

(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2004-73207

(P2004-73207A)

(43) 公開日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(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	4 B O 2 4
C O 7 K 14/18	C O 7 K 14/18	4 B O 6 4
C O 7 K 16/10	C O 7 K 16/10	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 47 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-326811 (P2003-326811)	(71) 出願人	591076811
(22) 出願日	平成15年9月18日 (2003.9.18)		カイロン コーポレーション
(62) 分割の表示	特願2001-211447 (P2001-211447) の分割		アメリカ合衆国、カリフォルニア 946 08, エミリービル, ホートン ストリー ト 4560
原出願日	平成4年9月11日 (1992.9.11)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	759,575		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成3年9月13日 (1991.9.13)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	エイミー ジェイ. ウィーナー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 10, ペニシア, グリーンブライアー コ ート 433
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 免疫反応性C型肝炎ウイルスのポリペプチド組成物

(57) 【要約】

【課題】 診断およびワクチンに有用な、多数のHCV単離体（特にこのウイルスの異質性ドメインに関して）と免疫学的に交差反応性であるポリペプチド組成物を提供すること。

【解決手段】 少なくとも2つのC型肝炎ウイルス（HCV）アミノ酸配列を含む免疫反応性ポリペプチド組成物であって、各アミノ酸配列が、HCVエンベロープポリペプチドの可変ドメイン中に存在する少なくとも1つのエピトープを含有し、ここで、該可変ドメインのアミノ酸配列が互いに異質性であり、別個のHCV単離体由来であり、そして各アミノ酸配列は全長のエンベロープタンパク質より長くない、組成物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの C 型肝炎ウイルス (HCV) アミノ酸配列を含む免疫反応性ポリペプチド組成物であって、各アミノ酸配列が、HCV エンベロープポリペプチドの可変ドメイン中に存在する少なくとも 1 つのエピトープを含有し、ここで、該可変ドメインのアミノ酸配列が互いに異質性であり、別個の HCV 単離体由来であり、そして各アミノ酸配列は全長のエンベロープタンパク質より長くない、組成物。

【請求項 2】

複数の抗原のセットを含有する請求項 1 に記載の免疫反応性組成物であって、ここで、(a) 各抗原のセットが、HCV エンベロープポリペプチドの可変ドメイン中に存在する少なくとも 1 つのエピトープを含有する複数の同一配列からなり、そして (b) 1 つのセットの該エピトープのアミノ酸配列が、少なくとも 1 つの他のセットのアミノ酸配列に関して異質性である、免疫反応性組成物。 10

【請求項 3】

前記別個の HCV 単離体が、HCV I 群単離体および HCV II 群単離体を含む、請求項 1 に記載の免疫反応性組成物。

【請求項 4】

前記可変ドメインが、E2/N S1 タンパク質中に存在する、請求項 1 に記載の免疫反応性組成物。

【請求項 5】

前記可変ドメインが、E1 タンパク質中に存在する、請求項 1 に記載の免疫反応性組成物。 20

【請求項 6】

各アミノ酸配列が、HCV エンベロープポリペプチドの第二の可変ドメイン中に存在するエピトープをさらに含有し、ここで、アミノ酸配列の第二の可変ドメインが互いに異質性であり、そして別個の HCV 単離体由来である、請求項 1 に記載の免疫反応性組成物。

【請求項 7】

前記第一の可変ドメインが、E2/N S1 タンパク質中に存在し、そして前記第二の可変ドメインが、E1 タンパク質中に存在する、請求項 6 に記載の免疫反応性組成物。

【請求項 8】

免疫反応性組成物を調製する方法であって： 30

(a) 請求項 1 から 7 のいずれかに記載の免疫反応性ポリペプチド組成物を形成する工程；

(b) 適切な賦形剤を提供する工程；および

(c) (a) の免疫反応性組成物と (b) の賦形剤とを混合する工程を包含する、方法。

【請求項 9】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の免疫反応性ポリペプチド組成物の有効量を非ヒト哺乳動物に投与する工程を包含する、抗 HCV 抗体を産生する方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法によって製造される、ポリクローナル抗体組成物。 40

【請求項 11】

HCV に対するヒト抗体の存在または非存在を検出するためのインビトロ検出方法であって：

HCV に対する抗体を含有すると推測される生物学的試料と、請求項 1 に記載の免疫反応性ポリペプチド組成物とを、該ポリペプチド組成物と該生物学的試料中の抗体とが抗原 - 抗体複合体を形成するに十分な時間および条件下で接触させる工程；および

該免疫反応性ポリペプチドを含有する抗原 - 抗体複合体の形成を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 12】

前記免疫反応性ポリペプチド組成物が、請求項 2 に規定された組成物である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記免疫反応性ポリペプチド組成物が、請求項 3 に規定された組成物である、請求項 1 1 または 1 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4】

前記可変ドメインが、H C V ゲノムの E 1 および E 2 / N S 1 ドメインからなる群より選択される、請求項 1 1 または 1 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

前記可変ドメインが、H C V ゲノムの E 1 ドメイン由来である、請求項 1 4 に記載の方法 10

【請求項 1 6】

前記可変ドメインが、H C V ゲノムの E 2 / N S 1 ドメイン由来である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載の免疫反応性ポリペプチド組成物を含有する、生物学的試料中の H C V に対する複数の抗体を検出するためのキットであって、ここで、該組成物が適切な容器中にパッケージされている、キット。

【請求項 1 8】

少なくとも 2 つの H C V アミノ酸配列を含む免疫反応性ポリペプチドをコードする D N A 20
分子であって、各アミノ酸配列が、H C V エンベロープポリペプチドの可変ドメイン中に存在する少なくとも 1 つのエピトープを含有し、ここで、該可変ドメインのアミノ酸配列が互いに異質性であり、別個の H C V 単離体由来である、D N A 分子。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の D N A 分子を含む、宿主細胞。

【請求項 2 0】

前記 D N A 分子が、前記ポリペプチドの発現を引き起こし得る制御配列を含む、請求項 1 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 1】

前記ポリペプチドの発現を提供する条件下で、請求項 2 0 に記載の宿主細胞群を増殖させる工程を包含する、組換えタンパク質を製造する方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、一般的に、免疫反応性ポリペプチド組成物、この組成物を免疫学的な適用において用いる方法、ならびにこの組成物を製造するための物質および方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

C 型肝炎ウイルスは、最近では、輸血後の非 A 非 B 型肝炎 (N A N B H) の原因となる主な因子、および集団獲得 (c o m m u n i t y - a c q u i r e d) N A N B H の重大 40
な原因として同定されている。このウイルスのゲノム配列を得るための物質および方法は、公知である。例えば、P C T 公開第 W O 8 9 / 0 4 6 6 9 号、第 W O 9 0 / 1 1 0 8 9 号、および第 W O 9 0 / 1 4 4 3 6 号を参照のこと。

【0 0 0 3】

H C V ゲノムの分子的特徴は、約 3 0 1 1 個のアミノ酸からなるポリタンパク質をコードする約 1 0 , 0 0 0 個のヌクレオチドを含有する正の極性の R N A 分子であるということを示す。その証拠となる数種の系は、H C V がフラビウイルスおよびペスチウイルスを包含するフラビウイルス (F l a v i v i r i d a e) 科のウイルスと同様の遺伝子構成を有することを示唆する。そのペスチウイルスおよびフラビウイルスの系統と同様に、H C V は、個々のウイルスのタンパク質 (構造および非構造の両者) がプロセッシングによ 50

って生じる、大きなポリタンパク質前駆体をコードすると考えられる。

【0004】

RNA含有ウイルスは、比較的高い割合の自然変異、すなわち報告によると、組み込まれているヌクレオチドあたりおよそ 10^{-3} から 10^{-4} の割合で自然変異を有する。従って、異質性(heterogeneity)および遺伝子型の流動率はRNAウイルスでは共通であるので、多様なウイルスの単離体が存在し得る。その単離体は、HCV種においてビルレントまたは非ビルレントであり得る。

【0005】

HCVの異なる単離体の多くが、現在同定されている。これらの単離体の配列は、RNAウイルスの限定された異質性の特徴を示す。

10

【0006】

単離体HCV J1.1は、以下の刊行物に記載されている：Kubo、Y.ら(1989) Japan. Nucl. Acids Res. 17:10367-10372; Takeuchi, K.ら(1990) Gene 91:287-291; Takeuchiら(1990) J. Gen. Virol. 71:3027-3033; Takeuchiら(1990) Nucl. Acids Res. 18:4626。

【0007】

2つの独立した単離体(「HCV-J」および「BK」)の5'-および3'-末端の配列を加えた完全コード配列は、それぞれ、KatoらおよびTakamizawaraによって記載されている(Katoら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9524-9528; Takamizawara(1991) J. Virol. 65:1105-1113)。

20

【0008】

HCV単離体について記載されている他の刊行物は、以下のとおりである：

「HCV-1」：Chooら(1990) Brit. Med. Bull. 46:423-441; Chooら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2451-2455; Hanら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1711-1715; European Patent Publication No. 318,216。

【0009】

「HC-J1」および「HC-J4」：Okamotoら(1991) Japan J. Exp. Med. 60:167-177。

30

【0010】

「HC-18」、「HC-23」、「Th」、「HC-27」、「EC1」および「EC10」：Weinerら(1991) Virol. 180:842-848。

【0011】

「Pt-1」、「HCV-K1」および「HCV-K2」：Enomotoら、日本においては、2つの主要なタイプのC型肝炎がある。Division of Gastroenterology、Department of Internal Medicine、Kanazawa Medical University、Japan。

40

【0012】

クローン「A」、「C」、「D」および「E」：Tsukiyama Koharaら、肝炎ウイルスの第2群、Virus Genes。

【0013】

診断およびワクチンの戦略に対する典型的なアプローチは、保存されたウイルスのドメインに注目することである。しかし、このアプローチは、可変ドメインにおいて存在し得る重要なエピトープを無視するという不利益を生む難点がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

50

診断およびワクチンに有用なポリペプチド組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の目的は、多数のHCV単離体（特にこのウイルスの異質性（heterogeneous）ドメインに関して）と免疫学的に交差反応性であるポリペプチド組成物を提供することである。

【0016】

多くの重要なHCVエピトープは、ウイルスの単離体の間では変化し、そしてこれらのエピトープは、特定のドメインに位置づけられ得ることが発見された。この発見は、（保存されたドメインよりもむしろ）可変ドメインに注目する免疫学的に交差反応性のポリペプチド組成物を製造するという戦略を可能にする。 10

【0017】

従って、本発明の1実施態様は、ポリペプチドを含む免疫反応性組成物である。ここで、このポリペプチドは、HCVの第一の可変ドメイン中のエピトープのアミノ酸配列を含有し、そして別個のHCV単離体の第一の可変ドメイン由来の少なくとも2種の異質性アミノ酸配列が、この組成物中に存在する。

【0018】

本発明の別の実施態様は、複数の抗原セットを含有する免疫反応性組成物である。ここで、（a）各抗原セットは、HCV単離体の第一の可変ドメイン中に存在するエピトープのアミノ酸配列を含む複数の実質的に同一のポリペプチドからなり、そして（b）1つのセットのエピトープのアミノ酸配列は、類似の配列を有する少なくとも1つの他のセットのアミノ酸配列に関して異質性である。 20

【0019】

本発明の別の実施態様は、複数のポリペプチドを含有する免疫反応性組成物であって、ここで各ポリペプチドは次式を有する：

$$R_r - (SV_n)_x - R'_r$$

ここで、

RおよびR'は、約1 - 2000個のアミノ酸からなるアミノ酸配列であり、そしてそれらは同一であるかまたは異なり；

rおよびr'は、0または1であり、そしてそれらは同一であるかまたは異なり； 30

Vは、HCV可変ドメインの配列を含有するアミノ酸配列であって、ここで、該可変ドメインは、少なくとも1個のエピトープを含有し；

Sは、1以上の整数であり、選択された可変ドメインを表し；そして

nは、1以上の整数であり、異なるnの値を有する少なくとも1種の他の単離体に関して、所定のSVで選択された異質性HCV単離体を表し、そしてnは各xに対して独立して選択され；

xは、1以上の整数であり；そして

ただし、アミノ酸配列は、（i）1V₁および1V₂、（ii）1V₁および2V₂、および（iii）1V₁および2V₁からなる群から選択される組合せを表す組成物中に存在する。 40

【0020】

本発明のさらに別の実施態様は、以下の（a）、（b）および（c）を包含する、HCVの処置のための免疫原性の薬剤組成物を調製する方法である：

（a）上記免疫反応性組成物を提供すること；

（b）適切な賦形剤を提供すること；および

（c）哺乳動物へ投与することにより免疫原性の応答を提供する割合で、（a）の免疫反応性組成物と（b）の賦形剤とを混合すること。

【0021】

本発明のさらに別の実施態様は、上記免疫反応性組成物の有効量を哺乳動物に投与することを包含する、抗HCV抗体を産生する方法である。 50

【 0 0 2 2 】

本発明のさらに別の実施態様は、以下の (a)、(b)、(c) および (d) を包含する、生物学的試料中で H C V に対する抗体を検出する方法である：

(a) H C V に対する抗体を含有すると推測される生物学的試料を提供すること；

(b) 上記免疫反応性組成物を提供すること；

(c) 抗原 - 抗体複合体が形成されるような条件下で、(a) の生物学的試料と (b) の免疫反応性組成物とを反応させること；および

(d) 必要に応じて、(a) の免疫反応性組成物と (b) の生物学的試料の抗体との間で形成される抗原 - 抗体複合体の形成を検出すること。

【 0 0 2 3 】

本発明の別の実施態様は、適切な容器中に入れられた上記免疫反応性組成物を含有する生物学的試料中で、H C V に対する抗体を検出するためのキットである。

【発明の効果】

【 0 0 2 4 】

本発明の発明によれば、診断およびワクチンに有用な、多数の H C V 単離体（特にこのウイルスの異質性ドメインに関して）と免疫学的に交差反応性であるポリペプチド組成物が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 2 5 】

発明の実施においては、指示されない限り、当該分野の技術範囲内にある分子生物学、微生物学、組換え DNA、および免疫学における従来の手法が採用される。このような手法は、文献中に詳しく説明されている。例えば、次の文献を参照のこと：M a n i a t i s , F i t s c h および S a m b r o o k , M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L (第 2 版 , 1 9 8 9) ; D N A C L O N I N G , I 巻および II 巻 (D . N G l o v e r 編 , 1 9 8 5) ; O L I G O N U C L E O T I D E S Y N T H E S I S (M . J . G a i t 編 , 1 9 8 4) ; N U C L E I C A C I D H Y B R I D I Z A T I O N (B . D . H a m e s および S . J . H i g g i n s 編 , 1 9 8 4) ; T R A N S C R I P T I O N A N D T R A N S L A T I O N (B . D . H a m e s および S . J . H i g g i n s 編 , 1 9 8 4) ; A N I M A L C E L L C U L T U R E (R . I . F r e s h n e y 編 , 1 9 8 6) ; I M M O B I L I Z E D C E L L S A N D E N Z Y M E S (I R L P r e s s , 1 9 8 6) ; B . P e r b a l , A P R A C T I C A L G U I D E T O M O L E C U L A R C L O N I N G (1 9 8 4) ; M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y のシリーズ (A c a d e m i c P r e s s , I n c .) ; G E N E T R A N S F E R V E C T O R S F O R M A M M A L I A N C E L L S (J . H . M i l l e r および M . P . C a l o s 編 , 1 9 8 7 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y) ; M e t h o d s i n E n z y m o l o g y V o l . 1 5 4 および V o l . 1 5 5 (それぞれ、W u および G r o s s m a n 、および W u 編) 、M a y e r および W a l k e r 編 (1 9 8 7) ; I M M U N O C H E M I C A L M E T H O D S I N C E L L A N D M O L E C U L A R B I O L O G Y (A c a d e m i c P r e s s , L o n d o n) 、S c o p e s (1 9 8 7) ; P R O T E I N P U R I F I C A T I O N : P R I N C I P L E S A N D P R A C T I C E , S e c o n d E d i t i o n (S p r i n g e r - V e r l a g , N . Y .) 、および H A N D B O O K O F E X P E R I M E N T A L I M M U N O L O G Y , I ~ I V 巻 (D . M . W e i r および C . C . B l a c k w e l l 編 , 1 9 8 6) ; I M M U N O A S S A Y : A P R A C T I C A L G U I D E (D . W . C h a n 編 , 1 9 8 7) 。本明細書中で述べられる前述および後述の全ての特許、特許出願および刊行物は、本明細書中に参考として援用されている。

【 0 0 2 6 】

H C V は、フラビウイルス (F l a v i v i r i d a e) 科の新しいメンバーである。フラビウイルス (F l a v i v i r i d a e) 科には、ペスチウイルス (ブタコレラウイ

10

20

30

40

50

ルスおよびウシウイルス性下痢性ウイルス) およびフラビウイルスが包含される。フラビウイルスの例には、デング熱ウイルスおよび黄熱病ウイルスがある。H C V の遺伝学的構成の図を図 1 に示す。フラビウイルスおよびペスチウイルスと同様に、H C V は、ウイルスのポリタンパク質の N 末端の基本的なポリペプチドドメイン(「C」)、続いて 2 種の糖タンパク質ドメイン(「E1」, 「E2/NS1」)を、コードすると考えられ、これらは非構造遺伝子 NS2 から NS5 の上流にある。この推定タンパク質ドメインのアミノ酸座標を表 1 に示す。

【0027】

【表1】

表 1. H C V 中の推定タンパク質ドメイン アミノ酸座標(約)	タンパク質						
	C	E1	E2/NS1	NS2	NS3	NS4	NS5
1 - 191							
192 - 383							
384 - 750							
751 - 1006							
1007 - 1488							
1489 - 1959							
1960 - 3011							

上記のように、多数の H C V 単離体が同定されている。完全および部分 H C V 配列の比較配列分析により、ヌクレオチドおよびアミノ酸レベルでの相同性に基づいて、H C V 単

10

20

30

40

50

離体が、少なくとも3つの基本群に広く細分され得ることが分かる(表2)。Houghtonら(1991)Hepatology 14:381-388を参照のこと。しかし、III群における単離体では、部分配列しか得られない。それゆえ、これらの単離体の配列がより明らかになると、これらの1つまたはそれ以上の単離体は、4番目となり得る群を含む別の群に分離されるべきである。表3は、ヌクレオチド配列から推定される種々のHCV単離体の個々のウイルスタンパク質の間での配列相同性を示す。同じウイルス群のタンパク質は、種々のウイルス群によりコードされる同じタンパク質よりも高い配列類似性を示すと考えられ得る(表3)。これに対する1つの例外は、現在まで全てのIおよびII群のウイルス単離体配列の間で高度に保存されているヌクレオキャプシドタンパク質である。(表3では、記号N/Aは、比較により得られなかった配列を示す。)従って、本発明のためには、I群の単離体は、本明細書中でI群として分類される単離体に対して、アミノ酸レベルで約90%またはそれ以上の相同性であるそれらのウイルスタンパク質、特に、E1およびE2/NS1タンパク質を有する単離体として定義され得る。II群は類似の方法で定義される。それ以上の群については、同様に、始原型単離体に対してウイルスタンパク質の相同性によって定義され得る。下位群はまた、所定のタンパク質、例えば、E1、E2/NS1またはNS2タンパク質における相同性により、または単により高い相同性レベルにより定義され得る。

10

【0028】

【表2】

表 2. C型肝炎ウイルスゲノムRNA配列の3つの基本群への分類

20

<u>HCV I</u>	<u>HCV II</u>	<u>HCV III</u>
HCV-1	HCV-J1.1	クローン A, C, D&E
HC-J1	HC-J4	HCV-K2 (a&b)
HCT 18	HCV-J	
HCT 23	BK	
Th	HCV-K1	
HCT 27		
EC1		
Pt-1		

30

【0029】

【表 3】

表 3. 種々の HCV 単離体によりコードされた推定ウイルスエンベロープタンパク質間のアミノ酸配列の類似性 (%)

HCV 群	C	E1	E2/NS1	NS2	NS3	NS4	NS5
<u>I と比較して</u>							
I	98-100	94-100	N/A	N/A	N/A	N/A	99-100
II	97-98	77-79	78-81	75-77	91-92	90-93	84-88
III	N/A	N/A	N/A	N/A	86	76-80	71-74
<u>II と比較して</u>							
II	98-100	92-100	89-100	93-100	94-100	97-100	95-100
III	N/A	N/A	N/A	N/A	84	76	74-75
<u>III と比較して</u>							
III	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	91-100	89-100

10

20

E 1 および E 2 / N S 1 遺伝子によりコードされた推定ウイルスエンベロープタンパク質は、I 群および II 群の間で実質的なアミノ酸配列の変異を示すことを注目すべきである。C、N S 3、N S 4 および N S 5 タンパク質が全て、両群の間でより高い配列保存性を示しているのに対し、N S 2 だけがかなりの割合の異質性を示す。I 群および II 群の間での推定ビリオンエンベロープタンパク質で見られる配列変異により、2 つの群間でのアミノ酸の特徴的な区別が可能になる。この例を図 2 および 3 に示す。この図 2 および 3 では、E 1 遺伝子産物の配列が I 群および II 群のウイルス間で比較される。H C V の I 群および II 群のヌクレオチド配列から推定された E 1 アミノ酸配列が示される。これらの図では、横線は H C V - 1 と配列が同一であることを示す。星印は、アミノ酸の群特異的な区別を示す；群特異的残基は、明確に定義され得る。I 群の配列は、H C V - 1、H C T 1 8、H C T 2 3、H C T 2 7、および H C - J 1 である。II 群の配列は、H C - J 4、H C V - J、H C V J 1 . 1、および B K である。このようなアミノ酸の群特異的な区別はまた、E 2 / N S 1 遺伝子によりコードされた g p 7 2 を含む他の遺伝子産物中にも存在する。図 4 ~ 6 は、I 群と II 群とを区別する H C V 単離体の推定 E 2 / N S 1 領域の比較アミノ酸配列を示す。後者のタンパク質はまた、ほとんどすべての単離体の間の大きな変異を示す約 3 0 個のアミノ酸からなる N - 末端超可変領域（「H V」）を含む。Weiner ら（1991）上記を参照のこと。この領域は、H C V - 1 のアミノ酸番号付けシステムを用いて、アミノ酸 3 8 4 位から 4 1 4 位までに生じる。

30

40

【0030】

推定 H C V エンベロープ糖タンパク質 E 2 / N S 1 は、ペスチウイルス属の g p 5 3（B V D V）/ g p 5 5（ブタコレラウイルス）エンベロープポリペプチドおよびフラビウイルス属の N S 1 に相当し得る。この両ポリペプチドは、これらのポリペプチドでワクチン接種した宿主に防御免疫を与える。

【0031】

超可変領域（「H V」）と H I V - 1 g p 1 2 0 V 3 ドメインとの間での配列変異度に関して著しい類似性、限定された二次構造の欠如、および推定抗体結合に関するアミノ酸変化の予期された効果により、H V ドメインが中和抗体をコードしていることが示唆される。

50

【0032】

ドメインの免疫原性は、実施例に記載の抗体エピトープマッピング実験により示される。これらの研究の結果により、HCVの3つの主要群に加え、さらにHV特異的部分群が存在することが示唆される。

【0033】

HCV誘導NANBHの個体から得た生物学的試料を分析することより、個体は同時に2つまたはそれ以上のHCV変異体を保有し得ることが示される。2つの共在HV変異体は、1つの個体J1の血漿中で見い出された。さらに、肝炎の間欠性発赤になっている慢性NANBHの個体の遺伝子の部分配列決定により、個体Qが2つのHCV変異体(Q1またはQ3)に感染していることが示された。各々の変異体は、この疾患の1つのエピソード(episode)にのみ関連していた。Q1またはQ3特異的ペプチド(アミノ酸396-407位)を用いるELISAにより、Qは、Q1ペプチドに反応する抗体を発生するが、対応するQ3ペプチドに反応する抗体を発生しないことが示されたので、Qの疾患の再発は、HV変異体の出現のために起こることが示唆された。疾患の第2のエピソードの間、Q1ペプチドに対する抗体は存在するが、Q3ペプチドに対する体液性免疫応答が欠如していることにより、HVドメインの変異が免疫選択の圧力から生じ得ることが示唆される。アミノ酸396~407位は、HVドメインにおける最も高い選択圧にかけられて得られたと思われる。これらの発見は、疾患に関連した高レベルの慢性度が、HCV感染に対する不適当な免疫宿主応答および/または免疫回避の有効なウイルス機構に依存し得るという説を支持する。さらに、それらは、E2/NS1 HV領域がウイルスエスケープ機構および/または不適当な免疫応答機構に含まれる遺伝子領域であることを示している。

10

20

【0034】

上記のように、HCVゲノム内にはいくつかの変異領域が存在する。これらの1つまたはそれ以上の領域は、おそらく、ウイルスエスケープ機構および/または不適当な免疫応答機構に含まれる。それゆえ、これらの変異体に対する免疫応答を誘導し得るHCVポリペプチドを処置するための組成物に含まれることが望ましい。

【0035】

ゲノムのE1およびE2/NS1領域が推定エンベロープ型ポリペプチドをコードしているので、これらの領域は、免疫原性に関して特に重要である。このため、これらの領域は、HCV感染に対して個体を防御する免疫応答を誘導および/または増強し、そして感染個体の疾患の慢性的な再発の予防を助けることが特に望ましい領域の中にある。さらに、これらの領域は、感染、さらに重複感染または2つまたはそれ以上の変異体による共感染の経過中に生じるHCV変異体を検出することが望ましい領域の中にある。

30

【0036】

本発明は、HCV感染、特に慢性HCV感染の予防のために、個体を処置するための組成物および方法を記載している。さらに、本発明は、生物学的試料中の抗HCV抗体の存在を検出するための組成物および方法を記載している。この後者の方法は、免疫学的に異なるHCVエピトープに対する応答で生じる抗HCV抗体を同定するのに特に有用である。この方法はまた、感染個体内のHCVの多様な変異体の進化を研究するのに用いられ得る。本発明の考察において、以下の定義が適用される。

40

【0037】

「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸の重合体を意味し、特定の長さの生産物を意味しない。従って、ポリペプチドの定義には、ペプチド、オリゴペプチド、およびタンパク質が含まれる。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾物、例えば、グリコシル化物、アセチル化物、リン酸化物などを意味しないか、あるいは除外する。この定義に含まれるものは、例えば、アミノ酸(例えば、非天然のアミノ酸を含む)の1つまたはそれ以上の類似体を含むポリペプチド、置換された結合ならびに当該技術分野で公知の天然に存在するおよび天然に存在しない他の改変を有するポリペプチドである。

【0038】

50

本明細書中で用いられるように、Aの重量が、AとBとを合わせた重量の少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、そして最も好ましくは少なくとも約90%であるとき、AはBから「実質的に単離される」とする。本発明のポリペプチド組成物は、好ましくは、ヒトまたは他の霊長類の組織（これには血液、血清、細胞溶解物、細胞小器官、細胞のタンパク質などが包含される）および細胞培養培地を実質的に含まない。

【0039】

「組換え体ポリヌクレオチド」とは、ゲノム、cDNA、半合成、もしくは合成起源のポリヌクレオチドを意味し、その起源もしくは操作によって、（1）このポリヌクレオチドが天然に関連しているポリヌクレオチドの全体もしくは一部分と関連していないもの、（2）このポリヌクレオチドが天然で連結しているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに連結されているもの、または（3）天然に存在しないものを意味する。

【0040】

「ポリヌクレオチド」とは、任意の長さを持ったポリマー形態のヌクレオチド（リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド）である。この用語は、分子の一次構造のみを意味する。従って、この用語には、二本鎖DNAおよび一本鎖DNA、ならびに二本鎖RNAおよび一本鎖RNAが含まれる。この用語にはまた、既知の型の改変、例えば当該分野において既知の標識、メチル化、「キャップ」、類似体による1つまたはそれ以上の天然に存在するヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間の改変、例えば非荷電結合を有するもの（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）、例えばタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）のようなペンダント部分を含むもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を有するもの、キレート化剤（例えば、金属、放射性金属など）を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された結合（例えば、アルファアノマー核酸など）を有するもの、ならびに未修飾形態のポリヌクレオチドが含まれる。

【0041】

単細胞因子として培養される微生物もしくは高等真核細胞系を示す「組換え体宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系」、「細胞培養物」などの用語は、組換え体ベクターもしくは他の転移ポリヌクレオチドの受容体として使用可能か、または使用されてきた細胞を意味し、トランスフェクトされた元の細胞の後代が含まれる。単一の親細胞の後代は、自然の、偶発的または故意の変異によって、形態、またはゲノムもしくは全DNAの相補性が元の親細胞と、必ずしも完全に同一でなくてもよい。

【0042】

「レプリコン」には、例えばプラスミド、染色体、ウイルス、コスミッドなどのあらゆる遺伝的要素であり、それらは細胞内でポリヌクレオチドの複製の自律的な単位として挙動し、すなわち自ら制御しながら複製を行うことができる。

【0043】

「ベクター」は、オープンリーディングフレームの複製および/または発現を提供する配列をさらに含むレプリコンである。

【0044】

「制御配列」は、ある種のポリヌクレオチド配列を意味し、この配列が連結しているコード配列を発現させるのに必要なものである。このような制御配列の性質は、宿主の生物によって異なる。このような制御配列としては、原核細胞内では、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、およびターミネーターが含まれ、真核細胞内では、一般に、プロモーター、ターミネーター、および場合によってはエンハンサーが含まれる。「制御配列」という用語は、最小限発現に必要なすべての要素を包含し、さらに発現に有利な追加の要素、例えば分泌を制御するリーダー配列を包含し得る。

【0045】

「プロモーター」は、DNAテンプレートにRNAポリメラーゼを結合させるコンセンサス配列を含むヌクレオチド配列であり、その結合は、mRNAの製造が、隣接する構造遺伝子の通常の転写開始部位で開始するような方法で行われる。

【 0 0 4 6 】

「作動可能に連結された」と用語は、上記のような要素が、意図した方式で機能し得るような関係に並置されていることを意味する。コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、制御配列に適合した条件下でこのコード配列の発現が達成されるように、連結される。

【 0 0 4 7 】

「オープンリーディングフレーム」(ORF)は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の領域であり、この領域は、コード配列の一部またはコード配列全体を意味する。

【 0 0 4 8 】

「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合に、mRNAに転写され、および/また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って決定される。コード配列は、mRNA、DNA(これにはcDNAが包含される)、および組換え体ポリヌクレオチド配列を包含し得るが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 4 9 】

本明細書中で用いられるように、「エピトープ」または「抗原決定基」とは、免疫反応性の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3~5個のアミノ酸で構成され、そしてより一般的には少なくとも約8個、またはさらには約10個のアミノ酸で構成されている。本明細書中で用いられるように、所定のポリペプチドのエピトープは、その所定のポリペプチドにおけるエピトープと同様のアミノ酸配列を有するエピトープ、およびその免疫学的な等価物を意味する。

【 0 0 5 0 】

「抗原」は、1個またはそれ以上のエピトープを含有するポリペプチドである。

【 0 0 5 1 】

「免疫原性」とは、細胞性免疫応答および/または体液性免疫応答を誘導する能力を意味する。免疫原性応答は、単独で免疫反応性のポリペプチドによって誘導され得るか、またはアジュバントの存在下または非存在下での担体の存在を必要とし得る。

【 0 0 5 2 】

「免疫反応性」は、(1)抗体および/またはリンパ球抗原リセプターに免疫学的に結合する能力、または(2)免疫原性である能力を意味する。

【 0 0 5 3 】

「抗体」は、特定のエピトープと結合する任意の免疫グロブリンであり、これには免疫グロブリンの抗体およびフラグメントが包含される。この用語は、とりわけ、ポリクローナル、モノクローナル、およびキメラ抗体を包含する。キメラ抗体の例は、米国特許第4,816,397号および第4,816,567号で論じられている。

【 0 0 5 4 】

「抗原セット」は、複数の実質的に同一のポリペプチドからなる組成物として定義され、ここでこのポリペプチドは、定義されたエピトープのアミノ酸配列を含む。

【 0 0 5 5 】

「実質的に同一のポリペプチド」とは、ポリペプチドの製造方法(例えば、組換え体発現、化学合成、組織培養など)が原因となる、配列またはサイズの変化の典型的な範囲に限定される変化以外は同一であるポリペプチドを意味する。この変化は、実質的に同一のポリペプチドの組成物(例えば、この組成物は同一のポリペプチドの組成物として免疫学的に作用する)の所望の機能的な性質を改変しない。この変化は、例えば、このポリペプチドの移送の間の分泌過程から、化学合成などにおいて100%未満の効力を生じる改変によるものであり得る。

【 0 0 5 6 】

本明細書中で用いられるように、ウイルスのタンパク質の「可変ドメイン」または「VD」は、少なくとも2種のHCV単離体または亜集団(subpopulation)の

10

20

30

40

50

間で矛盾がないパターンのアミノ酸の変化を示すドメインである。好ましくは、このドメインは、少なくとも1個のエピトープを含有する。可変ドメインは、1個だけのアミノ酸変化により単離体から単離体へ変化し得る。これらの単離体は、同じまたは異なったHCV群または亜群に由来し得る。可変ドメインは、単離体中の配列の組成から容易に同定され得、そしてこれらの技法は下記のとおりである。本発明を説明するために、可変ドメインは、図15～32に示されるようにHCV-1のゲノムによってコードされるポリタンパク質のアミノ酸番号に関して、1位で示されるイニシエーターのメチオニンと共に定義される。別のHCV単離体における対応の可変ドメインは、任意の可変ドメイン以外の保存ドメインを最大限に整列させる方法で2種の単離体の配列を整列させることにより決定される。これは、いかなる多くのコンピューターのソフトウェアパッケージ（例えば、ALIGN1.0、これはUniversity of Virginia, Department of Biochemistry から入手可能である（註：Dr. William R. Pearson））でなされ得る。Pearsonらの（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448を参照のこと。特定の可変ドメインによって定められるアミノ酸番号は、幾分主観的であり、かつ選択の問題であることが理解されるべきである。従って、可変ドメインの開始および終止は、他に指示がない限り、近似であり、および、ドメインまたはサブドメインと部分的に重複することを包含することが理解されるべきである。

10

【0057】

エピトープは、所定のポリペプチドにおける別のエピトープに免疫学的に結合する抗体と交差反応するとき、その所定のポリペプチドにおけるそのエピトープの「免疫学的等価物」である。

20

【0058】

典型的に、エピトープは、位置づけられ、少なくとも約5個のアミノ酸、時折少なくとも約8個のアミノ酸、およびさらに、約10個またはそれ以上のアミノ酸を含む。

【0059】

HCVエピトープを含むアミノ酸配列は、別のポリペプチド（例えば、担体タンパク質）と、共有結合によってまたは融合ポリヌクレオチドを発現させて融合タンパク質を形成させることによって、そのいずれかにより、連結され得る。所望ならば、アミノ酸配列は、エピトープの多数の繰り返しを挿入し得るかまたは結合し得、および/または種々のエピトープを組み入れ得る。担体タンパク質は、いかなる源からでも誘導され得るが、一般に比較的大きい免疫原性タンパク質、例えば、BSA、KLHなどである。所望ならば、担体タンパク質は、実質的に完全な長さのHCVタンパク質を担体として使用し得、免疫原性エピトープの数を増やす。あるいは、HCVエピトープ由来のアミノ酸配列は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端にて、非HCVアミノ酸配列と連結し得、従って、このポリペプチドは、「融合ポリペプチド」となる。類似型のポリペプチドは、他の所定のウイルスのタンパク質由来のエピトープを用いて、構築され得る。

30

【0060】

所定のポリペプチドの「変異体」とは、その所定のポリペプチドのアミノ酸配列が、その配列において1個またはそれ以上のアミノ酸の欠失、置換、付加または転位によって改変されたポリペプチドを意味する。変異体が生じる（例えば、組換えによって）または変異体が作られる（例えば、部位特異性変異誘発）方法は、当該分野において周知である。

40

【0061】

「形質転換」とは、外因性ポリヌクレオチドを宿主細胞に挿入することを意味する。なお、挿入法は、どんな方法でもよく、例えば、直接取込み法、形質導入法（これにはウイルス感染が包含される）、f-交配法、またはエレクトロポレーション法がある。外因性ポリヌクレオチドは、組込まれていないベクター、例えば、プラスミドまたはウイルスのゲノムとして保持されていても、あるいは宿主ゲノムに組込まれていてもよい。

【0062】

「個体」とは、脊椎動物、特に哺乳動物種のメンバーを意味し、げっ歯動物（例えば、

50

マウス、ラット、ハムスター、モルモット)、ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、および霊長類(チンパンジー、アフリカミドリザル、ヒヒ、オランウータン、およびヒト)を包含するが、これに限定されるものではない。

【0063】

本明細書中で用いられるように、「処置」とは、(i)伝統的なワクチンのような、感染または再感染の予防、(ii)症状の低減または排除、および(iii)ウイルスの実質的な排除または完全な排除、のいずれをも意味する。処置は、(感染前に)予防として、または(感染後に)治療として行われ得る。

【0064】

「有効量」という用語は、投与される個体において免疫原性応答を誘導するか、または意図するシステム(例えば、イムノアッセイ)において別な方法で検出可能に免疫反応を起こすのに十分なエピトープを有するポリペプチドの量を意味する。好ましくは、この有効量は、上記のように処置をするのに充分である。必要な正確な量は、接種により変化する。ワクチン接種のために、またはポリクローナル抗血清/抗体の発生において、例えば、その有効量は、種、年齢、および個体の一般的な症状、処置される症状の重症度、選択される特定のポリペプチドおよび投与様式などに依存して変化する。有効量は、比較的広く、非臨界的な範囲にあることもまた、知られている。適切な有効量は、定型の実験だけを用いて容易に決定され得る。

【0065】

本明細書中で用いられるように、「生物学的試料」とは、個体から単離された組織または液体の試料をいう。これには、例えば、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、皮膚と呼吸器官と腸管と尿生殖器管の外側部分、涙、唾液、乳、血液細胞、腫瘍、器官、バイオプシー、およびさらに、インビトロでの細胞培養構成物(これには細胞培養培地で細胞を増殖させて得られる馴化培地、例えば、Ma b産生ミエローマ細胞、組換え細胞、および細胞成分を包含するが、これに限定されない)の試料を包含するが、これに限定されない。

【0066】

本発明の免疫反応性ポリペプチド組成物は、少なくとも1種のHCV V D由来の単離体特異性エピトープと群特異性エピトープとの混合物を含有する。従って、少なくとも2種の異質性アミノ酸配列がHCVタンパク質中に存在する。この異質性アミノ酸配列は、各々、同一かまたは実質的に同一の物理的な場所に位置する別個のHCV単離体において見い出されるエピトープを定義する。すなわち、各配列は、HCVゲノム/ポリペプチド内の同一の場所に位置づけられる。これらの配列は異質性であるので、その場所は可変ドメイン(V D)として言及される。

【0067】

本発明をより良く理解するために、第一に、本発明の組成物を作り出す個別のアミノ酸配列を説明する。次いで、本発明の組成物において見い出される複数のこのような配列について論じる。

【0068】

本発明のポリペプチドを特徴付けるアミノ酸配列は、以下のような基本的な構造を有する：

$$L_y - Z - L'_{y'} \quad (I)$$

Zは、選択されたHCV単離体由来のタンパク質の領域由来のアミノ酸配列を表す。ここで、この領域は、少なくとも1個の可変ドメインを含み、そしてこの可変ドメインは、少なくとも1個のエピトープを含む。LおよびL'は、非HCVアミノ酸配列であるかまたは可変ドメインを含まないHCVアミノ酸配列であり、ここで、LおよびL'は、同一または異なり得る。yおよびy'は、0または1であり、これらは同一または異なり得る。従って、式1は、HCV V Dの配列を含むアミノ酸配列を表し、ここで、V Dは、エピトープを含む。

【0069】

上記のように、Zにおけるエピトープは、通常、最小約5個のアミノ酸、より典型的に

10

20

30

40

50

は最小約 8 個のアミノ酸、およびさらに典型的には最小約 10 個のアミノ酸を含む。

【0070】

Z の可変ドメインは、1 個より多いエピトープを含み得る。

Z の可変ドメインは、存在するエピトープの配列を組み合わせたサイズと少なくとも同程度のサイズである。従って、このドメインに、ただ 1 つのエピトープが存在するならば、このドメインは、典型的には最小約 5 個のアミノ酸で作られる。エピトープが部分的に重複するとき、この可変ドメインにおける組み合わされたエピトープの最小アミノ酸配列は、その個々のエピトープの配列の合計より小さい。

【0071】

Z は、上記 V D を含む H C V 単離体のアミノ酸配列である。従って、Z の最小のサイズは V D の最小のサイズである。Z は、V D だけに比べて多くの H C V のアミノ酸配列を含み、そして 1 個より多くの V D をさらに含み得る。Z の最大のサイズは、臨界的ではないが、完全な H C V のポリタンパク質の長さを上回することは明らかに不可能である。しかし、典型的には、Z は、完全な H C V タンパク質（特に、E 1、E 2 / N S 1、N S 2、N S 3、N S 4 および N S 5）の配列であり、そしてより典型的にはこのような H C V タンパク質のフラグメントである。従って、Z は、好ましくは、最小約 5 個のアミノ酸（より好ましくは最小約 8 個または約 10 個のアミノ酸）から最大約 1100 個のアミノ酸（より好ましくは最大約 500 個、さらに好ましくは最大約 400 個、またはさらに好ましくは最大約 200 個のアミノ酸）の範囲である。より一般的には、式 I および / または Z のポリペプチドは、それらが例えば、化学合成により調製されるとき、最大約 50 個のアミノ酸、より典型的には最大約 40 個のアミノ酸、そしてさらに典型的には最大約 30 個のアミノ酸である。

【0072】

非 H C V アミノ酸配列、L および L' は、それらがもし存在するならば、多くのタイプのこのような配列のいずれをも構成する。例えば、L および L' は、下記のように、Z が組換え体発現を促進するために融合される非 H C V 配列（例えば、β - ガラクトシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、インペルターゼ、α - 因子、T P A リーダーなど）を表し得る。あるいは、L および L' は、他の病原体（例えば、B 型肝炎ウイルス、百日咳菌（*Bordetella pertussis*）、テタヌストキソイド、ジフテリアなど）のエピトープを表して、多くのこれらの他の病原体に免疫反応的に関連する組成物を提供し得る。L および L' は、ペプチド合成の際の固体支持体、イムノアッセイの支持体、ワクチン担体のタンパク質などへの結合を促進するアミノ酸配列であり得る。実際、L および L' は、機能的な利点のない 1 種またはそれ以上の不必要なアミノ酸をさらに含み得る。L または L' に対する臨界的な最大のサイズはなく、その長さは、一般的に所望の機能によって決定される。典型的に、L および L' は、各々、最大約 2000 個のアミノ酸、さらに典型的には最大約 1000 個のアミノ酸である。有用な性質を有する L および L' 配列の多くは、最大約 500 個のアミノ酸である。Z の免疫反応性をブロックしないように L および L' を選択することは、もちろん望ましい。

【0073】

本発明に従って提供されるポリペプチドの組成物は、それぞれ以下の式 I I および I I I によって定義される少なくとも 2 種のアミノ酸配列の組成物中に、（免疫反応的に有効量で）存在することによって特徴付けらる：

$$L_y - Z_1 - L'_y \quad (I I)$$

$$L_y - Z_2 - L'_y \quad (I I I)$$

L、L'、y および y' は上記のように定義され、そしてそれらは独立して式 I I および I I I の各々に対してもまた定義される。Z₁ および Z₂ は、各々、上記で Z について定義されたような H C V アミノ酸配列であり、同一の可変ドメイン（すなわち、物理的な場所）を含むが、Z₁ および Z₂ の共通の可変ドメインにおいて少なくとも 1 種の異質性エピトープをそれらの間に有する異なる H C V 単離体から誘導される。例示的な実施例として、式 I I に従ったアミノ酸配列は、Z₁ として、単離体 H C V - 1 のアミノ酸 384 - 41

10

20

30

40

50

4 位（またはさらに特定すると 396 - 407 位または 396 - 408 位のアミノ酸）にわたる超可変ドメインのフラグメントを有し、一方、Z₂は、単離体 HCV - J1.1 由来の類似のフラグメントである。これらの 2 種の単離体は、このドメインにおいて異質性であり、これらのエピトープのアミノ酸配列は、有意に変化する。

【0074】

本発明の組成物は、式 1 に従って丁度 2 個より多い別個のアミノ酸配列を含み得、そして Z の配列は異なる可変ドメインを含む群に分割され得ることが理解されるべきである。例えば、本発明に従う組成物は、（式 I に従うアミノ酸配列と共に）HCV 配列の群を含み得る。この配列は、単離体 HCV - 1、HCV - J1.1、HC - J1、HC - J4 などにより由来するアミノ酸 384 - 411 位のところで超可変ドメインを含む。この組成物はまた、（式 1 に従うアミノ酸と共に）HCV 配列のさらなる群を含み得る。この配列は、単離体 HCV - 1、HCV - J1.1、HC - J1、HC - J4 などによりさらに由来するアミノ酸 215 - 255 位のところで可変ドメインを含む。従って、本発明の組成物の関係においては、式 1 の配列は以下のようにさらに定義され得る：

$$SV_n \quad (IV)$$

V は、HCV 可変ドメインの配列を含むアミノ酸配列を表し、ここで、この可変ドメインは、少なくとも 1 種のエピトープ；すなわち、式 1 を含む。S および n は、1 またはそれ以上の整数である。S は特定の可変ドメインを表し、そして n は特定の単離体を表す。例えば、S = 1 はアミノ酸 384 - 411 位における可変ドメインを表し得；S = 2 はアミノ酸 215 - 255 位における可変ドメインを表し得；そして n = 1、2、3 および 4 は、それぞれ、単離体 HCV - 1、HCV - J1.1、HC - J1 および HC - J4 を表し得る。従って、上記の 2 つの群の配列は以下のように表され得る：

群 1：1V₁、1V₂、1V₃ および 1V₄

群 2：2V₁、2V₂、2V₃ および 2V₄

本発明に記載の組成物には、式 IV の少なくとも 2 種の別個の配列がある。すなわち、この組成物は、式 IV に従う 2 種の異なる配列を含有し、ここで S およびまたは n の値は異なる。例えば、少なくとも 1V₁ および 1V₂ が存在し、または少なくとも 1V₁ および 2V₂ が存在し、または少なくとも 1V₁ および 2V₁ が存在する。

【0075】

式 IV 中に含まれる別個の配列は、同一または異なるポリペプチド分子のいずれかにおける組成物中に存在する。1V₁ および 1V₂ の最小の組み合わせを用いて、これらの 2 種の配列は、同一のポリペプチド分子（例えば、1V₁ - 1V₂）または分離した分子中に存在し得る。本発明の組成物のこの特徴は、以下のようなポリペプチドの組成物として記載され得る：

$$Rr - (SV_n)_x - R'r' \quad (V)$$

ここで、S、V および n は、上記で定義のとおりであり；R および R' は、約 1 - 2000 個のアミノ酸のアミノ酸配列であり、そして同一または異なり；r および r' は、0 または 1 であり、そして同一または異なり；x は、1 以上の整数であり；n は、各 x に対して独立して選択され；ただし、これらのアミノ酸配列は、(i) 1V₁ および 1V₂、(ii) 1V₁ および 2V₂、および (iii) 1V₁ および 2V₁ からなる群より選択される組み合わせを表す組成物中に存在する。式 IV の別個の配列が異なるポリペプチド内にある実施態様においては、x は 1 であり得るが、所望であるなら 1 をさらに越え得る；例えば、ポリペプチド 1V₁ - 1V₂ と 1V₁ - 2V₂ との混合物。x が 1 であるとき、r および r' は好ましくは共に 0 であり、L_y および L'_y の重複を避ける。これは、V が式 I による好ましい実施態様によって記載され得るからである。x が 1 より大きいとき、R とその隣接する L とを組み合わせた長さ、および R' とその隣接する L' とを組み合わせた長さは、好ましくは、L および L' に関して上記の典型的な最大長より長くはない。

【0076】

この組成物の別個の V 配列中に含まれる HCV のアミノ酸配列の選択は、この配列の意図する適用に依存し、そして本発明の開示による当業者の範囲内である。第一に、本発明

10

20

30

40

50

に関するHCVエピトープは、2種のタイプに分かれ得ることが認められるべきである。エピトープの第一のタイプは、「群特異性」であるものであり、すなわち、HCV単離体の群中の全てのまたは実質的に全ての単離体における対応のエピトープは、互いに免疫学的に交差反応性であるが、他の群の実質的に全ての単離体の対応するエピトープを有しない。好ましくは、群特異性のクラスにおけるエピトープは、この群内に実質的に保存されるが、この群間またはこの群中には保存されない。エピトープの第二のタイプは、「単離体特異性」であるものであり、すなわち、このエピトープは、実質的に同一の単離体と免疫学的に交差反応し、そして全てのまたは実質的に全ての別個の単離体とは交差反応しない。

【0077】

これらの群特異性エピトープおよび単離体特異性エピトープは、本発明の開示によって容易に同定され得る。第一に、数種のHCV単離体の配列が、本明細書中に記載されているように、比較され、そして配列異質性の領域が同定される。通常、異質性のパターンは、群特異性または単離体特異性を示す。同定された領域が1個またはそれ以上のエピトープを含むことが周知であるならば、次いで、所望のエピトープを含むのに十分なサイズの配列は、本発明の組成物に含まれ得る可変ドメインとして選択される。所定の異質性領域の免疫反応性が周知でないならば、種々のHCV単離体のその領域内に見い出される配列を表すペプチドは、調製され得、そしてスクリーニングされ得る。スクリーニングは含まれ得るが、抗HCV抗体の種々の源（例えば、患者の血清、中和化Mabなど）によるイムノアッセイまたは抗体の発生、およびインビトロでウィルスを中和するためのそのような抗体の能力、に限定されない。あるいは、下記のようなスクリーニングのプロトコールで同定されるエピトープの遺伝子座は、種々の単離体の異質性およびスクローニングされた対応の異質性配列の免疫学的な性質について試験され得る。

【0078】

ワクチンの適用には、E1および/またはE2/NS1ドメイン由来の可変ドメインが、特に重要であると考えられる。特に、アミノ酸215-255内のE1可変ドメイン（図2および3参照）、およびアミノ酸384-414内のE2/NS1可変ドメイン（図4～6参照）は、重要な免疫反応性ドメインであるとして同定されている。予備的な証拠により、これらのドメインの片方または両方が、慢性HCV感染に通じるエスケープ変異体に反応し得る異質性の遺伝子座であり得ることが示唆される。従って、Vの可変ドメインがこれらの可変ドメインの片方または両方であるような、上記のようなポリペプチド組成物は、特に好ましい。さらに、本発明のポリペプチド組成物は、特に可変ドメイン中の一般的な線形エピトープに関連するが、配座エピトープもまた含有し得る。例えば、この組成物は、組換え体系（例えば、昆虫または哺乳動物細胞）で発現される、（異なる単離体の可変ドメインを示す）組換え体E1および/またはE2/NS1タンパク質の混合物を含み得る。この組換え体系は、可変ドメインの内側または外側のいずれかに配座エピトープを維持している。あるいは、配座エピトープを維持する単一の単離体由来のE1および/またはE2/NS1サブユニット抗原が、本発明に従って、ポリペプチド組成物と組み合わせられ得る（例えば、合成ペプチドまたは変性させた組換え体ポリペプチドの混合物）。ワクチンに対する別の好ましい適用では、本明細書中に記載のポリペプチド組成物を他のHCVサブユニット抗原と組み合わせ得る。例えば、同一人の所有する米国特許出願第

号に記載の抗原である。この出願のタイトルは、Robert O. Ralston, Frank Marcus, Kent B. Thudium, Barbara GervaseおよびJohn Hallにより、「C型肝炎ウイルスアジア口糖タンパク質」（アトニードケット番号0154,002）であって、本願と共に同日で出願しており、本明細書中に参考として援用されている。

【0079】

診断の適用には、抗原として本発明の組成物を用い、それにより、別個のHCV単離体に対する抗体を検出する能力を改善するのに有用であり得る。典型的には、このポリペ

10

20

30

40

50

チド混合物は、均質なまたは不均質なイムノアッセイ形式において直接用いられ得、後者では、好ましくは、ポリペプチドを固体基質（例えば、マイクロタイタープレートウェル、プラスチックビーズ、ニトロセルロースなど）上に固定することを包含する。例えば、PCT公開第WO90/11089；欧州公開公報第360,088号；IMMUNO ASSAY: A PRACTICAL GUIDE、上記を参照のこと。あるいは、本発明のポリペプチド組成物を作り出す実質的に同一の各ポリペプチドを別個の遺伝子座で同一の支持体上に固定し得、それにより抗体が産生される単離体または群についての情報が提供される。このことは、種々の単離体が、肝炎、癌、または種々の臨床予後を必要とする他の疾患を引き起こすならば、診断に特に重要である。好ましい形式は、Chiron RIBATM ストリップイムノアッセイ形式であり、これは、同一人の所有する米国特許出願第07/138,894号および米国特許出願第07/456,637号に記載されており、その開示内容は本明細書中に参考として援用されている。

10

【0080】

本発明の組成物の製造に有用なポリペプチドは、組換えによって、合成によって、または組織培養中で、製造され得る。切形型HCV配列または全長HCVタンパク質を含む組換え体ポリペプチドは、HCV配列（1個またはそれ以上のエピトープ、隣接しているかまたは隣接していないかのいずれかである）、または融合タンパク質中の配列から完全に製造され得る。融合タンパク質では、有用な異種（heterologous）配列は、組換え宿主からの分泌を提供するか、HCVエピトープの免疫反応性を高めるか、またはポリペプチドの支持体またはワクチン担体への結合を促進する配列を包含する。例えば、

20

【0081】

全長ポリペプチド、および切形型HCV配列を含むポリペプチド、およびそれらの変異体は、化学合成によって調製され得る。化学合成によってポリペプチドを調製する方法は、当該分野において周知である。それらはまた、組換え技術によっても調製され得る。HCV-1をコードするDNA配列、および他のHCV単離体由来の可変領域のDNA配列が、本明細書中に記載および/または参照されている。これらの配列の入手により、HCVポリペプチドの免疫反応性領域をコードするポリヌクレオチドの構築が可能である。

30

【0082】

HCVの可変ドメイン由来の1個またはそれ以上の免疫反応性HCVエピトープを含む所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されるか、または単離され、そして発現ベクター中に挿入され得る。このベクターは、 β -ガラクトシダーゼまたはスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）のような融合配列の部分を含み得るか、または含み得ない。SODの融合配列を含むポリペプチドの産生に有用な方法およびベクターは、1986年10月1日に公開された欧州公開公報第0196056号に記載されている。

【0083】

所望のポリペプチドをコードするDNAは、融合または成熟形態のどちらであっても、そして分泌を可能にするシグナル配列を含有するかまたは含有しなくても、任意の都合のよい宿主に対して適切な発現ベクター内に連結され得る。次いで、宿主は、発現ベクターで形質転換される。原核宿主細胞系および真核宿主細胞系の両方が、現在、組換え体ポリペプチドを形成するのに用いられており、そしてより一般的な制御系および宿主細胞系の要約を以下に示す。宿主細胞は、所望のポリペプチドを発現させる条件下でインキュベートされる。次いで、このポリペプチドは、溶解細胞または培地から単離され、その意図された用途に必要な程度まで精製する。

40

【0084】

ウイルス由来のHCVゲノムの抽出、DNAライブラリーの調製および探索、クローンの配列決定、発現ベクターの構築、細胞の形質転換、免疫学的アッセイ（例えば、ラジオ

50

イムノアッセイおよびE L I S Aアッセイ)の実施、培養中の増殖細胞において用いられる一般的な方法は、当該分野において周知である(例えば、上記「背景」の部に引用された文献、および上記のこの「発明の実施態様」の部の初めに引用された文献を参照のこと)。

【0085】

所望の配列を含むベクターの適切な宿主内への形質転換は、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する周知のいずれの方法によっても行われ得、この導入方法には、ウイルス中のポリヌクレオチドのパッケージング、および、ウイルスによる、またはポリヌクレオチドの直接取り込みによる宿主細胞の形質導入が包含される。用いられる形質転換の方法は、形質転換される宿主に依存する。直接取り込みによる細菌の形質転換は、一般に、塩化カルシウムまたは塩化ルビジウムによる処理を使用し得る(Cohen(1972)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110)。直接取り込みによる酵母の形質転換は、Hinnenら、(1978)J. Adv. Enzyme Reg. 7:1929の方法を用いて行われ得る。直接取り込みによる哺乳動物の形質転換は、GrahamおよびVan der Eb(1978)Virology 52:546のリン酸カルシウム沈澱法、またはその種々の周知の改変法を用いて行われ得る。細胞(特に、哺乳動物細胞)内への組換え体ポリヌクレオチドの導入に対して、当該分野において周知である他の方法は、デキストラン仲介トランスフェクション、リン酸カルシウム仲介トランスフェクション、ポリブレン仲介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソーム中のポリヌクレオチドの被包化、および核内へのポリヌクレオチドの直接マイクロインジェクションを包含する。

【0086】

所望のコード配列の発現を得るために、宿主細胞は(発現ベクターであり得る)ポリヌクレオチドで形質転換される。このポリヌクレオチドは、所望のコード配列に作動可能に連結された制御配列からなる。この制御配列は、所定の宿主に適合し得る。原核宿主の間では、E. coliが最もよく用いられる。原核生物の発現制御配列は、プロモーター、必要に応じて含有されるオペレーター部位、およびリボソーム結合部位を含む。原核宿主に適合し得る転移ベクターは、一般に、例えば、pBR322(アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性を付与するオペロンを含むプラスミド)、および種々のpUCベクター(抗生物質耐性マーカーを付与する配列をまた含む)から得られる。プロモーター配列は、天然に存在する、例えば、 β -ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)(Weissman(1981)Interferon 3(I. Gresser編)中の「The cloning of interferon and other mistakes」、ラクトース(lac)(Changら、(1977)Nature 198:1056)およびトリプトファン(trp)(Goeddelら、(1980)Nucl. Acids Res. 8:4057)、および λ 由来P_Lプロモーター系およびN遺伝子リボソーム結合部位(Shimatakeら、(1981)Nature 292:128)であり得る。さらに、天然に存在しない合成プロモーターもまた、細菌プロモーターとして機能する。例えば、1つのプロモーターの転写活性化配列は、他のプロモーターのオペロン配列に結合して、合成ハイブリッドプロモーターを形成し得る(例えば、tacプロモーター(これは、trpおよびlacプロモーターの配列由来である)(De Boerら、(1983)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21)。上記の系は、特にE. coliに適合し得る；所望であれば、他の原核宿主(例えば、バチリス属(Bacillus)またはシュードモナス属(Pseudomonas)の株が、対応する制御配列で用いられ得る。

【0087】

真核宿主は、培養系における酵母および哺乳動物細胞を包含する。Saccharomyces cerevisiaeおよびSaccharomyces carlsbergensisは、最も一般的に用いられる酵母宿主であり、そして好都合な菌類宿主である。酵母適合性ベクターは、一般に、栄養要求性突然変異体に原栄養性(proto tr

10

20

30

40

50

opy)を、または野生株に重金属耐性を付与することにより、生育した形質転換体の選別を可能にするマーカーを有する。酵母適合性ベクターは、2ミクロンの複製起点(Broachら(1983)Meth. Enz. 101:307)、CEN3およびARS1の組合せ、または複製を確実に行うような他の手段(例えば、宿主細胞ゲノムに適切なフラグメントを取り込ませ得る配列)を用い得る。酵母ベクターの制御配列は、当該分野において周知であり、解糖系酵素の合成のプロモーターを含む(Hessら(1968)J. Adv. Enzyme Reg. 7:149);例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)(欧州公開公報第284044号)、エノラーゼ、グルコキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPまたはGAPDH)、ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、3-グリセロリン酸ムターゼ、およびピルビン酸キナーゼ(PyK)(欧州公開公報第329303号)。酵母PH05遺伝子(これは酸ホスファターゼをコードする)もまた、有用なプロモーター配列を提供する。さらに、天然に存在しない合成プロモーターもまた、酵母プロモーターとして機能する。例えば、1つの酵母プロモーターの上流活性化配列(UAS)は、他の酵母プロモーターの転写活性化領域に連結され得、合成ハイブリッドプロモーターを創製する。このようなハイブリッドプロモーターの例は、GAP転写活性化領域に連結したADH調節配列(米国特許第4,876,197号および第4,880,734号)を包含する。ハイブリッドプロモーターの他の例は、GAPまたはPyKのような解糖系酵素の転写活性化領域と結合したADH2、GAL4、GAL10、またはPH05遺伝子のいずれかの制御配列からなるプロモーターであって、プロモーターを包含する(欧州公開公報第164556号)。さらに、酵母プロモーターは、適当な転写開始のための酵母RNAポリメラーゼに結合する能力を有する、酵母以外の起源の天然に存在するプロモーターを包含する。

10

20

30

40

【0088】

酵母発現ベクターに含まれ得る他の制御要素には、ターミネーター(例えば、GAPDH由来、およびエノラーゼ遺伝子由来(Holland(1981)J. Biol. Chem. 256:1385)、およびリーダー配列がある。リーダー配列フラグメントは、典型的には、細胞からタンパク質を分泌させる疎水性アミノ酸からなるシグナルペプチドをコードする。適切なシグナル配列をコードするDNAは、分泌酵母タンパク質に対する遺伝子(例えば、酵母インペルターゼ遺伝子(欧州公開公報第12,873号)および α -因子遺伝子(米国特許第4,588,684号))に由来し得る。あるいは、非酵母起源のリーダー(例えば、インターフェロンリーダー)もまた、酵母における分泌を提供する(欧州公開公報第60057号)。分泌リーダーの好ましいクラスは、酵母 α -因子遺伝子のフラグメントを使用し、このフラグメントは、「プレ」シグナル配列と「プロ」領域との両方を含んでいる。用いられ得る α -因子フラグメントのタイプは、完全長プレ-プロ α -因子リーダー、および不完全 α -因子リーダー(米国特許第4,546,083号および第4,870,008号;欧州公開公報第324274号)を包含する。分泌を提供する α -因子リーダーフラグメントを用いる別のリーダーは、第2の酵母 α -因子由来のプロ-領域ではなく、第1の酵母のプレ配列で作られたハイブリッド α -因子リーダーを包含する(例えば、PCT WO 89/02463を参照のこと)。

【0089】

染色体外レプリコンまたは組込みベクターである発現ベクターが、多種の酵母中への形質転換用に関連されている。例えば、発現ベクターは、以下の種に用いるために開発されている; *Candida albicans* (Kurtzら(1986)Mol. Cell Biol. 6:142)、*Candida maltosa* (Kunzeら(1985)J. Basic Microbiol. 25:141)、*Hansenula polymorpha* (Gleesonら(1986)J. Gen. Microbiol. 132:3459)、*Kluyveromyces fragilis* (Dasら(1984)J. Bacteriol. 158:1165)、*Kluyveromyces lactis* (De Louvenencourtら(1983)J. Bacteriol. 15

50

4:737)、*Pichia guillerimondii* (Kunzeら(1985)上記)、*Pichia pastoris* (Creggら(1985) *Mol. Cell Biol.* 5:3376; 米国特許第4,837,148号および第4,929,555号)、*Shizosaccharomyces pombe* (BeachおよびNurse(1981) *Nature* 300:706)、および *Yarrowia lipolytica* (Davidowら(1985) *Curr. Genet.* 10:39)。

【0090】

発現用宿主として利用可能な哺乳動物細胞系は、当該分野で周知であり、*American Type Culture Collection* (ATCC) から入手可能な多種の不死化された細胞系、例えば *HeLa* 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、シリアンハムスター腎 (BHK) 細胞、COS サル細胞、および多数の他の細胞系を含む。当該分野において、哺乳動物細胞に対して適切なプロモーターが周知であり、それらは、シミアンウイルス 40 (SV40)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、アデノウイルス (ADV) およびウシ乳頭腫ウイルス (BPV) に由来するようなウイルスプロモーターを含む (適切なプロモーターの例は、*Sambrook* (1989) を参照のこと)。哺乳動物細胞は、ターミネーター配列およびポリ A 付加配列を必要とし得；発現を増大するエンハンサー配列をもまた含まれ得、そして、遺伝子の増幅を引き起こす配列もまた望ましくあり得る。これらの配列は、当該分野で周知である。

【0091】

哺乳動物細胞で複製に適するベクターが、当該分野で周知であり、そして、それらは、ウイルスのレプリコン、または所望のポリペプチドをコードする適切な配列の宿主ゲノム中への組込みを確実にする配列を含み得る。

【0092】

外来 DNA の発現に使用され、ワクチン調製において使用され得るベクターは、ワクシニアウイルスである。この場合、異種 DNA がワクシニアゲノム中へ挿入される。ワクシニアウイルスゲノム中へ外来 DNA を挿入する技術は、当該分野で周知であり、例えば相対的組換えを利用する。異種 DNA は、一般的に、選択マーカーの提供も行うチミジンキナーゼ遺伝子 (tk) のような、天然には非必須の遺伝子中に挿入される。組換えウイルスの構築を非常に容易にするプラスミドベクターが、記載されている (例えば、*MacKett* ら (1984) 「DNA Cloning」 Vol. II. IRL Press, 191 頁中、*Chakarabarti* ら (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:3403; *Moss* (1987) 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」 (Miller および Calos 編、10 頁) を参照のこと)。次いで、免疫反応性領域を含む所望のポリペプチドの発現が、生存している組換えワクシニアウイルスで感染しおよび/または免疫化された細胞または個体で起こる。

【0093】

ポリペプチドの発現のための他のシステムは、昆虫細胞およびこれらの細胞中での使用に適切なベクターを含む。これらのシステムは、当該分野で周知であり、例えば、バキュロウイルス *Autographa californica* 核ポリヘドロシスウイルス (AcNPV) 由来の昆虫発現転移ベクターを含む。このベクターは、ヘルパー非依存ウイルス発現ベクターである。このシステムから得られる発現ベクターは、通常、強力なウイルスポリヘドロン遺伝子プロモーターを用いて、異種遺伝子の発現を起こす。現在、AcNPV 中へ外来遺伝子を導入するために最も一般的に使用される転移ベクターは、pAc373 である。当業者に周知の多種の他のベクターもまた、発現を増進するために設計されている。これらは、例えば、pVL985 (これは、ポリヘドロン開始コドンに ATG から ATT に変更し、そして、ATT から 32 塩基対の下流に BamHI クローニング部位を導入する; *Luckow* および *Summers* (1989)、*Virology* 17:31 を参照のこと) を含む。非融合外来タンパク質の良好な発現は、通常、理想的には ATG 開始シグナルの前方に適切な翻訳開始シグナルを含む短いリーダー配列を有す

10

20

30

40

50

る外来遺伝子を必要とする。プラスミドは、*E. coli* 中での選択および増殖のために、ポリヘドロンポリアデニル化シグナルおよびアンピリシン抵抗性 (*amp*) 遺伝子および複製起点を含む。

【0094】

異種DNAをバキュロウイルスの所望の部位に導入する方法は、当該分野で周知である（以下を参照のこと：*Summers* および *Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* ; *Jur* (1987) 「*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*」 (*Miller* および *Calos* 編) 中に記載 ; *Smith* ら (1983)、*Mol. & Cell. Biol.* 3: 2156 ; および、*Luckow* および *Summers* (1989) 上記)。例えば、この挿入は、相同的組換えにより、ポリヘドロン遺伝子のような遺伝子中に行われ得；所望のバキュロウイルス遺伝子中に作られた制限酵素部位中にもまた行われ得る。挿入される配列は、可変ドメイン由来の少なくとも1つのエピトープを含む所望のHCVポリペプチドのすべてのまたは様々のセグメントをコードするものであり得る。

10

【0095】

シグナルペプチド切断、タンパク質分解性切断、およびリン酸化のような、翻訳後改変のためのシグナルは、昆虫細胞により認識されると考えられる。また、分泌および核での蓄積 (*nuclear accumulation*) に必要なシグナルは、無脊椎動物と脊椎動物細胞との間で保存されていると考えられている。無脊椎動物の細胞中で有効な脊椎動物細胞由来のシグナル配列の例は、当該分野で周知である。例えば、昆虫細胞中では、ヒトインターロイキン2シグナル (*IL2*) は、細胞が認識されると外部へ輸送するシグナルとなり、完全に除去される。

20

【0096】

上記宿主細胞およびベクターを用いて調製されたポリペプチドは、しばしば、融合ポリペプチドであることが望ましい。非融合ポリペプチドと同様に、融合ポリペプチドは発現後に細胞内に留まり得る。あるいは、融合ポリペプチドが、リーダー配列フラグメントを含む場合、この融合ポリペプチドはまた、細胞から増殖培地中に分泌され得る。好適には、外来遺伝子のリーダーフラグメントと残りの部分との間に、インビボまたはインビトロで切断され得るプロセッシング部位がある。

30

【0097】

HCVの処置に組成物が使用される場合、その組成物は免疫原性であることが望ましい。合成ポリペプチドは、正しいエピトープを提供するために正しく構造化されるが、免疫原性になるには小さすぎる場合、ポリペプチドは適切な担体に結合され得る。このような結合を得るための多数の技術が、当該分野で周知であり、これらには、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート (*SPDP*) およびスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (*SMCC*) (ペプチドにスルフヒドリル基がなければ、システイン残基の付加により提供され得る) を用いるジスルフィド結合の形成が含まれる。これらの試薬は、その試薬自身とあるタンパク質中のペプチドシステイン残基との間にジスルフィド結合を形成し、そして、リジンのε-アミノ基または他のアミノ酸の他の遊離アミノ基によるアミド結合を形成する。このような種々のジスルフィド/アミド-形成剤が知られている。例えば、*Immun. Rev.* (1982) 62: 185を参照のこと。他の二官能カップリング剤は、ジスルフィド結合よりもむしろチオエーテル結合のためである。これらのチオエーテル形成試薬の多くは、市販で入手可能であり、6-マレイミドヘキサン酸、2-ブロモ酢酸、2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸などの反応性エステルを含む。これらのカルボキシル基は、そのカルボキシル基をコハク酸イミドまたは1-ヒドロキシル-2-ニトロ-4-スルホン酸のナトリウム塩と組み合わせることで、活性化され得る。抗原をカップリングするためのさらなる方法には、欧州公開公報第259, 149号に記載のロタウイルス/「結合ペプチド」システムが用いられる。上記の列挙は

40

50

、それがすべてであるわけではなく、列挙された化合物の改変物もまた、明らかに使用され得る。

【0098】

担体としては、宿主に対して有害な抗体の産生をそれ自体が引き起こさなければ、どのような担体でも使用され得る。適切な担体は、典型的には、タンパク質のような大きくて徐々に代謝される高分子；ラテックス機能付与セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズなどのような多糖類；ポリグルタミン酸、ポリリジンなどのような重合アミノ酸；アミノ酸共重合体；および不活性ウイルス粒子（以下を参照のこと）である。特に有用なタンパク質基質は、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、卵白アルブミン、テタヌストキシン、および当業者

10

【0099】

HCV可変ドメイン（特にE1およびE2/NS1）のエピトープの免疫原性は、粒子形成タンパク質（例えば、B型肝炎表面抗原に関連するタンパク質）と融合されたまたは組み立てられた真核細胞系において、それらを調製することによっても増強され得る。例えば、米国特許第4,722,840号を参照のこと。可変ドメイン由来のHCVエピトープを含有するポリペプチドが粒子形成タンパク質コード配列に直接結合する構築物は、HCVエピトープに関して免疫原性であるハイブリッドを生成する。さらに、調製したすべてのベクターは、例えば、プレ-Sペプチドのような種々の程度の免疫原性を有し、HBVに特異的なエピトープを含む。このように、粒子形成タンパク質から構築され、HCV配列を含む粒子は、HCVおよびHBVに関して免疫原性である。

20

【0100】

肝炎表面抗原(HBSAg)が、S.cerevisiae(Valenzuelaら(1982)Nature 298:344)、および、例えば哺乳動物細胞(Valenzuelaら(1984)「B型肝炎」Millman I.ら編に記載)中で形成され、そして粒子に組み立てられることが示されている。このような粒子の形成は、モノマーサブユニットの免疫原性を増強することが示された。構築物はまた、プレ表面(プレ-S)領域の55のアミノ酸を含むHBSAgの免疫優性エピトープを含み得る。Neurathら(1984)。酵母中で発現され得るプレ-S-HBSAg粒子の構築物は、欧州公開公報第174,444号に開示されている；酵母での発現のための異種ウイルス配列を含むハイブリッドは、欧州公開公報第175,261号に開示されている。これらの構築物は、SV40-ジヒドロ葉酸還元酵素ベクターを用いて、CHO細胞のような哺乳動物細胞中에서도発現され得る(Michelleら(1984))。

30

【0101】

さらに、粒子形成タンパク質コード配列の一部は、HCV可変ドメイン由来のエピトープをコードするコドンで置換され得る。この置換において、酵母または哺乳動物で免疫原性粒子を形成する単位の集合を媒介するのに必要とされない領域が削除され得、このようにして、HCVエピトープと競合する部分から余分なHBV抗原部位を除去する。

【0102】

活性成分として免疫原性ポリペプチドを含むワクチンの調製は、当業者に公知である。典型的には、このようなワクチンは、液体溶液または懸濁液のいずれかとして、注射可能なように調製される；注射前に、液体に溶解または懸濁させるのに適当な固形物の形態としても調製され得る。この調製物はまた、乳化することも可能であり、すなわち、リボソーム中でカプセル化されたポリペプチドであってもよい。この活性免疫原性成分は、薬学的に受容され得る賦形剤であって、この活性成分と適合し得る賦形剤と混合されることが多い。適当な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組合せである。さらに、必要であれば、このワクチンには、少量の補助物質が含まれ得る。この補助物質としては、保湿剤または乳化剤、pH緩衝剤、および/またはワクチンの効果を増強するアジュバントが挙げられる。効果的なアジュバントの例は、以下を含むが、それだけには限定されない：水酸化アルミニウム、N-アセチル

40

50

- ムラミル - L - スレオニル - 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 ((C G P 1 1 6 3 7)、ノル - M D P と呼ばれる)、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン - 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 (C G P 1 9 8 3 5 A、M T P - P E と呼ばれる)、および R I B I。ここで、R I B I は、2 % スクアレン / T w e e n 8 0 乳濁液中に、細菌から抽出される 3 成分、すなわちモノホスホリルリピド A、トレハロースジミコレートおよび細胞壁骨格 (M P L + T D M + C W S) を含んでいる。アジュバントの効力は、可変ドメイン由来の H C V エピトープを含む免疫原性ポリペプチドに対する抗体の量を測定することにより決定され得る。この抗体は、種々のアジュバントもまた含むワクチン中でこのポリペプチドを投与することによって生じる。

10

【 0 1 0 3 】

タンパク質は、中性または塩の形態でワクチンに処方され得る。薬学的に受容され得る塩には、酸付加塩 (ペプチドの遊離アミノ基と共に形成される) が含まれ、この塩は、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸)、または有機酸 (酢酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸など) を用いて形成される。遊離カルボキシル基と共に形成される塩は、無機塩基 (例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニア、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄) および有機塩基 (イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2 - エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど) から誘導され得る。

20

【 0 1 0 4 】

ワクチンは、従来、非経口的に投与され、その形態は、例えば、皮下または筋肉注射である。他の投与形態に適したさらなる処方物には、坐剤があり、場合によっては経口処方物を含む。坐剤には、従来のバインダーおよび担体は、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含み得る ; このような坐剤は、活性成分を含む混合物から 0 . 5 % ~ 1 0 %、好適には 1 % ~ 2 % の範囲で形成され得る。経口処方物には、通常用いられる賦形剤が含まれており、この賦形剤には、例えば、薬学的なグレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどがある。これらの組成物は溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性処方物または粉末の形態をとり、そして 1 0 % ~ 9 5 % の、好適には 2 5 % ~ 7 0 % の活性成分を含む。

30

【 0 1 0 5 】

上記に加えて、H C V 抗原セットの組換えポリペプチドを発現する弱毒化微生物の生ワクチンを調製することも可能である。適切な弱毒化微生物が、当該分野で周知であり、例えばウイルス (例えば、ワクシニアウイルス) および細菌を含む。

【 0 1 0 6 】

ワクチンは、投薬処方と適合する様式で、そして予防効果および / または治療効果が得られる量で投与される。投与されるべき量は、一般的に 1 回の投与当り抗原 5 μ g ~ 2 5 0 μ g の範囲であるが、処置される個体、この個体の免疫系が抗体を合成する能力、および望まれる保護の程度に依存する。投与に必要とされる活性成分の正確な量は、医師の判断によるものであり、各個体に特有であり得る。

40

【 0 1 0 7 】

ワクチンは、1 回の投与スケジュールで与えられるか、または好適には複数回の投与スケジュールで与えられ得る。複数投与スケジュールでは、最初のワクチン投与は、1 ~ 1 0 回に分けて行われ、以後の投与は引続き免疫応答を維持および / または増強するために必要とされる時間間隔で行われ得る。例えば、2 回目の投与では 1 ~ 4 ヶ月で行われ、そして必要であれば数カ月後に引続き投与が行われ得る。投与法は、少なくとも部分的には、個体の必要量よっても決定され、医師の判断による。

【 0 1 0 8 】

さらに、上述の H C V ポリペプチドを含む抗原セットを含むワクチンは、他の免疫制御剤、例えば免疫グロブリンと共に投与され得る。

50

【0109】

本発明の組成物は、個体に投与されて、多数の用途に使用され得る（従来技術を用いて、血清から精製または単離された）ポリクローナル抗体を生成し得る。例えば、ポリクローナル抗体は、個体を受動免疫化することに、または免疫化学試薬として用いられ得る。

【0110】

本発明の他の実施態様では、複数のHCV抗原セットを含む上記の免疫反応性組成物が、例えば血液または血清試料を含む生物学的試料中の抗-HCV抗体を検出するために用いられる。イムノアッセイの設計は、変化に富み、多様なものが当該分野で周知である。しかしながら、イムノアッセイは抗原セットを用い、ここで各抗原セットは、HCV単離体の第1可変ドメイン中にエピトープのアミノ酸配列を含む複数の実質的に同一のポリペプチドからなり、1セットのアミノ酸配列は、少なくとも1つの他のセットのアミノ酸配列について異質性である。イムノアッセイのプロトコルは、例えば、競合、または直接反応、またはサンドイッチ型アッセイに基づき得る。このプロトコルはまた、例えば、固体支持体を使用し得、または免疫沈降法によるものであり得る。ほとんどのアッセイは、標識化抗体またはポリペプチドの使用を含む；この標識は、例えば、蛍光性、化学発光性、放射性、または染料分子であり得る。プローブからのシグナルを増幅するアッセイもまた知られている；それらの例は、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイ、およびELISAアッセイのような、酵素標識されそして酵素に介されるイムノアッセイである。

10

【0111】

免疫学的診断に適し、そして適切な標識試薬を含むキットが、可変ドメイン由来のHCVエピトープを含有する本発明の組成物を含む適切な材料を、アッセイの実施に必要とされる残りの試薬および材料（例えば、適当な緩衝液、塩類溶液など）および適当なアッセイの説明書のセットと共に、適当な容器中にパッケージすることで構成される。

20

【実施例】

【0112】

以下の記載は本発明の実施例であり、説明の目的のためにだけ提供するもので、本発明の範囲を限定するものではない。本開示を考えると、特許請求の範囲内で非常に多数の実施例が当業者に明らかである。

【0113】

実施例において、以下の材料および方法を用いた。

30

【0114】

（被験体試料およびRNAの抽出）

無症候性のHCV保菌者であるHCT18およびHCVJ1、および慢性的に感染しているHCV被験体のThは、Weinerら（1991）Virology 180:842-848中に、以前に記載されている。被験体Qは、肝臓パイオプシーに基づいて、慢性活性肝炎であると診断され、6ヶ月間、アルファ-2bインターフェロン治療を施された（毎週3回、3百万単位）。製造者により示されるように10μg/mlのMS2保菌者RNA（Boehringer Mannheim, 165-948）を含むRNAzolTMB試薬（Cinna/Biotech Laboratories）を用いてChomcynskiおよびSacchi（1987）Anal. Biochem. 162:156-159の方法に従い、RNAを血漿0.2mlから抽出した。RNAを、蒸留水で処理したジエチルピロカーボネート200μl中に再懸濁し、そして、最終濃度0.2Mの酢酸ナトリウムおよび2.5倍容量の100%エタノール（-20℃）中で再沈澱させた。

40

【0115】

（cDNAおよびポリメラーゼ連鎖反応）

すべての反応を、Weinerら（1990）Lancet 335:1-5に従い実施した。M13配列決定は、Messingら（1983）Methods in Enzymology 101:20-37に従い実施した。少なくとも4つのクローン化挿入フラグメントの共通配列が、2つのクローン由来のHCV J1.2 E2/NS1配

50

列を除いて与えられた。

【0116】

HCT18およびThのクローニングおよび配列決定を、上記のWeinerら(1991)の報告の通りに行った。被験体QのE2/NS1のアミノ末端セグメントおよびカルボキシ近位セグメントをクローニングするために用いた組み込まれたPCRプライマーは以下であった：

【0117】

【化1】

PCR I

X(E2)14 GGTGCTCACTGGGGAGTCCT(1367-1386)S

X(E2)18J CATTGCAGTTCAGGGCCGTGCTA(1608-1588)A,

PCR II

X(E2)4 TCCATGGTGGGGAAGTGGGC(1406-1425)S

X(E2)19J TGCCAACTGCCATTGGTGTT(1582-1562)A;

PCR I

X(E2)14 (上記)S

J1rc12 TAACGGGCTGAGCTCGGA(2313-2296)A

PCR II

US(E2)5 CAATTGGTTCGGTTGTACC(1960-1978)S

J1rc13 CGTCCAGTTGCAGGCAGCTTC(2260-2240)A.

HCV J1 E2/NS1遺伝子をクローニングするために用いたPCRプライマーは以下であった：

【0118】

【化2】

PCR I

J1(E2)14 (上記)S

J1(E2)rc30" CAGGGCAGTATCTGCCACTC(2349-2330)A

J1IZ-2' TGAGACGGACGTGCTGCTCCT(1960-1978)S

J1(E2)rc32" TTTGATGTACCAGGCGGCGCA(2658-2636)A

PCR II-E2384.5'

GGATCCGCTAGCCATACCCGCGTGACGGGGGGGGTGCAA(1469-1495)S

DSCON1JBX"

GGATCCTCTAGATTACTCTTCTGACCTATCCCTGTCCTCCAAGTC

ACA(2272-2301)A

J1IZ-1' CAACTGGTTCGGCTGTACA(1915-1935)S

J1(E2)rc31" (2566-2546)A.

*は、Takeuchiら(1990)Nucl. Acids Res. 18:4626からのnt配列である；**は、Katoら(1989)Proc. Jpn. Acad.

10

20

30

40

50

65B:219-223からのnt配列である。センス(S)またはアンチセンス(A)PCRプライマーを、参考文献中のヌクレオチド番号に従い、5'から3'の向きに示した。

【0119】

(ビオチン化ペプチドの合成)

HCVの3つの株の超可変領域に対する重複オクタペプチド(8ペプチド)を、切断可能なリンカー上で合成し、誘導し、ポリエチレンのピンを、本質的にMaejira(1990)J. Immunol. Methods 134:23-33による記載のように、各ペプチドのN-末端にカップリングした。最後に、40mMのビオチン、40mMの1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)、40mMのベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP, NOVABIOCHEM)および60mMのN-メチルモルホリン(NMM)を含む150μlのジメチルホルムアミド溶液を用いて一晩20℃で反応させ、ビオチンをN-末端にカップリングした。

10

【0120】

ビオチン化の後、ペプチドの側鎖を脱保護し、洗浄し、そして各ピンから得られるペプチドを、200μlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)中で切断した。切断ペプチド溶液を含むマイクロタイタープレートで、必要とされるまで-20℃で貯蔵した。

【0121】

(ビオチン化ペプチドのELISA試験)

ポリスチレンプレート(Nunc immunoplate maxisorb F96)を、一晩4℃で、0.1ml/ウェルの5μg/mlストレプトアビジン(Sigmaカタログ番号S4762)溶液と共に、pH9.6の0.1M炭酸緩衝液中でインキュベートすることにより、ストレプトアビジンでコートした。ストレプトアビジン溶液除去の後、ウェルを、PBS中のTween20の0.1%溶液で4回洗浄した。PBS中で、0.2mlの2%BSAと共に1時間20℃で、各ウェルをインキュベートすることにより、非特異的結合を遮断した。ウェルを、再びPBS/Tween20で4回洗浄した。プレートを風乾し、要求されるまで、4℃で貯蔵した。各ウェル中のストレプトアビジンを、0.1%のアジ化ナトリウムを含むPBS中に0.1%のBSAを伴う切断ペプチド溶液の1:100希釈液100μlと、20℃で1時間のインキュベートすることにより、切断されたペプチドにカップリングした。インキュベーションの後、プレートをPBS/Tween20で4回洗浄した。各ウェルを、血清の適切な希釈液(0.1%のアジ化ナトリウムを含むPBS中の2%BSAで希釈)100μlと共に、20℃で1時間または4℃で一晩インキュベートした後、PBS/Tween20で4回洗浄した。結合した抗体を、コンジュゲート0.1ml中で、20℃で1時間反応させることにより検出した。これは、CASS(0.1MのPBS中に希釈した0.1%ヒツジ血清、0.1% Tween20、0.1%ナトリウムカゼイネート、pH7.2)中の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG(H+L)(Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD)0.25ml/l(飽和レベル)から構成されていた。ウェルを、PBS/Tween20で2回洗浄し、引き続きPBSだけで2回洗浄した。酵素の存在は、100mlの0.1Mリン酸/0.08Mクエン酸緩衝液、pH4.0中に50mgのアンモニウム2,2'-アジノ-ビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホネート(ABTS, Boehringer Mannheimカタログ番号122661)および0.03mlの35%(w/w)過酸化水素溶液を含む0.1mlの新たに調製された溶液と、20℃で45分間反応させることにより検出した。発色を、Titertek Multiscan MCプレートリーダー中で、492nmの対照波長に対して405nmのデュアル波長モードで測定した。

20

30

40

【0122】

(コンピューターで生成された抗原性プロフィール)

HCV E2/NS1タンパク質およびHIV-1 gp120超可変領域V3(a a

50

303 - 338) に対する抗原性プロファイルを、Kabat [免疫学的に重要なタンパク質の配列、米国厚生省 (U.S. Department of Health and Human Services)、公共保健サービス (Public Health Service)、国立衛生研究所 (1983)] により最初に提案されたようにして、配列変異の程度に基づいて、コンピュータプログラムから誘導した。この抗原性プロファイルを用いて、各々の可能な対をなすアミノ酸に対して抗体結合が保持される個々の確率の平均を乗じて免疫グロブリンの超可変ループを同定した。与えられたアミノ酸の変化に関連する抗体結合の保持の確率は、103個の特徴化された線形エピトープに対するすべての可能なアミノ酸置換基の抗体結合における効果を評価することにより、実験的に決定される値であった。Geysenら (1988) J. Mol. Rec. 1: 32 - 41 10
 。このようにして、このアルゴリズムは、変異指数に加重値を与え、抗体の結合に大きな影響があると考えられるアミノ酸の変化により重みを与えた。すなわち、保存的なアミノ酸の変化に対して補正を行った。15のHCV配列 [HCV - 1, Q3.2, HCT23, EC10, HC - J1, HCV E1, TH, HCT27, Q1.2, HCT18, HC - J4, HCV J1.2 / HCV J1.1, HCV J, HCV BK] をHCVに対する抗原性プロファイルの測定に用いた。HIV - 1 V3プロファイルを、ユニークHIV - 1配列のより多数のデータベースからランダムに選択した15配列の242の個プロファイルを平均することで得た。LaRosaら (1990) Science 249: 932 - 935およびCorrection in Science (1991) 811頁。これらの単離体のいくつかのaa384と420との間のアミノ酸配列を図4 ~ 20
 6に示す。

【0123】

(コンピュータで生成される2次構造予測)

アミノ末端領域 (384 - 420) がαヘリックス、βシート、βターン2次構造を含む確率は、3つの上記2次構造特徴のそれぞれに対する確率を、各残基に割り当てるアルゴリズムを用いて決定し得る。アルゴリズムに用いられる係数は、構造データベースの残基のすべての対合様式の組合せに対して得られた。LevittおよびGreer (1977) J. Mol. Biol. 114: 181 - 293。これらの係数から得られた予想パラメータは、与えられた残基が3つの定義された2次構造特徴の1つに見出される確率を得るためにアルゴリズムをデータベースに適応し直して、観察結果と合致させた。 30

【0124】

(実施例1)

(HCV E2 / NS1 HVおよびHIV - 1 gp120ドメインの2次構造およびアミノ酸配列変異の比較)

15のHCVおよびHIV - 1単離体由来のアミノ酸配列を、HCV E2 HVドメインまたはHIV - 1 gp120 V3ドメイン中でアミノ酸配列の異質性が観察された位置の数について比較した (それぞれ、図7、AおよびB)。アミノ酸の異質性は、E2 HV領域では30のアミノ酸位置のうち25の位置、そして、HIV - 1 gp120 V3ドメインでは35のアミノ酸位置のうち23の位置で生じていた。図7AおよびBのx軸上のダッシュは、可変アミノ酸残基が生じるアミノ酸位置を表し、そして、非変異アミノ酸は1文字のアミノ酸コードで示している。図7中に示された抗原性プロファイルにより、HIV - 1 GP120タンパク質のV3ループ (図7B) と同様に、HCV E2中の1ブロックのアミノ酸残基 (図7A中のアミノ酸384 - 414) において、その変異は抗体結合における予想通りの逆の効果を有することが認められたことが示される。図7中のデータにより、HCV E2ドメインは、ウイルス中和エピトープをコードすることで知られるHIV - 1 gp120 V3ドメインと、観察されたアミノ酸変異の程度および期待重みの両方において類似することが示され、E2 HVドメインは、gp120 V3ドメインと同様の機能を有し得ることが示唆される。

【0125】

線形エピトープは、タンパク質 (特にタンパク質の末端) のあまり構造化されていない 50

領域に、または伸長した表面ループに、より関連していると思われる。コンピューター分析を用いて、個々の残基が残基 384 ~ 420 間の 15 の E2

HV アミノ酸配列についての定義された 2 次構造特徴に関連する確率を予測した。図 7 から、E2 アミノ末端残基 384 と、非常に期待され顕著に保存された β ターン (残基 415 - 418) との間の領域は、 α ヘリックス、 β シート、 β ターンの確率が 50 % 以下であることから示されるように、比較的構造化されていないことが示される。E2 HV ドメイン中の期待構造の欠如は、単離体間でみられる広範囲の配列変異に対する許容性と一致し、タンパク質の 3 次元的折り畳みに寄与する顕著に構造化された領域と対照的である。V3 は、HIV-1 gp120 の主要中和ドメインであり、 β 鎖 - II 型 β ターン - β 鎖 - α ヘリックス特徴を含むことが報告されており、アミノ酸の変異において、HCV E2 HV ドメインよりも強い構造的制限を有し得る。HCV E2 HV ドメインは、この V3 よりも構造化されていないようにさえ見える。まとめると、この事実は、E2 HV ドメインが、線形中和エピトープと考えられる部位を含むタンパク質ドメインに特徴的な特性を有するようになると思われることを示唆する。

10

【0126】

(実施例 2)

(HCV E2 / NS1 HV ドメインのエピトープマッピング)

HCT18 (A, D)、Th (B, E) および HCV J1 (C, F) の E2 / NS1 HV ドメイン (アミノ酸 384 ~ 416 位) に対応し、そしてそれを越えて伸長する重複ピオチン化 8 量体ペプチドを、ストレプトアビジンでコートしたプレートに結合し、HCT18 (A - C) または Th (D - F) のいずれかに由来の血漿と反応させた。HCV 単離体 HCT18 (図 9)、Th (図 10)、および HCV J1 (図 11) についての結果を図 9 ~ 11 に示す。HCT18 血漿を 1 : 200 に希釈し、Th 血漿を 1 : 500 に希釈した。HVE-1、-2、-3、-4、および -5 は単離体に特異的なエピトープを示す。

20

【0127】

図 9 ~ 11 から分かるように、HCT18 配列 (図 9 A 中の HVE-I) から誘導されたペプチドで試験すると、HCT18 血漿は線形エピトープ (407 PKQNV 411) を同定したが、2 つの異なる株 Th および HCV J1 の HV ドメインに対応するペプチドとは反応しなかった (図 10 および 11)。対照的に、Th 血漿は、Th の HV ドメイン中の線形エピトープ HVE-IV (409 QNIQLI 414 、図 10) を同定し、そして株 HCT18 (399 IVRFFAP 405 、図 9) および HCV J1 中のエピトープをもまた同定した。IV の薬剤の使用者である Th は、HCV の複数の株に対して感染可能状態に置かれ得た。

30

【0128】

Th 血漿および HCT18 血漿は両方とも、ELISA において各単離体由来のピン合成された重複 8 量体ペプチドと共に使用された場合、3 つの単離体すべてに共通なエピトープ (アミノ酸 413 - 419 位) とそれぞれ反応した (データを示していない)。

【0129】

抗体結合の特異性を確認するために、アミノ酸 403 - 407 位を含むピオチン化ペプチドに結合している抗体を評価し、これを用いて、HCT18 血漿の反応性を、HCT18 HV ドメインに対する重複 8 量体を含むピンで遮断した。これらのデータにより、以下のことが示される：1) E2 / NS1 HV ドメインが免疫原性であること、2) この領域をマップする複数のエピトープがあること、そして、3) HV ドメイン中のエピトープのサブセット (図 9 ~ 11 中の HVE-1、-2、-3、-4 または -5) が単離体特異的であること。

40

【0130】

(実施例 3)

(可変 E2 / NS1 HV ドメインが、肝炎の発赤と関連し得ることの決定)

慢性 HCV 感染にしばしば見出される肝炎の間欠性発赤に関連する HCV 変異体を発見

50

する可能性を調べるために、慢性肝炎の被験体 Q から、約 2 年間隔の肝炎の 2 つの別個のエピソード（それぞれ、Q 1 および Q 3）の際に得た E 2 / N S 1 遺伝子を部分的に配列決定した。肝炎の第 2 のエピソードは、インターフェロン治療を終了して 1 年半後に起こった。

【 0 1 3 1 】

Q 1 および Q 3 の E 2 / N S 1 領域の推定アミノ酸配列の差異は、3 9 1 - 4 0 8 の間でだけ著しく異なっており、8 つの変化のうち 7 つをアミノ酸 3 9 8 と 4 0 7 との間に生じていた（図 1 2）。図 1 2 は、Q 1 および Q 3 単離体の E 2 / N S 1 ポリペプチドの 2 つの領域、つまりアミノ酸 3 8 4 - 4 1 4 および 5 4 7 - 6 4 7 の推定アミノ酸配列を示す。Q 1 配列上のアミノ酸（E）が、4 つの Q 1 クローンのうちの 1 つに見出された。ボックスで囲まれたアミノ酸は、Q 1

H V E または Q 3 H V E の 1 2 量体ペプチドの位置を表す。Q 1 と Q 3 との間に見出されるアミノ酸配列の相違は、太字で示した。

【 0 1 3 2 】

Q 1 および Q 3 の E 2 / N S 1 ポリペプチドのアミノ酸 5 4 7 と 6 4 7 との間では、アミノ酸異質性が 1 カ所だけ観察された（図 1 2）。

【 0 1 3 3 】

Q 1 および Q 3 の E 2 H V ドメイン中に観察されるアミノ酸置換の抗体結合における効果を調べるため、アミノ酸 3 9 6 から 4 0 7（図 1 2 の H V E Q 1 または Q 3）をもとに Q 1 および Q 3 に特異的な 1 2 量体ペプチドを合成し、E L I S A において Q 1 および Q 3 の血漿と各ペプチドとを別々に反応させた。図 7 から、Q 1 および Q 3 の両血漿中の抗体は、Q 1 ペプチドと反応したが、Q 3 ペプチドとは反応しないことが示される。統計解析（スチューデントの検定）により、Q 1 / Q 3 血漿の Q 1 ペプチドへの結合は、これらの血漿のランダムに選択された 1 区画の 1 2 の対照ペプチドに対するバックグラウンド結合を有意に越えている（ $P < 0.001$ ）ことが示されたが、一方 Q 1 または Q 3 の血漿の Q 3 ペプチドへの結合は、統計上有意ではなかった。このデータは、被験体 Q は、H C V Q 1 H V ドメインに対する抗体を発生し、この抗体は、2 年後の Q 3 時点でもまだ検出し得たが、検出し得る体液性応答は、肝炎の第 2 のエピソードの間に優性である Q 3 E 2 H V 変異体に対して全く発生されなかったことを示している。

【 0 1 3 4 】

【 表 4 】

表 4

12 量体 ペプチド の Elisa の 結果

血漿	TARFAGFFQSGA		TAGFVRLFETGP	
	Q1 配列		Q3 配列	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Q1	1.158	0.134	0.691	0.123
Q3	1.022	0.123	0.593	0.036

（ 実施例 4 ）

（ H C V 感染固体における異なる E 2 / N S 1 H V ドメインを伴う共存 E 2 / N S 1 遺伝子の検出 ）

図 1 3 は、日本人のボランティアの供血者 H C V J 1 の 1 つの漿試料からクローンニングした H C V J 1 の 2 つの単離体（ J 1 . 1 および J 1 . 2 ）から推定されたアミノ酸配列を示す。K u b o ら（ 1 9 8 9 ）N u c l . A c i d s R e s . 1 7 : 1 0 3 6

7 - 1 0 3 7 2。H C V J 1 . 1 と H C V J 1 . 2 との間の全部で 2 3 のアミノ酸の変化のうち、太字で示した 9 つの相違が、3 0 のアミノ酸の E 2 / N S 1 H V ドメインに集中している。E 2 / N S 1 H V ドメイン中の 9 つのアミノ酸の置換のうち 5 つは、非保存的アミノ酸変化を表す。H C V J 1 は、本発明者らの実験室でクローニングされた唯一の I I 群 H C V ゲノムであるため、これらの相違が H C V J 1 血漿の交叉汚染によるものではないと考えられる。2 つの別個の P C R 反応から作製した 7 つのクローン化配列から、2 つの E 2 / N S 1 H V 変異体配列だけが同定されたので、H C V J 1 . 2 配列は、H C V J 1 の血液中の少数配列 (m i n o r i t y s e q u e n c e) を表す。

【 0 1 3 5 】

興味深いことに、H C T 2 7 単離体および H C V E 1 単離体は、これらは異なる実験室で配列決定され、おそらく無関係な個体から得られたが、両者を比較することにより、これらの単離体中の E 2 / N S 1 H V ドメイン中のアミノ酸の相違の数が、同一個体由来の単離体の間で観察された相違の数より少ないことが示された (図 1 4) 。

【 0 1 3 6 】

上記の結果により、個体および個体群中で H C V ゲノムが急速に進化しているという示唆が導かれる。

【 0 1 3 7 】

(実施例 5)

(ワクチンの製剤と調製)

(ジフテリアトキソイド担体タンパク質の M C S へのカップリング)

(必要な材料)

エチレンジアミン四酢酸 (E D T A N a ₂ · 2 H ₂ O) (M W 3 7 2)

6 - マレイミドヘキサ酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (M C S) (S i g m a) - 純度 9 5 %

リン酸二水素ナトリウム (N a H ₂ P O ₄)

窒素

ジメチルホルムアミド (D M F)

M i l l i Q 水

5 m M E D T A 含有 0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 6 . 6 6)

0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0)

0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0)

コハク酸ナトリウム [(C H ₂ C O O N a) ₂ · 6 H ₂ O]

システイン

塩酸 (2 % 溶液)

0 . 1 M コハク酸ナトリウム / 0 . 1 E D T A 、 p H 5 . 6

精製されたジフテリアトキソイド (C o m m o n w e a l t h S e r u m L a b o r a t o r i e s , V i c t o r i a , A u s t r a l i a) を、以下に記載の方法により M C S にカップリングした : L e e ら (1 9 8 0) M o l . I m m u n o l . 1 7 : 7 4 9 ; P a r t i s ら (1 9 8 3) P r o t . C h e m . 2 : 2 6 3 ; P e e t e r s ら (1 9 8 9) J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 2 0 : 1 3 3 ; J o n e s ら (1 9 8 9) J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 2 3 : 2 1 1 。 1 0 0 m l のジフテリアトキソイドを G 2 5 セファデックスカラム (1 7 c m × 4 c m) に通し、チオメルサルを除去した。トキソイドを、0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 0) で溶出し、溶出液のタンパク質容量を B C A タンパク質測定法 (P i e r c e) を用いてアッセイした。得られた溶液を、A m i c o n 限外濾過ユニットを用いて、最終濃度 1 0 m g / m l に濃縮した。

【 0 1 3 8 】

1 m l のトキソイド溶液を、0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 8 . 0) で透析し、次いで 2 0 0 μ l D M F 中の 1 . 5 m g M C S の溶液と混合した。得られた溶液を、暗所において室温で 1 時間時々攪拌しながらインキュベートした。M C S トキソイドからカップリング

されていないMCSを分離するため、溶液を、0.1 Mリン酸緩衝液（pH 6.66）で平衡化されたセファデックスPD10カラムに通過させ、タンパク質画分を採集した。

【0139】

カップリングされたマレイミド基の担体分子当りの数を、そこにHCVペプチドがカップリングする前に測定した。30 mlのコハク酸/EDTA緩衝液に窒素を2分間吹き込んだ。5 mgのシステインを、25 mlメスフラスコ中に移し、最終体積が25 mlである吹き込まれた緩衝液中に溶解した。表5中に示した溶液の分量を、2連で、25 mlスクリーキャップボトルに移した。別々のピペットを用いて、各分量中へ窒素を通気した。次いで各ボトルを密封し、暗所において室温で40分間時々かきまぜながらインキュベートした。

10

【0140】

【表5】

表5

溶液	試料1(ml)	標準(ml)	ブランク(ml)
活性化担体	0.3	-	-
リン酸緩衝液	-	0.3	0.3
システイン溶液	1.0	1.0	-
コハク酸緩衝液	-	-	1.0

20

*：3溶液のそれぞれの0.1 ml分量を、エルマンの測定法に用いるために採取した。

【0141】

（スルフヒドリルの定量測定のためのエルマン試験）

（必要な材料）

リン酸緩衝液、pH 8.0

30

15.6 gの NaH_2PO_4 または12.0 gの NaH_2PO_4 無水物を、約700 mlのMilli Q水に溶解する。50% NaOHを用いてpHを8.0に調節する。Milli Q水を最終体積が1000 mlになるように加え、次いで必要に応じてpHを調整する。

エルマン試薬

10.0 mgの5,5'-ジチオビス-2-ニトロ安息香酸(DTNB)を、2.5 mlのリン酸緩衝液(pH 8.0)中に溶解する。

【0142】

0.1 mlのエルマン試薬を、上記のように調製した溶液、すなわち試料、標準溶液、およびブランク溶液の0.1 ml分量のそれぞれに加えた。次いで、5 mlのリン酸緩衝液(pH 8.0)を、各分量に加えてよく混合し、15分間そのままおいた。各分量の吸光度を1 cm路長のセル中で412 nmで測定した。

40

【0143】

担体タンパク質上に存在するマレイミド基の数を、次の方法によって測定した。ml当り0.01 μ モルの-SHの溶液は、1 cm光路において412 nmで0.136の吸光度を生じた。標準または試料(A)の吸光度は、活性化担体タンパク質上のカップリングされたマレイミド基と反応したシステインの量と等しかった。1モルの有効な-SHが、1モルのマレイミドと反応するので、試験された分量中に存在するマレイミド基の μ モルにおける濃度は、 $A(0.01) / 0.136 \mu\text{mol/ml}$ である。溶液の全体積は、5.2 mlであった。そのため、存在する総 μ モル数は、 $A(0.01)(5.2) / 0.136$

50

であった。試料溶液は、全体積が 1.3 ml であり、その内 0.3 ml が活性化担体タンパク質から構成された。試料溶液中に存在するマレイミド基の量は、 $A(0.01)(5.2)(1.3)/(0.136)(0.1)(0.3) = A(16.57) \mu\text{mol/ml}$ であると計算された。MCS 活性化担体タンパク質は、 -20°C で貯蔵した。

【0144】

(HCV ペプチドの還元)

HCV ペプチドを MCS 活性化担体タンパク質にカップリングする前に、ペプチドを還元し、ペプチド上に存在するチオール基が完全に還元された $-SH$ 形であることを確実にした。

【0145】

(必要な材料)

ジチオトレイトール (DTT)

炭酸水素アンモニウム (NH_4HCO_3)

メタノール

SEP-PAKs (C18 カートリッジ、水)、各 8 mg のペプチドに 1 カートリッジ 0.1 M 炭酸水素アンモニウム緩衝液

1 L Milli Q 水中に 7.9 g の NH_4HCO_3 を溶解

緩衝液 A、 1 L Milli Q 水中、 $0.1\% \text{ V/V}$ トリフルオロ酢酸 (TFA)

緩衝液 B、 1 L Milli Q 水中、 $60\% \text{ V/V}$ アセトニトリル、 $0.1\% \text{ V/V}$ TFA

HCV ポリタンパク質のアミノ酸 384 - 411 および 225 - 260 にそれぞれ対応する 2 つの各 HCV ペプチド 15 mg を、 10 倍過剰量の DTT を含む 2.5 ml の 0.1 M 炭酸水素アンモニウムに加えた。生成した溶液をペプチドが溶解するまで攪拌し、次いで室温で 1 時間そのままおいた。2 対の SEP-PAKs を連結し、約 20 ml のメタノール、次いで 20 ml の緩衝液 A を各対の SEP-PAKs に通すことにより活性化した。各ペプチド / DTT 試料を、ゆっくりと 1 対の SEP-PAKs に通した。DTT を 20 ml の緩衝液 A で溶出した。還元されたペプチドを、 7 ml の緩衝液 B で事前に重さを量ったボトル中に溶出し、次いで一晩凍結乾燥した。次いでこのボトルの重さを量り、回収されたポリペプチドの量を測定した。次いで、還元されたペプチドを、MCS 活性化担体タンパク質に即座にカップリングした。

【0146】

(HCV ペプチドの MCS 活生ヒタンパクへのカップリング)

5 mM の EDTA を伴う約 100 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 ($\text{pH } 6.66$) を、真空下で脱気し、次いで 10 分間窒素を吹き込んだ。MCS 活性化担体タンパク質の 10 mg/ml 溶液 2 伽 1 に、過剰の発泡を防ぐために窒素を注意深く吹き込んだ。各 5 mg の還元ペプチドを、約 0.2 ml の脱気され吹き込まれたリン酸 / EDTA 緩衝液 ($\text{pH } 6.66$) 中に溶解し、次いで MCS 活性化担体タンパク質溶液と混合した。得られた混合物を、スクリーキャップボトルに移し、次いで窒素を充満させ密封した。この溶液を、Branson 2000^R 音波処理バス中に 2 分間おいてさらに脱気した。このボトルを、アルミホイルで被い、振とうテーブル上で緩やかに攪拌しながら室温で一晩インキュベートした。

【0147】

得られたコンジュゲートは可溶性であり、カップリングされなかったペプチドは、この混合物をリン酸 / EDTA 緩衝液 ($\text{pH } 6.66$) で平衡化したセファデックス PD10 カラムに通すことにより除去した。タンパク質画分を採集した。担体タンパク質に結合したペプチドの量を、アミノ酸分析により測定した。

【0148】

コンジュゲートおよび担体タンパク質の両方の $150 \mu\text{g}$ 分量のアミノ酸分析を行った。担体タンパク質だけの寄与によるアミノ酸のレベルの平均割合を測定し、生成した結合ペプチドの量を計算した。セリン、スレオニン、トリプトファン、メチオニン、チロシンおよびシステインは、標準加水分解条件下で改変されるので、これらのアミノ酸のレベル

10

20

30

40

50

は、測定されなかった。これらの計算で得られた典型的な結果を、表 6 中に示す。

【 0 1 4 9 】

【 表 6 】

表 6

アミノ酸	担体のみ	コンジュゲート
D	212	193
E	194	170
G	153	108
R	60	56
A	150	384
P	79	163

10

コンジュゲートの太字の値は、ペプチド中にも存在していたアミノ酸である。アラニンおよびプロリンを含むコンジュゲートについては、結果を標準化するために、因子 $(193 + 179 + 180 + 56) / (212) + 194 + 153 + 60 = 0.8659$ に、アミノ酸レベルの量を掛けてある。

20

【 0 1 5 0 】

(ワクチン組成物の調製)

注射組成物は、上記のように調製された M C S 活性化ジフテリアトキソイド担体タンパク質に結合した H C V ペプチド、および本明細書中に参考として援用された 1990 年 12 月 13 日に公開された P C T 国際公開番号第 W 0 9 0 4 8 3 7 号に記載のサブミクロンの水中油乳化型アジュバントを構成成分とした。さらに、H C V 結合ペプチドおよびアジュバントに加え、免疫賦活剤である親油性ムラミルペプチド (M T P - P E、C I B A - G E I G Y、B a s e l、S w i t z e r l a n d) を含む注射組成物を調製した。ワクチン組成物は、一般的に 50 % のタンパク質および 5 % の免疫賦活剤から構成された。

30

【 0 1 5 1 】

(M T P - P E を含むワクチン組成物の処方)

注射ワクチン組成物 10 ml の調製:

2.5 ml のスクアレン (S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s , M o .)

0.25 ml Tween 80 (S i g m a C h e m i c a l C o .)

0.25 ml SPAN 85 (S i g m a C h e m i c a l C o .)

1000 μg M T P - P E

1000 μg M C S - 活性化ジフテリアトキソイド担体タンパク質に結合した H C V ペプチド

(M T P - P E を含まないワクチン組成物の処方箋)

40

注射ワクチン組成物 10 ml の調製:

2.5 ml のスクアレン (S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s , M o .)

0.25 ml Tween 80 (S i g m a C h e m i c a l C o .)

0.25 ml SPAN 85 (S i g m a C h e m i c a l C o .)

1000 μg M C S - 活性化ジフテリアトキソイド担体タンパク質に結合した H C V ペプチド

(実施例 6)

(ワクチン調製物の毒性についての試験方法)

実施例 5 の方法により調製したワクチンを、毒性について小動物で試験した。1 kg 当

50

り50 μ gのワクチンを、モルモット、マウスおよびウサギに腹腔内注射して投与した。アカゲザルおよび霊長類にも、腹腔内注射によりワクチンを投与した。アカゲザルおよび霊長類の試験個体群の半数には、5 μ g / kgで投与したが、一方他の半数には、50 μ g / kgで投与した。各研究で用いた対照動物には、ウイルスペプチドを含まないワクチン調製物の成分からなる同等量の組成物を注射した。

【0152】

実施例5の方法により調製したワクチンを、毒性について小動物で試験した。1 kg当り50 μ gのワクチンを、モルモット、マウスおよびウサギに腹腔内注射して投与した。アカゲザルおよび霊長類にも、腹腔内注射によりワクチンを投与した。アカゲザルおよび霊長類の試験個体群の半数には、5 μ g / kgで投与したが、一方他の半数には、50 μ g / kgで投与した。各研究で用いた対照動物には、ウイルスペプチドを含まないワクチン調製物の成分からなる同等量の組成物を注射した。

10

【0153】

(実施例7)

(ワクチンにおける投与動物における中和抗体の産生の証明)

実施例5の方法により調製したワクチンを、ワクチン投与した被験体におけるウイルス中和抗体の産生を誘起するワクチンの効果を測定するために、チンパンジーで試験した。チンパンジーに、実施例5の方法により調製したワクチンを5 μ g / kgの投与量で、6ヵ月の期間にわたり0、1、3、および6ヵ月の間隔をおいて投与した。対照のチンパンジーには、ウイルスペプチドを含まないワクチンの成分からなる同等量の組成物を注射した。最後のワクチン投与を行ってから2週間後、試験および対照の各チンパンジーに、10 C I U₅₀ (チンパンジー感染単位)の投与量のCDC / 910血漿接種材料で刺激した。ウイルス刺激の1週間後から始めて、各チンパンジーを、ウイルス血症について毎週ベースでモニターした。

20

【0154】

ウイルス血症を検出するために、血液試料および肝臓バイオプシー標本を、数ヵ月間毎週ベースで、対照および試験動物から採取した。肝臓バイオプシーにより採取された組織を、壊死および/または炎症の徴候について組織学的に検査した。さらに、バイオプシー材料由来の肝細胞を、HCV感染に特有の細管の存在について電子顕微鏡で検査した。血液試料はまた、ワクチンの調製に使用されなかったウイルスポリペプチドのセグメントに対する抗体の存在について、上記のELISAアッセイによっても分析された。特に、各血液試料を、NS₃、NS₄、およびNS₅ペプチドに対する抗体の存在について、ELISAによりスクリーニングした。チンパンジーの血清中におけるこれらのペプチドに対する抗体の存在は、HCV感染を示した。

30

【0155】

以下の方法を用いて、チンパンジーから採取した血漿中に循環するまたは肝臓バイオプシー組織中に存在するウイルスRNAを検出した。

【0156】

(肝臓および血清中のHCV RNAを検出するcPCR法)

cPCRアッセイにおいて、試料中の推定ウイルスRNAを、逆転写酵素でcDNAに逆転写し、次いで、得られたcDNAのセグメントを、Saikiら(1986)により記載のPCR技術の改変法を用いて増幅する。cPCR法に用いるプライマーは、HCV RNAから誘導する。これは本明細書で提供されるHCV cDNAのファミリーにより同定され得る。HCV-RNAに対応する増幅生成物を、本明細書で提供されるHCV cDNAのファミリーから誘導されるプローブを使用して検出する。

40

【0157】

これらの研究に用いたcPCR / HCVアッセイは、RNAの調製、RNAのcDNAへの逆転写、PCRによるcDNAの特異的セグメントの増幅、およびPCR生成物の分析のための以下の方法を使用して実施した。

【0158】

50

全RNAを調製するために、Maniatisら(1982)に記載のグアニジウムイソチオシアネート法を使用して、RNAを肝臓から抽出した。

【0159】

全RNAを血漿から単離するために、血漿をTENB(0.1M NaCl、50mM トリス-HCl(pH8.0)、1mM EDTA)で5~10倍に希釈し、そして、プロテイナーゼK/SDS溶液(0.5%SDS、1mg/mlプロテイナーゼK、20マイクログラム/mlポリA担体)中で60~90分間37でインキュベートした。試料を、フェノール(pH6.5)で1回抽出し、得られた有機相を0.1%SDS含有TENBで再び1回抽出し、そして、両抽出の水相をプールして、同体積のフェノール/CHCl₃/イソアミルアルコール[1:1(99:1)]で2回抽出した。得られた水相を、同体積のCHCl₃/イソアミルアルコール(99:1)で2回抽出し、そして、0.2M 酢酸ナトリウム(pH6.5)、および2.5倍容量の100%エタノールを用いてエタノール沈澱した；沈澱は、-20で一晩行った。

10

【0160】

PCR反応のテンプレートとして使用したcDNAは、対応するcDNAの調製のために選抜された試料を使用して調製した。各RNA試料(2マイクログラムのチンパンジー肝臓の熱変性全RNAまたは2マイクロリットルの血漿から得たRNAを含む)を、1マイクロモルの各プライマー、1ミリリットルの各デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)、50ミリモルのトリス-HCl(pH8.3)、5ミリモルのMgCl₂、5ミリモルのジチオトレイトール(DTT)、73ミリモルのKCl、40単位のRNアーゼインヒビター(RNAsin)、および5単位のAMV逆転写酵素を含む25マイクロリットル反応物中でインキュベートした。このインキュベーションは、37で60分間行った。cDNA合成に続いて、反応物を50マイクロリットルの脱イオン水(DIW)で希釈し、10分間沸騰し、氷上で冷却した。

20

【0161】

HCV cDNAのセグメントの増幅は、それらの配列がHCV cDNAクローン36(アンチ-センス)および37b(センス)から誘導される2つの合成オリゴマー16量体プライマーを使用して実施した。クローン36由来のプライマーの配列は以下であった：

【0162】

【化3】

5' GCA TGT CAT GAT GTA T 3'

クローン37b由来のプライマーの配列は以下であった：

【0163】

【化4】

5' ACA ATA CGT GTG TCA C 3'

30

40

各プライマーは、最終濃度1マイクロモルで用いた。プライマーに隣接するHCV cDNAのセグメントを増幅するために、cDNA試料を、0.1マイクログラムのRNアーゼAおよびPerkin Elmer Cetus PCRキット(N801-0043またはN801-0055)のPCR反応物を用いて、製造者の指示に従ってインキュベートした。PCR反応は、Perkin Elmer Cetus DNA熱サイクラーで、30サイクルまたは60サイクルいずれかで実施した。各サイクルは、94 1分での変性段階、37 2分でのアニーリング段階、および72 3分での伸長段階で構成された。しかしながら、最終サイクル(30または60)における伸長段階は、3分ではなく7分であった。増幅後、試料を同体積のフェノール：クロロホルム(1:1)で抽出し、次いで同体積のクロロホルムで抽出し、次いで試料を0.2Mの酢酸ナトリウム含有

50

エタノールで沈澱させた。

【0164】

cPCR生成物を、次のようにして分析した。生成物を、Murakawara(1988)に従って1.8%アルカリ性アガロースゲル電気泳動にかけ、そして、0.4MのNaOH中でゲルを一晩ブロッティングすることにより、ZETATMProbe紙(BioRad Corp.)上に移した。プロットを、2×SSC(1×SSCは、0.15M NaCl、0.015Mのクエン酸ナトリウム)中で中和し、0.3MのNaCl、15mMのリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.8、15mMのEDTA、1.0%のSDS、0.5%の脱脂乳(Carnation Co.)、および0.5mg/mlの超音波処理され変性されたサケ精子DNA中でプレハイブリダイズした。HCVcDNAフラグメントについて分析すべきプロットを、米国出願番号07/456,637に記載のクローン35のHCVcDNA挿入配列のニックトランスレーションにより生成された³²P標識化プローブに、ハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションの後、プロットを1×SSC(1×SSCは、0.15M NaCl、0.01Mのクエン酸ナトリウム)中で65℃で洗浄し、乾燥し、そしてオートラジオグラフを記録した。生成物の期待サイズは、586ヌクレオチド長である；プローブとハイブリダイズされて、このサイズの範囲でゲル中を移動した生成物は、ウイルスRNAについて陽性であると評価された。

【0165】

分析される各試料中のRNAの存在を立証するために、対照として、アルファ-1抗トリプシンmRNAを増幅するために設計されたcPCRプライマーを用いるcPCRを実施した。アルファ-1抗トリプシン遺伝子のコード領域は、Rosenbergら(1984)中に記載されている。アルファ-1抗トリプシン遺伝子のコード領域の365ヌクレオチドのフラグメントを増幅するために設計された合成オリゴマー16量体プライマーを、ヌクレオチド22-37位(センス)およびヌクレオチド372-387位(アンチセンス)から誘導した。cDNA/PCRプライマー配列の間にあるがそれを含まない³²Pニックトランスレーションプローブを用いて、PCR生成物を検出した。

【0166】

PCR反応の極感受性のため、すべての試料を少なくとも3回試みた。次の予防措置を取ってあらゆる偽陽性シグナルを取り除いた：1)O-リングゴム栓を有するスクリーキャップ管を用いてエアロゾルを除去；2)ディスポーザブルピストン/キャピラリーを有するRanin MICROMAN^Rの陽圧ピペッター(positive displacement pipettors)でピペティング；および3)2つの非連続的cDNAクローンからのcDNAおよびPCRプライマーに対するオリゴヌクレオチド配列の選択。

【産業上の利用可能性】

【0167】

本発明の免疫反応性組成物は、例えば、HCV感染、特に慢性HCV感染に対する個体の処置にも使用し得るワクチンのような材料の調製において有用である。さらに、この組成物は、生物学的試料におけるHCVの多数の変異体の検出に用いる材料を調製するために使用し得る。例えば、本発明の免疫反応性組成物は、1つ以上のHCV単離体を認識するポリクローナル抗体組成物を生成するために使用され得、または抗HCV抗体イムノアッセイの抗原として使用され得る。後者の方法は、血液生成物をHCV汚染の可能性についてスクリーニングするために使用され得る。ポリクローナル抗血清または抗体は、個体の受動免疫のために使用され得る。

【図面の簡単な説明】

【0168】

【図1】図1は、HCVゲノムの遺伝学的な構築を模式的に示す。

【図2】図2は、I群およびII群のHCV単離体によってコードされるE1タンパク質の推定アミノ酸配列の比較を示す。

【図3】図3は図2の続きである。

【図 4】図 4 は、H C V 単離体の推定 E 2 / N S 1 領域のアミノ酸配列の比較を示す。

【図 5】図 5 は図 4 の続きである。

【図 6】図 6 は図 5 の続きである。

【図 7】図 7 は、推定 H C V E 2 / N S 1 タンパク質（アミノ酸 3 8 4 - 4 2 0 位）のアミノ末端領域、および H I V - 1 の g p 1 2 0 V 3 超可変領域に関する抗原性プロフィールを示すグラフである。

【図 8】図 8 は、H C V E 2 / N S 1 タンパク質（アミノ酸 3 8 4 - 4 2 0 位）のアミノ末端領域由来の所定の残基が、 α - ヘリックス、 β - シートまたは β - ターンのいずれかの二次構造的特徴において見い出される確率の百分率を表す一連のグラフを示す。

【図 9】図 9 は、H C V 1 8（パネル A）または T h（パネル D）由来の血漿中の抗体と、H C V 単離体 H C T 1 8 の 3 8 4 から 4 1 5 または 4 1 6 までのアミノ酸から誘導される部分的に重複するビオチニル化 8 量体ペプチドとの反応性を表す棒グラフである。 10

【図 10】図 10 は、H C V 1 8（パネル B）または T h（パネル E）由来の血漿中の抗体と、H C V 単離体 T h の 3 8 4 から 4 1 5 または 4 1 6 までのアミノ酸から誘導される部分的に重複するビオチニル化 8 量体ペプチドとの反応性を表す棒グラフである。

【図 11】図 11 は、H C V 1 8（パネル C）または T h（パネル F）由来の血漿中の抗体と、H C V 単離体 H C V J 1 の 3 8 4 から 4 1 5 または 4 1 6 までのアミノ酸から誘導される部分的に重複するビオチニル化 8 量体ペプチドとの反応性を表す棒グラフである。

【図 12】図 12 は、Q 1 および Q 3 の単離体に対して与えられた E 2 / N S 1 ポリペプチドの 2 つの領域の推定アミノ酸配列、すなわち 3 8 4 - 4 1 4 位のアミノ酸および 5 4 7 - 6 4 7 位のアミノ酸を示す。 20

【図 13】図 13 は、単離体 H C V J 1 . 1 および J 1 . 2 の推定アミノ酸配列の 3 8 4 位から 6 4 7 位のアミノ酸を示す。

【図 14】図 14 は、単離体 H C T 2 7 および H C V E 1 の推定アミノ酸配列の 3 8 4 位から 6 5 1 位のアミノ酸を示す。

【図 15】図 15 は、単離体 H C V - 1 の完全ポリタンパク質配列を示す。

【図 16】図 16 は図 15 の続きである。

【図 17】図 17 は図 16 の続きである。

【図 18】図 18 は図 17 の続きである。 30

【図 19】図 19 は図 18 の続きである。

【図 20】図 20 は図 19 の続きである。

【図 21】図 21 は図 20 の続きである。

【図 22】図 22 は図 21 の続きである。

【図 23】図 23 は図 22 の続きである。

【図 24】図 24 は図 23 の続きである。

【図 25】図 25 は図 24 の続きである。

【図 26】図 26 は図 25 の続きである。

【図 27】図 27 は図 26 の続きである。

【図 28】図 28 は図 27 の続きである。 40

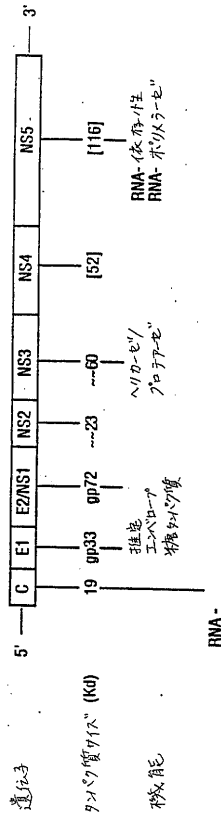
【図 29】図 29 は図 28 の続きである。

【図 30】図 30 は図 29 の続きである。

【図 31】図 31 は図 30 の続きである。

【図 32】図 32 は図 31 の続きである。

【 1 】



【 2 】

HCV-1	192	YQVNSTGLVHTVNDPCNSSIVYEADAALHTPGCVFC
HCT18		H-----A-----
HCT23		-----T-----S-----
HCT27		-----S-----I-----H-----
HC-J1		-----*-----*-----*-----
HC-J4		-----E-----VS-----I-----S-----M-----M-----
HCV-J		-----E-----VS-----I-----S-----M-----M-----
HCV J1		-----E-----VS-----I-----S-----M-----M-----
BK		-----E-----H-----VS-----I-----S-----A-----L-----M-----
HCV-1	230	VREGNSRCRWAMPTVATKDKLPATQRRHLDLIVGSAITCSALVYGDLCQSVFLVQ
HCT18		H-----V-----V-----A-----R-----T-----I-----
HCT23		-----D-----V-----V-----K-----N-----T-----I-----
HCT27		-----V-----K-----PVA-----N-----T-----I-----
HC-J1		-----V-----*-----*-----*-----*-----
HC-J4		-----D-----S-----L-----A-----NASV-----T-----I-----V-----A-----AF-----M-----S-----
HCV-J		-----S-----F-----L-----A-----NSSI-----T-----I-----V-----A-----A-----M-----S-----
HCV J1		-----N-----S-----L-----A-----NASV-----T-----I-----V-----T-----AF-----M-----S-----
BK		-----S-----S-----L-----A-----NVTI-----T-----I-----V-----A-----AF-----M-----S-----
HCV-1	290	LTFTSPRRMTTQCNCISYFGCHITGHRMAMDMQMSPTTALVMAOLLRIPOALIDMIA
HCT18		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----
HCT23		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----
HCT27		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----
HC-J1		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----
HC-J4		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----
HCV-J		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----
HCV J1		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----
BK		-----L-----T-----F-----S-----P-----R-----M-----T-----T-----Q-----C-----N-----C-----I-----S-----Y-----F-----G-----H-----I-----T-----G-----H-----R-----M-----A-----M-----D-----M-----Q-----M-----S-----P-----T-----T-----A-----L-----V-----M-----A-----O-----L-----L-----R-----I-----P-----O-----A-----L-----I-----D-----M-----I-----A-----

【 3 】

HCV-1	350	GAHGVLAGIAYESVMGNMAKVLVLLIPAGVDA
HCT18		-----G-----A-----H-----G-----V-----L-----A-----G-----I-----A-----Y-----E-----S-----V-----M-----G-----N-----M-----A-----K-----V-----L-----V-----L-----L-----I-----P-----A-----G-----V-----D-----A-----
HCT23		-----M-----
HCT27		-----M-----
HC-J1		-----*-----*-----*-----*-----
HC-J4		-----L-----Y-----I-----A-----I-----A-----I-----A-----G-----
HCV-J		-----L-----Y-----I-----M-----I-----M-----G-----
HCV J1		-----L-----Y-----I-----M-----I-----M-----G-----
BK		-----L-----Y-----A-----I-----M-----I-----M-----G-----

【 4 】

HCV-1	370	KVLVILLFAGVDAETHTGSGAGHTYSGFVSLLAGAQAQNVOLINTNGSMILNSTALNC
HCT27		-----K-----V-----L-----V-----I-----L-----L-----F-----A-----G-----V-----D-----A-----E-----T-----H-----T-----G-----S-----G-----A-----G-----H-----T-----Y-----S-----G-----F-----V-----S-----L-----L-----A-----G-----A-----Q-----A-----Q-----N-----V-----O-----L-----I-----N-----T-----N-----G-----S-----M-----I-----L-----N-----S-----T-----A-----L-----N-----C-----
HCT23		-----L-----L-----Y-----T-----N-----A-----R-----T-----Q-----L-----F-----S-----R-----D-----I-----I-----R-----
HCT27		-----L-----L-----Y-----T-----N-----A-----R-----T-----Q-----L-----F-----S-----R-----D-----I-----I-----R-----
HC-J1		-----L-----L-----Y-----T-----N-----A-----R-----T-----Q-----L-----F-----S-----R-----D-----I-----I-----R-----
HC-J4		-----L-----L-----Y-----T-----N-----A-----R-----T-----Q-----L-----F-----S-----R-----D-----I-----I-----R-----
HCV-J		-----L-----L-----Y-----T-----N-----A-----R-----T-----Q-----L-----F-----S-----R-----D-----I-----I-----R-----
HCV J1		-----L-----L-----Y-----T-----N-----A-----R-----T-----Q-----L-----F-----S-----R-----D-----I-----I-----R-----
BK		-----L-----L-----Y-----T-----N-----A-----R-----T-----Q-----L-----F-----S-----R-----D-----I-----I-----R-----
HCV-1	430	NDSLNTGMLAGLFYHKKFNSGCPERLASCRPLDQDQMGPISYANGSGDPQPCYCHY
HCT27		-----N-----D-----S-----L-----N-----T-----G-----M-----L-----A-----G-----L-----F-----Y-----H-----K-----K-----F-----N-----S-----G-----C-----P-----E-----R-----L-----A-----S-----C-----R-----P-----L-----D-----Q-----D-----Q-----M-----G-----P-----I-----S-----Y-----A-----N-----G-----S-----G-----D-----P-----Q-----P-----C-----Y-----C-----H-----Y-----
HCT23		-----G-----D-----D-----V-----Y-----Y-----M-----A-----Q-----O-----T-----E-----H-----
HCT27		-----G-----D-----D-----V-----Y-----Y-----M-----A-----Q-----O-----T-----E-----H-----
HC-J1		-----G-----D-----D-----V-----Y-----Y-----M-----A-----Q-----O-----T-----E-----H-----
HC-J4		-----G-----D-----D-----V-----Y-----Y-----M-----A-----Q-----O-----T-----E-----H-----
HCV-J		-----G-----D-----D-----V-----Y-----Y-----M-----A-----Q-----O-----T-----E-----H-----
HCV J1		-----G-----D-----D-----V-----Y-----Y-----M-----A-----Q-----O-----T-----E-----H-----
BK		-----G-----D-----D-----V-----Y-----Y-----M-----A-----Q-----O-----T-----E-----H-----
HCV-1	490	PEKCGIVPAKSGVPCFTRPVPVGTGTRGAGTYSNGENIDVFVLANTRPPLGNH
HCT27		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----
HCT23		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----
HCT27		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----
HC-J1		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----
HC-J4		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----
HCV-J		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----
HCV J1		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----
BK		-----P-----E-----K-----C-----G-----I-----V-----P-----A-----K-----S-----G-----V-----P-----C-----F-----T-----R-----P-----V-----P-----V-----G-----T-----G-----T-----R-----G-----A-----G-----T-----Y-----S-----N-----G-----E-----N-----I-----D-----V-----F-----V-----L-----A-----N-----T-----R-----P-----P-----L-----G-----N-----H-----

HcV単離体の推定 E2/NS1領域の73/80塩基配列比較

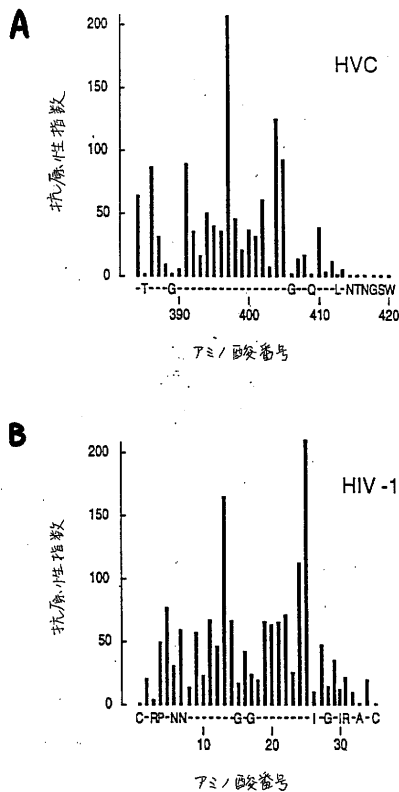
【 図 5 】

HCV-1	PGCTMMSGCTFTKVCAPFCVGGAGNNTHLCFTDCFRKHPDATYRGSGPWITRCLV	550
HCV-27	-----V-----Q-----AA-----	
HCV-81	-----V-----S-----E-----M-----	
H77	-----V-----L-----E-----M-----	
H90	-----V-----R-----E-----M-----	
Th	-----V-----V-----E-----M-----	
HC-J1	-----T-----G-----N-----V-----V-----E-----TK-----L-----M-----	
HC-J4	-----T-----G-----N-----V-----T-----E-----TK-----L-----M-----	
HCV-J	-----T-----G-----N-----V-----T-----E-----TK-----L-----M-----	
JH-1	-----T-----G-----N-----V-----T-----E-----TK-----L-----M-----	
BK	-----T-----G-----N-----V-----T-----E-----TK-----L-----M-----	
HCV-1	DYFELMHYPCTINTTIFKIRMYGVGSHLEACNWTGRCDELDKRSLSPLITTT	610
HCV-27	H-----V-----VQ-----D-----V-----D-----RL-----S-----	
HCV-81	G-----V-----L-----V-----OV-----N-----D-----S-----	
H77	H-----V-----V-----V-----L-----I-----S-----	
H90	H-----V-----V-----V-----L-----I-----S-----	
Th	H-----V-----V-----V-----L-----I-----S-----	
HC-J1	-----V-----F-----V-----V-----N-----N-----P-----S-----	
HC-J4	-----V-----F-----V-----V-----N-----N-----P-----S-----	
HCV-J	-----V-----F-----V-----V-----N-----N-----P-----S-----	
JH-1	-----V-----F-----V-----V-----N-----N-----P-----S-----	
BK	-----V-----F-----V-----V-----N-----N-----P-----S-----	

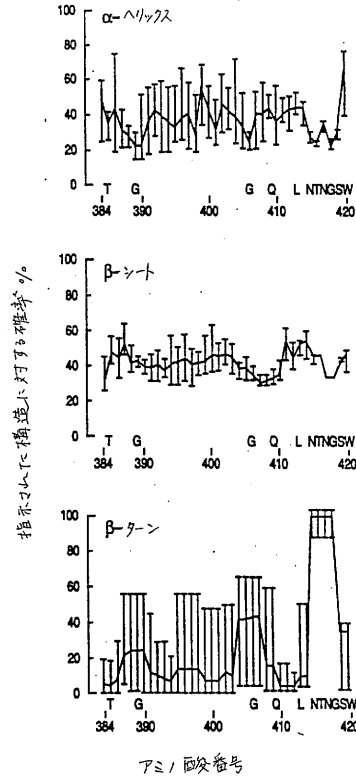
【 図 6 】

HCV-1	TOMQVLPQSEFTLPALSTGLHHONIVDQVLYGVGSSINSMKMKYVLLPILLADA	670
HCV-27	-----T-----T-----V-----I-----I-----	
HCV-81	-----T-----T-----V-----V-----I-----	
H77	-----T-----T-----V-----V-----I-----	
H90	-----T-----T-----V-----V-----I-----	
Th	-----T-----T-----V-----V-----I-----	
HC-J1	-----E-----I-----R-----L-----AVV-----F-----L-----	
HC-J4	-----E-----I-----R-----L-----AVV-----F-----L-----	
HCV-J	-----E-----I-----R-----L-----AVV-----F-----L-----	
JH-1	-----E-----I-----R-----L-----AVV-----F-----L-----	
BK	-----E-----I-----R-----L-----AVV-----F-----L-----	
HCV-1	RYSCIMMLLISQAEALENVILNAASTAGTIGLSPLVFFCFAMVIGRWEGAVYT	730
HCV-27	-----I-----L-----A-----AVA-----R-----A-----A-----	
HCV-81	-----I-----L-----A-----AVA-----R-----A-----A-----	
H77	-----I-----L-----A-----AVA-----R-----A-----A-----	
H90	-----I-----L-----A-----AVA-----R-----A-----A-----	
Th	-----I-----L-----A-----AVA-----R-----A-----A-----	
HC-J1	-----A-----A-----T-----V-----V-----A-----L-----L-----RL-----A-----A-----	
HC-J4	-----A-----A-----T-----V-----V-----A-----L-----L-----RL-----A-----A-----	
HCV-J	-----A-----A-----T-----V-----V-----A-----L-----L-----RL-----A-----A-----	
JH-1	-----A-----A-----T-----V-----V-----A-----L-----L-----RL-----A-----A-----	
BK	-----A-----A-----T-----V-----V-----A-----L-----L-----RL-----A-----A-----	
HCV-1	FTGMPPLLLLLLPORAYALDTEVAASCGGVVINGLMALTSPTTKYKISLMLMQYF	790
HCV-27	-----M-----	
HCV-81	-----M-----	
H77	-----M-----	
H90	-----M-----	
Th	-----M-----	
HC-J1	-----L-----V-----P-----M-----R-----M-----A-----F-----VL-----L-----	
HC-J4	-----L-----V-----P-----M-----R-----M-----A-----F-----VL-----L-----	
HCV-J	-----L-----V-----P-----M-----R-----M-----A-----F-----VL-----L-----	
JH-1	-----L-----V-----P-----M-----R-----M-----A-----F-----VL-----L-----	
BK	-----L-----V-----P-----M-----R-----M-----A-----F-----VL-----L-----	

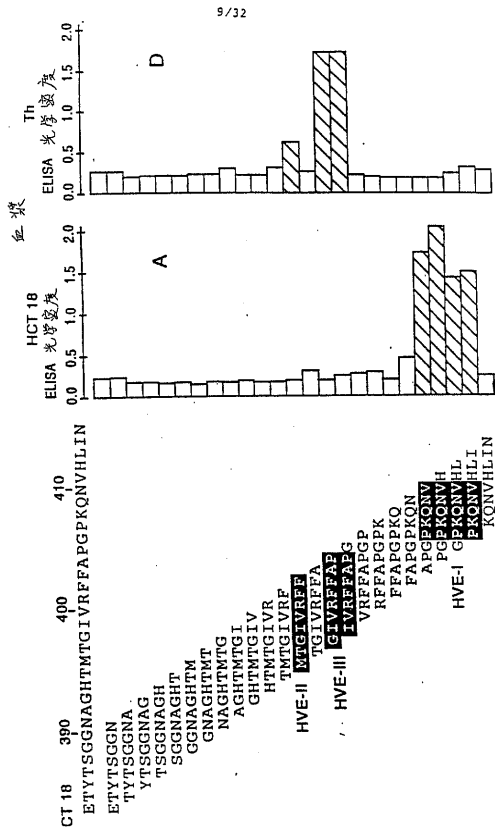
【 図 7 】



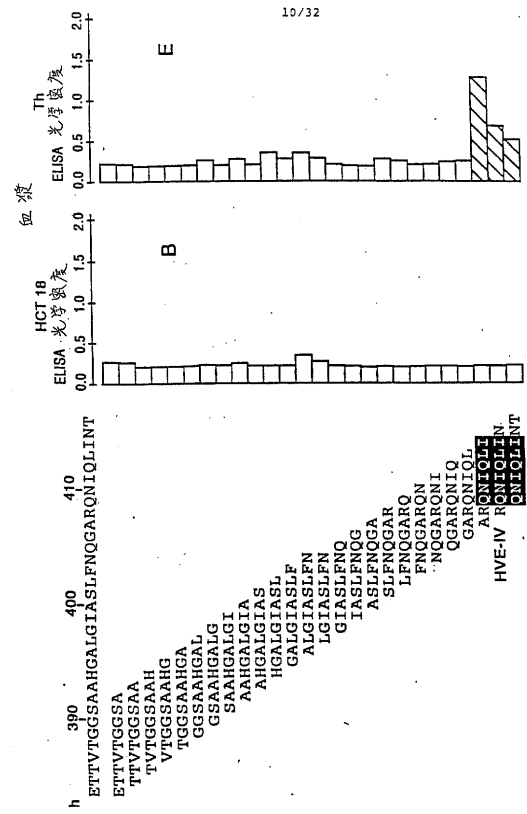
【 図 8 】



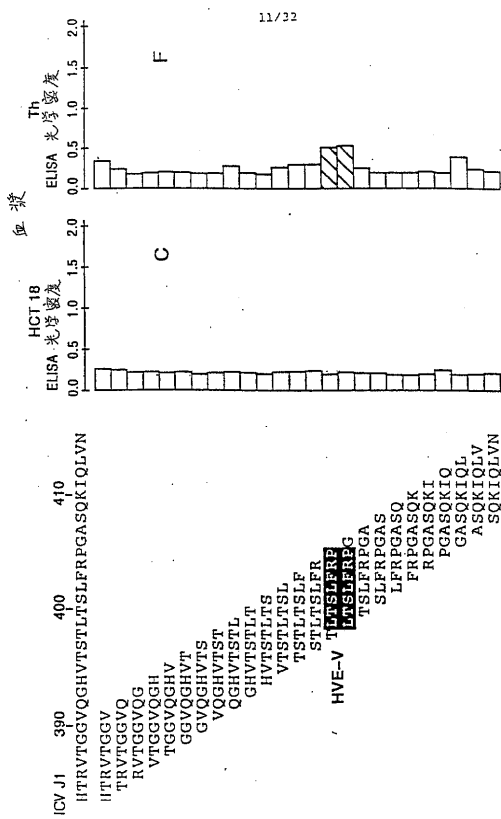
【 図 9 】



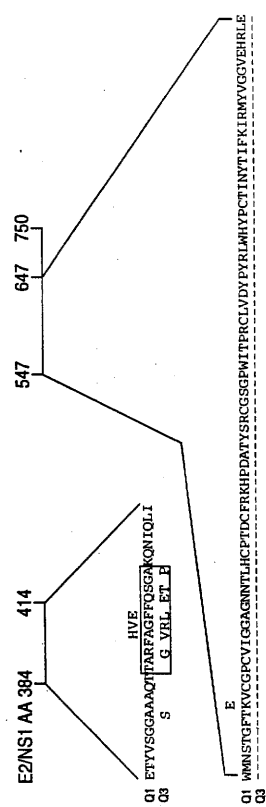
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 12 】



【 1 3 】

E2 HV

384 HTRVVGQGHVITSTLSLPRFQASQIQLVNTNGSHINRTALNCNSLQTFALAFY
N-H-----GARG-----Q-----R A-----K-----

444 THKFNASGCPERMASCRSIDKFDQGMGPITYAQDMSDQRPYCHYAPROGIVPASQVC
--R-----VG-----R'-----T-----

504 GPVYCTPSVVGITDRSGAPTYNKGDNEDTVLLANTRPHGHNFGCTWNSGTSFTY
-----F V-----

564 CGSPFCNIGGVNNTLCTCTCFERHEDATYKCGSGMWLTPRCILVDYPRIMHPTCVN
A I R
K E

624 FTIFKVMYGVGVHRLDANCMWTRGR 651

【 1 4 】

E2 HV

384 TTYTTGNAARTQALTSFSPGAKQIQLVNTNGSHINRTALNCNSLQTFWAGLFY
E-----ST-----G-V-L--R-----E-----

444 YHKFNSSGCPERMASCRPLADFOQGMGPISYANGSGPEIRPYCHYAPROGIVPASQVC
-----D-----T-----

504 GPVYCTPSVVGITDRSGAPTYNKGDNEDTVLLANTRPHGHNFGCTWNSGTSFTY
-----C-D-----V-----

564 CGAPFCVIGGVNNTLCTCTCFERHEDATYKCGSGMWLTPRCILVDYPRIMHPTCVN
--A-----Y-----E-----GS-----G-----

624 YTVVQIMTYGVGVHRLDANCMWTRGR 651
--LFKV-----E-----Q-----N-----SP-----

684 AUTGLLHJHONIVDVOYINGVSSIVSMATKWEVILLFILLANRIGCSLW
-----D-V-----

【 1 5 】

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Lys Asn Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
65 70 75 80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
85 90 95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100 105 110

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
130 135 140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145 150 155 160

Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
165 170 175

【 1 6 】

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr
180 185 190

Gln Val Arg Asn Ser Thr Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
195 200 205

Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro
210 215 220

Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val
225 230 235 240

Ala Met Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Ala Thr
245 250 255

Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys
260 265 270

Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly
275 280 285

Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Gly Cys
290 295 300 305

Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
310 315 320

Asp Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Met Ala Gln
325 330 335

Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His
340 345 350

【 1 7 】

Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Ann Trp
 353 360 365
 Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu
 370 375 380
 Thr His Val Thr Gly Ser Ala Gly His Thr Val Ser Gly Phe Val
 385 390 395 400
 Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ala Lys Gln Ann Val Gln Leu Ile Ann Thr
 405 410 415
 Ann Gly Ser Trp His Leu Ann Ser Thr Ala Leu Ann Cys Ann Asp Ser
 420 425 430
 Leu Ann Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr His His Lys Phe Ann
 435 440 445
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Pro Leu Thr Asp
 450 455 460
 Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Ann Gly Ser Gly Pro
 465 470 475
 Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys Gly Ile
 480 485 490
 Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
 500 505 510
 Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser
 515 520 525

【 1 8 】

Trp Gly Glu Ann Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Ann Ann Thr Arg Pro
 530 535 540
 Pro Leu Gly Ann Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Ann Ser Thr Gly Phe
 545 550 555
 Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Ala Gly Ann
 560 565 570
 Ann Thr Leu His Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Asp Ala
 575 580 585
 Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Leu
 590 595 600
 Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Ann Tyr
 605 610 620
 Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 625 630 635
 Glu Ala Ala Cys Ann Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
 640 645 650
 Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Thr Thr Thr Gln Trp
 655 660 665
 Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Leu Ala Leu Ser Thr Gly
 670 675 680
 Leu Ile His Leu His Gln Ann Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
 685 690 695 700

【 1 9 】

Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Val
 705 710 715
 Leu Leu Phe Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu Trp
 720 725 730
 Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Ann Leu Val
 735 740 745
 Ile Leu Ann Ala Ala Ser Leu Ala Gly Thr His Gly Leu Val Ser Phe
 750 755 760
 Leu Val Phe Phe Cys Ala Trp Tyr Leu Lys Gly Lys Trp Val Pro
 765 770 775
 Gly Ala Val Tyr Thr Phe Tyr Gly Met Trp Pro Leu Leu Leu Leu
 780 785 790
 Leu Ala Leu Pro Gln Arg Ala Tyr Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ala
 795 800 805
 Ser Cys Gly Gly Val Val Leu Val Gly Leu Met Ala Leu Thr Leu Ser
 810 815 820
 Pro Tyr Tyr Lys Arg Tyr Ile Ser Trp Cys Leu Trp Trp Leu Gln Tyr
 825 830 835
 Phe Leu Thr Arg Val Glu Ala Gln Leu His Val Trp Ile Pro Pro Leu
 840 845 850
 Ann Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Met Cys Ala Val
 855 860 865
 870 875 880

【 2 0 】

His Pro Thr Leu Val Phe Asp Ile Thr Lys Leu Leu Leu Ala Val Phe
 885 890 895
 Gly Pro Leu Trp Ile Leu Gln Ala Ser Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe
 900 905 910
 Val Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Phe Cys Ala Leu Ala Arg Lys Met
 915 920 925
 Ile Gly Gly His Tyr Val Gln Met Val Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu
 930 935 940
 Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Ann His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala
 945 950 955
 His Ann Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe
 960 965 970
 Ser Gln Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala
 975 980 985
 Cys Gly Asp Ile Ile Ann Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Arg
 990 995 1000
 Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp Arg
 1005 1010 1015
 Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu
 1020 1025 1030
 Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Ann Gln Val Glu
 1035 1040 1045
 1050 1055

【 2 1 】

Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr
1060 1065 1070
Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg
1075 1080 1085
Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val
1090 1095 1100
Asn Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu
1105 1110 1115
Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His
1120 1125 1130
Ala Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu
1135 1140 1145
Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro
1150 1155 1160
Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val
1165 1170 1175
Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn
1180 1185 1190
Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro
1195 1200 1205
Pro Val Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr
1210 1215 1220 1225 1230

【 2 3 】

Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser
1410 1415 1420
Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu
1425 1430 1435 1440
Met Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr
1445 1450 1455
Cys Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile
1460 1465 1470
Glu Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg
1475 1480 1485
Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro
1490 1495 1500
Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Val Leu Cys Glu Cys
1505 1510 1515 1520
Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr
1525 1530 1535
Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln
1540 1545 1550
Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile
1555 1560 1565
Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro
1570 1575 1580

【 2 2 】

Gly Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Tyr Ala Ala Gln Gly
1235 1240 1245
Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe
1250 1255 1260
Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr
1265 1270 1275
Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr
1280 1285 1290
Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Ala Tyr Asp Ile
1295 1300 1305
Ile Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly
1310 1315 1320
Ile Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val
1325 1330 1335
Val Leu Ala Thr Ala Thr Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro
1340 1345 1350
Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr
1355 1360 1365
Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile
1370 1375 1380
Phe Cys His Ser Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val
1385 1390 1400 1405

【 2 4 】

Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro
1585 1590 1595 1600
Pro Pro Ser Trp Asn Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro
1605 1610 1615
Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln
1620 1625 1630
Asn Glu Ile Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys
1635 1640 1645
Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly
1650 1655 1660
Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val
1665 1670 1675
Val Ile Val Gly Arg Val Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro
1680 1685 1690
Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser
1695 1700 1705
Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe
1710 1715 1720
Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg Gln Ala Glu
1725 1730 1735
Val Ile Ala Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Thr Phe
1740 1745 1750 1755 1760

【 2 5 】

Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala
1765 1770 1775
Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala
1780 1785 1790
Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro Leu Thr Thr Ser Gln Thr Leu Leu
1795 1800 1805
Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly
1810 1815 1820
Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ala Ile Gly
1825 1830 1835 1840
Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu Ile Asp Ile Leu Ala Gly Thr Gly
1845 1850 1855
Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Gly
1860 1865 1870
Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser
1875 1880 1885
Pro Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg
1890 1900
His Val Gly Pro Gly Gly Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile
1905 1910 1915 1920
Ala Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro
1925 1930 1935

【 2 6 】

Glu Ser Asp Ala Ala Arg Val Thr Ala Ile Leu Ser Ser Leu Thr
1940 1945 1950
Val Thr Gln Leu Leu Arg Arg Leu His Gln Trp Ile Ser Ser Glu Cys
1955 1960 1965
Thr Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Ile Trp Asp Trp Ile
1970 1975 1980
Cys Glu Val Leu Ser Asp Phe Lys Thr Trp Leu Lys Ala Lys Leu Met
1985 1990 1995 2000
Pro Gln Leu Pro Gly Ile Pro Phe Val Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys
2005 2010 2015
Gly Val Trp Arg Val Asp Gly Ile Met His Thr Arg Cys His Cys Gly
2020 2025 2030
Ala Glu Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr Met Arg Ile Val Gly
2035 2040 2045
Pro Arg Thr Cys Arg Asn Met Trp Ser Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala
2050 2055 2060
Tyr Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Leu Pro Ala Pro Asn Tyr Thr Phe
2065 2070 2075 2080
Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu Glu Tyr Val Glu Ile Arg Gln Val
2085 2090 2095
Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys
2100 2105 2110

【 2 7 】

Pro Cys Gln Val Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val
2115 2120 2125
Arg Leu His Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu
2130 2135 2140
Val Ser Phe Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu
2145 2150 2155 2160
Pro Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr
2165 2170 2175
Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg
2180 2185 2190
Gly Ser Pro Pro Ser Val Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala
2195 2200 2205
Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala
2210 2215 2220
Glu Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn
2225 2230 2235 2240
Ile Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe
2245 2250 2255
Asp Pro Leu Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Ile Ser Val Pro Ala
2260 2265 2270
Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Gln Ala Leu Pro Val Trp
2275 2280 2285

【 2 8 】

Ala Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro
2290 2295 2300
Asn Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Pro Lys
2305 2310 2315
Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr
2320 2325 2330 2335
Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Arg Ser Phe
2340 2345 2350
Gly Ser Ser Thr Thr Ser Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Thr Ser
2355 2360 2365
Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Ala Glu Ser
2370 2375 2380
Tyr Ser Ser Met Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu
2385 2390 2395 2400
Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Glu Ala Asn Ala Glu Asp
2405 2410 2415
Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr
2420 2425 2430
Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn
2435 2440 2445
Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser
2450 2455 2460

【 2 9 】

Ala Cys Gln Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu 2485
 2470
 Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ser 2480
 2485 2490 2495
 Lys Val Lys Ala Ann Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Thr 2500
 2505 2510
 Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val 2515
 2520 2525
 Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val Thr His Ile Ann Ser Val Trp Lys 2530
 2535
 Asp Leu Leu Glu Asp Ann Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala 2540
 2550 2555
 Lys Ann Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Arg Lys Pro 2560
 2565 2570 2575
 Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys 2580
 2585
 Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Thr Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly 2590
 2595
 Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu 2600
 2610 2615 2620
 Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp 2625
 2630 2635 2640

【 3 0 】

Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu 2645
 2650 2655
 Glu Ala Ile Tyr Gln Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala 2660
 2665
 Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Ser Leu Thr Ann 2670
 2675 2680
 Ser Arg Gly Glu Ann Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val 2685
 2690 2700
 Leu Thr Thr Ser Cys Gly Ann Thr Leu Thr Cys Tyr Ile Lys Ala Arg 2705
 2710 2715
 Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys 2720
 2725 2730
 Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp 2735
 2740 2745
 Ala Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala 2750
 2755 2760
 Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr 2765
 2770 2775
 Ser Cys Ser Ser Ann Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg 2780
 2785 2790
 Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala 2800
 2805 2810 2815

【 3 1 】

Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Ann Ser Trp Leu Gly Ann Ile 2820
 2825 2830
 Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His 2835
 2840 2845
 Phe Ser Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asp 2850
 2855 2860
 Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro 2865
 2870 2875
 Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser 2880
 2885 2890
 Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Ann Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu 2895
 2900 2910
 Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg 2915
 2920 2925
 Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Arg Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr 2930
 2935 2940
 Leu Phe Ann Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Ala 2945
 2950 2955
 Ala Ala Gly Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser 2960
 2965 2970
 Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Ile 2975
 2980 2985 2990

【 3 2 】

Trp Phe Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu 2995
 3000 3005
 Pro Ann Arg 3010

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/531	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/576	G 0 1 N 33/576	Z
// A 6 1 K 38/00	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 P 31/12	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 P 31/12	

(72)発明者 マイケル ヒュートン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 2 6 , ダンヴィル , ローズミード コート 5 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA33 CA02
 4B064 AG26 AG33 CA19 CC24 DA01 DA15
 4B065 AB01 BA02 CA24 CA45 CA46
 4C084 AA27 BA44 CA01 NA14 ZB332
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA02 DA75 DA86 EA31 EA53
 FA74

专利名称(译)	免疫反应性丙型肝炎病毒多肽组合物		
公开(公告)号	JP2004073207A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2003326811	申请日	2003-09-18
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
[标]发明人	エイミージェイウィーナー マイケルヒュートン		
发明人	エイミー ジェイ.ウィーナー マイケル ヒュートン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/29 A61K39/395 A61P31/12 A61P37/02 C07K14/00 C07K14/02 C07K14/10 C07K14/18 C07K16/00 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/11 C12N15/51 C12N15/62 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/531 G01N33/576		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/12 A61P31/20 A61P37/02 C07K14/005 C07K2319/00 C12N2770/24222 Y10S436/82 Y10S530/826		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/18 C07K16/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/531.A G01N33/576.Z C12N5/00.A A61K37/02 A61P31/12 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA33 4B024/CA02 4B064/AG26 4B064/AG33 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA27 4C084/BA44 4C084/CA01 4C084/NA14 4C084/ZB332 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA02 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	07/759575 1991-09-13 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种多肽组合物，其与可用于诊断和疫苗的大量HCV分离物（特别是相对于该病毒的异源结构域）在免疫学上交叉反应。一种包含至少两个丙型肝炎病毒（HCV）氨基酸序列的免疫反应性多肽组合物，每个氨基酸序列包含存在于HCV包膜多肽的可变域中的至少一个表位。一种组合物，其包含，其中可变结构域的氨基酸序列彼此异源，来自分开的HCV分离物，并且每个氨基酸序列不超过全长包膜蛋白。[选择图]无