

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4287280号  
(P4287280)

(45) 発行日 平成21年7月1日 (2009.7.1)

(24) 登録日 平成21年4月3日 (2009.4.3)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 S

A 6 1 P 31/14 (2006.01)

A 6 1 P 31/14

C O 7 K 16/10 (2006.01)

C O 7 K 16/10

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53 N

請求項の数 9 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-564093 (P2003-564093)  
 (86) (22) 出願日 平成15年1月29日 (2003.1.29)  
 (65) 公表番号 特表2005-531286 (P2005-531286A)  
 (43) 公表日 平成17年10月20日 (2005.10.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IT2003/000032  
 (87) 国際公開番号 W02003/064473  
 (87) 国際公開日 平成15年8月7日 (2003.8.7)  
 審査請求日 平成17年12月22日 (2005.12.22)  
 (31) 優先権主張番号 RM2002A000049  
 (32) 優先日 平成14年1月30日 (2002.1.30)  
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(73) 特許権者 504290206  
 ロベルト・ブリオニ  
 イタリア・1-47900・リミニ・ピア  
 ザ・フェラーリ・22  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100101465  
 弁理士 青山 正和  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HC VE 2 グリコプロテインに対して向けられ、*in vitro* 中和活性を有するヒトモノクローナル抗体 Fab 断片

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の重鎖及び軽鎖の可変部分の配列 (I) :

e 1 3 7 重鎖 (H C)

【化 1】

LLEQSGSEVKVPGSSSLKVSCKTSGGTFSYTF SWVRQAPGQGLEWMG  
 GITPIIGIANYARNFQDRVITADESTSTVYMEVRRRLRSEDTAVYYCAKTS  
 EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT

e 1 3 7 軽鎖 (L C)

【化 2】

MAELTQSPSFLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA  
 ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLQPEDFATYYCQHLNTPWTFG  
 QGT

または

以下の重鎖及び軽鎖の可変部分の配列 (II) :

e 3 0 1 重鎖 (H C)

## 【化 3】

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSCTTSGGTLSGYGFNWLRQAPGQGPEWMG  
 GIIPLFRRTTYGQKFQGRLTITADESTGATYMESSLRSDDTAVYYCARE  
 KVSALTGGKSLHYFEYWGKGT

e 3 0 1 軽鎖 ( L C )

## 【化 4】

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY  
 DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTISLQSEDFALYYCQQYNDWPSTF  
 GQGT

10

から選択されるアミノ酸配列からなることを特徴とするヒト抗体からなる、in vivoでの H C V 中和剤。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の少なくとも一つの薬剤を治療上の有効量で含む、抗 H C V 治療用組成物。

## 【請求項 3】

ゲル、クリーム、軟膏、及び小卵製剤における局所的使用のための、請求項 2 に記載の組成物。

20

## 【請求項 4】

抗 H C V ワクチンが請求項 1 で定義の抗体を刺激できるが、有効でない抗体またはネガティブな抗体を刺激できないかどうかを求めることによって、抗 H C V ワクチンを評価するための、請求項 1 に記載の抗体の使用。

## 【請求項 5】

請求項 1 に定義のヒト抗体をコードする核酸。

## 【請求項 6】

原核生物細胞または真核生物細胞において、請求項 1 に定義の抗体を有効に発現できる、請求項 5 に記載の核酸を含む組換え発現ベクター。

30

## 【請求項 7】

細胞環境の外に請求項 1 に定義の抗体を輸送できる、この抗体をコードする配列と実質的に連結したシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 6 に記載の組換えベクター。

## 【請求項 8】

遺伝子治療において使用する請求項 7 に記載の組換えベクター。

## 【請求項 9】

a) タンパク質 E 2 の各種のエピトープに対して向けられた特異的ヒト F a b の結合を阻害できる、生物学的流体中の抗体の存在を測定する工程であって、前記特異的ヒト F a b が、請求項 1 に定義のヒト抗体に由来する工程；

40

b) H C V 感染の予後、H C V 感染の治療に対する応答性、H C V 感染のような患者の臨床上的特徴と、かくして滴定された抗体の存在を相関させる工程；

を含む、生物学的流体中の H C V E 2 タンパク質の各種のエピトープに対して向けられた抗体の存在の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、H C V E 2 グリコプロテインに対して向けられ、in vitro 中和活性を有するヒトモノクローナル抗体 F a b 断片に関する。C 型肝炎ウイルス ( V C V ) は、世界人口の約 4% に感染している (World Health Organization, 1999)。この病原体と接触した患

50

者の80%以上が、宿主免疫応答により感染を撲滅することができずに慢性的な感染を引き起こし、慢性肝炎、肝硬変、及び肝細胞カルシノーマのような重篤な肝臓疾患の危険を有する[1,2]。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

慢性的な感染の治療は、インターフェロン及びリバビリンでの組み合わせ治療に基づくが、これはより重篤な副作用を非常に高い確率で引き起こし、且つ有効性も高くない(4人中わずかに一人のみが長期的な効果を得る)[3,4]。ウイルス感染は、免疫保護をもたらすものではない。この事実は、免疫系によって認識される抗原構造において、ウイルスが非常に可変的であるということと併せて、HCV感染に対して患者を保護する有効な血清治療及びワクチンの開発を妨げている。それ故、新たな抗ウイルス戦略が強く必要とされていることは明らかである。

10

著者は、免疫保護応答の最重要の標的と考えた、HCVタンパク質の一つ、表面E2グリコプロテインに対して向けられた数多くのヒトFab抗体断片をコードする遺伝子をクローン化した[5]。しかしながら、これらの抗体の生物学的活性の進化は単純ではなく、信頼できるin vitroのシステムは、HCVに対する中和活性を測定するのに利用できない。それゆえ著者は、標的細胞に対するE2タンパク質の結合を阻害する各種のFabの可変的な能力を評価して記載したに過ぎず、この活性と、血清の中和活性の間の相関関係は示されていない[5]。

#### 【0003】

20

以前の研究では、Burioni等(2001)[6]が、HCV感染患者によって生産されたいくつかの抗E2抗体が、おそらくE2抗原に対する結合と、その立体構造の改変により、宿主免疫応答にウイルスをより非感受性にするネガティブ効果を有することを示した[6]。これは、高い抗E2抗体力価が、HCV感染に対する保護を直接には相関しない理由を説明できた。

#### 【0004】

Bugli等、2001[7]は、免疫応答が向けられている4の別個の領域を示す、抗E2ヒトFabのパネルをin vitroで結合できるE2タンパク質エピトープのマップを作成した(図2)[7]。慢性的に感染した患者の血清におけるこれらの領域の一つ以上に対して向けられた抗体の存在は、治療の有効性と各種の予後を減少する合併症と関連できた。それ故、HCV E2タンパク質の各種のエピトープに対して向けられた生物学的流体中の抗体を測定する方法の必要性が存在することは明らかである。本発明の一つの実施態様は、この方法を提供する。

30

本発明の著者はさらに、ウイルスシュードタイプ、即ちHCVに外的に同一であるが、蛍光を生産するタンパク質を生産できる標的細胞に侵入した後のウイルスのシステムにおける各種の抗E2抗体の中和活性を評価した[8]。細胞中における蛍光の存在または不在を明らかにすることによって、この方法は、各種のエピトープに対して向けられた抗E2抗体のin vivo中和活性の直接的な測定を提供する。

#### 【0005】

予期せぬことに、著者は、e137及びe301という二つのアッセイされた抗体が、抗体調製物の単一の全身的な投与で得られる濃度で、ウイルスを中和できることを見出した；二つの他の抗体は中和活性を有さず、一方はウイルス感染を促進さえできた。

40

#### 【0006】

患者における各種の抗体生産の滴定の方法の開発は、重篤な合併症を形成する危険のある感染患者と、より好ましい予後を有する患者の間を識別する可能性を有する高価値の診断及び予後装置を表す。この後者の群では、この方法は、重篤な副作用と関連する非常に有効性の低い治療を投与することを除去する一方で、かなりのコストの減少を提供するであろう。

#### 【0007】

かくして同定されたE2エピトープは、合成ペプチドを合成することによって再生産可

50

能ではないので[5]、この方法は、相関する臨床上のデータと疫学的データを有する、タンパク質 E 2 の各種の部分に対する抗体の量を測定する方法のみを表す。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

良好な中和能力を有するヒト F a b フォーマットにおける抗 E 2 抗体の同定は、そのラージスケールの生産と、抗 H C V 治療における医薬として、またはリスクのある患者（不調和な H C V 状態を有するカップル、職業上の曝露の疑いのある患者等）に対してウイルスの伝播を阻害するための局所形態の予防薬としての使用を許容する。

本発明の抗体は、抗 H C V ワクチンのための候補分子を、即ち中和抗体を刺激できるが、有効ではないまたはネガティブな抗体を刺激できない抗 H C V ワクチンのための候補物質を、in vitroで評価するために有利に使用できる。

広いスペクトルのウイルスを認識できるヒト抗体を中和する利用可能性は、人工ワクチンの生産において重要であろう。この文献に記載された中和抗体は、中和交差反応応答を刺激できるワクチン（ペプチドまたは抗イディオタイプ抗体から調製された）の開発のための鑄型として使用できる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、H C V E 2 タンパク質に対する、*in vivo*中和活性を与えるヒト抗体、またはその機能的な断片である。

特定の実施態様では、本発明の抗体は、重鎖及び軽鎖の可変部分の以下のアミノ酸配列によって特徴づけられる、e 1 3 7 抗体である：

e 1 3 7 重鎖（H C）

[配列 1]

LLEQSGSEVKVPGSSSLKVSCKTSGGTFSTYTFSWVRQAPGQGLEWMG  
GITPIIGIANYARNFQDRVITITADESTSTVYMEVRRRLRSED TAVYYCAKTS  
EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT

e 1 3 7 軽鎖（L C）

[配列 2]

MAELTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA  
ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLQPEDFATYYCQHLNTYPWTFG  
QGT

【 0 0 1 0 】

別の実施態様では、本発明の抗体は、重鎖及び軽鎖の可変部分の以下のアミノ酸配列によって特徴づけられる、e 3 0 1 抗体である：

e 3 0 1 重鎖（H C）

[配列 3]

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSC T TSGGTLSDYGFNWLRQAPGQGPEWMG  
GIIP LFRRTTYGQKFQGR L TITADESTGATYME LSSLRSDD TAVYYCARE  
KVS VLTGGKSLHYFEYWGKGT

e 3 0 1 軽鎖（L C）

[配列 4]

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY  
DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTISLQSEDFALYYCQQYNDWPSTF  
GQGT

【 0 0 1 1 】

本発明の更なる目的は、治療上の有効量で、本発明の抗体の少なくとも一つを含む、抗 H C V 治療用組成物である。好ましくは前記組成物は、全身性の使用のための精製形態、または当業者に既知の賦形剤との、ゲル、クリーム、軟膏、小卵としての局所的使用のための別の製剤で供給される。本発明の更なる目的は、本発明の抗体のそれぞれをコードする核酸である。有利には前記核酸は、原核生物細胞または真核生物細胞において本発明の抗体を有効に発現できる発現ベクターに含まれ得る。好ましい形態では、組換えベクターはまた、本発明の抗体のコード配列と実質的に連結し、細胞環境の外に抗体を輸送できるシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 1 2 】

本発明の更なる目的は、遺伝子治療に記載されるような組換えベクターの使用である。本発明は、以下の図面を参考にして、本発明自体を制限するものではない以下の実験例において記載される。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 3 】

20

実施例 1

物質と方法

抗 H C V F a b 及び全長 I g G 1 の生産

抗 H C V / E 2 F a b の生産、精製、及び特徴づけは、別の文献に記載されている [5]。F L A G - F a b (ペンタペプチド架橋で重鎖断片のカルボキシ末端で融合した F L A G エピトープで標識された F a b) を、別の文献に記載されたように構築して精製した [6]。アッセイの正当性と標準化を F a b コード遺伝子を使用して実施し、全長ヒトモノクローナル抗体 (H u M a b) を構築し、それをトランスフェクト化細胞における後の生産のための適切な真核生物ベクターに挿入した [9]。培養上清中に存在する H u M a b を記載されたようにイムノアフィニティにより精製し [10]、P A G E によって純度チェックした。ヒト抗体の量を、サンドイッチイムノアッセイによってアッセイした。全ての抗体及び F a b を使用まで - 7 0 で貯蔵した。

30

【 0 0 1 4 】

血清及び標本

健康なドナー及び H C V 陽性患者から得た血清を、標準法に引き続き、市販の診断キット (Ortho, Raritan, NJ) を使用して分析した。所定のエピトープに対して向けられた既知の量の抗体を有する見かけの標本を調製するために、H C V ネガティブ血清を P B S 中の濃縮した精製 H u M a b でスパイクし、ポジティブ及びネガティブ血清と正確に同様に処理した。

【 0 0 1 5 】

40

F a b 阻害力価 (F I T) アッセイのデザイン

このアッセイの目的は、エピトープに対する標識 F a b の結合を阻害する血清の能力を評価し、かくして血清中のエピトープ結合抗体の量の間接的な測定を得ることである (図 1)。

F L A G - F a b を精製し [10]、F A L G - F a b 特異的 E L I S A でアッセイし、阻害実験で使用される正確な濃度を測定した。略記すると、既知の濃度の F L A G - F a b 調製物を E L I S A によって滴定し [11]、そこでは抗原被覆プレートを P B S / 1 % B S A で 37 で 1 時間ブロックした。ブロッキング溶液の除去の後、P B S / B S A 1 % で調製された F L A G - F a b の 50  $\mu$  l の段階的な希釈物をウェルに加え、37 で 2 時間インキュベートした。自動化プレート洗浄器 (DiaSorin, Saluggia, Italy) において P B S / 0 . 0

50

5 % T w e e n - 2 0 でプレートを 1 0 回洗浄し、その後 P B S / B S A 1 % 中の抗 F L A G マウスモノクローナル抗体 M 2 (Sigma, St. Louis, MO; P B S 中に 10 μg/ml) の 1 0 μg/ml 溶液を 5 0 μl 加えた。3 7 °C で 1 時間のインキュベーションの後、前述のように P B S / T w e e n - 2 0 でウェルを 1 0 回洗浄し、マウスモノクローナル抗体結合を、セイヨウワサビペルオキシダーゼ接合ヤギ抗マウス I g G (Pierce; P B S 中で 1:8000) で視覚化した。基質を加え、暗所で室温で 3 0 分インキュベートした後、自動化プレートリーダーにおいて O D<sub>450</sub> についてプレートを読み取った。全てのアッセイを少なくとも二重で実施した。ネガティブコントロール抗原 ( B S A ) を常に取り込み、O D の読み取りのバックグラウンドとして差し引いた。

#### 【 0 0 1 6 】

10

血清の F a b 阻害力価 ( F I T ) の測定のため、標準条件で、最大の読み取りの 50 % に等しい O D<sub>450</sub> の読み取りを与える精製 F L A G - F a b の濃度を、F a b 阻害 E L I S A の更なる実験のため使用した。これらの実験のため、プレートを前述のように被覆してブロックした。P B S / B S A 1 % 中の段階的な 1 : 4 の血清希釈物を、E L I S A ウェル当たり 5 0 μl の量で加えた。3 7 °C で 2 時間のインキュベーションの後、精製した F L A G - F a b を血清希釈物に直接加え、所望の最終濃度に到達させた。プレートをさらに 3 0 分インキュベートし、F L A G - F a b E L I S A のため前述のように加工した。100 % 阻害に対応する、20 : 1 の過剰な精製非標識 F a b を含むポジティブコントロールサンプルを含む。過剰量のコントロール非相関 F a b [12] を含み、0 % 疎外に対応するネガティブコントロールサンプルもまた含まれる。最終結果は、式：阻害率 = 1 0 0 × (

20

F L A G - F a b 結合の 70 % より大きい阻害を与える最高の血清希釈は、当該エピトープと当該血清についての F a b 阻害力価 ( F I T ) として考慮される。

#### 【 0 0 1 7 】

##### 結果

アッセイで使用される適切な F L A G - F a b 濃度が各 F L A G - F a b について測定され、1 0 μg / m l ( e 8、e 2 0、e 1 3 7、e 3 0 1、e 5 0 9 ) から 0 . 1 μg / m l ( e 1 0 - B ) までの範囲である。各種の抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は以下の通りである：

30

#### 【 0 0 1 8 】

e 8 H C

[配列 5]

LLEQSGAEVKMPGATVKVSCQSSRYTFTSYGIGWVRQAPGQGLEWMG  
WISGYTHETKYAQSFQGRVTMTAETSTGTAYMELRSLRSDDTATYYCA  
RDGGGRVVPPTHLRAFDVWGQGT

e 8 L C

[配列 6]

MAELTQSPGTLSPGERATLSCRASHRVNNNFLAWYQQKPGQAPRLLI  
SGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDDFAVYYCQQYGDSPLY  
SFGQGT

40

e 1 0 H C

[配列 7]

LLESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSIYGGRGVSYWGWVRQSPGKGLE  
WIGHIYYFGDTFYNPSLNNRATISIDSSKNQFSLKLKSVTASDTALYFCAR  
STLQYFDWLLTREAAYSIDFWGQGI

e 1 0 L C

[配列 8]

MAELTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGVITILLAWYQQKPGKPPKALIYA  
ASSLQSGVPSRFSGSGSDTDFTLTISLQPEDSATYYCQQLNTYPWTFG  
QGT

10

e 2 0 H C

[配列 9]

LLEQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDHYGINWVRQAPGQGLEWMGGIIP  
VFGTTTYAQKFQGRATITADDSTGTAFLELTRLTDDTAVYFCATPHQLH  
VLRGGKALSPWDYWGQGT

e 2 0 L C

20

[配列 10]

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKRGQAPSLLIY  
GTSTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNDWPSTF  
GQGT

e 1 3 7 H C

[配列 11]

LLEQSGSEVKVPKGSSSLKVSCKTSGGTFSTYTFSWVRQAPGQGLEWMG  
GITPIIGIANYARNFQDRVITADESTSTVYMEVRRLRSEDVAVYYCAKTS  
EVTATRGRTFFYSAMDVWGQGT

30

e 1 3 7 L C

[配列 12]

MAELTQSPSFLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYA  
ASTLQSGVPSRFSGSGSWTEFTLTISRLQPEDFATYYCQHLNTYPWTFG  
QGT

40

e 3 0 1 H C

[配列 13]

LLEQSGSEVKKPGSSVRVSCCTSGGTLSDYGFNWLRQAPGQGPEWMG  
GIIPLFRRTTYGQKFQGRLTITADESTGATYMESSLRSDDTAVYYCARE  
KVSFLTGGKSLHYFEYWGKGT

e 3 0 1 L C

[配列 14]

MAELTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSRLAWYQQKRGQAPSLLIY  
DTSSRATGVPARFSASGSGTQFTLTISLQSEDFALYYCQQYNDWPSTF  
GQGT

e 5 0 9 H C

[配列 1 5]

LLEESGAIEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFRYGITWVRQAPGQGLEWMGQI  
MPTFATATYAQRFQGRVTISADESTSTAYLEVRSLRSEDTAVYYCATPR  
QVTILRGPKALSPWDYWGQGT

10

e 5 0 9 L C

[配列 1 6]

MAELTQSPATLSASPGERASLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIS  
GASTRATGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPH  
FGQGT

前述の F a b 断片をコードするヌクレオチド配列は、以下の通りである：

20

e 8 H C

[配列 1 7]

CTGCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGATGCCTGGGGCCACAG  
TGAAGGTCTCCTGCCAGTCTTCCCGTTACACCTTCACCAGTTACGGT  
ATCGGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGGCTTGAGTGGATG  
GGATGGATCAGCGGATACACCCATGAGACAAAATATGCACAGAGTTT  
CCAGGGCAGAGTCACCATGACCGCAGAGACATCCACGGGCACAGCG  
TATATGGAGTTGAGGAGCCTGCGGTCTGACGACACGGCCACATATTA  
CTGCGCGAGAGATGGAGGAGGGAGGGTGGTAGTGCCGCCTACTCAT  
CTACGTGCTTTTGATGTCTGGGGTCAAGGGACG

30

e 8 L C

[配列 1 8]

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG  
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCACAGAGTCAATAACA  
ACTTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
CTCATCTCTGGTGCATCTACCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTT  
CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC  
TGGAGCCTGATGATTTTGCAGTTTATTATTGTCAGCAGTATGGTGACT  
CACCTCTTTATTCTTTTGGCCAGGGGACC

40

e 1 0 H C

[配列 1 9]



CTGCTCGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGT  
CCCTCACCTGCACCGTCTCCGGTGTCTCCATCAGTTACGGTGGTCGT  
GGCGTTTCCTACTGGGGTTGGGTCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGCC  
TGGAGTGGATTGGCCACATCTACTACTTTGGAGACACCTTCTACAAC  
CCGTCCCTCAACAATCGAGCTACCATATCAATAGACTCATCCAAAAAC  
CAGTTCTCCCTCAAGCTCAAGTCTGTGACTGCCTCAGACACGGCCCT  
GTATTTCTGTGCCAGGAGCACCCCTACAGTATTTTGACTGGTTATTGAC  
ACGGGAGGCTGCCTACTCCATTGACTTCTGGGGCCAGGGAATA

10

e 1 0 L C

[配列 2 0]

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTTGG  
AGACCGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGCGTCACCATT  
CTTTTAGCCTGGTATCAGCAAAAGCCAGGGAAACCCCTAAGGCCCT  
GATTTATGCTGCATCGTCTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCA  
GCGGCAGTGGTTCTGACACAGATTTCACTCTCACAATCAGCAGCCTA  
CAGCCTGAAGATTCTGCAACTTATTACTGTCAACAACCTTAACACTTAC  
CCGTGGACGTTCCGGCCAGGGGACC

20

e 2 0 H C

[配列 2 1]

CTGCTCGAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCTCGG  
TGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGACCACTATGGTATCAACTGG  
GTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTGGAGTGGATGGGCGGTATCA  
TCCCTGTCTTTGGCACAACCTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGA  
GCCACCATTACCGCGGACGACTCCACGGGGACGGCCTTTTTTGGAGC  
TGACCAGACTGACATTTGACGACACGGCCGTCTATTTCTGTGCGACA  
CCTCACCAACTGCATGTCCTCCGGGGCGGTAAAGCCCTCTCCCCCT  
GGGACTACTGGGGCCAGGGAACC

30

e 2 0 L C

[配列 2 2]

40

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGG  
GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGT  
AACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGTCTCCT  
CATCTACGGAACATCTACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCA  
GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT  
GCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATGATTG  
GCCCTCCACCTTCGGCCAAGGGACA

10

e 1 3 7 H C

[配列 2 3]

CTGCTCGAGCAGTCTGGGTCTGAAGTAAAAGTGCCCGGGTCCTCGTT  
GAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGGCACCTTCAGCACCTATACTT  
TCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGG  
GGGGATCACCCCTATCATTGGCATCGCAAACCTACGCACGGAACCTCC  
AGGACAGAGTCACCATCACCGCGGACGAATCCACGAGCACGGTCTA  
CATGGAGGTGAGGAGGCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTATATTATT  
GTGCGAAAACTTCGGAAGTAACAGCCACTAGAGGGCGGACTTTCTTC  
TACTCCGCTATGGACGTCTGGGGTCAAGGGACC

20

e 1 3 7 L C

[配列 2 4]

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTTCCTGTCTGCATCTGTAGG  
AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGGGGCATAAGCAATT  
ATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTG  
ATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCGAGGTTTCA  
CGGCAGTGGATCTTGGACAGAATTCACTCTCACAATCAGCCGCCTCC  
AGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACACCTTAATACTTACCC  
GTGGACGTTTCGGCCAAGGGACC

30

e 3 0 1 H C

[配列 2 5]

40

CTGCTCGAGCAGTCTGGGTCTGAGGTGAAGAAACCTGGGTCTCGG  
TGAGGGTCTCGTGCACGACTTCTGGAGGCACCTTGAGCGACTATGGT  
TTCAACTGGTTACGACAGGCCCTGGACAAGGGCCTGAGTGGATGG  
GAGGGATCATCCCTTTGTTTCGAAGAACAACCTACGGACAGAAGTTC  
CAGGGCAGACTCACCATTACCGCGGACGAGTCCACGGGCGCAACCT  
ACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTCTATTAC  
TGTGCGAGAGAGAAAGTTTCGGTCCTCACAGGCGGAAAGTCACTCCA  
TTACTTTGAATATTGGGGCAAGGGAACC

10

e 3 0 1 L C

[配列 2 6]

ATGGCCGAGCTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAG  
GGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAG  
CAGGTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGTCTC  
CTCATCTATGACACATCTTCCAGGGCCACTGGTGTCCCAGCCAGGTT  
CAGTGCCAGTGGGTCTGGGACGCAGTTCCTCTCACCATCAGCAGC  
CTGCAGTCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGTCAGCAGTATAATGATT  
GGCCCTCCACCTTCGGCCAAGGGACA

20

e 5 0 9 H C

[配列 2 7]

CTGCTCGAGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCAGGGTCCTCGG  
TGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGACACCTTCAGATATGGTATC  
ACGTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAC  
AGATCATGCCTACGTTTGCGACAGCAACCTACGCACAGAGGTTCCAG  
GGCAGAGTCACGATTTCCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACTT  
GGAGGTGCGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGT  
GCGACACCTCGCCAAGTTACTATACTTCGGGGACCTAAAGCCCTCTC  
CCCTTGGGACTACTGGGGCCAGGGAACC

30

e 5 0 9 L C

[配列 2 8]

40

ATGGCCGAGCTCACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGCGTCTCCAG  
 GGGAAAGAGCCTCCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAG  
 CAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC  
 CTCATCTCTGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTGTCCCGGCCAGGT  
 TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGTAGC  
 CTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAAC  
 TGGCCTCCCCACTTTGGCCAGGGGACC

10

## 【0019】

精製した標識化 F a b 分子上の F L A G - F a b E L I S A は、非常に特異的で再生産性の結果を生ずる。F I T の測定は、10の H C V - ネガティブ血清で実施される；その力価は、我々の試験の上限の検出として一貫して > 1 : 20 であり、特異的な抗 H C V 抗体の不在で阻害が生じないことを示す。

## 【0020】

我々の F L A G - F a b によって認識されるエピトープに対して向けられた抗体を、F I T が有効に測定することを示すために、我々の F a b によって定義された H C V E 2 エピトープに対して向けられた既知の量の I g G を含む偽のサンプルを得る、所定の特異性のヒトモノクローナル抗体とネガティブ血清を混合することによって模倣の標本で同じ分析を実施する。その結果(図 2 A 及び B)は、F I T と抗体量の間の良好な相関を示し、F I T が患者の血清中のエピトープ特異的抗体の量に関する信頼できる情報を提供できることが示される。

20

## 【0021】

最後に、広範囲の希釈物を包含する値で、F I T は H C V 陽性血清において常にポジティブである。患者間でのかなりの異種性で、F I T は同じ血清サンプルにおける各種の F a b について非常に多様化している。

## 【0022】

## 実施例 2

30

## 物質と方法

## ヒト抗体断片

この実施例におけるヒト組換え抗体断片は、Bugli 等(2001)[7]に十分に記載されており、実施例 1 で使用されたものに相当する。略記すると、F a b をコードする遺伝子を、1 b 遺伝子型の H C V R N A の血液中の持続的な存在の慢性肝炎を有する 58 歳の女性の I g G 1 / カップレパートリーを含むファージディスプレイの組み合わせライブラリーから得た。選択された遺伝子を適切な細菌発現ベクター[13]に挿入し、トランスフォーム化細胞を組換え F a b のソースとして使用し、組換え F a b を記載されたように生産して精製した[14]。細胞に対する E 2 結合の中和 ( N O B ) 活性[5, 15]、及びこれらの分子の相互作用[7]は記載されている。H C V 感染患者の血清中の同様な抗体の存在は、阻害 E L I S A によって測定される[7]。

40

## 【0023】

## シュードタイプ及び中和アッセイ

ここで使用されるシュードタイプは、Mathuura 等, 2001[8]において十分に特徴づけられ記載されている。略記すると、V S V G \* / H C V E 1 - E 2 シュードタイプ ( V S V / H C V ) は、N 末端シグナル配列に融合した 1 b タイプ H C V c D N A クローン ( N I H - J 1 ) の E 1 及び E 2 タンパク質のエクトドメインと、V S V G プロテインの膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインからなるキメラ E 1 及び E 2 H C V エンベロープグリコプロテインで、G エンベローププロテインが置換されている小水疱性口内炎ウイルスからなる[8]。プラスミドの構築[16]及び真核生物発現ベクターは、記載されている[8, 17]。G

50

プロテインコード領域が緑色蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) で置換されている組換え VSV を有するキメラ E1 及び E2 cDNA を構成的に発現する CHO 細胞を感染することによって、VSV/HCV を調製する [18]。コントロールとして (及び VSV/HCV シュードタイプを生産するために) 使用される VSV G<sup>\*</sup>/HCV E1-E2 (VSV/G) シュードタイプを、G プロテインを一過的に発現している VSV G<sup>\*</sup> 細胞系を感染することによって生産する。中和アッセイを記載されたように実施する [8]。精製ヒト組換え Fab の希釈物を、37 °C で 30 分シュードタイプ VSV/HCV または VSV/G の  $2.4 \times 10^3$  感染単位 (IU) でインキュベートし、96 穴ウェルプレートで調製された HepG2 細胞 ( $4 \times 10^4$  細胞) 内にインキュベートする。37 °C で 60 分の吸着の後、10% FBS を含む DMEM で細胞を 3 回洗浄し、37 °C で 16 時間インキュベートする。ウイルスの IU を、蛍光顕微鏡により GFP 発現細胞の数を計測することによって測定する。データは、抗体が添加されていないコントロールウェルと比較した阻害のパーセンテージとして提供される。データは二重で実施された 3 の実験の平均である。

【0024】

結果

抗 HCV/E2 ヒトモノクローナル抗体のパネル生産と配列特徴づけ

ヒトモノクローナル抗体 Fab 断片のパネルは、1b 遺伝子型の HCV での持続的な感染を有する患者の抗 HCV/E2 免疫レパートリーを表す [5, 19]。CHO 細胞において発言された 1a 遺伝子型 (H 株) [20] の精製組換え HCV/E2 で選択された抗体断片は十分に特徴づけられ、HCV/E2 に対する共有された等しいアフィニティを有する慢性感染患者の血清 [7] に存在するクローンに対応する。5 の抗体のそれぞれは、この患者の全抗 E2 抗体レパートリーの属する 5 のファミリーの一つを表す。同じファミリーに属する Fab は、同様の生物学的活性を共有し、DNA 配列の強力なホモロジーを有する [5]。5 の Fab のそれぞれは、2 の表面上の異なるエピトープを認識する [7]。相対的な生殖系列配列からの多様性は、抗原由来のアフィニティの成熟の典型であり (表 1a 及び 1b)、抗原に対する著機的な曝露を示唆する。

【0025】

表 1A、B: 生殖系列と抗 HCV E2 ヒトモノクローナル抗体の可変領域における V 遺伝子のミューテーション

Burioni 等, 1998 [5] に記載されたように配列を決定し、IMGT データベースにおいて生殖系列配列と並べる [21]。ヌクレオチドとアミノ酸ミューテーションのパーセンテージを、重鎖及び軽鎖についてのフレームワーク領域 (FR) 1、FR 2、及び FR 3、重鎖についての相補性決定領域 (CDR) 1 及び CDR 2、軽鎖についての CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 を考慮して、Kabat 及び Wu のアライメント法 [22] に従って計算する。

【0026】

表 1a - 重鎖

10

20

30

【表 1 a】

抗体	V 遺伝子	ミューテートされたスクレオドの%		ミューテートされたアミノ酸の%	
		FRs	CDRs	FRs	CDRs
e 8	VH1-18	9.5	22.2	14.9	33.3
e 20	VH1-69	9.4	16.9	19	38
e 137	VH1-69	11.5	15.3	14	41.7
e 301	VH1-69	8.9	19.4	15.6	45.8
e 509	VH1-69	5.2	15.9	10.9	33.3

10

【 0 0 2 7 】

表 1 b - 軽鎖

【表 1 b】

抗体	V 遺伝子	ミューテートされたスクレオドの%		ミューテートされたアミノ酸の%	
		FRs	CDRs	FRs	CDRs
e 8	KV 3-20	2.7	16	2.6	33.3
e 20	KV 1-9	4.3	7.7	9.7	22.2
e 137	KV 1-8	2.2	9	3.2	15.4
e 301	KV 3-15	3.8	14.3	9.7	23
e 509	KV 3-15	3.2	1.3	6.5	0

20

30

【 0 0 2 8 】

細胞に対する H C V / E 2 結合を阻害できないことが見出されたいくつかのクローン ( e 1 3 7 及び e 8 )、並びに非常に低濃度でさえ H C V / E 2 結合を阻害する他のもので、各 F a b の結合の中和 ( N O B ) 活性を測定した [5] (以下参照)。

【 0 0 2 9 】

ヒト組換え F a b によるシュードタイプウイルスの中和

40

H C V / E 2 の表面上の異なるエピトープを認識する F a b の二つ、e 8 及び e 2 0 [7] は、高濃度 (80 µg/ml) でさえ、V S V / H C V シュードタイプ感染を中和しない。これらの二つの F a b の一方、e 2 0 は強力な N O B 活性を有し [5]。E 2 結合を阻害する抗体でさえ、ウイルス感染を防止しないかもしれないことを確認する。

【 0 0 3 0 】

二つの他の F a b、e 1 3 7 及び e 3 0 1 は 10 µg/ml の濃度で V S V / H C V を有効に中和する一方、V S V G エンベローププロテイン ( V S V / G シュードタイプ ) を有する V S V シュードタイプは影響されない (図 3 a 及び 3 b)。H C V / E 2 上のヒトエピトープの二次元表面マップで示されているような、中和活性を与えられたヒト抗体によっておそらく認識される、同じ E 2 領域に対して、これらの二つのクローンが競合することを

50

示す以前の発見と、これらのデータは一致する(図4)。F a b 5 0 9 は、N O B 活性の観点で現在最も強い入手可能な抗体であり、非常に低濃度で、E 2 と細胞標的の間の結合を阻害可能である(表2)。このF a b とV S V / H C V シュードタイプのインキュベーションは、1  $\mu$ g/ml の濃度にヘパトーム細胞内へのウイルス侵入を増大する。V S V / G シュードタイプが使用される場合、感染の増大は示されず、かくして細胞膜とのこのF a b の非特異的な相互作用が、細胞内へのウイルスエントリーを促進する可能性を除外する。(図3C)。

#### 【0031】

表2 - 抗H C V / E 2 抗体特徴づけ

N O B 活性は、細胞標的に対する精製H C V / E 2 調製物の結合の中和の50%を達成する濃度( $\mu$ g/ml単位)として計算される：

【表2】

Fab クローン	50 % NOB 濃度 ( $\mu$ g/ml)	VSV/HCV 感染に対する効果
e8	> 40(無)	なし
e20	3(高)	なし
e137	40(低)	阻害
e301	3(高)	強力に阻害
e509	< 0.035(最高)	最高化

#### 【0032】

コントロール抗体[23]は、V S V / H C V 及びV S V / G シュードタイプの両者を中和できないため、シュードタイプシステムに対して効果を発揮しない。V S V / H C V に対して効果を有しないこれらの実験における中和コントロールとして使用されたポリクローナル抗V S V 抗血清の1：1000までの希釈物によって、V S V / G シュードタイプは十分に中和される。いくつかの宿主において生産されたポリクローナル及びモノクローナル抗E 1 及び抗E 2 抗体は、V S V / H C V シュードタイプに対して中和効果を示さない。

#### 【0033】

一価F a b の中和活性は、ビリオンの凝集または交差結合のために必要なく、H C V の侵入を阻害できることを示す；さらに、ウイルスとその細胞標的の間の相互作用のブロックは、H C V 中和における鍵となる因子である可能性は低いようである。これらのデータは、血清中のN O B 活性と疾患からの保護の間の相関関係の欠如を分子レベルで説明できる。

1 a 遺伝子型のE 2 で選択された抗E 2 抗体が、1 b 遺伝子型のE 2 を有するシュードタイプを中和できるため、ある程度の交差保護が、抗H C V 抗体によって提供される。

#### 【0034】

この結果は、F a b 5 0 9 が、V S V / H C V シュードタイプウイルスの感染を増大できることを示すが、V S V / G 構築物に対して効果を表さなかった。ウイルス侵入を促進するe 5 0 9 の能力についての考え得る説明は、細胞に対するウイルス付着に關与する細胞構築物であるC D 8 1 に結合するE 2 の領域に対して、この抗体が特異的に且つ非常に有効に結合するという観察に見出すことができる[24]。E 2 に対するe 5 0 9 の結合は、その細胞標的の一つに対するE 2 の結合を模倣でき、C D 8 1 によって誘導されるものと同様なE 2 の三次元構造の改変を促進できた。E 2 は少なくとも二つの三次元構造状態で存在し、このタンパク質に結合する抗体は、結合の競合なく、ヒトF a b のN O B 活性を調節することによってタンパク質の立体状態を改変できる[6]。それ故、F a b 5 0 9 は、H C V と細胞表面の間の相互作用の研究のための鍵となるツールであるようであり、ワクチンのための分子の評価のためのin vitroモデルにおいて使用できるであろう。

#### 【0035】

## [参考文献]

1. Hoofnagle, *Hepatitis C: the clinical spectrum of disease*. Hepatology, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 15S-20S.
2. Cerny and Chisari, Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. Hepatology, 1999. **30**(3): p. 595-601.
3. Fried and Hoofnagle, *Therapy of hepatitis C*. Semin Liver Dis, 1995. **15**(1): p. 82-91. 10
4. Hoofnagle and di Bisceglie, *The treatment of chronic viral hepatitis*. N Engl J Med, 1997. **336**(5): p. 347-56.
5. Burioni, et al., Dissection of human humoral immune response against hepatitis C virus E2 glycoprotein by repertoire cloning and generation of recombinant Fab fragments. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 810-4. 20
6. Burioni, et al., Non-neutralizing human antibody fragments against Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Modulate Neutralization of Binding Activity of Human Recombinant Fabs. Virology, 2001. **288**: p. 29-35.



7. Bugli, et al., Mapping B cell epitopes of Hepatitis C Virus E2 glycoprotein using human monoclonal antibodies from phage display libraries. *J Virol*, 2001. **75**(20): p. 9986-9990.
8. Matsuura, et al., Characterization of Pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology*, 2001. **286**(2): p. 263-75.
9. Bender, et al., Recombinant human antibodies: linkage of an Fab fragment from a combinatorial library to an Fc fragment for expression in mammalian cell culture. *Hum Antibodies Hybridomas*, 1993. **4**(2): p. 74-9. 10
10. Barbas, et al., Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(21): p. 10164-8.
11. Williamson, et al., Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Feb 1;91(3):1193]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(9): p. 4141-5. 20
12. Burioni, et al., Recombinant human Fab to glycoprotein D neutralizes infectivity and prevents cell-to-cell transmission of herpes simplex viruses 1 and 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(1): p. 355-9.
13. Burioni, et al., A vector for the expression of recombinant monoclonal Fab fragments in bacteria. *J Immunol Methods*, 1998. **217**(1-2): p. 195-9. 30
14. Barbas, et al., Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(19): p. 9339-43.
15. Rosa, et al., A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 1759-63. 40
16. Takikawa, et al., Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol*, 2000. **74**(11): p. 5066-74.

17. Ohashi, et al., Ligand-induced activation of chimeric receptors between the erythropoietin receptor and receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(1): p. 158-62.
18. Takada, et al., A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(26): p. 14764-9.
19. Plaisant, et al., Human monoclonal recombinant Fabs specific for HCV antigens obtained by repertoire cloning in phage display combinatorial vectors. *Res Virol*, 1997. **148**(2): p. 165-9. 10
20. Lesniewski, et al., Antibody to hepatitis C virus second envelope (HCV-E2) glycoprotein: a new marker of HCV infection closely associated with viremia. *J Med Virol*, 1995. **45**(4): p. 415-22.
21. Lefranc, et al., *IMGT, the international ImMunoGeneTics database*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(1): p. 209-12.
22. Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5<sup>th</sup> ed. 1991, Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services. 20
23. Burioni, et al., A new subtraction technique for molecular cloning of rare antiviral antibody specificities from phage display libraries *Res Virol*, 1998. **149**(5): p. 327-30.
24. Pileri, et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. *Science*, 1998. **282**(5390): p. 938-41. 30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 3 6 】

【図 1】FIT:THEORETICAL BASIS。パネル A は、競合因子の存在しない、エピトープに対する F a b - F L A G の結合を示す。( A ) に存在する F a b の同濃度を使用して、患者の血清での抗原のプレインキュベーションは、血清中の F a b によって認識されるエピトープに対して向けられた抗体の定量分析を可能にする。パネル B 及び C では、結合した抗体は、F a b と競合して、パネル A と比較して結合量を比例的に減少する。パネル D 及び E では、特異的なエピトープに対して向けられていない抗体の存在は、F a b 結合に最低限でも影響するものではない。

【図 2 A】既知の濃度の e 8 - I g G 1 及び e 5 0 9 - I g G 1 を含む血清 ( F a b によって認識されたエピトープに対して向けられた全抗体 ) による H C V / E 2 に対する e 8 - F L A G ( A ) と e 5 0 9 - F L A G ( B ) の間の結合の阻害。F A B 結合の阻害が、同じ特異性を有する全抗体の存在下でのみ観察でき、これは抗体濃度に依存することは明らかである。 40

【図 2 B】既知の濃度の e 8 - I g G 1 及び e 5 0 9 - I g G 1 を含む血清 ( F a b によって認識されたエピトープに対して向けられた全抗体 ) による H C V / E 2 に対する e 8 - F L A G ( A ) と e 5 0 9 - F L A G ( B ) の間の結合の阻害。F A B 結合の阻害が、同じ特異性を有する全抗体の存在下でのみ観察でき、これは抗体濃度に依存することは明らかである。

【図 3 A】各種の濃度の精製抗 H C V / E 2 ヒト組換え F a b による V S V / H C V 及び 50

V S V / G シュードタイプの感染の阻害。F a b 処理シュードタイプで感染された H e p G 2 を 1 6 時間インキュベートし、緑色蛍光タンパク質発現細胞の数を、蛍光顕微鏡によって測定した。データは、コントロールウェル ( F a b が添加されていない ) で検出された感染の % として提示されている。示された結果は、二重で実施した 3 の個々のアッセイの平均である。

【図 3 B】各種の濃度の精製抗 H C V / E 2 ヒト組換え F a b による V S V / H C V 及び V S V / G シュードタイプの感染の阻害。F a b 処理シュードタイプで感染された H e p G 2 を 1 6 時間インキュベートし、緑色蛍光タンパク質発現細胞の数を、蛍光顕微鏡によって測定した。データは、コントロールウェル ( F a b が添加されていない ) で検出された感染の % として提示されている。示された結果は、二重で実施した 3 の個々のアッセイの平均である。

10

【図 3 C】各種の濃度の精製抗 H C V / E 2 ヒト組換え F a b による V S V / H C V 及び V S V / G シュードタイプの感染の阻害。F a b 処理シュードタイプで感染された H e p G 2 を 1 6 時間インキュベートし、緑色蛍光タンパク質発現細胞の数を、蛍光顕微鏡によって測定した。データは、コントロールウェル ( F a b が添加されていない ) で検出された感染の % として提示されている。示された結果は、二重で実施した 3 の個々のアッセイの平均である。

【図 4】この実験で使用されたモノクローナル抗体によって認識される、H C V / E 2 の表面に存在するヒト B 細胞エピトープの二次元表面様マップ。オーバーラップしている円は、相互的な阻害を示す。V S V / H C V シュードタイプ中和活性を与えられた F a b は下線で示されている。細胞標的との H C V / E 2 の相互作用を介在する推定の領域は、二重線で示されている。中和抗体によって認識される推定の領域は、塗りつぶした黒色の円によって示されている。抗原-抗体相互作用によって誘導できる改変のため、この模式図は、実際の物理的マップに対応していない。

20

【図 1】

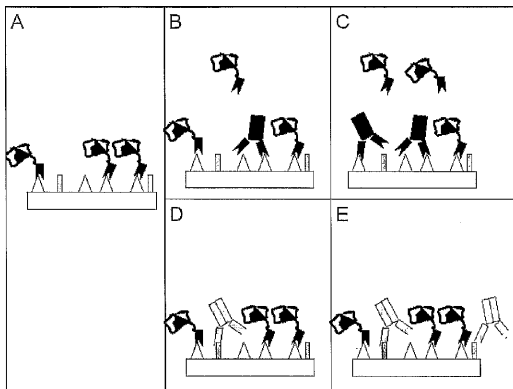


FIGURE 1

【図 2 A】

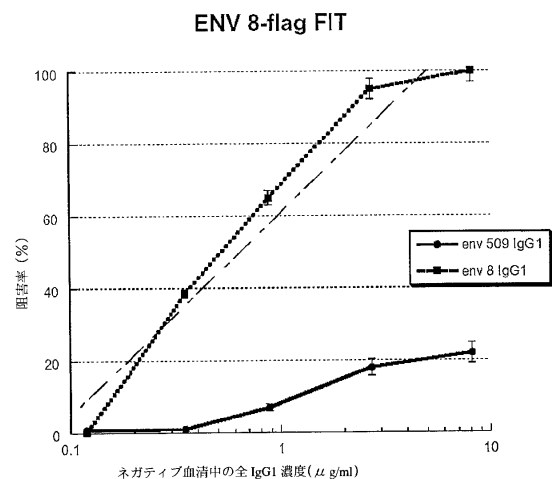


FIGURE 2A

【図 2 B】

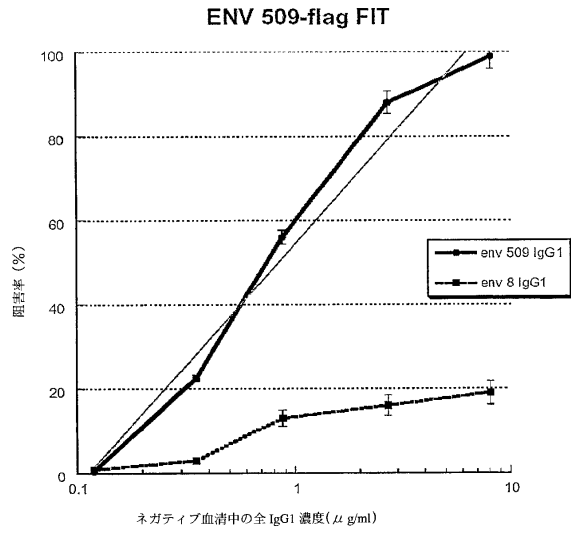


FIGURE 2B

【図 3 A】

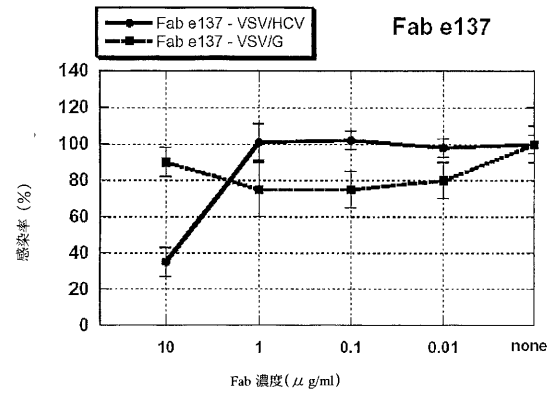


FIGURE 3A

【図 3 B】

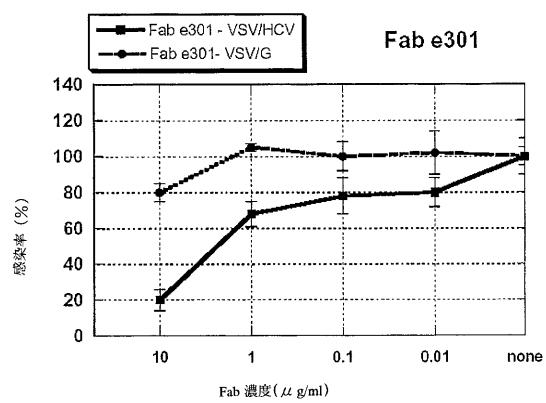


FIGURE 3B

【図 3 C】

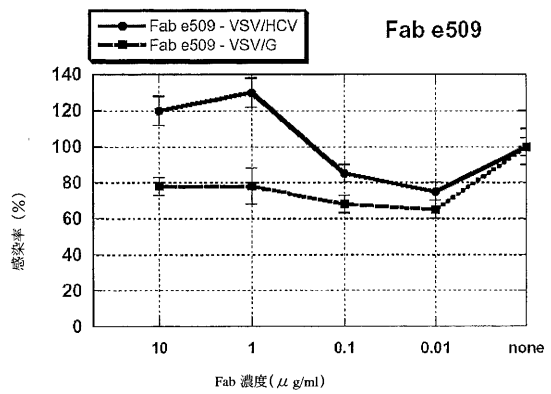


FIGURE 3C

【図 4】

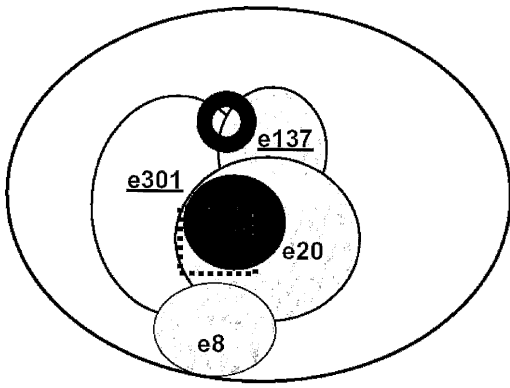


FIGURE 4

【配列表】

0004287280000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/576 (2006.01) G 0 1 N 33/576 Z

(72)発明者 ロベルト・ブリオニ  
イタリア・I - 4 7 9 0 0 ・リミニ・ピアザ・フェラーリ・2 2

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 0 5 2 6 6 ( WO , A 1 )  
Virology, (2001), Vol. 288, p. 29-35

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00  
A61K 39/395  
A61P 31/14  
C07K 16/00  
BIOSIS(STN)  
CAplus(STN)  
REGISTRY(STN)  
PubMed