

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-222729

(P2004-222729A)

(43) 公開日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 S	4 C O 8 4
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-51709 (P2004-51709)	(71) 出願人	502152193
(22) 出願日	平成16年2月26日 (2004.2.26)		インノジェネティクス・エヌ・ブイ
(62) 分割の表示	特願平8-506189の分割		I N N O G E N E T I C S N. V.
原出願日	平成7年7月31日 (1995.7.31)		ベルギー国、ビー-9052 ゲント、ボ
(31) 優先権主張番号	94870132.1		ックス 4、インダストリーパーク・ツウ
(32) 優先日	平成6年7月29日 (1994.7.29)		イナード 7
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄
		(72) 発明者	マエルテンス, ゲールト
			ベルギー国、ペー-8310 ブリュッヘ
			3、ジルベルスパーレンストラート 6
			4
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 診断用及び治療用の精製C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白

(57) 【要約】

【課題】 E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 よりなる群から選択される組換え蛋白を精製する方法等を提供する。

【解決手段】 本発明は、E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 よりなる群から選択される組換え蛋白を精製する方法に関する。本発明はまた、このような方法により単離された組成物に関する。本発明はまた、これらの組成物の診断用及び治療用の応用に関する。更に、本発明は、H C V 治療の臨床的有効性及び / 又は臨床的結果を予知及び監視するための、H C V の E 1 蛋白及びペプチドの使用に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

形質転換宿主細胞を溶解して組換えにより発現された蛋白を単離する際に、ジスルフィド結合切断剤によりジスルフィド結合切断又は還元工程を行うことを特徴とする、E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 よりなる群から選択される組換え H C V の単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白を精製する方法。

【請求項 2】

ジスルフィド結合切断又は還元工程を、部分的切断又は還元条件下で行う、請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 3】

ジスルフィド結合切断剤が、好適には 0 . 1 ~ 5 0 mM、好適には 0 . 1 ~ 2 0 mM、更に好適には 0 . 5 ~ 1 0 mM の範囲の濃度の、ジチオスレイトール (D T T) である、請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載の方法。

【請求項 4】

ジスルフィド結合切断剤が、界面活性剤である、請求の範囲第 1 項記載の方法。

【請求項 5】

界面活性剤が、好適には 1 ~ 1 0 % の濃度、更に好適には 3 . 5 % の濃度の、エンピゲン - B B (Empigen-BB) である、請求の範囲第 4 項記載の方法。

【請求項 6】

ジスルフィド結合切断剤が、D T T のような古典的ジスルフィド結合切断剤と、エンピゲン - B B のような界面活性剤との組合せを含む、請求の範囲第 1 項又は第 2 項記載の方法。

【請求項 7】

S H 基保護剤によりジスルフィド結合の再形成を阻止する工程を更に含む、請求の範囲第 1 項 ~ 第 6 項のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

S H 基保護剤が、N - エチルマレイミド (N E M) 又はその誘導体である、請求の範囲第 7 項記載の方法。

【請求項 9】

ジスルフィド結合の再形成を阻止する工程を、低 p H 条件により達成する、請求の範囲第 7 項記載の方法。

【請求項 1 0】

少なくとも以下の工程：

- 組換え E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 発現宿主細胞を、場合により N - エチルマレイミド (N E M) のような S H 基保護剤の存在下で、溶解し、
- レンチル렉チンクロマトグラフィーのようなレクチンクロマトグラフィー、あるいは抗 E 1 及び / 又は抗 E 2 特異的モノクローナル抗体を用いる免疫親和性などの親和性精製により、上記 H C V エンベロープ蛋白を回収し、
- D T T のようなジスルフィド結合切断剤を用いて、好適には N E M 又はビオチン - N E M のような S H 基保護剤の存在下で、ジスルフィド結合を還元又は切断して、そして
- 還元された E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 エンベロープ蛋白を、ゲル濾過、及び場合によりこれに続く $N i^{2+}$ - I M A C クロマトグラフィーと脱塩工程により回収する工程、

により更に特徴づけられる、請求の範囲第 1 項 ~ 第 9 項のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 1】

請求の範囲第 1 項 ~ 第 1 0 項のいずれか 1 項記載の方法により単離されることを特徴とする、E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 よりなる群から選択される実質的に精製された組換え H C V の単一の又は特定オリゴマーの組換えエンベロープ蛋白を含む組成物。

【請求項 1 2】

10

20

30

40

50

更に、組換えHCVエンベロープ蛋白が、ワクシニアのような組換え哺乳動物細胞から発現されることを特徴とする、請求の範囲第11項記載の組成物。

【請求項13】

更に、組換えHCVエンベロープ蛋白が、組換え酵母細胞から発現されることを特徴とする、請求の範囲第11項記載の組成物。

【請求項14】

ベクター配列、適切な原核生物性、真核生物性又はウイルス性プロモーター配列及びその後続く単一の又は特定オリゴマーのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白の発現を可能にするヌクレオチド配列を含む組換えベクター。

【請求項15】

ヌクレオチド配列が、更に、アミノ酸1位と192位の間の領域で開始し、アミノ酸250位と400位の間の領域で終わるか、より好適には250位と341位の間の領域で終わるか、更により好適には290位と341位の間の領域で終わる単一のHCVのE1蛋白をコードすることを特徴とする、請求の範囲第14項記載の組換えベクター。

【請求項16】

ヌクレオチド配列が、更に、アミノ酸117位と192位の間の領域で開始し、アミノ酸263位と400位の間の領域で終わるか、より好適には250位と326位の間の領域で終わる単一のHCVのE1蛋白をコードすることを特徴とする、請求の範囲第15項記載の組換えベクター。

【請求項17】

ヌクレオチド配列が、更に、264～293位プラスマイナス8アミノ酸の間の最初の疎水性ドメインが欠失している単一のHCVのE1蛋白をコードすることを特徴とする、請求の範囲第15項又は第16項記載の組換えベクター。

【請求項18】

ヌクレオチド配列が、更に、アミノ酸290位と406位の間の領域で開始し、アミノ酸600位と820位の間の領域で終わるか、より好適には322位と406位の間の領域で開始するか、更により好適には347位と406位の間の領域で開始するか、そして最も好適には364位と406位の間の領域で開始する単一のHCVのE2蛋白をコードすることを特徴とする、請求の範囲第14項記載の組換えベクター。

【請求項19】

ヌクレオチド配列が、更に、アミノ酸623、650、661、673、710、715、720、746又は809位のいずれかの位置で終わることを特徴とする、請求の範囲第18項記載の組換えベクター。

【請求項20】

ヌクレオチド配列が、更に、それに5'末端ATGコドン及び3'末端停止コドンを加えられていることを特徴とする、請求の範囲第15項～第19項のいずれか1項記載の組換えベクター。

【請求項21】

ヌクレオチド配列が、更に、コード領域の3'末端に第Xa因子切断部位及び/又は3～10個、好適には6個のヒスチジンコドンを加えられていることを特徴とする、請求の範囲第15項～第20項のいずれか1項記載の組換えベクター。

【請求項22】

配列番号3、5、7、9、11、13、21、23、25、27、29、31、35、37、39、41、43、45、47及び49に示されるいずれかの配列又はこれらの部分を含む核酸。

【請求項23】

請求の範囲第22項記載の組換え核酸を有する組換えベクター。

【請求項24】

更に、組換えHCVエンベロープ蛋白が、請求の範囲第14項～第23項のいずれか1項記載の少なくとも1つの組換えベクターの発現生成物であることを特徴とする、請求の

10

20

30

40

50

範囲第 1 1 項記載の組成物。

【請求項 2 5】

更に、上記 E 1 又は E 2 蛋白に存在する少なくとも 1 つのグリコシル化部位が、核酸レベルで除去されていることを特徴とする、請求の範囲第 1 4 項～第 2 3 項のいずれか 1 項記載の組換えベクター。

【請求項 2 6】

ベクターが、宿主細胞中で機能することが可能、かつ H C V の E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白の発現を制御することが可能な制御配列に加えて、請求の範囲第 1 4 項～第 2 2 項のいずれか 1 項記載の H C V の E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白をコードするヌクレオチド配列を含む、請求の範囲第 1 4 項～第 2 5 項のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの組換えベクターで形質転換された宿主細胞。

10

【請求項 2 7】

請求の範囲第 2 6 項記載の宿主細胞により発現された組換え E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白。

【請求項 2 8】

少なくとも以下の工程：

- 請求の範囲第 1 4 項～第 2 5 項のいずれか 1 項記載の組換えベクターで形質転換された請求の範囲第 2 6 項記載の宿主細胞を、適切な培地中で増殖させ、

- 適切な条件下で請求の範囲第 1 5 項～第 2 5 項のいずれか 1 項記載のベクター配列を発現させ、そして

20

- 好適には N - エチルマレイミド (N E M) のような S H 基保護剤の存在下で、上記形質転換細胞を溶解し、

- 例えばレクチンクロマトグラフィーあるいは抗 E 1 及び / 又は抗 E 2 特異的モノクローナル抗体を用いる免疫親和性クロマトグラフィーのような親和性精製 (上記レクチンは好適にはレンチルレクチンである) により、上記 H C V エンベロープ蛋白を回収し、次に

- 前工程の溶出液を、D T T のようなジスルフィド結合切断剤と、好適には N E M 又はビオチン - N E M のような S H 基保護剤の存在下で、インキュベートして、そして

- ゲル濾過、及び場合により更に $N i^{2+}$ - I M A C クロマトグラフィーと脱塩工程により、H C V の単一の又は特定オリゴマーの E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白を単離する工程、

30

を含むことを更に特徴とする、請求の範囲第 1 項～第 1 0 項のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 9】

少なくとも 1 つの下記の E 1 及び / 又は E 2 ペプチド：

コア / E 1 V 1 領域のアミノ酸 1 8 1 ~ 2 0 0 位にわたる E 1 - 3 1 (配列番号 5 6)、

E 1 領域のアミノ酸 1 9 3 ~ 2 1 2 位にわたる E 1 - 3 3 (配列番号 5 7)、

E 1 V 2 領域のアミノ酸 2 0 5 ~ 2 2 4 位にわたる E 1 - 3 5 (配列番号 5 8) (エピトープ B)、

E 1 V 2 領域のアミノ酸 2 0 8 ~ 2 2 7 位にわたる E 1 - 3 5 A (配列番号 5 9) (エピトープ B)、

40

E 1 領域 [V 1、C 1 及び V 2 領域 (エピトープ B を含有する)] のアミノ酸 1 9 2 ~ 2 2 8 位にわたる 1 b E 1 (配列番号 5 3)、

E 1 領域のアミノ酸 3 0 1 ~ 3 2 0 位にわたる E 1 - 5 1 (配列番号 6 6)、

E 1 C 4 領域のアミノ酸 3 1 3 ~ 3 3 2 位にわたる E 1 - 5 3 (配列番号 6 7) (エピトープ A)、

E 1 領域のアミノ酸 3 2 5 ~ 3 4 4 位にわたる E 1 - 5 5 (配列番号 6 8)、

E 2 領域のアミノ酸 3 9 7 ~ 4 1 6 位にわたる E n v 6 7 即ち E 2 - 6 7 (配列番号 7 2) (エピトープ A)、

E 2 領域のアミノ酸 4 0 9 ~ 4 2 8 位にわたる E n v 6 9 即ち E 2 - 6 9 (配列番号 7 3

50

) (エピトープ A)、
 E 2 領域の 5 8 3 ~ 6 0 2 位にわたる E n v 2 3 即ち E 2 - 2 3 (配列番号 8 6) (エピ
 トープ E)、
 E 2 領域の 5 9 5 ~ 6 1 4 位にわたる E n v 2 5 即ち E 2 - 2 5 (配列番号 8 7) (エピ
 トープ E)、
 E 2 領域の 6 0 7 ~ 6 2 6 位にわたる E n v 2 7 即ち E 2 - 2 7 (配列番号 8 8) (エピ
 トープ E)、
 E 2 領域の 5 4 7 ~ 5 6 6 位にわたる E n v 1 7 B 即ち E 2 - 1 7 B (配列番号 8 3) (エ
 ピトープ D)、
 E 2 領域の 5 2 3 ~ 5 4 2 位にわたる E n v 1 3 B 即ち E 2 - 1 3 B (配列番号 8 2) (10
 エピトープ C)、
 を含む組成物。

【請求項 3 0】

少なくとも 1 つの下記のコンフォメーション性エピトープ：
 モノクローナル抗体 1 5 C 8 C 1、1 2 D 1 1 F 1、及び 8 G 1 0 D 1 H 9 により認識さ
 れるエピトープ F、
 モノクローナル抗体 9 G 3 E 6 により認識されるエピトープ G、
 モノクローナル抗体 1 0 D 3 C 4 及び 4 H 6 B 2 により認識されるエピトープ H (又は C
)、
 モノクローナル抗体 1 7 F 2 C 2 により認識されるエピトープ I、 20
 を含む組成物。

【請求項 3 1】

請求の範囲第 1 1 項 ~ 第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項 ~ 第 3 0 項のいずれか 1 項記載
 の組成物で免疫して作成される E 1 及び / 又は E 2 特異的モノクローナル抗体。

【請求項 3 2】

薬剤としての使用のための、更に詳しくは H C V の E 1 又は E 2 抗原の存在の検出のため
 の免疫測定用キットに組み込むため、疾患の予知 / 監視のため、又は H C V 治療のための
 、請求の範囲第 3 1 項記載の E 1 及び / 又は E 2 特異的モノクローナル抗体。

【請求項 3 3】

H C V の E 1 又は E 2 抗原の検出のための免疫測定用キットの調製のための、H C V 疾 30
 患の予知 / 監視のためのキットの調製のための、又は H C V 薬剤の調製のための、請求の
 範囲第 3 1 項記載の E 1 及び / 又は E 2 特異的モノクローナル抗体の用途。

【請求項 3 4】

少なくとも下記の工程：
 (i) 免疫複合体の形成を可能にする適切な条件下で、好適には固定化された形で、請求
 の範囲第 3 1 項記載の E 1 及び / 又は E 2 特異的モノクローナル抗体に、生物学的試料を
 接触させ、
 (ii) 結合しなかった成分を除去し、
 (iii) 形成された免疫複合体を、適切な条件下で検出可能な標識物に結合されている異種 40
 抗体とインキュベートし、
 (iv) 該免疫複合体の存在を視覚的又は機械的に検出する工程
 を含む、生物学的試料中に存在する H C V 抗原のインビトロ診断の方法。

【請求項 3 5】

以下のもの：
 - 好適には固体基材上に固定された形の、請求の範囲第 3 1 項記載の少なくとも 1 つの
 E 1 及び / 又は E 2 特異的モノクローナル抗体、
 - これらの抗体と、生物学的試料中に存在する H C V 抗原との間の結合反応を可能にす
 る緩衝液又は前記緩衝液を生成するのに必要な成分、
 - 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、
 を含む、生物学的試料中に存在する H C V 抗原の存在を測定するためのキット。 50

【請求項 3 6】

薬剤として使用するための、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 3 7】

免疫応答を起こすために、場合により薬剤学的に許容しうる助剤と一緒にして、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の有効量の組成物を投与することを特徴とする、H C V に対する哺乳動物（好適にはヒト）の免疫のためのワクチンとして使用するための、前記組成物。

【請求項 3 8】

免疫応答を起こすために、場合により薬剤学的に許容しうる助剤と一緒にして、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の有効量の組成物を投与することを特徴とする、H C V に対する哺乳動物（好適にはヒト）の免疫のためのワクチンを調製するための、前記組成物の用途。

【請求項 3 9】

場合により薬剤学的に許容しうる助剤と一緒にした、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の有効量の組成物を含む、H C V に対して哺乳動物（好適にはヒト）を免疫するためのワクチン組成物。

【請求項 4 0】

生物学的試料中に存在する H C V 抗体のインビトロ検出のための、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 4 1】

生物学的試料中に存在する H C V 抗体の検出のための免疫測定用キットの調製のための、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の組成物の用途。

【請求項 4 2】

少なくとも以下の工程：

（i）免疫複合体の形成を可能にする適切な条件下で、好適には固定化された形で、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の組成物に、生物学的試料を接触させ、

（ii）結合しなかった成分を除去し、

（iii）形成された免疫複合体を、適切な条件下で検出可能な標識物に結合されている異種抗体とインキュベートし、

（iv）該免疫複合体の存在を視覚的又は機械的に検出する工程、を含む、生物学的試料中に存在する H C V 抗体のインビトロ診断の方法。

【請求項 4 3】

以下のもの：

- 好適には固体基材上に固定された形の、請求の範囲第 1 1 項～第 1 3 項、第 2 4 項又は第 2 9 項～第 3 0 項のいずれか 1 項記載の少なくとも 1 つのペプチド又は蛋白組成物、

- これらの蛋白又はペプチドと、生物学的試料中に存在する H C V に対する抗体との間の結合反応を可能にする緩衝液又は前記緩衝液を生成するのに必要な成分、

- 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、を含む、生物学的試料中に存在する H C V 抗体の存在を測定するためのキット。

【請求項 4 4】

以下の工程：

- H C V 感染患者からの生物学的試料を、E 1 蛋白又はその好適な部分と、免疫学的複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし、

- 結合しなかった成分を除去し、

- 治療の開始時及び治療中の上記試料中の抗 E 1 力価を計算し、

- 治療の開始時及び / 又は治療中の上記試料中の抗 E 1 力価に基づき、H C V 疾患の自然の経過を監視するか、又は上記患者の治療に対する応答を予知する工程、

を含む、H C V 感染に罹っている患者のH C V 疾患のインビトロ監視、又は、特にインターフェロンによる、治療に対する応答を予知するための、請求の範囲第11項～第13項又は第24項のいずれか1項記載のE1蛋白又は請求の範囲第29項記載のその部分、更に詳しくはH C V の単一のE1蛋白又はE1ペプチドを含む組成物の用途。

【請求項45】

以下のもの：

- 少なくとも1つのE1蛋白又はE1ペプチド、更に詳しくは請求の範囲第11項～第13項、第24項又は第29項のいずれか1項記載のE1蛋白又はE1ペプチド、
- これらの蛋白又はペプチドと、生物学的試料中に存在する抗E1抗体との間の結合反応を可能にする緩衝液又は前記緩衝液を生成するのに必要な成分、
- 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、
- 場合により治療の進行中の抗E1力価の低下を推定するための自動走査及び解釈装置

10

、
を含む、H C V 感染に罹っている患者のH C V 疾患の監視、又は、特にインターフェロンによる、治療に対する応答を予知するためのキット。

【請求項46】

少なくとも以下の工程：

(i) 免疫複合体の形成を可能にする適切な条件下で、好適には固定化された形で、請求の範囲第11項～第13項又は第24項のいずれか1項記載の少なくとも1つのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白組成物、あるいは請求の範囲第29項記載の少なくとも1つのE1又はE2ペプチド組成物に、1つ又はそれ以上の血清型のH C V 抗体の存在について分析すべき生物学的試料を接触させ、

20

(ii) 結合しなかった成分を除去し、

(iii) 形成された免疫複合体を、適切な条件下で検出可能な標識物に結合されている異種抗体とインキュベートし、

(iv) 該免疫複合体の存在を視覚的又は機械的に(例えば、デンシトメーター、蛍光測定、比色法により)検出し、観察された結合パターンから1つ又はそれ以上のH C V 血清型の存在を推定する工程、

を含む、生物学的試料中に存在するH C V の1つまたはそれ以上の血清型を検出するための、更に詳しくは検出すべきH C V の異なる型の抗体を検出するため

30

の、1つの測定フォーマットに組合せた血清型測定法。

【請求項47】

以下のもの：

- 請求の範囲第11項～第13項、第24項のいずれか1項記載の少なくとも1つのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白、あるいは請求の範囲第29項記載のE1又はE2ペプチド、

- これらの蛋白又はペプチドと、生物学的試料中に存在する抗E1抗体との間の結合反応を可能にする緩衝液又は前記緩衝液を生成するのに必要な成分、

- 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、

- 場合により、観察された結合パターンから1つ又はそれ以上の血清型の存在を検出するための自動走査及び解釈装置、

40

を含む、生物学的試料中に存在するH C V の1つ又はそれ以上の血清型を分類する(serotyping)ための、更に詳しくはH C V のこれらの血清型に対する抗体を検出するためのキット。

【請求項48】

請求の範囲第42項～第46項のいずれか1項記載の方法によりH C V の有無又は遺伝子型を決定するために、固体基材上に固定化するための、及び逆相ハイブリダイゼーション測定法に取り込むための、好適には膜ストリップのような固体支持体上に平行線状に固定化するための、請求の範囲第11項～第13項、第24項又は第29項のいずれか1項記載のペプチド又は蛋白組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換え蛋白発現、組換え蛋白の精製、合成ペプチド、HCV感染の診断、HCV感染に対する予防的処置の一般的分野、及び慢性肝炎患者の治療の臨床的有効性の予後/監視、又は自然の疾患の予後/監視に関する。

【0002】

更に詳しくは、本発明は、C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白の精製方法、診断、予防又は治療における本発明に記載の方法により精製されたHCVエンベロープ蛋白の使用、疾患を監視するための測定法、及び/又は疾患の診断、及び/又は疾患の治療における単一の又は特定オリゴマーのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2エンベロープ蛋白の使用に関する。

10

【背景技術】

【0003】

本発明に記載の方法により細胞溶解物(ライセート)から精製されたE2蛋白は、患者血清の約95%と反応する。この反応性は、CHO細胞から分泌されたE2の反応性と同様である(Spaeteら、1992)。しかし、細胞内で発現された形態のE2は、マンノース炭水化物モチーフの含量が多いため、より密接に未変性のウイルスエンベロープ蛋白に類似しており、一方、CHO細胞から分泌されたE2蛋白は、ガラクトース及びシアル酸糖残基で更に修飾されている。E2のアミノ末端側の半分がバキュロウイルス系で発現されると、幾つかの患者群の血清のわずかに約13~21%のみしか検出できない(Inoueら、1992)。大腸菌(*E. coli*)からE2を発現させると、HCV血清の反応性は更に低く、14%(Yokosukaら、1992)~17%(Mitaら、1992)の範囲であった。

20

【0004】

本発明のワクシニアで発現させた精製した組換えE1蛋白を用いると、HCV血清の約75%(及び慢性患者の約95%)は抗E1陽性であり、Koharaら(1992)及びHsuら(1993)の結果とは全く異なる。Koharaらは、ワクシニアウイルス発現E1蛋白を使用し、患者の7~23%に抗E1抗体を検出し、一方、Hsuらは、バキュロウイルス発現E1を使用して、わずかに14/50(28%)の血清のみを検出した。

【0005】

これらの結果は、エンベロープ蛋白のヒト患者血清との高い反応性を得るには、良好な発現系のみならず良好な精製プロトコールが必要であることを示している。これは、蛋白の本来の折りたたみの保存を保証する本発明の適正な発現系及び/又は精製プロトコールを用い、夾雑蛋白の排除を保証し、コンフォメーションを保ち、及びこれによりHCVエンベロープ蛋白の反応性を保持する本発明の精製プロトコールを用いることにより、達成される。診断的スクリーニング測定法に必要な精製HCVエンベロープ蛋白の量は、1年間に数グラムの範囲である。ワクチンとして使用するには、更に多量のエンベロープ蛋白が必要であろう。したがって、最適の発現構築物の選択及び小規模のスケールアップにはワクシニアウイルス系が使用でき、高マンノース炭水化物を含有する単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白の大規模発現と精製は、数種の酵母株から発現される場合に達成されうる。例えばB型肝炎の場合は、哺乳動物細胞からのHBsAgの製造は、酵母由来のB型肝炎ワクチンと比較して、はるかに費用がかさむ。

30

40

【0006】

発明の目的

本発明の目的は、組換えにより発現させたE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白を、凝集物ではなく、夾雑物を含まない単一の又は特定オリゴマーの組換え蛋白として、診断用及びワクチンに直接使用できるように、該組換え蛋白の新規の精製方法を提供することである。

【0007】

本発明の別の目的は、HCVのE1及び/又はE2ドメインからのコンフォメーション

50

性エピトープを含む精製（単一の又は特定オリゴマーの）組換え E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 糖蛋白を含む組成物を提供することである。

【 0 0 0 8 】

本発明の更に別の目的は、E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白を組換えにより発現させるための新規な組換えベクター構築物、及び該ベクター構築物で形質転換された宿主細胞を提供することである。

【 0 0 0 9 】

本発明の目的はまた、組換え H C V E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白の製造方法及び精製方法を提供することである。

【 0 0 1 0 】

本発明の目的はまた、本発明の組換え H C V E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白の診断及び免疫原用の用途を提供すると共に、本発明の組換え H C V E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白のいずれかを含む、診断用キット、ワクチン又は治療剤を提供することである。

【 0 0 1 1 】

本発明のさらなる目的は、H C V 感染に罹っている患者の（例えば、インターフェロンによる）治療に対する応答を監視 / 予知するための、E 1、E 2、及び / 又は E 1 / E 2 蛋白、又はその好適な部分の新規な用途を提供することである。

【 0 0 1 2 】

本発明の目的はまた、H C V スクリーニング及び確認抗体試験における本発明の組換え E 1、E 2、及び / 又は E 1 / E 2 蛋白の用途を提供することである。

【 0 0 1 3 】

本発明の目的はまた、H C V 感染の診断、及び抗体の作成に使用できる E 1 及び / 又は E 2 ペプチドを提供することである。このようなペプチドは、ヒトのモノクローナル抗体を単離するために使用することもできる。

【 0 0 1 4 】

本発明の目的はまた、E 1 及び / 又は E 2 エピトープ（組換え蛋白中に含有されているペプチド又はコンフォメーション性エピトープ中に含有されている）と特異的に反応する、モノクローナル抗体、更に詳しくはヒトモノクローナル抗体又はヒト化されたマウスモノクローナル抗体を提供することである。

【 0 0 1 5 】

本発明の目的はまた、H C V 抗原の検出又は慢性 H C V 感染の治療のための、抗 E 1 又は抗 E 2 モノクローナル抗体の可能な用途を提供することである。

【 0 0 1 6 】

本発明の目的はまた、H C V 感染に罹っている患者の（例えば、インターフェロンによる）治療に対する応答を監視 / 予知するための、又は該疾患の予後を監視 / 予知するためのキットを提供することである。

【 0 0 1 7 】

本発明の全ての目的は、後述する実施態様により達成されたと考えられる。

【 0 0 1 8 】

定義

以下の定義は、本発明に使用される異なる用語や表現を例示する。

【 0 0 1 9 】

「C 型肝炎ウイルス単一エンベロープ蛋白」という用語は、E 1 又は E 2 領域の少なくとも 1 つの H C V エピトープを定義するアミノ酸配列（及び / 又はアミノ酸類似体）を含む、ポリペプチド又はその類似体（例えば、ミモトープ（mimotopes））を意味する。これらの単一のエンベロープ蛋白は、広義には、組換えにより発現されたエンベロープ蛋白のモノマー形態でもホモオリゴマー形態でもよい。典型的には、エピトープを規定する配列は、H C V の E 1 又は E 2 領域のアミノ酸配列に対応する（同一であるか、又はエピトープを破壊しない本来のアミノ酸残基の類似体の置換による）。一般に、エピトープを規定

10

20

30

40

50

する配列の長さは、3個以上のアミノ酸、更に典型的には5個以上のアミノ酸、更に典型的には8個以上のアミノ酸、そして更に典型的には10個以上のアミノ酸である。コンフォメーション性エピトープは、抗原の三次元構造（例えば、折りたたみ）により形成されると考えられるため、エピトープを規定する配列の長さは大きく変動しうる。すなわち、エピトープを規定するアミノ酸は、数は比較的少ないが、折りたたみにより正しいエピトープのコンフォメーションとなる分子の長さに沿って広く散在している。エピトープを規定する残基間の抗原の部分は、エピトープのコンフォメーション構造に決定的に重要ではない可能性がある。例えば、エピトープコンフォメーションに決定的に重要な配列（例えば、ジスルフィド結合に関与するシステイン、グリコシル化部位など）が維持されるならば、これらの介在配列を欠失又は置換させても、コンフォメーション性エピトープは影響を受けないことがある。コンフォメーション性エピトープはまた、ホモオリゴマー又はヘテロオリゴマーのサブユニットの2個以上の基本的領域により形成されてもよい。

10

【0020】

本発明のHCV抗原は、HCVのE1及び/又はE2（エンベロープ）ドメインからのコンフォメーション性エピトープを含む。ウイルスのエンベロープ蛋白に対応すると考えられているE1ドメインは、現在、HCVポリ蛋白のアミノ酸192～383にまたがっていると推定されている（Hijikataら、1991）。哺乳動物系で発現される（グリコシル化される）と、35 kDaの概算分子量（SDS-PAGEにより測定）を有すると考えられている。E2蛋白（以前はNS1と呼ばれていた）は、HCVポリ蛋白のアミノ酸384～809又は384～746にまたがっており（Grakouiら、1993）、これもまたエンベロープ蛋白であると考えられている。ワクシニア系で発現される（グリコシル化される）と、見かけのゲル分子量約72 kDaを有すると考えられている。これらの蛋白の終点は近似的なものであると理解される（例えば、E2のカルボキシ末端は、大体730～820アミノ酸領域のどこかであることができ、例えばアミノ酸730、735、740、742、744、745、好適には746、747、748、750、760、770、780、790、800、809、810、820で終わる）。E2蛋白はまた、E1、P7（アミノ酸747～809）、NS2（アミノ酸810～1026）、NS4A（アミノ酸1658～1711）又はNS4B（アミノ酸1712～1972）と一緒に発現されてもよい。正しい蛋白の折りたたみを得るために、これらの他のHCV蛋白と一緒に発現されることが重要なことがある。

20

30

【0021】

また、本発明の実施例の項で使用される単離株は、本発明の範囲を限定するものではなく、HCVの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10型、又は他の任意の新規の遺伝子型からのHCV単離株は、本発明の実施のためのE1及び/又はE2配列の好適な供給源である、と理解される。

【0022】

本発明で使用されるE1及びE2抗原は、全長ウイルス蛋白、その実質的全長型、又はその機能性断片（例えば、エピトープの形成又は保持に必須な配列を失っていない断片）であってよい。更に、本発明のHCV抗原はまた、目的のコンフォメーション性エピトープの形成を阻止又は妨害しない他の配列も含んでよい。コンフォメーション性エピトープの有無は、目的の抗原を抗体（そのコンフォメーション性エピトープに対するポリクローナル血清又はモノクローナル抗体）でスクリーニングし、その反応性を、その抗原の変性したもの（たとえあるとしても、直鎖のエピトープのみを保持する）の反応性と比較することにより、容易に決定できる。このようなスクリーニングでポリクローナル抗体を用いる場合は、ポリクローナル血清をまず変性抗原で吸収して、目的の抗原に対する抗体が保持されているか否かを調べることを有利である可能性がある。

40

【0023】

本発明のHCV抗原は、目的のエピトープを与える任意の組換え法により作成できる。例えば、哺乳動物細胞又は昆虫細胞での組換え細胞内発現は、天然のHCV抗原の場合のように「未変性の」コンフォメーションでグリコシル化されたE1及び/又はE2抗原を

50

提供するための好ましい方法である。酵母細胞及び突然変異酵母株〔例えば、m n n 9 突然変異体（Kniskernら、1994）、又はパナジン酸耐性選択（Ballouら、1991）により得られるグリコシル化突然変異体〕は、分泌される高マンノース型の糖の産生に理想的に適しており、一方、哺乳動物細胞から分泌された蛋白は、幾つかの診断用途又はワクチン用途には不適である可能性があるガラクトース又はシアル酸を含有するなどの修飾を受けていることがある。しかし、ある用途には、蛋白について公知であるように、他の組換え宿主（例えば、大腸菌）中で抗原を発現させて、回収後蛋白を復元することも、可能であり、充分である。

【0024】

「融合ポリペプチド」という用語は、H C V 抗原が1つの連続的なアミノ酸鎖（この鎖は天然には存在しない）の一部であるポリペプチドを意味する。H C V 抗原は、互いにペプチド結合により直接連結しているか、又は介在するアミノ酸配列により分離していてもよい。融合ポリペプチドはまた、H C V にとって外来性のアミノ酸配列を含有してもよい。

10

【0025】

「固相」という用語は、各H C V 抗原又はH C V 抗原を含む融合ポリペプチドが、共有結合又は疎水性吸着のような非共有結合により結合する固体を意味する。

【0026】

「生物学的試料」という用語は、個体により産生された抗体、更に詳しくはH C V に対する抗体を通常含有する、哺乳動物個体（例えば、類人猿、ヒト）の体液又は組織を意味する。体液又は組織はまた、H C V 抗原をも含有してもよい。このような成分は当該分野で公知であり、血液、血漿、血清、尿、脊髄液、リンパ液、呼吸器系・腸管又は尿生殖路の分泌物、涙、唾液、乳、白血球及び骨髓腫細胞などがあるが、これらに限定されない。身体成分には、生物学的液体が含まれる。「生物学的液体」という用語は、生物から得られる液体を意味する。幾つかの生物学的液体は、他の生成物（例えば、第VIII：C 因子のような凝固因子、血清アルブミン、成長ホルモンなど）の供給源として使用される。このような場合、生物学的液体の供給源が、H C V のようなウイルスで汚染されていないことが重要である。

20

【0027】

「免疫学的に反応性」という用語は、問題の抗原が、H C V に感染した個体からの身体成分に存在する抗H C V 抗体と特異的に反応することを意味する。

30

【0028】

「免疫複合体」という用語は、抗原上のエピトープに抗体が結合すると形成される組合せを意味する。

【0029】

本明細書で使用される「E 1」は、H C V ポリ蛋白の最初の400アミノ酸内で発現される蛋白又はポリペプチドを意味し、時にE、E N V 又はS 蛋白と呼ばれる。この天然の形態は、膜に強く結合して存在する35 kDa の糖蛋白である。ほとんどの天然のH C V 株では、E 1 蛋白は、C（コア）蛋白の後に続いてウイルスポリ蛋白中にコードされている。E 1 蛋白は、全長ポリ蛋白のおよそアミノ酸（a a）192から約a a 383まで広がっている。

40

【0030】

本明細書で使用される「E 1」という用語は、天然のE 1と免疫学的に交差反応する類似体及び端を切り取った（短縮）形態も含み、遺伝子型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は他の新たに同定されたあらゆるH C V タイプ若しくはサブタイプのE 1 蛋白を含む。

【0031】

本明細書で使用される「E 2」は、H C V ポリ蛋白の最初の900アミノ酸内で発現される蛋白又はポリペプチドを意味し、時にN S 1 蛋白と呼ばれる。この天然の形態は、膜に強く結合して存在する72 kDa の糖蛋白である。ほとんどの天然のH C V 株では、E 2 蛋白はE 1 蛋白の後に続いてウイルスポリ蛋白中にコードされている。E 2 蛋白は、およ

50

そアミノ酸 384 位からアミノ酸 746 位まで広がっており、別の形態の E2 は、アミノ酸 809 位まで広がっている。本明細書で使用する「E2」という用語は、天然の E2 と免疫学的に交差反応する類似体及び端を切り取った形態も含む。例えば、コドン 383 と 384 の間への複数のコドンの挿入、及びアミノ酸 384 ~ 387 の欠失が、Katoら (1992) により報告されている。

【0032】

本明細書で使用する「E1/E2」は、少なくとも 1 つの E1 成分と少なくとも 1 つの E2 成分とを含有するオリゴマー形態のエンベロープ蛋白を意味する。

【0033】

「特定オリゴマーの」E1 及び/又は E2 及び/又は E1/E2 エンベロープ蛋白という用語は、凝集物ではない、全ての可能なオリゴマー形態の、組換えにより発現された E1 及び/又は E2 エンベロープ蛋白を意味する。E1 及び/又は E2 特定オリゴマーのエンベロープ蛋白はまた、ホモオリゴマーの E1 又は E2 エンベロープ蛋白 (後述) と呼ばれる。

【0034】

「単一の又は特定オリゴマーの」E1 及び/又は E2 及び/又は E1/E2 エンベロープ蛋白という用語は、単一のモノマー性 E1 又は E2 蛋白 (単語の厳密な意味において単一)、及び特定オリゴマーの E1 及び/又は E2 及び/又は E1/E2 組換え発現蛋白を意味する。本発明のこれらの単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白は、更に、以下の式 $(E1)_x (E2)_y$ [式中、x は 0 と 100 の間の数であり、y は 0 と 100 の間の数であるが、ただし、x と y の両方が 0 であることはない] により定義される。x = 1 で y = 0 の時、該エンベロープ蛋白はモノマー性 E1 を含む。

【0035】

本明細書で使用する「ホモオリゴマー」という用語は、2 つ以上の E1 又は E2 モノマーを含有する E1 及び/又は E2 の複合体を意味し、例えば、E1/E1 二量体、E1/E1/E1 三量体又は E1/E1/E1/E1 四量体、及び E2/E2 二量体、E2/E2/E2 三量体又は E2/E2/E2/E2 四量体、E1 五量体及び六量体、E2 五量体及び六量体、又は E1 若しくは E2 の任意のより高次のホモオリゴマーは、本明細書の定義の範囲内で全て「ホモオリゴマー」である。このオリゴマーは、C 型肝炎ウイルスの異なるタイプ又はサブタイプから得られる E1 又は E2 の、1 つ、2 つ又は数個の異なるモノマーを含有してもよく、例えば、WO 94/25601 として公開された国際出願及びヨーロッパ特許出願第 94870166.9 号 (両者とも本出願人による) に記載のものを含む。このような混合オリゴマーも本発明の範囲内でホモオリゴマーであり、HCV のより普遍的な診断、予防又は治療を可能に示す。

【0036】

本明細書に記載の蛋白に適用される「精製された」という用語は、目的の蛋白が、組成物中の総蛋白成分の少なくとも 35 % を構成している組成物を意味する。目的の蛋白は、好適には総蛋白成分の少なくとも 40 %、より好適には少なくとも約 50 %、より好適には少なくとも約 60 %、更により好適には少なくとも約 70 %、更により好適には少なくとも約 80 %、更により好適には少なくとも約 90 %、最も好適には少なくとも約 95 % を構成する。該組成物は、本発明で使用する純度 (%) の測定に影響しない他の化合物 (例えば、炭水化物、塩、脂質、溶媒など) を含有してもよい。「単離された」HCV 蛋白は、少なくとも 35 % の純度の HCV 蛋白組成物を意味する。

【0037】

「実質的に精製された蛋白」という用語は、インビトロの診断方法及び治療用化合物として使用できるように精製された蛋白を意味する。これらの蛋白は、実質的に細胞性蛋白、ベクター由来蛋白、又は他の HCV ウイルス成分を含まない。これらの蛋白は、通常均質 (少なくとも純度 80 %、好適には 90 %、より好適には 95 %、より好適には 97 %、より好適には 98 %、より好適には 99 %、更に好適には 99.5 %、そして最も好適には、SDS-PAGE や銀染色のような従来法により、夾雑蛋白が検出されない) にな

るまで精製される。

【0038】

本発明に関連して使用される「組換えにより発現された（組換え発現）」という用語は、以下に詳述するように、本発明の蛋白が、原核生物であれ、又は下等若しくは高等真核生物中であれ、組換え発現方法で産生されたことを意味する。

「下等真核生物」という用語は、酵母、真菌などのような宿主細胞を意味する。下等真核生物は、一般に（必ずしもそうとは限らないが）単細胞である。好ましい下等真核生物は、酵母であり、特にサッカロミセス (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*)、クルベロミセス (*Kluyveromyces*)、ピヒア (*Pichia*) [例えば、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*)]、ハンゼヌラ (*Hansenula*) [例えば、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)]、ヤロウィア (*Yarrowia*)、シュワニオミセス (*Schwanniomyces*)、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*)、チゴサッカロミセス (*Zygosaccharomyces*)などに属する種がある。サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、S・カールスベルゲンシス (*S. carlsbergensis*)及びK・ラクチス (*K. lactis*)は、最も一般的に使用される酵母宿主であり、好都合な真菌宿主である。

10

【0039】

「原核生物」という用語は、大腸菌 (*E. coli*)、乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、ラクトコッカス (*Lactococcus*)、サルモネラ (*Salmonella*)、連鎖球菌 (*Streptococcus*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、又はストレプトミセス (*Streptomyces*)のような宿主を意味する。これらの宿主もまた、本発明中で考慮される。

20

「高等真核生物」という用語は、高等動物（例えば、哺乳動物、は虫類、昆虫など）に由来する宿主細胞を意味する。現在好適な高等真核生物宿主細胞は、チャイニーズハムスター（例えば、CHO）、サル（例えば、COS及びVero細胞）、ベビーハムスター腎（BHK）、ブタ腎（PK15）、ウサギ腎13細胞（RK13）、ヒト骨肉腫細胞株143B、ヒト細胞株HeLa及びヒト肝癌細胞株（例えばHepG2）、及び昆虫細胞株（例えば、スポドプテラ・フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*))から得られる。宿主細胞は、浮遊又はフラスコ培養、組織培養、器官培養などで提供されてもよい。あるいは、宿主細胞は、トランスジェニック動物であってもよい。

【0040】

「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸のポリマーを意味し、生成物の特定の長さを意味しない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、及び蛋白は、ポリペプチドの定義に含まれる。この用語は、ポリペプチドの発現後の修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化など）も排除しない。この定義に含まれるものは、例えば、アミノ酸の1つまたはそれ以上の類似体（例えば、非天然アミノ酸、PNAなどを含む）を含有するポリペプチド、置換された結合を有するポリペプチド、及び当業者に公知の他の修飾物（天然に存在するものも存在しないものも含む）がある。

30

【0041】

「組換えポリヌクレオチド又は核酸」という用語は、ゲノム、cDNA、半合成又は合成由来のポリヌクレオチド又は核酸を意味し、これは、その起源又は操作により、（1）天然の状態で結合しているポリヌクレオチドの全て又は一部と結合していない、（2）天然の状態で結合しているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに結合している、又は（3）天然には存在しない。

40

【0042】

「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」という用語、及び単細胞として培養された微生物又は高等真核生物細胞株を意味する他の類似の用語は、組換えベクター又は他の移入（transfer）ポリヌクレオチドの受容者として使用できるか又は使用されている細胞を意味し、トランスフェクションされた元々の細胞の子孫を包含する。自然の、偶然の又は意図的な突然変異があるため、1つの親細胞の子孫は、形態又はゲノムDNA若しくは総DNAの相補性において必ずしも元々の親と完全に同一でなくてもよいと理解される。

50

【 0 0 4 3 】

「レプリコン」という用語は、細胞内でポリヌクレオチド複製の自律的単位として機能する（すなわち、自らの制御下で複製できる）任意の遺伝要素（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、コスミドなど）である。

【 0 0 4 4 】

「ベクター」という用語は、目的の読みとり枠（open reading frame）の発現及び／又は複製を提供する配列を更に含むレプリコンである。

【 0 0 4 5 】

「調節配列」という用語は、これに連結しているコード配列を発現させるのに必要なポリヌクレオチド配列である。このような調節配列の本質は、宿主生物に依存して異なる。すなわち、原核生物では、このような調節配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結部（ターミネーター）を含み、真核生物では、このような調節配列は、一般に、プロモーター、ターミネーター、及びある場合にはエンハンサーを含む。「調節配列」という用語は、少なくともその存在が発現に必要な全ての成分を包含し、また、その存在が有利である付加的成分（例えば、分泌を制御するリーダー配列）も包含してよい。

10

【 0 0 4 6 】

「プロモーター」という用語は、隣接する構造遺伝子の正常な転写開始部位で mRNA 産生が開始するように、RNA ポリメラーゼが DNA 鋳型に結合することを可能にする共通配列を含むヌクレオチド配列である。

20

【 0 0 4 7 】

「作動可能に連結した」という用語は、このように記載された成分が、その目的とする方法で機能することを可能にする関係にある近接関係を意味する。コード配列に「作動可能に連結した」調節配列は、調節配列と適合性のある条件下でコード配列の発現が達成される方法で連結している。

【 0 0 4 8 】

「読みとり枠」（ORF）は、ポリペプチドをコードし、停止コドンを含まないポリヌクレオチド配列の領域である。この領域は、コード配列の一部又は全コード配列であってもよい。

【 0 0 4 9 】

「コード配列」は、適切な制御配列の支配下に置くと、mRNA に転写され、及び／又はポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。コード配列の境界は、5' 末端の翻訳開始コドンと、3' 末端の翻訳停止コドンとにより決定される。コード配列は、mRNA、DNA（cDNA を含む）、及び組換えポリヌクレオチド配列を包含しうるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される「エピトープ」又は「抗原決定基」は、免疫反応性のあるアミノ酸配列を意味する。一般的に、エピトープは、少なくとも 3 ～ 4 個のアミノ酸、更に一般的には少なくとも 5 又は 6 個のアミノ酸よりなり、時にエピトープは約 7 ～ 8 個、又は更には約 10 個のアミノ酸よりなる。本明細書において、指定されたポリペプチドのエピトープは、指定されたポリペプチド中のエピトープと同じアミノ酸配列を有するエピトープ、及びその免疫学的等価物を意味する。このような等価物には、例えば、遺伝子型 1 a、1 b、1 c、1 d、1 e、1 f、2 a、2 b、2 c、2 d、2 e、2 f、2 g、2 h、2 i、3 a、3 b、3 c、3 d、3 e、3 f、3 g、4 a、4 b、4 c、4 d、4 e、4 f、4 g、4 h、4 i、4 j、4 k、4 l、5 a、5 b、6 a、6 b、6 c、7 a、7 b、7 c、8 a、8 b、9 a、9 b、10 a に属する、現在公知の配列又は株などの、又は他の新たに定義される任意の HCV（サブ）タイプの、株、サブタイプ（＝遺伝子型）、又はタイプ（群）特異的変異体も包含される。エピトープを構成するアミノ酸は直鎖の配列の一部である必要はなく、任意の数のアミノ酸が散在していてコンフォメーション性エピトープを形成してもよいと理解すべきである。

40

50

【 0 0 5 1 】

「免疫原性」という用語は、単独で又は担体と結合して、アジュバントの存在下又は非存在下で、体液性及び／又は細胞性応答を引き起こす、物質の能力を意味する。「中和」とは、部分的又は完全に、感染性因子の感染性を阻止する免疫応答を意味する。「ワクチン」は、部分的又は完全な、HCVに対する防御を誘導することができる免疫原性組成物である。ワクチンはまた、個体の治療に有用であることがあり、この場合、これは治療用ワクチンと呼ばれる。

【 0 0 5 2 】

「治療薬」という用語は、HCV感染を治療することができる組成物を意味する。

【 0 0 5 3 】

「有効量」という用語は、それが投与された個体の免疫原性応答を誘導するか又は目的の系（例えば、免疫測定法）において検出できる程度に免疫反応するのに十分な、エピトープ含有ポリペプチドの量を意味する。好適には、この有効量は、前記で定義したように、治療をするのに充分である。必要な正確な量は、用途に応じて異なる。例えば、ワクチンとしての応用、又はポリクローナル抗血清／抗体の産生のためには、有効量は、個体の種、年齢及び一般的状態、治療すべき疾患の重篤度、選択された特定のポリペプチド及び投与方法などにより異なりうる。また、有効量は、比較的広い、決定的に重要ではない範囲にあると考えられる。適切な有効量は、通常の実験のみにより容易に決定することができる。HCV疾患の予防のためのE1及び／又はE2及び／又はE1／E2単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白の好適な範囲は、0.01～100 µg/用量、好適には0.1～50 µg/用量である。十分な免疫応答とその後のHCV疾患に対する防御のために、個体当たり数回の用量が必要な場合もある。

【 0 0 5 4 】

発明の詳細な説明

更に詳しくは、本発明は、形質転換された宿主細胞を溶解して組換えにより発現された蛋白を単離する場合に、ジスルフィド結合切断剤によりジスルフィド結合切断又は還元工程を行うことを特徴とする、E1及び／又はE2及び／又はE1／E2よりなる群から選択される組換えHCVの単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白を単離又は精製する方法に関する。

【 0 0 5 5 】

本発明のこれらの「単一の又は特定オリゴマーの」エンベロープ蛋白の本質は、これらには夾雑蛋白が含まれず、かつ夾雑物質とジスルフィド結合で結合していないということである。

【 0 0 5 6 】

本発明の蛋白は、下等又は高等真核生物細胞あるいは原核生物細胞中で組換え技術で発現される。本発明の組換え蛋白は、好適にはグリコシル化されており、高マンノース型の、ハイブリッドの、又は複合のグリコシル化を受けていてもよい。好適には、該蛋白は、実施例の項で詳述されるように哺乳動物の細胞株から、又はこれも実施例の項で詳述されるように突然変異酵母株のような酵母中で発現される。

【 0 0 5 7 】

本発明の蛋白は、小胞体又はゴルジ装置のような細胞成分内で発現されてもよく又は分泌されてもよい。しかし好適には、本発明の蛋白は、高マンノース型のグリコシル化を受けており、哺乳動物細胞の小胞体又はゴルジ装置中に保持されるか、又は酵母細胞中に保持されるか又はそこから分泌され、好適には、mn9突然変異体（Kniskernら、1994）のような酵母突然変異株又はパナジン酸耐性（Ballouら、1991）により選択された突然変異体から分泌される。

【 0 0 5 8 】

HCVエンベロープ蛋白の発現に際し、本発明者らは、分子内又は分子間ジスルフィド架橋に関与していないシステインの遊離チオール基の幾つかが、宿主又は発現系由来（例えばワクシニア）蛋白あるいは他のHCVエンベロープ蛋白（単一の又はオリゴマーの）

10

20

30

40

50

のシステインと反応して、非特異的分子間架橋を形成することを示すことができた。これにより、夾雑蛋白と共にHCVエンベロープ蛋白の「凝集物」が形成される。WO 92/08734において、精製後に「凝集物」が得られたことが示されていたが、どの蛋白相互作用が関与していたかは記載されなかった。PCT特許WO 92/08734において、ワクシニアウイルス系で発現された組換えE1/E2蛋白は、凝集物として部分的に精製され、その純度はわずかに70%であることが見出されたため、精製された凝集物は、診断、予防又は治療の目的に有用ではなかった。

【0059】

したがって、本発明の主要な目的は、単一の又は特定オリゴマーのHCVエンベロープ蛋白を夾雑蛋白から分離し、精製した蛋白（純度>95%）を診断、予防及び治療の目的に使用することである。これらの目的のために、本発明者らは、凝集した蛋白複合体（「凝集物」）はジスルフィド架橋と非共有結合的蛋白-蛋白相互作用とに基づいて形成されるという証拠を提供することができた。したがって、本発明は、特異的条件下でジスルフィド結合を選択的に切断するための手段、及び診断、予防及び治療上の利用を大きく妨害する夾雑蛋白から、切断された蛋白を分離するための手段を提供する。ジスルフィド架橋の再形成を防止するために、遊離のチオール基をブロック（可逆的に又は不可逆的に）してもよく、又は放置して酸化させ、他のエンベロープ蛋白とオリゴマーを形成させてもよい（ホモオリゴマーの定義を参照）。夾雑蛋白のレベルが検出不能であるため、このような蛋白オリゴマーは、WO 92/08734及びWO 94/01778に記載の「凝集物」とは本質的に異なることは理解されるべきである。

【0060】

該ジスルフィド結合の切断は、以下の方法によっても達成される。

【0061】

(1) システイン残基がシステイン酸に修飾される、システイン酸による過ギ酸酸化（Moreら、1963）。

【0062】

(2) 例えば妥当な酸化剤（例えば、 Cu^{2+} ）と共に亜硫酸塩（ SO_3^{2-} ）を用いる、システインがS-スルホシステインに修飾される、亜硫酸分解（ $\text{R-S-S-R} \rightarrow 2\text{R-SO}_3^-$ ）（Bailey and Cole、1959）。

【0063】

(3) ジチオスレイトール（DTT）、 β -メルカプトエタノール、システイン、グルタチオンレッド、 ϵ -メルカプトエチルアミン、又はチオグリコール酸のようなメルカプタンによる還元〔このうち、DTTと β -メルカプトエタノールが通常使用される（Cleland、1964）〕は、水環境で実施することができ、システインが修飾を受けないため、本発明の好適な方法である。

【0064】

(4) ホスフィン（例えば、 Bu_3P ）による還元（Ruegg and Rudinger、1977）。

【0065】

したがって、これらの化合物は全て、本発明のジスルフィド結合を切断するための物質又は手段と見なされる。

【0066】

本発明の該ジスルフィド結合切断（又は還元）工程は、好適には部分的ジスルフィド結合切断（還元）工程である（部分的切断又は還元条件下で実施される）。

【0067】

本発明の好適なジスルフィド結合切断又は還元剤は、ジチオスレイトール（DTT）である。低濃度の該還元剤（すなわち、例えばDTTの場合は、約0.1~約50mM、好適には約0.1~約20mM、好適には約0.5~約10mM、好適には1mM以上、2mM以上、又は5mM以上の範囲、更に好適には約1.5mM、約2.0mM、約2.5mM、約5mM又は約7.5mMである）を使用して部分的還元が得られる。

【0068】

該ジスルフィド結合切断工程は、発現された蛋白を解離することができる適当な界面活性剤（ジスルフィド結合切断の手段の一例として、又は切断剤と組合せて）、例えば、デシルPEG（Decyl PEG）、エンピゲン-BB（EMPIGEN-BB）、NP-40、コール酸ナトリウム、トリトンX-100の存在下で実施することもできる。

【0069】

該還元又は切断工程（好適には部分的還元又は切断工程）は、好適には界面活性剤の存在下で（界面活性剤と共に）実施される。本発明の好適な界面活性剤は、エンピゲン-BBである。使用される界面活性剤の量は、好適にはエンピゲン-BBのような界面活性剤1～10%の範囲、好適には3%以上、より好適には約3.5%である。

【0070】

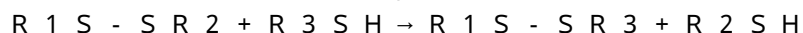
ジスルフィド結合を切断するための特に好適な方法は、前記で詳述した古典的なジスルフィド結合切断剤と界面活性剤（これも前記で詳述した）の組合せである。実施例の項に記載されるように、低濃度のDTT（1.5～7.5mM）と約3.5%のエンピゲン-BBとの特定の組合せは、組換えにより発現されたE1及びE2蛋白の精製のための、還元剤と界面活性剤の特に好適な組合せであることが示された。ゲル濾過クロマトグラフィーにより、該部分的還元によって、場合により二量体状のE1蛋白の生成、及び免疫測定法において擬反応性を引き起こす夾雑蛋白からのこのE1蛋白の分離がもたらされることが示されている。

【0071】

しかし、システインをより近づきやすくする、当該分野で公知の任意の還元剤と、当該分野で公知の任意の界面活性剤又は他の手段との、他の任意の組合せもまた、そのような組合せが、本発明で例示された好適な組合せと同じ、ジスルフィド架橋切断という目標を達成するかぎり、本発明の範囲内にあると理解すべきである。

【0072】

本発明のジスルフィド結合切断手段は、ジスルフィド結合の還元以外に、以下のタイプの反応を引き起こす当該分野で公知の任意のジスルフィド架橋交換物質（有機性又は蛋白性の競合的物質、例えばCreighton、1988を参照）を含んでもよい：



* R1、R2：蛋白凝集物の化合物

* R3SH：競合的物質（有機性、蛋白性）

【0073】

「ジスルフィド架橋交換物質」という用語は、ジスルフィド結合再形成物質及びジスルフィド結合阻止物質を包含すると解釈すべきである。

【0074】

本発明はまた、以下のリストから選択される当該分野で公知の任意のSH基保護又は結合試薬の使用を更に包含する、前述のHCVの単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白を精製又は単離する方法にも関する：

- グルタチオン
- 5, 5' - ジチオビス - (2 - ニトロ安息香酸) 又はビス - (3 - カルボキシ - 4 - ニトロフェニル) - ジスルフィド〔DTNB又はエルマン試薬（Ellman's reagent）〕（Elmann、1959）
- N - エチルマレイミド（NEM；Benesch ら、1956）
- N - (4 - ジメチルアミノ - 3, 5 - ジニトロフェニル) マレイミド又はタピーの（Tuppy's）マレイミド（これは、蛋白を着色する）
- P - クロロメルクリ安息香酸（Grassetti ら、1969）
- 4 - ビニルピリジン（Friedman and Krull、1969）は、酸加水分解反応後に放出されうる
- アクリロニトリル、これは酸加水分解反応後に放出されうる（Weil and Seibles、1961）
- NEM - ビオチン〔例えば、シグマ（Sigma）B1267から入手できる〕

10

20

30

40

50

- 2, 2' - ジチオピリジン (Grassetti and Murray, 1967)
 - 4, 4' - ジチオピリジン (Grassetti and Murray, 1967)
 - 6, 6' - ジチオジニコチン酸 (DTDNA; Brown and Cunningham, 1970)
 - 2, 2' - ジチオビス - (5' - ニトロピリジン) (DTNP; 米国特許第 3 5 9 7 1 6 0 号) 又は他のジチオビス (複素環誘導体) 化合物 (Grassetti and Murray, 1969)
- 【0075】

引用した文献を調査すると、スルフヒドリル基に対する異なる試薬が、しばしば同じ蛋白又は酵素分子の異なる数のチオール基と反応することがわかる。このチオール基の反応性の変動は、分子の形、周りの原子の群及びその電荷、ならびに試薬分子又はイオンの大きさ、形及び電荷などの、これらの基の立体環境によると結論されうる。しばしば、適当な濃度の変性剤 (例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、尿素又は塩酸グアニジン) の存在により、蛋白分子に十分な変性 (unfolding) が引き起こされ、チオール基が全ての試薬へ均等に近づくことが可能になる。変性剤の濃度を变化させることにより、変性の程度を調節することができ、こうして反応性の程度の異なるチオール基が露出されうる。現在までに報告されている研究のほとんどは、p - クロロメルクリ安息香酸、N - エチルマレイミド及びDTNBを用いて行われているが、最近開発された他の試薬も同じく有効である可能性がある。これらは、構造が異なるため、実際、チオール基の立体環境の変化に対して異なる応答を示しうる可能性がある。

10

【0076】

あるいは、E 1 及び E 2 (エンペロープ) 蛋白の組換え発現及び精製に際して、遊離 S H 基の酸化を防ぎ、したがって大きな分子間凝集物の形成を防ぐための、低 pH (好適には pH 6 未満) のような条件も、本発明の範囲内に包含される。

20

【0077】

本発明の好適な精製された S H 基保護剤は、N - エチルマレイミド (NEM) である。該 S H 基保護試薬は、組換え宿主細胞の溶解時、及び前述の部分的還元操作の後、又はジスルフィド架橋切断の任意の他の操作の後に使用されうる。該 S H 基保護試薬はまた、検出可能な標識物を提供することができる任意の基、及び / 又は該組換え蛋白を固体基材に固定化することを助ける任意の基 (例えば、ピオチン化 NEM) により、修飾することもできる。

【0078】

システイン架橋を切断し、遊離のシステインを保護する方法は、Darbre (1987)、Mean s and Feeney (1971)、及び Wong (1993) によっても記載されている。

30

【0079】

前記で定義した本発明の単一の又は特定オリゴマーの組換え E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白を精製する方法は、更に、以下の工程を含むことを特徴とする：

- 組換え E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 発現宿主細胞を、好適には N - エチルマレイミド (NEM) のような S H 基保護剤及び場合により適切な界面活性剤 (好適にはエンピゲン - BB) の存在下で、溶解し、
- 例えばレクチンクロマトグラフィー [例えばレンチル (lentil) レクチンクロマトグラフィー] あるいは抗 E 1 及び / 又は抗 E 2 特異的モノクローナル抗体を用いる免疫親和性クロマトグラフィーなどの親和性精製により、該 H C V エンペロープ蛋白を回収し、次に
- ジスルフィド結合切断剤 (例えば DTT) を用いて、好適には S H 基保護剤 (例えば NEM 又はピオチン - NEM) の存在下で、ジスルフィド結合を還元又は切断して、そして
- 還元した H C V の E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 エンペロープ蛋白を、例えばゲル濾過 (サイズ排除クロマトグラフィー又は分子ふるい) により及び場合により付加的な Ni^{2+} - IMA C クロマトグラフィー及び脱塩工程により、回収する。

40

【0080】

前述の回収工程は、当業者に公知の他の任意の適当な方法を用いて実施してもよいと理

50

解すべきである。

【0081】

好適なレクチンクロマトグラフィー系としては、実施例に例示されているように、ガラントス・ニバリス (*Galanthus nivalis*)凝集素 (GNA)クロマトグラフィー、又はレンス・クリナリス (*Lens culinaris*)凝集素 (LCA)〔レンチル (*lentil*)〕レクチンクロマトグラフィーが挙げられる。他の有用なレクチンとしては、高マンノース型の糖を認識するもの、例えばナルシサス・シュードナルシサス (*Narcissus pseudonarcissus*)凝集素 (NPA)、ピサム・サチバム (*Pisum sativum*)凝集素 (PSA)、又はアリウム・ウルシヌム (*Allium ursinum*)凝集素 (AUA)が含まれる。

【0082】

10

前記方法は、好適には、前述のように細胞内で産生された単一の又は特定オリゴマーのHCVエンベロープ蛋白の精製に使用することができる。

【0083】

分泌されたE1又はE2又はE1/E2オリゴマーについては、リシヌス・コムニス (*Ricinus communis*)凝集素I (RCAI)のような複合糖質を結合するレクチンが好適なレクチンである。

【0084】

更に詳しくは本発明は、前記で定義された方法により単離又は精製されていることを特徴とする、E1及び/又はE2及び/又はE1/E2よりなる群から選択される、実質的に精製された組換えHCVの単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白に関する。

20

【0085】

更に詳しくは、本発明は、ワクシニアのような組換え哺乳動物細胞から発現された組換えエンベロープ蛋白の精製又は単離に関する。

【0086】

本発明はまた、組換え酵母細胞から発現された組換えエンベロープ蛋白の精製又は単離に関する。

【0087】

本発明は同様に、組換え細菌 (原核生物)細胞から発現された組換えエンベロープ蛋白の精製又は単離に関する。

【0088】

30

本発明はまた、ベクター配列、適切な原核生物性、真核生物性もしくはウイルス性又は合成プロモーター配列、その後続く本発明の単一の又は特定オリゴマーのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2の発現を可能にするヌクレオチド配列を含む組換えベクターにも関する。

【0089】

特に、本発明は、ベクター配列、適切な原核生物性、真核生物性もしくはウイルス性又は合成プロモーター配列、その後続く本発明の単一のE1又はE1の発現を可能にするヌクレオチド配列を含む組換えベクターに関する。

【0090】

特に、本発明は、ベクター配列、適切な原核生物性、真核生物性もしくはウイルス性又は合成プロモーター配列、その後続く本発明の単一のE1又はE2の発現を可能にするヌクレオチド配列を含む組換えベクターに関する。

40

【0091】

ベクター配列に挿入される目的のE1及び/又はE2配列をコードするHCV cDNAセグメントは、シグナル配列に結合させてもよい。該シグナル配列は、非HCV供給源由来のもの (例えば哺乳動物細胞中で発現させるためのIgG又は組織プラスミノゲンアクチベーター (tpa)リーダ配列、又は酵母細胞で発現させるための α -接合因子配列)でもよいが、本発明の特に好ましい構築物は、HCVゲノム中でE1及びE2蛋白の各開始点の前に現れるシグナル配列を含有する。ベクターに挿入される目的のE1及び/又はE2配列をコードするHCV cDNAセグメントはまた、例えば実施例に例示さ

50

れたような疎水性ドメイン、又は E 2 超可変領域 I に欠失を有していてもよい。

【 0 0 9 2 】

更に詳しくは、本発明の組換えベクターは、H C V ポリ蛋白のアミノ酸 1 位と 1 9 2 位の間の領域で開始し、2 5 0 位と 4 0 0 位の間の領域で終わる、より好適には 2 5 0 位と 3 4 1 位の間の領域で終わる、更により好適には 2 9 0 位と 3 4 1 位の間の領域で終わる、ポリ蛋白をコードする H C V c D N A セグメントを有する、H C V の単一の E 1 蛋白の発現のための核酸を包含する。最も好適には、本発明の組換えベクターは、1 1 7 位と 1 9 2 位の間の領域で開始し、2 6 3 位と 3 2 6 位の間の領域中のいずれかの位置で終わる、H C V ポリ蛋白の一部をコードする H C V c D N A セグメントを有する、H C V の単一の E 1 蛋白の発現のための組換え核酸を包含する。また本発明の範囲には、最初の疎水性ドメイン (2 6 4 位 ~ 2 9 3 位 プラス又はマイナス 8 アミノ酸) が欠失した形態、又は 5 ' 末端 A T G コドンと 3 ' 末端停止コドンが加えられた形態、又は、第 X a 因子切断部位を有し、及び / 又は 3 ~ 1 0 個、好適には 6 個のヒスチジンコドンが加えられた形態も含まれる。

10

【 0 0 9 3 】

更に詳しくは、本発明の組換えベクターは、H C V ポリ蛋白のアミノ酸 2 9 0 位と 4 0 6 位の間の領域で開始し、6 0 0 位と 8 2 0 位の間の領域で終わる、より好適には 3 2 2 位と 4 0 6 位の間の領域で開始する、更により好適には 3 4 7 位と 4 0 6 位の間の領域で開始する、更に尚好適には 3 6 4 位と 4 0 6 位の間の領域で開始する、ポリ蛋白をコードする H C V c D N A セグメントを有する、H C V の単一の E 2 蛋白の発現のための核酸を包含する。最も好適には、本発明の組換えベクターは、2 9 0 位と 4 0 6 位の間の領域で開始し、6 2 3、6 5 0、6 6 1、6 7 3、7 1 0、7 1 5、7 2 0、7 4 6 又は 8 0 9 位のいずれかの位置で終わるポリ蛋白をコードする H C V c D N A セグメントを有する、H C V の単一の E 2 蛋白の発現のための組換え核酸を包含する。また本発明の範囲には、5 ' 末端 A T G コドンと 3 ' 末端停止コドンが加えられた形態、又は、第 X a 因子切断部位を有し、及び / 又は 3 ~ 1 0 個、好適には 6 個のヒスチジンコドンが加えられた形態も含まれる。

20

【 0 0 9 4 】

本発明の H C V の単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白の組換え発現のために、種々のベクターが使用されうる。酵母及びグリコシル化突然変異株のような下等真核生物は、典型的には、プラスミド又は組換えウイルスで形質転換される。ベクターは、宿主内で独立に複製してもよく、又は宿主細胞ゲノム中に組み込まれてもよい。

30

【 0 0 9 5 】

高等真核生物は、ベクターで形質転換してもよく、又は組換えウイルス (例えば、組換えワクシニアウイルス) に感染させてもよい。ワクシニアウイルスへの外来 D N A の挿入のための技術及びベクターは、当該分野で周知であり、例えば相同組換えが利用される。広範囲のウイルスプロモーター配列、おそらくターミネーター配列及びポリ (A) 付加配列、場合によりエンハンサー配列及び増幅配列は、全て哺乳動物での発現に必要であるが、当該分野で利用可能である。ワクシニアは、宿主細胞蛋白の発現を停止させるため、ワクシニアは特に好適である。ワクシニアはまた、生きた組換えワクシニアウイルスで免疫した細胞又は個体中で、H C V の E 1 及び E 2 の発現を可能にするため、大変好ましい。ヒトの予防接種には、アビボックス (avipox) やアンカラ修飾ウイルス (Ankara Modified Virus) (A M V) が特に有用なベクターである。

40

【 0 0 9 6 】

バキュロウイルスのオートグラフィア・カリホルニカ核多角体病ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) (A c N P V) 由来の昆虫発現移入ベクターも、公知であり、これは、ヘルパー非依存性ウイルス発現ベクターである。この系に由来する発現ベクターは、通常、異種遺伝子を発現させるのに、強力なウイルス性ポリヘドリン遺伝子プロモーターを使用する。バキュロウイルスでの発現のために、バキュロウイルスの目的の部位へ異種 D N A を導入するための異なるベクター及び方法が、当業者に公知で

50

ある。また、昆虫細胞に認識される翻訳後修飾の異なるシグナルも、当該分野で公知である。

【0097】

本発明の範囲には、精製された組換えの単一の又は特定オリゴマーのHCVのE1又はE2又はE1/E2蛋白を生産するための方法も包含され、ここでは、凝集物形成に關与するシステイン残基は、凝集物形成が防止されるように核酸配列のレベルで他の残基で置換されている。このような突然変異したE1及び/又はE2蛋白をコードする核酸を有する組換えベクターにより発現される組換え蛋白もまた、本発明の範囲内にある。

【0098】

本発明はまた、少なくとも1つのグリコシル化部位が除去されており、そのためグリコシル化突然変異体と呼ばれることを特徴とする、組換えE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白にも關する。実施例で例示されるように、問題の患者のHCV疾患を診断（スクリーニング、確認、予後など）及び防止するのに、異なるグリコシル化突然変異体が望まれることがある。例えば、GLY4の欠如したE2蛋白グリコシル化突然変異体は、診断における幾つかの血清の反応性を改良することが見いだされた。これらのグリコシル化突然変異体は、好適には本発明に開示された方法により精製される。本発明にはまた、このようなE1及び/又はE2及び/又はE1/E2グリコシル化突然変異体をコードする核酸挿入物（インサート）を有する組換えベクター、及びこのような組換えベクターにより形質転換された宿主細胞も、包含される。

10

【0099】

本発明はまた、同様に本発明の一部を構成するポリヌクレオチドを含む組換えベクターにも關する。本発明は、更に詳しくは、配列番号3、5、7、9、11、13、21、23、25、27、29、31、35、37、39、41、43、45、47及び49に示される組換え核酸、又はこれらの部分に關する。

20

【0100】

本発明はまた、前記で定義された組換えベクターで形質転換された宿主細胞をも包含し、ここで該ベクターは、前記で定義されたHCVのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白をコードするヌクレオチド配列を、該HCVのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2配列に作動可能に連結し、該HCVのE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白の発現を調節することができる制御配列に加えて含む。

30

【0101】

真核生物宿主としては、定義の項に記載した下等又は高等真核生物が挙げられる。下等真核生物宿主は、当該分野で周知の酵母細胞を含む。高等真核生物宿主としては、主に当該分野で公知の哺乳動物細胞株があり、ATCCから入手できる多くの不死化した細胞株（例えばHEL細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）細胞、ベビーハムスター腎（BHK）細胞、PK15、RK13及び多くの他の細胞株）を含む。

【0102】

本発明は、特に、前記で定義した組換えベクターを含有する前記で定義した宿主細胞により発現される組換えE1及び/又はE2及び/又はE1/E2蛋白に關する。これらの組換え蛋白は、特に、本発明の方法により精製される。

40

【0103】

前記で定義したHCVエンベロープ蛋白を単離又は精製する好適な方法は、少なくとも以下の工程を含むことを更に特徴とする：

- E1及び/又はE2及び/又はE1/E2 HCVエンベロープ蛋白を発現する、本発明の組換えベクター又は公知の組換えベクターで形質転換した、前記で定義した宿主細胞を、適切な培地中で生育させ、
- 適切な条件下で、前記で定義した該ベクター配列を発現させ、
- 好適にはN-エチルマレイミド（NEM）のようなSH基保護剤、及び場合により（好適にはエンピゲン-BBである）適切な界面活性剤の存在下で、該形質転換宿主細胞を溶解し、

50

- レクチンクロマトグラフィーあるいは抗 E 1 及び / 又は抗 E 2 特異的モノクローナル抗体を用いる免疫親和性クロマトグラフィー (該レクチンは好適にはレンチルレクチン又は G N A である) のような親和性精製により、該 H C V エンベロープ蛋白を回収し、次に

- 前工程の溶出液をジスルフィド結合切断手段 (例えば、D T T) とインキュベートし、好適には、引き続き S H 基保護剤 (例えば、N E M 又はビオチン - N E M) とインキュベートして、そして

- ゲル濾過、及び場合により引き続き $N i^{2+}$ - I M A C クロマトグラフィー及び脱塩工程のような手段により、H C V の単一の又は特定オリゴマーの E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白を単離する。

【 0 1 0 4 】

10

前述の方法の結果として、実施例の項に記載のように、E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白は、ゲル濾過カラム又は I M A C カラムのボイド容積中のベクター由来の成分及び / 又は細胞成分を含有する大きな凝集物とは別に溶出する形態で生産されうる。ジスルフィド架橋切断工程は、有利にも、宿主及び / 又は発現系由来の蛋白の存在に由来する擬反応性をも排除する。細胞の溶解の際の N E M 及び適切な界面活性剤の存在は、H C V エンベロープ蛋白と夾雑物との凝集を、既に部分的に又は完全に防止しうる。

【 0 1 0 5 】

Janknecht ら、1991、及び Hochuli ら、1988、が記載した (H i s) 。を有する構築物には、好適には、 $N i^{2+}$ - I M A C クロマトグラフィー及びそれに続いて脱塩工程が使用される。

20

【 0 1 0 6 】

本発明はまた、本発明の H C V の単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白を用いる、マウス又はラットのような小動物でモノクローナル抗体を生産する方法、及び抗 H C V 抗体を認識するヒト B 細胞をスクリーニング及び単離する方法にも関する。

【 0 1 0 7 】

本発明は更に、第 3 表に記載の以下の E 1 ペプチドの少なくとも 1 つを含む組成物に関する：

コア / E 1 V 1 領域のアミノ酸 1 8 1 ~ 2 0 0 位にわたる E 1 - 3 1 (配列番号 5 6) 、
E 1 領域のアミノ酸 1 9 3 ~ 2 1 2 位にわたる E 1 - 3 3 (配列番号 5 7) 、
E 1 V 2 領域のアミノ酸 2 0 5 ~ 2 2 4 位にわたる E 1 - 3 5 (配列番号 5 8) (エピトープ B) 、
E 1 V 2 領域のアミノ酸 2 0 8 ~ 2 2 7 位にわたる E 1 - 3 5 A (配列番号 5 9) (エピトープ B) 、
E 1 領域 [V 1 、 C 1 及び V 2 領域 (エピトープ B を含有する)] のアミノ酸 1 9 2 ~ 2 2 8 位にわたる 1 b E 1 (配列番号 5 3) 、
E 1 領域のアミノ酸 3 0 1 ~ 3 2 0 位にわたる E 1 - 5 1 (配列番号 6 6) 、
E 1 C 4 領域のアミノ酸 3 1 3 ~ 3 3 2 位にわたる E 1 - 5 3 (配列番号 6 7) (エピトープ A) 、
E 1 領域のアミノ酸 3 2 5 ~ 3 4 4 位にわたる E 1 - 5 5 (配列番号 6 8) 。

30

【 0 1 0 8 】

40

本発明はまた、第 3 表に記載の以下の E 2 ペプチドの少なくとも 1 つを含む組成物に関する：

E 2 領域のアミノ酸 3 9 7 ~ 4 1 6 位にわたる E n v 6 7 すなわち E 2 - 6 7 (配列番号 7 2) (エピトープ A 、モノクローナル抗体 2 F 1 0 H 1 0 に認識される、第 1 9 図を参照) 、
E 2 領域のアミノ酸 4 0 9 ~ 4 2 8 位にわたる E n v 6 9 すなわち E 2 - 6 9 (配列番号 7 3) (エピトープ A) 、
E 2 領域の 5 8 3 ~ 6 0 2 位にわたる E n v 2 3 すなわち E 2 - 2 3 (配列番号 8 6) (エピトープ E) 、
E 2 領域の 5 9 5 ~ 6 1 4 位にわたる E n v 2 5 すなわち E 2 - 2 5 (配列番号 8 7) (

50

エピトープ E)、

E2 領域の 607 ~ 626 位にわたる Env 27 すなわち E2 - 27 (配列番号 88) (エピトープ E)、

E2 領域の 547 ~ 566 位にわたる Env 17 B すなわち E2 - 17 B (配列番号 83) (エピトープ D)、

E2 領域の 523 ~ 542 位にわたる Env 13 B すなわち E2 - 13 B (配列番号 82) (エピトープ C、モノクローナル抗体 16A6E7 に認識される、第 19 図を参照)。

【0109】

本発明はまた、以下の E2 コンフォメーション性エピトープの少なくとも 1 つを含む組成物に関する：

モノクローナル抗体 15C8C1、12D11F1 及び 8G10D1H9 により認識されるエピトープ F、

モノクローナル抗体 9G3E6 に認識されるエピトープ G、

モノクローナル抗体 10D3C4 及び 4H6B2 により認識されるエピトープ H (又は C)、又は、

モノクローナル抗体 17F2C2 に認識されるエピトープ I。

【0110】

本発明はまた、ペプチド又は蛋白組成物で免疫して作成される E1 又は E2 特異的抗体にも関し、該抗体は、前記で定義したいずれかのポリペプチド又はペプチドと特異的に反応性であり、かつ該抗体は、好適にはモノクローナル抗体である。

【0111】

本発明はまた、プラスミド若しくはファージの可変鎖ライブラリー又はヒト B 細胞集団から、当該分野で公知の方法によりスクリーニングされた E1 又は E2 特異的抗体に関し、該抗体は、前記で定義した任意のポリペプチド又はペプチドと特異的に反応性であり、かつ該抗体は、好適にはモノクローナル抗体である。

【0112】

本発明の E1 又は E2 特異的モノクローナル抗体は、前記で定義した本発明の HCV ポリペプチド又はペプチドに対して免疫した動物 (特に、マウス又はラット) の脾臓細胞を一方とし、そしてミエローマ細胞株の細胞を他方として、古典的な方法で作成され得、そして最初に動物の免疫に使用されたポリペプチドを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの能力により選択されうる、任意のハイブリドーマにより生産することができる。

【0113】

本発明の抗体は、酵素型、蛍光型又は放射能型の適切な標識物により標識することができる。

【0114】

本発明の好適な本実施態様のモノクローナル抗体は、マウス及びノ又はヒトの cDNA からの H 及び L 鎖をコードするゲノム DNA 配列あるいは H 及び L 鎖をコードするゲノムクローンの一部から出発して、組換え DNA 技法により作成されるマウスモノクローナル抗体のヒト化型であってよい。

【0115】

あるいは、本発明の好適な本実施態様のモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体であってよい。本発明の本実施態様のこれらの抗体はまた、HCV に感染した患者又は HCV に対する予防接種を受けた患者のヒト末梢血リンパ球からも得られうる。このようなヒトモノクローナル抗体は、例えば重症複合免疫不全症 (SCID) マウスのヒト末梢血リンパ球 (PBL) 再集団 (repopulation) により、調製される (最近の総説については、Duchosal ら、1992 を参照)。

【0116】

本発明はまた、レパートリークローニング (repertoire cloning) 法 (Persson ら、1991) による組換え抗体の選択のための、本発明の蛋白又はペプチドの使用に関する。

【0117】

ある遺伝子型由来のペプチド又は単一の若しくは特定オリゴマーのエンベロープ蛋白に対する抗体は、薬剤 (medicament) として使用することができ、更に詳しくは、HCV 遺伝子型の検出 (HCV の E 1 又は E 2 抗原の存在の検出) のための免疫測定法に組み込むために、HCV 疾患の予知 / 監視のために、又は治療剤として、使用することができる。

【0118】

あるいは、本発明はまた、生物学的試料中の E 1 又は E 2 抗原の存在の検出のための免疫測定法キットの調製、HCV 疾患の予知 / 監視のためのキットの調製又は HCV 薬剤の調製のための、前述の任意の E 1 又は E 2 特異的モノクローナル抗体の使用に関する。

【0119】

本発明はまた、少なくとも以下の工程を含む、生物学的試料中に存在する HCV 抗原のインビトロ診断又は検出の方法に関する：

(i) 免疫複合体の形成を可能にする適切な条件下で、好適には固定化された形で、前記で定義した E 1 及び / 又は E 2 特異的モノクローナル抗体の任意のものに、該生物学的試料を接触させ、

(ii) 結合しなかった成分を除去し、

(iii) 形成された免疫複合体を、分析される試料中に存在する抗体に特異的に結合する異種抗体 (この異種抗体は、適切な条件下で検出可能な標識物に結合されている) とインキュベートし、

(iv) 該免疫複合体の存在を、視覚的又は機械的に (例えば、デンストメーター、蛍光測定、比色法により) 検出する。

【0120】

本発明はまた、

- 好適には固体基材上に固定された、前記で定義した少なくとも 1 つのモノクローナル抗体、

- これらの抗体と、生物学的試料中に存在する HCV 抗原との間の結合反応を可能にする緩衝液又は前記緩衝液を作成するのに必要な成分、

- 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、

- 場合により観察された結合パターンから試料中に存在する HCV 抗原を推定するための自動走査及び解釈装置、

を含む、生物学的試料中に存在する HCV 抗原のインビトロ診断のためのキットに関する。

【0121】

本発明はまた、本発明の方法により精製された E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 組換え HCV 蛋白を含む組成物、又は薬剤として使用するための前述の少なくとも 1 つのペプチドを含む組成物に関する。

【0122】

更に詳しくは、本発明は、場合により薬剤学的に許容しうる助剤 (アジュバント) と一緒に、免疫応答を起こすのに十分な量の組成物を投与することを含む、HCV に対して哺乳動物 (好適にはヒト) を免疫するワクチンとしての使用のための、前述のエンベロープペプチドの少なくとも 1 つを含む組成物又は前記で定義した組換えエンベロープ蛋白組成物に関する。

【0123】

更に詳しくは、本発明は、前述のワクチンを調製するための、前述の任意の組成物の使用に関する。

【0124】

また本発明は、前述の E 1 及び / 又は E 2 領域から得られる HCV の単一の又は特定オリゴマーの蛋白又はペプチドを含む、HCV に対して哺乳動物 (好適にはヒト) を免疫するためのワクチン組成物に関する。

【0125】

10

20

30

40

50

免疫原性組成物は、当該分野で公知の方法により調製することができる。本組成物は、通常、薬剤学的に許容しうる担体と一緒にした、好適には助剤を更に含有する、免疫原性量の、前記で定義した組換え E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 の単一の又は特定オリゴマーの蛋白、又は前記で定義した E 1 又は E 2 ペプチドを含む。

【0126】

E 1 又は E 2 に対する抗体の形成は、他のエンベロープ蛋白に対するものよりも好ましい可能性があるため、また、E 2 蛋白は H C V タイプ間で交差反応性があり、E 1 蛋白はタイプ特異的であるため、本発明の単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白は、E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 のいずれであっても、特に有用なワクチン抗原になると予想される。1 型の E 2 蛋白と幾つかの遺伝子型から得られる E 1 蛋白を含有する 10 カクテルが、特に有利なことがある。E 2 に対してモル過剰の E 1、又は E 1 に対してモル過剰の E 2 を含有するカクテルが、特に有利なこともある。免疫原性組成物は、抗体産生を誘導するため（抗体の供給源にするために、又は動物の防御免疫を誘導するため）に動物に投与してもよい。

【0127】

薬剤学的に許容しうる担体は、組成物を投与される個体に対して有害な抗体の産生をそれ自体は誘導しない任意の担体を含む。好適な担体は、典型的には、大きくてゆっくり代謝される巨大分子（例えば、蛋白、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー）、及び不活性なウイルス粒子である。このような担体は、当 20 業者に周知である。

【0128】

本組成物の効力を増強させる好適な助剤としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：水酸化アルミニウム（みょうばん）、米国特許第 4, 606, 918 号記載の N - アセチル - ムラミル - L - トレオニル - D - イソグルタミン（t h r - M D P）、N - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン（n o r - M D P）、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - アラニン - 2 - （1', 2' - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ） - エチルアミン（M T P - P E）及び R I B I（これは、2 % スクアレン / ツイーン（Tween）80 エマルジョン中に、細菌から抽出された 3 つの成分、モノホスホリルリピッド A、 30 トレハロースジミコラート、及び細胞壁骨格（M P L + T D M + C W S）を含有する）。この 3 つの成分（M P L、T D M 又は C W S）は、いずれかを単独で使用してもよいし、2 つずつを組合せて使用してもよい。更に、スチムロン（Stimulon）〔ケンブリッジ・バイオサイエンス（Cambridge Bioscience）、マサチューセッツ州ウォーセスター（Worcester）〕、又は S A F - 1〔シンテックス（Syntex）〕のような助剤を使用してもよい。更に、完全フロイントアジュバント（C F A）及び不完全フロイントアジュバント（I F A）は、ヒト以外での使用や研究目的に使用してもよい。

【0129】

本免疫原性組成物は、典型的には、薬剤学的に許容しうる賦形剤（例えば、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなど）を含有する。更に、このような賦形剤は、湿潤剤、乳化剤、p H 緩衝化物質、保存剤などの補助物質を含有してもよい。 40

【0130】

典型的には、本免疫原性組成物は、注射剤として（液剤又は懸濁剤として）調製される。注射の前に、液体賦形剤へ溶解又は懸濁するのに適した固体形態を調製してもよい。この調製物はまた、助剤の効果を上げるために、乳化させるか、リポソーム中にカプセル化させてもよい。E 1 及び E 2 蛋白はまた、例えば Q u i l A（I S C O M S）のようなサポニンと共に免疫刺激性複合体（Immune Stimulating Complexes）に取り込ませてもよい。

【0131】

ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、「十分な量」又は「免疫学的に有効な量」の本発明のエンベロープ蛋白、及び必要に応じて任意の他の前述の成分を含む。「免疫 50

学的に有効な量」とは、その量が、個体に投与されたとき（単一用量であれ、一連の用量の一部であれ）、前記で定義したように治療に有効であることを意味する。この量は、治療される個体の健康及び肉体的状態、治療される個体の分類学的位置（例えば、ヒトでない霊長類、霊長類など）、抗体を合成する個体の免疫系の能力、目的とする防御の程度、ワクチンの処方、担当医師による医学的状況の評価、感染HCVの株、及び他の関連因子により変わる。この量は、比較的広い範囲にあり、これは通常の試験により決定することができる。通常、この量は、0.01～1,000 µg/用量、特に0.1～100 µg/用量の間である。

【0132】

単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白は、B型肝炎表面抗原（ヨーロッパ特許出願第174,444号を参照）と同じように、同種（例えば、コア、NS2、NS3、NS4又はNS5領域からのT細胞エピトープ又はB細胞エピトープ）又は異種（非HCV）ハプテンを提示するためのワクチン担体として役立ててもよい。こうして使用する場合、エンベロープ蛋白は、凝集物に結合したハプテン又は抗原に対する免疫応答を刺激することができる免疫原性担体となる。抗原は、蛋白の親水性領域に対応する位置で、E1及び/又はE2をコードする遺伝子中にクローン化してもよく、従来法の化学的方法で結合させてもよい。このような親水性領域としては、V1領域（アミノ酸191～202位にわたる）、V2領域（アミノ酸213～223位にわたる）、V3領域（アミノ酸230～242位にわたる）、V4領域（アミノ酸230～242位にわたる）、V5領域（アミノ酸294～303位にわたる）、及びV6領域（アミノ酸329～336位にわたる）がある。ハプテンの挿入のための他の有用な位置は、疎水性領域（およそアミノ酸264～293位にわたる）である。この領域は、ここに欠失を有するE1蛋白と抗血清との反応性に影響を与えずに欠失させうることが、本発明で示されている。したがって、ハプテンを欠失の部位に挿入してもよい。

【0133】

本免疫原性組成物は、従来法の新経口投与、典型的には、例えば皮下又は筋内への注射により投与される。他の投与法に適した更なる製剤としては、経口製剤や坐剤が挙げられる。投与法は、単一用量スケジュール又は複数用量スケジュールでもよい。ワクチンは、他の免疫調節性の物質と共に投与してもよい。

【0134】

本発明はまた、生物学的試料中に存在するHCV抗体のインビトロ検出のための、前記のペプチド又はポリペプチドを含む組成物に関する。

【0135】

本発明はまた、生物学的試料中に存在するHCV抗体を検出するための免疫測定キットの調製のための、前述の組成物の使用に関する。

【0136】

本発明はまた、少なくとも以下の工程を含む、生物学的試料中に存在するHCV抗体のインビトロ診断方法に関する：

- (i) 免疫複合体の形成を可能にする適切な条件下で、好適には固定化された形で、前記で定義したエンベロープペプチド又は蛋白の任意のものを含む組成物に、該生物学的試料を接触させ（ここで、該ペプチド又は蛋白は、ストレプトアビジン又はアビジン複合体により固体基材に共有結合したビオチン化ペプチド又は蛋白であってもよい）、
- (ii) 結合しなかった成分を除去し、
- (iii) 形成された免疫複合体を、適切な条件下で検出可能な標識物に結合されている異種抗体とインキュベートし、
- (iv) 該免疫複合体の存在を、視覚的又は機械的に（例えば、デンストメーター、蛍光測定、比色法により）検出する。

【0137】

あるいは、本発明はまた、生物学的試料中に存在するHCV抗体に関して競合するように、前記で開示した、組換えにより生産し精製した単一の又は特定オリゴマーの蛋白E1

及び／又はE 2 及び／又はE 1 / E 2 蛋白を、E 1 及び／又はE 2 ペプチドと組合せて使用する、競合免疫測定法（フォーマット）に関する。

【0138】

本発明はまた、

- 場合によりH C V 又は他のタイプのH C V からの他のポリペプチド又はペプチドと組合せた、好適には固体基材上に、より好適には同じE L I S A プレートの異なるマイクロウェル上に、更により好適には同じ膜ストリップ上に固定化された、前記で定義した少なくとも1つのペプチド又は蛋白組成物、

- これらのポリペプチド又はペプチドと、生物学的試料中に存在するH C V に対する抗体との間の結合反応を可能にする緩衝液又は前記緩衝液を作成するのに必要な成分、

10

- 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、

- 場合により、観察された結合パターンから試料中に存在するH C V 遺伝子型を推定するための自動走査及び解釈装置、

を含む、生物学的試料中のH C V 抗体の存在を測定するためのキットに関する。

【0139】

本発明の免疫測定法は、H C V に感染した個体の血清中の抗体により認識される、直鎖エピトープ（ペプチドの場合）及びコンフォメーション性エピトープ（単一の又は特定オリゴマーの蛋白）を保持するE 1 及び／又はE 2 ドメインからの、単一の又は特定オリゴマーの抗原を用いる。例えば単一の又は特定オリゴマーの抗原、二量体性抗原、及び単一の又は特定オリゴマーの抗原の組合せを使用することは、本発明の範囲内である。本発明のH C V のE 1 及びE 2 抗原は、抗体の検出のために既知の抗原を用いる、実質的にあらゆる測定フォーマットに使用することができる。もちろん、H C V のコンフォメーション性エピトープを変性させるようなフォーマットは、避けるか又は適合させるべきである。これらの測定法の全てに共通の特徴は、H C V 抗体を含有することが疑われる体成分に、抗原を、体成分中に存在する任意のそのような抗体への抗原の結合を可能にする条件下で接触させることである。このような条件は、典型的には、生理学的温度、p H 及びイオン強度であり、過剰の抗原を使用する。試料と抗原とのインキュベーションの後に、抗原を含有する免疫複合体を検出する。

20

【0140】

免疫測定法の設計は広い範囲の変更が可能であり、多くのフォーマットが当該分野で公知である。例えば、プロトコールは、固体支持体、又は免疫沈降法を用いることもある。ほとんどの測定法では、標識抗体又はポリペプチドを使用し、標識物は、例えば酵素、蛍光、化学発光、放射能、又は色素分子でもよい。免疫複合体からのシグナルを増幅する測定法も知られており、例としては、ビオチン及びアビジン又はストレプトアビジンを使用する測定法、及び酵素標識及び酵素介在免疫測定法（例えばE L I S A ）などがある。

30

【0141】

免疫測定法は、不均一系又は均一系フォーマットでもよく、及び標準型又は競合型でもよいが、これらに限定されない。不均一系フォーマットでは、インキュベート後のポリペプチドからの試料の分離を容易にするため、ポリペプチドは、典型的には固体マトリックス又は支持体に結合している。使用できる固体支持体の例としては、ニトロセルロース（例えば、膜又はマイクロタイターウェルの形態で）、塩化ポリビニル（例えば、シート又はマイクロタイターウェルで）、ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズ又はマイクロタイタープレートで）、フッ化ポリビニリデン〔イムノロン（登録商標）（Immunolon）として知られている〕、ジアゾ化ペーパー、ナイロン膜、活性化ビーズ、及びプロテインA ビーズなどがある。例えば、不均一系フォーマットで、ダイナテック（Dynatech）イムノロン（登録商標）（Immunolon）1 又はイムノロン（登録商標）（Immunolon）2 マイクロタイタープレート、又は0 . 2 5 インチのポリスチレンビーズ〔プレシジョンプラスチックボール（Precision Plastic Ball）〕が使用できる。抗原性ポリペプチドを含有する固体支持体は、典型的には、被験試料から分離した後、かつ結合した抗体の検出の前に洗浄される。標準型フォーマット及び競合型フォーマットの両方が当該分野で公知である。

40

50

【0142】

均一系フォーマットでは、被験試料は、溶液中で抗原の組合せとインキュベートされる。例えば、これは形成されるあらゆる抗原 - 抗体複合体を沈降させる条件下であってもよい。標準型フォーマット及び競合型フォーマットの両方が当該分野で公知である。

【0143】

標準型フォーマットでは、抗体 - 抗原複合体中の H C V 抗体の量を直接監視する。これは、抗 H C V 抗体上のエピトープを認識する標識した抗異種（例えば、抗ヒト）抗体が、複合体形成により結合するか否かを測定することにより行ってもよい。競合型フォーマットでは、試料中の H C V 抗体の量は、複合体中の既知量の標識抗体（又は他の競合性リガンド）の結合への競合的影響を監視することにより推定される。

10

【0144】

抗 H C V 抗体を含む形成された複合体（又は、競合的測定法の場合は、競合抗体の量）は、フォーマットに依存して、多くの既知の方法の任意のものにより検出される。例えば、複合体中の非標識 H C V 抗体は、標識物（例えば、酵素標識）と複合体を形成した抗異種 I g のコンジュゲートを用いて検出することができる。

【0145】

免疫沈降又は凝集測定フォーマットでは、H C V 抗原と抗体との間の反応により、溶液又は懸濁液から沈殿するネットワークが形成され、肉眼で見える沈殿物の層又はフィルムが形成される。被験試料中に抗 H C V 抗体が存在しない場合は、肉眼で見える沈殿物が形成されない。

20

【0146】

現在、3つの具体的な型の粒子凝集（P A）測定法が存在する。これらの測定法は、支持体にコーティングされて、種々の抗原に対する抗体の検出に使用される。この測定法の1つの型は、赤血球（R B C）に受動的に吸着している抗原（又は抗体）により感作された赤血球を使用する血球凝集測定法である。体成分中に存在する特異的な抗原抗体を添加すると（もし存在する場合）、精製抗原でコーティングされた赤血球の凝集が引き起こされる。

【0147】

血球凝集測定法において非特異的反応の可能性を排除するために、P A では赤血球の代わりに2つの人工担体を使用してもよい。これらのうち最も一般的なものは、ラテックス粒子である。しかし、ゼラチン粒子を使用してもよい。これらの担体のいずれかを使用する測定法は、精製した抗原でコーティングされた粒子の受動的凝集に基づいている。

30

【0148】

コンフォメーション性エピトープを含む本発明の H C V の単一の又は特定オリゴマーの E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 抗原は、典型的には、これらの免疫測定法に使用するためのキットの形で包装される。キットは、通常、別々の容器に、未変性の H C V 抗原、対照抗体調製物（陽性及び / 又は陰性）、測定フォーマットに必要な場合には標識抗体、そして標識物が直接シグナルを生成しない場合にはシグナル生成試薬（例えば、酵素基質）を含有する。未変性の（ネイティブ）H C V 抗原は、既に固体マトリックスに結合していてもよく、又はこれをマトリックスに結合させるために試薬と共に分離してあってもよい。測定法を実施するための取り扱い説明（例えば、印刷物、テープ、C D - R O M など）は、通常、キットに含まれている。

40

【0149】

未変性の H C V 抗原を使用する免疫測定法は、感染の危険のある H C V を含まない供給血液の調製のために、血液をスクリーニングするのに有用である。供給血液の調製法は、以下の工程を含む。供血者の体成分（好適には血液又は血液成分）を、本発明の H C V の E 1 及び / 又は E 2 蛋白と反応させて、H C V 抗体（もし存在すれば）と H C V 抗原との間の免疫学的反応を起こさせる。反応の結果として抗 H C V 抗体 - H C V 抗原複合体が形成されるか否かを検出する。供給血液に使用される血液は、未変性の H C V 抗原である E 1 又は E 2 に対する抗体を示さない供血者からのものである。

50

【 0 1 5 0 】

H C V 抗原に対する反応性が陽性である時は、擬陽性の可能性を減らすために免疫測定を繰り返すことが好ましい。例えば、血液製剤（例えば、輸血、血漿、第Ⅷ因子、免疫グロブリンなど）の生産のための血液の大規模なスクリーニングでは、特異性を犠牲にして感度を上げる（汚染された血液が決して見逃されることがないようにするため）ようなフォーマットの「スクリーニング」試験が典型的に行われる。すなわち、擬陽性率は上昇する。したがって、典型的には、これらの供血者が「繰り返し反応性」（すなわち、提供された血液について2回以上の免疫測定の試験で陽性であること）であるかどうかという更なる試験に委ねる。しかし、H C V 陽性の確認のためには、「確認」試験は、感度を犠牲にして特異性を上げる（擬陽性試料が陽性と判定されないようにするため）ようなフォーマットである。したがって、E 1 及び E 2 について本発明で記載した精製法は、H C V 診断測定法に単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白を含めるのに非常に有用である。

10

【 0 1 5 1 】

選択される固相としては、ポリマービーズ又はガラスビーズ、ニトロセルロース、微粒子、反応トレイのマイクロウェル、試験管及び磁性粒子などが挙げられる。シグナル生成化合物としては、酵素、発光化合物、色原体、放射性元素及び化学発光化合物が挙げられる。酵素の例としては、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びベータガラクトシダーゼがある。増強化合物としては、ビオチン、抗ビオチン及びアビジンが挙げられる。増強化合物を結合する化合物の例には、ビオチン、抗ビオチン及びアビジンがある。リウマチ因子様物質の影響を阻止するために、被験試料は、リウマチ因子様物質の影響を阻止するのに十分な条件に付される。これらの条件は、被験試料を一定量の抗ヒト I g G に接触させて混合物を生成させ、反応混合物からリウマチ因子様物質が実質的になくなるのに十分な時間と条件下で混合物をインキュベートすることを含む。

20

【 0 1 5 2 】

本発明は、更に、H C V 感染患者のH C V 疾患のインビトロ監視、又は治療（例えば、インターフェロンによる）に対する応答を予知するための、E 1 蛋白又はその部分、更に詳しくは前記で定義したH C V の単一の又は特定オリゴマーのE 1 蛋白の使用に関し、これは：

- C 型肝炎感染患者からの生物学的試料を、E 1 蛋白又はその好適な部分と、免疫学的複合体の形成を可能にする条件下でインキュベートし、
- 結合しなかった成分を除去し、
- 該試料中（例えば、（インターフェロン）治療の開始時及び／又は治療中の）に存在する抗 E 1 力価を計算し、
- 治療の開始時及び／又は治療中の該試料中の抗 E 1 力価に基づき、H C V 疾患の自然の経過を監視し、又は治療に対する患者の応答を予知する、

ことを含む。

30

【 0 1 5 3 】

開始時の2倍、3倍、4倍、5倍、7倍、10倍、15倍、又は好適には20倍以上の抗 E 1 力価の低下を示す患者は、H C V 療法（更に詳しくは、インターフェロン療法）に対する、長期の持続性レスポンド（応答者）と結論できるであろう。実施例には、抗 E 1 測定法は、I F N 治療又はC型肝炎ウイルス疾患一般の治療に対する長期の応答を予知するために非常に有用であることが示されている。

40

【 0 1 5 4 】

更に詳しくは、第3表に列挙した以下のE 1 ペプチドは、H C V 感染患者のH C V 疾患のインビトロ監視、又はインターフェロン治療に対する応答の予知に有用であることがわかった：

コア／E 1 V 1 領域のアミノ酸181～200位にわたるE 1 - 31（配列番号56）、
E 1 領域のアミノ酸193～212位にわたるE 1 - 33（配列番号57）、
E 1 V 2 領域のアミノ酸205～224位にわたるE 1 - 35（配列番号58）（エピト

50

ープ B)、

E 1 V 2 領域のアミノ酸 2 0 8 ~ 2 2 7 位にわたる E 1 - 3 5 A (配列番号 5 9) (エピトープ B)、

E 1 領域 [V 1、C 1 及び V 2 領域 (エピトープ B を含有する)] のアミノ酸 1 9 2 ~ 2 2 8 位にわたる 1 b E 1 (配列番号 5 3)、

E 1 領域のアミノ酸 3 0 1 ~ 3 2 0 位にわたる E 1 - 5 1 (配列番号 6 6)、

E 1 C 4 領域のアミノ酸 3 1 3 ~ 3 3 2 位にわたる E 1 - 5 3 (配列番号 6 7) (エピトープ A)、

E 1 領域のアミノ酸 3 2 5 ~ 3 4 4 位にわたる E 1 - 5 5 (配列番号 6 8)。

【 0 1 5 5 】

前述のペプチドの小さい断片も、本発明の範囲内にあると理解すべきである。このような小さい断片は、化学合成により容易に調製することができ、前述のように及び実施例に記載のように、測定法に使用できる能力について試験することができる。

【 0 1 5 6 】

本発明はまた：

- 少なくとも 1 つの E 1 蛋白又は E 1 ペプチド、更に詳しくは前記で定義した E 1 蛋白又は E 1 ペプチド、

- これらの蛋白又はペプチドと、生物学的試料中に存在する抗 E 1 抗体との間の結合反応を可能にする緩衝液を作成するのに必要な成分又は緩衝剤、

- 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、

- 場合により、治療の進行中の抗 E 1 力価の低下を推定するための自動走査及び解釈装置、

を含む、H C V 感染患者の H C V 疾患を監視、又は治療 (例えばインターフェロン治療) に対する応答を予知するためのキットに関する。

【 0 1 5 7 】

他の H C V 抗原に対する抗体に比較して抗 E 2 レベルも低下するため、E 1 蛋白又はペプチドについて前記したように、本発明の E 2 蛋白及びペプチドも、H C V 治療の監視 / 予知にある程度まで使用できると理解すべきである。しかし、H C V 疾患の監視 / 予知のための試験に使用するのにも適した E 2 領域中の幾つかのエピトープを決定することは可能であることを理解すべきである。

【 0 1 5 8 】

本発明はまた、生物学的試料中に存在する H C V の 1 つ又はそれ以上の血清型を検出する、更に詳しくは検出すべき H C V の異なる型の抗体を検出するための、1 つの測定フォーマットに組合せた血清型測定法に関し、これは、少なくとも以下の工程を含む：

(i) 免疫複合体の形成を可能にする適切な条件下で、好適には固定化された形で、E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白組成物の少なくとも 1 つ、あるいは前述の E 1 又は E 2 ペプチド組成物の少なくとも 1 つのものに、1 つまたはそれ以上の血清型の H C V 抗体の存在について分析すべき生物学的試料を接触させ、

(ii) 結合しなかった成分を除去し、

(iii) 形成された免疫複合体を、異種抗体 (該異種抗体は、適切な条件下で検出可能な標識物に結合されている) とインキュベートし、

(iv) 該免疫複合体の存在を、視覚的又は機械的に (例えば、デンストメーター、蛍光測定、比色法により) 検出し、観察された結合パターンから 1 つ又はそれ以上の H C V 血清型の存在を推定する。

【 0 1 5 9 】

この方法で使用される蛋白又はペプチドの組成物は、組換えにより発現された型特異的エンベロップ蛋白又は型特異的ペプチドであると理解すべきである。

【 0 1 6 0 】

本発明は、更に、

- 前記で定義した少なくとも 1 つの E 1 及び / 又は E 2 及び / 又は E 1 / E 2 蛋白ある

10

20

30

40

50

いはE 1又はE 2ペプチド

- これらの蛋白又はペプチドと、生物学的試料中に存在する抗E 1抗体との間の結合反応を可能にする緩衝液を作成するのに必要な成分又は緩衝剤、
- 前述の結合反応で形成された免疫複合体を検出する手段、
- 場合により、観察された結合パターンから1つ又はそれ以上の血清型の存在を検出するための自動走査及び解釈装置、

を含む、生物学的試料中に存在するH C Vの1つ又はそれ以上の血清型を分類する(serotyping)ための、更に詳しくはH C Vのこれらの血清型に対する抗体を検出するためのキットに関する。

【0161】

10

本発明はまた、前記で定義した方法によりH C Vの有無又は遺伝子型を決定するために、固体基材上に固定化するための、及び逆相ハイブリダイゼーション測定法に取り込むための、好適には膜ストリップのような固体支持体上に平行の線状に固定化するための、前記で定義したペプチド又は蛋白組成物の使用に関する。他のH C Vポリ蛋白領域からの他の型特異的抗原との組合せもまた、本発明の範囲内にある。

【0162】

表の凡例

第1表：実施例1に記載したE 1蛋白の異なる形態を作成するための増幅に使用した各クローン及びプライマーの特徴。

第2表：抗E 1試験の要約。

20

第3表：競合試験用の合成ペプチド。

第4表：エンベロープ抗体レベルの経時変化。

第5表：L T RとN Rの差。

第6表：マウスE 2モノクローナル抗体間の競合実験。

第7表：E 1グリコシル化突然変異体の構築のためのプライマー。

第8表：E 1グリコシル化突然変異体のE L I S Aによる分析。

【0163】

実施例1：C型肝炎ウイルスE 1蛋白のクローニングと発現

1. ワクシニアウイルス組換えベクターの構築

p g p t A T A 1 8ワクシニア組換えプラスミドは、p A T A 1 8 (Stunnenberg ら、1988)を改変したものであり、ワクシニアウイルスI 3中間プロモーターの制御下に大腸菌(E. coli)キサンチンゲンシンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む付加的な挿入体(インサート)を有する(第1図)。プラスミドp g s A T A 1 8は、3つの読み枠中に停止コドンを含む配列番号1 / 94のオリゴヌクレオチドリンカーを、P s t IとH i n d I I Iで切断したp A T A 1 8ベクターに挿入して構築した。これにより余分のP a c I制限部位が作成された(第2図)。元々のH i n d I I I部位は保存されなかった。

30

配列番号1 / 94を有するオリゴヌクレオチドリンカー：

【0164】

【表1】

40

5'	G	GCATGC	AAGCTT	AATTAATT	3'
3'	ACGTC	CGTACG	TTCGAA	TTAATTAA	TCGA
PstI SphI HindIII Pac I (HindIII)					

【0165】

組換え蛋白に融合した設計されたヒスチジンストレッチのN i ²⁺キレート化により、迅速かつ効率的な精製を容易にするために、付加的なカルボキシ末端のヒスチジン付加部分(タグ)を有する分泌蛋白を発現するように、ワクシニア組換えベクターp M S 6 6を設計した。平滑末端を生成する3つの制限酵素(S m a I、S t u I及びP m l I / B b

50

r P I) のユニーク (単一) 部位を含有する配列番号 2 / 9 5 のオリゴヌクレオチドリンカーを、任意の c D N A のカルボキシ末端が、蛋白分解酵素第 X a 因子切断部位をコードする配列の後に 6 つのヒスチジンと 2 つの停止コドンにコードするヌクレオチド配列が続く枠 (フレーム) に挿入されるように合成した (3 ' 末端の下流に、新しい P a c I 制限部位も導入された) 。配列番号 2 / 9 5 を有するこのオリゴヌクレオチドを、p g p t A T A 1 8 の X m a I 部位と P s t I 部位の間に導入した (第 3 図) 。

配列番号 2 / 9 5 を有するオリゴヌクレオチドリンカー :

【 0 1 6 6 】

【表 2】

```
'5' CCGGG GAGGCCTGCACGTGATCGAGGGCAGACACCATCACCACCATCACTAATAGTTAATTAA CTGCA3
3'      C CTCCGGACGTGCACTAGCTCCCGTCTGTGGTAGTGGTGGTAGTGATTATCAATTAATT G
```

XmaI

PstI

【 0 1 6 7 】

実施例 2 . H C V 組換えプラスミドの構築

2 . 1 . 異なる形態の E 1 蛋白をコードする構築物

血清試料から、既に記載されている (Stuyver ら、1993b) ように、R N A を調製し、次に逆転写とポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を行って、P C R 生成物を得た。第 1 表に、増幅に使用した各クローン及びプライマーの特徴を示す。P C R 断片を、S m a I で切断した p S P 7 2 [プロメガ (Promega)] プラスミドにクローン化した。ワクシニア組換えベクターへの挿入のために、以下のクローンを選択した : H C C 1 9 A (配列番号 3) 、H C C 1 1 0 A (配列番号 5) 、H C C 1 1 1 A (配列番号 7) 、H C C 1 1 2 A (配列番号 9) 、H C C 1 1 3 A (配列番号 1 1) 及び H C C 1 1 7 A (配列番号 1 3) (第 2 1 図に記載した) 。各 p S P 7 2 プラスミドから、E c o R I と H i n d I I I 制限酵素切断により、E 1 コード領域を含有する c D N A 断片を切断し、E c o R I / H i n d I I I で切断した p g p t A T A - 1 8 ワクシニア組換えベクター (実施例 1 に記載) 中に、1 1 K ワクシニアウイルス後期プロモーターの下流に挿入した。各プラスミドを、p v H C V - 9 A 、p v H C V - 1 0 A 、p v H C V - 1 1 A 、p v H C V - 1 2 A 、p v H C V - 1 3 A 及び p v H C V - 1 7 A と命名した。このうち、p v H C V - 1 1 A を第 4 図に示す。

【 0 1 6 8 】

2 . 2 . 疎水性領域 E 1 欠失突然変異体

コドン A s p 2 6 4 ~ V a l 2 8 7 (ヌクレオチド 7 9 0 ~ 8 6 1 、疎水性ドメイン I をコードする領域) が欠失しているクローン H C C 1 3 7 を、以下のように作成した : H C P r 5 2 (配列番号 1 6) / H C P r 1 0 7 (配列番号 1 9) と H C P r 1 0 8 (配列番号 2 0) / H C P r 5 4 (配列番号 1 8) のプライマーセットを用いて、クローン H C C 1 1 0 A から 2 つの P C R 断片を作成した。これらのプライマーを第 2 1 図に示す。この 2 つの P C R 断片を、電気泳動後、アガロースゲルから精製し、各断片 1 n g をプライマー H C P r 5 2 (配列番号 1 6) と H C P r 5 4 (配列番号 1 8) を用いる P C R の鋳型として一緒に使用した。得られた断片を、S m a I で切断した p S P 7 2 ベクターにクローン化し、欠失を有するクローンは、2 4 コドン (7 2 塩基対) が欠失しているために容易に同定できた。クローン H C C 1 3 7 (配列番号 1 5) を含有するプラスミド p S P 7 2 H C C 1 3 7 を選択した。欠失のまわりの H C V 配列 (ベクター p S P 7 2 - H C C 1 3 7 から X m a I と B a m H I により切断された断片) を、ワクシニアプラスミド p v H C V - 1 0 A の X m a I - B a m H I 部位に挿入することにより、疎水性ドメイン I の欠如した全長 E 1 c D N A を含有する組換えワクシニアプラスミドを構築した。得られたプラスミドを、p v H C V - 3 7 と命名した。確認のための配列決定の後、内部欠失を有するアミノ末端領域を、このベクター p v H C V - 3 7 から単離 (E c o R I と B s t

10

20

30

40

50

E IIにより切断)し、E c o R IとB s t E IIで切断したp v H C V - 1 1 Aプラスミドに再挿入した。この構築物は、両方の疎水性ドメインが欠失したE 1蛋白を発現すると予測され、p v H C V - 3 8と命名した。クローンH C C 1 3 8のE 1をコードする領域を、配列番号2 3に示す。

【0 1 6 9】

E 1カルボキシ末端の親水性領域(理論的にはアミノ酸3 3 7 ~ 3 4 0 辺りまで伸びている)は、構築物p v H C V - 3 8に完全には含まれていないため、p v H C V - 3 7 プラスミドからE c o R I / B a m H I切断により疎水性ドメインIの欠如した大きなE 1領域を単離し、E c o R I / B a m H Iで切断したp g s A T A - 1 8ベクター中にクローン化した。得られたプラスミドを、p v H C V - 3 9と命名した。これはクローンH C C 1 3 9 (配列番号2 5)を含有していた。B a m H Iによりp v H C V - 3 7ベクターから同じ断片を切断し(その粘着末端はクレノウDNAポリメラーゼI(ベーリンガー(Boehringer))で充填した)、そして次にE c o R I(5'粘着末端)で切断した。この配列を、E c o R IとB b r P Iで切断したベクターp M S - 6 6に挿入した。こうして、カルボキシ末端に6つのヒスチジンのテールを含有する、プラスミドp v H C V - 4 0中のクローンH C C 1 4 0(配列番号2 7)を得た。

【0 1 7 0】

2 . 3 . 他の遺伝子型のE 1

慢性C型肝炎の3 a型感染患者(血清B R 3 6、クローンB R 3 6 - 9 - 1 3、W O 9 4 / 2 5 6 0 1中の配列番号1 9、及びStuyver ら、1993a も参照)からクローンH C C 1 6 2 (配列番号2 9)を得、輸血後肝炎の5 a型感染小児(血清B E 9 5、クローンP C - 4 - 1、W O 9 4 / 2 5 6 0 1中の配列番号4 5)からH C C 1 6 3 (配列番号3 1)を得た。

【0 1 7 1】

2 . 4 . E 2 構築物

血清B E 1 1 (遺伝子型1 b)から、プライマーH C P r 1 0 9 (配列番号3 3)とH C P r 7 2 (配列番号3 4)により、Stuyver ら、1993b に記載されたようにRNA調製、逆転写及びPCR法を用いて、H C VのE 2 P C R断片2 2を得、この断片をS m a Iで切断したp S P 7 2ベクターにクローン化した。クローンH C C 1 2 2 A (配列番号3 5)をN c o I / A l w N I又はB a m H I / A l w N Iで切断し、断片の粘着末端を平滑末端にした(N c o I部位及びB a m H I部位はクレノウDNAポリメラーゼI(ベーリンガー(Boehringer))で、A l w N I部位はT 4 DNAポリメラーゼ(ベーリンガー(Boehringer))で)。次に、E c o R IとH i n d I I Iでの切断により線状にし、粘着末端をクレノウDNAポリメラーゼ(ベーリンガー(Boehringer))で充填したワクシニアp g s A T A - 1 8ベクターに、このB a m H I / A l w N I c DNA断片を挿入した。得られたプラスミドを、p v H C V - 4 1と命名した。これは、シグナル配列として作用しうるE 1蛋白の3 7アミノ酸(M e t 3 4 7 ~ G l y 3 8 3)を含有する、アミノ酸M e t 3 4 7 ~ G l n 6 7 3のE 2領域をコードしていた。E c o R IとB b r P Iで切断した後、クレノウDNAポリメラーゼで平滑末端としたベクターp M S 6 6に、同じH C V c DNAを挿入した。得られたプラスミドをp v H C V - 4 2と命名した。これはアミノ酸3 4 7 ~ 6 8 3をコードしていた。N c o I / A l w N I断片を、同様の方法で、p g s A T A - 1 8(p v H C V - 4 3)又はp M S - 6 6ワクシニアベクター(p v H C V - 4 4)の同じ部位に挿入した。p v H C V - 4 3とp v H C V - 4 4は、H C Vポリ蛋白のアミノ酸3 6 4 ~ 6 7 3をコードしており、このうちアミノ酸3 6 4 ~ 3 8 3は、E 2のシグナル配列をコードするE 1蛋白の天然のカルボキシ末端領域由来であり、アミノ酸3 8 4 ~ 6 7 3は、成熟E 2蛋白由来である。

【0 1 7 2】

2 . 5 . 組換えH C V - ワクシニアウイルスの作成

ウサギ腎R K 1 3細胞(ATCC CCL 3 7)、ヒト骨肉腫1 4 3 Bチミジンキナーゼ欠損(TK⁻)(ATCC CRL 8 3 0 3)、HeLa(ATCC CCL 2)及び

HepG2 (ATCC HB 8065) 細胞株は、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC、ロックヴィル、メリーランド州、アメリカ合衆国) から得た。RK13 と 143B (TK⁻) についてはアールの塩類 (Earle's salts) (EMEM) と共に、HepG2 についてはグルコース (4 g/l) と共に、10% ウシ胎児血清を補足したダルベッコー改変イーグル培地 (DMEM) 中で、細胞を生育させた。既に記載されている (Panicali & Paoletti, 1982; Piccini ら、1987; Mackett ら、1982、1984、及び 1986) ように、ワクシニアウイルス WR 株 [ウェスタンリザーブ (Western Reserve)、ATCC VR 119] を、143B 又は RK13 細胞中で通常通り増殖させた。143B 細胞のコンフルエントな単層に、感染多重度 (m. o. i.) 0.1 [= 0.1 プラーク形成単位 (PFU) / 細胞] で野性型ワクシニアウイルスを感染させた。2 時間後、500 ng のプラスミド DNA を含有するリン酸カルシウム共沈殿物の形で、ワクシニア組換えプラスミドを感染細胞にトランスフェクションして、相同組換えを起こさせた (Graham & van der Eb, 1973; Mackett ら、1985)。選択培地 [ミコフェノール酸 (mycophenolic acid) (MPA) 25 µg/ml、キサンチン 250 µg/ml、及びヒポキサンチン 15 µg/ml を含有する EMEM; Falkner and Moss, 1988; Janknecht ら、1991] 中でインキュベートしたウサギ腎 RK13 細胞上で、大腸菌 (*Escherichia coli*) キサンチン - グアニンホスホリシルトランスフェラーゼ (gpt) を発現する組換えウイルスを選択した。選択培地中で 0.9% アガロース重層下で、RK13 細胞の新鮮な単層上で単一の組換えウイルスを精製した。チミジンキナーゼ欠損 (TK⁻) 組換えウイルスを選択し、次に 5 - ブロモ - 2' - デオキシウリジン 25 µg/ml の存在下で、ヒト 143B 細胞 (TK⁻) の新鮮な単層上でプラークを精製した。精製した組換え HCV - ワクシニアウイルスの原液を、m. o. i. 0.05 でヒト 143B 細胞又はウサギ RK13 細胞に感染させることにより調製した (Mackett ら、1988)。組換えワクシニアウイルス中の HCV cDNA 断片の挿入は、各 HCV 断片 (第 1 表を参照) をクローン化するために使用したプライマーを用いる PCR により、MPA 選択後の細胞溶解物の一定分量 (50 µl) で確認した。組換えワクシニア - HCV ウイルスを、ワクシニア組換えプラスミド番号に従って命名した。例えば、組換えワクシニアウイルス vv HCV - 10A は、野性型 WR 株を pv HCV - 10A プラスミドで組換えすることにより得た。

10

20

30

40

50

【0173】

実施例 3：組換えワクシニアウイルスによる細胞の感染

RK13 細胞のコンフルエントな単層を、実施例 2 に記載したように m. o. i. 3 で組換え HCV - ワクシニアウイルスに感染させた。感染のためには、細胞単層をリン酸緩衝化生理食塩水、pH 7.4 (PBS) で 2 回洗浄し、組換えワクシニアウイルス原液を MEM 培地で希釈した。m. o. i. が 3 になるように、 10^6 個の細胞につきウイルス溶液 200 µl を添加し、24 で 45 分間インキュベートした。ウイルス溶液を吸引し、 10^6 個の細胞につき完全増殖培地 2 ml (実施例 2 を参照) を加えた。細胞を 37 で 24 時間インキュベートし、この間に HCV 蛋白を発現させた。

【0174】

実施例 4：ウェスタンブロッティングによる組換え蛋白の分析

感染細胞を PBS で 2 回洗浄し、溶解緩衝液 [50 mM トリス - 塩酸、pH 7.5、150 mM NaCl、1% トリトン X - 100、5 mM MgCl₂、1 µg/ml アプロチニン (シグマ (Sigma)、ボルネム (Bornem)、ベルギー)] で直接溶解するか、又は 50 mM トリス - 塩酸、pH 7.5 / 10 mM EDTA / 150 mM NaCl 中で 5 分間インキュベートしてフラスコからはがして、遠心分離 (1000 g で 5 分間) により回収した。次に、細胞ペレットを、 10^6 個の細胞につき 200 µl の溶解緩衝液 (50 mM トリス - 塩酸、pH 8.0、2 mM EDTA、150 mM NaCl、5 mM MgCl₂、アプロチニン、1% トリトン X - 100) に再懸濁した。エッペンドルフ遠心分離機で 14,000 rpm で 5 分間遠心分離して、細胞溶解物から不溶性の破片を除去して清澄にした。ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) により、20 µl の溶解物の蛋白を分離した。次に、トランスファー緩衝液 [25 mM トリス - 塩酸、pH 8.0、1

9 2 mM グリシン、2 0 % (v / v) メタノール〕中で、4 に冷却したヘーファー (Hoef er) H S I トランスファー装置を用いて 1 0 0 V (定電圧) で 2 時間、蛋白をゲルからニトロセルロースシート〔アマーシャム (Amersham) 〕に電氣的にトランスファーした。ニトロセルロースフィルターをブロット液 (Blotto) 〔 P B S 中の 5 % (w / v) 脱脂インスタントミルク粉末 ; Johnson ら、1981 〕でブロッキング処理し、ブロット液 / 0 . 1 % ツイーン (Tween) 2 0 で希釈した一次抗体とインキュベートした。非特異結合を減らすために、通常、ヒト陰性対照血清又は H C V 感染患者血清を 2 0 0 倍希釈し、2 0 0 倍希釈した野性型ワクシニアウイルス感染細胞溶解物と室温で 1 時間ブレインキュベートした。ブロット液 / 0 . 1 % ツイーン 2 0 で洗浄後、ニトロセルロースフィルターを、ブロット液 / 0 . 1 % ツイーン 2 0 で希釈したアルカリホスファターゼ基質溶液とインキュベートした。P B S 中の 0 . 1 % ツイーン 2 0 で洗浄後、フィルターをアルカリホスファターゼ基質溶液 (1 0 0 mM トリス - 塩酸、pH 9 . 5 、 1 0 0 mM N a C l 、 5 mM M g C l ₂ 、 0 . 3 8 μ g / ml ニトロブルーテトラゾリウム、0 . 1 6 5 μ g / ml 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート) とインキュベートした。電氣的トランスファー以外の全ての操作は、室温で行った。

10

【 0 1 7 5 】

実施例 5 : 組換え E 1 又は E 2 蛋白の精製

5 . 1 . 溶解

感染した R K 1 3 細胞 (E 1 又は E 2 構築物を有する) をリン酸緩衝化生理食塩水 (P B S) で 2 回洗浄し、1 0 mM E D T A を含有する P B S 中でインキュベートして培養レシピエントからはがした。はがした細胞を P B S で 2 回洗浄し、4 で、 10^5 個の細胞につき、2 mM ビオチン化 N - エチルマレイミド (ビオチン - N E M) 〔シグマ (Sigma) 〕を含有する溶解緩衝液〔 5 0 mM トリス - 塩酸、pH 7 . 5 、 1 5 0 mM N a C l 、 1 % トリトン X - 1 0 0 、 5 mM M g C l ₂ 、 1 μ g / ml アプロチニン (シグマ (Sigma) 、ボルネム (Bornem) 、ベルギー) 〕 1 ml を加えた。この溶解物を、B 型ダウンサー (douncer) でホモゲナイズし、室温で 0 . 5 時間放置した。一次溶解物に、1 0 mM N - エチルマレイミド〔 N E M 、アルドリッチ (Aldrich) 、ボルネム (Bornem) 、ベルギー) 〕を含有する溶解緩衝液 5 倍量を更に加え、この混合物を室温で 1 5 分間放置した。ベックマン J A - 1 4 ローター中で 1 4 , 0 0 0 rpm (r_{max} で 3 0 , 1 0 0 g) で 4 で 1 時間遠心分離して、溶液から不溶性細胞破片を除去して清澄にした。

20

30

【 0 1 7 6 】

5 . 2 . レクチンクロマトグラフィー

カラムの 5 倍量の溶解緩衝液で流速 1 ml / 分で平衡化させた 0 . 8 × 1 0 cm のレンチルレクチンセファロース 4 B カラム〔ファルマシア (Pharmacia) 〕に、清澄化した細胞溶解物を流速 1 ml / 分で流した。レンチルレクチンカラムをカラムの 5 ~ 1 0 倍量の緩衝液 1 〔 0 . 1 M リン酸カリウム、pH 7 . 3 、 5 0 0 mM K C l 、 5 % グリセロール、1 mM 6 - N H ₂ - ヘキサン酸、1 mM M g C l ₂ 、及び 1 % デシル P E G (DecylPEG) (クwant (KWANT) 、ベヅム (Bedum) 、オランダ) 〕で洗浄した。ある実験では、次にカラムを、1 % デシル P E G (DecylPEG) の代わりに 0 . 5 % エンピゲン - B B 〔カルビオケム (Calbiochem) 、カリフォルニア州サンディエゴ、米国〕を含有するカラムの 1 0 倍量の緩衝液 1 で洗浄した。溶出緩衝液 (1 0 mM リン酸カリウム、pH 7 . 3 、 5 % グリセロール、1 mM ヘキサン酸、1 mM M g C l ₂ 、 0 . 5 % エンピゲン - B B 、及び 0 . 5 M α - メチル - マンノピラノシド) を適用して、結合物質を溶出した。溶出した物質を分画し、実施例 6 に記載のように E L I S A を用いて、画分を、E 1 又は E 2 の存在についてスクリーニングした。第 2 2 図に、v v H C V 3 9 (1 b 型) 、 v v H C V 4 0 (1 b 型) 、 v v H C V 6 2 (3 a 型) 、及び v v H C V 6 3 (5 a 型) で感染させた細胞溶解物の 4 つの異なる E 1 精製物の、レンチルレクチン溶出画分から得られた E L I S A 結果を示す。第 2 3 図に、第 2 2 図に示した値から得られたプロフィールを示す。これらの結果は、異なる型の H C V のエンベロープ蛋白についてレクチン親和性カラムを使用できることを示している。

40

50

【0177】

5.3. 濃縮及び部分的還元

E1 陽性又は E2 陽性画分をプールし、ベックマン JA-20 ローター中で 4 で 5, 000 rpm で 3 時間遠心分離し、セントリコン (Centricon) 30 kDa [アミコン (Amicon)] で濃縮した。ある実験では、E1 陽性又は E2 陽性画分をプールし、窒素蒸発により濃縮した。 3×10^8 個の細胞相当量を約 200 μ l に濃縮した。部分的還元のために、この 200 μ l に、最終濃度 3.5 % になるように 30 % エンピゲン - BB [カルピオケム (Calbiochem)、カリフォルニア州サンディエゴ、米国] を加え、次に最終濃度 1.5 ~ 7.5 mM になるように 1 M DTT 水溶液を加え、37 で 30 分間インキュベートした。次に、NEM (ジメチルスルホキシド中、1 M) を最終濃度 50 mM になるように加え、更に 37 で 30 分間反応させて遊離のスルフヒドリル基をブロックした。

10

【0178】

5.4. ゲル濾過クロマトグラフィー

スーパーデックス (Superdex) - 200 HR 10 / 20 カラム [ファルマシア (Pharmacia)] を、カラムの 3 倍量の PBS / 3 % エンピゲン - BB で平衡化させた。還元混合物をスマートシステム (Smart System) [ファルマシア (Pharmacia)] の 500 μ l 試料ループに注入し、PBS / 3 % エンピゲン - BB 緩衝液を加えてゲル濾過した。V₀ から V_t まで 250 μ l の画分を集めた。実施例 6 に記載のように、画分を E1 蛋白又は E2 蛋白の存在についてスクリーニングした。

【0179】

第 24 図に、vvHCV39 (1b 型)、vvHCV40 (1b 型)、vvHCV62 (3a 型)、及び vvHCV63 (5a 型) で感染させた細胞溶解物の 4 つの異なる E1 精製物の、ゲル濾過クロマトグラフィー後に得られた画分から得られた ELISA 結果を示す。第 25 図に、1b 型、3a 型及び 5a 型 (それぞれ、vvHCV39、vvHCV62 及び vvHCV63 で感染させた RK13 細胞からのもの; レンチルレクチンで精製し、前記実施例のように還元した) の E1 蛋白の精製物から得られたプロフィールを示す。「1」、「2」、「3」で示したピークは、純粋な E1 蛋白ピークを示す (E1 反応性は主に画分 26 ~ 30 にあった)。これらのピークは、二量体性 E1 蛋白に対応する約 70 kDa の非常に似通った分子量を示した。3 つのプロフィール中の他のピークは、実施例 5.3. に概説した還元工程によってのみ、また適正な界面活性剤の存在下での以後のゲル濾過工程によってのみ、E1 から分離することができた、ワクシニアウイルス及び / 又は細胞性蛋白である。第 26 図に示すように、プール 1 (画分 10 ~ 17 を示す) とプール 2 (画分 18 ~ 25 を示す) は、E1 プール (画分 26 ~ 30) には存在しない夾雑蛋白を含有する。E1 ピーク画分を SDS - PAGE にかき、実施例 4 に記載のようにプロットした。第 27 図に示すように、NEM - ピオチンで標識した蛋白をストレプトアビジン - アルカリホスファターゼにより検出した。特にゲル濾過クロマトグラフィーの前に存在する 29 kDa と 45 kDa の夾雑蛋白 (レーン 1) が、画分 26 ~ 30 では非常に低レベルでしか存在しないことが、容易に観察することができる。約 65 kDa のバンドは、完全にはモノマー E1 形態には分解されない E1 二量体形態を示す。3a 型 E1 蛋白 (レーン 10 ~ 15) について同様の結果が得られた。これは、6 個の炭水化物ではなく 5 個の炭水化物のみしか存在しないため、SDS - PAGE でより速い移動度を示す。第 28 図に、第 26 図と同一条件下で実施した SDS - PAGE 実験の銀染色を示す。精製操作の全体像を第 29 図に示す。

20

30

40

【0180】

精製した E1 蛋白の存在を、実施例 4 に記載のようにウェスタンブロットティングにより更に確認した。二量体性 E1 蛋白は、凝集せず、夾雑物質がないように見える。前述のスキームに従って vvHCV40 感染細胞から精製したサブタイプ 1b の E1 蛋白を、477 パーキンエルマー (Perkins-Elmer) シーケンサーでアミノ末端から配列決定して、最初の残基としてチロシンを含有しているらしいことが判った。このことにより、E1 蛋白が正しい位置 (A191 と Y192 の間) でシグナルペプチダーゼによりそのシグナル配列

50

から切断されたことが確認された。これにより、成熟 E 1 蛋白のアミノ末端はアミノ酸 192 位で開始するという Hijikata ら (1991) の知見が確認される。

【0181】

5.5. E 2 蛋白の精製

実施例 5.1. ~ 5.4. に示すように、vvHCV 44 に感染した RK13 細胞から、E 2 蛋白 (アミノ酸 384 ~ 673) を精製した。第 30 図に、レンチルレクチンクロマトグラフィーの OD₂₈₀ プロフィール (連続線) を示す。点線は、ELISA (実施例 6 を参照) で検出された E 2 反応性を示す。第 31 図に、レンチルレクチン E 2 プール (第 30 図を参照) (その一部は実施例 5.3. に記載の方法に従い還元してブロックしたものであり、また一部は直ちにカラムに適用したものである) のゲル濾過クロマトグラフィーから得られた同じプロフィールを示す。E 2 プールの両方の部分を別々のゲル濾過カラムにかけた。還元をしない場合、E 2 は夾雑蛋白と共有結合凝集物を生成することが証明できた。還元とブロッキングの後、夾雑蛋白の大部分は V₀ 画分に集まった。E 2 蛋白と一緒に精製された他の夾雑蛋白は、以後の工程で除去できたため、もはや E 2 蛋白に共有結合していなかった。第 32 図に、E 2 蛋白精製について実施した付加的な Ni²⁺-IMAC 精製工程を示す。この親和性精製工程では、vvHCV 44 から発現された E 2 蛋白に付加された 6 個のヒスチジン残基を使用した。夾雑蛋白は、カラムから流れ出すか、又は 30 mM イミダゾール洗浄により除去することができた。第 33 図に、0.5 µg の精製 E 2 蛋白と 30 mM イミダゾール洗浄物の銀染色した SDS / PAGE を示す。純粋な E 2 蛋白は、200 mM イミダゾール溶出工程により容易に回収することができた。第 34 図に、イミダゾールを除去して目的の緩衝液 (例えば、PBS、炭酸緩衝液、生理食塩水) に変更することができることを目的とした付加的な脱塩工程を示す。

10

20

【0182】

E 1 の産生のために vvHCV 11A (又は vvHCV 40) で、又は E 2 蛋白の産生のために vvHCV 41、vvHCV 42、vvHCV 43 若しくは vvHCV 44 で感染させた、約 50,000 cm² の RK13 細胞から出発して、実施例 5.1 ~ 5.5 に記載の方法により、約 1.3 mg の E 1 蛋白と 0.6 mg の E 2 蛋白を得ることができた。

【0183】

(予想に反して) 分泌された E 2 蛋白 (約 30 ~ 40 % を構成し、60 ~ 70 % は細胞内形態である) は、凝集物を形成したことで特徴付けられることにも注目すべきである。したがって、分泌された E 2 を精製するにも同じ問題があった。分泌された E 2 は前述のように精製することができた。

30

【0184】

実施例 6 : 抗 E 1 若しくは抗 E 2 抗体の検出又は E 1 若しくは E 2 蛋白の検出のための ELISA

マクシソルブ (Maxisorb) マイクロウェルプレート [ヌンク (Nunc)、ロスキルデ (Roskilde)、デンマーク] を、1 ウェル当たり PBS 中 5 µg/ml のストレプトアビジン [ペーリンガー マンハイム (Boehringer Mannheim)] 溶液 1 部 (例えば、50 µl 又は 100 µl 又は 200 µl) で、4 で 16 時間又は 37 で 1 時間、コーティングした。あるいは、ウェルを、50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液、pH 9.6 中 5 µg/ml ガランタス・ニバリス・アグルチニン (Galanthus nivalis agglutinin) (GNA) 1 部で、4 で 16 時間又は 37 で 1 時間、コーティングした。GNA によるコーティングの場合は、プレートをイノテスト (Innotest) HCV Ab III キット [インノジェネティックス (Innogenetics)、ズウィジンドレヒト (Zwijndrecht)、ベルギー] の洗浄液 (Washing Solution) 400 µl で 2 回洗浄した。非結合コーティング表面は、1.5 ~ 2 部のブロッキング溶液 (PBS 中 0.1 % カゼイン及び 0.1 % NaN₃) で、37 で 1 時間又は 4 で 16 時間、ブロッキングした。ブロッキング溶液を吸引した。精製した E 1 又は E 2 は 100 ~ 1,000 ng/ml (濃度は A = 280 nm で測定した) に希釈し、あるいは E 1 若しくは E 2 についてスクリーニングすべきカラム画分 (実施例 5 を参照) 又は精製していない細胞溶解物 (実施例 5.1.) 中の E 1 若しくは E 2 は、ブロッキング溶液で 20 倍希釈し、

40

50

各ウェルに1部のE1又はE2溶液を加え、ストレプトアビジン又はGNAでコーティングしたプレート上で、37℃で1時間インキュベートした。マイクロウェルをイノテスト(Innotest) HCV Ab IIIキット〔インノジェネティックス(Innogenetics)、ズウィジンドレヒト(Zwijndrecht)、ベルギー〕の洗浄液1部で3回洗浄した。イノテスト(Innotest) HCV Ab IIIキットの試料希釈液(Sample Diluent)で、血清試料は20倍希釈し、又はモノクローナル抗E1若しくは抗E2抗体は20 ng/mlの濃度に希釈し、この溶液1部をE1又はE2蛋白と37℃で1時間反応させた。マイクロウェルを、イノテスト(Innotest) HCV Ab IIIキット〔インノジェネティックス(Innogenetics)、ズウィジンドレヒト(Zwijndrecht)、ベルギー〕の洗浄液400 µlで5回洗浄した。イノテスト(Innotest) HCV Ab IIIキット〔インノジェネティックス(Innogenetics)、ズウィジンドレヒト(Zwijndrecht)、ベルギー〕のコンジュゲート希釈液(Conjugate Diluent)1部で、1/80,000希釈したヤギ抗ヒト又は抗マウスIgGペルオキシダーゼ結合二次抗体〔ダコ(DAKO)、グロストルupp(Glostrup)、デンマーク〕で、37℃で1時間インキュベートし、プレートを、イノテスト(Innotest) HCV Ab IIIキット〔インノジェネティックス(Innogenetics)、ズウィジンドレヒト(Zwijndrecht)、ベルギー〕の洗浄液400 µlで3回洗浄後、イノテスト(Innotest) HCV Ab IIIキット〔インノジェネティックス(Innogenetics)、ズウィジンドレヒト(Zwijndrecht)、ベルギー〕の基質溶液(Substrate Solution)1部で100倍希釈した、イノテスト(Innotest) HCV Ab IIIキット〔インノジェネティックス(Innogenetics)、ズウィジンドレヒト(Zwijndrecht)、ベルギー〕の基質を24℃で30分間添加して得られた発色により、結合した抗体を検出した。

【0185】

実施例7：異なる臨床プロフィールを有する患者群の追跡

7.1. 抗E1及び抗E2抗体の監視

現在のC型肝炎ウイルス(HCV)診断方法は、HCV抗体の存在のスクリーニングと確認のために開発された。このような測定法は、治療の監視や疾患の予後の予知のために有用な情報を与えないようである。しかし、B型肝炎の場合のように、臨床の場においては抗エンベロップ抗体の検出及び定量がより有用なことがある。C型肝炎ウイルス疾患の予後の予知マーカーとしての抗E1抗体力価及び抗E2抗体力価の使用の可能性を探るために、IFN-α治療で長期持続性の応答を示す一連の患者〔治療後少なくとも1年の期間、血液中のトランスアミナーゼレベルは正常であり、HCV-RNA試験(5'非コード領域のPCR)が陰性である患者と定義する〕を、応答を示さないか又は治療の最後に再発の生化学的応答を示す患者と比較した。

【0186】

IFN-α治療で長期持続性の応答を示す一群8名の患者(LTR、1~3.5年追跡、3a型が3名と1b型が5名)を、治療に完全には応答しない9名の患者(NR、1~4年追跡、1b型が6名、3a型が3名)と比較した。1b型(vvHCV-39、実施例2.5.参照)と3a型(vvHCV-62、実施例2.5.参照)のE1蛋白を、ワクシニアウイルス系(実施例3及び4を参照)で発現させ、均一になるまで精製した(実施例5)。実施例6に記載のELISAで、1b型C型肝炎ウイルスに感染している患者から得られた試料を、精製した1b型E1蛋白との反応性について試験し、一方、3a型感染の試料を抗3a型E1抗体の反応性について試験した。異なる患者に感染しているC型肝炎ウイルスの遺伝子型を、イノリパ(Inno-LiPA)遺伝子型測定法〔インノジェネティックス(Innogenetics)、ズウィジンドレヒト(Zwijndrecht)、ベルギー〕により測定した。第5図に、インターフェロン治療中及び治療後の追跡期間中の、これらの患者の抗E1シグナル対ノイズ比を示す。LTR症例では抗E1レベルが一貫して急速に低下している(3症例では完全に陰性化)が、一方、NR症例の抗E1レベルはほぼ一定値のままだった。得られた抗E1データの一部を、平均S/N比±SD(平均抗E1力価)として第2表に示す。第5、第6、第7及び第8図に示すように、抗E1力価を、シグナル対ノイズ比から求めることができた。

【0187】

2つの群の間には、既に治療の最後の段階で著しい差が認められた。LTRでは抗E1抗体力価は6.9倍低下したが、NRではわずかに1.5倍の低下であった。追跡の最後の段階では、持続性応答の患者では抗E1力価は22.5倍低下したが、NRではわずかながら上昇した。したがって、これらの結果に基づくと、IFN- α 治療の監視中の抗E1抗体レベルの低下は、治療に対する長期の持続性応答と相関した。抗E1測定法は、IFN治療、又はC型肝炎疾患の治療一般に対する長期応答の予知に非常に有用でありうる。

【0188】

この知見は予測しないことだった。これに反して、本発明者らは、長期応答患者ではIFN治療中に抗E1抗体レベルが上昇することを予測していた。B型肝炎の場合には、抗HBsAg抗体についての血清変換の結果としてウイルスが消失する。また他の多くのウイルス感染では、抗エンベロープ抗体が生成されるとウイルスが排除される。しかし、本発明の実験では、治療に対する長期応答患者では抗E1抗体は明らかに低下し、一方、非応答患者ではこの抗体レベルはほぼ一定値を維持した。これらの実験の結果は予測されていなかったが、この明白ではない結果は、HCV感染の臨床診断に非常に重要かつ有用である可能性がある。第9、第10、第11及び第12図に示すように、抗E2レベルは、試験した同じ患者でも非常に異なって挙動し、抗E1抗体のように明白な力価の低下は観察されなかった。第35図には、このパイロット試験の全体像を示す。

【0189】

第2表から推定できるように、治療に対する不完全応答者に比較して、長期応答者では、治療の開始時に、抗E1力価は平均で少なくとも2倍高かった。したがって、治療の開始時に抗E1抗体の力価を測定すること、又は感染の間に患者を監視し、抗E1力価を測定することは、C型肝炎の臨床診断の有用なマーカーとなり得る。更に、実施例7.3.に示すように、E1又はE2蛋白のより規定された領域の使用が好ましい可能性がある。

【0190】

7.2. より大きな患者コホートにおけるE1及びE2抗体の解析

このパイロット試験から、本発明者らは、感染が完全に消失した場合、HCVエンベロープ蛋白に対する抗体は、より通常試験されるHCV抗原に対する抗体より急速に変化し、E1抗体が最も激しく変化する、と結論した。したがって、我々は、より多くの1b型及び3a型感染LTRを入れ、さらに対応する(マッチさせた)シリーズのNRをコホートに補足して、両群に14名ずつの患者が含まれるようにした。数名の部分的応答者(PR)と再発を有する応答者(RR)も解析した。

【0191】

第36図に、LTR群及びNR群の平均E1抗体(E1Ab)及びE2抗体(E2Ab)レベルを示し、第4及び第5表に統計解析を示す。この大きなコホートにおいて、IFN- α 治療前の高いE1Abレベルは、LTRに関連していた($P < 0.03$)。3a型感染患者においては1b型感染患者群よりはるかに高いE1抗体レベルが観察された(第37図)ため、遺伝子型を考慮した(第4表)。1b型感染群では、治療の開始時にもLTRはNRよりE1抗体レベルが高かった($P < 0.05$)。3a型感染NRの数は少ないため、統計解析ができなかった。

【0192】

1.5年の追跡期間中、LTRで監視した抗体レベルのうち、E1抗体のみが、治療の開始時に測定したレベルに比較して急速に消失した(治療の終了時、 $P = 0.0058$; 治療後6月目及び12月目、それぞれ $P = 0.0047$ 及び $P = 0.0051$)。この消失は、1型感染又は3型感染LTRにおいて有意であった(平均P値 < 0.05)。これらのデータにより、E1Abレベルは回復の初期に急速に低下するという当初の知見を確認した。この特徴は、ウイルスの遺伝子型には依存しないようである。NR、PR又はRRでは、追跡期間を通して、測定したいずれの抗体においても変化が認められなかった。治療中にALTレベルが正常化し、HCV-RNAが陰性化して、治療に良好に応答した

10

20

30

40

50

患者では、持続性応答者（L T R）と再発を有する応答者（P P）との間で著しい差があった。L T Rとは異なり、R RではE 1抗体レベルの低下を示さず、これは、P C R、又はH C V - R N Aの古典的な検出技術によっても、A L Tレベルの上昇によっても、明らかにされない潜伏性のH C V感染の存在を示していた。治療中にR R群になお存在しているこの微量のウイルスR N Aは、抗E 1 B細胞の刺激が可能なのであった。したがって、抗E 1の監視は、N RからL T Rを区別できるのみでなく、R Rからも区別できる可能性がある。

【0193】

7.3. E 1蛋白の規定された領域の抗体の監視

H C V抗原同定のための分子生物学的アプローチにより、ウイルス診断薬の開発において驚くべき進展がもたらされたが、λ g t 1 1ライブラリーの免疫スクリーニング法では、主に、コア及び非構造領域全体に分散した直鎖のエピトープが得られ、エンベロープ領域の解析のためには、哺乳動物細胞におけるE 1 / E 2領域のクローニング及び発現を待たなければならなかった。このアプローチは、ゲノム構造の解読のかなり前から既にエンベロープ領域にそのエピトープがマッピングされていた、他の多くのウイルス感染とは著しく異なる。このようなエピトープ及び対応する抗体は、しばしば、ワクチンの開発に有用な中和活性を有し、及び / 又は臨床的若しくは予知的意義のある診断用検定法の開発を可能にした（例えば、B型肝炎表面抗原に対する抗体）。今日H C Vワクチン又はC型肝炎疾患の臨床診断及び予知を可能にする検査がないため、免疫監視機構に暴露されたウイルスエンベロープ領域の性状解析は、H C Vの診断と予防における新しい方向付けに大きく貢献しうる。

【0194】

H C - J 1配列（Okamoto ら、1990）に基づき、既に記載された方法（EP-A-0 489 968）に従って、8アミノ酸ずつ重複する20量体（第3表）を幾つか合成した。e n v 3 5ペプチド（E 1 - 3 5とも呼ぶ）以外は、いずれによっても、約200のH C V症例の血清中の抗体を検出できなかった。2つの血清のみが、e n v 3 5ペプチドとわずかに反応した。しかし、実施例6に記載の抗E 1 - E L I S Aを用いて、以下のように追加のエピトープを発見することができた：実施例6に記載の抗E 1 - E L I S Aに、50 μ g / mlのE 1ペプチドを、試料希釈液で1 / 20倍希釈したヒト血清と混合することで変更を加えた。第13図に、単一の又は混合物のE 1ペプチドの存在下での、組換えE 1（v v H C V - 40から発現された）蛋白に対するヒト血清の反応性の結果を示す。ライン免疫測定フォーマット（Line Immunoassay format）でストリップ上にコーティングされたE 1ペプチドを用いることにより、血清の2%のみが検出されたが、半分以上の血清は、組換えE 1蛋白で試験したとき、同じペプチドにより競合可能な抗E 1抗体を含有していた。精製したE 1蛋白を注射したB a l b / cマウスから得たマウスモノクローナル抗体の幾つかを、次にE 1に対する反応性について単一のペプチドと競合させた（第14図）。e n v 5 3の添加により幾つかの血清のE 1との反応性を実質的に競合させることができたため、e n v 5 3の領域は明らかに優勢なエピトープを含有しており、e n v 3 1領域に対する抗体も検出された。e n v 5 3及びe n v 3 1ペプチドは、直接固相にコーティングしたときは全く反応性を示さなかったため、この知見は驚くべきことであった。

【0195】

したがって、本出願人が既に（W O 93 / 18054中に）記載した方法を用いて、ペプチドを合成した。以下のペプチド：

ペプチドe n v 3 5 A - ビオチン

N H₂ - S N S S E A A D M I M H T P G C V - G K ビオチン（配列番号51）

E 1領域のH C Vポリ蛋白のアミノ酸208 ~ 227にわたる

ペプチドビオチン - e n v 5 3（「エピトープA」）

ビオチン - G G - I T G H R M A W D M M M N W S P T T A L - C O O H（配列番号52）

E 1領域のH C Vポリ蛋白のアミノ酸313 ~ 332にわたるペプチド1 b E 1（「エピ 50

トープ B」)

H₂ N - Y E V R N V S G I Y H V T N D C S N S S I V Y E A A D M I M H T P G C G
K - ビオチン (配列番号 53)

E1 領域の H C V ポリ蛋白のアミノ酸 192 ~ 228 にわたる

を合成し、ペプチド E1a - BB (ビオチン - G G - T P T V A T R D G K L P A T Q L
R R H I D L L、配列番号 54) 及び E1b - BB (ビオチン - G G - T P T L A A R D
A S V P T T T I R R H V D L L、配列番号 55) (これらは、それぞれ遺伝子型 1a 及
び 1b の配列の同一領域から得られ、また第 9 回国際ウイルス学会 (the IXth internati
onal virology meeting) (グラスゴー、1993) で記載された (「エピトープ C」)) の
反応性と比較した。H C V 血清のパネルの反応性を、エピトープ A、B 及び C で試験し、
エピトープ B は、env35A と比較した (47 個の H C V 陽性血清のうち、8 個はエ
ピトープ B で陽性であったが、env35A と反応するものはなかった)。エピトープ A
、B 及び C に対する反応性は、実施例 6 に記載のようにストレプトアビジンでコーティ
ングしたプレートに結合したビオチン化ペプチド (50 µg/ml) に対して、直接、試験した
。明らかに、エピトープ A 及び B が最も反応性が高く、エピトープ C 及び env35A は
、はるかに反応性が低かった。完全な E1 蛋白に対する反応性を監視したのと同じシリ
ーズの患者 (実施例 7.1.) で、エピトープ A、B 及び C に対する反応性を試験した。エ
ピトープ C についてはほとんど反応性が見られず、一方、第 15、第 16、第 17 及び第
18 図に示すように、エピトープ A 及び B は大部分の血清と反応した。しかし、最も反応
性のエピトープ (エピトープ A) に対する抗体でも疾患の緩解を予測するようには見えず
、一方、抗 1b E1 抗体 (エピトープ B) は、I F N 治療の開始時に、ほとんど長期応答
者にのみ存在した。したがって、抗 1b E1 (エピトープ B) 抗体及び抗 env53 (エ
ピトープ A) 抗体が、C 型肝炎疾患の予後の有用なマーカーであることが示された。env
53 エピトープは、交差反応性抗体 (主要な遺伝子型と交差反応する抗体) の検出に使用
することが有利であり、env53 領域に対する抗体は、血清又は肝臓組織中の普遍的
な E1 抗原の検出に対して非常に有用である可能性がある。env53 領域を認識するモ
ノクローナル抗体を、ランダムエピトープライブラリーと反応させた。免疫スクリーニ
ングでモノクローナル抗体 5E1A10 と反応した 4 つのクローンには、配列 - G W D - が
存在していた。配列 A W D は、全ての H C V 変異株の env53 領域に存在する普遍的な
H C V 配列に類似しているため、env53 交差反応性のマウスのエピトープの基本的な
配列を含有すると考えられる。env31 も、アミノ末端配列 - Y Q V R N S T G L - (配
列番号 93) 中にエピトープを含有する可能性のある可変領域を明らかに含有し、診断
に有用でありうる。第 3 表に示した env31 又は E1 - 31 は、ペプチド 1b E1 の一
部である。ペプチド E1 - 33 及び E1 - 51 もまた、マウス抗体とある程度反応し、ペ
プチド E1 - 55 (可変領域 6 (V6)) を含有する; アミノ酸 329 ~ 336 位にわたる
もまた、患者血清のあるものと反応した。

【0196】

抗 E2 抗体は、抗 E1 抗体と明らかに異なるパターンをたどり、特に治療に対する長期
応答を有する患者では異なっていた。したがって、抗エンベロープ抗体の低下は、組換え
E1 / E2 蛋白を用いる測定法では、単一の抗 E1 蛋白又は抗 E2 蛋白を用いる場合のよ
うには効率的に測定できなかったことは明らかである。両抗体を同時に測定する測定法で
は、抗 E2 応答は明らかに抗 E1 応答を不明瞭にしてしまうであろう。したがって、単
一の E1 蛋白及び E2 蛋白に対する抗エンベロープ抗体を試験する能力が有用であることが
示された。

【0197】

7.4. 抗 E2 抗体のマッピング

24 個の抗 E2 MAb のうち、3 個のみが組換え E2 に対する反応性についてペプチド
による競合を受け得、そのうち 2 個は、H V R I 領域 (ペプチド E2 - 67 及び E2 - 6
9、エピトープ A と呼ぶ) と反応し、エピトープを認識した 1 個は、ペプチド E2 - 13
B (エピトープ C) による競合を受けた。大多数のマウス抗体は、コンフォメーション性

抗 E 2 エピトープを認識した (第 19 図)。H V R I (エピトープ A)、及び H V R II (エピトープ B) (これは少ない)、及び 3 番目の直鎖エピトープ領域 (ペプチド E 2 - 23、E 2 - 25 又は E 2 - 27 による競合を受ける、エピトープ E と呼ぶ)、及び 4 番目の直鎖エピトープ領域 (ペプチド E 2 - 17 B による競合を受ける、エピトープ D) に対するヒトの応答も、しばしば観察できたが、大部分の血清はコンフォメーション性エピトープと反応した (第 20 図)。これらのコンフォメーション性エピトープは、その相対的位置により以下のように分類されうる: コンフォメーション性エピトープを認識する、ハイブリドーマ 15 C 8 C 1、12 D 11 F 1、9 G 3 E 6、8 G 10 D 1 H 9、10 D 3 C 4、4 H 6 B 2、17 F 2 C 2、5 H 6 A 7、15 B 7 A 2 の上澄液中の I g G 抗体を、

10
 プロテイン A 親和性クロマトグラフィーにより精製し、得られた I g G を 1 mg/ml にし、
 ビオチン存在下でホウ酸緩衝液中でビオチン化した。ゲル濾過クロマトグラフィーにより、
 ビオチン化抗体を遊離のビオチンから分離した。プールしたビオチン化抗体画分を、
 100 ~ 10,000 倍希釈した。固相に結合した E 2 蛋白を、非ビオチン化競合抗体の
 100 倍量の存在下でビオチン化 I g G により検出し、次にアルカリホスファターゼ標識
 ストレプトアビジンにより検出した。

【0198】

競合の百分率を第 6 表に示す。これらの結果に基づき、4 つのコンフォメーション性抗 E 2 エピトープ領域 (エピトープ F、G、H 及び I) を表すことができた (第 38 図)。あるいは、これらの M A b は、本試験で使用したペプチドでは表されない突然変異直鎖エピトープを認識する可能性がある。モノクローナル抗体 4 H 6 B 2 及び 10 D 3 C 4 は、

20
 16 A 6 E 7 の反応性と競合したが、16 A 6 E 7 とは異なり、ペプチド E 2 - 13 B を認識しなかった。これらの M A b は、同じ直鎖エピトープ (エピトープ C) の変異株を認識するか、あるいは立体障害があるか又は E 2 - 13 B 領域 (エピトープ H) への 16 A 6 E 7 の結合後コンフォメーションを変化させるコンフォメーション性エピトープを認識する可能性がある。

【0199】

実施例 8 : E 1 グリコシル化突然変異体

8.1. 緒言

哺乳動物細胞から発現される、v v H C V 10 A にコードされる E 1 蛋白及び v v H C V 41 ~ 44 にコードされる E 2 蛋白は、それぞれ 6 個及び 11 個の炭水化物部分を含有

30
 する。これは、v v H C V 10 A 感染又は v v H C V 44 感染 R K 13 細胞の溶解物を、溶解物中の蛋白 (E 1 を含む) が部分的に脱グリコシル化されるように、低下する濃度のグリコシダーゼ [P N G a s e F 又はエンドグリコシダーゼ H、(ベーリンガー・マンハイム・ビオケミカ (Boehringer Mannheim Biochemica)、製造業者の取り扱い説明書による) とインキュベートすることにより、示すことができた (それぞれ第 39 及び第 40 図)。

【0200】

幾つかのグリコシル化部位の欠如した突然変異体は、免疫学的反応性が改良されたエンペロープ蛋白の選択を可能にした。例えば H I V については、幾つかの選択された糖付加モチーフが欠如した g p 120 蛋白が、診断的目的及びワクチンとしての目的に特に有用

40
 であることが見いだされた。A / ホンコン / 3 / 68 (H 3 N 2) インフルエンザウイルスのエスケープ突然変異体の血球凝集素蛋白中の新しいオリゴ糖側鎖の付加は、中和モノクローナル抗体との反応性を妨害する (Skehel ら、1984)。インフルエンザ血球凝集素蛋白中に、部位特異的突然変異誘発により新規なグリコシル化部位を導入すると、劇的な抗原性変化が観察され、炭水化物が抗原性の調節物質であることが示唆された (Gallagher ら、1988)。別の分析では、フレンドマウス白血病ウイルスの表面蛋白 g p 70 の 8 個の炭水化物付加モチーフを欠失させた。この突然変異のうち 7 つはウイルス感染性に影響を与えなかったが、アミノ末端に関して 4 番目のグリコシル化シグナルの突然変異により、非感染性表現型が得られた (Kayman ら、1991)。更に、N - 結合炭水化物鎖の付加は、折りたたみ中間体の安定化、したがって効率的折りたたみ、正しくない折りたたみ及び小胞

50

体での分解の防止、オリゴマー化、生物学的活性、及び糖蛋白の輸送に重要であることが、当該分野で公知である（Roseら、1988；Domsら、1993；Helenius、1994の総説を参照）。

【0201】

HCV遺伝子型の、異なるエンベロープ蛋白配列の整列から、HCVサブタイプ1b E1蛋白上の6個のグリコシル化部位は、ある（サブ）タイプでは幾つかは欠如しているため、正しい折りたたみと反応性のために必ずしも全てが必要ではない、と推測されうる。1b、6a、7、8及び9型に存在する4番目の炭水化物モチーフ（Asn251上）は、今日知られている他の全ての型では欠如している。この糖付加モチーフは、突然変異させて、反応性が改善された1b E1型蛋白を生成しうる。また、2b型配列は、V5領域（Asn299上）に余分のグリコシル化部位を示す。遺伝子型2cに属する単離株S83は、V1領域（Asn上）の最初の炭水化物モチーフさえ欠如しているが、これは他の全ての単離株には存在している（Stuyver、1994）。しかし、完全に保存された糖付加モチーフの中でも、炭水化物の存在は、折りたたみには必要でない可能性もあり、免疫監視機構を逃れるのに一役買っている可能性がある。したがって、正しい折りたたみ（及び反応性）に必要とされない炭水化物付加モチーフの同定は明白ではなく、各突然変異体を分析し、反応性について試験しなければならない。グリコシル化モチーフ（NXS又はNXT配列）の突然変異誘発は、これらのコドンが、Nの場合はNと異なるアミノ酸をコードし、及びノ又はSの場合及びTの場合はS又はTと異なるアミノ酸をコードするように、N、S、又はTのコドンを突然変異させることにより達成されうる。あるいは、NPS又はNPTが炭水化物によって度々修飾されるわけではないことが知られているため、X位をPに突然変異させてもよい。どの炭水化物付加モチーフが折りたたみ及びノ又は反応性に必要で、どれが必要でないかを確立した後、そのような突然変異の組合せを作成してもよい。

【0202】

8.2.E1蛋白の突然変異誘発

全ての突然変異はクローンHCC110A（配列番号5）のE1配列上に行なった。第1回目のPCRを、ワクシニア11K後期プロモーターの上流に位置するGPT配列をターゲットとしたセンスプライマー「GPT」（第7表を参照）と、突然変異誘発を得るために目的の塩基変化を含有するアンチセンスプライマー（GLY#と命名、#はグリコシル化部位の数を示す。第41図を参照）とを使用して行なった。6つのGLY#プライマー（それぞれ特定のグリコシル化部位に対して特異的）を以下のように設計した：

- N-グリコシル化Asnをコードするコドン（AAC又はAAT）を、Glnコドン（CAA又はCAG）に変更。アスパラギンに非常に似ていることからグルタミンを選択した〔2つのアミノ酸は共に中性であり、非極性残基を含有する。グルタミンの側鎖の方が長い（-CH₂-基が1つ余分にある）〕。

【0203】

- 新しいユニーク（単一）又は稀な制限酵素部位（例えば、E1Gly5の第2のSmaI部位）を作成するために、グリコシル化部位の下流のコドンの1つ又は幾つかに、サイレント変異を導入。アミノ酸配列を変更することなく、この突然変異は、突然変異配列を元々のE1配列（pVHCV-10A）から又は互いに区別する方法を与える（第41図）。この追加の制限部位は、新しいハイブリッド（2重、3重、など）グリコシル化突然変異体の構築にも有用でありうる。

【0204】

- 最初のミスマッチのヌクレオチドの5'に18ヌクレオチドを、そして3'末端に12~16ヌクレオチドを伸長させる。第7表に、N-結合グリコシル化部位の配列と重複する6つのGLY#プライマーの配列を示す。

【0205】

部位特異的突然変異誘発のために「ミスプライミング（mispriming）」又は「重複伸長（overlap extension）」（Horton、1993）を使用した。この考え方を、第42と第43

10

20

30

40

50

図に例示する。まず、2つの別個の断片を、各突然変異部位について標的遺伝子から増幅した。5'末端から得られたPCR生成物(生成物GLY#)を、5'センスGPTプライマー(第7表を参照)、及び各3'アンチセンスGLY#プライマーで増幅した。第2の断片(生成物OVR#)を、3'アンチセンスTK_Rプライマーと、各5'センスプライマー(OVR#プライマー、第7表、第43図を参照)で増幅した。

【0206】

OVR#プライマーは、GLY#プライマー配列の一部を標的とする。したがって、2群のPCR生成物は、同一配列の重複領域を共有する。これらの中間体生成物を混合し(GLY-1とOVR-1、GLY-2とOVR-2など)、高温で融解させ、再アニーリングさせると、生成物GLY#の最初のセンス鎖は、生成物OVR#のアンチセンス鎖と、2つの鎖が互いのプライマーとして作用するようにアニーリングすることができる(この逆もある)(第42.B.図を参照)。アニーリングした重複部分を2回のPCRサイクル中、Taqポリメラーゼで伸長すると、全長突然変異体分子E1GLY#が生成し、これはグリコシル化部位数#を破壊する突然変異を有していた。2つの内部ネストプライマー(nested primer)の共通のセットを用いて、3回目のPCRで、クローニングのための充分量のE1GLY#生成物を生成した。これら2つの新規なプライマーは、それぞれワクシニア11Kプロモーターの3'部位(センスGPT-2プライマー)と、ワクシニアのチミジンキナーゼ遺伝子座の5'末端(アンチセンスTK_R-2プライマー、第7表を参照)が重複していた。全てのPCR条件は、Stuyverら(1993)が記載したとおりに行った。

10

20

【0207】

これらの各PCR生成物を、EcoRI/BamHIで切断して、元々のE1配列(pvHCV-10A)を含有するEcoRI/BamHIで切断したワクシニアウイルスにクローン化した。

【0208】

選択されたクローンを、EcoRI/BamHI切断により挿入体の長さについて、及び新しい各制限部位の存在について分析した。突然変異した部位を重複している配列を、2本鎖配列決定により確認した。

【0209】

8.3.E1グリコシル化突然変異体の解析

30

実施例8.2に記載の突然変異E1配列を含有する6つのプラスミドから出発して、実施例2.5に記載の野性型ワクシニアウイルスとの組換えを行って、組換えワクシニアウイルスを作成した。簡単に説明すると、サブコンフルエントなRK13細胞の175cm²フラスコを、突然変異E1配列を有する6つの組換えワクシニアウイルスで、及びvvHCV-10A(非突然変異E1配列を有する)と野性型ワクシニアウイルスとで、感染させた。感染の24時間後、細胞を溶解して、実施例4に記載のウェスタンブロッティングで分析した(第44A図を参照)。全ての突然変異体は、SDS-PAGEで、元々のE1蛋白より速い移動度を示し(約2~3kDa 小さい分子量に相当する)、これにより炭水化物部分が1つ付加されなかったことを確認した。また、組換えウイルスをPCRと制限酵素分析で解析して、異なる突然変異体の同一性を確認した。第44B図に、全ての突然変異体(第41図に記載)が予測された追加の制限部位を含有することを示す。細胞溶解物の別の部分を、ELISAにより異なる突然変異体の反応性を試験するために使用した。溶解物を20倍希釈し、実施例6に記載のようにレクチンGNAでコーティングしたマイクロウェルプレートに添加した。捕捉された(突然変異)E1糖蛋白を、実施例6に記載の24名のHCV感染患者の20倍希釈血清と反応させた。6つの突然変異体及びE1のシグナル対ノイズ(S/N)値(GLY#のOD/野性型のOD)を、第8表に示す。この表にはまた、GLY#及びE1蛋白のS/N値の比を示す。患者血清との反応性の比較のために異なる突然変異体の細胞溶解物を使用するアプローチにより、反応性レベルではなく異なる発現レベルの結果が観察される可能性があることを理解すべきである。このような困難さは、実施例5に記載のように異なる突然変異体を精製し、全ての異なるE1

40

50

蛋白の同一量を試験することにより解決できた。しかし、第5表に示した結果は、第1 (GLY1)、第3 (GLY3)、及び第6 (GLY6) のグリコシル化モチーフの除去により、幾つかの血清の反応性が低下するが、第2と第5の部位の除去ではそうではないことを、既に示している。GLY4の除去は、幾つかの血清の反応性を改良するようであった。これらのデータは、異なる患者は、本発明のグリコシル化突然変異体に対して異なって反応することを示す。すなわち、このような突然変異体E1蛋白は、HCV疾患の診断 (スクリーニング、確認、予知など) と予防に有用でありうる。

【0210】

実施例9：グリコシル化欠損酵母中でのHCVのE2蛋白の発現

クローンHCC41に対応するE2配列に、 α -接合因子プレ/プロシグナル配列を付加し、酵母発現ベクターに挿入した。この構築物で形質転換した*S. cerevisiae*細胞は、増殖培地中にE2蛋白を分泌した。*S. cerevisiae*株中でのこのような構築物の発現の際に、ほとんどのグリコシル化部位は、高マンノース型グリコシル化で修飾されていたことが観察された (第45図)。このため、不均一性のレベルが高くなりすぎ、反応性が妨害され、このことはワクチンにも診断目的にも不適であった。この問題を解決するために、パナジン酸耐性クローンの選択により、改変されたグリコシル化経路を有する*S. cerevisiae*突然変異体を作成した。このクローンを、分子量の分析及び糖蛋白インペルターゼの不均一性の分析により、改変グリコシル化経路について解析した。これにより、異なるグリコシル化欠損*S. cerevisiae*突然変異体が同定できた。次に、選択された突然変異体の幾つかでE2蛋白を発現させ、実施例4に記載のウェスタンブロッティング上で、実施例7に記載のモノクローナル抗体と反応させた (第46図)。

【0211】

実施例10：一般的有用性

これら結果は、HCVエンベロープ蛋白とヒト患者血清との高い反応性を得るには、良好な発現系のみならず良好な精製プロトコールが必要であることを示している。これは、蛋白の本来の折りたたみの保存を保証する本発明の適正なHCVエンベロープ蛋白発現系及び/又は精製プロトコールを用い、夾雑蛋白の排除を保証し、コンフォメーション (したがって、HCVエンベロープ蛋白の反応性) を保持する本発明の精製プロトコールを用いることにより達成される。診断的スクリーニング測定法に必要な精製HCVエンベロープ蛋白の量は、1年間に数グラムの範囲である。ワクチンとして使用するには、更に多量のエンベロープ蛋白が必要であろう。したがって、最適の発現構築物の選択及び小規模のスケールアップにはワクシニアウイルス系が使用でき、数種の酵母株から発現させる場合、高マンノース炭水化物を含有する単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白の大規模発現と精製が達成されうる。例えば、B型肝炎の場合は、哺乳動物細胞からのHBsAgの製造は、酵母由来のB型肝炎ワクチンと比較してはるかに費用がかさむ。

【0212】

本発明に開示した精製方法は、「ウイルスエンベロープ蛋白」一般にも使用できる。例としては、フラビウイルス、新たに発見されたGB-A、GB-B及びGB-C肝炎ウイルス、ペスチウイルス (例えばウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、ブタコレラウイルス (HCV)、ボーダー病ウイルス (Border Disease Virus) (BDV))、そしてこれらより少し関連は少ないがB型肝炎ウイルスのようなウイルス (主にHBsAgの精製) から得られるものがある。

【0213】

本発明のエンベロープ蛋白精製方法は、詳細な説明の項に記載したように、下等又は高等真核生物細胞あるいは原核生物で、細胞内及び細胞外に発現される蛋白について使用することができる。

【0214】

【表 3】

第 1 表：組換えワクシニアプラスミド及びウイルス

プラスミド名	名 称	c D N A サブクローン 構 築 物	長 さ (nt/aa)	挿入に用いた ベクター
pvHCV-13A	E1s	EcoR I - Hind III	472/157	pgptATA-18
pvHCV-12A	E1s	EcoR I - Hind III	472/158	pgptATA-18
pvHCV-9A	E1	EcoR I - Hind III	631/211	pgptATA-18
pvHCV-11A	E1s	EcoR I - Hind III	625/207	pgptATA-18
pvHCV-17A	E1s	EcoR I - Hind III	625/208	pgptATA-18
pvHCV-10A	E1	EcoR I - Hind III	783/262	pgptATA-18
pvHCV-18A	COREs	Acc I (K1) - EcoR I (K1)	403/130	pgptATA-18
pvHCV-34	CORE	Acc I (K1) - Fsp I	595/197	pgptATA-18
pvHCV-33	CORE-E1	Acc I (K1)	1150/380	pgptATA-18
pvHCV-35	CORE-E1b.his	EcoR I - BamH I (K1)	1032/352	pMS-66
pvHCV-36	CORE-E1n.his	EcoR I - Nco I (K1)	1106/376	pMS-66
pvHCV-37	E1Δ	Xma I - BamH I	711/239	pvHCV-10A
pvHCV-38	E1Δs	EcoR I - BstE II	553/183	pvHCV-11A
pvHCV-39	E1Δb	EcoR I - BamH I	960/313	pgsATA-18
pvHCV-40	E1Δb.his	EcoR I - BamH I (K1)	960/323	pMS-66
pvHCV-41	E2bs	BamH I (K1)-AlwN I (T4)	1005/331	pgsATA-18
pvHCV-42	E2bs.his	BamH I (K1)-AlwN I (T4)	1005/341	pMS-66
pvHCV-43	E2ns	Nco I (K1) - AlwN I (T4)	932/314	pgsATA-18
pvHCV-44	E2ns.his	Nco I (K1) - AlwN I (T4)	932/321	pMS-66
pvHCV-62	E1s (type 3a)	EcoR I - Hind III	625/207	pgsATA-18
pvHCV-63	E1s (type 5)	EcoR I - Hind III	625/207	pgsATA-18
pvHCV-64	E2	BamH I - Hind III	1410/463	pgsATA-18
pvHCV-65	E1-E2	BamH I - Hind III	2072/691	pvHCV-10A
pvHCV-66	CORE-E1-E2	BamH I - Hind III	2427/809	pvHCV-33

nt : ヌクレオチド aa : アミノ酸

K1 : クレノウDNAポリメラーゼ充てん

T4 : T4 DNAポリメラーゼ充てん

位置 : HCVポリ蛋白配列中のアミノ酸の位置

【表 4】

第 1 表 (つづき) : 組換えワクシニアプラスミド及びウイルス

プラスミド名	名 称	H C V c D N A サブクローン構築物	長 さ (nt/aa)	挿入に用いた ベクター
pvHCV-81	E1*-GLY 1	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-82	E1*-GLY 2	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-83	E1*-GLY 3	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-84	E1*-GLY 4	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-85	E1*-GLY 5	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-86	E1*-GLY 6	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A

n t : ヌクレオチド a a : アミノ酸

K 1 : クレノウ DNA ポリメラーゼ充てん

T 4 : T 4 DNA ポリメラーゼ充てん

位置 : H C V ポリ蛋白配列中のアミノ酸の位置

【 0 2 1 6 】

【表 5】

第 2 表：抗 E 1 試験の要約

S/N $\pm$ SD(平均抗 E 1 力価)

	治療開始時	治療終了時	追 跡 時
LTR	6.94 $\pm$ 2.29 (1:3946)	4.48 $\pm$ 2.69 (1:568)	2.99 $\pm$ 2.69 (1:175)
NR	5.77 $\pm$ 3.77 (1:1607)	5.29 $\pm$ 3.99 (1:1060)	6.08 $\pm$ 3.73 (1:1978)

L T R : 1 年をこえる、長期的持続的応答

N R : 無応答、再発を有する応答又は部分的応答

【 0 2 1 7 】

【表 6】

第3表

競合試験のための合成ペプチド

蛋 白	ペプチド	ア ミ ノ 酸 配 列	位 置	配列番号	10
E1	E1-31	LLSCLTVPASAYQVRNSTGL	181-200	56	20
	E1-33	QVRNSTGLYHVTNDCPNSSI	193-212	57	
	E1-35	NDCPNSSIVYEAHDAILHTP	205-224	58	
	E1-35A	SNSSIVYEAADMIMHTPGCV	208-227	59	
	E1-37	HDAILHTPGCVPCVREGNVS	217-236	60	
	E1-39	CVREGNVSRCWVAMTPTVAT	229-248	61	
	E1-41	AMTPTVATRDKLPATQLRR	241-260	62	
	E1-43	LPATQLRRHIDLLVGSATLC	253-272	63	
	E1-45	LVGSATLCSALYVGDLCSGV	265-284	64	
	E1-49	QLFTFSPRRHWTQGCNCSI	289-308	65	
	E1-51	TQGCNCSIYPGHITGHRMAW	301-320	66	
	E1-53	ITGHRMAWDMMMWNWSPTAAL	313-332	67	
	E1-55	NWSPTAALVMAQLLRIPQAI	325-344	68	
	E1-57	LLRIPQAILDMIAGAHWGV	337-356	69	
	E1-59	AGAHWGVLAGIAYFSMVGNM	349-368	70	30
	E1-63	VVLLLFAGVDAETIVSGGQA	373-392	71	

【表 7】

E2-67	SGLVSLFTP GAKQNIQLINT	397-416	72	
E2-69	QNIQLINTNGSWHINSTALN	409-428	73	
E2-53B	LNCNESLNTGW WLAGLIYQHK	427-446	74	
E2-51B	AGLIYQHKFNSSGCPERLAS	439-458	75	
E2-1B	GCPERLASCRPLTDFDQGWG	451-470	76	
E2-3B	TDFDQGWGPISYANGSGPDQ	463-482	77	10
E2-5B	ANGSGPDQRPYCWHYPPKPC	475-494	78	
E2-7B	WHYPPKPCGIVPAKSVCGPV	487-506	79	
E2-9B	AKSVCGPVYCFTPSPVVVGT	499-518	80	
E2-11B	PSPVVVGTTDRSGAPTYSWG	511-530	81	
E2-13B	GAPTYSWGENDTDVFLNNT	523-542	82	
E2-17B	GNWFGCTWMNSTGFTKVC GA	547-566	83	
E2-19B	GFTKVC GAPPVCIGGAGNNT	559-578	84	
E2-21	IGGAGNNTLHCPTDCFRKHP	571-590	85	20
E2-23	TDCFRKHPDATYSRCGSGPW	583-602	86	
E2-25	SRCGSGPWITPRCLVDYPYR	595-614	87	
E2-27	CLVDYPYRLWHYPCTINYTI	607-626	88	
E2-29	PCTINYTIFKIRMYVGGVEH	619-638	89	
E2-31	MYVGGVEHRLEAACNWT PGE	631-650	90	
E2-33	ACNWT PGERCDLEDRDRSEL	643-662	91	
E2-35	EDRDRSELSPLLLTTTQWQV	655-674	92	30

【 0 2 1 9 】

【表 8】

第4表：エンベロープ抗体レベルの経時変化（完全な研究、28患者）

ウィルコクソン・サイン ド・ラング試験（P値）	E1Ab NR 全部	E1Ab NR 1 b 型	E1Ab NR 3 a 型	E1Ab LTR 全部	E1Ab LTR 1 b 型	E1Ab LTR 3 a 型	E1Ab LTR 全部	E2Ab NR 全部	E1Ab LTR 全部
治療終了時*	0.1167	0.2604	0.285	0.0058	0.043	0.0499	0.0186	0.0186	0.0610
6ヵ月追跡*	0.86	0.7213	0.5930	0.0047	0.043	0.063	0.04326	0.04326	0.0464
12ヵ月追跡*	0.7989	0.3105	1	0.0051	0.0679	0.0277	0.0869	0.0869	0.0058

*：データは、治療開始時に得た値と比較した

**：P値<0.05

第5表：L T RとN Rとの間の違い（完全な研究）

マシーイズニー Uテスト（P値）	E1Ab S/N 全部	E1Ab力価 全部	E1Ab S/N 1 b型	E1Ab S/N 3 a型	E2Ab S/N 全部
治療開始時*	0.0257		0.05	0.68	0.1078
治療終了時*	0.1742				0.1295
6ヵ月追跡*	1		0.6099	0.425	0.3081
12ヵ月追跡*	0.67		0.23	0.4386	0.6629

*：P値<0.05

第6表：マウスE2モノクローナル抗体間の競合実験

バイオチン化抗E2MAbの抗E2反応性の減少 (%)

競合物質 17H10F4D10 2F10H10 16A6E7 10D3C4 4H6B2 17C2F2 9G3E6 12D11F1 15C8C1 8G10D1H9

17H10F4D10	62	10	ND	11	ND	5	6	30	ND
2F10H10	90	1	ND	30	ND	0	4	12	ND
16A6E7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10D3C4	11	50	92	94	26	28	43	53	30
4H6B2	ND	ND	82	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17C2F2	2	ND	75	56	ND	11	10	0	0
9G3E6	ND	ND	68	11	ND	ND	60	76	ND
12D11F1	ND	ND	26	13	ND	ND	ND	88	ND
15C8C1	ND	ND	18	10	ND	ND	ND	ND	ND
8G10D1H9	2	11	ND	15	ND	67	082	81	ND

競合物質対照

15B7A2	0	9	15	10	9	0	0	0	5
5H6A7	0	0	12	8	0	0	4	0	0
23C12H9	ND	2	12	ND	4	ND	ND	ND	2

ND：実施せず

第7表：プライマー

配列番号 96	GPT	5'-GTTTAACCACTGCATGATG-3'
配列番号 97	TK _n	5'-GTCCCATCGAGTGGGCTAC-3'
配列番号 98	GLY1	5'-CGTGACATGGTACAT <u>TCGGGACAC</u> TTGGCGCACTTCATAAGCGGA-3'
配列番号 99	GLY2	5'-TGCCTCATACACAA <u>TGGAGCTCTGGGACGAGTCGTT</u> CGTGAC-3'
配列番号 100	GLY3	5'-TACCCAGCAGCGGGAGC <u>ICTGT</u> TTGCTCCCCGAACGCAGGGCAC-3'
配列番号 101	GLY4	5'-TGTCGTGGTGGGACGGAGGGCC <u>TGCC</u> TAGCTGCGAGCGTGGG-3'
配列番号 102	GLY5	5'-CGTTATGTGGCCCGGTAGATTGAGCACTGGCAGTCCCTGCACCCGTCTC-3'
配列番号 103	GLY6	5'-CAGGGCCGTTGTAGGCC <u>CTCC</u> ACTGCATCATCATATCCCAAGC-3'
配列番号 104	OVR1	5'- <u>CCGGAATGT</u> ACCATGTCACGAACGAC-3'
配列番号 105	OVR2	5'- <u>GC</u> TCATTGTGTATGAGGCAGCGG-3'
配列番号 106	OVR3	5'- <u>GAGCTCCCGCTGCTGGGTAGCGC</u> -3'
配列番号 107	OVR4	5'- <u>CC</u> TCCTCCCAACCAACGACAATACG-3'
配列番号 108	OVR5	5'-CTACCCGGGGCCACATAACGGGTCACCCG-3'
配列番号 109	OVR6	5'-GGAGGCC <u>CTACA</u> ACGGCCCTGGTGG-3'
配列番号 110	GPT-2	5'-TTCTATCGATTAAATAGAAATTC -3'
配列番号 111	TK _n -2	5'-GCCATACGCTCACAGCCGATCCCC-3'

下線付きのヌクレオチドは、付加的な制限部位を表す。
太字のヌクレオチドは、元のHCC110A配列に関して突然変異を表す。

【表 1 2】

第8表：E L I S AによるE1 グリコシル化突然変異体の解析

血 清																			
SN GLY1	SN GLY2	SN GLY3	SN GLY4	SN GLY5	SN GLY6	SN E1	SN GLY1	SN GLY2	SN GLY3	SN GLY4	SN GLY5	SN GLY6	SN E1	SN GLY1	SN GLY2	SN GLY3	SN GLY4	SN GLY5	SN GLY6
1.802462	2.120971	1.403871	1.205597	2.120191	2.066913	1.950345	1.866103	1.730193	2.468162	1.220654	1.629403	1.629403	1.629403	1.629403	1.629403	1.629403	1.629403	1.629403	1.629403
2.400795	1.76010	2.325495	2.639300	2.459019	5.043993	2.146302	1.595477	1.608973	2.402212	1.467502	2.070524	2.070524	2.070524	2.070524	2.070524	2.070524	2.070524	2.070524	2.070524
1.642718	1.715477	2.261646	2.354748	1.591810	4.033742	1.96692	1.402099	1.602222	2.191550	1.464216	1.721164	1.721164	1.721164	1.721164	1.721164	1.721164	1.721164	1.721164	1.721164
2.570154	3.824038	3.074605	1.499307	3.15	4.71302	4.190751	3.959542	3.710507	5.170841	4.250784	3.955153	3.955153	3.955153	3.955153	3.955153	3.955153	3.955153	3.955153	3.955153
2.402051	1.793761	2.409344	2.627358	1.715311	4.964765	2.13912	1.576336	1.708937	3.021807	1.562092	2.07270	2.07270	2.07270	2.07270	2.07270	2.07270	2.07270	2.07270	2.07270
2.031487	1.495737	2.131613	2.527925	2.494033	4.784027	2.02069	1.496409	1.704976	2.677757	1.529608	1.744221	1.744221	1.744221	1.744221	1.744221	1.744221	1.744221	1.744221	1.744221
2.828205	2.227036	2.512792	2.790881	3.131579	4.869128	2.287753	1.954198	1.805556	2.616822	1.55719	2.593086	2.593086	2.593086	2.593086	2.593086	2.593086	2.593086	2.593086	2.593086
計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計
S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N	S/N
59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534	59.80534
69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243	69.65243
2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185	2.902185
2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447	2.507447
4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076	4.279076
2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046	2.806046
2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075	2.555075
3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195	3.189195

血 清																			
GLY1/E1	GLY2/E1	GLY3/E1	GLY4/E1	GLY5/E1	GLY6/E1	GLY1/E1	GLY2/E1	GLY3/E1	GLY4/E1	GLY5/E1	GLY6/E1	GLY1/E1	GLY2/E1	GLY3/E1	GLY4/E1	GLY5/E1	GLY6/E1	GLY1/E1	GLY2/E1
0.637316	0.848876	0.580834	0.911587	0.877607	0.718296	0.431977	0.94569	0.84373	0.537245	0.941408	0.90578	0.677036	0.94569	0.84373	0.537245	0.941408	0.90578	0.677036	0.94569
0.55869	0.925463	0.900053	1.541952	0.958831	0.848305	0.508794	1.035913	0.992733	1.005882	1.019642	0.982522	0.677036	1.035913	0.992733	1.005882	1.019642	0.982522	0.677036	1.035913
0.852516	0.93017	0.859761	1.835317	0.935031	0.806641	0.052516	0.816436	0.758410	2.026172	0.806641	0.765781	0.954961	0.816436	0.758410	2.026172	0.806641	0.765781	0.954961	0.816436
0.94319	0.94056	0.837480	1.976	1.154762	1.003140	0.950261	0.935431	0.887305	2.05505	0.946488	0.902288	0.94319	0.935431	0.887305	2.05505	0.946488	0.902288	0.94319	0.935431
0.783002	0.790232	0.663547	1.524798	0.799102	0.672435	0.620171	0.790232	0.663547	1.524798	0.799102	0.672435	0.620171	0.790232	0.663547	1.524798	0.799102	0.672435	0.620171	0.790232
計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計	計
E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#	E1/GLY#
19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524	19.36524
0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628	0.957628
0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990	0.915990
0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314	0.675314
1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170	1.392170
0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042	0.919042
0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919	0.962919

10

20

30

40

【表 1 3】

参 考 文 献

- Bailey, J. and Cole, R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1733-1739.
- Ballou, L., Hitzeman, R., Lewis, M. & Ballou, C. (1991) PNAS 88, 3209-3212.
- Benesch, R., Benesch, R.E., Gutcho, M. & Lanfer, L. (1956) Science 123, 981. 10
- Cavins, J. & Friedman. (1970) Anal. Biochem. 35, 489.
- Cleland, W. (1964) Biochemistry 3, 480
- Creighton, E. (1988) BioEssays 8, 57
- Darbre, A., John Wiley & Sons Ltd. (1987) Practical Protein Chemistry - A Handbook. 20
- Darbre, A., John Wiley & Sons Ltd. (1987) Practical Proteinchemistry p.69-79.
- Doms et al, (1993), Virology 193, 545-562.
- Ellman, G. (1959) Arch. Biochem. Biohys. 82, 70. 30
- Falkner, F. & Moss, B. (1988) J. Virol. 62, 1849-1854.
- Friedman, M. & Krull. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 630.
- Gallagher J. (1988) J. Cell Biol. 107, 2059-2073. 40
- Glazer, A., Delange, R., Sigman, D. (1975) North Holland publishing company, Elsevier, Biomedical. Part : Modification of protein (p. 116).
- Graham, F. & van der Eb, A. (1973) Virology 52, 456-467.
- Grakoui et al. (1993) Journal of Virology 67:1385-1395.

【 0 2 2 5 】

【表 1 4】

- Grasseti, D. & Murray, J. (1969) *Analyt. Chim. Acta.* 46, 139.
- Grasseti, D. & Murray, J. (1967) *Arch. Biochem Biophys.* 119, 41.
- Helenius, *Mol. Biol. Cell* (1994), 5: 253-265.
- Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M. & Shimotohno, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88(13):5547-51. 10
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., Stüber, D. (1988) *Biochemistry* 88, 8976.
- Hsu, H., Donets, M., Greenberg, H. & Feinstone, S. (1993) *Hepatology* 17:763-771. 20
- Inoue, Y., Suzuki, R., Matsuura, Y., Harada, S., Chiba, J., Watanabe, Y., Saito, I. & Miyamura, T. (1992) *J. Gen. Virol.* 73:2151-2154.
- Janknecht, R., de Martynoff, G. *et al.*, (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8972-8976.
- Kayman (1991) *J. Virology* 65, 5323-5332. 30
- Kato, N., Oostuyama, Y., Tanaka, T., Nakagawa, M., Muraio, K., Ohkoshi, S., Hijikata, M., Shimitohno, K. (1992) *Virus Res.* 22:107-123.
- Kniskern, P., Hagopian, A., Burke, P., Schultz, L., Montgomery, D., Hurni, W., Yu Ip, C., Schulman, C., Maigetter, R., Wampler, D., Kubek, D., Sitrin, R., West, D., Ellis, R., Miller, W. (1994) *Vaccine* 12:1021-1025. 40
- Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Maki, N., Asano, K., Yoshizawa, K., Miki, K., Tanaka, S., Hattori, N., Matsuura, Y., Saito, I., Miyamura, T. & Nomoto, A. (1992) *J. Gen. Virol.* 73:2313-2318.
- Mackett, M., Smith, G. & Moss, B. (1985) In: 'DNA cloning: a practical approach' (Ed. Glover, D.) IRL Press, Oxford.

【表 1 5】

Mackett, M., & Smith, G. (1986) J. Gen. Virol. 67, 2067-2082.

Mackett, M., Smith, G. & Moss, B. (1984) J. Virol. 49, 857-864.

Mackett, M., Smith, G. & Moss, B. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7415-7419.

10

Means, G. (1971) Holden Day, Inc.

Means, G. & Feeney, R. (1971) Holden Day p.105 & p. 217.

Mita, E., Hayashi, N., Ueda, K., Kasahara, A., Fusamoto, H., Takamizawa, A., Matsubara, K., Okayama, H. & Kamada T. (1992) Biochem. Biophys. Res. Comm. 183:925-930.

20

Moore, S. (1963) J. Biol. Chem. 238, 235-237.

Okamoto, H., Okada, S., Sugiyama, Y., Yotsumoto, S., Tanaka, T., Yoshizawa, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1990) Jpn. J. Exp. Med. 60:167-177.

Panicali & Paoletti (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4927-4931.

30

Piccini, A., Perkus, M. & Paoletti, E. (1987) Meth. Enzymol. 153, 545-563.

Rose (1988) Annu. Rev. Cell Biol. 1988, 4: 257-288;

Ruegg, V. and Rudinger, J. (1977) Methods Enzymol. 47, 111-116.

Shan, S. & Wong (1993) CRC-press p. 30-33.

40

Spaete, R., Alexander, D., Rugroden, M., Choo, Q., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Leng, S., Lee, C., Ralston, R., et al. (1992) Virology 188(2):819-30.

Skehel, J., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1179-1783.

【表 1 6】

Stunnenberg, H., Lange, H., Philipson, L., Miltenburg, R. & van der Vliet, R. (1988)
Nucl. Acids Res. 16, 2431-2444.

Stuyver, L., Van Arnhem, W., Wyseur, A., DeLeys, R. & Maertens, G. (1993a)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 192, 635-641.

Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A., Duhamel, M., Vanderborght, B., Van
Heuverswyn, H., & Maertens, G. (1993b) J. Gen. Virol. 74, 1093-1102.

Stuyver, L., Van Arnhem, W., Wyseur, A., Hernandez, F., Delaporte, E., Maertens,
G. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10134-10138.

Weil, L. & Seibler, S. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 95, 470.

Yokosuka, O., Ito, Y., Imazeki, F., Ohto, M. & Omata, M. (1992) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 189:565-571.

Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K, Ts'o P (1979) Biochemistry
18:5134-43.

Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1991) Science 254:1497-500.

Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1993) Nucleic-Acids-Res. 21:197-200.

Asseline U, Delarue M, Lancelot G, Toulme F, Thuong N (1984) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 81:3297-301.

Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen J, Broder S (1987)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7706-10.

【図面の簡単な説明】

【 0 2 2 8 】

【図 1】プラスミド p g p t A T A 1 8 の制限地図。

【図 2】プラスミド p g s A T A 1 8 の制限地図。

【図 3】プラスミド p M S 6 6 の制限地図。

【図 4】プラスミド p v H C V - 1 1 A の制限地図。

【図 5】I F N 治療に対する無応答者の抗 E 1 レベル。

【図 6】I F N 治療に対する応答者の抗 E 1 レベル。

【図 7】I F N 治療に完全に応答した患者の抗 E 1 レベル。

【図 8】IFN 治療に対する不完全応答者の抗 E 1 レベル。

【図 9】IFN 治療に対する無応答者の抗 E 2 レベル。

【図 10】IFN 治療に対する応答者の抗 E 2 レベル。

【図 11】IFN 治療に対する不完全応答者の抗 E 2 レベル。

【図 12】IFN 治療に対する完全応答者の抗 E 2 レベル。

【図 13】ペプチドと競合したヒト抗 E 1 反応性。

【図 14】抗 E 1 モノクローナル抗体の、ペプチドとの反応性の競合。

【図 15】IFN 治療に対する無応答者の抗 E 1 (エピトープ 1) レベル。

【図 16】IFN 治療に対する応答者の抗 E 1 (エピトープ 1) レベル。

【図 17】IFN 治療に対する無応答者の抗 E 1 (エピトープ 2) レベル。

10

【図 18】IFN 治療に対する応答者の抗 E 1 (エピトープ 2) レベル。

【図 19】抗 E 2 モノクローナル抗体の、ペプチドとの反応性の競合。

【図 20】ペプチドと競合したヒト抗 E 2 反応性。

【図 21A】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

【図 21B】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

20

【図 21C】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

【図 21D】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

【図 21E】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

30

【図 21F】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

【図 21G】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

40

【図 21H】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

【図 21I】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる (配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される)。

【図 21J】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配

50

列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる（配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される）。

【図 21K】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる（配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される）。

【図 21L】本発明の核酸配列。本発明の E 1 又は E 2 蛋白をコードする核酸配列は、配列表に示すように、各 E 1 又は E 2 蛋白のアミノ酸配列に翻訳されうる（配列番号 3 ~ 13、21 ~ 31、35 及び 41 ~ 49 は、残基番号 1 から開始する読み枠で翻訳され、配列番号 37 ~ 39 は、残基番号 2 から開始する読み枠で翻訳される）。 10

【図 22】vvHCV39 (1b 型)、vvHCV40 (1b 型)、vvHCV62 (3a 型)、及び vvHCV63 (5a 型) に感染した細胞溶解物の 4 つの異なる E 1 精製物の、レンチルレクチンクロマトグラフィー溶出画分から得られた ELISA 結果。

【図 23】第 22 図に示した値に基づく、4 つの異なる E 1 構築物の、レンチルレクチンクロマトグラフィーから得られた溶出プロフィール。

【図 24】第 vvHCV39 (1b 型)、vvHCV40 (1b 型)、vvHCV62 (3a 型)、及び vvHCV63 (5a 型) に感染した細胞溶解物の 4 つの異なる E 1 精製物の、ゲル濾過クロマトグラフィー後に得られた画分の ELISA 結果。

【図 25】1b 型 (1)、3a 型 (2) 及び 5a (3) 型 (それぞれ vvHCV39、vvHCV62 及び vvHCV63 に感染した RK13 細胞からのもの；レンチルレクチンで精製し、実施例 5.2 ~ 5.3 のように還元した) の E 1 蛋白の精製物、及び標準物質 (4) から得られたプロフィール。「1」、「2」、「3」と記したピークは、純粋な E 1 蛋白ピークを示す (第 24 図を参照、主に画分 26 ~ 30 に E 1 反応性)。 20

【図 26】E 1 vvHCV40 (1b 型) (レーン 1)、第 25 図に示す画分 10 ~ 17 を示す vvHCV40 のゲル濾過のプール 1 (レーン 2)、第 25 図に示す画分 18 ~ 25 を示す vvHCV40 のゲル濾過のプール 2 (レーン 3) 及び E 1 プール (画分 26 ~ 30) (レーン 4) の未処理溶解物の、実施例 4 に記載した SDS-PAGE の銀染色。

【図 27】E 1 構築物 39 (1b 型) 及び 62 (3a 型) のゲル濾過の画分のストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプロット。蛋白は NEM-ビオチンで標識した。レーン 1：開始ゲル濾過構築物 39、レーン 2：画分 26 構築物 39、レーン 3：画分 27 構築物 39、レーン 4：画分 28 構築物 39、レーン 5：画分 29 構築物 39、レーン 6：画分 30 構築物 39、レーン 7：画分 31 構築物 39、レーン 8：分子量マーカー、レーン 9：開始ゲル濾過構築物 62、レーン 10：画分 26 構築物 62、レーン 11：画分 27 構築物 62、レーン 12：画分 28 構築物 62、レーン 13：画分 29 構築物 62、レーン 14：画分 30 構築物 62、レーン 15：画分 31 構築物 62。 30

【図 28】第 26 図と同一条件下で実施した vvHCV-39 (E1s、1b 型) 及び vvHCV-62 (E1s、3a 型) のゲル濾過画分の SDS-PAGE ゲルの銀染色。レーン 1：開始ゲル濾過構築物 39、レーン 2：画分 26 構築物 39、レーン 3：画分 27 構築物 39、レーン 4：画分 28 構築物 39、レーン 5：画分 29 構築物 39、レーン 6：画分 30 構築物 39、レーン 7：画分 31 構築物 39、レーン 8：分子量マーカー、レーン 9：開始ゲル濾過構築物 62、レーン 10：画分 26 構築物 62、レーン 11：画分 27 構築物 62、レーン 12：画分 28 構築物 62、レーン 13：画分 29 構築物 62、レーン 14：画分 30 構築物 62、レーン 15：画分 31 構築物 62。 40

【図 29】精製操作の完全な概要を与える、抗 E 1 マウスモノクローナル抗体 5E1A10 によるウェスタンブロット解析。レーン 1：粗溶解物、レーン 2：レンチルクロマトグラフィーのフロースルー (flow through)、レーン 3：レンチルクロマトグラフィー後のエンピゲン BB による洗浄物、レーン 4：レンチルクロマトグラフィーの溶出物、レーン 5：レンチル溶出物の濃縮中のフロースルー (flow through)、レーン 6：サイズ排除クロマトグラフィー (ゲル濾過) 後の E 1 のプール。 50

【図30】vvHCV44に感染したRK13細胞からのE2蛋白のレンチルレクチンクロマトグラフィーのOD₂₈₀ プロフィール（連続の線）。点線は、ELISAで検出したE2反応性を示す（実施例6のように）。

【図31A】vvHCV44に感染したRK13細胞からのE2蛋白プールのレンチルレクチンゲル濾過クロマトグラフィーのOD₂₈₀ プロフィール（連続の線）。E2プールは、直ちにゲル濾過カラムに適用した（非還元条件）。点線は、ELISAで検出したE2反応性を示す（実施例6のように）。

【図31B】vvHCV44に感染したRK13細胞からのE2蛋白プールのレンチルレクチンゲル濾過クロマトグラフィーのOD₂₈₀ プロフィール（連続の線）。E2プールは、実施例5.3に示すように還元し、保護した（還元条件）。点線は、ELISAで検出したE2反応性を示す（実施例6のように）。 10

【図32】第31B図に示す還元条件下でゲル濾過後の、vvHCV44から発現されたE2蛋白のNi²⁺-IMACクロマトグラフィー及びELISA反応性。

【図33】第32図に示すNi²⁺-IMACクロマトグラフィーの、200mMイミダゾール溶出工程（レーン2）と30mMイミダゾール洗浄（レーン1）により回収された、精製されたE2蛋白0.5μgのSDS-PAGEの銀染色。

【図34】イミダゾールを除去することを目的とした、第33図に示す200mMイミダゾールにより回収した精製E2蛋白の脱塩工程のODプロフィール。

【図35A】治療中及び治療後6～12カ月間にわたり追跡した、LIAスキャン（LIA scan）法で測定した、NRとLTRの異なるHCV抗原（コア1、コア2、E2HCVR、NS3）に対する抗体レベル。平均値は、白四角の曲線で示してある。 20

【図35B】治療中及び治療後6～12カ月間にわたり追跡した、LIAスキャン（LIA scan）法で測定した、NRとLTRの異なるHCV抗原（NS4、NS5、E1及びE2）に対する抗体レベル。平均値は、白四角の曲線で示してある。

【図36】LTR群及びNR群の平均E1抗体（E1Ab）及びE2抗体（E2Ab）レベル。

【図37】無応答者（NR）及び長期応答者（LTR）の1b型及び3a型の平均E1抗体（E1Ab）レベル。

【図38】抗E2モノクローナル抗体の地図上の相対的位置。

【図39】HCVのE1エンベロープ蛋白の部分的グリコシル化。製造業者の指示に従い、vvHCV10A感染RK13細胞の溶解物を、異なる濃度のグリコシダーゼとインキュベートした。右のパネル：グリコペプチダーゼF（PNGase F）。左のパネル：エンドグリコシダーゼH（Endo H）。 30

【図40】HCVのE2エンベロープ蛋白の部分的グリコシル化。製造業者の指示に従い、vvHCV64感染（E2）及びvvHCV41感染（E2s）RK13細胞の溶解物を、異なる濃度のグリコペプチダーゼF（PNGase F）とインキュベートした。

【図41】HCVのE1糖蛋白のインビトロ突然変異誘発。突然変異した配列の地図と、新しい制限部位の作成。

【図42A】HCVのE1糖蛋白のインビトロ突然変異誘発（第1部）。PCR増幅の第1段階。 40

【図42B】HCVのE1糖蛋白のインビトロ突然変異誘発（第2部）。重複伸長とネストPCR（nested PCR）。

【図43】HCVのE1糖蛋白のインビトロ突然変異誘発。増幅の第1段階で合成されたPCRで突然変異させた断片（GLY-#及びOVR-#）の地図。

【図44A】HeLa細胞（左）及びRK13細胞（右）中で発現されたE1糖蛋白突然変異体のウェスタンブロット解析。レーン1：野生型VV（ワクシニアウイルス）、レーン2：元々のE1蛋白（vvHCV-10A）、レーン3：E1突然変異体Gly-1（vvHCV-81）、レーン4：E1突然変異体Gly-2（vvHCV-82）、レーン5：E1突然変異体Gly-3（vvHCV-83）、レーン6：E1突然変異体Gly-4（vvHCV-84）、レーン7：E1突然変異体Gly-5（vvHCV-85） 50

)、レーン8:E1突然変異体Gly-6(vvHCV-86)。

【図44B】PCR増幅/制限切断によるE1グリコシル化突然変異体ワクシニアウイルスの分析。レーン1:E1(vvHCV-10A)、BspEI、レーン2:E1.Gly-1(vvHCV-81)、BspEI、レーン4:E1(vvHCV-10A)、SacI、レーン5:E1.Gly-2(vvHCV-82)、SacI、レーン7:E1(vvHCV-10A)、SacI、レーン8:E1.Gly-3(vvHCV-83)、SacI、レーン10:E1(vvHCV-10A)、StuI、レーン11:E1.Gly-4(vvHCV-84)、StuI、レーン13:E1(vvHCV-10A)、SmaI、レーン14:E1.Gly-5(vvHCV-85)、SmaI、レーン16:E1(vvHCV-10A)、StuI、レーン17:E1.Gly-6(vvHCV-86)、StuI、レーン3-6-9-12-15:低分子量マーカー、pBluescript SK+、MspI。

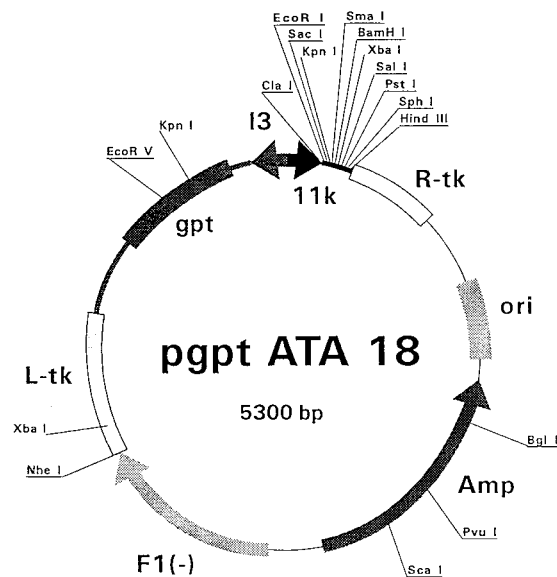
10

【図45】S・セレビスエ(*S. cerevisiae*)で発現させた組換えE2のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動。接種物は、ロイシン選択培地中で72時間増殖させ、完全培地で1/15希釈した。28℃で10日間培養後、培地試料を採取した。スピードバック(speedvac)で濃縮した培養上澄液200μlの相当量をゲルにのせた。2つの独立の形質転換体を分析した。

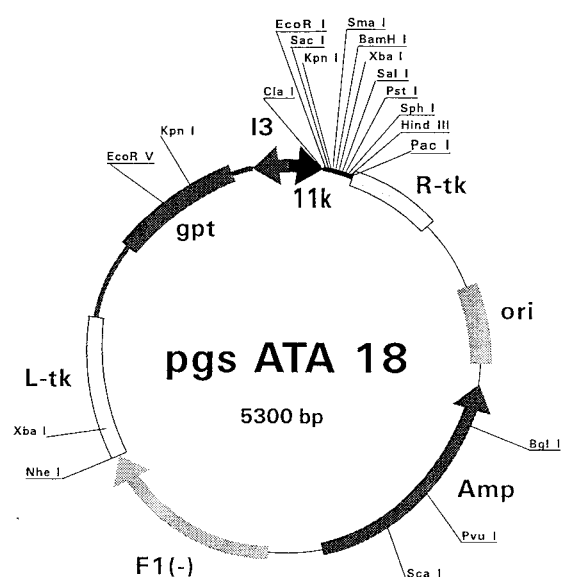
【図46】グリコシル化欠損S・セレビスエ(*S. cerevisiae*)突然変異体で発現させた組換えE2のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。接種物は、ロイシン選択培地中で72時間増殖させ、完全培地で1/15希釈した。28℃で10日間培養後、培地試料を採取した。イオン交換クロマトグラフィーで濃縮した培養上澄液の350μlの相当量をゲルにのせた。

20

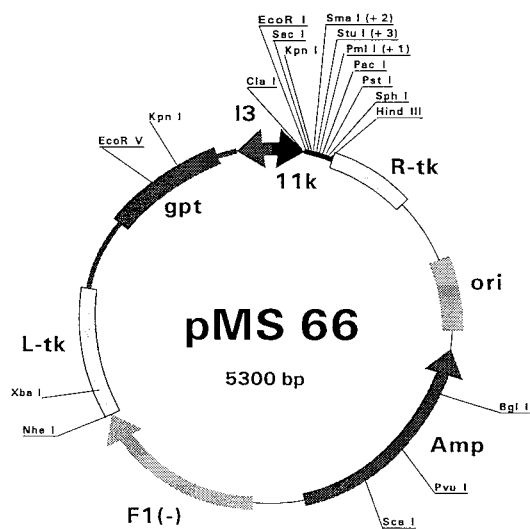
【図1】



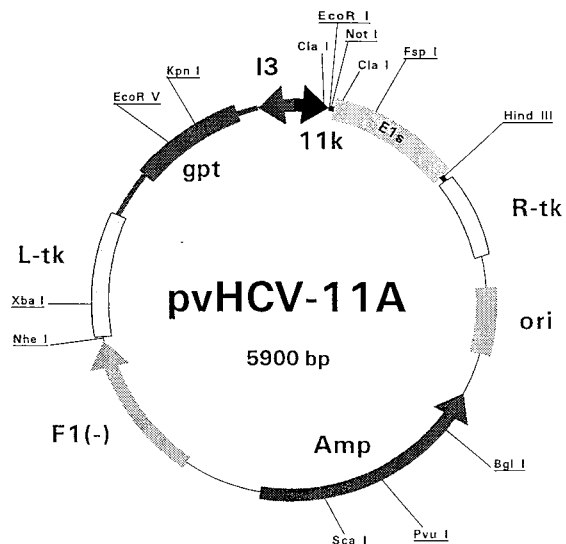
【図2】



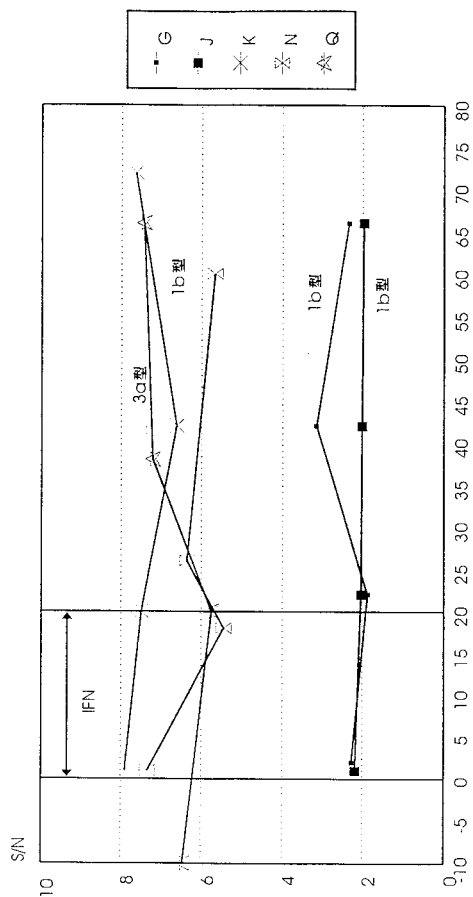
【図 3】



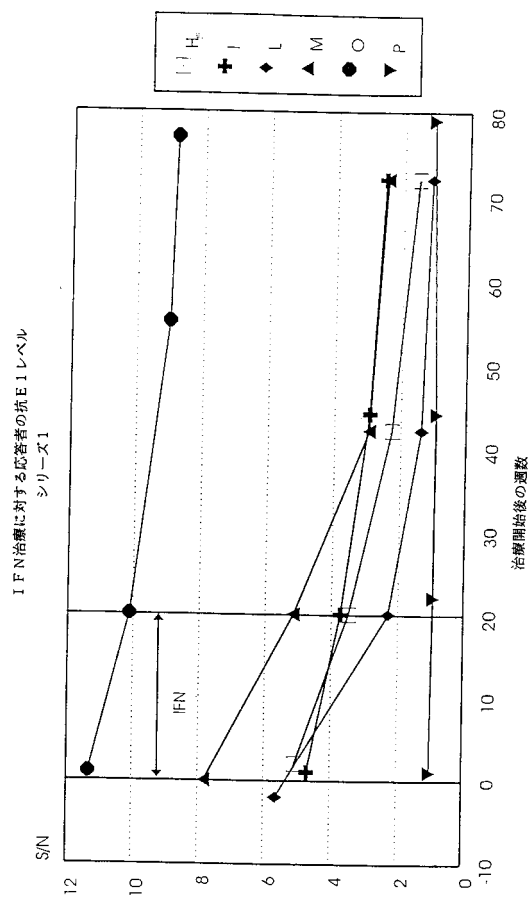
【図 4】



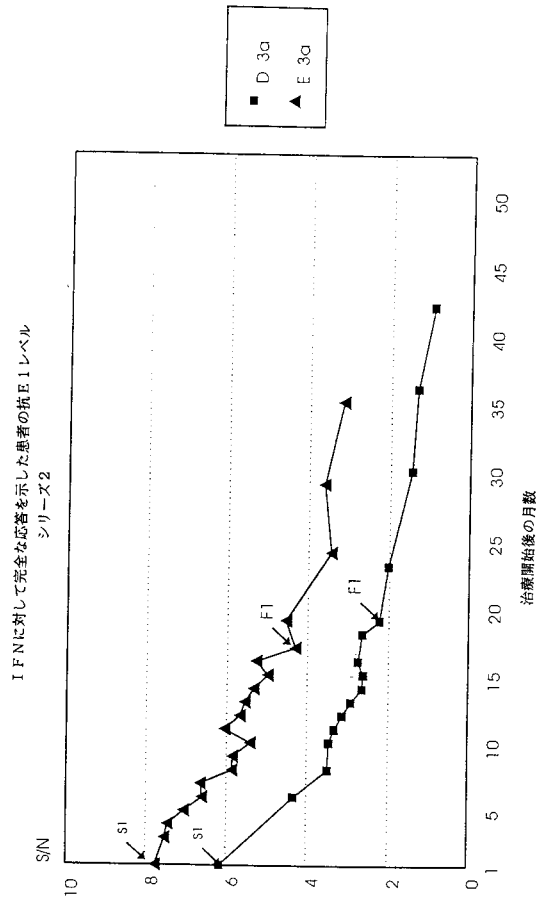
【図 5】



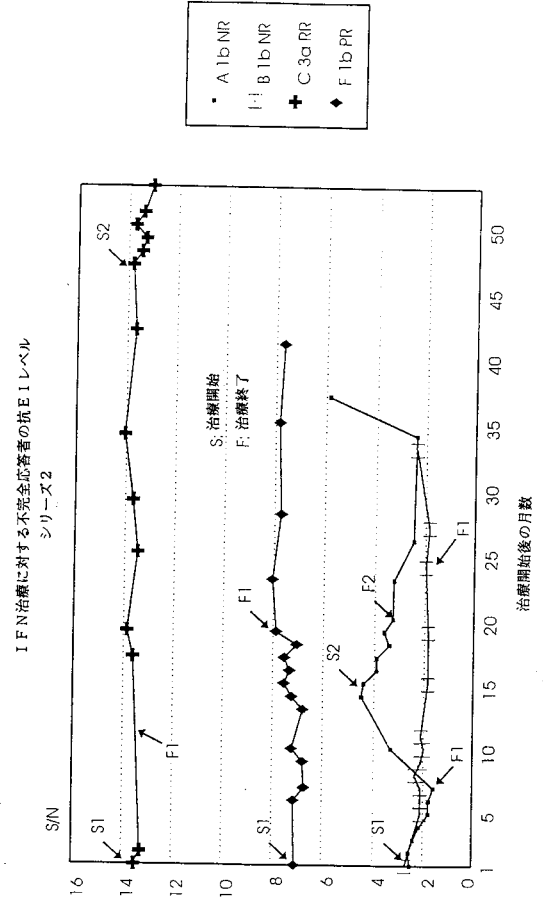
【図 6】



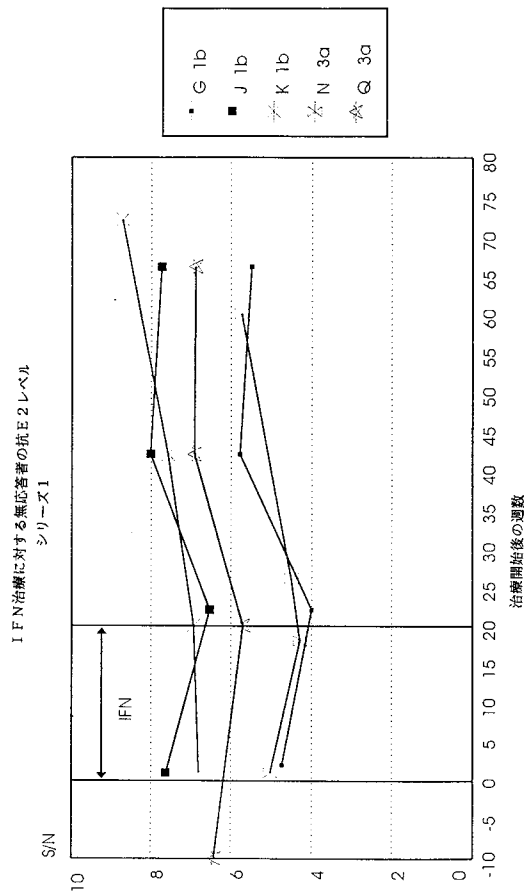
【図 7】



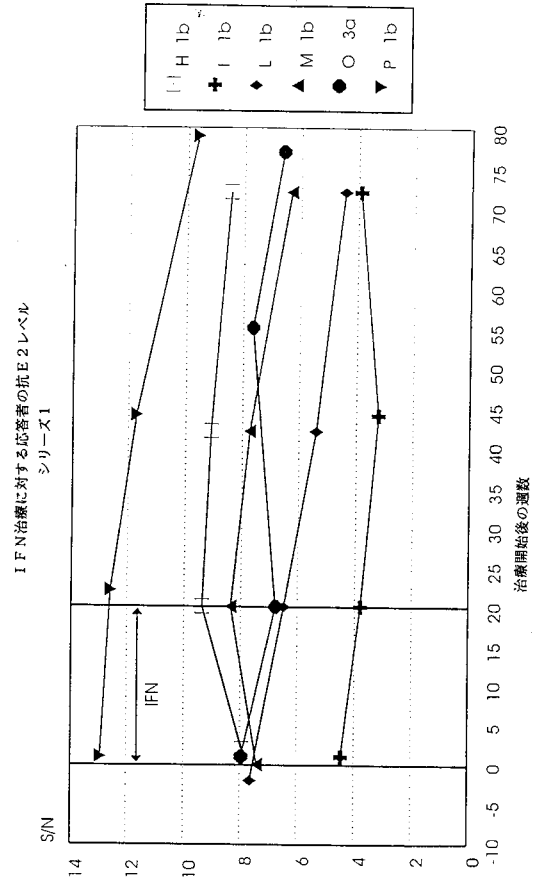
【図 8】



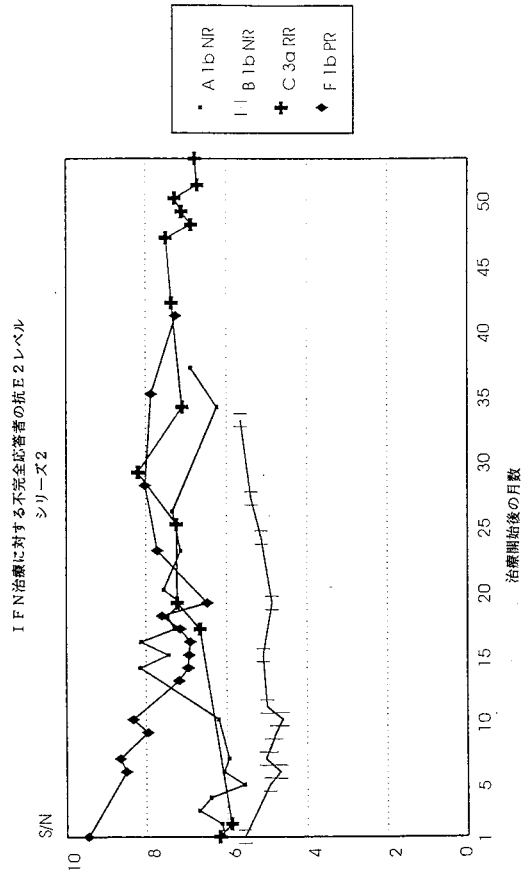
【図 9】



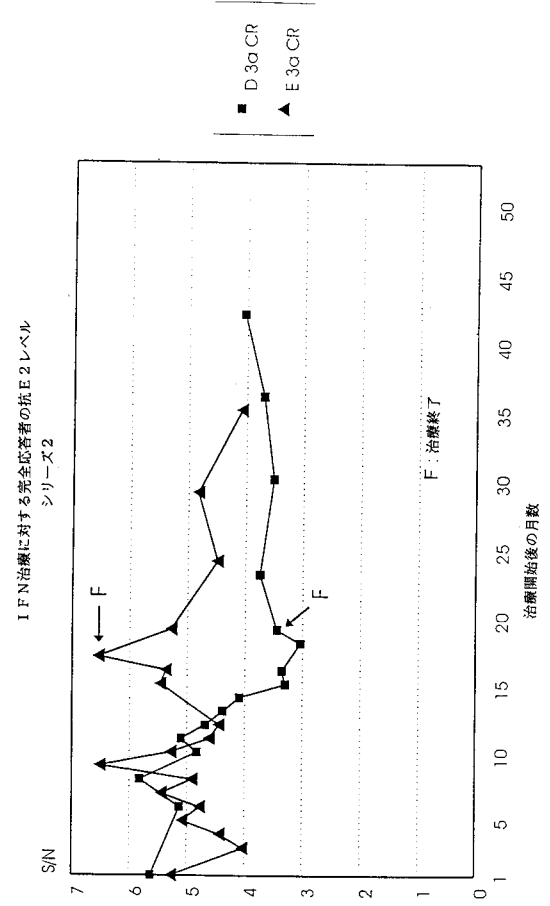
【図 10】



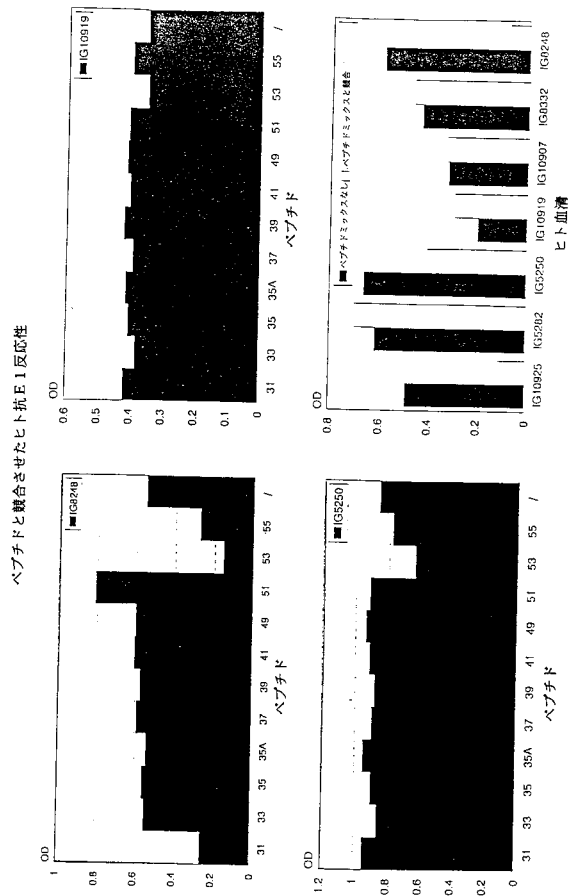
【図 1 1】



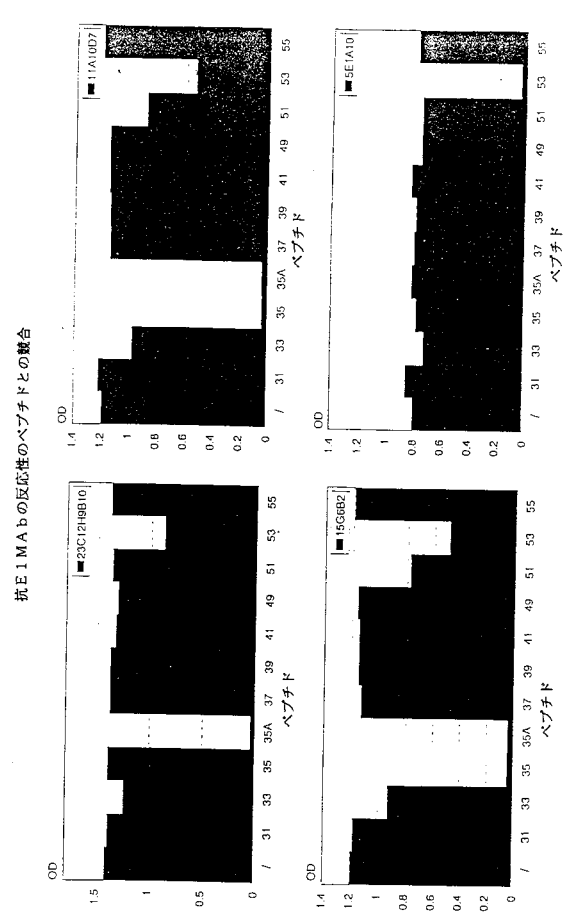
【図 1 2】



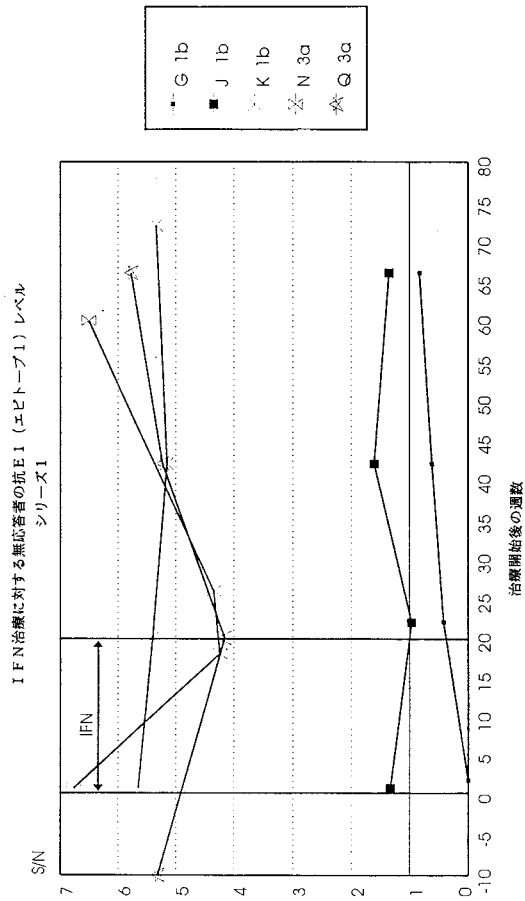
【図 1 3】



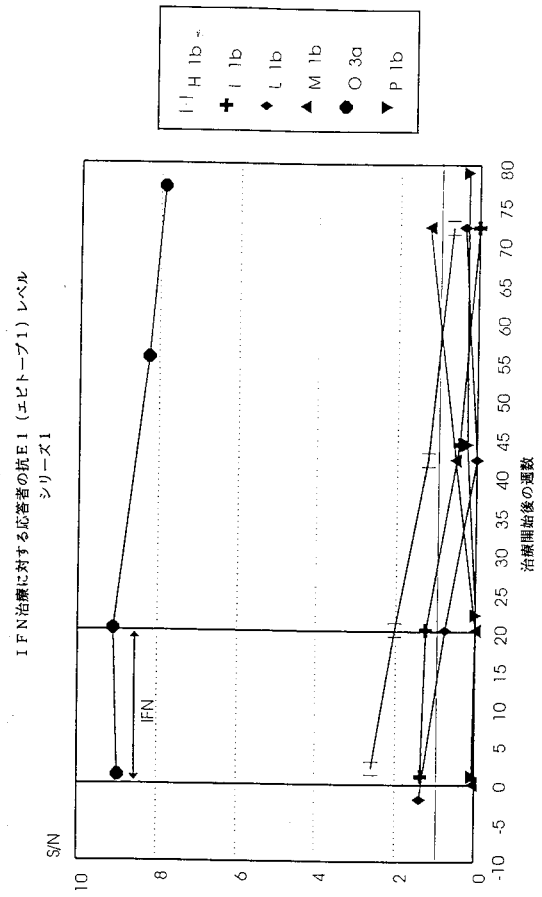
【図 1 4】



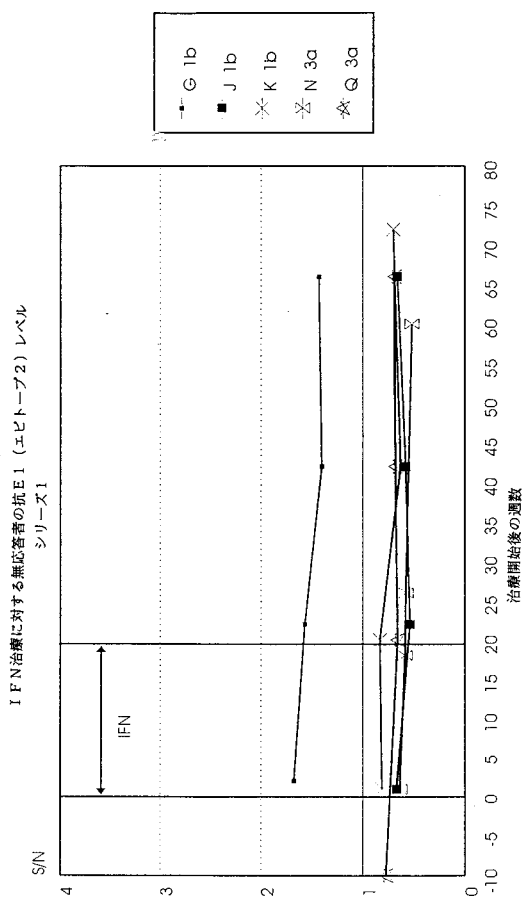
【図 15】



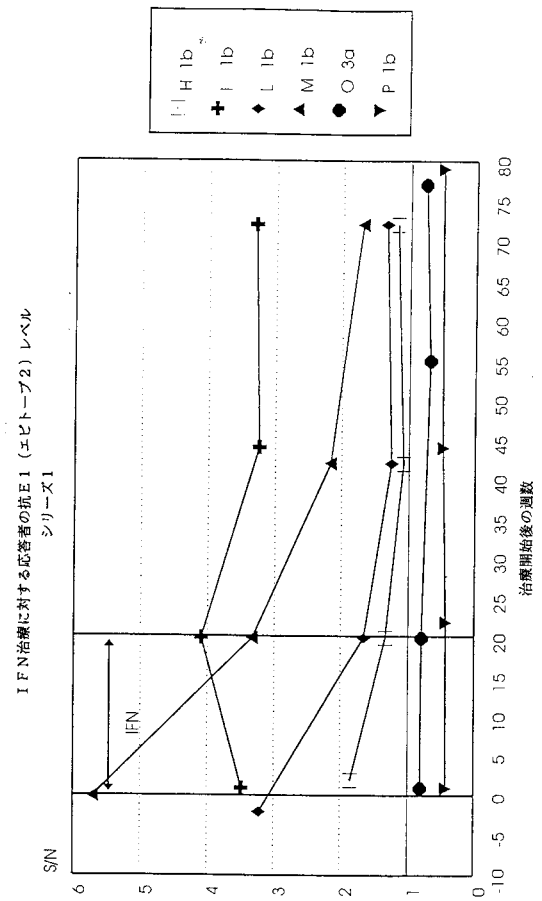
【図 16】



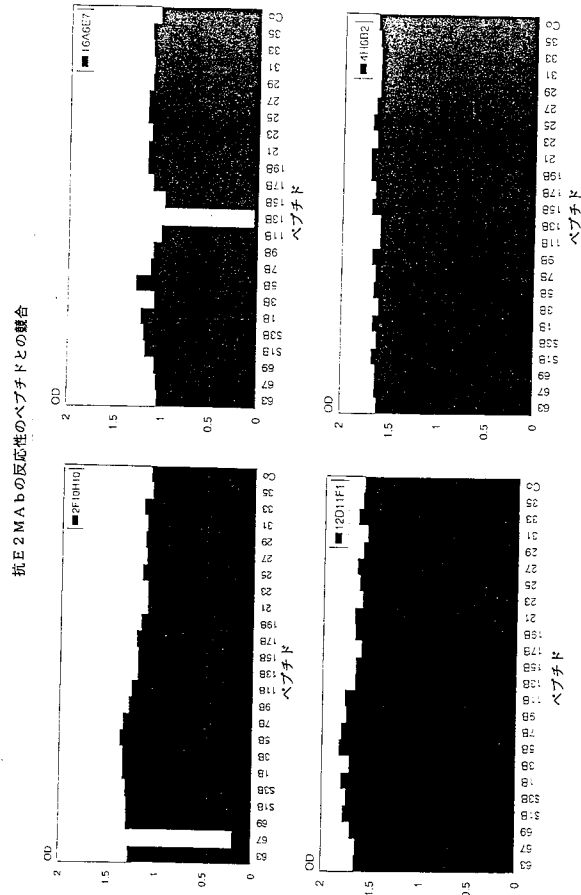
【図 17】



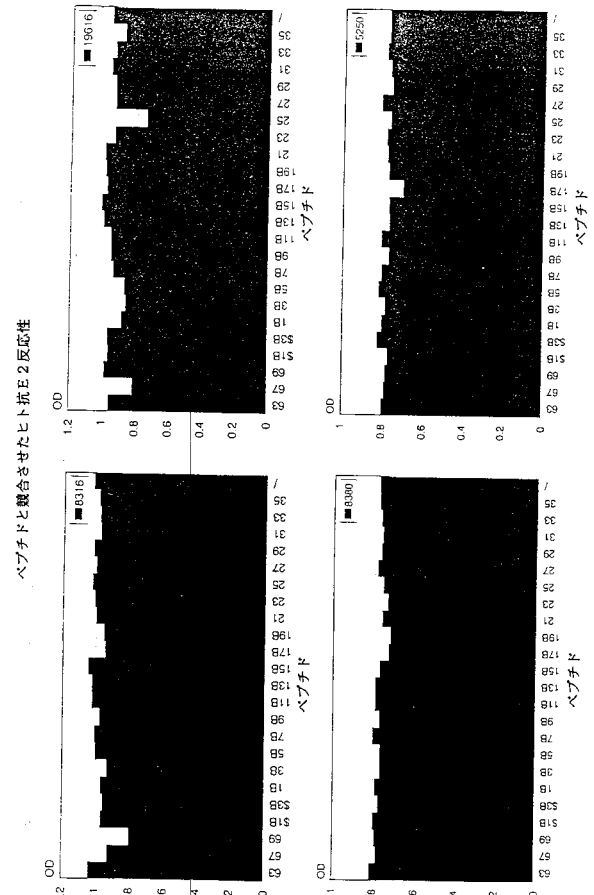
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【図 21 A】

5' GGCAATGCAAGCTTAATTAATT3' (配列番号 1)

3'ACGTCCGTACGTTGCAATTAATTAATCGA5' (配列番号 94)

5'CCGGGAGGCGCTGCACGTGATCGAGGCGACACCATCACCACCATCACTAATAGT
TAATTAAGTCA 3' (配列番号 2)

3'CCTCCGACGTGCACTAGCTCCCGTCTGGTAGTGGTGGTAGTGATTCAATTAAATT
5' (配列番号 95)

配列番号 3 (HCC19A)

ATGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCTCTGGCTTTACTGTCCTGTCTGACCATCCCA
GCTTCCGCTTATGAGGTGCGCAACGTGTCCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCT
CCAACCTCAAGCATTGTGTATGAGGACGGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGCT
GCCCTGCGTTCCGGGAGAACAACCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACGCTC
GCAGCTAGGAAGCCAGCGTCCCCACCAAGACAATACGACGCCACGTGATTTGCTCG
TTGGGGCGGCTGCTCTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGATCTCTGCGGATCTGTCTTC
CTCGTCTCCAGCTGTTCAACATCTCGCTCGCCGCGATGAGACGGTGCAGGACTGCA
ATTGCTCAATCTATCCCGCCACATAACAGGTACCGTATGGCTTGGGATATGATGAT
GAAGTGGTCCGCTACAACGGCCCTGGTGTATCGAGCTGCTCCGGATCCCAAGCT
GTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCATTGGGGAGTCTGGCGGGCTCGCCTACTATT
CCATGGTGGGGAAGTGGGCTAAGGTTTGTATTGTGATGCTACTCTTGTCTCTAATAG

配列番号 5 (HCC10A)

ATGTTGGGTAAGGTCAATGATACCCCTTACATGCGGCTTCCGCGACCTCGTGGGGTACA
TTCGCTCGTGGCGCCCCCTAGGGGGGCTGCCAGGCCCTGCGCATGGGTCGG
GGTTCGGAGGACGGGTGAACATGCAACAGGGAATTTGCCGGTGTCTCTTTCTCT
ATCTTCTCTTGGCTTTGCTGTCTGTCTGACGCTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGG
CAACGTGTCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACCTCAAGCATTGTGTAT
GAGGACGGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGGCTTCCGGGAGAAC
AATCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCG
TCCCCACACGACAATACGACGCCACGTGATTTGCTGTTGGGGCGGCTGCTTTCTG

【図 21 B】

TTCCGCTATGTACGTGGGGACCTCTGCGGATCTGCTTCTCTGCTCTCCAGCTGTTC
CCATCTCGCCTCGCCGCGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCG
CCACATAACGGGTACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTCGCTACAACG
GCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGGATCCCAAGCTGCTGCTGGACATGGTGGCGG
GGGCCAATTGGGGAGTCTGCGGGTCTCGCTACTATTCCATGGTGGGGAAGTGGGC
TAAGGTTTTGATTGTGATGCTACTCTTGTCTCCCTAATAG

配列番号 7 (HCC11A)

ATGTTGGGTAAGGTCAATGATACCCCTTACGTGCGGCTTCCGCGACCTCATGGGGTACA
TTCCGCTCGTGGCGCCCCCTAGGGGGTGTGCCAGAGCCCTGGCGCATGGGCTCCG
GGTTCGGAAGACGGGTGAACATGCAACAGGGAATTTGCTGCTGCTCTTCTCTA
TCTTCTCTTGGCTTACTGCTCTGTGACCATTCAGCTTCCGCTTATGAGGTGCGC
AACGTGTCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACCTCAAGCATTGTGTATG
AGGACGGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGGCTGCTTCCGGGAGAACA
ACTCTTCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCCAACGCTGCGAGCTAGGAACGCCAGCGT
CCCCACTACGACAATACGACGCCACGTGATTTGCTGTTGGGGCGGCTGCTTCTGTT
CGGCTATGATGCTGGGGATCTCTGCGGATCTGCTTCTCTGCTCTCCAGCTGTTCACC
ATCTCGCTCGCCGCGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCC
ACATAACAGGTACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGAATAG

配列番号 9 (HCC12A)

ATGCCCGGTTGCTCTTCTCTATCTTCTCTTGGCCCTGCTGCTGCTGACCATACCA
GCTTCCGCTTATGAAGTGGCAACGTGTCCGGGGTGTACCATGTCAAGCAAGCTGCT
CCAACCTCAAGCATTGTGTATGAGGACGGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGCT
GCCCTGCTTCCGGGAGGCAACTCTCCGCTTGTGGGTGGCGCTCACTCCACGCTC
GCGGCCAGGAACGCCAGCTCCCCACAACGACAATACGACGCCACGTGATTTGCTC
GTTGGGGCTGCTGCTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGATCTCTGCGGATCTGTTT
CCTTGTTCAGCTGTTCACTTCTCACCTCGCGGCGATCAACAGTACAGGACTGCA
ACTGCTCAATCTATCCCGGCCATGATCAGGTACCCGATGGCTTGGGATATGATGAT
GAACCTGCTCAATAG

配列番号 11 (HCC13A)

ATGTCGGTTGCTCTTCTCTATCTTCTCTTGGCCCTGCTGCTGCTGCTGACCATACCA
GCTTCCGCTTATGAAGTGGCAACGTGTCCGGGGTGTACCATGTCAAGCAAGCTGCT
CCAACCTCAAGCATTGTGTATGAGGACGGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGCT

【図 2 1 C】

GCCCTGCGTTCCGGAGGGCAACTCCTCCCGTTGCTGGTGCGCTCACTCCACGCTC
GCGGCCAGGAACGCCAGCGTCCCGACAACGACAATACGACGCCACGTGATTGCTC
GTTGGGGCTGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGATCTCTCGGATCTGTTTT
CCTTGTITCCAGCTGTTACCTTCTCACTCGCCGCGATCAAACAGTACAGACTGCA
ACTGCTCAATCTATCCCGCCATGTATCAGGTACCCGCATGGCTTGGGATATGATGAT
GAACTGGTAATAG

配列番号 13 (HCCI17A)

ATGCTGGGTAAGGCCATCGATAACCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACA
TTCGCTCGTCCGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCG
GGTTCGGAAGACGGGTGAACATATGCAACAGGGAATTTGCCCTGGTTGCTCTTTCTCTA
TCTTCTCTTGGCTTTACTGTCTGTCTAACCATTTCCAGCTTCCGCTTACGAGGTGCGC
AACGTGTCCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACCAAGCATTGTGTATG
AGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGCCCTGCGTTCCGGGAGAACA
ACTCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACGCTCGCGGTAGGAACGCCAGCAT
CCCCACTACAACAATACGACGCCACGTGATTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTCTGTT
CCGCTATGTACGTGGGGATCTCTCGGATCTGTCTTCTCGTCTCCAGCTGTTCAACC
ATCTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTGACGAGTGAATTGCTCAATCTATCCCGGCC
ACATAACGGGTACCCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTACTAATAG

配列番号 15 (HCP151)

ATGCCCGGTTGCTCTTCTCTATCTT

配列番号 16 (HCP152)

ATGTTGGGTAAGGTCATCGATAACCTT

配列番号 17 (HCP153)

CTATTAGGACCAGTTCATCATCATATCCCA

配列番号 18 (HCP154)

CTATTACCAGTTTCATCATCATATCCCA

配列番号 19 (HCP107)

ATACGACGCCACGTGATTCCAGCTGTTCAACATC

【図 2 1 E】

ATCTTCTCTTGGCTTTGCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGGC
CAACGTGTCCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACCAAGCATTGTGTAT
GAGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGCCCTGCGTTCCGGGAGAAC
AACTCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCG
TCCCCACACGACAATACGACGCCAGTGCATTCCAGCTGTTCAACATCTCGCCTCG
CCGGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGT
CACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTGCCCTACAACGGCCCTGGTGGTAT
CGCAGCTGCTCCGGATCCTCTAATAG

配列番号 27 (HCCI40)

ATGTTGGGTAAGGTCATCGATAACCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACA
TTCGCTCGTCCGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCG
GGTTCGGAGGACGGCGTGAACATATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCT
ATCTTCTCTTGGCTTTGCTGTCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTSCG
CAACGTGTCCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACCAAGCATTGTGTAT
GAGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGCCCTGCGTTCCGGGAGAAC
AACTCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCG
TCCCCACACGACAATACGACGCCACGTGCAATCCAGCTGTTCAACATCTCGCCTCG
CCGGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGT
CACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTGCCCTACAACGGCCCTGGTGGTAT
CGCAGCTGCTCCGGATCGTATCGAGGGCAGACCATCACCCATCACTAATAG

配列番号 29 (HCCI62)

ATGGGTAAGGTCATCGATAACCTTACGTGCGGATTCCGCCGATCTCATGGGGTACATCC
CGCTCGTCCGCGCTCCCGTAGGAGGCGTCGAAGAGCCCTTGCGCATGGCGTAGGGCG
CCTTGAAGACGGGATAAAATTCGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTATTT
TCCTTCTCGCTCTGTTCTTGTGCTAATTCATCCAGCAGTAGTCTAGAGTGGCGGAAT
ACGTCTGGCCCTCTATGTCCTTACCAACGACTGTTCCAATAGCAGTATTGTGTACGAGGC
CGATGACGTTATTCTGCACACACCCGGCTGCATACCTTGTGTCCAGGACGGCAATACA
TCCAGTGTGTCGACCCAGTGACACCTACAGTGGCAGTCAAGTACGTCCGAGCAACCA
CCGCTTCGATACGACGTATGTGGACCTATTAGTGGGCGCGGCCAGCATGTGCTCTGC
GCTCTACGTGGGTGACATGTGTGGGCTGTCTTCTCGTGGGACAAGCCTTCACGTTCA
GACCTCGTCGCCATCAAAACGCTCCAGACCTGTAACTGCTCGCTGTACCCAGGCCATCT
TTCAGGACATCGAATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTAATAG

【図 2 1 D】

配列番号 20 (HCP108)

GATGGTGAACAGCTGGGAATCGACGTGGCGTCGTAT

配列番号 21 (HCCI37)

ATGTTGGGTAAGGTCATCGATAACCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGTACA
TTCGCTCGTCCGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCG
GGTTCGAGGACGGCGTGAACATATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCT
ATCTTCTCTTGGCTTTGCTGTCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGGC
CAACGTGTCCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACCAAGCATTGTGTAT
GAGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGCCCTGCGTTCCGGGAGAAC
AACTCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCG
TCCCCACACGACAATACGACGCCACGTGATCCAGCTGTTCAACATCTCGCCTCG
CCGGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGT
CACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTGCCCTACAACGGCCCTGGTGGTAT
CGCAGCTGCTCCGGATCCCAAGCTGTGCGGACATGGTGGCGGGGCCCATTTGGGG
AGTCTTGGCGGCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACCTGGGCTAAGGTTTTGATTG
TGATGCTACTCTTGTCTCCCTAATAG

配列番号 23 (HCCI38)

ATGTTGGGTAAGGTCATCGATAACCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACA
TTCGCTCGTCCGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCG
GGTTCGAGGACGGCGTGAACATATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCT
ATCTTCTCTTGGCTTTGCTGTCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGGC
CAACGTGTCCGGGATGTACCATGTACGAACGACTGCTCCAACCAAGCATTGTGTAT
GAGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGCCCTGCGTTCCGGGAGAAC
AACTCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCG
TCCCCACACGACAATACGACGCCACGTGATCCAGCTGTTCAACATCTCGCCTCG
CCGGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGT
CACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACCTGGTAA
TAG

配列番号 25 (HCCI39)

ATGTTGGGTAAGGTCATCGATAACCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACA
TTCGCTCGTCCGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCG
GGTTCGAGGACGGCGTGAACATATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCT

【図 2 1 F】

配列番号 31 (HCCI63)

ATGGGTAAGGTCATCGATAACCTAACGTGCGGATTCCGCCGATCTCATGGGGTATATCC
CGCTCGTAGGCGGGCCCCATTGGGGCGCTCGCAAGGGCTCTCGCACAGGTGTGAGGGT
CCTTGAGGACGGGGTAAACTATGCAACAGGGAATTTACCCGGTTGCTCTTTCTCTATCT
TTATTCTTGCTCTTCTCTCGTGTCTGACCGTTCCGGCCCTGCAAGTTCCCTACCGAAATG
CCTCGGGATTTATCATGTTACCAATGATTGCCCAAACCTTTCCATAGTCTATGAGGGA
GATAACCTGATCCTACACGCACTGGTTGCGTGCCCTGTGTATCATCAGGTAATGTGA
GTAGATGCTGGGTCCAAATTACCCCTACACTGTCAGCCCCGAGCCTCGGAGCAGTCAC
GGCTCCTCTTTCGGAGAGCGGTTGACTACCTAGCGGGAGGGGCTGCCCTGCTCGCGG
TTATACGTAGGAGACGCGTGTGGGGCACTATTCTTGGTAGGCCAAATGTTTACCTATA
GGCCTCGCCAGCAGCTACGGTGCAAGACTGCAACTGTTCCATTACAGTGGCCATGT
TACCGGCCACCGGATGGCATGGGATATGATGATGAACCTGGTAATAG

配列番号 33 (HCP109)

TGGGATATGATGATGAACCTGGT

配列番号 34 (HCP172)

CTATTATGGTGGTAAGGCCARCARGAGCAGGAG

配列番号 35 (HCCI22A)

TGGGATATGATGATGAACCTGGTGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCC
GGATCCCAAGCTGTCTGGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTTGGGGAGTCTTGGCGG
GCCTGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACCTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTATGCTACTC
TTTGGCGGCTCGACGGGCATACCGCGGTGTACGAGGGGCGACGAGCCTCGGATACCA
GGGGCCTTGTGTCCCTTTAGCCCCGGGTGCGCTCAGAAAAATCCAGCTCGTAAACAC
CAACGGCAGTTGGCACATCAACAGGACTGCCCTGAACCTGCAACGACTCCCTCCAAC
AGGGTTCTTTGCCCACTATTCTACAAACACAAATCAACTCGCTGGATGCCAGAG
CGCTTGGCCAGCTGTCTGCTCCATCGCAAGTTGCTCAGGGGTGGGGTCCCTCACTT
ACACTGAGCCTAACAGCTCGGACCAAGAGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACC
GTGTGGTATTGTACCCGCGTCTCAGGTGTGCGGTCCAGTGATTGCTTACCCCGAGCC
CTGTTGTGGTGGGGACGACCGATCGGTTTGGTGTCCCACTATAACTGGGGGGCGAA
CGACTCGGATGTGCTGATTCTCAACAACACGCGGCCCGCGAGGCAACTGGTTCGGC
TGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTACCAAGACGTGTGGGGGCCCGCGTCAACA
TCGGGGGGCGGCAACAACCTTGACCTGCCCACTGACTGTTTTCGGAAGCACCC
CGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCTGGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTT

【 図 2 1 G 】

CATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCCTGCACTGTCAACCTTACCATTCTCAAGGT
TAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCAGAGGTCGAAGCCGCATGCAATTGGACTCG
AGGAGAGCGTGTGTGACTGTGGAGGACGGGATAGATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTG
TCTACAACAGBTGGCAGATAGCTGCCCTGTTCTCTTACCACCCCTCCCGGCCATCCA
CCGGCTGTACCACTCCATCAGAACATCGTGGACGTGCAATACCTGTACGGGTGAG
GTGCGCGGTGTCTCCTTGTGCATAAATGGGAGTGTCTCTGTGCTCTTCTCTCTCT
GGCAGACGCGGCATCTCGCGCTGCTTATGGATGATGCTGCTGATAGCTCAAGCTGAG
GCCGCCTTAGAGAACTGGTGGTCTCAATGCGCGGCCGTGCGCGGGCGCATGGC
TACTCTTCTTCTTGTGTTCTTGTGCTGCTGCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCC
TGCTGCGGCATACGCTCTTCTATGGCGTGTGGCCGCTGCTCTGCTTCTGCTGGCCTTAC
CACCACGAGCTTATGCCTAGTAA

配列番号 37 (HCCI41)

GATCCCAAGCTGTCGTGGACATGGTGCGCGGGGCCATTGGGAGTCCTGGCGGG
CCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCT
TTGCCGCGCTCGACGGGCATACCCGCGTGTCAAGAGGGGACGACGCCCTCGATACCA
GGGCGCTTGTGTCCTCTTTAGCCCGGGGTGCGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACAC
CAACGCGAGTTGGACATTAACAGGACTGCCCTGAAGCTCAACGACTCCCTCCAAAC
AGGGTCTTTGCCGCACTATTCAACAACAAATTAAGCTCGTGTGGATGCCGAGAG
CGCTTGGCCAGCTGTGCGTCCATCGACAAGTTGCGTCAAGGGTGGGGTCCCTCACTT
ACACTGAGCCTAACAGCTCGGACGAGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACC
GTGTGGTATTGTACCCGCGGTCTCAGGTGTGCGGTCAGGTGATTGCTTACCCCCGAGCC
CTGTTGTTGGTGGGACACCGCATCGGTTTGGTGTCCCAACGTATAACTGGGGGGCGAA
CGTACTCGGATGTGCTGATTCTCAACAACACGGCGCCGCCGAGGCAACTGTTTCGGC
TGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTACCAAGACGTGTGGGGGGCCCCGTCACAAC
TCGGGGGGGCCCGCAACAACACGGTTGACCTGCCCACTGTGTTTTCGGAAGCACCC
CGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCTGGGCCCTGGGTGACACCTAGGTGTATGGTT
CATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCCTGCACCTGTCAACTTACCATCTTCAAGGT
TAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCAGAGTTTCAAGCCCGCATGCAATTGGACTCG
AGGAGAGCGTTGTGACTGTGAGGACAGGATAGATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTG
TCTACAACAGAGTGGCAGAGTGGCAGAGCTTAATTAATAG

配列番号 39 (HCCI42)

GATCCCAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCATTGGGGAATCCTGGCGGG
CCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGGAAGTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCT

【 図 2 1 I 】

配列番号 43 (HCCI44)

ATGTGTTGGGGAAGTGGGCTAAGGTTTGTGTTGTGATGCTACTCTTTGCCGGGCTGACAG
GGCATACCCGGGTGTGAGGAGGGGAGCAGCCTCCGATACCAAGGGGCTTGTGTCCT
CTTTAGCCCGGGTGCAGCTCAGAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAGTTGGCAG
ATCAACAGGACTGCCCTGAAGCTCAACGACTGCTGATGCCAGGCGCTGACCGAGTGTGCG
TATTCTCAACAAACAAATTAACCTGCTGATGCCAGGCGCTGAGCCTGAGCCAGTGTGCG
CTCCATCGACAAGTTTCGTGAGGGGTGGGGTCCCTCACTACACTGAGCTCAACAGC
TCGGACCAAGAGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCG
CGTCTCAGGTGTGCGGTTCAGTGTATTGCTTACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGAC
GACCGATCGGTTTGGTGTCCCACTATAACTGGGGGGGGAACGACTCGGATGTGCTG
ATTCTCAACAACACGCGGCCCGCGGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATG
GCACTGGGTTTCAACAGACGTGTGGGGGCCCTCGGTGCAACATCGGGGGGCGCGCA
ACAACAGCTTGACCTGCCCACTGACTGTTTTCGGAAGACCCCGAGGCCACTACGCG
CAGATCGGTTCTGGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTTATTACCATATAGG
CTCTGGCACTACCCCTGCACTGTCAACTTCACCATCTTCAAGTTTAGGATGTACGTGG
GGGCGTGGAGCACAGGTTTCGAAGCCGCTGCAATTTGACTCGAGGAGAGCGTTGTGA
TTTGGAGGACAGGATAGATCAGAGCTTAGCCCGTGTGCTGTCTACAACAGGTGAT
CGAGGGCAGACCATCACCACTACTTAATAG

配列番号 45 (HCCL64)

ATGGTGGCGGGGGCCCAATTGGGGAGTCTGGCGGGCTCGCCTACTATTTCATGTTGG
GGAACATGGGCTAAGGTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTCGACGGGCATAC
CCGCGTGTCAAGGAGGGGACAGCCTCCGATACACAGGGGCTTGTGTCCCTCTTAGC
CCGGGTGGCTCAGAAAACTCAGCTCTGAACACCAACCGGCAGTTGGCACAATTAAC
AGCACTCCGCTGAAGCTCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGGCGCATCTTCT
ACAAACACAAATTAAGCTGTGTGGATGCCACGAGCGCTTGGCCAGCTGTGCTGTCAT
CGACAAGTTGCTCAGGGGTGGGGTCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGCTCGGAC
CAGAGGCGCTACTGCTGGCAGTACCGCGCTGACCGGTGTGGTATTGTACCCGGCTCTC
AGGTGTGGGTGCTCAGTGTATTGCTACCCCGAGCCCTGTTGGTGGGGACACGCCA
TCGGTTTGGTGTCCCAAGCATTAACGGGGGGCGAACGATCGATGTGCTGATTCTC
ACAACACGCGGGCGCGCGAGGAACTGGTTGGCTGTACATGTGATGAATGGCACT
GGGTTACCAAGACGTGTGGGGGCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCGGCAACAAC
ACCTTGACCTGCCCACTGACGTTTTCGGAAGCAACGACGAGGCCACTACGCCAGAT
CGGGTTCTGGGCGCTGGCTGACTAGTGTATGGTCTTATACCATTAAGGCTCTGG
CACTACCCCTGCACCTGCAACTTCAACATCTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCG

【 図 2 1 H 】

TTGCCGGCGTCGACGGGCATACCCGCGTGTGAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCA
GGGGCCTTGTGTCCCTCTTAGACCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAACAC
CAACGGCAGTTTGGCACATCAACAGGACTGCCCTGAATGCAACGACTCCCTCCAAAC
AGGGTCTTTGCCGCGATCTTACAACAACAATTCAACTCGTCTGGATGGCCGAGAG
CGCTTGGCCAGCTCGCTCCATCGACAAGTTCGCTCAGGGGTGGGTCGCTCCCTCACTT
ACACTGAGCCTAACAGCTCGGACCGAGGGCCCTACTGCGGCACTGACGCGCTCGACC
GTGTGGTATTGTACCCGCGGTCTCAGGTGTGCGGTCCAGTGATTGCTTACCCCCGAGCC
CTGTTGTGGTGGGACGACCGATCGGTTTGGTGTCCCAAGTATAACTGGGGGGCGAA
CGACTCGGATGGTCTGATTCAACAACACCGGGCCCGCGAGGCAACTGGTTCGGC
TGATACATGGATGAATGGCAGCTGGTTCACCAAGAGCTGTGGGGGCCCCCCGTCAACA
TCGGGGGGGCCCGGAACAACACCTTGACCTGCCCACTGACTGTTTTGGAAGCACCC
CGAGGCCACCTACGCCAGATCGGCTTCTGGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTT
CATTACCCATATAGGCTCTGCACTACCCCTGCAGCTGTCAACTTACCACTCTTCAAGGT
TAGGATGTACGTGGGGGGCTGGAGCACAGGTTCAAGCCGCATGCAATATGGACTCG
AGGAGAGCGCTGTGACTTGTGAGGACAGGGATAGATCAGAGCTTACCCGCTGCTGCTG
CTACAACAGGTGATCGAGGGCAGACCATCAACCACTACTAATAG

配列番号 41 (HCCI43)

ATGTTGGGGAAC TGGGCTAAGGTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTCGACG
GGCATACCCGCGGTGCAGGAGGGGACGAGCCTCCGATACACGAGGGCCCTGTGTCCCT
CTTTAGCCCCGGGTGGCGCTCAGAAAAATCCAGCTCGTAACACCAACGGCAGTTGGCAC
ATAACACAGGACTGCCCTGAAGTCAAGCACTCTCTCCAAACAGGGTTGTTGCCGCAC
TATTCTACAACACAAATTCAACTCGTGGATGGCCGAGCGCTTGCCACTGCTCG
CTCCATCGACAAGTTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGC
TCGGACACGAGGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGATTGTACCCG
CGTCTCAGGTGGCGGCTCGAGTTAGTTGCTTACCCCGAGCGCTGGTGTGGGGGAC
GACCGATCGGTTTGGTGTCCCCCACTAACTCGGGGAGCAACGACTCGGATGTGCTG
ATTCTCAACAACACGCGGCCGCCGAGGCAACTGGTTTCGGCTGTACATGGATGAATG
GCACTGGGTTCAACAAGACGTGTGGGGCCCCCGTGCACACTCGGGGGGGCCGGCA
ACAACACCTTGACTCGCCCCACTGACTGTTTTCGGAAGACCCCGAGCCCACTACGC
CAGATCGGCTTTCGGCCCTGCGTGCACCTAGGTGTATGTTCAATTACCAATAAGG
CTCTGGCACTACCCCTGCACTGTCAACTTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGG
GGCGCTGGAGACAGGTTTGAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGA
CTGTGAGGACACGGATAGATCAGAGCTTAGCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGG
CAGAGCTTAATTAATGAG

【 図 2 1 J 】

TGGAGCACAGGTTGGAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGGCTTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAGATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGATACCTGCCCTGTCTCTTACCACCTGCCGGCCTATCCACCGGCTGATCCACCTCCATCAAAACATCGTGGACGTGAATACCTGTACGGTGTAGGGTCGGCGGTTGTCTCCCTTGTCTCAATATGGGAGTATGCTCTTGTCTTCTTCTCTGGCAGAGCGCGCATCTGCGCGCTCTTATGGATGATGCTGCTGATGCTCAAGCTGAGGCCGCCCTAGAGAACTGGTGCTCCTAATGCGCGCGCTGTGCGCGGCGCATGSCATCTTTCTTCTGTGTCTTCTGTGCTGCTGCTGCTACATCAAGGGCAGGCTGTGCTCTGGTGCGGCATACGCTCTCTATGGCGTGTGGCCGCTGCTCTGCTTCTGCTGGCCTTACCACCACGAGCTTATGCTTAGTAA

配列番号 47 (HCCI65)

AATTGGGTAAGGTCATCGATACCCCTTACATCGCGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACA
TCCCGCTCGTCGGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCG
GGTTCGAGGACGGCGTGAACATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCT
ATCTCTCTCTGGGTTTGCTCTGCTGCTACGGCTTCCAGCTTCCGCTATGAAGTGC
CAACGTGTCCGGATGTACCATGTACGCAAGCACTGCTCAACATCAAGCATGTGAT
GAGGCACGGGACATGATCATGCACACCCCCGGTGCCTGCCCTGCGTTCGGGAAGC
AACTCTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCG
TCCCCAACGACAATACAGCCCAACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTTCTG
TTCGCTATGTAGCGTGGGGACCTTCGGGACTGTCTCTCTCGCTCCCAAGCTTTCA
CCATCTCGCTCGCCGGCATGAGACGTCGAGCACTGCAATTGCTCAATCTATCCGG
CCACATAACGGGTACCGTATGGCTTGGGATATGATGTAAGTGGTCGCTACAACG
GCCCTGTGGTATCGCAGCTGCTCCGATGCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGG
GGGCCATTGGGAGGCTCTGGCGGCTCGCTACTATTCCGATGGTGGGAACTGGGC
TAAGGTTTGGTTGTGATGCTACTCTTGGCGGCTCGACAGCAATCCCGCTGTCAG
GAGGGGCAGCAGCTCCGATACAGGGCCCTGTGTGCCCTTTAGGCCCGGGTGGGC
TCAGAAAATCCAGCTCGTAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAACAGGACTGCCCT
GAACTCGAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGGCGCACTATTCTACAACACAAA
TTCAACTGTCTGGATGGGTCGACAGCGCTTGCCGACGCTGCTCGCTCATCGAACCTC
CTCAGGGGTGGGTCCTCTCACTTACCTAGGCTAACGCTCGACCAAGGCCCTCA
CTGCTGGCACTACGCGCTCGACCGTGTGGTATTGTACCGCGCTCTCAGGTGTGCGGT
CCAGTGTATTGCTTACCCCGAGCGCTGTTGTGGTGGGACGACCGATCGTTTGGTGT
CCCCAGCTATAACTGGGGGCGCAACGACTCGGATGTGCTGATTCTCAACAAACACGGG
CGCGCGCAGGCAAGGTTGGTCCGCTGTACATGGTGATGAATGSCACTGGGTTCCACAA
CGTGTGGGGGCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCGCAACAACACTTGAACCTGCC

【図 2 1 K】

CCACTGACTGTTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCTGGGCC
CTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCCTGCA
CTGTCAACTTACCATCTTCAAGTTAGGATGTACGTGGGGGGCTGGAGCACAGGTT
CGAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAG
ATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGATACTGCCCTGTTCC
TTCACCACCTCGCGGCCCTATCCACCGGCTGATCCACCTCCATCAGAATCGTGG
ACGTGCAATACCTGTACGGTGTAGGGTGGCGGTTGTCTCCCTTGTCAATGGA
GTATGTCTGTGTCTTCTCTCTCTGGCAGACGCGCATCTGCGCTGCTTATGGA
TGATGTCTGTATAGCTCAAGCTGAGGCCGCTTAGAGAACCTGCTGCTCTCAATGC
GGCGGCGTGGCCGGGGCGCATGGCACTCTTCTCTCTGTGTCTCTGTGCTGCT
GGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGTGGCGCATACGCTTCTATGGCGTGGCC
GCTGCTCTGCTTCTGCTGGCCTTACCACCAGAGCTTAGCTAGTAAGCTT

配列番号 49 (HCC166)

ATGAGCACGAATCTAAACCTCAAAGAAAAACAAACGTAACACCAACCGCGGCCCA
CAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTGCGCG
GCAGGGGCCCAAGTTGGGTGTGCGCGGCTAGGAAGACTTCGAGCGGTGCAAC
CTCGTGGGAGGCGACAACCTATCCCCAAGGCTCGCCGACCCGAGGGTAGGCGCTGGG
CTCAGCCCGGTACCCCTGGCCCTCTATGGCAATGAGGGCATGGGGTGGCAGGATG
GCTCCTGTACCCCGCGGCTCTCGGCTAGTTGGGGCCCTACAGACCCCGCGGTAGG
TCGCGTAATTTGGTAAGGTACATGATACCTTACATGCGGCTTCGCCACCTCGTGG
GGTACATTCGCTGCTCGGCGCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGG
CGTCCGGGTTCTGGAGGACGGCGTGAACATGCAACAGGGAATTCGCCGTTGCTCT
TTCTCTATCTTCTCTTGGCTTGTGCTGCTGTGCTGACCGTTCCAGCTTCGCTTATGAA
GTGCGCAACGTGTCCGGGATGACCATGTCAACGACGACTGCTCAACTCAAGCATTG
TGTATGAGGCGAGCGACATGATCATGCACACCCCGGGTGGTGGCTGCGTTCGGGA
GAACAACTCTTCCGCTGCTGGGTAGCGCTACCCCGACGCTCGCAGCTAGGAACGCC
AGCGTCCCAACACGACAATACGACGCCAGCTGATTTGCTGTTGGGGCGGTGCTT
TCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGACCTCTGCGGATCTGCTTCTCTGCTCCAGCTG
TTCACCATCTCGCTCGCCGCGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATC
CCGGCCACATAACGGGTACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAAGTGGTGCCTAC
AAGGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGGATCCCAAGCTGTCTGGGACATGGTG
GCGGGGGCCATTGGGGAGTCTGGCGGCGCTCGCTACTATTCCATGGTGGGAACCT
GGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTTTTGGCGGCTCGACGGGCATACCCGCGT
GTCAGGAGGGGACGAGCTCCGATACCAGGGGCTTGTGCTCTTTAGCCCGGG

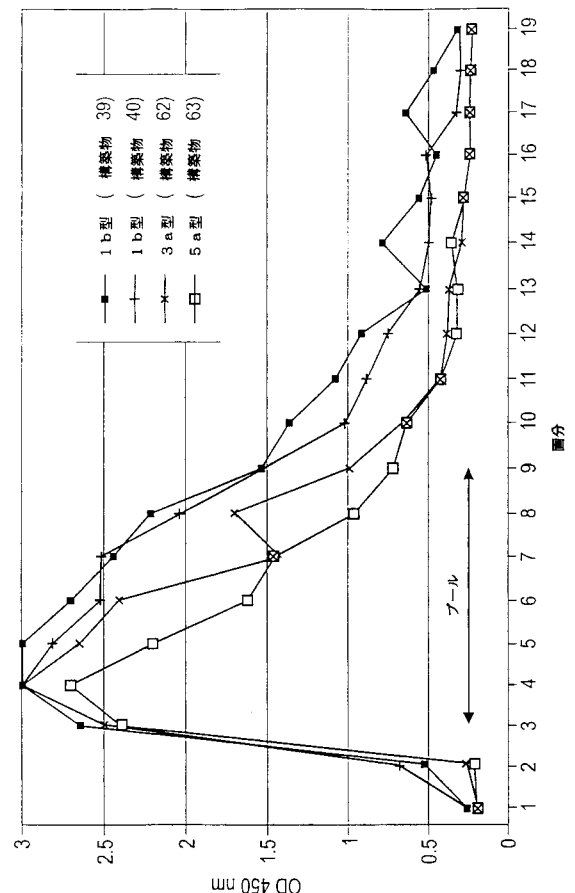
【図 2 2】

面分	容積	希釈	450 nmで測定したOD			
			構築物			
			39	40	62	63
			1b型	1b型	3a型	5a型
スタート	23 ml	1/20	2.517	1.954	1.426	1.142
70-50-	23 ml	1/20	0.087	0.085	0.176	0.120
1	0.4 ml	1/200	0.102	0.051	0.048	0.050
2			0.396	0.550	0.090	0.067
3			2.627	2.603	2.481	2.372
4			3	2.967	3	2.694
5			3	2.810	2.640	2.154
6			2.694	2.499	1.359	1.561
7			2.408	2.481	0.347	1.390
8			2.176	1.970	1.624	0.865
9			1.461	1.422	0.887	0.604
10			1.286	0.926	0.543	0.519
11			0.981	0.781	0.294	0.294
12			0.812	0.650	0.249	0.199
13			0.373	0.432	0.239	0.209
14			0.653	0.371	0.145	0.184
15			0.441	0.348	0.151	0.151
16			0.321	0.374	0.098	0.106
17			0.525	0.186	0.099	0.108
18			0.351	0.171	0.083	0.090
19			0.192	0.164	0.084	0.087

【図 2 1 L】

TCGGCTCAGAAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAACAGGACT
GCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGCCGCACTATTCTACAAAC
ACAAATTCACCTGCTGTGGATGCCAGAGCGCTTGGCAGCTGTGCTCCATCGACAA
GTTGCTCAGGGGTGGGGTCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGCTCGGACCAGAGG
CCCTACTGCTGGCACTACGGCGCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGCGTCTCAGGTGT
GCGGTCCAGTGTATTGCTTACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGACGACCGATCGGTT
TGGTGTCCCCACGTATAACTGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCTCAACAAC
ACGCGGCGCGCGGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTCA
CCAAGACGTGTGGGGGCCCCGTGCAACATCGGGGGGCGGCAACAACACCTTGA
CCTGCCCCACTGACTGTTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTT
TGGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTTACCTACCATATAGGCTCTGGCACTAC
CCCTGCCTGTCAAACCTTACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGCGTGGAGC
ACAGGTTGCAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACA
GGGATAGATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGATACTGCC
CTGTTCTCTCACCACCTGCGGCGCTATCCACCGGCTGATCCACCTCCATCAGAAC
ATCGTGGACGTGAATACCTGTACGGTGTAGGGTGGCGGTTGTCTCCCTTGTCTATCA
AATGGGAGTATGCTGTTGCTTCTTCTCTCTGGCAGACGCGGCATCTGCGCTGTC
TTATGGATGATGCTGCTGATAGCTCAAGCTGAGGCGCCCTTAGAGAACCTGGTGGTCC
TCAATGCGGCGCGCGTGGCGGGGCGCATGGCACTCTTCTCTCTGTGTTCTTCTGT
GCTGCTGATACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGTGGCGCATACGCTTCTATGGCG
TGTGGCGCTGCTCTGCTTCTGCTGGCCTTACCACCAGAGCTTAGCTAGTAA

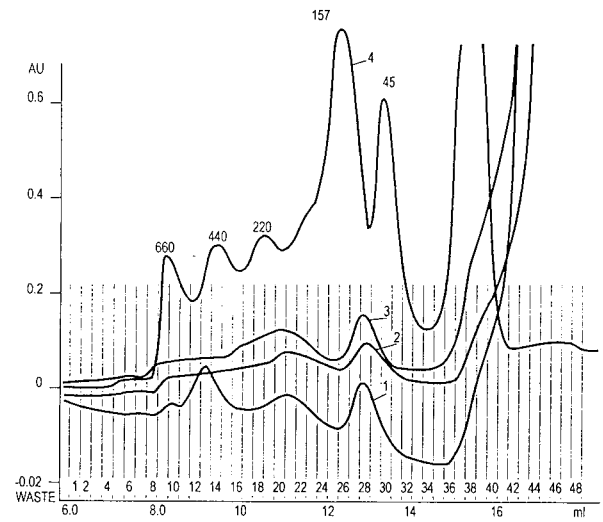
【図 2 3】



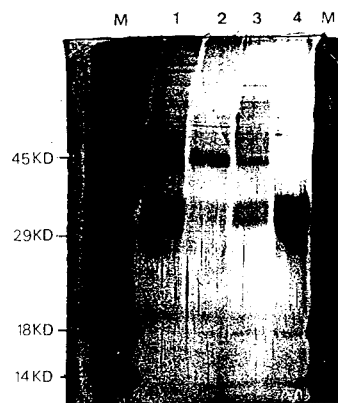
【図 2 4】

画分	容積	希釈	450nmで測定したOD			
			構築物			
			39	40	62	63
			1b型	1b型	3a型	5a型
20	250 μ l	1/200	0.072	0.130	0.096	0.051
21			0.109	0.293	0.084	0.052
22			0.279	0.249	0.172	0.052
23			0.093	0.151	0.297	0.054
24			0.080	0.266	0.438	0.056
25			0.251	0.100	0.457	0.048
26			3	1.649	0.722	0.066
27			3	3	2.528	0.889
28			3	3	3	2.345
29			3	3	2.849	2.580
30			2.227	1.921	1.424	1.333
31			0.263	0.415	0.356	0.162
32			0.071	0.172	0.154	0.064
33			0.103	0.054	0.096	0.057
34			0.045	0.045	0.044	0.051
35			0.043	0.047	0.045	0.046
36			0.045	0.045	0.049	0.040
37			0.045	0.047	0.046	0.048
38			0.046	0.048	0.047	0.057
39			0.045	0.048	0.050	0.057
40			0.046	0.049	0.048	0.049

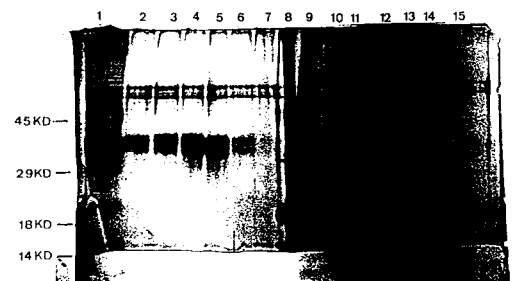
【図 2 5】



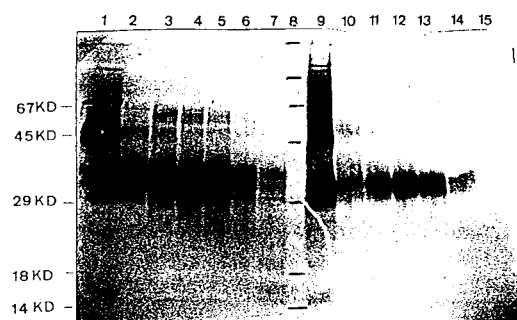
【図 2 6】



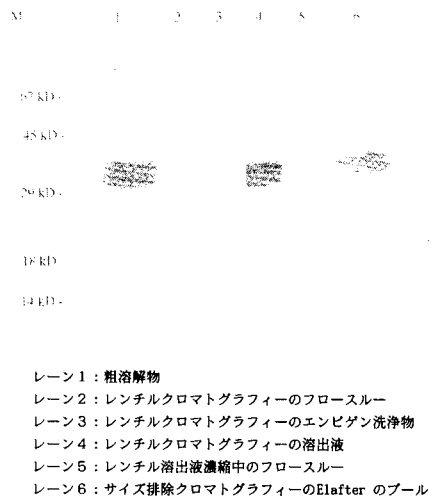
【図 2 8】



【図 2 7】

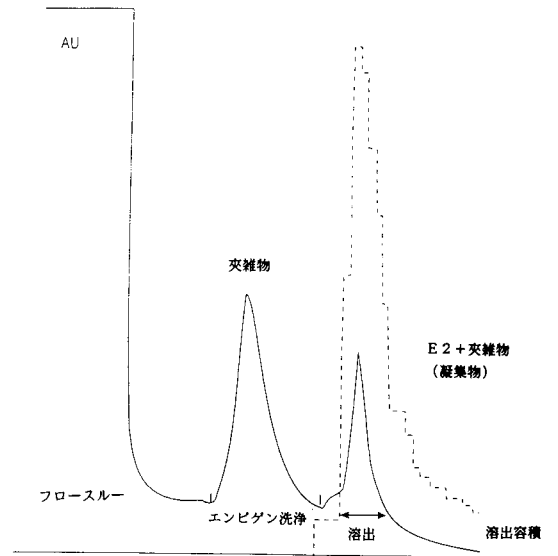


【図 29】

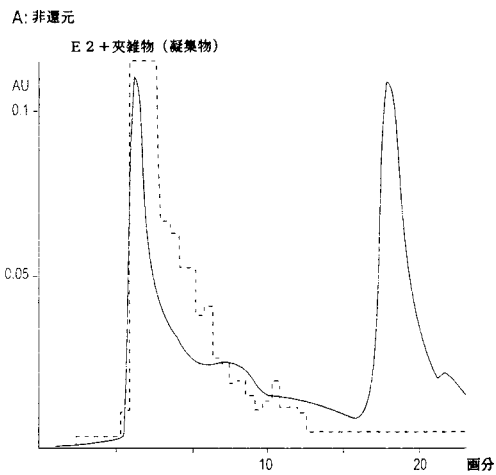


マウスモノクローナル抗体 5E1A10 を用いたウェスタンブロット解析

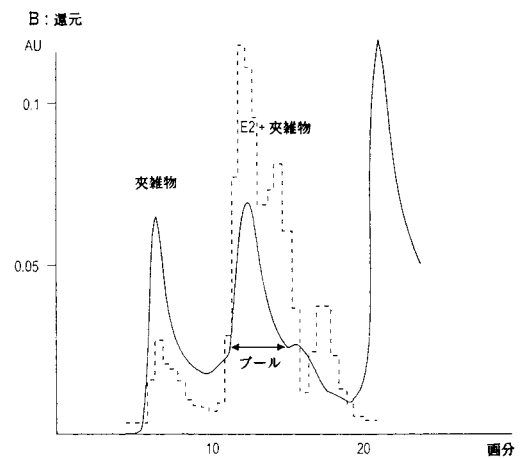
【図 30】



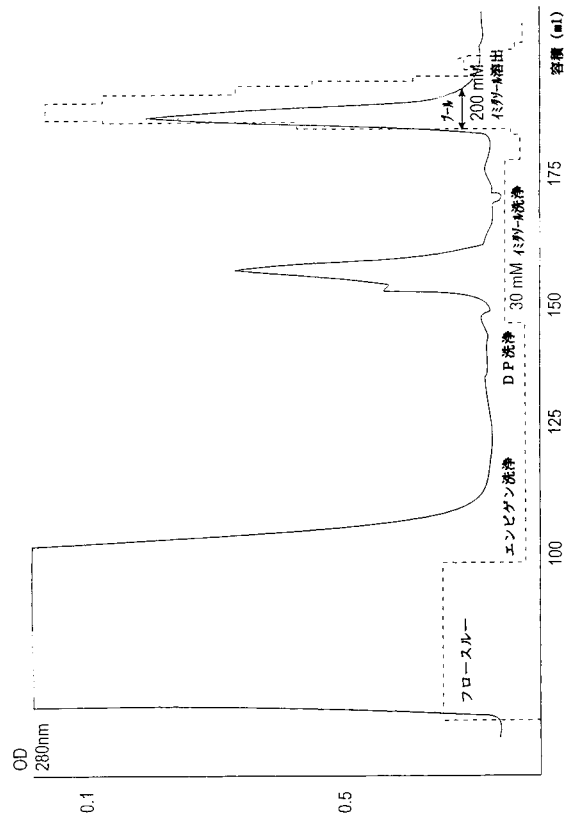
【図 31 A】



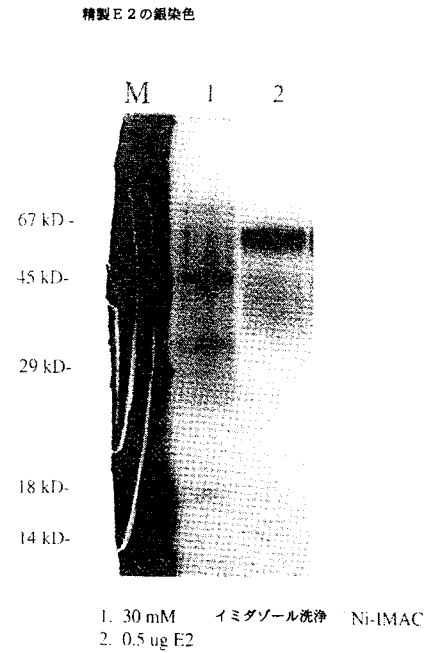
【図 31 B】



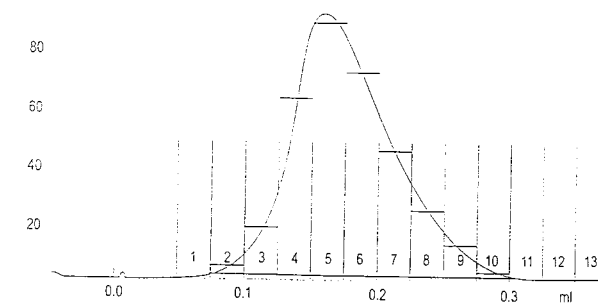
【図 3 2】



【図 3 3】



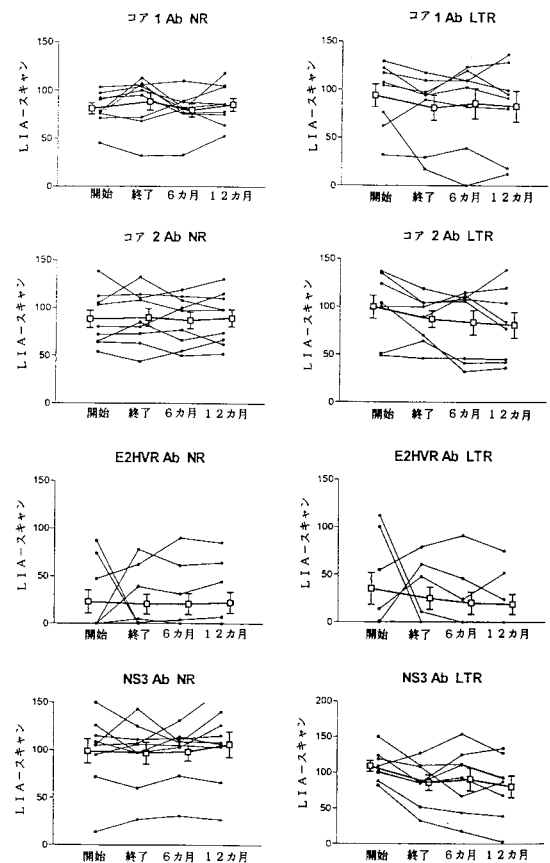
【図 3 4】



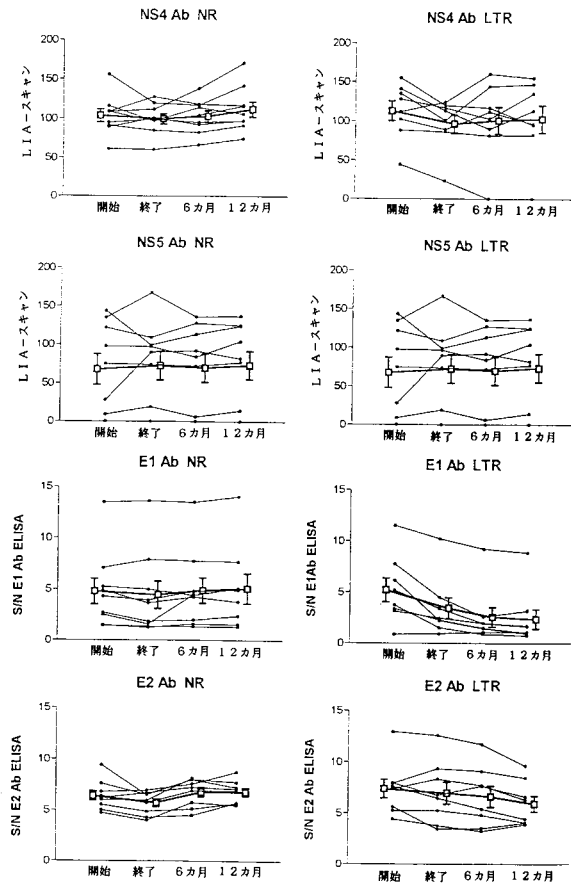
No.	保持 (ml)	ピーク始まり (ml)	ピーク終り (ml)	フェレノソフ (ml)	面積 (ml*AU)	高さ (AU)
1	-0.45	-0.46	-0.43	0.04	0.0976	4.579
2	1.55	0.75	3.26	2.51	796.4167	889.577
3	3.27	3.26	3.31	0.05	0.0067	0.224
4	5.55	3.32	3.33	0.02	0.0002	0.018

検出されたピークの総数=4
 基線より上の総面積=0.796522ml*AU
 評価したピークの総面積=0.796521ml*AU
 ピーク面積/総面積比=0.999999
 総ピークデュレーション=2.613583ml

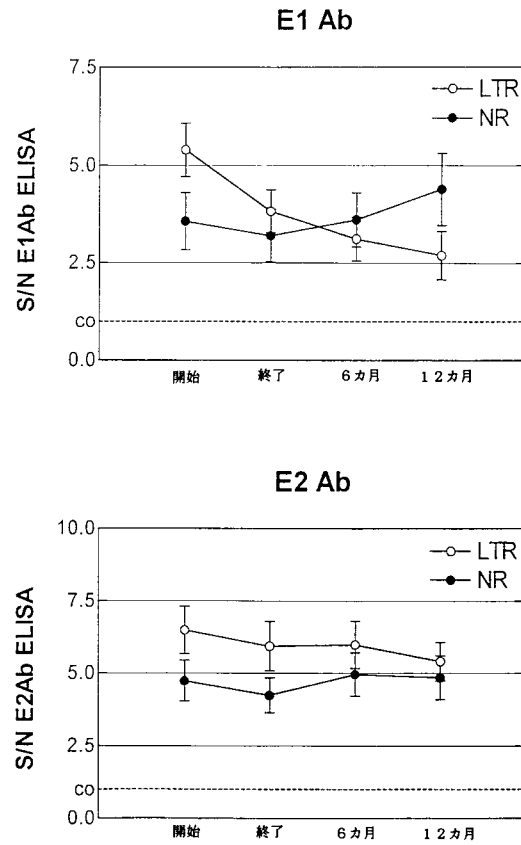
【図 3 5 A】



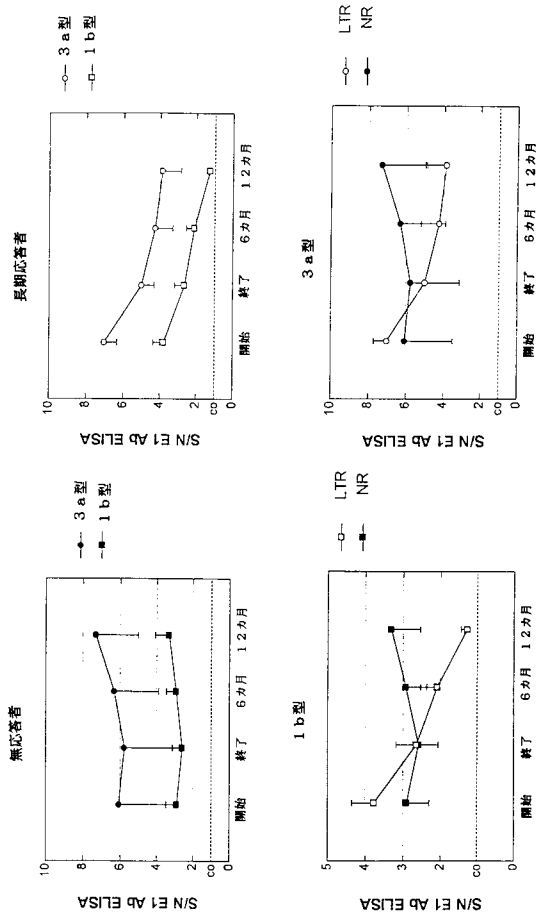
【図 35 B】



【図 36】

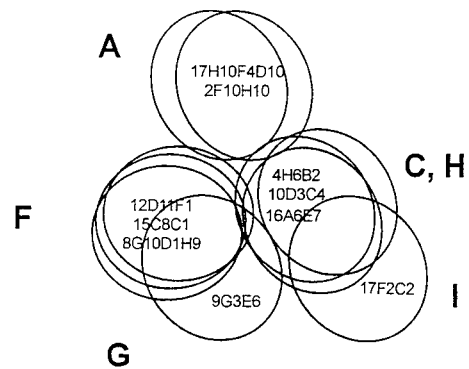


【図 37】



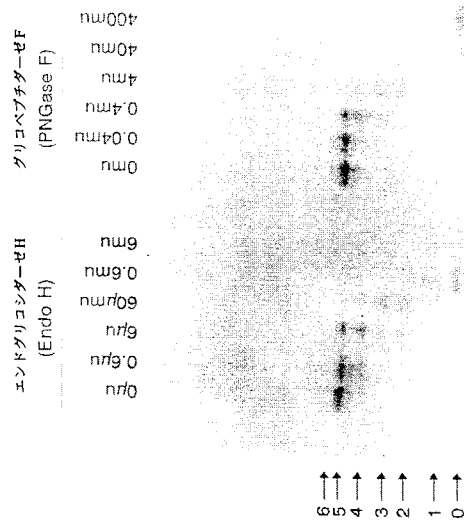
【図 38】

抗 E2 モノクローナル抗体の相対的マップ位置



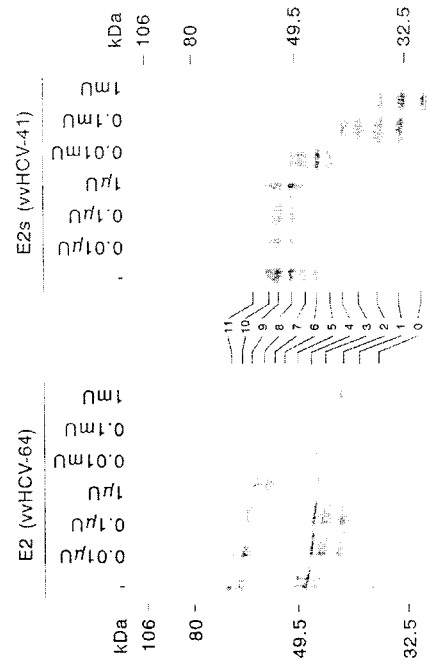
【図 39】

HCVのE1エンペロープ蛋白の部分的脱グリコシル化



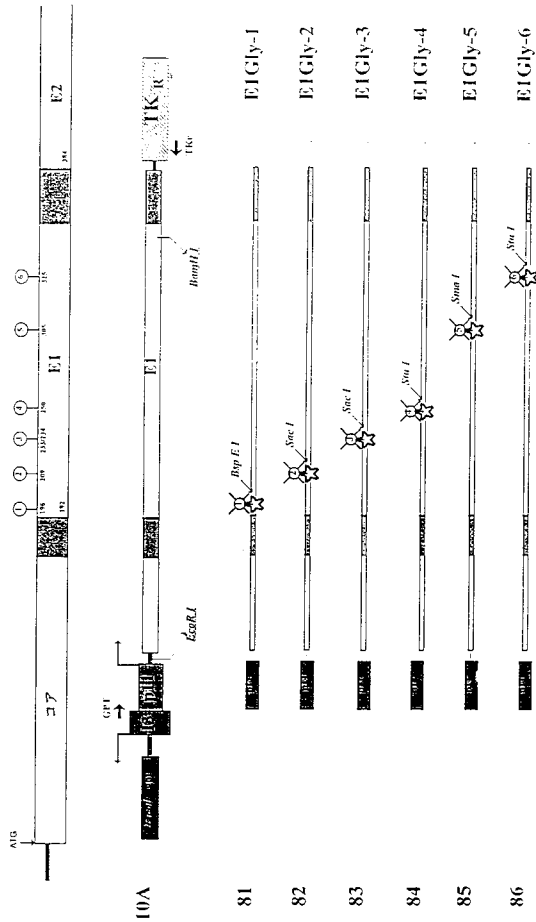
【図 40】

PNGase FによるHCVのE2/E2sエンペロープ蛋白の部分的処理



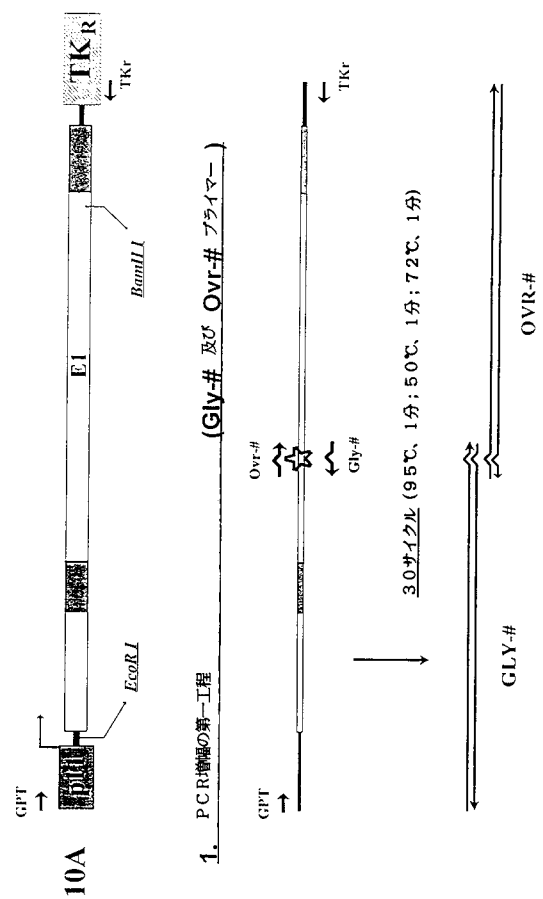
【図 41】

HCVのE1糖蛋白のインビトロ突然変異誘発



【図 42 A】

HCVのE1糖蛋白のインビトロ突然変異誘発



【手続補正書】

【提出日】平成16年3月26日(2004.3.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

形質転換宿主細胞を溶解して組換えにより発現された蛋白を単離する際に、ジスルフィド結合切断剤によりジスルフィド結合切断又は還元工程を行うことを特徴とする、E1及び/又はE2及び/又はE1/E2よりなる群から選択される組換えHCVの単一の又は特定オリゴマーのエンベロープ蛋白を精製する方法。

【請求項2】

ジスルフィド結合切断又は還元工程を、部分的切断又は還元条件下で行う、請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項3】

ジスルフィド結合切断剤が、好適には0.1~50mM、好適には0.1~20mM、更に好適には0.5~10mMの範囲の濃度の、ジチオスレイトール(DTT)である、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

【請求項4】

ジスルフィド結合切断剤が、界面活性剤である、請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項5】

界面活性剤が、好適には1~10%の濃度、更に好適には3.5%の濃度の、エンピゲン-BB(Empigen-BB)である、請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項6】

ジスルフィド結合切断剤が、DTTのような古典的ジスルフィド結合切断剤と、エンピゲン-BBのような界面活性剤との組合せを含む、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

【請求項7】

SH基保護剤によりジスルフィド結合の再形成を阻止する工程を更に含む、請求の範囲第1項~第6項のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

SH基保護剤が、N-エチルマレイミド(NEM)又はその誘導体である、請求の範囲第7項記載の方法。

【請求項9】

ジスルフィド結合の再形成を阻止する工程を、低pH条件により達成する、請求の範囲第7項記載の方法。

【請求項10】

少なくとも以下の工程：

- 組換えE1及び/又はE2及び/又はE1/E2発現宿主細胞を、場合によりN-エチルマレイミド(NEM)のようなSH基保護剤の存在下で、溶解し、
- レンチルレクチンクロマトグラフィーのようなレクチンクロマトグラフィー、あるいは抗E1及び/又は抗E2特異的モノクローナル抗体を用いる免疫親和性などの親和性精製により、上記HCVエンベロープ蛋白を回収し、
- DTTのようなジスルフィド結合切断剤を用いて、好適にはNEM又はビオチン-NEMのようなSH基保護剤の存在下で、ジスルフィド結合を還元又は切断して、そして
- 還元されたE1及び/又はE2及び/又はE1/E2エンベロープ蛋白を、ゲル濾過、及び場合によりこれに続くNi²⁺-IMACクロマトグラフィーと脱塩工程により回収する工程、

により更に特徴づけられる、請求の範囲第1項～第9項のいずれか1項記載の方法。

【請求項11】

請求の範囲第1項～第10項のいずれか1項記載の方法により単離されることを特徴とする、E1及び/又はE2及び/又はE1/E2よりなる群から選択される実質的に精製された組換えHCVの単一の又は特定オリゴマーの組換えエンベロップ蛋白を含む組成物。

【請求項12】

更に、組換えHCVエンベロップ蛋白が、ワクシニアのような組換え哺乳動物細胞から発現されることを特徴とする、請求の範囲第11項記載の組成物。

【請求項13】

更に、組換えHCVエンベロップ蛋白が、組換え酵母細胞から発現されることを特徴とする、請求の範囲第11項記載の組成物。

【手続補正書】

【提出日】平成16年3月26日(2004.3.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2004222729000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/18	C 0 7 K 14/18	
C 0 7 K 16/10	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/576	G 0 1 N 33/576	Z
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	B
// A 6 1 K 39/29	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 39/29	

(72)発明者 ボスマン、フONS

ベルギー国、ベ - 1 7 4 5 オプウェイク、フルスト 1 6 5

(72)発明者 ドウ・マルティノフ、ハイ

ベルギー国、ベ - 1 4 1 0 ワーテルロー、マットストラート 7 1

(72)発明者 バイセ、マリー・アンヘ

ベルギー国、ベ - 9 8 2 0 メーレルベーク、エー・ロンセストラート 2 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA33 BA51 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 EA02
 EA04 GA11 HA03 HA08 HA15
 4B064 AG27 AG33 CA02 CA05 CA10 CA11 CA12 CA19 CA20 CC24
 CE11 CE12 DA01 DA15
 4B065 AA01X AA26X AA58X AA87X AA96X AA96Y AB01 AB02 AC14 BA02
 BA08 CA24 CA25 CA45 CA46
 4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 MA01 NA14
 ZA752 ZB052 ZB332
 4C085 AA03 AA13 AA14 BA92 CC08 CC32 DD62 DD88 EE06 FF02
 FF03 FF13 FF20 GG01
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 CA02 DA76 DA86 EA31 EA53
 FA74 GA26 GA45

专利名称(译)	诊断和治疗纯化的丙型肝炎病毒包膜蛋白		
公开(公告)号	JP2004222729A	公开(公告)日	2004-08-12
申请号	JP2004051709	申请日	2004-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	酒店卢武铉遗传学NV 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	酒店卢武铉遗传学NV		
[标]发明人	マエルテンスゲールト ボスマンフォンス ドゥマルティノフハイ バイセマリーアンヘ		
发明人	マエルテンス,ゲールト ボスマン,フォンス ドゥ・マルティノフ,ハイ バイセ,マリー・アンヘ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/29 A61K39/395 A61P1/16 A61P31/12 C07K14/18 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/40 C12P21/00 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/70 C12R1/865 C12R1/91 C12R1/92 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/12 A61K39/29 A61K2039/5256 A61P1/16 A61P31/12 C07K14/005 C07K16/109 C07K2317/34 C12N2710/24143 C12N2770/24222 C12N2770/24234 C12N2770/24243 Y10S435/803 Y10S435/81 Y10S435/915 Y10S435/975		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.S A61P1/16 A61P31/12 C07K14/18 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/576.Z G01N33/577.B C12N5/00.A A61K37/02 A61K39/29 A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/12 C12P21/02.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA33 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/AG33 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA87X 4B065/AA96X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA752 4C084/ZB052 4C084/ZB332 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA92 4C085/CC08 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF13 4C085/FF20 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA02 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045/GA26 4H045/GA45		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	1994870132 1994-07-29 EP		
其他公开文献	JP3892443B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：提供纯化选自E1和/或E2和/或E1 / E2的重组蛋白的方法。解决方案：本发明涉及纯化选自E1和/或E2和/或E1 / E2的重组蛋白的方法。本发明还涉及通过这种方法分离的组合物。本发明还涉及这些组合物的诊断和治疗应用。此外，本发明涉及HCV E1蛋白和肽用于预测和监测HCV治疗的临床有效性和/或临床结果的用途。 Ž

