

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 9 月 9 日(09.09.2016)



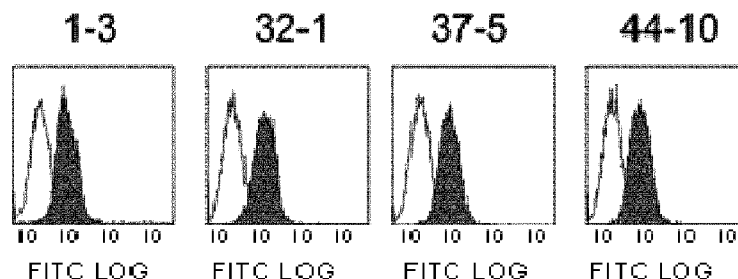
(10) 国際公開番号

WO 2016/139941 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) C12N 15/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/001125
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 2 日(02.03.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-041198 2015 年 3 月 3 日(03.03.2015) JP
- (71) 出願人: 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1010032 東京都千代田区岩本町二丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP). 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 近藤 昌夫 (KONDOH, Masuo); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 深澤 征義 (FUKASAWA, Masayoshi); 〒1628640 東京都新宿区戸山 1-23-1 国立感染症研究所内 Tokyo (JP). 八木 清仁 (YAGI, Kiyohito); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人前田特許事務所 (MAEDA & PARTNERS); 〒5300004 大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 2 番 1 号 新ダイビル 2 3 階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ANTIBODY, FRAGMENT, MOLECULE, AND ANTI-HCV TREATMENT AGENT

(54) 発明の名称: 抗体、フラグメント、分子及び抗 HCV 治療剤



(57) Abstract: Provided is an anti-occludin monoclonal antibody having HCV infection-inhibiting activity. The antibody of the invention is an anti-occludin monoclonal antibody. Alternatively, it is an anti-occludin monoclonal antibody that bonds to human occludin by recognizing an epitope in the extracellular loop of human occludin. Provided is an anti-HCV treatment agent having as an active ingredient a molecule bonded to an anti-occludin monoclonal antibody, rat anti-occludin monoclonal antibody, human chimera anti-occludin monoclonal antibody, humanized anti-occludin monoclonal antibody, anti-occludin single-chain antibody scFv, or epitope of an anti-occludin monoclonal antibody.

(57) 要約: HCV 感染阻害活性を有する抗オクルディンモノクローナル抗体を提供する。本発明にかかる抗体は、抗オクルディンモノクローナル抗体である。また、ヒトオクルディンの細胞外ループ中のエピトープを認識してヒトオクルディンに結合する抗オクルディンモノクローナル抗体である。抗オクルディンモノクローナル抗体、ラット抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒトキメラ抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒト化抗オクルディンモノクローナル抗体、抗オクルディン一本鎖抗体 scFv、抗オクルディンモノクローナル抗体のエピトープに結合する分子を有効成分とする抗 HCV 治療剤が提供される。



WO 2016/139941 A1

明 細 書

発明の名称：抗体、フラグメント、分子及び抗HCV治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、オクルディンモノクローナル抗体、その抗体のフラグメント（Fab fragment等）、抗体のL鎖とH鎖の可変領域が一本鎖として発現させた一本鎖抗体scFv(single-chain variable fragment)、オクルディンエピトープに結合する分子、及びその抗体等を有効成分とする抗HCV治療剤に関する。

背景技術

[0002] C型肝炎ウイルス（以下、本明細書において「HCV」と記載する場合がある）は慢性肝疾患発症の主要因の一つであり、感染者は国内では約150万人に達すると推定される。HCV感染者の約7割は慢性肝炎に進行し、その後20～30年をかけて約半数が肝硬変に、約10%が肝癌に至り、国内の肝癌による年間死亡者数のうち約7割がHCV感染に起因するものとされている。国内のHCV保有者は肝炎の症状を示していないウイルスキャリアーを含めると200万人以上と推定されており、それはこれまでインターフェロン以外の有効な抗ウイルス剤が無かったことが主原因となっている。

[0003] 近年、ウイルス因子を標的とした薬剤（以下、DAA製剤：NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤やNS5A阻害剤、NS5B阻害剤）が開発され、きわめて高い効果を示すことが報告されている。副作用の大きいインターフェロンを用いない治療（インターフェロンフリー療法）も現実的となってきた。しかしながら、DAA製剤では耐性ウイルスの問題が生じる可能性があり、実際に耐性ウイルス株が複数分離されている。またDAA製剤でウイルスを完全に排除できない事例も多数報告されている。そのため、薬剤耐性が生じ難い宿主因子を標的としたアプローチが重要になると考えられる。

[0004] HCVのようにエンベロープを持ったウイルスが宿主の細胞に感染する際は、細胞表面の特異的なタンパク質（ウイルス受容体）に結合し、その後、ウイルス膜と細胞膜が融合してウイルス遺伝子を細胞内に注入する。そのため、H

CVが細胞表面のウイルス受容体に結合し進入するのを阻止できる抗体等が求められる。

[0005] 哺乳動物で発現させたHCVのE2タンパク質がヒト細胞表面に存在するCD81に特異的に結合することが示され、この実験系を用いて、C型肝炎患者からE2タンパク質とCD81との結合を阻害するNOB (neutralisation of binding) 活性を示す抗体の開発がなされている。例えば遺伝子型1aのC型慢性肝炎患者の骨髓リンパ球から抗体遺伝子ライブラリーを作製し、ファージディスプレイ法を用いて、NOB活性を示す抗体が作製されている（特許文献1）。しかし、上記のHCV感染患者からモノクローナル抗体を取得する方法では、HCV感染阻害抗体が存在する患者に限定されること、エンベロープタンパク質は高率に変異すること等から、抗HCV剤として有用な抗体を見出すことが困難である。

[0006] 一方、オクルディン(Occludin)は、細胞間に形成されるタイトジャンクションの主要なタンパク質として知られる。2009年にPlossらによって、オクルディンがHCVの感染受容体の一つであることが示された（非特許文献1）。

[0007] しかしながら、オクルディンは細胞外領域の小さな四回膜貫通タンパク質であること、細胞外領域の種間ホモロジーが高いことから、抗体を含めてオクルディンのバインダーの創製は立ち後れている。細胞膜に存在する複数膜貫通タンパク質であるオクルディンのインタクト細胞外ドメインに対する抗体の作製が困難であることは、例えば非特許文献2, 3に示されている。

[0008] 非特許文献4には、オクルディン細胞外第2ループに対する抗体の作製が記載されている。しかし、この文献では、免疫染色像のデータで、オクルディンの発現のない（低下した）細胞でのシグナル消失（低下）の検証がなく、オクルディンを特異的に認識しているか明らかでない。また、変性オクルディンについての結果であるイムノブロットのデータでは、市販の抗体と同様の位置にバンドが見られることのみを示しており、オクルディンの発現のない細胞や過剰発現の細胞を用いた検討を行っておらず、オクルディンを真に認識しているか明らかでない。更に、異なる分子量の位置に多数のバンドが認められ、特異性に疑問がある。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特表2005-531286号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Nature, 457, 882, 2009

非特許文献2：YAKUGAKU ZASSHI 133(9) 939-945(2013)

非特許文献3：文献2 科学技術動向 2009年10月号 関根進「抗体医薬の現状と課題」4. (3)

非特許文献4：Journal of Histochemistry & Cytochemistry Volume 55(7): 735-744, 2007

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明はかかる問題点に鑑みてなされたものであって、HCV感染阻害活性を有する抗オクルディンモノクローナル抗体、及びその抗オクルディンモノクローナル抗体等を有効成分として有する抗HCV治療剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明にかかる抗オクルディンモノクローナル抗体は、ヒトオクルディンの細胞外ループ中のエピトープを認識してインタクトなヒトオクルディンに結合する抗オクルディンモノクローナル抗体である。

[0013] 本発明にかかる抗オクルディンモノクローナル抗体は、ラット抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒトキメラ抗オクルディンモノクローナル抗体及びヒト化抗オクルディンモノクローナル抗体である。

[0014] また、本発明にかかる抗HCV治療剤は、上述の抗オクルディンモノクローナル抗体、ラット抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒトキメラ抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒト化抗オクルディンモノクローナル抗体若しくはそのフラグメント又は抗オクルディンモノクローナル抗体のエピトープに

結合する分子を有効成分とする。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、HCV感染阻害活性を有する抗オクルディンモノクローナル抗体、抗オクルディン一本鎖抗体scFvが得られる。また、本発明にかかる抗HCV治療剤は、HCV感染阻害活性を有する。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] (A) は各抗オクルディンモノクローナル抗体のVHのアミノ酸配列を示す図である。(B) は各抗オクルディンモノクローナル抗体のVLのアミノ酸配列を示す図である。

[図2]一過性発現した細胞表面オクルディンへの各抗オクルディンモノクローナル抗体の結合をフローサイトメトリー解析により示した図である。

[図3]インタクトな状態で発現している細胞表面オクルディン (Huh7.5.1-8細胞) への各ラット抗オクルディンモノクローナル抗体の結合をフローサイトメトリー解析により示した図である。

[図4]各抗オクルディンモノクローナル抗体の各動物種 (species) オクルディンに対する結合特異性解析結果を示す図である。

[図5]各抗オクルディンモノクローナル抗体のMARVELファミリーへの結合特異性解析結果を示す図である。

[図6]オクルディン第一及び第二細胞外領域欠損変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図7]細胞外領域配列の相同性解析結果を示す図であり、ClustalW2を用いて、ヒトオクルディン、カニクイザルオクルディン、マウスオクルディン、ラットオクルディン、イヌオクルディン、ウシオクルディンのアミノ酸配列の相同性を解析したものである。

[図8]ヒトオクルディン、マウスオクルディン、及び、ヒトオクルディンの第一あるいは第二細胞外領域をマウスオクルディンに置き換えた変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図9]ヒトオクルディンに対して第一細胞外領域をマウス型へ1アミノ酸置換(

あるいは除去・挿入)した各変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図10]ヒトオクルディンに対して第一細胞外領域をウシ型に1アミノ酸置換(あるいは除去・挿入)した各変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図11]オクルディンの第一細胞外領域104番目から115番目のアミノ酸をアラニンに1アミノ酸置換した各変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図12]ヒトオクルディン第二細胞外領域をイヌ型に1アミノ酸もしくは2アミノ酸置換した各変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図13]ヒトオクルディン第二細胞外領域のシステイン残基についてセリン残基に置換した各変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図14]抗オクルディンモノクローナル抗体のヒトオクルディンへの結合力について細胞エライザ (Cell ELISA) で評価した図であり、そのうち(A)はオクルディン非発現の野生型HT1080細胞 (HT1080) であり、(B)はヒトオクルディン発現HT1080細胞 (HT1080/hOCLN) である。

[図15]抗オクルディンモノクローナル抗体によるウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

[図16]抗オクルディンモノクローナル抗体による免疫沈降法 (以下、IP) の結果を示す図である。そのうち(A)はFLAGタグヒトオクルディン発現HT1080細胞についてIPしたサンプルについてオクルディン抗体 (C末認識、市販品) で染色した像であり、(B)は同じサンプルに対して抗FLAG抗体で染色した像である。(C)はFLAGタグマウスオクルディン発現HT1080細胞についてIPしたサンプルについてオクルディン抗体 (C末認識、市販品) で染色した像である。(D)はインタクトなオクルディンを発現するCaco-2細胞を用いてIPしたサンプルについてオクルディン抗体 (C末認識、市販品) で染色した像である。

[図17]Caco-2細胞を用いた、抗オクルディンモノクローナル抗体による免疫染色の結果を示す図である。

[図18]抗オクルディンモノクローナル抗体がバリア機能に与える影響を評価した図である。

[図19]Huh7.5.1-8細胞に対する抗オクルディンモノクローナル抗体による細胞増殖（生存率）に与える影響を評価した図である。

[図20]HCVcc (genotype 2a)を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性であり、細胞内のHCVゲノムRNAの定量結果である。

[図21]HCVpp-H77株 (genotype 1a) を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性を示す図である。

[図22]HCVpp-TH株 (genotype 1b) を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性を示す図である。

[図23]HCVpp-Con-1株 (genotype 1b) を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性を示す図である。

[図24]HCVpp-JFH1株 (genotype 2a) を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性を示す図である。

[図25]HCVpp-J6株 (genotype 2a) を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性を示す図である。

[図26]VSV（ヒト水疱性口内炎ウイルス）を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro VSV感染阻害活性を示す図である。

[図27]HCVcc(NS5A阻害剤耐性変異導入株)を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性であり、細胞内のHCVゲノムRNAの定量結果である。そのうち(A)は野生型(WT)であり、(B)はL31V変異型であり、(C)はY93H変異型である。

[図28]様々なHCVcc株を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害アッセイの免疫染色の結果である。

[図29]様々なHCVcc株を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害アッセイのイムノブロット解析の結果である。

[図30]様々なHCVcc株を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害アッセイにおいてHCV に対する抗体で免疫染色を行った結果である。

[図31]HCVcc(genotype 2a)を用いた抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV cell-to-cell感染阻害アッセイの結果であり、免疫染色の結果である。

[図32]ヒトIgG4変異体キメラ抗体のオクルディン結合特異性解析を示す図である。

[図33]ヒトIgG4変異体キメラ抗体による in vitro HCV感染阻害活性を示す図である。

[図34]オクルディン抗体（1-3, 37-5）を投与したヒト肝キメラマウスにHCV (genotype 1b)を接種した際の継時的なHCVのコピー数を示す図である。

[図35]オクルディン抗体（1-3, 37-5）を投与したヒト肝キメラマウスにHCV (genotype 1b)を接種した際の体重変化を示す図である。

[図36]オクルディン抗体（1-3, 37-5）を投与したヒト肝キメラマウスにHCV (genotype 1b)を接種した際の血中のヒトアルブミン濃度を示す図である。

[図37]オクルディン抗体（1-3, 37-5）を投与したヒト肝キメラマウスにHCV (genotype 1b)を接種した際のAST値を示す図である。

[図38]オクルディン抗体（1-3, 37-5）を投与したヒト肝キメラマウスにHCV (genotype 1b)を接種した際のALT値を示す図である。

[図39]in vivo持続感染状態からのラット抗オクルディンモノクローナル抗体投与の効果を示す図である。

[図40]DAA剤とラット抗オクルディンモノクローナル抗体の併用投与in vivo試験の結果を示す図である。

[図41]オクルディン抗体1-3について、パパイン処理しFab分画を精製したサンプルについてCBB染色で純度を確認している図である。

[図42]作製した抗オクルディンFabフラグメントをフローサイトメトリー解析した結果を示す図である。

[図43]抗オクルディンFabフラグメントによる HCVcc (genotype 2a)におけるin vitro HCV感染阻害活性であり、細胞内のHCVゲノムRNAの定量結果である。

[図44]一本鎖抗体scFvの配列情報を示す図であり、上段はscFv1-3、下段はscFv37-5である。

[図45]各抗オクルディン一本鎖抗体scFvの第一及び第二細胞外領域欠損変異体を用いたフローサイトメトリー解析結果を示す図である。

[図46]HCVpp-JFH1株 (genotype 2a) を用いた各抗オクルディン一本鎖抗体scFvのin vitro HCV感染阻害活性を示す図である。

[図47]西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) ラベルした抗オクルディン抗体1-3について、本抗体のオクルディン発現細胞への結合が抗オクルディン抗体1-3(非標識)で阻害されていることを示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

[0018] (抗体)

細胞膜に存在する複数膜貫通タンパク質であるオクルディンのインタクト細胞外ドメインに対する抗体の作製が困難であり、これまでに細胞外領域を認識するオクルディンリガンド抗体としての報告は皆無である。本発明にかかる抗オクルディンモノクローナル抗体は、オクルディン遺伝子によりコードされるポリペプチドの細胞外領域の立体構造を特異的に認識し、且つ該細胞外領域に結合する。

[0019] オクルディンの細胞外領域には、例えばリガンド結合ドメイン (Ligand binding domain)、第一及び第二の細胞外ドメインのいずれも包含する。モノクローナル抗体、キメラ型抗体、ヒト化抗体は、任意のアイソタイプであることができる。抗体は、例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、あるいはそ

これらの改変体、マウスIgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgD、IgE、あるいはそれらの改変体であってもよい。任意の重鎖は、 κ 又は λ 型の軽鎖と対形成してもよい。抗体にはFabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、又はFvフラグメント、一本鎖抗体scFvが包含される。

[0020] 本発明者らは、抗オクルディンモノクローナル抗体として4つのクローンの作製に成功しており、それぞれ1-3、32-1、37-5、及び44-10と命名している。

[0021] 本発明にかかる抗オクルディンモノクローナル抗体は、オクルディンの第一細胞外領域及び第二細胞外ループ中のエピトープに結合する抗オクルディンモノクローナル抗体である。

[0022] 具体的には、32-1、37-5及び44-10の認識にはヒトオクルディンの第一細胞外領域が必須であり、1-3の認識にはヒトオクルディン第二細胞外領域が必須である。

[0023] 後述するように、第一細胞外ループ中のエピトープは、DRGYGTSLLGGSVGYPYGGSGFGSYGSGYGYGYGYGYGGYTDP (Asp Arg Gly Tyr Gly Thr Ser Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Tyr Pro Tyr Gly Gly Ser Gly Phe Gly Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Thr Asp Pro Arg)(配列番号1)である。また、第二細胞外ループ中のエピトープは、GVNPTAQSSGSLYGSQIYALCNQFYTPAATGLYVDQYLYHYCVVDPQE (Gly Val Asn Pro Thr Ala Gln Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Ser Gln Ile Tyr Ala Leu Cys Asn Gln Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Leu Tyr Val Asp Gln Tyr Leu Tyr His Tyr Cys Val Val Asp Pro Gln Glu)(配列番号2)である。

[0024] 完全な抗体分子は、2つの重(H)鎖可変領域(VH)及び2つの軽(L)鎖可変領域(VL)を有しているところ、1-3では、VHは、QVQLKESGPGLVQPSETLSLTC TVSGFSLSSHVSWVRQPPGKLEWIAAISRGGSTYFNSVLKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTA IYFCIGEDWYFDWGPMTVTSSAであった(配列番号3)。また、1-3では、VLは、YIQMTQSPASLSASPEEIVTITCQASQDIGNWVTWYQQKPGKSPQLLVYSATTLADGIPSRFSGSRSGT QYSLKISRLQVEDTGIYYCLQRYSTPYTFGGGTRLELKRであった(配列番号4)。また、3

2-1では、VHは、EVQLVESGGGLVQPRRSLKLSAASGFTFNKYMAWVRQTPTKGLEWVASISPRGDNGYYSDSVKGRFTISRDNASTQYLQMDSLRSEDTATYYCTTDYGVYWGQGMVTVSSAであった（配列番号5）。また、32-1では、VLは、DVQMTQSLSYLAASPGESVSISCKASTSISNYLAWYQQKPGEAYKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLEPEDFGLYYCQQYYEKPHFTFGAGTKLELKRであった（配列番号6）。また、37-5では、VHは、EVQLVESGGGLLQGRSLKLSCVASGFTFNHYWMTWVRQAPGKGLEWVASITDIGGATYYLASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRSEDTATYYCTRDDGPFAYWGQGLTVTVSSAであった（配列番号7）。また、37-5では、VLは、DIQMTQSPSFLSASVGDRTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAPKLLIYNANSLQTGIPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPEDVATYFCLQHNSWRFTGGGKLELKRであった（配列番号8）。また、44-10では、VHは、EVKLLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFTDFYMNWIRQAAGKAPEWLGFIGNKANGYTTEYIPSVKGRFTISRDNQNLFFLQMNTLRAEDTGTYCARGVGPDPYWGQGMVTVSSAであった（配列番号9）。また、44-10では、VLは、DIVMTQSPSSLAVSAGETVTVNCKSSQSLFSSGNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYLASNKSGAPDRFMGSGSGTDFTLTISSMQAEDLAIYYCQQHYDIPPTFGGKLELKRであった（配列番号10）。

[0025] VH及びVL領域は、相補性決定領域（CDR）に細分することができ、フレームワーク領域（FR）が散在している。本発明者らは、ハイブリドーマmRNAからRACE法（rapid amplification of cDNA ends）にてVH領域及びVL領域の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を解析したところ、図1に示されるとおりの配列であった。

[0026] 抗体のL鎖とH鎖の可変領域が一本鎖として発現させた一本鎖抗体scFv(single-chain variable fragment)は、scFv1-3ではMETDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRAVRSLYIQMTQSPASLSASPEEIVTITCQASQDIGNWVTWYQQKPGKSPQLLVYSATTLADGIPSRFSGSRSGTQYSLKISRLLQVEDTGIYYCLQRYSTPYTFGGGTRLELKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLKESGGLVQPSETSLTCTVSGFSLSSHVSWVRQPPGKGLEWIAAISRGGSTYFNSVLKSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLQTEDTAIYFCIGEDWYFDF WPGTMVTVSSAA RGGP EQKLISEEDL DLNSAVD HHHHHHである（配列番号11）。

またscFv37-5では、METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRAVRSLVPSSDPDIQMTQSPSFLSASVGDRTINCKASQNINRYLNWYQQKLGEAPKLLIYNANSLQTGIPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPE

DVATYFCLQHNSWRTFGGGTLKLELKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGGLLPGRSLKLSVASGFTF
NHYWMTWVRQAPGKGLEWVASITDIGGATYYLASVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRSEDTATYYCTR
DDGPFAYWGQGLTVTVSSAARGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHHである（配列番号12）。

[0027] また、上記一本鎖抗体のアミノ酸配列において、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるものもHCV感染阻害活性を有する抗体として利用可能である。更には、上記一本鎖抗体及び配列が改変された一本鎖抗体に分子タグが付加されたものもHCV感染阻害活性を有する抗体として利用可能である。分子タグとしては、特に限定されるものではないが、例えば、FLAGタグ、Hisタグ、又は、c-Mycタグ等が挙げられる。

[0028] 本実施形態にかかる抗体は、任意の種類の分子と抗体との共有結合により修飾又は複合化された、抗体誘導体を包含することも可能である。このような抗体誘導体として、例えば、アセチル化、グリコシル化、アミド化、PEG化、リン酸化、既知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解的開裂、又は細胞内配位子又は他のタンパク質あるいは低分子化合物への結合により修飾されている抗体が挙げられる。

[0029] 本実施形態にかかる抗体を取得する方法としては、取得したい抗体を産生するハイブリドーマを培養し、得られた培養上清から常法によって抗体を精製して取得することができる。取得したハイブリドーマから抗体を採取する方法は、特に限定されるものではないが、例えば通常の腹水形成法や細胞培養法等を用いることが可能である。腹水形成法においては、例えば、骨髓腫細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内にプリスタン等の鉱物油を投与し、その後ハイブリドーマ $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 個を腹腔内に投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～4週間後に腹水又は血清を採集する。細胞培養法においては、例えば、ハイブリドーマを10～20%仔ウシ血清含有IMDM、RPMI-1640、MEM、E-RDF又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5% CO₂濃度）で3～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得することができる。抗体の精製は、例えば、硫安塩析法、DEAEセルロース等の陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、

プロテインGセファロース等を用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子量や構造によってふるい分ける分子ふるいクロマトグラフィー等の公知の方法を適宜に選択して精製することが可能である。

[0030] また、別の方法としては、取得したい抗体を産生するハイブリドーマから抗体をコードする遺伝子、より詳細には免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子を取得して、該遺伝子を発現するためのベクターを作成し、宿主細胞（哺乳類細胞、昆虫細胞、微生物等）に導入して、該抗体を産生させることも可能である。このとき、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子について、望む形質を導入するための遺伝子改変を行ったり、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域を用いてヒトIgG骨格を有するキメラ抗体あるいはヒト化抗体、低分子抗体やスキャフォールド抗体を作製することは、公知の技術を用いることで、当業者であれば実施することができる。

[0031] また、本発明は、オクルディンエピトープ(epitope)に結合する分子にも関する。エピトープ(epitope)とは、抗体が認識して結合する抗原の特定の構造単位である。抗体は病原微生物や高分子物質等と結合する際、その全体を認識するわけではなく、エピトープを認識して結合し、エピトープは抗原性のための最小単位であり、エピトープに結合する分子は、例えば有機合成化合物やペプチド等である。

[0032] （抗HCV治療剤）

本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、本実施形態にかかる抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒトキメラ抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒト化抗オクルディンモノクローナル抗体若しくはそのフラグメント、一本鎖抗オクルディン抗体scFv又はオクルディンエピトープに結合する分子を有効成分とする。また、本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、これら抗オクルディンモノクローナル抗体等の有効成分と、DAA剤（Direct-acting antiviral agent 直接作用型抗ウイルス剤）とを含むものとすることができる。DAA剤にはNS3/4A阻害剤、NS5A阻害剤、NS5B阻害剤、又はこれらの組み合わせが含まれる。例えば、本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、抗オクルディンモノクローナル

抗体と、NS5B阻害薬及びNS3/4A阻害薬を含むDAA剤を有する抗HCV治療剤として構成することも可能である。

[0033] 本実施形態にかかる抗HCV治療剤の有効投与量は、特に限定されるものではないが、例えば、1回につき体重1 kgあたり0.001～1,000 mgとすることができる。又は、患者あたり0.01～100,000 mg/bodyの投与量とすることができる。また、本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、その投与時期として、疾患の臨床症状が生ずる前後を問わず投与することができる。本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、例えば、1日1～3回、1週間に1～7日投与することが可能である。

[0034] 本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、通常、非経口投与で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注、腹腔内注等）で投与されるが、この投与形態に限定されるものではなく、例えば、経皮、経粘膜、経鼻、経肺、経口等で投与してもよい。

[0035] 本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、微生物の増殖を抑制する防腐剤又はpHを許容範囲に保つのに役立つ緩衝剤を含んでもよい。防腐剤は、アジ化ナトリウム、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール等である。緩衝剤は、リン酸、クエン酸、及びその他の有機酸である。

[0036] また、本実施形態にかかる抗HCV治療剤は、例えば、賦形剤、安定剤、EDTA等のキレート化剤、塩、又は抗菌剤を含んでもよい。他にも、アスコルビン酸及びメチオニン等の酸化防止剤、ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、若しくは非特異的免疫グロブリン等のタンパク質、ポリソルベート、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸、グルコース、マンノース、若しくはデキストリン等の単糖類、二糖類、及びその他の炭

水化物、スクロース、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール等の糖類を含むことが可能である。

[0037] なお、本発明は、C型肝炎の治療に有効な量のラット抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒトキメラ抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒト化抗オクルディンモノクローナル抗体若しくはそのフラグメント、一本鎖抗オクルディン抗体scFv又はオクルディンエピトープに結合する分子及び使用説明書を含む、キットを構成することも可能である。

[0038] なお、HCVには各遺伝子型が知られるが、全ての遺伝子型でオクルディンが感染に関与していることから、ラット抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒトキメラ抗オクルディンモノクローナル抗体、ヒト化抗オクルディンモノクローナル抗体若しくはそのフラグメント、一本鎖抗オクルディン抗体scFv又はオクルディンエピトープに結合する分子は、全ての遺伝子型のC型肝炎の治療に利用可能である。また、抗体には、該抗体と本質的に同等の生物学的活性をもち且つそのアミノ酸配列中1もしくは複数のアミノ酸残基の変異を有する変異体も含まれるものと定義する。

実施例

[0039] 1) 細胞融合

ヒトオクルディン発現プラスミドをWistarラット皮下に免疫し、血清中の抗体価上昇が観察された個体に対し、最終免疫（ブースティング）を行った。最終免疫後、動物からリンパ細胞を回収し、マウスミエローマ細胞（P3U1）と細胞融合を行った。融合後の細胞を96-well plate 10枚に播種し、培養培地1*にて13日間、37℃、5% CO₂下で培養した。

*培養培地1: D-MEM (Wako, 044-29765) + 10% FCS (Hyclone, Lot.FQF24009), 10% BM conditioned H1 Hybridoma cloning supplement (Roche, 1088947), 1×HAT supplement (Life technology, 21060017), 50 µg/mL Penicillin/Streptomycin (Life technology, 15140122), 4 mM L-Glutamine (Life technology, 25030081)

2) 特異モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立

培養後、全てのプレートウェルから培養上清を回収した。チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞、CHO/hOCLN細胞）を用い、上記で回収した培養上清、及びPE標識したPE標識抗ラットIgG抗体で染色し、フローサイトメーター(FCM)解析を行った。ここで、CHO/hOCLN細胞は、CHO細胞にヒトオクルディン遺伝子をコードしたpBOMB0ベクターを遺伝子導入した一過性にヒトオクルディンを過剰に発現した細胞である。

[0040] FCM解析にて、陽性を示すシフトが確認されたウェルから、それぞれハイブリドーマ細胞を回収し、各クローンに関し1.2 cells/wellで96-well plate 1枚に撒き、培養培地1*にて11日間、37 °C、5% CO₂下で培養した。培養後、顕微鏡下でシングルコロニー形成の認められるウェルをプレートあたり20~30選択し、そのハイブリドーマ培養上清を回収した。チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞、hOCLN/CHO細胞）を用い、上記で回収した培養上清、及びPE標識したPE標識抗ラットIgG抗体で染色し、フローサイトメーター(FCM)解析を行った。

[0041] FCM陽性の確認された4クローン分のプレートから、シフト強度が強く、且つ細胞数の多いウェルを各クローン3 wellずつ選択し、24-well plateに37 °C、5% CO₂下で拡大し培養培地1*にて培養を行った。3日間培養後、全てのウェルを6-well plateに拡大し培養培地2*にて培養を行った。3日間培養後、培養上清を回収した。

[0042] また、インタクトな状態のオクルディンへの結合性を調べる目的でHepatoma細胞（Huh7.5.1-8細胞、OKH-4細胞）を用い、上記で回収した培養上清、及びAlexa488標識抗ラットIgG抗体で染色し、フローサイトメーター(FCM)解析を行った。

[0043] ここで、Huh7.5.1細胞は、高分化型ヒト肝癌由来細胞株であり、高いC型肝炎ウイルス（HCV）感染感受性を示す、57歳男性患者の肝癌より分離されたHuh7細胞の亜株である。Huh7細胞よりHCV複製能の高い株としてHuh7.5細胞が分離され、更にHuh7.5細胞にHCV複製システムを導入して樹立した細胞株（HCVレプリコン細胞株）からインターフェロンガンマ処理によりレプリコンを排

除することでHuh7.5.1細胞は樹立された。Huh7.5.1-8細胞は、HCVに対して、より感染感受性が高い細胞亜株としてHuh7.5.1細胞から分離された株である。また、OKH-4細胞は、Huh7.5.1-8細胞由来のオクルディン欠損細胞である。Huh7.5.1-8細胞にヒトオクルディンへの標的配列を含むpX330ベクター（CRISPR/Cas9システム）を遺伝子導入し、樹立されたものである。遺伝子発現解析を行った結果、OKH-4細胞はオクルディンの発現が特異的に欠損していることがわかっている。イムノプロット解析、細胞免疫染色、FCM解析等によってもオクルディンの欠損が確認されている。

[0044] FCM解析の結果、全てのウェルにおいて、オクルディン特異的な陽性を示すシフトが確認された。シフト強度が強く、且つ細胞数の多いウェルを各クローン1 wellずつ選択し、75 cm² Flaskに37 °C、5% CO₂下で拡大し培養培地2*（下記参照）にて培養を行った。3～5日間培養後、150 cm²プレートに拡大し培養培地2*にて培養を行った。5日間培養後、培養上清を回収した。チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞、CHO/hOCLN細胞）、Hepatoma細胞（Huh7.5.1細胞、OKH-4細胞）を用い、回収した培養上清の一部、及びチャイニーズハムスター卵巣細胞ではPE標識、Hepatoma細胞ではAlexa488標識した抗ラットIgG抗体で染色し、FCM解析を行った。この結果、図1に示される合計4クローンにおいて、各クローンで複数の陽性を示すシフトが確認された（図2、図3）。図2は、各抗体クローンの一過性発現したオクルディンの細胞表面への結合をFCMにより解析した結果である。ここで図2において、白で示されたエリア（以下、塗りつぶされていないエリアを意味する。）は、各ハイブリドーマ培養上清によるCHO細胞（オクルディン陰性細胞）の染色パターンであり、右側の塗りつぶされたエリアは、各ハイブリドーマ培養上清によるCHO/hOCLN細胞（オクルディン陽性細胞）の染色パターンである。全てのクローンはCHO/hOCLN細胞（オクルディン発現細胞）への高い結合性（陽性シフト）を示した。図3は、インタクトに発現している細胞表面のオクルディンへの各抗体クローンの結合をFCMにより解析した結果である。ここで図3において、白で示されたエリアは、各ハイブリドーマ培養上清によるOKH-4細胞（オクルディン陰

性細胞)の染色パターンであり、右側の塗りつぶされたエリアは、各ハイブリドーマ培養上清によるHuh7.5.1-8細胞(オクルディン陽性細胞)の染色パターンである。全てのクローンはHuh7.5.1-8細胞(オクルディン陽性細胞)への高い結合性(陽性シフト)を示した。また、培養上清の一部を用いて、Rat immunoglobulin isotyping ELISA kitを用いて培養上清中の抗体のクラス、サブクラス決定を行った。結果を表1に示す。

[0045] [表1]

Project	Clone No.	Isotype
human occludin	1-3	IgG2b
	32-1	IgG2a
	37-5	IgG2b
	44-10	IgG2b

[0046] *培養培地2: D-MEM (Wako, 044-29765) + 10% FCS (Hyclone, Lot.FQF24009), 5% BM condimed H1 Hybridoma cloning supplement (Roche, 1088947), 1×HAT supplement (Life technology, 21060017), 50 µg/mL Penicillin/Streptomycin (Life technology, 15140122), 4 mM L-Glutamine (Life technology, 25030081)

3) 抗オクルディンモノクローナル抗体の各動物種オクルディンに対する結合性解析

ヒトオクルディン (NP_001192183.1)、カニクイザルオクルディン (XP_005557154.1)、マウスオクルディン (NP_032782.1)、ラットオクルディン (NP_112619.2)、イヌオクルディン (NP_001003195.1) 発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。5.0×10⁵ cellsに対し、各抗体5 µg/mLを100 µL添加、攪拌後、氷上で1時間静置した。0.2% BSA-PBSにて1回洗浄後、1% BSA-PBSにて希釈したGoat anti-rat IgG (H+L) -Alexa488抗体 (Life technology

y) を添加、攪拌後、氷上で遮光し30分静置した。0.2% BSA-PBSにて2回洗浄後、0.2% BSA-PBSにて終濃度5 μ g/mLとなるように希釈したPI (Miltenyi Biotec) を加え、FCM解析を行った。結果を図4に示す。いずれの抗体クローンも、ヒトオクルディン、カニクイザルオクルディン結合した。Clone 1-3は、マウスオクルディン、ラットオクルディンに結合性を示したのに対し、他の3クローンでは結合性が確認されなかった。イヌオクルディンに対してどのクローンも結合性を有していなかった。

[0047] 4) 抗オクルディンモノクローナル抗体の各種MARVELファミリーに対する結合性解析

ヒトオクルディン (NP_001192183.1)、ヒトトリセルリン (NP_001231663.1)、ヒトマーベルD3アイソフォーム1 (NP_001017967.2) 発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 $\times 10^5$ cellsに対し、各抗体5 μ g/mLを100 μ L添加、攪拌後、氷上で1時間静置した。0.2% BSA-PBSにて1回洗浄後、1% BSA-PBSにて希釈したGoat anti-rat IgG (H+L) -Alexa488抗体 (Life technology) を添加、攪拌後、氷上で遮光し30分静置した。0.2% BSA-PBSにて2回洗浄後、0.2% BSA-PBSにて終濃度5 μ g/mLとなるように希釈したPI (Miltenyi Biotec) を加え、FCM解析を行った。結果を図5に示す。いずれの抗体クローンも、ヒトトリセルリン、ヒトマーベルD3 アイソフォーム1には結合せず、ヒトオクルディンに特異的に結合した。

[0048] 5) ラット抗体の認識領域配列解析

5-1) ヒトオクルディン細胞外領域欠損体を用いたエピトープ解析

ヒトオクルディン (NP_001192183.1) (Wild type) 及び第一及び第二細胞外領域欠損体 (以下、 Δ EL1、 Δ EL2) ヒトオクルディン発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。5.0 $\times 10^5$ cellsに対し、各抗体5 μ g/mLを100 μ L添加、攪拌後、氷上で1時間静置した。0.2% BSA-PBSにて1回洗浄後、1% BSA-PBSにて希釈したGoat anti-rat IgG (H+L) -Alexa488抗体 (Life technology) を添加、攪拌後、氷上で遮光し30分静置した。0.2% BSA-PBSにて2回洗浄後、0.2% BSA-PBSにて終濃度5 μ g/mLとなるように希釈したPI (Miltenyi B

iotec) を加え、FCM解析を行った。結果を図6に示す。Clone 1-3は、 Δ EL2で結合性が消失し、他の3 Cloneについては、 Δ EL1で結合性が消失した。このことから、Clone1-3は第二細胞外領域、Clone32-1、Clone 37-5、Clone 44-10は第一細胞外領域を認識することが分かった。

[0049] 5-2) オクルディン変異体に対する結合性解析

図7は、細胞外領域配列の相同性解析であり、Clustal W2を用いて、ヒトオクルディン、カニクイザルオクルディン、マウスオクルディン、ラットオクルディン、イヌオクルディン、ウシオクルディンのアミノ酸配列の相同性を解析したものである。第一細胞外ループ中のエピトープは、DRGYGTSLLGGSVGY PYGSGFGSYGSGYGYGYGYGYGGYTDPR(Asp Arg Gly Tyr Gly Thr Ser Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Tyr Pro Tyr Gly Gly Ser Gly Phe Gly Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Gly Tyr Thr Asp Pro Arg)(配列番号1)である。また、第二細胞外ループ中のエピトープは、GVNPTAQSSGSLYGSQIYALCNQFYTPAATGLYVDQYLYHYCVVDPQE (Gly Val Asn Pro Thr Ala Gln Ser Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Ser Gln Ile Tyr Ala Leu Cys Asn Gln Phe Tyr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Leu Tyr Val Asp Gln Tyr Leu Tyr His Tyr Cys Val Val Asp Pro Gln Glu)(配列番号2)であった。

5-3) ヒトオクルディン細胞外領域変異体を用いたエピトープ解析-1

図8は、マウスオクルディンとヒトオクルディンの細胞外領域(第1細胞外領域/第2細胞外領域)についてそれぞれスワップ変異体を作製して解析した結果である。マウスオクルディン(m/m)、又はマウス/ヒトオクルディン(m/h)、ヒト/マウスオクルディン(h/m)、ヒトオクルディン(h/h)発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。 5.0×10^5 cellsに対し、各抗体 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ を $100 \mu\text{L}$ 添加し、5-1)と同様の操作でFCM解析を行った。結果を図8に示す。Clone 1-3に関しては、全てのスワップ変異体で結合性を確認できた。Clone 32-1、Clone 37-5、Clone 44-10に関しては、h/h、h/m変異体に関しては結合性を示したが、m/h及びm/m変異体では結合性は認められなかった。この結果より、Clone32-1、Clone37-5、Clone44-10は、第一細胞外領域にエピ

トープがあり、それはマウス型に変換することで結合性が消失することが分かった。

[0050] 5-4) ヒトオクルディン細胞外領域変異体を用いたエピトープ解析-2

図9は、ヒトオクルディン第一細胞外領域をマウス型に置き換えた（マウス、ラットに共通しない変異は除く）オクルディン各変異体発現細胞への抗体の結合を解析した結果である。ヒトオクルディンの第一細胞外領域のアミノ酸をマウス型に置換した変異体（S96G、L98F、V102L、G103N、 Δ G107、S116G、G119_Y120 insG）発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。 5.0×10^5 cellsに対し、各抗体 $5 \mu\text{g/mL}$ を $100 \mu\text{L}$ 添加し、5-1)と同様の操作でFCM解析を行った。Clone1-3は全ての変異体での結合を確認した。Clone 32-1、Clone 37-5、Clone 44-10に関して、アミノ酸置換体では結合性の変化は認められなかった。しかし、オクルディンの細胞外第一領域107番目のグリシンを欠損させることで結合性の消失（劇的な低下）が確認された。このことから、Clone 32-1、Clone 37-5、Clone 44-10のオクルディンの認識には細胞外第一領域の107番目のグリシンが重要であることが分かった。（なお、第二細胞外領域を認識するClone 1-3は全ての変異体への結合が確認されており、各変異体の細胞表面への発現には問題がないことを示している。）

5-5) ヒトオクルディン細胞外領域変異体を用いたエピトープ解析-3

図10は、ヒトオクルディン第一細胞外領域をウシ型に置き換えたオクルディン各変異体発現細胞への抗体の結合を解析した結果である。ヒトオクルディンの第一細胞外領域のアミノ酸をウシ型に置換した変異体（ Δ S96、L98M、G100A、S101G、G107A、G110A、G129_G130 insT）発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。 5.0×10^5 cellsに対し、各抗体 $5 \mu\text{g/mL}$ を $100 \mu\text{L}$ 添加し、5-1)と同様の操作でFCM解析を行った。Clone1-3は全ての変異体での結合を確認した。Clone 32-1については、G110A変異で大きく結合が低下し、G107A変異で完全に結合性が消失した。Clone 37-5については、G107A変異及びG110A変異で結合性が認められなかった。Clone 44-10に関しては結合性が、G107A変異、G110A変異で確認できた。他の変異体へは3 Cloneとも結合性を

有していた。このことから、Clone 32-1、Clone 37-5のオクルディンの認識には、図9でも示した107番目のグリシンに加え、110番目のグリシンも影響を与えること（特に37-5では認識に必須）が分かった。G110A変異体（110番目のグリシンがアラニンに置換）の認識に両者で差があることから、エピトープが若干異なることが示唆される。また、Clone 44-10のオクルディンの認識では、細胞外第一領域の107番目のグリシンがアラニンになっても認識できる一方で図9より107番目のグリシンが欠損すると認識できないこと、また、110番目のグリシンをアラニンに置換しても認識できることから、Clone 44-10のエピトープはClone 32-1、Clone 37-5とは異なることも分かった。（なお、第二細胞外領域を認識するClone 1-3は全ての変異体への結合が確認されており、各変異体の細胞表面への発現には問題がないことを示している。）

5-6) ヒトオクルディン細胞外領域変異体を用いたエピトープ解析-4

図11は、ヒトオクルディン第一細胞外領域104-115についてアラニン（Alanine, A）に置き換えたオクルディン各変異体発現細胞への抗体の結合を解析した結果である。各アラニン置換変異体（Y104A、P105A、Y106A、G107A、G108A、S109A、G110A、F111A、G112A、S113A、Y114A、G115A）発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。5.0×10⁵ cellsに対し、各抗体5μg/mLを100μL添加し、5-1）と同様の操作でFCM解析を行った。Clone1-3は全ての変異体での結合を確認した。Clone 32-1については、Y104A、P105A、G107A、G108A、F111A変異で完全に結合性が消失した。Clone 37-5については、G107A、G108A、G110A、F111A変異で結合性が認められなかった。Clone 44-10に関しては結合性が、Y104A、G108A、F111A変異で完全に結合性が消失することが確認できた。以上の結果より、Clone32-1、37-5、44-10抗体のエピトープは近傍にあると示唆されるものの、それぞれ異なることが分かった。（なお、第二細胞外領域を認識するClone 1-3は全ての変異体への結合が確認されており、各変異体の細胞表面への発現には問題がないことを示している。）

5-7) ヒトオクルディン細胞外領域変異体を用いたエピトープ解析-5

図12は、第二細胞外領域をイヌ型に置換（マウス、ラットに共通しない変

異は除く)した解析結果である。ヒトオクルディンの第二細胞外領域のアミノ酸をイヌ型に置換した変異体 (S203A、G209S、L215M、T221A、P222S、A223T、V229M、P222S/A223T) を発現させたHT1080発現をトリプシン処理により回収した。5.0×10⁵ cellsに対し、各抗体5μg/mLを100μL添加し、5-1)と同様の操作でFCM解析を行った。Clone 32-1は作製した全てのヒトオクルディン変異体への結合性を確認した。一方、A223T変異を加えることでClone 1-3の結合性の低下が認められ、近傍のP222S変異をさらに加えることで結合性が完全に消失した。このことから、Clone 1-3の認識には、オクルディンの第二細胞外領域のP222、A223が重要であることが分かった。(なお、第一細胞外領域を認識するClone 32-1は全ての変異体への結合が確認されており、各変異体の細胞表面への発現には問題がないことを示している。)

5-8) ヒトオクルディン細胞外領域変異体を用いたエピトープ解析-6

図13は、第二細胞外領域にある2か所のシステイン (Cysteine、C) 残基 (216番目及び237番目) それぞれ、あるいは両方をセリン (Serine、S) に変換した変異体 (C216S、C237S、C216S/C237S) について解析した結果である。各変異体発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。5.0×10⁵ cellsに対し、各抗体5μg/mLを100μL添加し、5-1)と同様の操作でFCM解析を行った。Clone 32-1、Clone 37-5、Clone 44-10については全ての変異体で結合性を確認できた。Clone 1-3では、Cysteine残基に変異を加えることで結合性が消失(劇的に低下)した。このことは、216番目システイン及び237番目のシステインが分子間でジスルフィド結合を形成することで生じるループ構造が、Clone 1-3の認識に重要であることを示唆している。(なお、第一細胞外領域を認識するClone 32-1、Clone 37-5、Clone 44-10は全ての変異体への結合が確認されており、各変異体の細胞表面への発現には問題がないことを示している。)

6) 抗オクルディンモノクローナル抗体の性状解析

6-1) 抗オクルディンモノクローナル抗体の結合力解析

HT1080細胞 (HT1080 cells)、及びhOCLN発現HT1080細胞 (HT1080/hOCLN c

ells) を用いて、各クローンの結合力を細胞エライザ (Cell ELISA) で評価した。コラーゲンコートを行った96well plate (Corning) に各細胞を播種し、37℃で2日間培養した。3.7% Formaldehydeで固定化した後、5% Skim-milkでBlockingし、各精製抗オクルディンモノクローナル抗体を反応させた。洗浄後、ヒツジ抗ラットIgG-HRP (GE Health care) を反応させた。よく洗浄した後、基質であるOPD溶液を加え、十分反応させた後、プレートリーダーで492nmの波長を測定し、各クローンにおける結合力を評価した。コントロールとして、ラットIgG (Jackson Immuno Research) を用いた。HT1080細胞では、どの抗体の濃度でも結合性は認められなかった (図14A)。一方、HT1080/h OCLN細胞では、用量依存的な吸光度の上昇が認められた (図14B)。各抗オクルディンモノクローナル抗体のKd値を算出した。Clone 1-3 : $K_d=0.58 \pm 0.03$ nM、Clone 32-1 : $K_d=0.59 \pm 0.05$ nM、Clone 37-5 : $K_d=0.72 \pm 0.08$ nM、Clone 44-10 : $K_d=0.63 \pm 0.05$ nMであった。各抗オクルディンモノクローナル抗体とも、ヒトオクルディンに対し同等な非常に強い結合力 (K_d :ピコモルオーダー) を保持していた。

- [0051] 6-2) 抗オクルディンモノクローナル抗体を用いたイムノブロット解析
- HT1080細胞並びにFLAGタグを付加したヒト及びマウスオクルディンを発現したHT1080細胞を1% Triton-Xを含むPBSで懸濁し、超音波処理することで細胞溶解液を調製した。ポリアクリルアミド電気泳動後、polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写し、PVDF膜を5% スキムミルク含有T-TBS中でブロッキング (室温、2時間) し、一次抗体 (Mouse 抗OCLN抗体 (invitrogen)、Clone 1-3、32-1、37-5、44-10、mouse 抗FLAG 抗体 (wako)、mouse抗GAPDH 抗体 (abcam) を作用 (室温、2時間) させ、その後二次抗体 (Goat 抗mouse IgG HRP-conjugated (Jackckson)、Goat 抗Rat IgG HRP-conjugated (GE health care)) を作用 (室温、1時間) させ、十分に洗浄した後に、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp) 又はECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp) を添加し、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp)

を用いて抗体認識バンドを検出した。結果を図15に示す。FLAGタグヒトOCLNを発現しているHT1080細胞の溶解液を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、Clone 1-3はOCLNと反応せず、Clone 32-1、37-5、44-10ではヒトOCLNとの反応が観察された。マウスOCLNはラットOCLN抗体では検出できなかった。

[0052] 6-3) 抗オクルディンモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法 (IP) 解析

100mm ディッシュ上でコンフルエントのFLAG (N末) タグヒト及びマウスOCLN発現HT1080細胞又はCaco-2細胞を、IP用RIPA buffer 2mLで溶解し、エッペンドルフチューブに回収した。4°Cで2時間反応後 (上清100 μ LをLysateとして保存)、500 μ Lの抗体溶液を終濃度 1 μ g/ tubeになるように加え、更に4°Cで2時間反応させた。反応させた溶液に、抗体結合性アガロース担体 (ProteinA/G agarose plus, Santa-cruz) を、4°Cで2時間反応させた。反応液を遠心し、未反応の細胞溶解液を除いた。得られた沈殿に対し、IP用RIPA bufferで3回洗浄した後、100 μ Lのサンプルバッファーを加え、泳動サンプルとした。ポジティブコントロールとして、市販のmouse抗OCLN抗体 (OC-3F10、Zymed) を用いた。ネガティブコントロールとしてラットIgG (Jackson社) を用いた。結果を図16に示す。(A)、(B) 双方の結果から、どのクローンでも免疫沈降法に適用できることが示された。マウスOCLN (C) についてはいずれの抗体でも反応性を示さなかった。OCLNをnativeに発現しているCaco-2細胞 (D) については、全てのクローンで免疫沈降法に適用できることがわかった。

[0053] 6-4) 抗オクルディンモノクローナル抗体を用いた免疫染色解析

12穴プレート (FALCON) にカバーガラスをのせて、50 μ g/mLのコラーゲンタイプI (BD Biosciences、溶媒: 0.02M CH_3COOH) を1 mL/well添加した。室温で1時間静置した後、PBSで2回洗浄し、Caco-2細胞を 1×10^5 cells/wellで播種し、72時間前培養した。その後、PBSで2回洗浄を行い、3.7%ホルムアルデヒド (キシダ化学) を500 μ L/well添加し、室温で30分静置することで

固定を施した。その後、PBSで2回洗浄し、0.1%(v/v) Triton-X-100/PBSを500 μ L添加し、10分間静置することで浸透化を施し、PBSで2回洗浄を行った。10 μ g/mLの各種オクルディン抗体を処理し、1 時間反応を行った。その後、ヤギ抗rat IgG-Alexa488 (Life Technologies、1/500 in 1%BSA-PBS) を混和した溶液を500 μ L/well添加し2 時間遮光静置した後、2回洗浄を行った。その後、10 ng/mLのDAPIを添加し、15分室温で静置することで核を染色した。更にPBSによる洗浄を2回行った後、それぞれのカバーガラスをanti-fade (ナカライテスク) を1滴添加したスライドガラスにのせて、封入を行った。共焦点顕微鏡LSM780 (Zeiss) にて蛍光を観察した。結果を図17に示す。いずれのクローンも免疫染色に適用できることが分かった。

[0054] 6-5) 抗オクルディンモノクローナル抗体のバリア機能制御活性解析

ヒト腸管上皮モデルとして汎用されるCaco-2細胞を用いて抗オクルディンモノクローナル抗体のバリア機能制御活性を解析した。Caco-2細胞をtrans well (CORNING) のtop wellに 8×10^4 cells/300 μ Lで播種し、bottom wellには700 μ Lの培地を加え、37°C、5% CO₂環境下で培養した。1日おきにMillicell-ERS (MILLIPORE)で経上皮電気抵抗 (TEER) 値を測定し、培地交換を行い37°C、5% CO₂環境下で培養を続けた。TEER値が安定した細胞播種10日後、抗オクルディンモノクローナル抗体を培地で50 μ g/mLに調製し、また、ネガティブコントロールとしてラット抗体 (Jackson Immuno Research) を、ポジティブコントロールとしてウェルシュ菌の下痢毒素で毒素領域を除いたC-CPEをそれぞれ培地で5.0 μ g/mLに調製し、前培養していた細胞の培地を除いてtop wellに300 μ Lの培地、bottom wellには700 μ Lの抗体希釈液をそれぞれ加え、37°C、5% CO₂環境下で培養し、抗体添加後経時的にTEER値を測定した。その後、top wellの培地、bottom wellの抗体希釈液を除去し、PBSで洗浄した。Top wellは300 μ L、bottom well は700 μ Lの培地に交換し、更に経時的にTEERを測定した。結果を図18に示す。各抗オクルディンモノクローナル抗体を5.0 μ g/mL処理しても影響は見られなかった。

[0055] 6-6) 抗オクルディンモノクローナル抗体の細胞増殖への影響の解析

96穴プレートにHCVのin vitro 感染系で用いられるHuh7.5.1-8細胞を 1.0×10^4 cells/well播種し、一晚培養した。抗オクルディンモノクローナル抗体の抗体希釈液を調製し、細胞の培養上清を除き、各抗体希釈液を100 μ L添加し、4日間培養した。XTT試薬 (Roche) を添加し、37°Cでincubateした。OD450を測定し、抗体非添加群の吸光度を基準として各抗体濃度における吸光度の相対値を求め、生存率とした。結果を図19に示す。抗オクルディンモノクローナル抗体を処理しても細胞の増殖に影響はなかった。

[0056] 7) ラット抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro HCV感染阻害活性解析 (Cell-cultured HCV (HCVcc)を用いた解析)

培地には、10%fetal bovine serum (Cell Culture Bioscience), non-essential amino acid (Hyclone SH30238.01)及びpenicillin/streptomycin(Wako, 168-23191)含有D-MEM (Wako, 044-29765) を用いた。

[0057] コラーゲンタイプIコート48穴プレート (Corning, NC03548) にHuh7.5.1-8細胞を 5×10^4 cells/500 μ L/wellで播種し、37 °C、1日間培養した。培地を除き、4種のオクルディン精製抗体を0.1~5 μ g含む培地 (250 μ L) を添加し、室温 (25 °C)で30分培養した。

[0058] その後、HCVcc (genotype 2a)を50倍希釈したものをそれぞれ250 μ L/well添加し、室温で2時間培養した。血清を含まない培地500 μ L/wellで3回洗浄し、前処理の1/2の濃度にした抗体液500 μ Lを加え、37 °Cで4日間培養した。

[0059] 細胞をPBS 500 μ L/wellで3回洗浄し、Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (FAVORGEN)を用いRNA抽出・精製を行い、滅菌水50 μ Lで溶解し、-80°Cで保存した。尚、RNA濃度は、Nano Dropを用いて測定した。

[0060] 精製したRNAを用いて、Taqman qRT-PCR法 (試薬はRNA-direct Realtime PCR Master Mix(Toyobo)、機器はLightCycler (Roche)) にてHCVゲノムRNA定量を行った。尚、反応溶液は、表2の組成に準じて調整した。

[0061]

[表2]

組成	Volume(μ L)
Distilled Water	2.4
RNA direct realtime PCR master mix	10
50mM Mn(AcO) ₂	1
Sense Primer 10 μ M	0.6
Antisense Primer 10 μ M	0.6
Taqman Probe 10 μ M	0.4
RNA sample	5

[0062] 尚、Sense Primerは5' -ACGGGGTTAATTATGCAACAGG-3' (配列番号13) であり、Anitisense Primerは5' -ACGGTGATGCAGGACAACAG-3' (配列番号14) であり、Taqman Probeは5' -[6-FAM]AGCAAGAAGATAGAAAAGGGGAAACCGGGTAG[TAMRA-6-FAM]-3' (配列番号15) であった。

[0063] 結果を図20に示す。ここで図20は、HCVcc (genotype 2a)を用いたin vitro HCV感染阻害活性であり、細胞内のHCVゲノムRNAの定量結果である。データは抗体非添加群のHCV ゲノムRNAコピー数に対する割合 (mean $\pm$ SD) で表記した (n=4) 。破線はバックグラウンドを示している。

[0064] HCVcc感染系にて、抗オクルディンモノクローナル抗体のHCV感染阻害活性を解析したところ、いずれのクローンも添加濃度依存的に細胞内のHCV RNA量が低下しており、顕著な感染阻害作用が認められた (図20) 。尚、感染阻害活性は、1-3>37-5=44-10>32-1の順であった。

[0065] 8) ラット抗オクルディンモノクローナル抗体のin vitro感染阻害活性解析 (HCV pseudoparticles (HCVpp, genotype 1a、1b及び2a) を用いた解析)
Huh7.5.1-8細胞を 1×10^5 cells/well/500 μ Lで48穴プレートに播種し、一晚培養した。抗オクルディンモノクローナル抗体を培地で各濃度に調製し、前培養していた細胞の培地を除いて250 μ L/wellの抗体溶液を加え、室温で30分静置した。なお、各抗体は0、0.25、2.5 μ g/wellで作用させた。

[0066] HCVpp (genotype 1a (H77株)、1b (TH株、Con-1株)又は2a (JFH-1株、J6株)、Microbe and Infection 15, 45-55, 2013に従い調製)あるいはVSV (水疱性口炎ウイルス)をそれぞれ250 μ L/well添加し、37 $^{\circ}$ Cで6時間培養した。

血清を含まない培地500 μ L/wellで3回洗浄し、前処理の1/2の濃度にした抗体液500 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで3日間培養した。

[0067] 培地を除去後、Lysis Buffer (Promega) を100 μ L/well加え、溶解液を1.5 mLチューブに回収し、10,000 rpm、1分間遠心し、氷上に置いた。本上清10 μ Lと発光基質(ピッカジーン)50 μ Lを混ぜ、Luminescencer-PSNで発光強度の測定を行った。

[0068] 結果を図21、図22、図23、図24、図25及び図26に示す。図21は、HCVpp (genotype 1a)、図22は、HCVpp (genotype 1b-TH)、図23は、HCVpp (genotype 1b-Con-1)、図24は、HCVpp (genotype 2a-JFH1)、図25はHCVpp (genotype 2a-J6)、図26は、VSVに対する感染阻害活性を示す図である。データは抗体非添加群のルシフェラーゼ活性に対する割合 (mean $\pm$ SD) で表記した (n=3)。抗オクルディンモノクローナル抗体は評価した全てのgenotype で、添加量依存的な感染阻害活性を示した。またオクルディンを介さずに細胞内へ侵入するVSVに関しては感染阻害活性をいずれの抗体でも確認できなかった。なお、感染阻害活性は、1-3>44-10 $\geq$ 37-5>32-1の順であった。阻害活性の強さの順番は上記7)のHCVccの結果(図20)とよく相関していた。

[0069] 9) NS5A阻害剤耐性変異導入ウイルス株における抗オクルディンモノクローナル抗体の感染阻害能の解析

NS5A阻害剤耐性変異は、インターフェロン耐性のHCV genotype 1bについて数多く報告されている。しかしながらHCV genotype 1bについて全長のレプリコンを用いたin vitroにおけるウイルスの生活環を効率的に再現する評価系は確立されていない。そこで、in vitroで広く汎用されているJFH-1株 (HCV genotype 2a) のNS5A領域について、genotype 1bのCon-1株に置換したキメラ全長レプリコン (JFH-1/NS5A-Con-1) を野生株として用いた。キメラ全長レプリコンのNS5AにNS5A阻害剤耐性変異であるL31V変異、Y93H変異を加え、抗オクルディンモノクローナル抗体における感染阻害能を評価した。トリプシン処理で回収したHuh7.5.1-8細胞をK-PBS 5mLで1回洗浄した後、細胞数がおおよそ 2×10^7 cells/mLになるようにした。0.4cmキュベットにこれらの細胞を5

00 μ Lとin vitroで合成したHCV RNAを50 μ g加えて氷上で5分間静置した。エレクトロポレーションを行う前にサスペンドして細胞を再懸濁した。Gene Pulser X cell (Bio Rad) を用いて 975 μ FD, 290mVの条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後、1.5 mLの血清培地を加え15分間静置した。トランスフェクションした細胞を50mL コニカルチューブに移して室温、200 $\times$ g、5分間で細胞を沈殿させた。沈殿させた細胞は10 mLの培地でサスペンションした後、 3×10^6 cells/dishをコラーゲンコート10 cm²ディッシュに播いて37°Cで培養した。翌日（24時間以上）に血清培地を取り除き、新しい血清培地を加えて37°Cで更に4日間培養した。回収したウイルス上清はMillex-HV 0.45 μ m (Millipore)で濾過した後に、Amicon Ultra-15 (Millipore)を用いて約10倍ウイルス液の濃縮を行った。以降の操作は前項のCell culture derived HCV (HCVcc)を用いた感染阻害活性解析に準ずる。ポジティブコントロールとして、クラウディン-1 抗体 (Anti-CL1 Clone 2C1) を用いた。結果を図27に示す。破線はバックグラウンドを示している。検討した抗オクルディンモノクローナル抗体Clone 1-3 及びClone 44-10では、NS5A阻害剤耐性変異導入株に対しても感染阻害活性を有していた。NS5A阻害剤はウイルスを標的にしているのに対し、抗オクルディンモノクローナル抗体は宿主因子を標的にしていることから、NS5A阻害剤耐性変異導入株に対しても感染阻害活性を有することは予想されることであり、他のDAA剤耐性ウイルスにも広く有効であることが強く予見される。

[0070] 10) オクルディン抗体による様々なHCVcc株に対する感染阻害解析

HCVccのシステムにおいて、細胞培養で感染系が確立しているTNS2-J1 (Genotype 1b/2a) とJc-1 (Genotype 2a)の感染に対して、オクルディン抗体で阻害ができるか評価した。評価系としては蛍光蛋白質の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察することでHCV感染を判断できる実験系を用いた。Interferon- β promoter stimulator -1 (IPS-1)は、ミトコンドリア外膜上に存在する膜蛋白質で、RNAウイルス感染時にIFN- β 産生に関与することで自然免疫を誘導する。HCVの非構造蛋白質であるNS3/NS4Aはプロテアーゼ活性を有しており、IPS-

1切断活性を有している。HCV感染時、HCVはIPS-1を切断することにより、IFN- β の産生を阻害していることが報告されている。蛍光蛋白質融合遺伝子mCherry-NLS-IPS-1は、赤色の蛍光蛋白質mCherry、核移行シグナル(Nuclear localize signal, NLS)、そしてIPS-1を含む遺伝子である。HCV感染により、産生されるNS3/NS4Aにより細胞質側に存在するIPS-1が切断され、NLSにより核へ蛍光蛋白質が移行する。この細胞内における蛍光蛋白質の挙動変化(核への移行)を観察することでHCVの感染を評価できる。また、HCV感染性はイムノブロット解析を用いた方法でも評価した。コントロールとしては、HCV-JFH1を用いた。結果を図28、図29に示す。未処理又はコントロール抗体添加群ではいずれもHCV感染を示す蛍光蛋白質の核への移行が全ての細胞で起こっていた。オクルディン抗体1-3を処理することにより、核への移行が全ての種類のウイルスで完全に抑えられた。オクルディン抗体37-5、44-10についてもごく一部感染が起こっているものの大部分の感染を抑制していることが分かった。オクルディン抗体32-1では、TNS2-J1株では蛍光蛋白質の核への移行を全て阻止したが、Jc-1では半分程度感染が確認された。イムノブロット解析及びHCV coreに対する免疫染色でも同様な結果が得られた(図29及び30)。以上の結果より、樹立抗体、特に1-3は様々なHCVcc感染を阻害できるプローブであることを確認した。

[0071] 11) オクルディン抗体によるHCV Cell-to-cell感染阻害解析

HCVには、受容体依存性エンドサイトーシスを介した侵入(Cell-free感染)に加えて、直接細胞から細胞へ移動して広がる感染(Cell-to-cell 感染)が存在する。Cell-to-cell感染は、生体内の持続感染時の感染維持に特に重要と考えられている。In vitro感染培養細胞系では、Cell-free感染とCell-to-cell感染が起こっている。そこでCell-to-cell感染を特異的に評価するために、侵入受容体の一つであるCD81を欠損しているためCell-free感染を起こさないCD81欠損細胞(751r細胞)を用いた。検出系としては、前項の複製能評価システムを用いた。本項ではまず、Cell-free感染を起こさない751r細胞にmCherry-NLS-IPS-1を導入しレポーター細胞を樹立した。本評価系を用いて

、Cell-to-cell感染をオクルディン抗体が阻害できるか評価した。HCV-JFH-1感染させたHuh7.5.1-8細胞と751r/ mCherry-NLS-IPS1細胞を共培養することで、Cell-to-cell感染が起こる条件とした。結果を図31で示す。ラットコントロール抗体処理群では、赤色の蛍光蛋白質の核への移行が確認された。一般にCell-free感染に比べ、Cell-to-cell感染は起こりにくいことが知られており、今回の系でも感染は弱く、Huh7.5.1-8細胞と接している751r/ mCherry-NLS-IPS1細胞の一部に感染が広がっているのが見られるのみであった。オクルディン抗体クローン1-3とクローン 37-5処理群では、非感染群と同様に、全て赤色の蛍光蛋白質は細胞質側に局在したままであった(図31)。即ち、オクルディン抗体により、Acceptor細胞である751r/mCherry-NLS-IPS-1細胞内へのHCVの移行が阻止されたことを示している。このことから、オクルディン抗体1-3及び37-5は、Cell-to-cell感染を阻害することがわかった。

[0072] 1 2) ヒトIgG4変異体キメラ抗体の作製

1 2-1) 発現ベクター作製

IgG4は、重鎖定常領域内にある228番目のSerをProに置換することで生体内安定性が向上することが知られている(Immunology, 105, 9-19, 2002)。そこで、228番目のSerをProに置換するようにプライマーを設計し、pFUSE-CHIg-hG4 (Invivogen) を鋳型にNhe I サイト及びBsrG I サイト間の682 bpをPCR法により増幅、PCR産物を電気泳動により分離後、精製しpFUSE-CHIg-hG4mを得た。尚、変異挿入部上流のプライマーにはNhe I サイト、下流のプライマーにはBsrGIサイトを付加した。

[0073] 各抗体クローンの可変部領域のVL領域及びVH領域のアミノ酸をコードする遺伝子をPCR法により増幅した。なお、VL遺伝子の上流にAge I サイト、下流にBsiW I サイト、VH遺伝子の上流にEcoR I サイト、下流にNhe I サイトを付加した。PCR産物を電気泳動により分離・精製した。

[0074] 増幅したVL遺伝子及びヒトIgG kappa鎖定常領域をもつクローニングベクターであるpFUSE2-CLIg-hk (Invivogen) をAge I 及びBsiW I で処理後、ライゲーションした。増幅したVH遺伝子及びpFUSE-CHIg-hG4mをEcoR I 及びNhe I で

処理後、ライゲーションした。各ライゲーション産物をコンピテントセルDH5 α にトランスフォーメーションし、独立に大腸菌クローンを培養、プラスミドDNAを回収後、シーケンスを確認し、pFUSE2-CLIg-hk-anti-オクルディン及びpFUSE-CHlg-hG4m-anti-オクルディンを得た。

[0075] 1 2-2) ヒトIgG4変異体キメラ抗体の精製

培養用6 穴プレートに 2×10^5 cells/wellのCHO-K1細胞を播種し、37 °C、5 % CO₂環境下でサブコンフルエントになるまで培養した。作製した発現ベクター $2 \mu\text{g}$ (pFUSE2-CLIg-hk-anti-オクルディンを $1.2 \mu\text{g}$ 、pFUSE-CHlg-hG4mutant-anti-オクルディンを $0.8 \mu\text{g}$) をOpti-MEM1 (GIBCO) $100 \mu\text{L}$ 及びFuGENE (登録商標)HD Transfection Reagent (Roche) $4 \mu\text{L}$ と混合し、15分間常温静置した。CHO細胞の培地を交換し、上記の混合液をウェルに全量加えた。その後、2日間、37 °C、5% CO₂環境下で培養し、上清を回収した。

[0076] 1 2-3) 各種オクルディンに対する結合性解析

HT1080細胞、ヒトオクルディン及びマウスオクルディン発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。 5.0×10^5 cellsに対し、前項で作製したヒトIgG4変異体キメラ抗体を含む培養上清を $100 \mu\text{L}$ 添加し、攪拌し氷上で1時間静置した。0.2% BSA-PBSにて1回洗浄後、1% BSA-PBSにて希釈したGoat anti-human IgG (H+L) -FITC抗体 (Jackson Immuno Research) を添加、攪拌、氷上で遮光し30分静置した。0.2% BSA-PBSにて2回洗浄後、0.2% BSA-PBSにて終濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈したPI (Miltenyi Biotec) を加え、FCM解析を行った。結果を図32に示す。作製した全てのキメラ抗体でヒトオクルディンへの結合性を示した。またClone 1-3をキメラ化したものでは、図4に示したラット抗体の場合と同様に、マウスオクルディンへの結合性も認められた。以上の結果から、それぞれのクローンのCDR領域がヒトオクルディン結合に必須であり、その結合性状を反映していることが示された。

[0077] 1 2-4) ヒトIgG4変異体キメラ抗体によるin vitro HCV感染阻害

7) と同様の方法にて、ヒトIgG4変異体キメラ抗体のin vitro HCV感染への影響を検討した。結果を図33に示す。ここで図33は、HCVcc (genotype 2a)

を用いたin vitro HCV感染阻害活性であり、細胞内のHCVゲノムRNAの定量結果である。データは抗体非添加群のHCV ゲノムRNAコピー数に対する割合 (mean $\pm$ SD) で表記した (n=4)。破線はバックグラウンドを示している。

[0078] HCVcc感染系にて、抗オクルディンヒトIgG4変異体キメラ抗体のHCV感染阻害活性を解析したところ、Xi 1-3, Xi 37-5ともに添加濃度依存的に細胞内のHCV RNA量が低下しており、ラット抗体と同様に、顕著な感染阻害作用が認められた (図33)。尚、感染阻害活性の強さは、1-3>37-5であった。

[0079] 13) ラット抗オクルディンモノクローナル抗体のin vivo HCV感染阻止試験

HCV (genotype 1b)を投与したヒト肝臓キメラマウスを用いて、ラット抗オクルディンモノクローナル抗体のin vivo感染阻害活性を解析した。ヒト肝臓キメラマウス (uPA-SCIDマウスより作製) は株式会社フェニックスバイオより入手した。雄性、12~16週齢、体重15g以上、血中ヒトアルブミン7.0 mg/mL以上の個体を選択した。群編成では、体重及び血中ヒトアルブミン濃度の平均値を考慮してマウスを3群(Control抗体を4匹、オクルディン抗体投与の2群については3匹)に振り分けた。

[0080] Control抗体、Clone 1-3又はClone 37-5を、マウスに腹腔内投与した。初回投与日をday 0とし、抗体投与量はday 0に50mg/kg、day3に30mg/kg、day7に20mg/kg、day10に10mg/kgとした。抗体投与液の希釈には生理食塩水を用いた。

[0081] 初回抗体投与の8時間後にマウスにイソフルラン麻酔を施し、生理食塩水で 1.0×10^5 copies/mLに調製したHCV (genotype 1b) 100 μ Lを眼窩静脈叢から接種した。

[0082] コントロール抗体、Clone 1-3又はClone 37-5を投与したマウス血清を経日的に回収し、血清中HCV RNA量を測定することでHCV感染阻害活性を評価した。結果を図34に示す。Control抗体投与マウスではday14以降全てのマウスでウイルスRNAが検出され、Day21以降はウイルスRNA量が約 10^7 copies/mLを示しプラトーに達したのに対して、Clone 1-3又はClone 37-5を投与した全てのマ

ウスでウイルスRNA量が定量限界以下のままであった。以上の結果から、ラット抗オクルディンモノクローナル抗体Clone 1-3又はClone 37-5投与により、HCV感染が完全に阻止できることが示された。

[0083] 詳細な手順、他の結果を以下に示す。

[0084] day0、day3、day7、day10、day14、day21、day28、day35、day42に、マウスの一般状態を観察し、体重を計測した。なお、day0、day3、day7、day10は抗体投与前に行った。

[0085] day0、day3、day7、day10、day14、day21、day28、day35、day42に採血を行った。なお、day0、day3、day7、day10は抗体投与前に、マウスにイソフルラン麻酔を施し、眼窩静脈叢より採血した。

[0086] day0、day7、day14、day21、day28、day35、day42の採血液を用いて血清中HCVゲノムRNA量を測定した。採取した血清5 μ LからSepsGene RV-R（エーディア株式会社、東京）を用いてRNA抽出を行い、RNAを1 mM DTT（プロメガ株式会社、東京）と0.4U/ μ L ribonuclease inhibitor（タカラバイオ株式会社、滋賀）を含む10 μ LのNuclease-free water（Life Technologies Corporation、CA、USA）に溶解した。PCR反応液は、溶解したRNA原液もしくは希釈したRNAを2.5 μ LとTaqMan EZ RT-PCR Core Reagents（Life Technologies Corporation）を用いて調製した。PCR反応と解析にはABI Prism 7500（Life Technologies Corporation）を用いた。RT-PCR反応は、50 $^{\circ}$ C 2分 $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 30分 $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 5分 $\rightarrow$ （95 $^{\circ}$ C 20秒 $\rightarrow$ 62 $^{\circ}$ C 1分） $\times$ 50サイクルで行った。

[0087] day0、day7、day14、day21、day28、day35、day42の採血液を用いて血中ヒトアルブミン濃度を測定した。血液2 μ Lを緩衝液（LX試薬栄研シリーズ共用緩衝液、栄研化学株式会社、東京）と混合し、370 $\times$ g、3分間の遠心分離を行った後、ラテックス凝集免疫比濁法（LX試薬' 栄研' Alb-II、栄研化学株式会社、東京）を用いて、吸光マイクロプレートリーダー（Vmax、日本モレキュラーデバイス株式会社、東京）で測定した。

[0088] day0、day7、day14、day21、day28、day35、day42の採血液を用いて血清中ALT及びAST活性を測定した。採取した血清10 μ Lを生理食塩液で希釈し、POP

・POD・ロイコ色素法（ピルビン酸オキシダーゼにより発生する過酸化水素とペルオキシダーゼによりジアリールイミダゾールロイコ色素を青色に発色）により、ドライケム3500（富士フィルム、東京）を用いて測定した。

[0089] 結果を図35～図38に示す。ここで図35は、HCV (genotype 1b)を投与したヒト肝キメラマウスに各種抗体を投与した際の体重変化である。図36は、HCV (genotype 1b)を投与したヒト肝キメラマウスに各種抗体を投与した際の血中のヒトアルブミン濃度である。図37は、HCV (genotype 1b)を投与したヒト肝キメラマウスに各種抗体を投与した際のAST値である。図38は、HCV (genotype 1b)を投与したヒト肝キメラマウスに各種抗体を投与した際のALT値である。

[0090] 抗オクルディン抗体投与による一般状態の変化、体重減少、血中ヒトアルブミン濃度減少、AST値、ALT値の有意な増加等は認められなかったことから、Clone 1-3及びClone 37-5は安全性及び有効性を兼ね備えた感染阻害分子であると考えられた。

[0091] 14) In vivo持続感染状態からのラット抗オクルディンモノクローナル抗体投与の効果

13)の実験で、コントロール抗体を投与した4匹はHCV持続感染状態になっている。これらのマウスに対するラット抗オクルディン抗体1-3及びマウス抗クローディン1抗体3A2の効果を検討した。抗体の投与は、Day42(0), 45(3), 49(7), 52(10)に、各30mg/kgを腹腔内投与で行った（各2匹ずつ）。投与開始後、1週間ごとに採血をし、血中HCV量を測定した（方法は13)と同様）。結果を図39に示す。クローディン1抗体3A2投与マウスではウイルスRNA量に変動がみられなかったのに対して、オクルディン抗体1-3投与マウスではウイルスRNA量が低下する傾向がみられ、投与を中止すると、10日ほど遅れてウイルスRNA量が元に戻ることが確認された。以上の結果から、ラット抗オクルディン抗体1-3は、HCV持続感染からでも血中ウイルス量低下させることができることが示された。

[0092] 15) DAA剤とラット抗オクルディンモノクローナル抗体の併用投与in viv

o試験

HCV (genotype 1a)を持続感染させたヒト肝臓キメラマウスを用いて、DAA剤 (Direct-acting antiviral agent(直接作用型抗ウイルス剤), Nesbuvir, NS5B阻害剤) とラット抗オクルディンモノクローナル抗体の併用投与試験を行った。基本的な操作は13) 14) と同様である。Nesbuvirのみ投与群 (101~104)、Nesbuvir+オクルディン抗体1-3投与群 (201~204) とした。Nesbuvirは毎日2回50mg/kg投与、オクルディン抗体1-3はDay0, 3, 7に30mg/kg投与で行った。結果を図40に示す。Nesbuvir単独投与群では、全てのマウス (101~104) でブレイクスルーがみられ、薬剤を投与しているにもかかわらず血中ウイルス量が上昇した (おそらく耐性ウイルスが増殖している)。一方で、Nesbuvir+オクルディン抗体1-3併用投与群では、1匹(201)が原因不明で死亡し、血中ウイルス量があまり下がらなかった1匹(204)では弱いブレイクスルー傾向がみられたが、残り2匹(202, 203)ではブレイクスルーがみられなかった。以上の結果から、オクルディン抗体1-3併用投与により、ブレイクスルー (耐性ウイルスの発生) を阻止できる可能性が示された。つまり、オクルディン抗体はDAA剤との併用で、有用な併用効果を示すことが考えられた。

[0093] 16) 抗オクルディン抗体FabフラグメントによるHCVcc感染阻害アッセイ

16-1) 抗オクルディン抗体Fab 1-3の作製

15ml tube (FALCON) に抗オクルディン抗体Clone1-3を消化用バッファー (20 mM sodium phosphate, 10mM EDTA, 20mM Cysteine; pH 7.0) に溶解させ、Immobilized Papain (Agarose Resin) (GE health care) を加えた。37℃で、4時間インキュベートさせた。その後10mM Tris-HCl (pH7.5)を1.0ml加え、遠心し上清を回収した。回収したサンプルをAb-Rapid SPiN (プロテノバ) に加え1時間反応させた。カラムを遠心し、通過区分をFab区分として回収した。その後PD10カラム (GE-Health care) でPBSに置換した。得られた目的タンパク質溶液をもちいて、還元条件下のSDS-PAGEを行った。結果を図41に示す。目的の位置にFabのバンドを確認した。未消化のFull-body及びFcのバンドは確認できなかった。

[0094] 16-2) 抗オクルディン抗体Fab1-3のオクルディン結合能の解析

ヒトオクルディンを発現させたHT1080発現をトリプシン処理により回収した。 5.0×10^5 cellsに対し、各抗体及びFab $5 \mu\text{g/mL}$ を $100 \mu\text{L}$ 添加し、5-1)と同様の操作でFCM解析を行った。結果を図42に示す。作製したFab1-3はヒトオクルディンに対する結合性を有していた。

[0095] 16-3) 抗オクルディン抗体Fab1-3のin vitro HCV感染阻害活性解析 (Cell-cultured HCV (HCVcc)を用いた解析)

培地には、10% fetal bovine serum (Cell Culture Bioscience), non-essential amino acid (Hyclone SH30238.01)及びpenicillin/streptomycin(Wako, 168-23191)含有D-MEM (Wako, 044-29765)を用いた。

[0096] コラーゲンタイプIコート48穴プレート (Corning, NC03548) にHuh7.5.1-8細胞を 5×10^4 cells/ $500 \mu\text{L}$ /wellで播種し、 37°C 、1日間培養した。培地を除き、精製Fab1-3を $0.5 \sim 5 \mu\text{g}$ 含む培地 ($250 \mu\text{L}$) を添加し、室温 (25°C) で30分培養した。

[0097] その後、HCVcc (genotype 2a)を50倍希釈したものをそれぞれ $250 \mu\text{L}$ /well添加し、室温で2時間培養した。血清を含まない培地 $500 \mu\text{L}$ /wellで3回洗浄し、前処理の1/2の濃度にした精製Fab1-3液 $500 \mu\text{L}$ を加え、 37°C で4日間培養した。

[0098] 細胞をPBS $500 \mu\text{L}$ /wellで3回洗浄し、Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (FAVORGEN)を用いRNA抽出・精製を行い、滅菌水 $50 \mu\text{L}$ で溶解し、 -80°C で保存した。尚、RNA濃度は、Nano Dropを用いて測定した。

[0099] 精製したRNAを用いて、Taqman qRT-PCR法 (試薬はRNA-direct Realtime PCR Master Mix(Toyobo)、機器はLightCycler (Roche)) にてHCVゲノムRNA定量を行った。尚、反応溶液は、表2の組成に準じて調整した。

[0100] 結果を図43に示す。ここで図43は、HCVcc (genotype 2a)を用いたin vitro HCV感染阻害活性であり、細胞内のHCVゲノムRNAの定量結果である。データは抗体非添加群のHCV ゲノムRNAコピー数に対する割合 (mean $\pm$ SD) で表記した (n=4)。

[0101] HCVcc感染系にて、抗オクルディンFab1-3についてHCV感染阻害活性を解析したところ、添加濃度依存的に細胞内のHCV RNA量が低下しており、顕著な感染阻害作用が認められた。尚、顕鏡下で細胞障害性は観察されなかった。以上の結果から、抗オクルディン抗体1-3は1価でも十分なHCV感染阻害能を有することが示され、本エピトープに結合する低分子がHCV感染阻害剤として機能しうることが強く示唆される。

[0102] 17) 抗オクルディン一本鎖抗体scFvの作製とscFvによるHCV感染阻害

17-1) 抗オクルディン一本鎖抗体scFv発現ベクター作製

一本鎖抗体は、抗体の可変領域VH、VLについて、適当なリンカー（汎用されているリンカーとして(GlyGlyGlyGlySer)₃等が知られている）で連結させた一つの読み枠で合成される分子である。Clone1-3とClone37-5につてそれぞれVH、VLに対するプライマー及びリンカーに対応するプライマーを設計し、Assembly PCRによりscFv遺伝子を作製した。作製したscFv遺伝子をpSecTag2/Hygro A (Invitrogen) を鋳型にClone1-3ではHindIIIサイト及びXhoIサイト間、Clone37-5ではBamHIサイト及びXhoIサイト間にライゲーションにより挿入した。各ライゲーション産物をコンピテントセルDH5αにトランスフォーメーションし、独立に大腸菌クローンを培養、プラスミドDNAを回収後、シーケンスを確認し、pSecTag2/Hygro-scFv1-3及びscFv37-5を得た。作製したコンストラクトのアミノ酸シーケンスを図44に示す。

[0103] 17-2) scFvを含む培養上清の回収

培養用6穴プレートに 5×10^5 cells/wellのHEK293T細胞を播種し、37℃、5% CO₂環境下でサブコンフルエントになるまで培養した。作製した発現ベクター2μgをOpti-MEM1 (GIBCO) 100μL及びFuGENE(登録商標)HD Transfection Reagent (Roche) 4μLと混合し、15分間常温静置した。CHO細胞の培地を交換し、上記の混合液をウェルに全量加えた。その後、2日間、37℃、5% CO₂環境下で培養し、上清を回収した。

[0104] 17-3) 各種オクルディンに対する結合性解析

HT1080細胞、ヒトオクルディン及びヒトオクルディン第一細胞外領域欠損

(Δ EL1)、ヒトオクルディン第二細胞外領域欠損 (Δ EL1) 発現HT1080細胞をトリプシン処理により回収した。 5.0×10^5 cellsに対し、前項で作製したscFvを含む培養上清を100 μ L添加し、攪拌し氷上で1時間静置した。0.2% BSA-PBSにて1回洗浄後、1% BSA-PBSにて希釈したマウス抗HisタグIgG (MBL) を添加し、攪拌、氷上で60分静置した。0.2% BSA-PBSにて1回洗浄後、1% BSA-PBSにて希釈したヤギ抗マウスIgG (H+L) -Alexa488抗体 (Jackson Immuno Research) を添加、攪拌、氷上で遮光し30分静置した。0.2% BSA-PBSにて2回洗浄後、FCM解析を行った。ポジティブコントロールとして、各ラット抗オクルディン抗体を用いた。またネガティブコントロールとしてラットIgG及びHEK293 T細胞の培養上清を使用した。結果を図45に示す。作製したscFvは、ヒトオクルディンに対して結合性を有していた。またそれぞれのエピトープに対する特異性を保持していた。

[0105] 17-4) 抗オクルディン一本鎖抗体scFvのin vitro感染阻害活性解析 (HCV pseudoparticles (HCVpp, genotype 2a) を用いた解析)

Huh7.5.1-8細胞を 1×10^5 cells/well/500 μ Lで48-well plateに播種し、一晚培養した。抗オクルディン一本鎖抗体を含む培地を各濃度に調製し、前培養していた細胞の培地を除いて250 μ L/wellのscFv含有培地を加え、室温で30分静置した。なお、各培地は原液又は10倍希釈で作用させた。

[0106] HCVpp (genotype 2a (JFH-1株)、Microbe and Infection 15, 45-55, 2013に従い調製) をそれぞれ250 μ L/well添加し、37 $^{\circ}$ Cで6時間培養した。血清を含まない培地500 μ L/wellで3回洗浄し、前処理の1/2の濃度にしたscFv含有培養液500 μ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで3日間培養した。

[0107] 培地を除去後、Lysis Buffer (Promega) を100 μ L/well加え、溶解液を1.5 mlチューブに回収し、10,000 rpm、1分間遠心し、氷上に置いた。本上清10 μ Lと発光基質(ピッカジーン)50 μ Lを混ぜ、Luminescencer-PSNで発光強度の測定を行った。

[0108] 結果を図46に示す。図46はHCVpp (genotype 2a-JFH-1) を用いたin vitro HCV感染阻害活性を示す図である。データは培地非添加群のルシフェラーゼ活

性に対する割合 (mean $\pm$ SD) で表記した (n=3)。抗オクルディン一本鎖抗体は添加量依存的な感染阻害活性を示した (*1は原液、*10は10倍希釈培地)。なお、感染阻害活性は、1-3>37-5の順であった。阻害傾向は図24と関連していた。また培地添加による細胞への影響は顕鏡下で確認できなかった。

[0109] 18) オクルディン結合分子取得に向けたスクリーニング系への応用

18-1) 抗オクルディン抗体Clone1-3のHRPラベル化

抗オクルディン抗体の定量的な検出を簡便にするため、抗体のHRP標識を行った。まず、抗体溶液が4mg/mL (3.8-4.2mg/mL) になるように調製し、溶液のpHを100mM Na₂CO₃/NaHCO₃を用いて9.8に合わせた。300 μ L抗体溶液 (4mg/mL) を100 μ LのPOD溶液に加え (Ab:POD=1M :5M)、25°Cのウォーターバス中で3時間反応させた。

反応停止液として2M Triethanolamine (pH8.0) 溶液と200mM NaBH₄を加え4°Cで2時間反応させた。ラベル化抗体の安定化のため1MのGlycine溶液を10 μ L加え、よく混合した。200mLのPBSで3回以上十分な透析を行い、ラベル化抗体を調製した。

[0110] 18-2) 抗オクルディン抗体Clone1-3のHRPラベル化体を用いたスクリーニング系構築

ヒトオクルディン発現HT1080細胞 (HT1080/hOCLN細胞) 及びHRP標識抗体を用いてスクリーニング系を構築した。コラーゲンコートを行った96well plate (Corning) にHT1080/hOCLN細胞を播種し、37°Cで2日間培養した。3.7% Formaldehydeで固定化した後、5% Skim-milkでBlockingし、ラベル化した抗オクルディンモノクローナル抗体1-3-HRPを反応させた。よく洗浄した後、基質であるTMB溶液を加え、十分反応させた後、プレートリーダーで450nmの波長を測定し、ラベル化抗体の結合量を評価した。結合阻害コントロールとして、ラット抗オクルディン抗体1-3を前処理した条件でも行った。またバックグラウンドを見る目的でラベル化抗体処置なしも測定した。結果を図47に示す。ラベル化抗体非添加群ではシグナルは検出されなかった、ラベル化抗体添加群では強いシグナルが検出できた。また非標識の抗体を加えることでこ

のシグナルは有意に減弱した。つまり本解析系をもちいることで、オクルディンと抗体の結合を阻害するオクルディン結合分子の取得が可能であることが示された。本系を用いたオクルディン結合分子のスクリーニングを通じて、HCV感染阻害を示す分子が新たに見出されることが期待される。

産業上の利用可能性

[0111] C型肝炎治療薬として利用することができる。

配列表フリーテキスト

[0112] 配列番号 13, 14 : プライマー

配列番号 15 : プローブ

請求の範囲

- [請求項1] ヒトオクルディンの細胞外ループ中のエピトープを認識してインタクトなヒトオクルディンに結合する抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項2] ヒトオクルディンの第一細胞外ループ中のエピトープ及び第二細胞外ループ中のエピトープに結合する請求項1記載の抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項3] 前記第一細胞外ループ中のエピトープが、配列番号1に記載のアミノ酸配列により定義される請求項1又は2に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項4] 前記第二細胞外ループ中のエピトープが、配列番号2に記載のアミノ酸配列により定義される請求項1又は2に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項5] V_Hの配列が配列番号3、V_Lの配列が配列番号4である請求項1又は2に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項6] V_Hの配列が配列番号5、V_Lの配列が配列番号6である請求項1又は2に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項7] V_Hの配列が配列番号7、V_Lの配列が配列番号8である請求項1又は2に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項8] V_Hの配列が配列番号9、V_Lの配列が配列番号10である請求項1又は2に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項9] ラット抗オクルディンモノクローナル抗体。
- [請求項10] 請求項1乃至8の何れか1項に記載の抗体の可変領域を有するヒトIgG1キメラ抗体、ヒトIgG4キメラ抗体又はヒトIgG4変異体キメラ抗体。
- [請求項11] 請求項1乃至8の何れか1項に記載の抗体の相補性決定領域を有するヒト化抗体。
- [請求項12] 請求項1乃至11の何れか1項に記載の抗体のFabフラグメント、(Fab

')2フラグメント又はFvフラグメント。

[請求項13] 配列番号 10 又は配列番号 11 である抗オクルディン一本鎖抗体 scFv。

[請求項14] 前記配列番号に示されるアミノ酸配列において 1 乃至数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる請求項 13 記載の抗オクルディン一本鎖抗体 scFv。

[請求項15] 前記一本鎖抗体 scFv に分子タグが付加された請求項 13 又は 14 項に記載の一本鎖抗体 scFv。

[請求項16] 請求項 1 乃至 15 の何れか 1 項に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体又はそのフラグメントを有効成分とする抗HCV治療剤。

[請求項17] 更に直接作用型抗ウイルス剤を含む請求項 16 記載の抗HCV治療剤。

[請求項18] 請求項 1 乃至 8 及び 13 乃至 15 の何れか 1 項に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体のエピトープに結合する分子。

[請求項19] 請求項 16 に記載の抗オクルディンモノクローナル抗体のエピトープに結合する分子を有効成分とする抗HCV治療剤。

[図1]

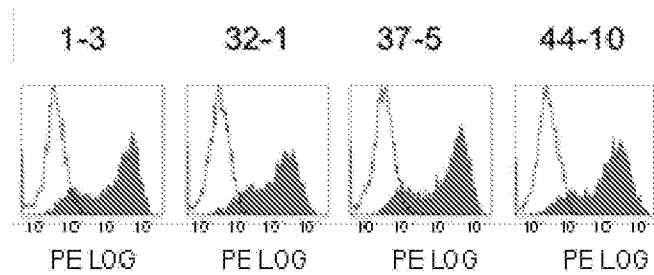
(A)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1-3	QVQLKESGPQL VQPSETLSLT	TVSGFELS SHHVS	WVRQPPGK GLEWIA	AISRGOSTY FNSVL	KSRLSISRGITNSQVFL KMSLSLTEDTATYFC	IGEDWYF DF	WGPGIMV TVSSA
32-1	EVQLVESGGGL VQPRRSKLS	AASGFTFN KYMA	WVRQTFPK GLEWYA	SISPRGER GYVEDSV	KGRFTSRONAKSTQY LQMDSLRSEGTATYYC	TTDYGVY	WGQGAMV TVSSA
37-5	EVQLVESGGGL LQPGSRSLSC	VASGFTFN HYVMT	WVRQAPGK GLEWYA	SITDISGAT YYLAEV	KGRFTSRDNTKSTLYL QMNSLRSEGTATYYC	TRDGPF AY	WGQETLV TVSSA
44-10	EVQLVESGGGL VQPGGSMRLS C	AASGFTFT DFYMN	WVRGAASK APEWLG	FIGMKARY TTEYPSV	KGRFTSRDNTQNLFF LQMNILRAEDTGTYYC	ARGVSDP DY	WGQGAMV TVSSA

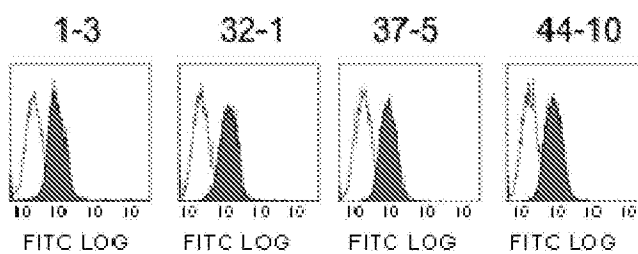
(B)

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
1-3	YIQNTQSPASLS ASPEEIVTTC	QASQDIG NWVT	WYQKPGK SPQLLV	SATTLAD	GIPSRFSQSRSGTQY BLKISRLQVEDTGYY C	LQRYSTPY T	FGGSTRL ELKRA
32-1	DVQMTQSLSYL AASPGESVISC	KASTSIS NYLA	WYQKPGK AYKLLY	SGSTLQS	GTPSRFSQSGSGTDF TLTIRSLPEDFGLYY C	QYYEKP MT	FGAGTKLE LKRA
37-5	DIQMTGPSFSL ASVGDRTVNC	KASQIN RYLV	WYQKLGK APKLLY	NANSLQT	GIPSRFSQSGSGTFT LTISLQPEDVATVFC	LQHNSWR T	FGGSTRL ELKRA
44-10	QVMTQSPSSLA VSAGETVTVNC	KSSQSLF SSGNQK NYLA	WYQKPG GSPKLLY	LASNKKS	GAPDRFMGSGSGTD FTLTISMDAEDLAIYY C	QGHYDPP T	FGGSTRL ELKRA

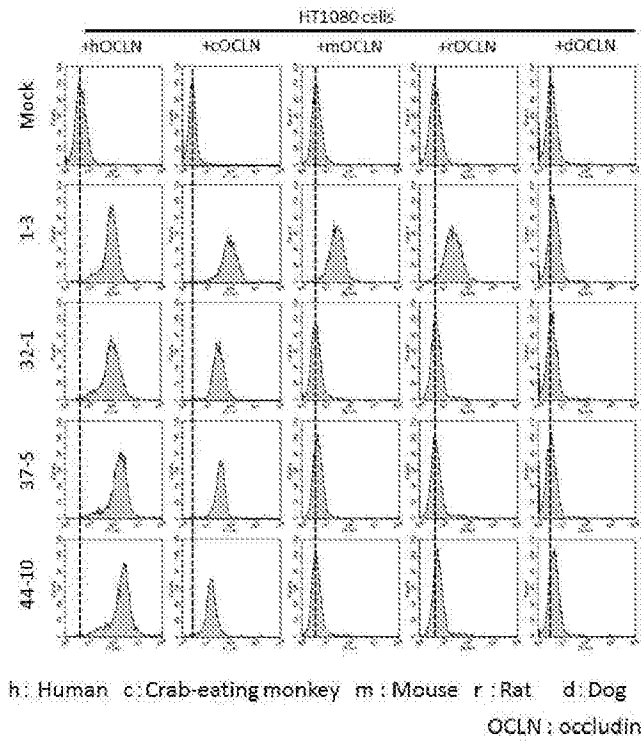
[図2]



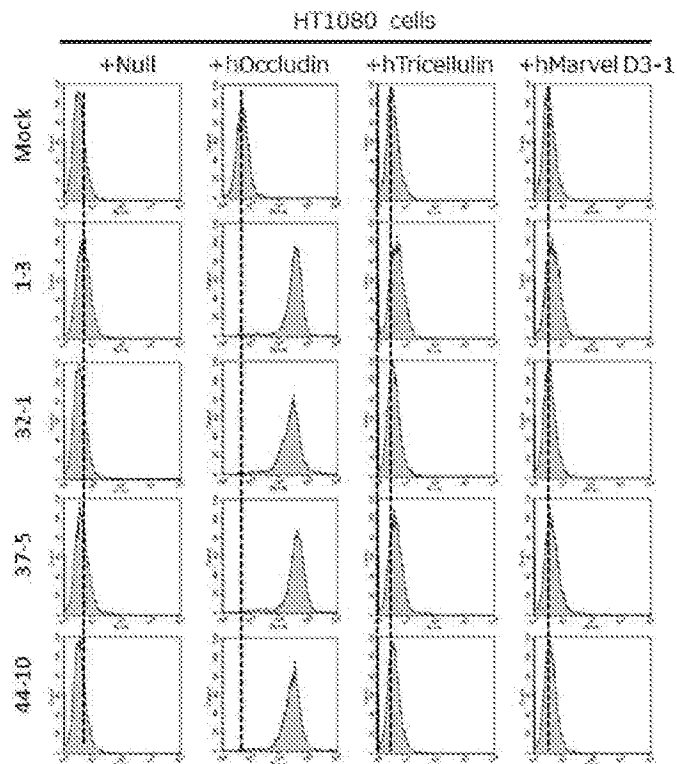
[図3]

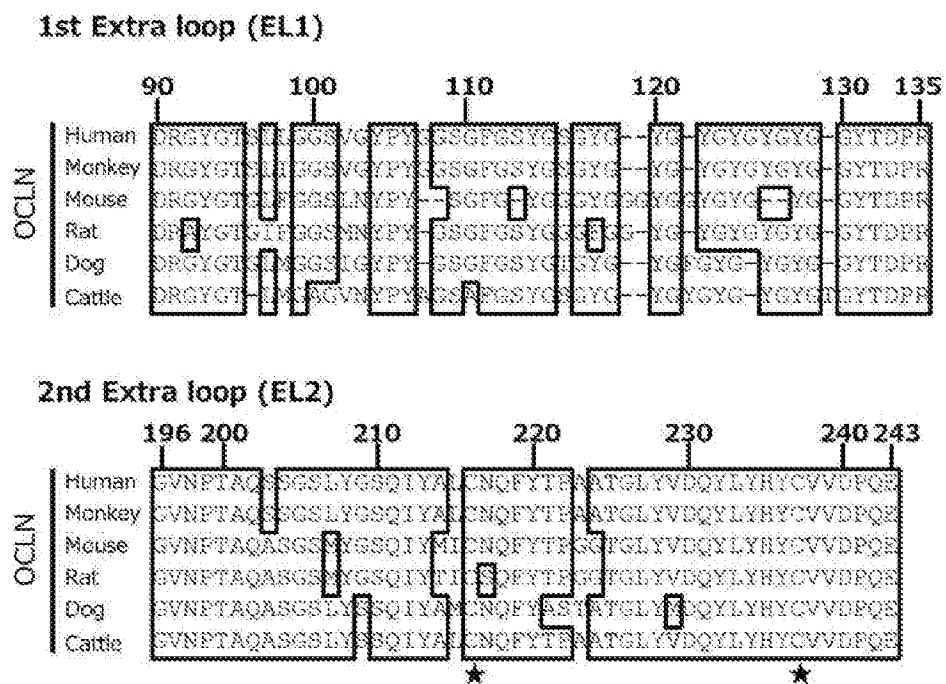
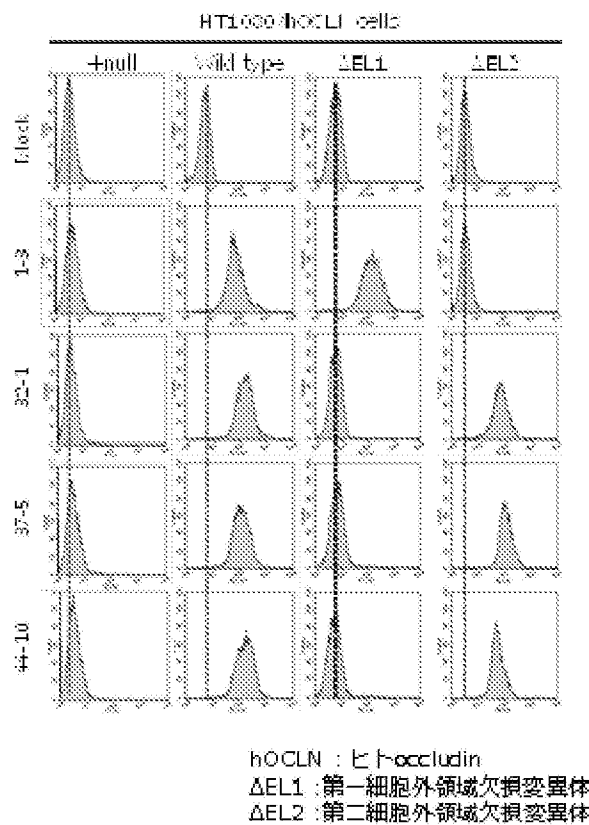


[図4]

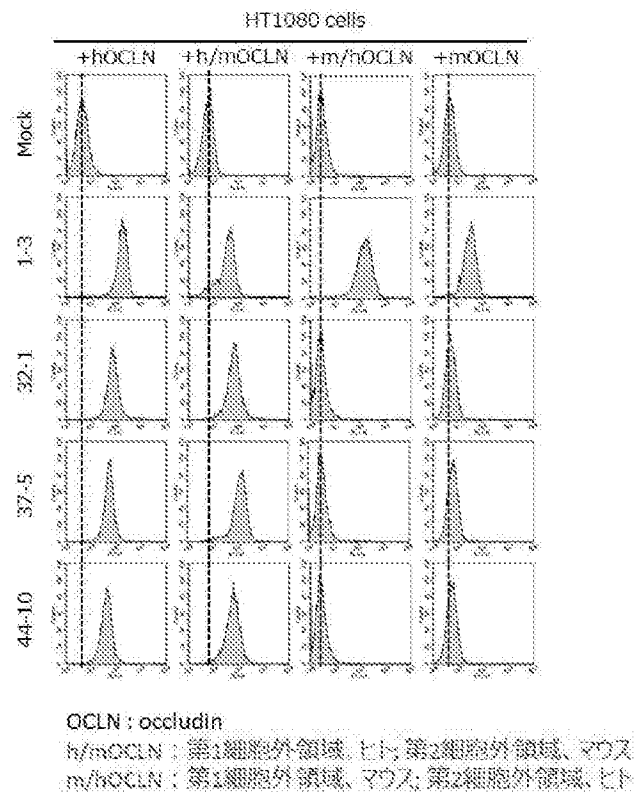


[図5]

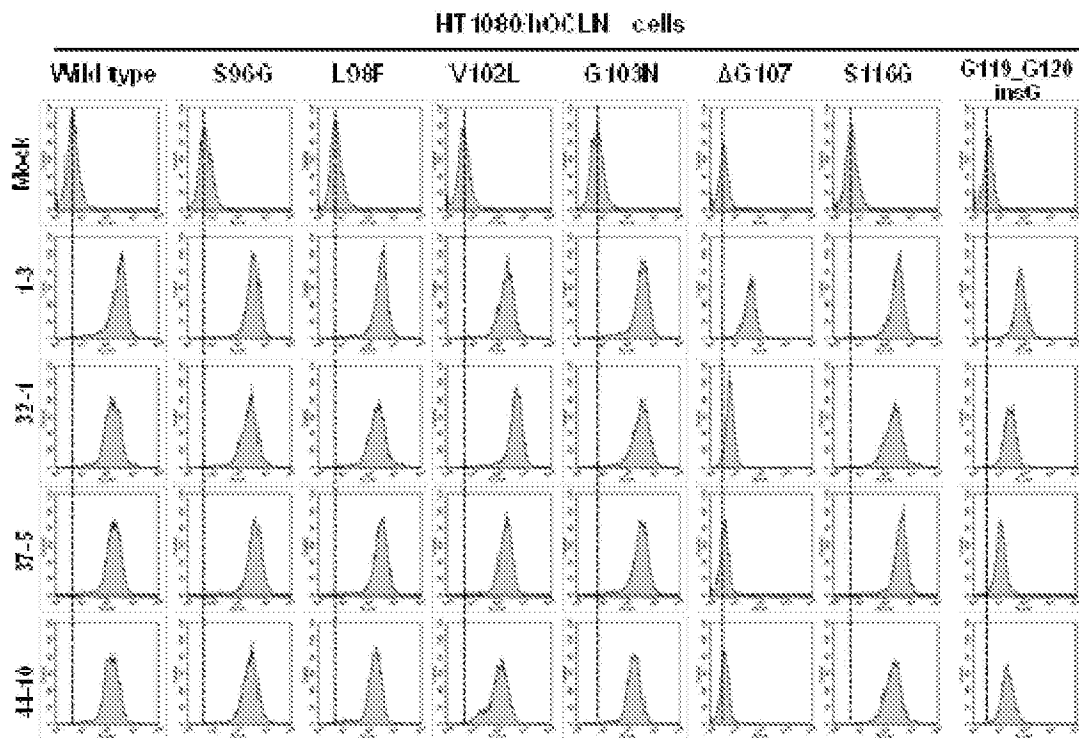




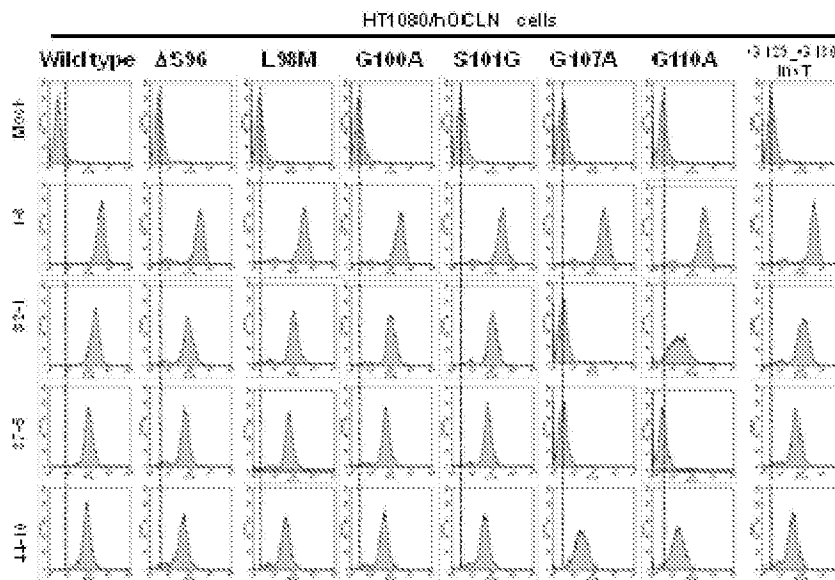
[図8]



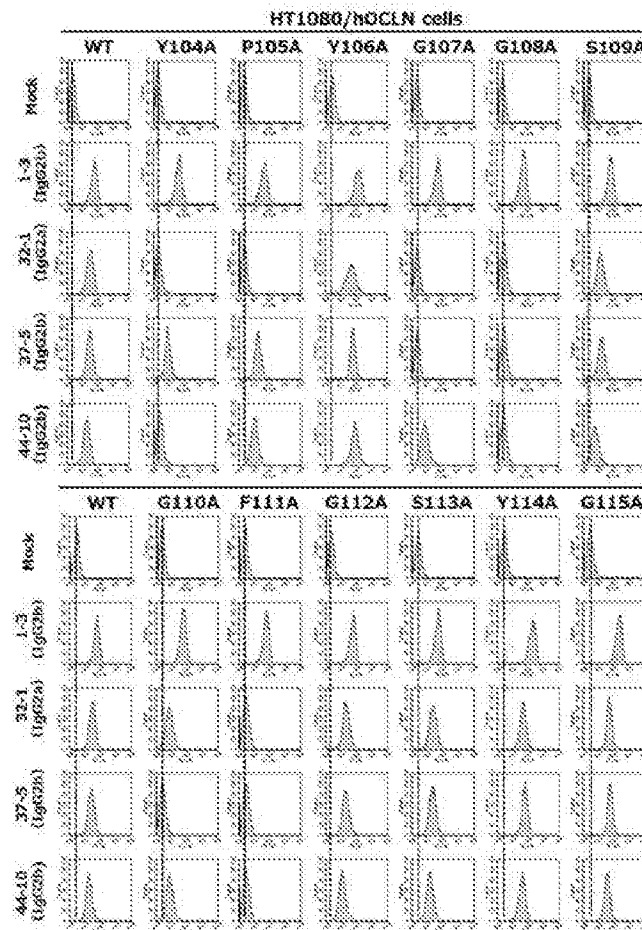
[図9]



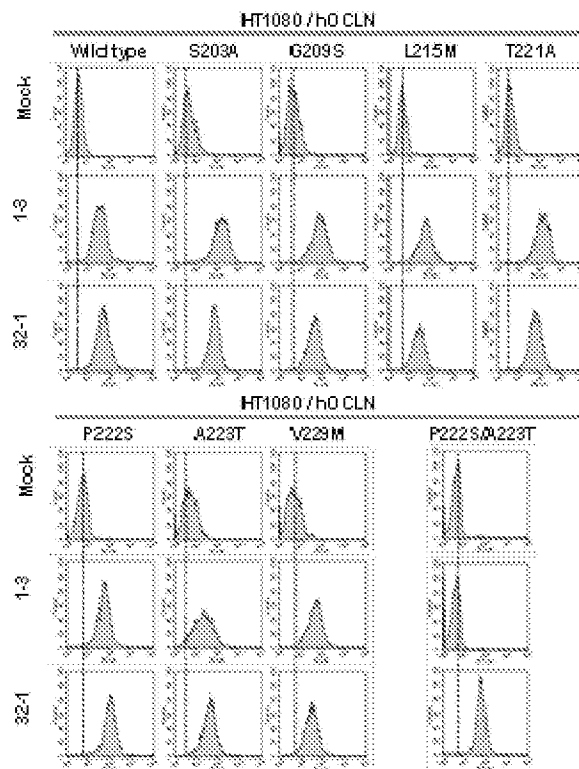
[図10]



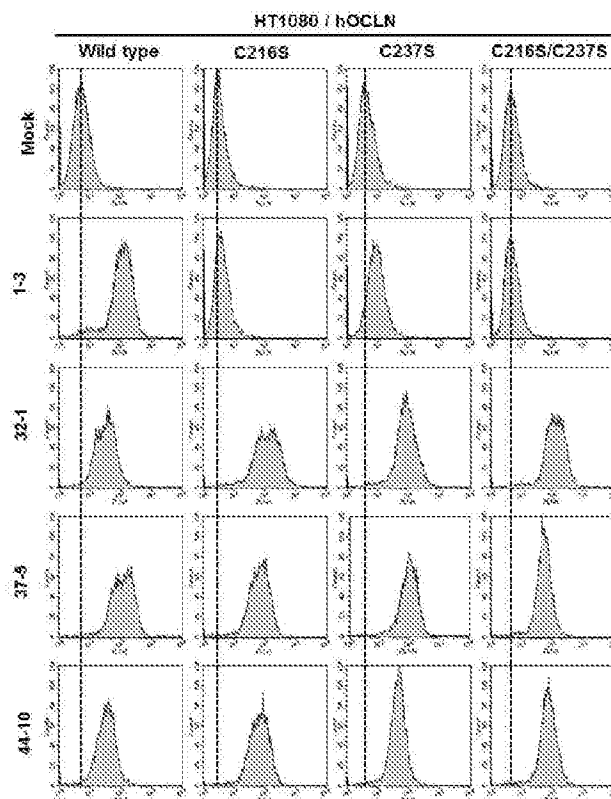
[図11]



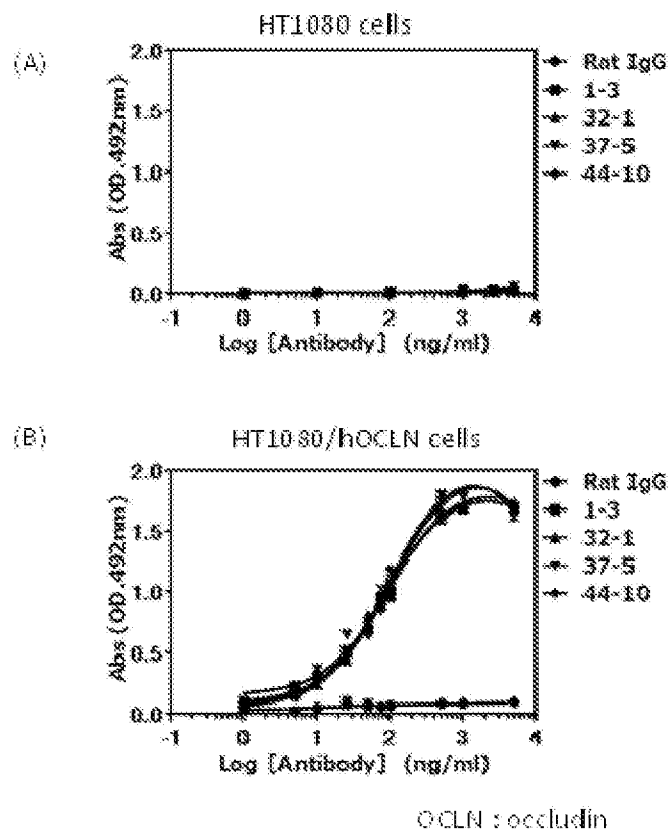
[図12]



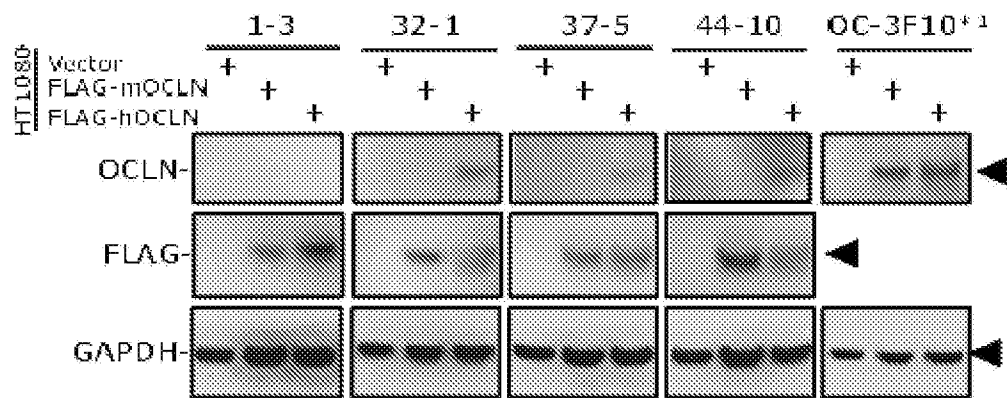
[図13]



[図14]

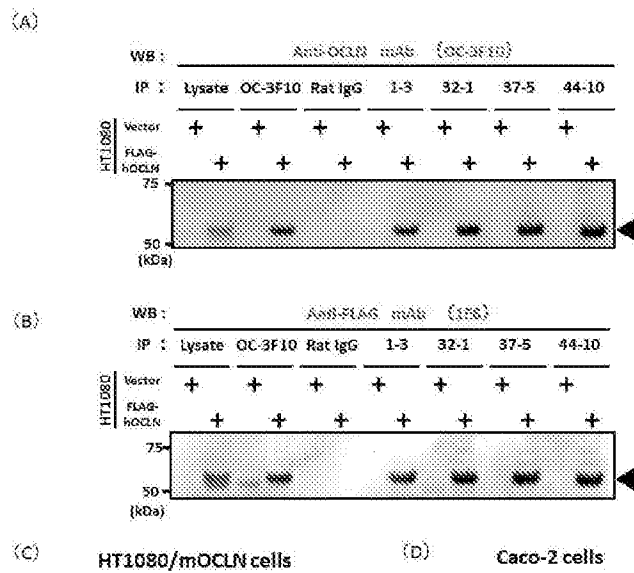


[図15]



*1 : C末認識の市販抗体

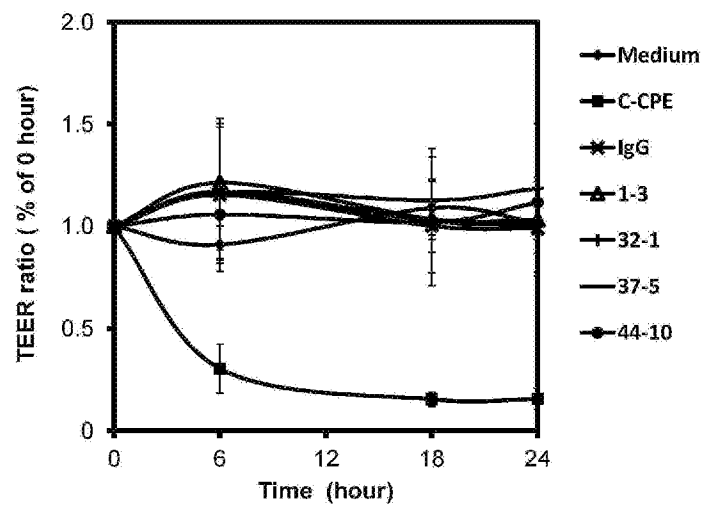
[図16]



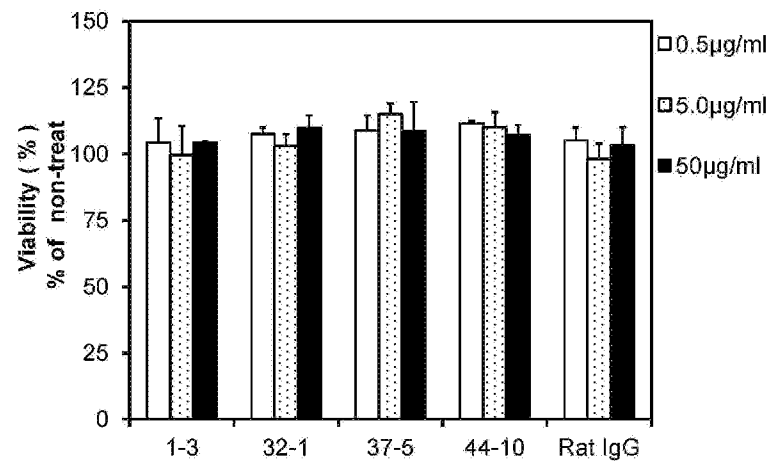
[図17]



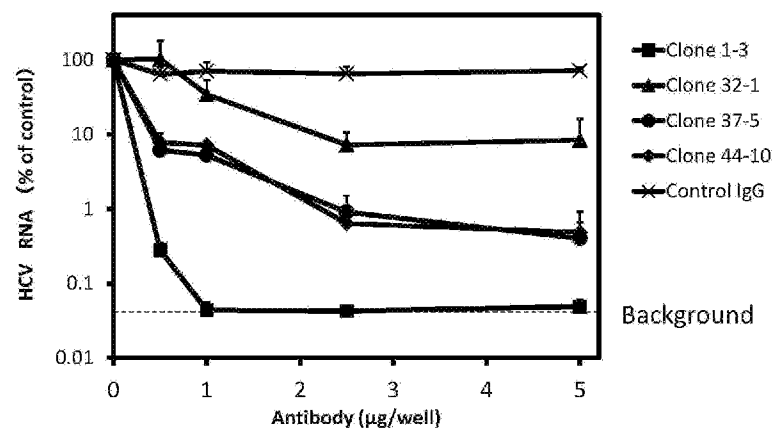
[図18]



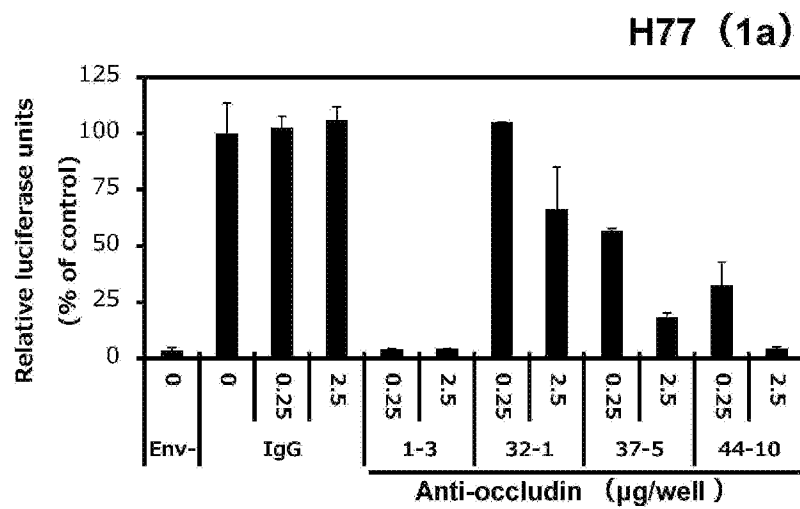
[図19]



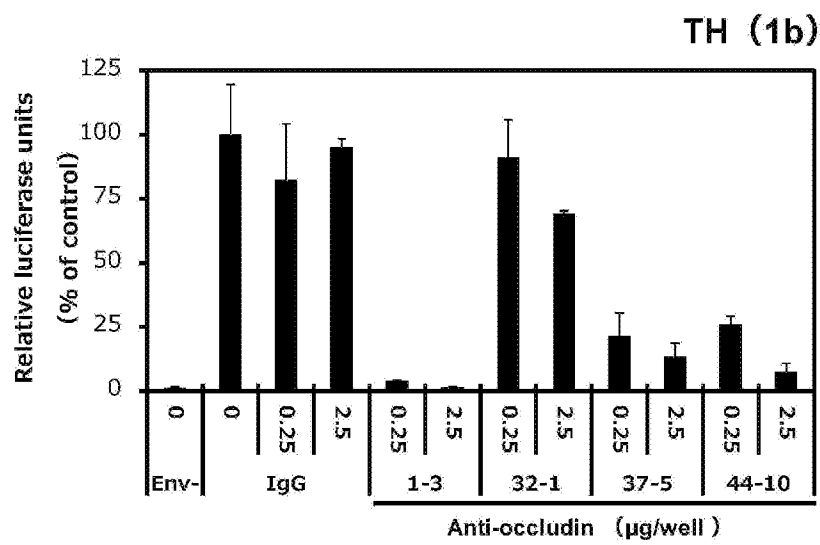
[図20]



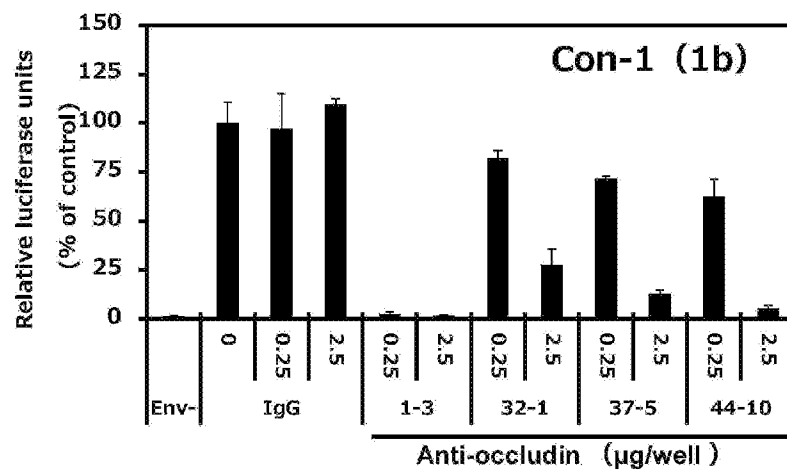
[図21]



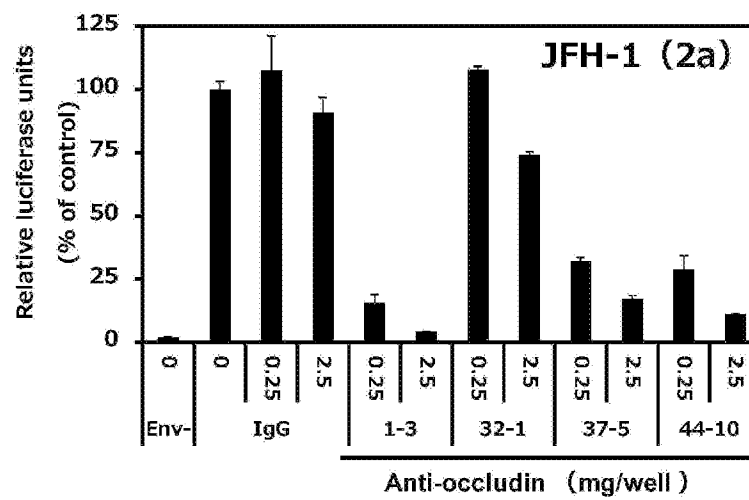
[図22]



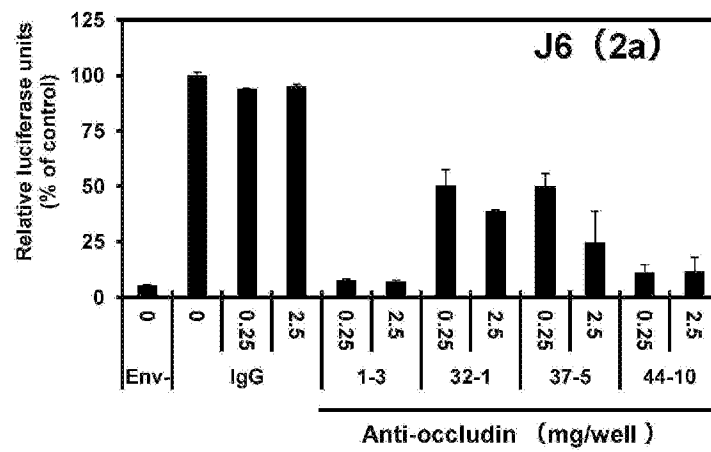
[図23]



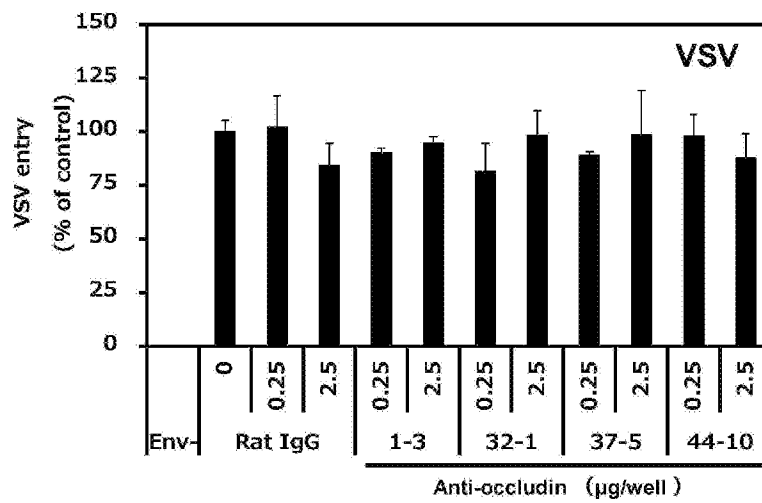
[図24]



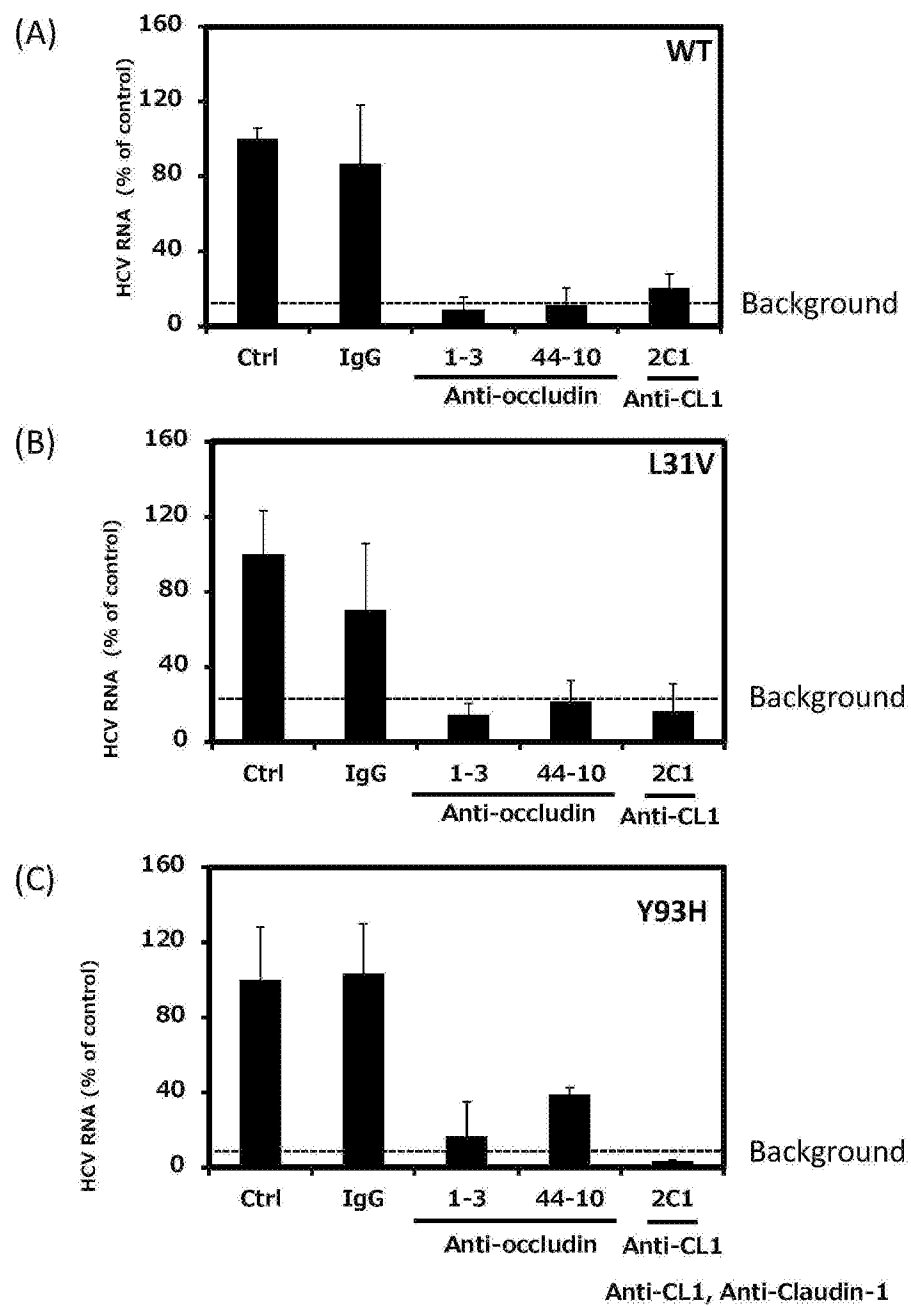
[図25]



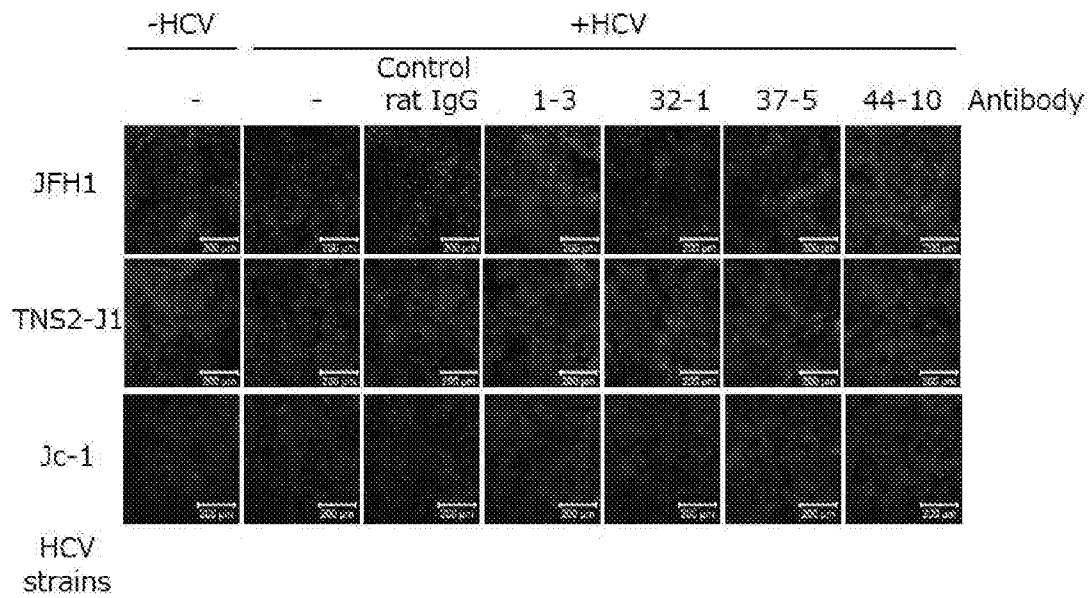
[図26]



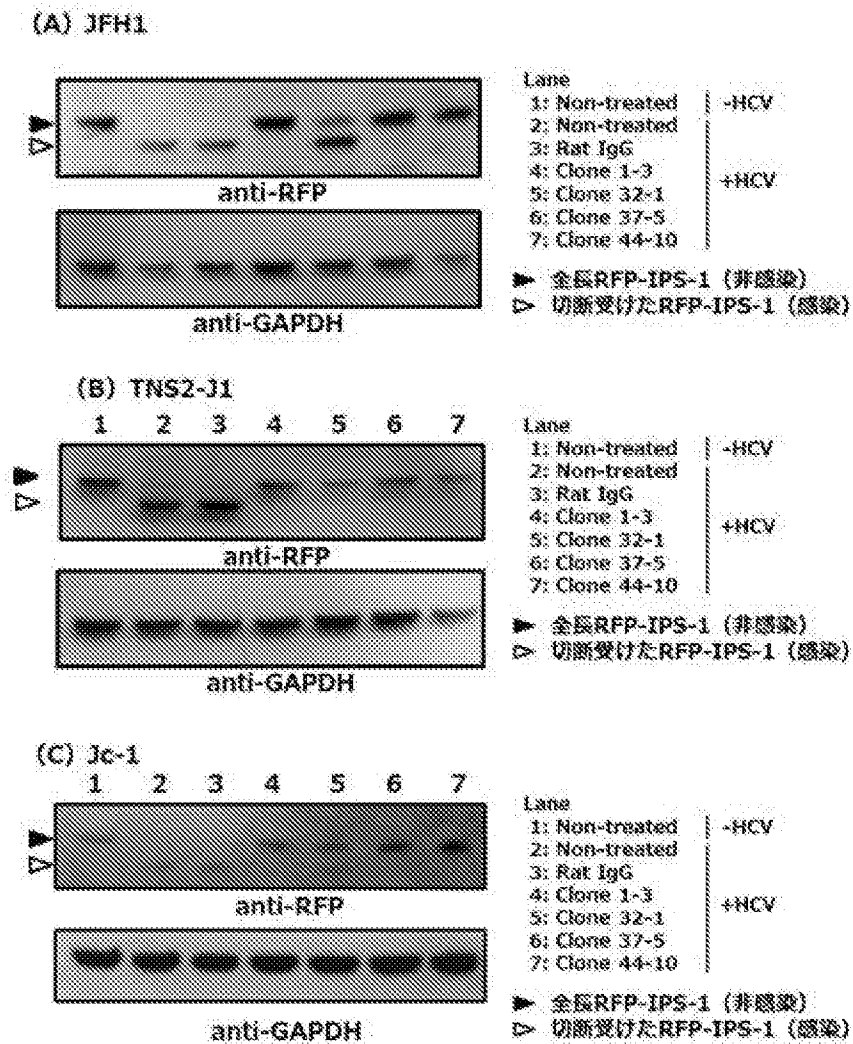
[図27]



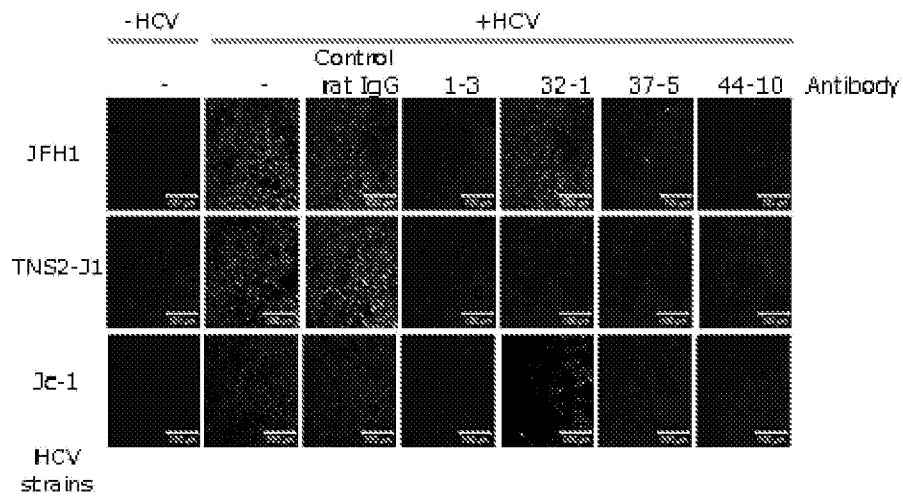
[図28]



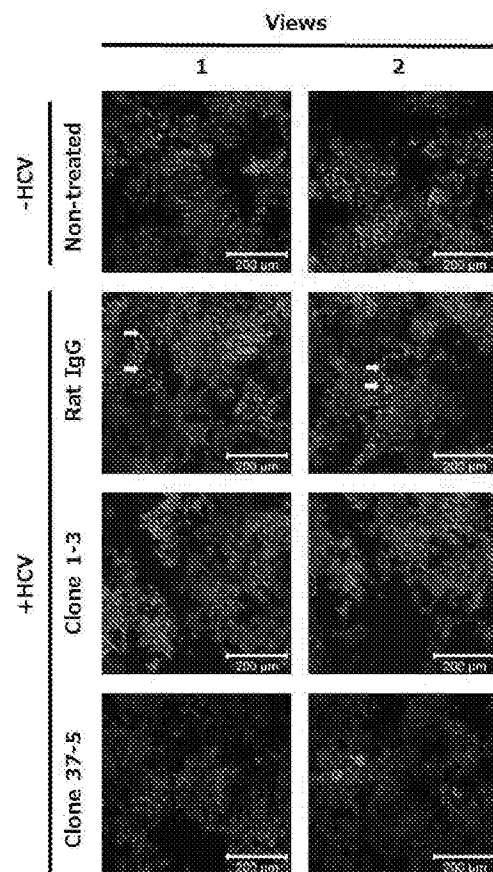
[図29]



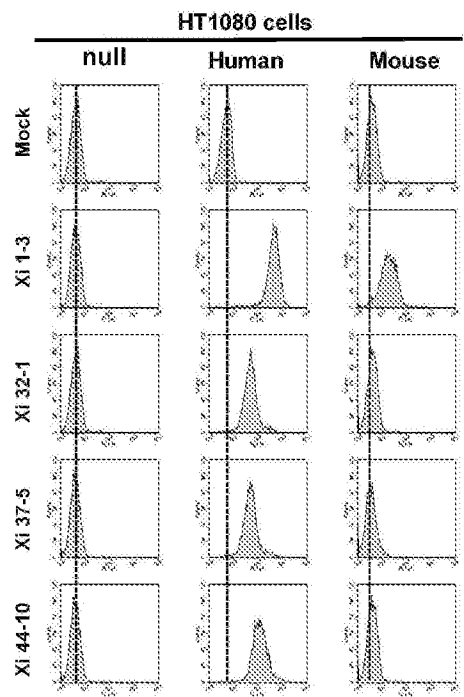
[図30]



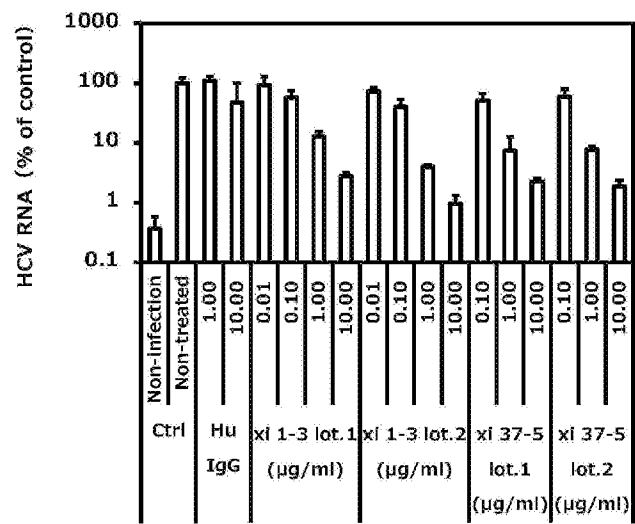
[図31]



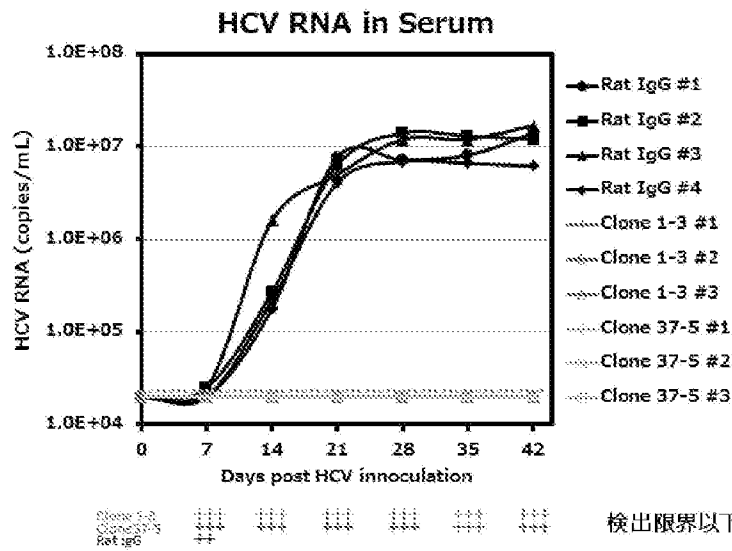
[32]



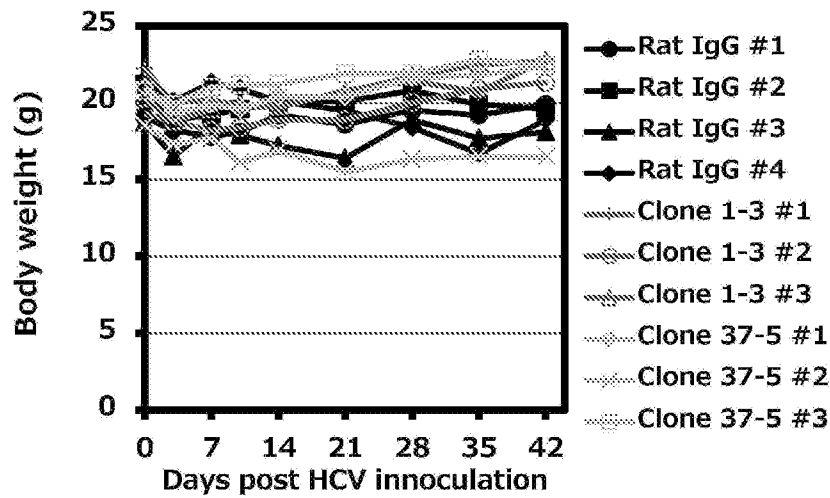
[33]



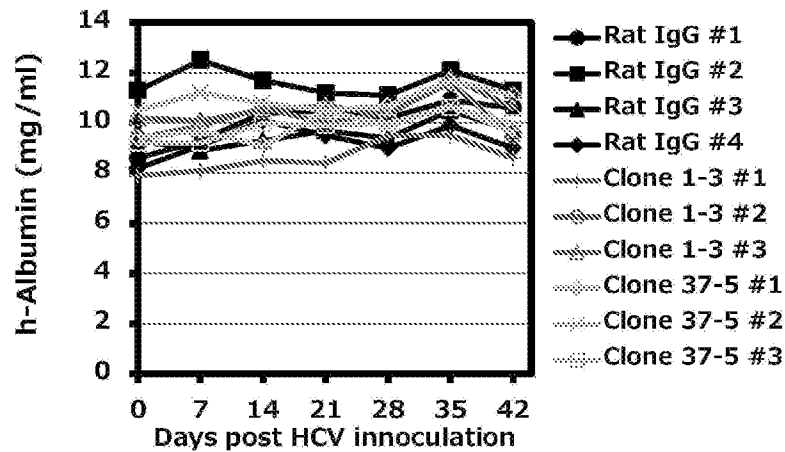
[図34]



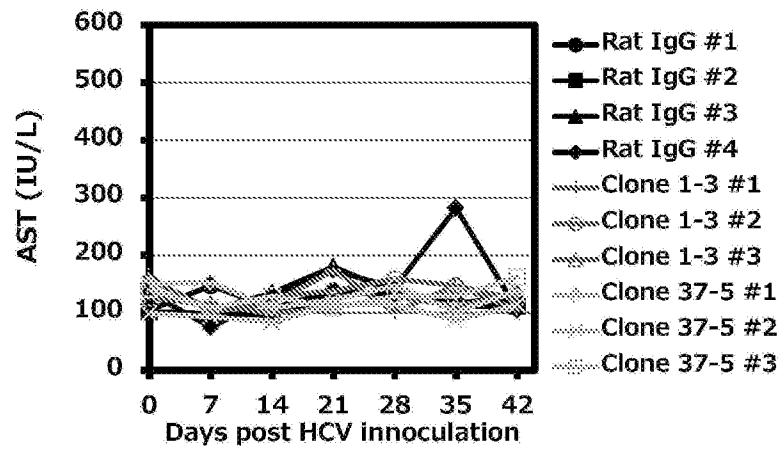
[図35]



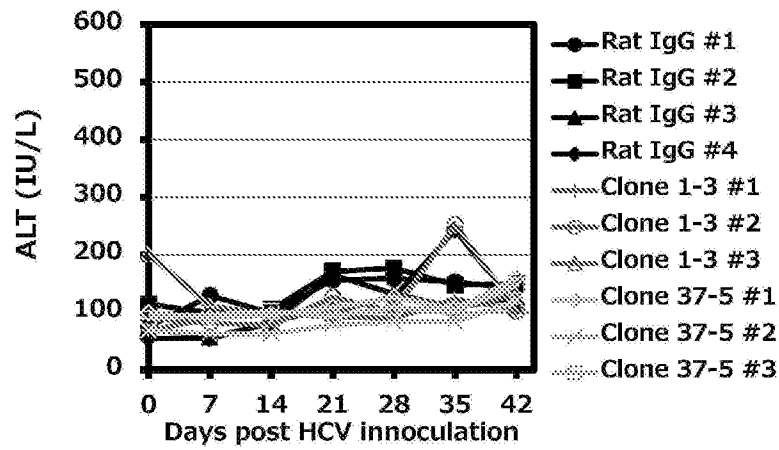
[図36]



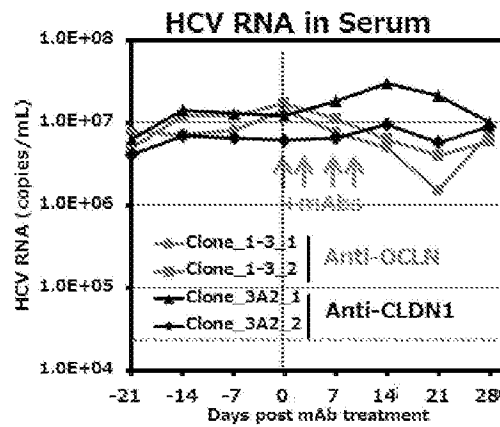
[図37]



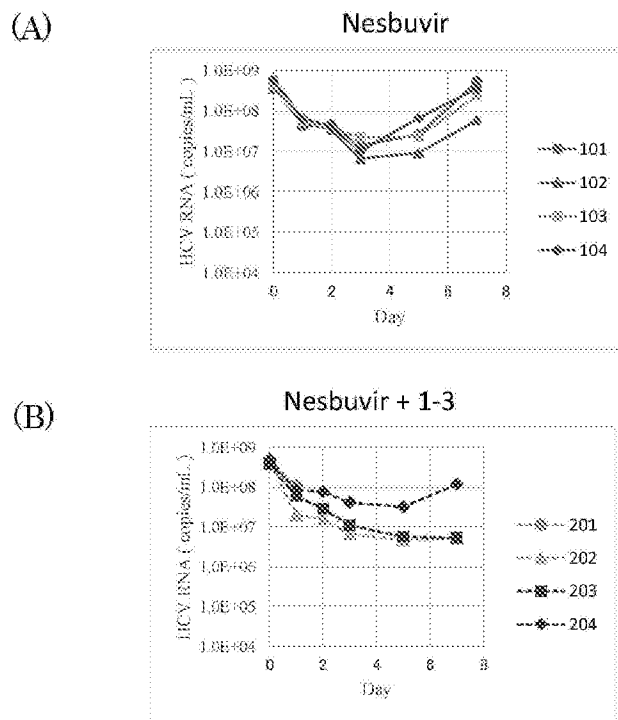
[図38]



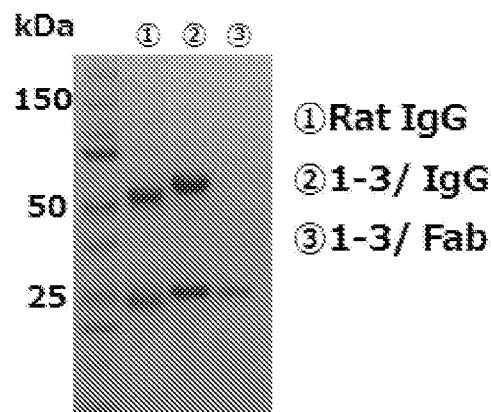
[図39]



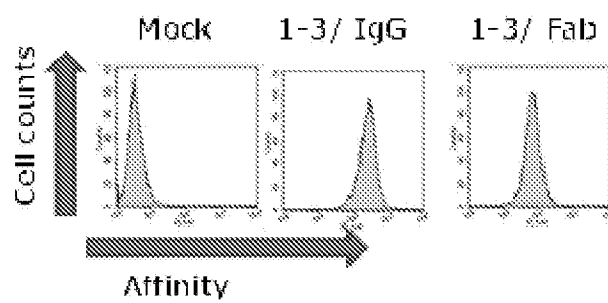
[図40]



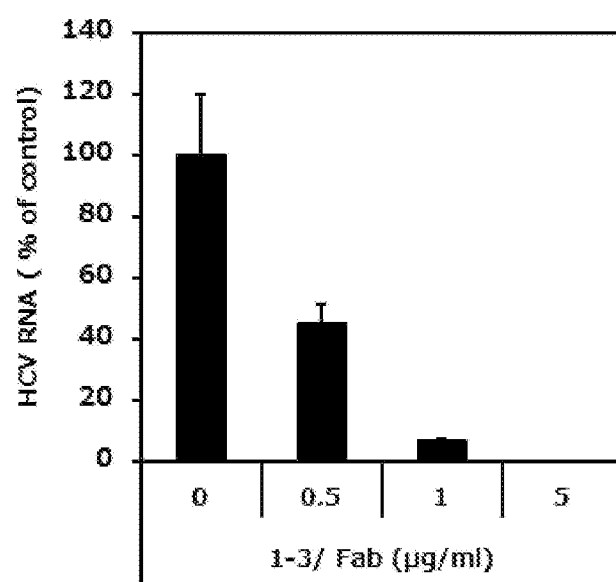
[図41]



[図42]

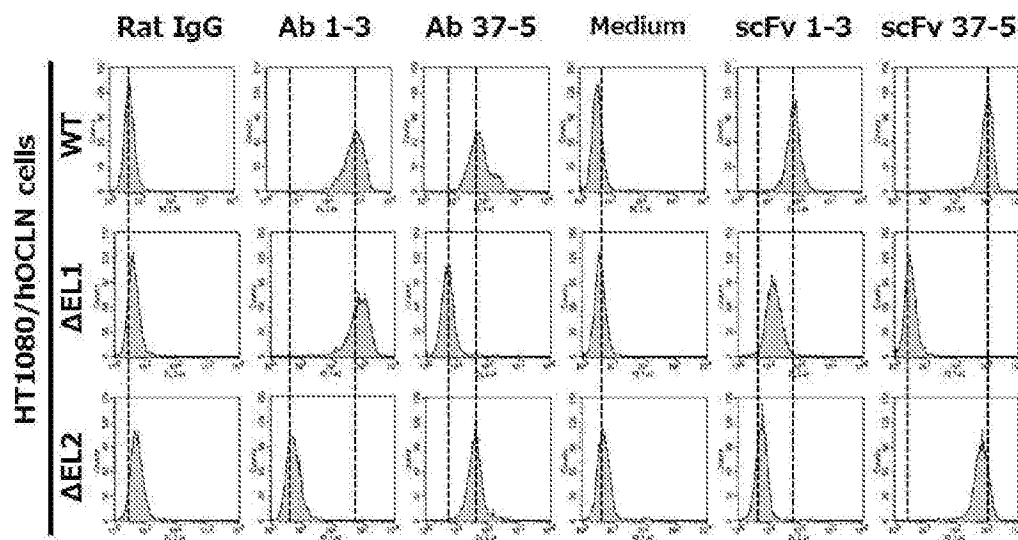


[図43]

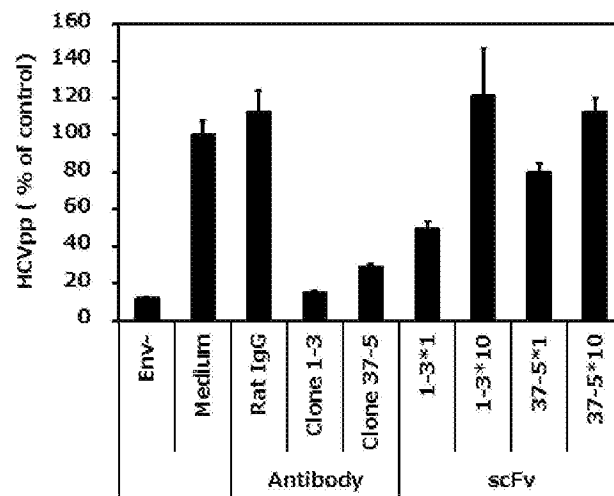


[illegible]

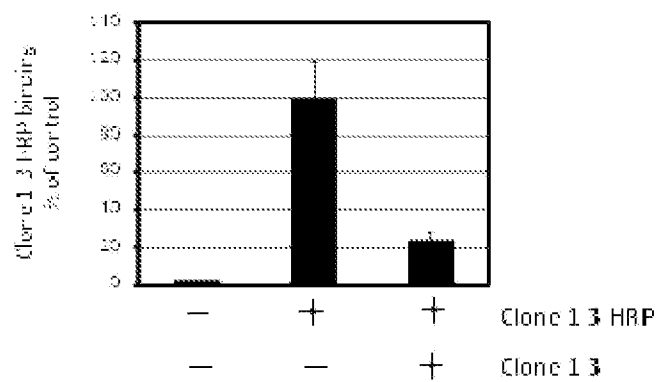
[図45]



[図46]



[図47]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/001125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/28, A61K39/395, A61K45/00, A61P31/14, C07K16/46, C12N15/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2012-504647 A (The Rockefeller University), 23 February 2012 (23.02.2012), entire text; particularly, claims; examples & US 2011/0271356 A1 claims; examples & WO 2010/040001 A1 & EP 2344534 A	1, 18, 19/1-19
Y	LIU Shufeng.et al., The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry, Virology, 2010, Vol.407, p.160-170, entire text, particularly, Results, Fig. 1	1-19
Y	MICHTA Maria L.et al., Species-Specific Regions of Occludin Required by Hepatitis C Virus for Cell Entry, Journal of Virology, 2010, Vol.84, p.11696-11708, entire text, particularly, Results, Fig. 2	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 May 2016 (02.05.16)

Date of mailing of the international search report
17 May 2016 (17.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i,
C07K16/46(2006.01)i, C12N15/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, A61K45/00, A61P31/14, C07K16/46, C12N15/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	JP 2012-504647 A (ザ ロックフェラー ユニヴァーシティ) 2012.02.23, 全文、特に特許請求の範囲、実施例 & US 2011/0271356 A1, Claims, Examples & WO 2010/040001 A1 & EP 2344534 A	1, 18, 19/1-19
Y	LIU Shufeng.et al., The second extracellular loop dictates Occludin-mediated HCV entry, Virology, 2010, Vol.407, p.160-170, 全文、特に、Results, Fig.1	1-19

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.05.2016

国際調査報告の発送日

17.05.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松原 寛子

4 N

4154

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	MICHTA Maria L. et al., Species-Specific Regions of Occludin Required by Hepatitis C Virus for Cell Entry, Journal of Virology, 2010, Vol. 84, p. 11696-11708, 全文、特に Results、Fig. 2	1-19