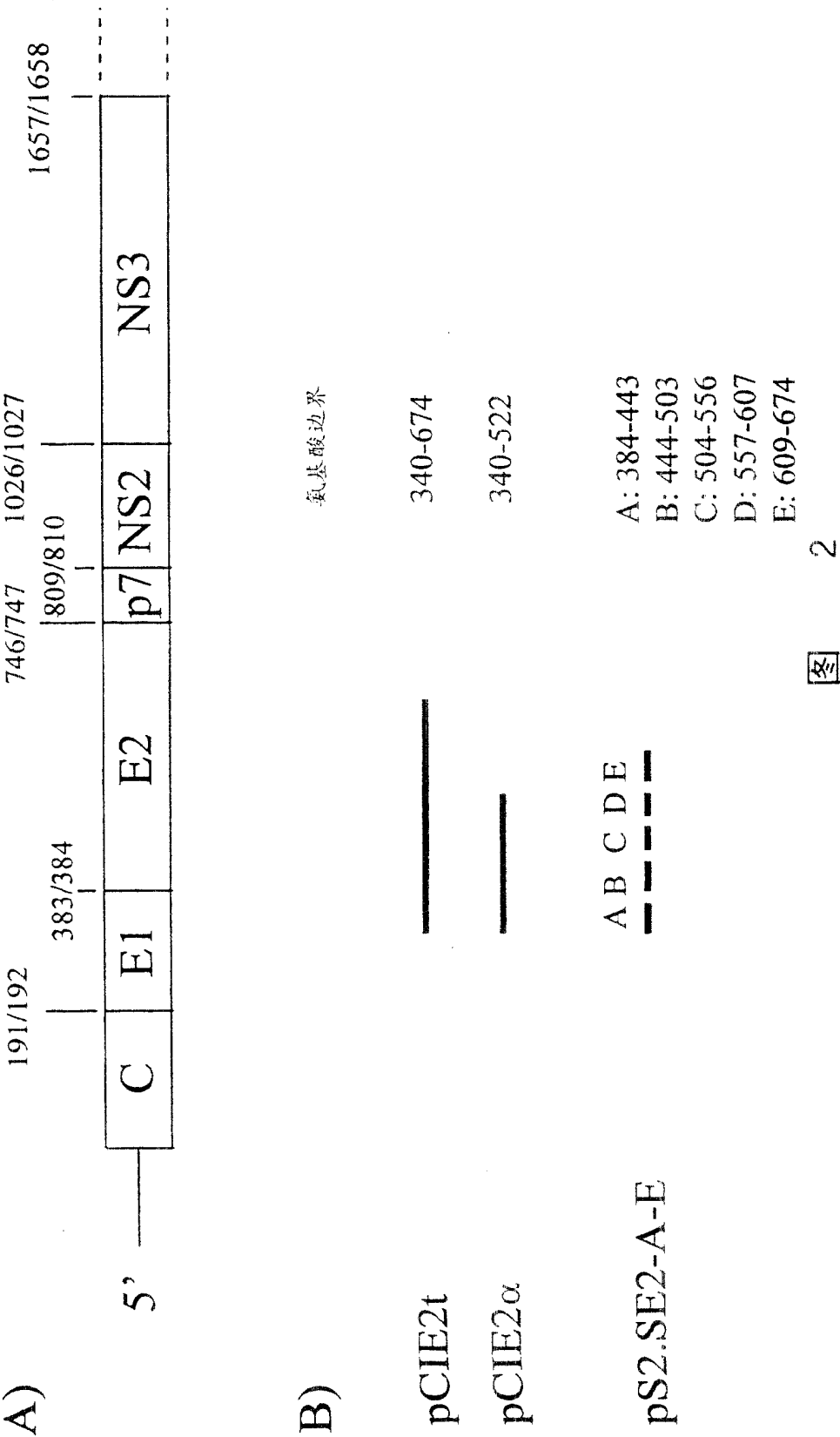


E



F

图 1续



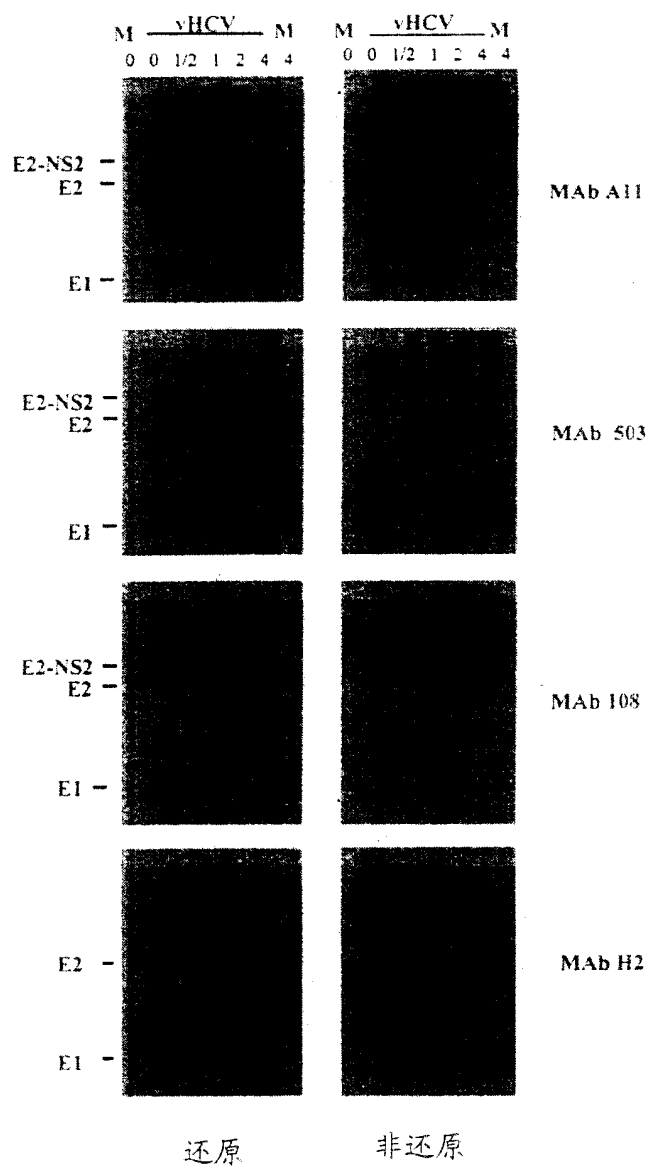
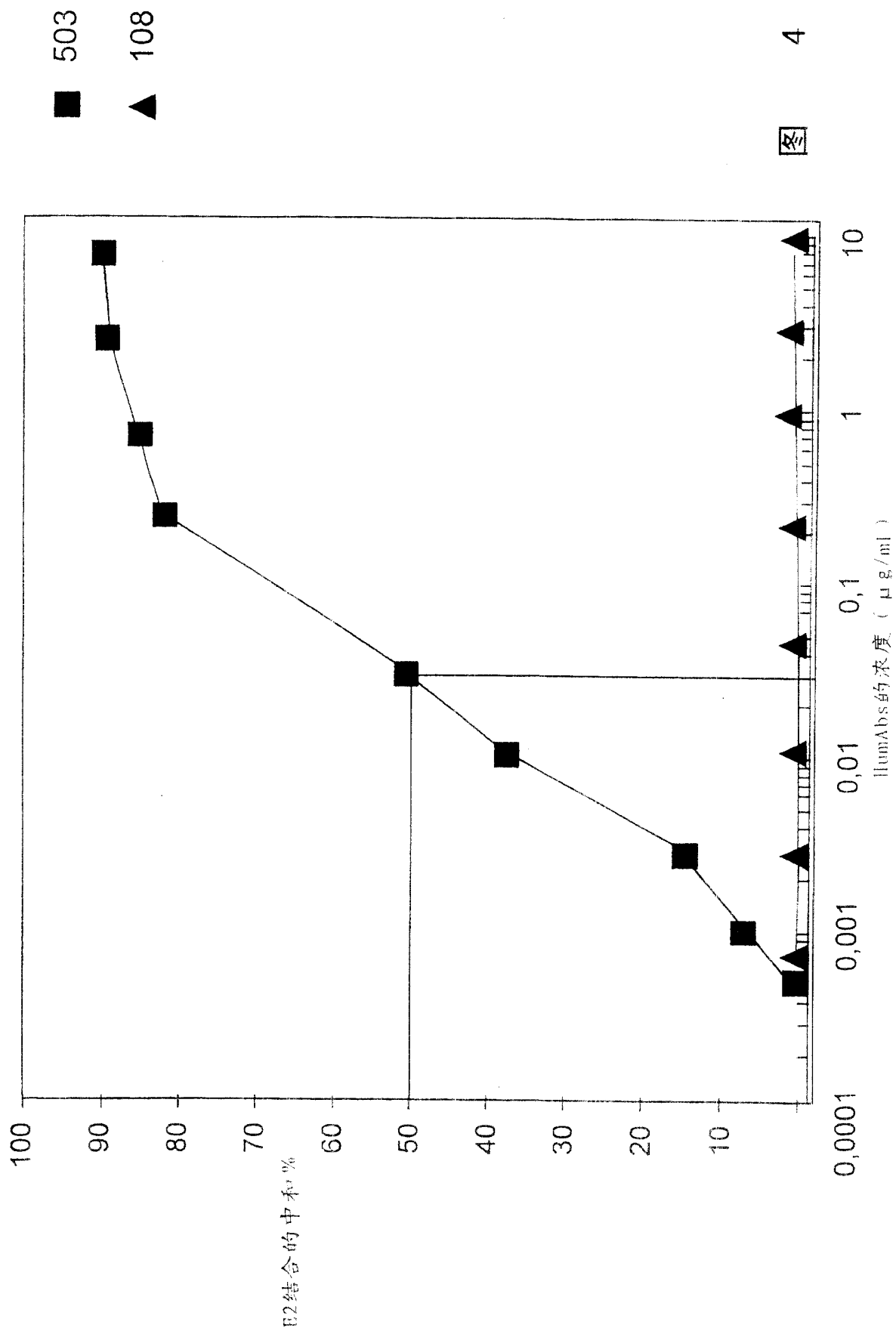


图 3



5'	TCT	TAC	GAG	CTC	ACG	CAG	CCG	CCC	TCG	GTG	TCA	GTG	TCC	CCA	GGA	CAG	ACG	GCC	54
	S	Y	E	L	T	Q	P	P	S	V	S	V	S	P	G	Q	T	A	
	AGG	ATC	ACC	TGC	TCT	GGA	GAT	GCA	TTG	CCA	AAG	CAA	TAT	GCT	TAC	TGG	TAT	CAG	108
	R	I	T	C	S	G	D	A	L	P	K	Q	Y	A	Y	W	Y	Q	
	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	GCC	CCT	GTG	TTG	GTG	ATA	TAT	AAA	GAT	AAT	GAG	AGG	CCC	162
	Q	K	P	G	Q	A	P	V	L	V	I	Y	K	D	N	E	R	P	
	TCA	GGG	ATC	CCT	GAG	CGA	TTC	TCT	GGC	TCC	AGG	TCA	GGG	ACA	ACA	GTC	ACG	TTG	216
	S	G	I	P	E	R	F	S	G	S	R	S	G	T	T	V	T	L	
	ACC	ATC	AGT	GGA	GTC	CAG	GCA	GAA	GAC	GAG	GCT	GAC	TAT	TAC	TGT	CAA	TCA	GCA	270
	T	I	S	G	V	Q	A	E	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	S	A	
	GAC	AGC	AGT	GGT	TCT	TCC	TGG	GTG	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	324
	D	S	S	G	S	S	W	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	

3'



5

5'	9	18	27	36	45	54
CAG	GTG	CAG	CTA	CAG	CAG	CTG
Q	V	Q	L	Q	Q	L
63	72	81	90	99	108	
TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TGG
S	L	T	C	A	V	W
117	126	135	144	153	162	
ATC	CGC	CAG	TCC	CCC	GGG	AGT
I	R	Q	S	P	G	S
171	180	189	198	207	216	
GGA	AGT	ACC	AGG	TAC	AAC	GAC
G	S	T	R	Y	N	D
225	234	243	252	261	270	
ACG	TCC	CAG	AAC	CAG	TTC	ACG
T	S	Q	N	Q	F	T
279	288	297	306	315	324	
GCT	GTA	TAT	TAC	TGT	GCG	GGC
A	V	Y	Y	C	A	W
333	342	351	360	369	378	
CAA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	G
Q	G	T	T	V	T	S



6