

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-516824

(P2004-516824A)

(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 N 15/00	Z N A C	4 B O 2 4
C O 7 K 14/02	C O 7 K 14/02		4 B O 6 3
C O 7 K 16/08	C O 7 K 16/08		4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08		4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-537775 (P2002-537775)	(71) 出願人	503148443 ビオメリュー・ソシエテ・アノニム B I O M E R I E U X S A フランス・69280・マルシ・レトワール・シュマン・ドゥ・ロルム 376
(86) (22) 出願日	平成13年10月12日 (2001.10.12)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月21日 (2003.4.21)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/003169	(72) 発明者	ジョリヴェーレノー、コレット フランス国、エフ-69720 サン・ボネー・ドゥ・ミュール、ルート・ナシオナル、レ・セードル 29
(87) 国際公開番号	W02002/034789		
(87) 国際公開日	平成14年5月2日 (2002.5.2)		
(31) 優先権主張番号	00/13454		
(32) 優先日	平成12年10月20日 (2000.10.20)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B型肝炎ウイルスに対するモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、野生型 H B s A g 抗原および少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、有利には3つ以上の H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能なモノクローナル抗体に関し、このモノクローナル抗体は、H B s A g 抗原の199~208領域中の少なくとも6個の隣接するアミノ酸からなるペプチド配列に結合し、有利には H B s A g 抗原の199~208領域によって形成されるペプチド配列と結合する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型 H B s A g 抗原および少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つ、有利には 3 つ以上の H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能なモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、H B s A g 抗原の 1 9 9 ~ 2 0 8 領域中の少なくとも 6 個の連続するアミノ酸からなるペプチド配列に結合し、有利には H B s A g 抗原の 1 9 9 ~ 2 0 8 領域により構成されるペプチド配列に結合する、モノクローナル抗体。

【請求項 2】

H B s A g 抗原の「a」決定基中に少なくとも 1 個のアミノ酸置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型の少なくとも 1 つに結合可能な、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項 3】

H B s A g 抗原の「a」決定基中の 1 2 7、1 3 3、1 3 4、1 4 2、1 4 3、1 4 4 または 1 4 5 位における少なくとも 1 個のアミノ酸置換、および場合により H B s A g 抗原の 1 0 0、1 1 8、1 2 0、1 2 2 位における少なくとも 1 個の他のアミノ酸置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型の少なくとも 1 つに結合可能な、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

H B s A g 抗原の 1 4 3 位におけるセリンのロイシンによる置換えに相当する少なくとも 1 個の置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能な、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

20

【請求項 5】

H B s A g 抗原の 1 4 4 位におけるアスパラギン酸のアラニンによる置換えに相当する少なくとも 1 個の置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能な、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 6】

H B s A g 抗原の 1 4 5 位におけるグリシンのアルギニンによる置換えに相当する少なくとも 1 個の置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能な、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

H B s A g 抗原の 1 2 7 位におけるプロリンのアラニンによる置換えに相当する少なくとも 1 個の置換および H B s A g 抗原の 1 4 3 位におけるセリンのロイシンによる置換えに相当する少なくとも 1 個の置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能な、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項 8】

H B s A g 抗原の 1 2 0 位におけるプロリンのセリンによる置換えに相当する少なくとも 1 個の置換および H B s A g 抗原の 1 4 3 位におけるセリンのロイシンによる置換えに相当する少なくとも 1 個の置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能な、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 9】

H B s A g 抗原の 1 0 0 位におけるチロシンのセリンによる置換えに相当する置換、H B s A g 抗原の 1 1 8 位におけるトレオニンのバリンによる置換えに相当する置換、H B s A g 抗原の 1 2 2 位におけるアルギニンのリシンによる置換えに相当する置換、H B s A g 抗原の 1 3 3 位におけるメチオニンのイソロイシンによる置換えに相当する置換、H B s A g 抗原の 1 3 4 位におけるチロシンのアスパラギンによる置換えに相当する置換、H B s A g 抗原の 1 4 2 位におけるプロリンのセリンによる置換えに相当する置換、H B s A g 抗原の 1 4 3 位におけるセリンのロイシンによる置換えに相当する置換および H B s A g 抗原の 1 4 5 位におけるグリシンのリシンによる置換えに相当する置換を含む H B s A g 抗原の突然変異体型に結合可能な、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

40

【請求項 10】

野生型 H B s A g 抗原および H B s A g 抗原の 1 2 7、1 3 3、1 3 4、1 4 2、1 4 3

50

、144および145位のアミノ酸をコードする1つ以上のコドンのレベルで点突然変異を有する配列によってコードされる「a」決定基を保持する突然変異H B s A gの少なくとも1つに結合可能なモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、H B s A g抗原の199～208領域またはエピトープに結合するモノクローナル抗体。

【請求項11】

モノクローナル抗体が、イムノグロブリンのクラスGに属することを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項12】

モノクローナル抗体が、2G2G10または8B4H7モノクローナル抗体からなることを特徴とする、請求項11に記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項13】

ヒト化された形態である、請求項1～12のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体のフラグメントまたは誘導体。

【請求項15】

請求項1～13のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生しうるハイブリドーマの製造方法であって、

哺乳動物、好ましくはネズミ動物を、場合によりフラグメントもしくは適当な抗原性誘導体の形態の野生型H B s A g抗原またはH B s A g抗原の突然変異体型で免疫化すること

20

、ハイブリドーマを形成するために抗体産生細胞を不死化させること、

場合によりフラグメントまたは適当な抗原性誘導体の形態の野生型H B s A g抗原および請求項2～10のいずれか1項に記載の少なくとも1つの突然変異体型でハイブリドーマ培養物をスクリーニングすること、および

野生型H B s A g抗原および請求項2～10のいずれか一項で定義した少なくとも1つの突然変異体型に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することからなる製造方法。

【請求項16】

請求項1～13のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生しうるハイブリドーマ

30

【請求項17】

請求項1～13のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の製造方法であって、

請求項16に記載のハイブリドーマまたは請求項15に記載の方法によりインピボまたはインピトロで得られやすいハイブリドーマを培養すること、および

培養培地からモノクローナル抗体を回収すること

からなる製造方法。

【請求項18】

請求項17に記載の方法により得ることができるモノクローナル抗体。

【請求項19】

検体中のH B s A g抗原の検出方法であって、請求項1～12または請求項18のいずれか1項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体または請求項14および請求項13に記載のフラグメントもしくは誘導体と該検体とを接触させること、および少なくとも1つの抗原/抗体、フラグメントまたは誘導体の複合体の存在を同定することからなる検出方法。

40

【請求項20】

請求項1～12または請求項18のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体、または請求項14および請求項13に記載のフラグメントもしくは誘導体、およびポリクローナルまたはモノクローナル抗H B s A g抗体から選択される少なくとも1つの他の抗体と該検体を接触させることからなる、請求項19に記載の方法。

50

【請求項 2 1】

「サンドイッチ」法または「競合」法により実施される、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

H B s A g 抗原の検出を抗 H B c 抗体の検出と同時に行う、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 1 2 または請求項 1 8 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体、または請求項 1 4 および請求項 1 3 に記載のフラグメントもしくは誘導体を、場合により抗 H B c 抗体検出用の少なくとも 1 つの試薬と組合わせて含む、診断用組成物。

10

【請求項 2 4】

H B s A g 抗原の検出のための少なくとも 1 つの他のモノクローナルまたはポリクローナル抗体をさらに含む、請求項 2 3 に記載の診断用組成物。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 1 2 または請求項 1 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体、または請求項 1 4 および請求項 1 3 に記載のフラグメントもしくは誘導体、またはそれらの組合せを含む抗血清。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 1 2 または請求項 1 8 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体または請求項 1 4 および請求項 1 3 に記載のフラグメントもしくは誘導体以外の、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体または抗 H B s A g モノクローナルおよびポリクローナル抗体の混合物をさらに含む、請求項 2 5 に記載の抗血清。

20

【請求項 2 7】

H B V に対する受動免疫を目的とする治療または予防的使用のための適当な組成物であって、薬学的に許容されうる支持体との混合において、請求項 1 ~ 1 2 または請求項 1 8 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体または請求項 1 4 および請求項 1 3 に記載のフラグメントもしくは誘導体またはそれらの組合せを含む、組成物。

【請求項 2 8】

H B V に対する受動免疫を目的とする治療または予防的使用のための適当な組成物であって、請求項 1 ~ 1 2 または請求項 1 8 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体または請求項 1 4 および請求項 1 3 に記載のフラグメントもしくは誘導体以外の、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体または抗 H B s A g モノクローナルおよびポリクローナル抗体の混合物をさらに含む、組成物。

30

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 1 2 または請求項 1 8 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体または請求項 1 4 および請求項 1 3 に記載のフラグメントもしくは誘導体に対する抗イディオタイプ抗体。

【請求項 3 0】

H B s A g 抗原の 1 9 9 ~ 2 0 8 領域を認識する抗 - 抗イディオタイプ抗体の産生を動物において誘導する請求項 2 9 に記載の抗イディオタイプモノクローナル抗体または前記抗イディオタイプ抗体の F a b フラグメントまたはそれらの混合物を含む生物学的に活性な組成物の動物を H B V に対して免疫化させるために十分な量および薬学的に許容されうるアジュバントを含むワクチン組成物。

40

【請求項 3 1】

ペプチド配列が、H B s A g 抗原の 1 9 9 位のアミノ酸で始まり 2 0 8 位のアミノ酸で終わり、かつ配列番号 1 で示される H B s A g 抗原のエピトープ。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 に記載のエピトープを含むか、または前記エピトープからなる、免疫原性ペプチド。

【請求項 3 3】

50

ペプチド配列が、請求項 3 1 に記載のエピトープのペプチド配列のアミノ酸に相同または同一な少なくとも 3 個のアミノ酸を含む、免疫原性ペプチド。

【請求項 3 4】

ペプチド配列が、配列番号 2 からなる、請求項 3 3 に記載の免疫原性ペプチド。

【請求項 3 5】

ペプチド配列が、請求項 3 1 に記載のエピトープのペプチド配列のアミノ酸に相同または同一な少なくとも 4 個のアミノ酸を含む、免疫原性ペプチド。

【請求項 3 6】

ペプチド配列が配列番号 3 の配列からなる、請求項 3 5 に記載の免疫原性ペプチド。

【請求項 3 7】

請求項 3 2 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性ペプチドを使用することにより、請求項 1 7 に記載のモノクローナル抗体、モノクローナル抗体のフラグメントまたはモノクローナル抗体の誘導体を得る方法。

【請求項 3 8】

特定のストリンジェントな条件下で、請求項 3 1 のエピトープをコードする DNA ヌクレオチド配列、請求項 3 1 のエピトープをコードする前記ヌクレオチド配列に相補的な DNA ヌクレオチド配列、または前記 DNA ヌクレオチド配列の RNA 転写産物にハイブリダイズしうる、核酸プローブまたはプライマー。

【請求項 3 9】

特定のストリンジェントな条件下で、請求項 3 1 のエピトープをコードする配列番号 4 で示される DNA ヌクレオチド配列、配列番号 4 に相補的な DNA ヌクレオチド配列、または前記 DNA ヌクレオチド配列の RNA 転写産物にハイブリダイズしうる、請求項 3 8 に記載の核酸プローブまたはプライマー。

【請求項 4 0】

生物学的検体中の HBV ウイルスの検出および/または定量のための、請求項 3 8 または請求項 3 9 に記載の少なくとも 1 つのプローブまたは少なくとも 1 つのプライマーを含む、診断用組成物。

【請求項 4 1】

生物学的検体中の HBV ウイルス DNA および/または RNA のインビトロ診断のための方法であって、血清、血漿または組織検体などの生物学的検体を少なくとも 1 つの HBV ウイルスの感染が疑われる患者から採取し、必要ならば前記検体を、それから上記 DNA および/または RNA を抽出するために処理し、前記検体を請求項 3 8 に記載の少なくとも 1 つのプローブまたは少なくとも 1 つのプライマーと特定のストリンジェントな条件下で接触させ、前記ウイルス DNA および/または RNA と少なくとも 1 つのプローブとのハイブリダイゼーションを確認すること、または前記 DNA および/または RNA の増幅により該検体中の該ウイルス DNA および/または RNA を検出および/または定量する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

5 つの型のウイルス性肝炎、A 型、B 型、C 型、D 型、E 型肝炎は、現在かなりよく知られている。それぞれの場合、ウイルスは肝臓に侵入し、肝細胞の破壊を伴う炎症状態を引き起こす。

【0002】

B 型肝炎はウイルスの一種、ヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) によって引き起こされる。HBV ウイルスは、Blumberg らにより発見された (A "new" antigen in leukemia sera, JAMA 191: 541, (1965))。ウイルスは血液経由、性的接触または周産期ルートによって伝播する。

【0003】

HBV は、感染しても大多数の症例において、まったく症状を発現することがなく、無症候性急性肝炎の原因となる。急性肝炎は、消化異常、腹痛、尿の異常着色および便の変色

10

20

30

40

50

、無気力ならびに黄疸を特徴とする。急性肝炎は、肝臓の急速な壊死を伴う劇症型へと進展しうる。

【0004】

ウイルス感染は、また、急性肝炎であった患者または感染が無症候性であった患者において、慢性型へと移行しうる。慢性キャリアは様々なサイズの肝病変を有し、肝硬変および初期癌を発症する危険性が增大している。感染の慢性化がしばしば起こるアジアやアフリカでは、肝臓の初期癌は重大な公衆の健康問題となっている。さらに、慢性キャリアはウイルスの保有宿主となり、そのウイルスを蔓延させるものであり、世界的レベルでの公衆の健康問題へと変化しつつある。

【0005】

H B V 感染は、ヒトにおける最も一般的なウイルス感染の一種である。これは、地理的に特徴的な発生率を有する遍在的な疾患である。欧州および北米では、人口の約 0.1% ~ 1% が感染しているが、アジアおよびアフリカでは人口の 20% までがキャリアである。全世界における H B V 感染者の数は、約 3 億 5 千万人と推定される。

【0006】

輸血後のウイルス感染を順に列挙すると、第一番目が H B V であり、次いで H C V、H I V がこれに続く。

【0007】

H B V は、肝親和性の D N A ウイルス（ヘパドナウイルス）である直径 42 nm の D N A を有する小ウイルスであり、ヘパドナウイルス科のファミリーに分類される。その遺伝子構造は、著しく小型なものである。ウイルスは、外殻およびヌクレオキャプシドからなる。殻は主として 3 つの表面抗原（H B s A g、すなわち B 型肝炎表面抗原）からなり、これらが H B V 感染の診断において大きな役割を果たしている。ヌクレオキャプシドは、コア抗原（H B c A g）、D N A ポリメラーゼ/逆転写酵素およびウイルスゲノムを含有する。ウイルスの核がウイルスの感染要素を構成し、外膜はウイルスの主要な抗原決定基である H B s 抗原を担っている。ウイルスの核はヌクレオカプシド内にとどまる。ヌクレオカプシドの直径は約 28 nm である。

【0008】

サイズは小さいが（3200 塩基対）、環状で、部分的に二重鎖となっている H B V の D N A は、重複する S、C、P および X 遺伝子から 4 つの型のウイルス生成物をコードしている。

【0009】

S 遺伝子は、ビリオンの外表面上に発現される H B s A g 殻タンパク質をコードしている。H B s A g 殻タンパク質は、24 k D a のポリペプチドおよびそれがグリコシル化された 28 k D a のポリペプチドの 2 つの主要ポリペプチドで構成される。H B s A g は、124 ~ 147 位のアミノ酸に対応し、H B V のすべての分離株に共通する「a」決定基と呼ばれる H B V の主要中和エピトープを含む。「a」決定基は、診断および予防接種において最も重要な標的である。急性または慢性感染後に抗 H B s 抗体が産生されると、通常は回復し予後も好ましい。抗 H B s 抗体には、ワクチン接種後には中和抗体の産生が伴う。回復期の個体の血清またはワクチン接種後の血清中に見出される抗 H B s 抗体の大部分は、その「a」決定基の領域に結合する。H B s 抗原の三次構造は未だ決定されていないが、構造-機能研究の結果、「a」決定基が H B s A g 抗原（残基 99 から 169）の主要親水性領域中に位置することが示されている。「a」決定基が高次構造を有することは明らかである。というのも、アルキル化または還元によりこの領域を変性させると、H B s A g 粒子を生じ、その H B s A g 粒子の抗原性が劇的に低下しているからである。おそらく、システイン間のジスルフィド架橋が適正なコンフォーメーションに参与している。「a」決定基（残基 124 ~ 147）は 5 つのシステインを含むが、「a」決定基の可能な構造には、第一のループを形成する 124 位と 137 位のアミノ酸の間および第二のループを形成する 139 位と 147 位のアミノ酸の間のジスルフィド架橋の存在が関与する。おそらく「a」決定基の配列全体が抗原構造に寄与している。さらに、H B s A g 抗原

10

20

30

40

50

は、122位にそれぞれリシンまたはアルギニンが存在するdまたはy決定基のいずれか、および160位にそれぞれリシンまたはアルギニンが存在するwまたはr決定基を含む。したがって、adw、ayw、adrおよびayrの4つの主要なHBsAgの抗原サブタイプがあり、それぞれが、地理的な分布に関連する。S遺伝子の上流、プレS遺伝子は種々のHBV表面抗原をコードする。

【0010】

P遺伝子は、ウイルスの複製メカニズムにきわめて重要なDNAポリメラーゼ/逆転写酵素をコードする。

【0011】

C遺伝子は、可溶性で分泌されるタンパク質であるHBeAgおよび細胞内のコアタンパク質であるHBcAgの2つのヌクレオカプシドタンパク質をコードする。HBeAgは、ウイルス複製が増大していることの血清学的マーカーである。 10

【0012】

X遺伝子は、異なる生物学的効果を有し、特にウイルスおよび細胞の遺伝子の転写をトランスに活性化しうるHBxAgをコードする。

【0013】

HBVが個体に感染すると、ウイルスDNAは、完全に宿主の肝細胞内で複製される。

【0014】

HBVの感染後、患者の血清中で最初に検出可能なマーカーは、HBsAg抗原であるが、このマーカーが、6ヶ月以上持続することは稀である。HBs抗原が血清から消失した後、抗HBsAg抗体が検出可能となり、持続する。HBc抗原はHBs殻抗原によって隔離されているので、通常では、患者の血清中に検出することはできないが、抗HBc抗体の存在は、HBs抗原の出現後1~2週間以内に容易に確認される。 20

【0015】

しかし、上記のマーカーを用いる標準的な血清学的試験では、HBVの変異体の検出が可能にならないことは、現在明白である。HBVのキャリアであり、進展した慢性B型肝炎を有する患者が存在するという事実は、標準的な血清学的マーカーを用いてHBV感染を同定することができないで、最も重大な問題であり、より良い試験法の開発の必要があることを示す。

【0016】

HBV変異体の存在は、長年にわたり疑われていた。この仮定は、慢性肝炎の患者の血清中および/または肝臓中に、標準的な血清学的マーカー(HBsAgおよび抗HBc)が確認されなかったにもかかわらず、ウイルスDNAが検出されたことに基づいている。 30

【0017】

ウイルスのDNA配列のキャリアである患者においてHBsAgが検出できないことについては、表面抗原の低発現またはSタンパク質の抗原決定基のレベルでの突然変異の存在など、いくつかの説明が可能である。第一には、ウイルスの共感染がHBVの複製を抑制しうる(Jilg *W et al.*, *Hepatol*, 1995, 23: 14-20, Jylberberg *et al.*, *Clinical infection diseases*, 1996, 23: 1117-1125, Ushida *et al.*, *J. of Med. Virol.* 1997, 52: 399-405, Hofer *et al.*, *Eur. J. Clin; Microbiol. Infect. Dis.*, 1998, 17: 6-13)。別の説明は、インビボにおける抗HBs抗体との免疫複合体形成の間にHBs抗原がマスクされたということであろう。 40

【0018】

しかし、さらに最近になって、HBsAgの存在が、患者の抗HBs血清中に観察されるようになってきた。これらの患者におけるHBsAg抗原の存在は、その抗原が存在する抗HBsによって中和されていないという事実と関連しており、変異体の存在を示唆している。

【0019】

変異体または突然変異体の存在は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いるワクチン接種および治療に関連してきている。突然変異体の分析は、突然変異体が混合したポピュレーションから選択されてきたものであり、「a」決定基中のアミノ酸置換を起こす点突然変異を有することを示しているようである。突然変異体は、遺伝子型のプールとなる、遺伝子中の任意の突然変異の産物であるらしい。さらに、免疫反応は、突然変異体の選択における主な因子であると考えられる。一般に、インビトロでウイルス感染した細胞にモノクローナル抗体を添加すると、その抗体によって中和されない分離株が選択される。したがって、ウイルス複製が活性である患者に与えられたモノクローナル抗体が、エスケープ突然変異体 (e s c a p e m u t a n t) を選択することになっても驚くにはあたらぬ。臨床的に重要な数種のエスケープ突然変異体の分離株が、ワクチン接種を受けた個体中に見出されている。いくつかの場合では、HBsAg抗原の「a」決定基内の145位のアミノ酸をコードするコドンのレベルで点突然変異を有し、グリシンがアルギニンに変化している。そのような突然変異体を含む血清のチンパンジーへの投与は、これらの因子が伝播性であることを示している。「a」決定基の141位のリシンのグルタミン酸での置換を誘導する別の点突然変異も、ワクチン接種した患者において見出されている。したがって、野生型HBVのみならず突然変異体または変異体も、確実な方法で、検出可能とすることが重要である。実際、HBsAgエピトープのレベルで重要な突然変異が起こり、抗HBs抗体がそれを認識しない場合には、その突然変異体が検出されないか、その試験が十分な感度を有するものではないということになる。現在、エスケープ突然変異体が検出されていないという事実は、そのキャリアに影響を与えるのみならず、血液、血液製剤および臓器の提供による感染の伝播にもつながりうる。さらに、突然変異体HBsAgは、個体が以前に免疫化されており、抗HBsタイプの応答を有していたとしても、その個体に感染しうる。国際公開公報第94/26904号には、122位での突然変異を含むエスケープ突然変異体からHBsAgの野生型を区別することが可能なモノクローナル抗体が記載されている。しかし、確実な診断試験を開発するために、HBsAgの野生型および突然変異体型の両方を検出するモノクローナル抗体の特徴付けを求める深刻な必要性がある (Coleman et al. (1999), Journal of Medical Virology 59 : 19 - 24 ; Ireland et al. (2000), Hepatology 31 : 1176 - 1181)。実際、あるケースでは、「a」決定基をコードする殻遺伝子の領域に影響を及ぼすHBV変異体が、市販の診断試験で使用されるモノクローナル抗体では認識されない (Carman et al. (1990), Lancet 336 : 325 - 329 ; Seddigh - Tonckaboni et al. (2000), Journal of Medical Virology 60 : 113 - 121 ; Weinberger et al. (2000), Journal of General Virology 81 : 1165 - 1174)。

10

20

30

40

50

【0020】

したがって、本発明の主題は、野生型HBsAg抗原、および少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つおよび有利には3つ以上の突然変異体型HBsAg抗原に結合可能なモノクローナル抗体であり、このモノクローナル抗体は、HBsAg抗原の199~208領域中の少なくとも6個の連続するアミノ酸からなるペプチド配列に結合し、有利にはHBsAg抗原の199~208領域により構成されるペプチド配列に結合する。

【0021】

さらに、本発明の主題は、野生型HBsAg抗原、および少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つおよび有利には3つ以上の突然変異体型HBsAg抗原に特異的に結合可能なモノクローナル抗体であり、このモノクローナル抗体は、HBsAg抗原の199~208領域に特異的に結合する。

【0022】

本発明のモノクローナル抗体が野生型および突然変異型HBsAg抗原に特異的に結合する能力は、以下の事実に関係する。すなわち、本発明の発明者がエピトープ「マッピング

」によって初めて明らかにしたように、本発明のモノクローナル抗体の能力は、HBVの野生型およびHBsAg抗原の199位と208位のアミノ酸の間に位置する領域またはエピトープに相当する突然変異型の両方において、HBsAg抗原の「a」決定基のレベルまたは「a」決定基の近接部分で起こりうる他の突然変異またはアミノ酸置換の有無とは無関係に、表面抗原の高度に保存された領域を認識するとの事実につながる。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、HBsAg抗原の「a」決定基中に少なくとも1個のアミノ酸置換を含む少なくとも1つのHBsAg抗原の突然変異型、および具体的にはHBsAg抗原の「a」決定基中の127、133、134、142、143、144および145位での少なくとも1個のアミノ酸置換、および場合によりHBsAg抗原の100、118、120、122位での少なくとも1個の他のアミノ酸置換を有するHBsAg抗原の突然変異型を認識し、特異的に結合することが可能である。明らかにされた突然変異または置換は、野生型HBsAg抗原のアミノ酸配列に関して位置付けられる。

10

【0023】

本発明のモノクローナル抗体によって特異的に認識される突然変異型は、以下の実施例において確認される。より具体的には、以下の突然変異体がある：

- 1043 Sp：HBsAg抗原の143位のセリンがロイシンで置換されている
- AP3.1：HBsAg抗原の144位のアスパラギン酸がアラニンによって置換されている
- Arg1.2：HBsAg抗原の145位のグリシンがアルギニンによって置換されている
- 1157 Sp：HBsAg抗原の127位のプロリンがアラニンで置換されており、HBsAg抗原の143位のセリンがロイシンで置換されている
- 1056 Sp：HBsAg抗原の120位のプロリンがセリンで置換されており、HBsAg抗原の143位のセリンがロイシンで置換されている
- M5：HBsAg抗原の100位のチロシンがセリンで置換されており、HBsAg抗原の118位のトレオニンがバリンで置換されており、HBsAg抗原の122位のアルギニンがリシンで置換されており、HBsAg抗原の133位のメチオニンがイソロイシンで置換されており、HBsAg抗原の134位のチロシンがアスパラギンで置換されており、HBsAg抗原の142位のプロリンがセリンで置換されており、HBsAg抗原の143位のセリンがロイシンで置換されており、HBsAg抗原の145位のグリシンがリシンで置換されている。

20

30

【0024】

上記の突然変異体は、モノクローナル抗体のスクリーニングに使用することができる。本発明の抗体を、たとえば、野生型HBsAg抗原および1つ以上の上記のような突然変異体でスクリーニングすることができる。具体的には、本発明の抗体は、野生型HBsAg抗原、およびHBsAg抗原の127、133、134、142、143、144および145位の少なくとも1つで、さらに具体的にはHBsAg抗原の143、144および145位の少なくとも1つで1個以上の置換を、および場合によりHBsAg抗原の100、118、120、122位の少なくとも1つで少なくとも1個の他の置換をそれぞれが有する1つ以上のHBsAg突然変異体でスクリーニングすることができる。

40

【0025】

具体的には、本発明のモノクローナル抗体は、野生型HBsAg抗原、およびHBsAg抗原の127、133、134、142、143、144および145位のアミノ酸をコードする1つ以上のコドンのレベルで点突然変異を有する配列によってコードされる「a」決定基を保持する少なくとも1つのHBsAg突然変異体に結合することができる。本発明の好ましい抗体は、イムノグロブリンのクラスGに属する、2G2G10および8B4H7と呼ばれる抗体である。2G2G10モノクローナル抗体は、IgG2bイムノグロブリンクラスに属する。8B4H7モノクローナル抗体は、IgG2aクラスに属し、2G2G10抗体をUV処理することによって得られた。

【0026】

50

本発明は、本発明のモノクローナル抗体のフラグメントおよび誘導体、具体的には Fab、Fab₂、F(ab)₂ および sFv フラグメント (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159: 5821-5833 および Bird et al., 1988, Science 242: 423-426) およびそのコンジュゲートをも含む。本発明のモノクローナル抗体誘導体は特にヒト化抗体を含む。モノクローナル抗体のフラグメント、およびヒト化誘導体を含むモノクローナル抗体の誘導体の製造方法は、当業者には周知である。非ヒト、例えばネズミの「ヒト化」型抗体は、非ヒトイムノグロブリンに由来する最小の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどのヒト化抗体は、レセプターの超可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの所望の特異性、親和性および容量を有する非ヒトドナー種 (ドナー抗体) の超可変領域の残基によって置き換えられているヒトイムノグロブリン (レセプター抗体) である。ある種の場合には、ヒトイムノグロブリンの Fv 領域の (FR) 残基が、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中には見出されない残基を含みうる。これらの修飾は、抗体の機能を改善するために実施される。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つおよび好ましくは2つの可変ドメインを含み、その中では、すべてまたはほとんどすべての超可変ループは非ヒトイムノグロブリンに相当し、すべてのまたはほとんどすべての FR 領域はヒトイムノグロブリンのものである。ヒト化抗体は、場合によっては、ヒトイムノグロブリンなどのイムノグロブリンの定常領域 (Fc) の少なくとも一部分をも含みうる (Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); および Presta et al., Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992))。

【0027】

本発明のモノクローナル抗体、具体的には、2G2G10 および 8B4H7 抗体は、下記の実施例1に記載のプロトコール、または実施例1に記載のプロトコールに由来するプロトコールに従いハイブリドーマ系により産生される。さらに、哺乳動物、好ましくはネズミ動物を、野生型 HBsAg 抗原または場合によりフラグメントまたは適当な抗原誘導体の形態の HBsAg 抗原の突然変異体型で免疫化し、ハイブリドーマを形成させるために抗体産生細胞を不死化させ、野生型 HBsAg 抗原および場合によりフラグメントまたは適当な抗原誘導体の形態の少なくとも1つの上記突然変異体型でハイブリドーマ培養物をスクリーニングし、さらに野生型 HBsAg および少なくとも1つの上記突然変異体型に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによってハイブリドーマ系を作製することからなる、本発明のモノクローナル抗体の製造方法も本発明の主題である。

【0028】

本発明は、本発明のモノクローナル抗体を産生しうるハイブリドーマ、上記方法に従ってインピボまたはインピトロで得られやすいハイブリドーマを培養することおよび培養培地からモノクローナル抗体を回収することからなる本発明のモノクローナル抗体の製造方法、ならびにこのハイブリドーマ培養方法によって得られそうなモノクローナル抗体をも含む。

【0029】

本発明のモノクローナル抗体は、HBsAg 抗原を含有すると思われる検体中の HBsAg 抗原の検出および/または定量的ための、したがって (野生型および/または突然変異体) HBV ウイルスの検出のためのイムノアッセイにおける使用が可能である。このようなアッセイは、臨床診断においておよび血液製剤のスクリーニングにおいて使用可能である。さらに、本発明は、検体中の HBsAg 抗原の検出および/または定量方法にも関し、その方法は、本発明の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはそのようなモノクローナル抗体のフラグメントもしくは誘導体に検体を接触させること、および少なくとも1つの抗原/抗体、フラグメントまたは誘導体の複合体の存在を確認することからなる。

【0030】

10

20

30

40

50

本発明の方法の一実施態様においては、本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体、および本発明のモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体により認識されるものとは異なる領域またはエピトープに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗HBsAg抗体から選ばれる少なくとも1つの他の抗体と検体を接触させる。

【0031】

このような方法は、当業者に周知の「サンドイッチ」法または「競合」法に従って一または二段階で、均質または不均質相で実施される。さらに、本発明の方法は、同じアッセイにおいて、分析されるべき検体中の抗HBc抗体の検出と関連付けることも可能である。

【0032】

対応する診断組成物は、少なくとも1つの本発明のモノクローナル抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体を、場合により、抗HBc抗体の検出のための少なくとも1つの試薬との組み合わせで含み、さらに本発明のモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体によって認識されるものとは異なる領域またはエピトープを認識する、HBsAg抗原検出用の少なくとも1つの他のモノクローナルまたはポリクローナル抗体を含みうる。本発明の抗体、フラグメントまたは誘導体は、HBsAg抗原捕獲抗体として固相上に固定化することが可能であり、または、あらゆる適当なマーカーで標識した場合には検出に使用することが可能である。また、本発明の抗体、フラグメントまたは誘導体をHBsAg抗原捕獲相として使用し、本発明の抗体により認識されるものとは異なるエピトープに対する少なくとも1つの他のモノクローナルまたはポリクローナル抗体を検出コンジュゲートとして使用すること、またはその逆の使用も考えられる。同様に、本発明の抗体、フラグメントまたは誘導体、および本発明の抗体により認識されるエピトープとは異なるエピトープに対する少なくとも1つの他のモノクローナルまたはポリクローナル抗体を同じ固相に固定化することが可能である。さらに、検体中の抗HBc抗体を捕獲しうる試薬は、この同じ固相上、あるいは本発明の抗体、フラグメントまたは誘導体、および場合により本発明の抗体により認識されるエピトープとは異なるエピトープを認識する少なくとも1つの他の抗HBsAgモノクローナルまたはポリクローナル抗体が固定化されている固相とは異なる固相上に固定化し、本発明の組成物に含ませることが可能である。

【0033】

本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはそのような抗体のフラグメントもしくは誘導体またはその組み合わせを含む、HBVに対する受動免疫のための治療または予防的使用に適した抗血清にも関する。その抗血清は、さらに、本発明のモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体以外の、少なくとも1つのモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体または抗HBsAgモノクローナルおよびポリクローナル抗体の混合物を含みうる。

【0034】

HBVに対する受動免疫のための治療または予防的使用のための適当な組成物は、薬学的に許容されうるピークルとの混合物の中に、本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体またはその組み合わせを含む。

【0035】

「薬学的に許容されうるピークル」とは、例えばRemingtonのPharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co.に記載されるようなヒトまたは動物に投与しうる支持体およびピークルを意味する。

【0036】

本発明はしたがって、本発明のモノクローナル抗体、そのフラグメントもしくは誘導体またはその組み合わせの治療的または予防的に効果的な量を個体に投与することからなる、治療または予防目的のHBVに対する受動免疫方法をさらに含む。本発明のモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体により認識されるエピトープとは異なるエピトープに対する1つ以上の他の抗HBsAgモノクローナルまたはポリクローナル抗体も投与しうる。

10

20

30

40

50

【0037】

本発明は、上記に定義した本発明の抗体に対する抗イディオタイプまたは抗イディオタイプ抗体をも含む。抗イディオタイプ抗体は、別の抗体に対して産生され、別の抗体の特異的抗原結合部位またはイディオタイプと反応する抗体である。抗イディオタイプ抗体は、イディオタイプにより認識される抗原として機能する。このような抗体は、コンフォーメーション依存エピトープの場合には特に有用である。ウイルスなどの外部病原体の内部イメージを表す抗イディオタイプ抗体は、ワクチン接種用の抗原の「代替物」として使用される。インビボにおける抗イディオタイプ抗体の重要性は、多数の実験において明らかにされている。インビボにおける抗イディオタイプ抗体の投与は、特異的イディオタイプに対する応答の抑制または増強という効果をもたらす。本発明の抗イディオタイプ抗体は、HBsAgの199～208エピトープを認識する抗-抗イディオタイプ抗体を産生することにより動物における応答を誘導し、それにより動物をHBVに対して免疫化し、さらにはHBV感染を中和することさえできる。したがって、本発明の主題は、HBsAg抗原の199～208領域を認識する抗-抗イディオタイプ抗体の産生を動物において誘導する抗イディオタイプモノクローナル抗体または前記抗イディオタイプ抗体のFabフラグメントまたはその混合物を、動物のHBVへの免疫化に十分な量で含む活性組成物、および例えば水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムといった薬学的に許容されうるアジュバントを含むワクチン組成物である。薬学的に許容されうるアジュバントは当業者に周知であり、参考としてRemingtonのPharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co.に記載のアジュバントを挙げることができる。所望ならば、ワクチンは湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などの少量の補助的物質を含有しうる。動物をHBVに対して免疫化する方法は、上記に定義されたワクチン組成物を1回以上の投与において投与することからなる。無論、動物に対するインビボ試験の後には、HBVに対するワクチン接種の最終目的は、ヒトにおける感染予防である。したがって、上記に使用された「動物」という語は、動物およびヒトの両方を意味する。ワクチンは、適当な希釈剤（特に、リン酸緩衝液でありうる）の中に、タンパク質が1mg/mlのオーダーの最終濃度になるように、本発明の抗イディオタイプ抗体またはそのFabフラグメントを混合することにより製造する。通常のサイズのヒトに対しては、例えばその溶液の50 μ l（50 μ g）～100 μ l（100 μ g）を4500 μ l中に希釈し、500 μ lの薬学的に許容されうるアジュバントと混合する（pH6.0 \pm 0.1）。用量は、動物、その年齢および体重により変わる。

【0038】

本発明のイディオタイプモノクローナル抗体は、当業者に周知の方法で製造される。HBsAgの199～208エピトープまたは領域を得て、現在利用可能なあらゆる技術により精製する。イディオタイプ抗体（Ab1）は、動物、好ましくはネズミ、具体的にはマウスを、抗原として上記エピトープで免疫化することにより製造する。次いで、動物の脾臓細胞を確認し、単離し、ポリエチレングリコールなどの融合剤の存在下でリンフォーマまたはミエローマ細胞と融合させる（Kohler and Milstein, Nature 256: 459（1975））。次に、融合させた細胞を、非融合悪性細胞の増殖を阻害する選択培地中でインキュベートする。ハイブリドーマ細胞を限界希釈法によりクローニングし、求める特異性を有するモノクローナル抗体の分泌を試験する。モノクローナル抗体は、腹水での増殖によりインビボでも得られる。イディオタイプ抗体Ab1は、HBVに対し免疫化し、中和さえする性質を有する抗イディオタイプ抗体（Ab2）を産生させるために使用される。抗イディオタイプ抗体Ab2は、抗体Ab1の製造に用いた方法と同じ方法で得られるが、このときは抗体Ab1が使用される免疫原となる。

【0039】

本発明の主題はさらに、本発明者が同定した配列番号1の配列中に示すHBsAg抗原の199位のアミノ酸から始まり208位のアミノ酸で終了するペプチド配列のHBsAg抗原の保存されたエピトープおよびその免疫原性ペプチドとしての使用であり、さらには、ペプチド配列が、配列番号1に示すエピトープのアミノ酸と相同または同一の少なくとも

も3個および少なくとも4個のアミノ酸をそれぞれ含むことで特徴付けられる免疫原性ペプチド、具体的には配列番号2および配列番号3に示す免疫原性ペプチドでもある。添付の図に示した配列番号1と配列番号2の配列を比較したところ、配列番号2の配列は、配列番号1の対応アミノ酸と厳密に相同あるいは同一である、W(トリプトファン)、P(プロリン)、S(セリン)の3個のアミノ酸および配列番号1のL(ロイシン)に等価(equivalent)なI(イソロイシン)を含む。添付の図に示した配列番号1と配列番号3の配列を比較したところ、配列番号3の配列は、配列番号1の対応アミノ酸と厳密に相同あるいは同一である、W(トリプトファン)、P(プロリン)、Y(チロシン)、S(セリン)の4個のアミノ酸および配列番号1のS(セリン)およびI(イソロイシン)にそれぞれ等価なT(トレオニン)およびL(ロイシン)の2個のアミノ酸を含む。前記の等価なアミノ酸とは、ペプチドの免疫原性としての効率に影響を及ぼすことなく相互に置換しうるアミノ酸である。このような免疫原性ペプチドは、上記の定義に対応し、HBsAg抗原の野性型および少なくとも1つの突然変異体型の両者を認識可能なモノクローナル抗体、モノクローナル抗体のフラグメントまたはモノクローナル抗体の誘導体の製造に使用することができる。モノクローナル抗体またはモノクローナル抗体のフラグメントもしくは誘導体の製造は当業者には周知である。例として、Kohler and Milstein, Nature 256: 45-47 (1975)、European Journal of Immunology 6: 511-519 (1976)、およびGalfrè G. et al. Nature, 266: 522-550 (1977)が挙げられる。エピトープは、化学的合成、遺伝子組換えまたは異なる方法の組み合わせにより製造しうる。本発明のエピトープをコードする配列はしたがって、適当な宿主細胞内で適当なプロモーターの制御下で発現させることができる。宿主細胞には、哺乳類細胞、酵母および細菌を含む原核または真核生物に由来する細胞などの、組換えDNA分子を転写および翻訳することが可能で、かつ発現に必要な因子の制御下に置かれた、本発明のエピトープをコードするS遺伝子のフラグメントを発現させることができるあらゆる単細胞生物が含まれる。さらに、配列番号2および配列番号3の免疫原性ペプチドは、化学的合成により容易に得ることができる。

【0040】

最後に本発明は、特定のストリンジェントな条件下で、配列番号1に示すエピトープをコードするDNAヌクレオチド配列、配列番号1に示すエピトープをコードする前記ヌクレオチド配列に相補的なDNAヌクレオチド配列または前記DNAヌクレオチド配列のRNA転写産物にハイブリダイズしうる核酸プローブまたはプライマーに関する。

【0041】

本発明は、特定のストリンジェントな条件下で、配列番号1に示すエピトープをコードする配列番号4に示すDNAヌクレオチド配列、配列番号4の相補的なDNAヌクレオチド配列または前記ヌクレオチドDNA配列のRNA転写産物にハイブリダイズしうる核酸プライマーまたはプローブ；生物学的検体中の(野性型および/または突然変異体)HBVウイルスの検出および/または定量的ための、上記定義の少なくとも1つのプローブまたは少なくとも1つのプライマーを含む診断組成物；ならびに生物学的検体中の(野性型および/または突然変異体)HBVウイルスのDNAおよび/またはRNA診断の方法にも関する。この方法によれば、血清、血漿または組織検体などの生物学的検体を、少なくとも1つのHBVウイルスによる感染が疑われる患者から採取し、必要ならば上記検体を、検体からDNAおよび/またはRNAを抽出するために処理し、上記検体を特定のストリンジェントな条件下で少なくとも1つのプローブまたは少なくとも1つのプライマーと接触させ、上記ウイルスDNAおよび/またはRNAと少なくとも1個のプローブとのハイブリダイゼーションまたは上記DNAおよび/またはRNAの増幅を確認することにより検体中のウイルスDNAおよび/またはRNAを検出および/または定量する。核酸プローブを使用する場合には、ハイブリダイゼーション複合体の形成の確認は、標的配列に相補的またはほぼ相補的、あらゆる適当なマーカーによって標識したプローブを使用することにより直接行うことが可能であり、または標的配列の一部に相補的またはほぼ相補的な

捕獲プローブおよび適当なマーカーで標識したプローブまたは標的配列の別の部分に相補的またはほぼ相補的な検出プローブを使用することからなる、1または2段階の「サンドイッチ」法の実施によっても行うことが可能である。プライマーを使用する場合には、プライマーを、標識増幅産物の同定のために、直接標識することも可能であり、または標識しないことも可能であり、後者の場合には、生成した増幅産物は、アクリルアミドゲルを通過させることにより予測した大きさとの関係で選択したり、または適当な検出プローブを用いて分析しうる。

【0042】

Galibertら (Nature 280: 646-650 (1979)) による HBV ゲノムの 751~780 位のヌクレオチドに相当する、配列番号 4 に示す本発明の 199~208 エピトープをコードする DNA ヌクレオチド配列の選択、それに相補的な配列および対応する RNA 配列を選択することに始まり、配列番号 4、それに相補的な配列または対応する RNA にハイブリダイズ可能なヌクレオチドプローブまたはプライマーを決定し、それを得ることは当業者の能力の範囲内である。オリゴヌクレオチドの製造の例として、制限酵素の使用および自動合成装置を用いる化学合成が挙げられる。特定のストリンジент条件下で本発明の DNA または RNA ヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能なプローブおよびプライマーは、この定義の一部を形成する。適当なストリンジент条件を定義することも当業者の能力の範囲内である。特徴的なストリンジент条件は、試験されたハイブリッドの T_m (「融解温度」) 以下の約 12 と 20 との間から選択される温度と食塩液濃度の組合わせに対応するものである。これらはすべて当業者の一般的知識の一部をなすものであり、説明のために「DNA PROBES」(George H. Keller and Mark M. Manak 著、2nd Ed. (1993) Stockton Press, 49 West 24th St., New York, N.Y. 10010, USA (さらに具体的には、1~21 ページの第 1 節 “Molecular Hybridization Technology” を参照)) と題する書籍を挙げるができる。

【0043】

図 1

添付の図 1 は、HBsAg 抗原のアミノ酸配列を示す。この図では、199~208 エピトープは、下記の実施例に説明するようにエピトープ「マッピング」により位置付けられ、確認されている。HBsAg 抗原のアミノ酸配列の 194~209 のアミノ酸からなる領域中の野性型 HBsAg 抗原の配列のアミノ酸と共通または相同もしくは同一のアミノ酸、および等価なアミノ酸を有する 2 つのクローン HWWKHPTRYSLG および HPLKQYWWRPSSI を、野性型 HBsAg 抗原の配列の下に示す。共通または相同もしくは同一および等価なアミノ酸は図 1 において太字で示す。

【0044】

実施例

実施例 1: モノクローナル抗体の作製および特徴付け

4~6 週齢の雌 BALB/c JYc マウス (IFFA Credo) を、等容量のフロイント完全アジュバントで乳化させた組換え HBsAg ay50 μ g を腹腔内投与により免疫化した。組換え HBsAg タンパク質は、Pasteur Merieux Connaught から入手した。このタンパク質は、Galibertら (Nature 280: 646-650 (1979)) により配列決定された ayw 系統に相当し、CHO 細胞で発現している (Michel et al., PNAS 81/7708-7712 (1984))。このタンパク質は、プレ S および S 領域から構成される。NH₂ 末端位に位置する 55 アミノ酸がプレ S 2 領域に相当する。

【0045】

3 回の注射を、2 週ごとに、不完全アジュバントの存在下で行った。最後の注射から 4 日後に、脾臓細胞を取り出し、Kohler and Milstein (Nature 256: 45-47 (1975); European Journal of Immun 50

ology 6 : 511 - 519 (1976)) の方法に従って、Sp 2 / 0 - Ag 1 4 マウスのミエローマ細胞系と融合させた。細胞を12 ~ 14日間培養した後、固相上に固定化した血漿組換えayHBsAg抗原を用いて間接ELISA試験により培養上清をスクリーニングした。1058個の培養上清を1 / 10に希釈し、そのようにスクリーニングした。405nmのODが約2、すなわち同じ波長における閾値である0.3の6倍高い値を示す、66個の陽性クローンが選択された。1 / 10に希釈した66個の陽性クローンの培養上清を、天然の血漿ayHBsAg抗原を用いて間接ELISAでスクリーニングした。405nmのODが2を超える、すなわち同じ波長における閾値である0.1の24倍高い値を示す20個のクローンが選択された。これら20個のクローンの中から12個の培養上清を1 / 10に希釈し、その後、固相に固定化した天然のayHBsAg抗原および天然のadHBsAg抗原をそれぞれ用いて間接ELISA試験により試験を行った。これらの試験の各々から、1 / 1600に希釈した場合の405nmのODが天然のayHBsAg抗原による試験では1.2以上であり、そして天然のadHBsAg抗原による試験では約1.1、すなわち閾値である0.1の約10倍高いODを有する6個のクローンが選択された。これら6個の陽性クローンのうち4個を、限界希釈法により2回サブクローニングし、腹水の形態で作製した。予めPristane (商品名) を注射したマウスから腹水を得て、 10^6 個のハイブリドーマ細胞を注射した。

10

【0046】

上記のように得られた4つのIgGを、製造元 (Pharmacia) から供給されたプロトコールに従って、A4FFタンパク質と結合させたセファロースのカラムで精製し、以下の実験に用いた。最後に、イムノグロブリン類のIgG2bクラスに属する2G2G10モノクローナル抗体は、優れた機能を有するため保持された。

20

【0047】

実施例2 : 2G2G10抗体のクラス変換

Rosen and Klein (Nature 306 : 189 - 190 (1983)) のプロトコールに従ったUV処理により、2G2G10モノクローナル抗体のクラスをIgG2bからIgG2aに変換した。修飾された抗体を8B4H7と命名した。

【0048】

実施例3 : ファージに担持されたペプチドバンクのスクリーニング

Gretchら (Analytical Biochemistry 163 : 270 - 277 (1987)) の方法に従い、New England Biolabs Inc. から市販されているPh.D. - 12 (登録商標) バンクを、ビオチン化2G2G10および8B4H7モノクローナル抗体によりスクリーニングした。これは、M13ファージのマイナーエンベロープタンパク質 (pIII) のN末端で発現されるドデカペプチドのコンビナトリアルバンクである。このバンクは、 4×10^{12} ファージ/mlを含み、 1.9×10^9 個の様々な配列を表す。

30

【0049】

最初の「バイオパニング」の間には、0.1M NaHCO₃ 緩衝液 (pH 8.6) 中の10μgのストレプトアビジンを一晩、4で加湿チャンバー内で攪拌しながら直径35mmのペトリ皿に固定化した。その後、ペトリ皿を、飽和溶液 [0.1M NaHCO₃ (pH 8.6) 中の5mg/ml BSA ; 0.02% NaN₃] により2時間、4で飽和させた。TBS (トリス緩衝食塩液) [0.5M トリス ; 0.75M NaCl、pH 7.5] - 0.1% Tween 中で6回洗浄した後、ビオチン化2G2G10または8B4H7モノクローナル抗体を、0.02% NaN₃ およびBSA 1mg/mlを含むTBS 0.1% Tween 中170nMの濃度で一晩、4で加湿チャンバー内で攪拌しながらインキュベートした。抗体により占められない部位をブロックするために、ビオチン40μgを加え、1時間、4で加湿チャンバー内で攪拌しながらインキュベートした。TBS 0.1% Tween で6回洗浄した後、TBS 0.1% Tween - 0.1nM ビオチン中に希釈したバンク10μl (4×10^9 ファージ) を、1時間、周囲温度で攪拌しながらインキュベートした。未固定化ファージはその後、TBS 0.1%

40

50

Tweenで10回洗浄して除去した。固定化されたファージは、溶出緩衝液[0.1 M HCl - グリシン; pH 2.2; 1 mg/ml BSA; 0.1 mg/ml フェノールレッド]で7分間インキュベートすることにより溶出した。溶出物は、1 M トリス - HCl (pH 9.1) 200 μ l で中和した。

【0050】

2G2G10または8B4H7のいずれかによるバンクのスクリーニングに対応する溶出物は、LB培地[トリプトン 10 g/l; 酵母抽出物 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7.5]中の大腸菌(*Escherichia coli*)のER2537株への感染により個別に増幅した。37、250 rpmで4時間30分インキュベートした後、溶出物残渣は、2回連続の10分間の遠心を10,000 rpmで行うことにより除去した。上清に含まれるファージは、1/6のポリエチレングリコール/NaCl [16.7% ポリエチレングリコール、3.3 M NaCl]で2回沈殿させた。14,000 rpmで15分間遠心した後、ペレットをTBS - 0.02% NaN₃ 200 μ l に取った。これらの増幅溶出物の100 μ lを2回目のバイオパニングに使用した。

【0051】

2回目、3回目および4回目のバイオパニングのために、その前の回の増幅溶出物の100 μ lを、それぞれ100 M、1 nMおよび0.1 nMのビオチン化2G2G10または8B4H7抗体とともに一晚、4でプレインキュベートし、その間に、前記のようにストレプトアビジン10 μ gをペトリ皿上に固定化した。15分間、周囲温度でペトリ皿を飽和させた後、ファージ/抗体混合物を加えた。以下のプロトコールは、1回目の「バイオパニング」のプロトコールと同様である。

【0052】

実施例4：ファージクロンのクローニングおよび増幅

大腸菌の培養物を、光学密度(OD)が0.5に達するまで、250 rpm、37でインキュベートした。細菌を増殖させる間に、上層アガロース[LB 1 l; バクト - ペプトン10 g; 酵母抽出物5 g; NaCl 5 g; MgCl₂ · 6H₂O 1 g; アガロース7 g]を溶かして3 mlずつ分注し、55で保存した。細胞の準備が整ったときに、培養物200 μ lを、4回目のバイオパニングの後得られ、そしてLB培地で希釈した溶出物10 μ lとともに、1~5分間、周囲温度でインキュベートした。混合物は、アガロースの入った2本のチューブに移し、攪拌し、迅速にLB IPTG/XGalのペトリ皿上に注いだ。ペトリ皿は、一晚、37でインキュベートする。

【0053】

2G2G10または8B4H7によるスクリーニングに対応するペトリ皿から無作為に選択した36個のコロニーは、大腸菌培養物1 mlに4~5時間、37で感染させることにより増幅させ、その後、14,000 rpmで30秒間遠心して細胞を除去した。上清500 μ lをスクリーニングに用い、その残余を再び遠心し、グリセロールで1:1に希釈し、-20で保存した。

【0054】

LB/グリセロール中に保存されたファージ2 μ lを、大腸菌培養物1.7 mlに37、250 rpmで24時間感染させることにより増幅させた。14,000 rpmで5分間遠心して細胞を除去した。上清は、PEG/NaClにより沈殿させた。14,000 rpmで15分間遠心した後、ペレットをTBS 500 μ l に取った。269 nmの吸収スペクトロメトリによりこれらのファージ溶液をアッセイし、ELISA試験に用いた。

【0055】

実施例5：ファージクロン中に挿入された配列のシーケンシング

PEG/NaCl 200 μ lにより10分間、周囲温度で沈殿させた上清500 μ lから始めて、種々のクロンのDNAの抽出および精製を行った。14,000 rpmで10分間遠心した後、ペレットをトリス - HCl (pH 8.0) 100 μ l、1 mM EDTA、4 M NaIおよび無水エタノール250 μ lに取り、次いで10分間、周囲温度でインキュベートした。14,000 rpmで10分間遠心した後、ペレットを70%エタ

ノール500 μ lを用いて1回洗浄し、その後真空下で10分間乾燥させる。それを最終的には30mMトリス-HCl (pH8.0) 30 μ l、1mMEDTAに取った。

【0056】

挿入物のヌクレオチドシーケンシングは、「Big Dye (登録商標)ターミネーター・サイクル・シーケンシング・レディ・リアクション」(Perkin Elmer)シーケンシングキットおよびファージの野性型配列に相当する5'HO-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-OH3'プライマーを用いて自動シーケンサー(377A型、Perkin Elmer)を使用するSangerの改変方法に従って行った。反応混合物は、配列決定すべきDNA5 μ l、水2.5 μ l中の2.5pmoleのオリゴヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチドおよびTaq (登録商標)ポリメラーゼを含有する「Big Dye (登録商標)」混合物ならびに水4.5 μ lを含んだ。25回のシーケンシングサイクル(96で30秒、50で15秒、60で4分間)は、BiometraのTrioblock PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)装置中で実施した。配列画分は、TE[10mMトリス-HCl pH8、1mMEDTA]緩衝液で平衡化したセファデックスG50カラムにより精製し、乾燥させ、シーケンシングを行うまで-20で保存した。タンパク質の配列は、Geneworksソフトウェアを用いてヌクレオチドの配列から推定した。

【0057】

実施例6：ファージクローンの免疫学的解析

0.1M NaHCO₃緩衝液中100 μ g/mlの最終濃度で用いる2G2G10もしくは8B4H7抗HBsAg抗体または無関係の抗体(陰性対照として使用)100 μ lを、一晚、4で加湿チャンパー内で、ELISA「Nunc Maxisorb」ウェルプレートの各列に固定化下。次いでそのプレートを2時間、4で飽和溶液[0.1M NaHCO₃; BSA 50mg/ml; NaN₃ 0.02%]中で飽和させた。TBS-0.5%Tweenで4回洗浄した後、TBS Tween中に希釈した種々の濃度のファージ(1 \times 10¹²、2.5 \times 10¹¹、6.2 \times 10¹⁰および4 \times 10⁹ファージ/ml)の100 μ lを各ウェルに加え、攪拌しながら2時間、周囲温度でインキュベートする。TBS-0.5%Tweenで4回洗浄した後、ペルオキシダーゼを結合させ、飽和溶液中に1/5000に希釈した100 μ l/ウェルの抗M13抗体を攪拌しながら2時間、周囲温度でインキュベートした。1時間、37でインキュベートしたのち、プレートをTBS-0.5%Tweenで4回洗浄した。発色のために、プレートをフェニレンジアミンおよび過酸化水素(カラーEIAキット、bioMerieux)の溶液とともに暗所で10分間インキュベートする。1.8N硫酸により反応を停止させ、ELISAプレートリーダー(Axiaマイクロリーダー)を用いてプレートの492nmでの吸収を読む。各クローンの各希釈について、結果は、抗HBsAg抗体と対照抗体の差の値により表す。次いで、その結果は、至適希釈を3回試験することにより確認した。

【0058】

2G2G10抗体では、免疫反応性クローンはまったく選択することができなかった。一方、同じパラトープを有するがIgG2aクラスに属する、同等な8B4H7抗体は、免疫反応性クローンの選択を可能にした(表1)。さらに、これらのクローンのうち2個(HWWKHPTRYSLGおよびHPLKQYWWRP SI)は、2G2G10抗体によっても認識される。

【0059】

【表1】

表1

2G2G10抗体および修飾された8B4H7抗体により選択された
ファージクローンの頻度および免疫反応性

クローンの配列	クローン 頻度	8B4H7との 反応性 ^a		2G2G10との 反応性 ^b
HKMHSHPRLTSP	13/36	<0.1 ^c		
HWGNHSHSPQR	6/36	<0.1		
WHKAVPRWLASP	4/36	0.8	0.4 ^d	<0.1 ^c
HMAHRWQSFLRP	2/36	<0.1		
RVHKRHRTQKNA	1/36	>2.5	<0.1	
HWWKHPTRYSLG	1/36	>2.5	0.5	>2.5
HFFKLSNRWTTP	1/36	22.5	<0.1	
HPLKQYWWRPSI	1/36	<0.1		0.4

10

【0060】

クローンの免疫反応性は、固相に固定化した8B4H7^aまたは2G2G10^bおよび 8×10^{10} ファージ/ml^cおよび 2×10^{10} ファージ/ml^dの最終濃度で添加されたファージクローンを用いて、実施例6に記載のELISA法により測定した。

20

【0061】

実施例7：HBsAg配列上の免疫反応性ファージクローン配列の位置

MacVectorソフトウェアVer. 4.5 (Kodak)を使用して、ペプチドのアミノ酸配列を、モノクローナル抗体を得るために用いたHBsAg組換えタンパク質の配列と比較した (Galibert et al., 1979)。簡潔に述べると、高度な類似性を有する領域を最適局所同一性を検索するLFASTAプログラムにより検出する (Pearson and Lipman, PNAS 85: 2444-2448 (1988))。2G2G10に対して免疫反応性の2個のクローンにより、2G2G10および8B4H7により認識されるエピトープのHBsAgの199~208領域内における明らかな位置付けが可能になった (図1)。実際、HWWKHPTRYSLGは、199~208配列と同一の4残基および類似の3残基を有し、HPLKQYWWRPSIは、201~205配列と3個の同一残基および1個の類似の残基を有する。

30

【0062】

実施例8：2G2G10および8B4H7モノクローナル抗体を用いた野生型HBsAg抗原およびHBsAg変異体の検出

使用した形式は、2G2G10または8B4H7モノクローナル抗体を捕獲に、そしてヤギ抗HBsポリクローナル抗体を検出に使用するサンドイッチタイプの形式である。

【0063】

患者血清中の野生型HBsAg抗原の検出：

Societe Nationale de Transfusion Sanguine of Lilleから供給された、いくつかのサブタイプを含む患者血清 (希釈された検体) を、2G2G10モノクローナル抗体を捕獲に、そしてヤギ抗HBsポリクローナル抗体を検出に用いて検査した。結果を下記の表2に示す。試験をした検体を、そのサブタイプおよび由来に従って同定する。結果は、閾値に対するシグナルとして表す。閾値は、陰性検体のシグナルの5倍に相当する。シグナル/閾値の値が1を超えるものを陽性とする。

40

【0064】

【表2】

表 2

検体／サブタイプの同定	シグナル／閾値
41 - adw2 - (米国+アジア)	2.91
42 - adw4 - (欧州+南米)	3.04
43 - adr - (アジア)	2.94
44 - ayw1	3.00
45 - ayw2 - (南欧)	3.94
46 - ayw3 - (欧州-アジア)	3.42
47 - ayw3	3.07
48 - ayw4 - (アフリカ)	4.02
49 - ayr - (日本)	4.00
50 - 陰性／検体希釈液	0.2

10

【 0 0 6 5 】

血漿中の野生型 H B s A g 抗原の検出：

2 G 2 G 1 0 モノクローナル抗体および 8 B 4 H 7 モノクローナル抗体を捕獲に用いて、bioMerieux sero the que からの血漿を上記と同じ条件下で試験した。結果を下記の表 3 に示す。結果は、シグナル／閾値の値で表す。閾値は、陰性検体のシグナルの 5 倍に相当する。シグナル／閾値の値が 1 を超えるものを陽性とする。

20

【 0 0 6 6 】

【 表 3 】

表 3

検体	2G2G10 // シグナル / 閾値	8B4H7 // シグナル / 閾値
MAP 52 1/600	25.7	29.4
MAP 97 1/50000	24.6	36.1
MAP 59 1/3000	42.2	43.0
MAP 62 1/7000	46.0	47.6
MAP 64 1/6000	54.7	70.7
H80 1/7000	58.9	56.9
I44519 1/6000	52.2	54.0
I44344 1/16000	62.7	69.3

30

【 0 0 6 7 】

H B s A g 変異体の検出：

2 G 2 G 1 0 抗体について、Carmen 博士から入手し Ireland et al. , (H e p a t o l o g y 3 1 : 1 1 7 6 - 1 1 8 1 (2 0 0 0)) により以前報告された方法に従って調製した組換え H B s A g 変異体の培養上清からの H B s A g 変異体を検出する能力を試験した。

40

【 0 0 6 8 】

アッセイは、Vidas (登録商標) 自動分析機上で行う蛍光免疫酵素定性試験法を用いて行った (Weber et al. , Journal of Virological Methods 42 : 63 - 74 (1993) ; Mikkelsen et al. , Gynecologic Obstetric Investigation 41 : 35 - 40 (1996)) 。この 2 段階捕獲試験法は、以下のように実施した。

50

【 0 0 6 9 】

2 G 2 G 1 0 抗体を、固相容器 (S P R) 上に 1 0 μ g / m l の最終濃度で固定化した。その後、S P R を種々の変異体に相当する組換えタンパク質および抗 H B s A g ビオチン化ヤギポリクローナル抗体を含む培養上清と同時にインキュベートした。次いで第 2 段階では、蛍光測定反応にアルカリ性ストレプトアビジン - フォスファターゼ複合体を用いた。

【 0 0 7 0 】

表 4 に示すように、別の抗 H B s A g 抗体である 6 H 6 B 6 と比べて、2 G 2 G 1 0 抗体は、試験した種々の変異体の検出が可能であった。実際には、B A 3 . 2 および T 5 N 検体は、I r e l a n d ら (H e p a t o l o g y 3 1 : 1 1 7 6 - 1 1 8 1 (2 0 0 0)) の報告があるように試験した培養上清中への抗原の分泌に影響を与える C 1 2 4 R および T 2 3 N 突然変異をそれぞれ有する。したがって、これら 2 つの上清において検出されなかったことは、考慮に入れることはできない。

【 0 0 7 1 】

【表 4】

表 4
HBsAg 変異体に対する抗 HBsAg 抗体の反応性

MHR 中の突然変異	検体	2G2G10	6H6B6
標準配列	Gly D	3.3	3.0
標準配列	Gly Y	4.9	4.3
対照プラスミド ^a		0.2	0.3
P120T	BA 2.4	3.3	3.5
C121R	J1 ^a	6.7	27.5
T123N	BA 3.4	2.2	0.3
T123N/C124R	BA 3.2 ^a	0.2	0.3
M133T	SA7	3.0	2.1
F134L	J2	2.3	3.0
D144A	AP 3.1	4.7	0.7
G145R	Arg 1.2	7.2	0.4
Q129R/G130N/A166V	SA6	4.6	2.6
Q30R/S53L/L98V/Q101R/S210T	HK188	27.4	24.2
S143L	1043 Sp	3.0	0.7
P127A/S143L	1157 Sp	3.4	0.3
P120S/S143L	1056 Sp	1.8	0.5
Y100S/T118V/R122K/M133I/Y134N/P142S/S143L/G145K	M5	2.0	0.7
D144E を含む多置換	PA17	2.5	2.3
D99N/122NT123/G145R	T5N ^a	0.2	0.3

【 0 0 7 2 】

M H R : 主要親水性領域 (m a j o r h y d r o p h i l i c r e g i o n) を示す。結果は、シグナル / 閾値の 2 回の平均で示す。各抗体について、閾値は、精製された血漿 H B s A g サブタイプ a d / a y の 0 . 1 6 n g / m l で得られたシグナルの 2 回の平均で定義した。

^a 非希釈検体

【図面の簡単な説明】

【図 1】

H B s A g 抗原のアミノ酸配列を示す図である。

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
2 mai 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/34789 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : F-69002 Lyon (FR). BECQUART, Laurence [FR/FR], 6, rue Paul Painlevé, F-69800 Saint Priest (FR).
C07K 16/08, A61K 39/42, C12N 5/20, G01N 33/53, C12Q 1/70, A61P 31/20
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR01/03169
- (22) Date de dépôt international : 12 octobre 2001 (12.10.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 00/13454 20 octobre 2000 (20.10.2000) FR
- (71) Dépositant (pour tous les États désignés sauf US) : BIOMERIEUX SA [FR/FR], 376, chemin de l'Orme, F-69280 Marcy-l'Étoile (FR).
- (71) Dépositant (pour US seulement) : JOLIVET-REYNAUD, Colette [FR/FR], Les Cédres, 29, route Nationale, F-69720 Saint Bonnet de Mure (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LESENECHAL, Mylène [FR/FR], 84, rue Anatole-France, F-69100 Villeurbanne (FR). BAT-TAIL-POIROT, Nicole [FR/FR], 6, quai Jules Courmont,
- (74) Mandataires : GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 20, rue la Mauberge, F-75009 Paris (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NB, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES DIRECTED AGAINST HEPATITIS B VIRUSES

(54) Titre : ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES VIRUS DE L'HEPATITE B

(57) Abstract: The invention concerns a monoclonal antibody capable of binding with a wild type HBsAg antigen and with at least one, preferably at least two and advantageously more than two, mutated forms of the HBsAg antigen, said monoclonal antibody binding with the peptide sequence consisting of at least 6 adjacent amino acids in the 199-208 region of the HBsAg antigen, and advantageously binding with the peptide sequence formed by the 199-208 region of the HBsAg antigen.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet un anticorps monoclonal capable de se lier à un antigène HbsAg de type sauvage et à au moins une, de préférence au moins deux et avantageusement plus de deux, formes mutantes de l'antigène HbsAg. Jedit anticorps monoclonal se liant à une séquence peptidique consistant en au moins 6 acides aminés contigus dans la région 199-208 de l'antigène HbsAg, et avantageusement se liant à la séquence peptidique constituée par la région 199-208 de l'antigène HbsAg.

WO 02/34789 A1

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES VIRUS DE L'HEPATITE B

5 Cinq types d'hépatites virales, les hépatites A, B, C, D, E, sont assez bien
connues à ce jour. Dans chaque cas, le virus envahit le foie et provoque un état inflammatoire
avec une destruction des cellules hépatiques.

L'hépatite B est causée par un virus, le virus de l'hépatite B humain (HBV). Le
virus HBV a été découvert par Blumberg et al. A « new » antigen in leukemia sera, JAMA
191 : 541, (1965). Le virus est transmis par voie sanguine, par contact sexuel ou par voie
10 périnatale.

L'infection par HBV dans la majorité des cas n'entraîne aucun symptôme et est
responsable d'hépatites aiguës asymptomatiques. L'hépatite aiguë se caractérise par des
troubles digestifs, des douleurs abdominales, une coloration des urines et une décoloration des
15 fèces anormales, une asthénie et un ictère. L'hépatite aiguë peut évoluer vers une forme
fulminante avec une nécrose rapide du foie.

L'infection virale peut également évoluer vers une forme chronique, soit chez
des patients ayant présenté une hépatite aiguë, soit chez des individus pour lesquels l'infection
était asymptomatique. Les porteurs chroniques présentent des lésions hépatiques d'importance
variable et un risque élevé d'évolution vers une cirrhose et le développement d'un cancer
20 primitif du foie. En Asie et en Afrique où la chronicité des infections est fréquente, les cancers
primitifs du foie représentent un problème crucial de santé publique. Par ailleurs, les porteurs
chroniques représentent des réservoirs pour le virus et permettent sa propagation transposant
le problème de santé publique au niveau mondial.

L'infection par HBV est une des infections virales les plus courantes chez
25 l'homme. C'est une maladie ubiquitaire avec une incidence géographique distincte. En Europe
et en Amérique du Nord entre environ 0,1% et 1% de la population est infectée, alors qu'en
Asie et en Afrique jusqu'à 20% de la population est porteuse de HBV. On estime à environ
350 millions le nombre de personnes infectées par HBV à travers le monde.

Une hiérarchisation des infections virales suite à une transfusion montre que la
30 transmission de HBV est la première, suivie de HCV et ensuite de HIV.

HBV est un petit virus à ADN de 42 nm de diamètre qui appartient au groupe des
virus à ADN hépatotropes (hepadnavirus) et est classé dans la famille des *Hepadnaviridae*. Sa

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

structure génomique est remarquablement compacte. Le virus comprend une enveloppe externe et une nucléocapside. L'enveloppe est composée principalement de trois antigènes de surface (HBsAgs : hepatitis B surface antigens) qui jouent un rôle majeur dans le diagnostic des infections par HBV. La nucléocapside contient l'antigène du core (HBcAg), une ADN polymérase/transcriptase inverse, ainsi que le génome viral. Le noyau viral constitue l'élément infectieux du virus et la membrane externe porte le principal déterminant antigénique du virus, l'antigène HBs. Le noyau viral demeure à l'intérieur de la nucléocapside. Son diamètre est d'environ 28 nm.

En dépit de sa petite taille (3200 paires de bases) l'ADN circulaire, partiellement double brin, de HBV code pour quatre types de produits viraux à partir de ses gènes chevauchants S, C, P, et X.

Le gène S code pour la protéine d'enveloppe HBsAg exprimée sur la surface externe du virion. La protéine d'enveloppe HBsAg est constituée de deux polypeptides majeurs, un polypeptide de 24 kDa et sa forme glycosylée de 28 kDa. HBsAg contient l'épitope majeur neutralisant de HBV, dénommé déterminant « a », qui correspond aux acides aminés 124 à 147 et est commun à tous les isolats de HBV. Le déterminant « a » est la cible la plus importante pour le diagnostic et la vaccination. Le développement d'anticorps anti-HBs après une infection aiguë ou chronique est généralement associé à un rétablissement et à un pronostic favorable. Les anticorps anti-HBs sont également associés à la production d'anticorps neutralisants après vaccination. La majorité des anticorps anti-HBs trouvés dans le sérum d'individus convalescents ou après vaccination se lie à la région du déterminant « a ». Bien que la structure tridimensionnelle de l'antigène HBs n'ait pas encore définie, des études de structure-fonction indiquent que le déterminant « a » est localisé dans la principale région hydrophile de l'antigène HBsAg (résidus 99 à 169). Il est clair que le déterminant « a » est très structuré parce que la dénaturation de cette zone par alkylation ou réduction donne des particules HBsAg dont l'antigénicité est fortement réduite. Il est probable que des ponts disulfure entre des cystéines sont impliqués dans une conformation correcte. Une structure potentielle du déterminant « a » (résidus 124-147), qui comprend cinq cystéines, impliquerait l'existence de ponts disulfure entre les acides aminés 124 et 137, formant une première boucle, et entre les acides aminés 139 et 147, formant une deuxième boucle. L'intégralité de la séquence du déterminant « a » contribue probablement à la structure antigénique. De plus, l'antigène HBsAg contient soit le déterminant *d* ou *y* qui correspond respectivement à la

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

présence de soit une lysine ou une arginine à la position 122 et, soit le déterminant *w* ou *r* qui correspond respectivement à la présence soit d'une lysine ou d'une arginine à la position 160. Il y a donc quatre sous types antigéniques majeurs de HBsAg, *adw*, *ayw*, *adr* et *ayr*, chacun étant associé à une distribution géographique. En amont du gène S, les gènes Pré-S codent pour divers antigènes de surface de HBV.

Le gène P code pour l'ADN polymérase/transcriptase inverse, très importante dans le mécanisme de la réplication virale.

Le gène C code pour deux protéines de la nucléocapside, HBeAg qui est une protéine sécrétée soluble et HBcAg, la protéine core intracellulaire. HBeAg est un marqueur sérologique d'une réplication virale élevée.

Le gène X code pour HBxAg qui a différents effets biologiques et qui peut notamment transactiver la transcription de gènes viraux et cellulaires.

Quand HBV infecte un individu, l'ADN viral se réplique totalement à l'intérieur des cellules hépatiques de l'hôte.

Après infection par HBV, le premier marqueur détectable dans le sérum de patient est l'antigène HBsAg, mais ce marqueur persiste rarement au delà de six mois. Après que l'antigène HBs ait disparu dans le sérum, les anticorps anti-HBsAg deviennent détectables et persistent. Parce que l'antigène HBc est séquestré par l'antigène d'enveloppe HBs, il n'est pas détectable en routine dans les sérums de patients, mais la présence d'anticorps anti-HBc est facilement mise en évidence dans les uns à deux semaines suivant l'apparition de l'antigène HBs.

Il est cependant maintenant certain que les tests sérologiques conventionnels, mettant en œuvre les marqueurs précités, ne permettent pas de détecter les variants de HBV. Or, le fait que des patients porteurs de HBV et ayant développé une hépatite B chronique existent, sans qu'il soit possible de mettre en évidence une infection par HBV à l'aide des marqueurs sérologiques traditionnels, est de la plus haute importance et montre la nécessité de développer de meilleurs tests.

L'existence de variants de HBV est suspectée depuis de nombreuses années. Cette présomption est basée sur la détection d'ADN viral dans le sérum et/ou le foie de patients présentant une hépatite chronique, en l'absence de mise en évidence des marqueurs sérologiques conventionnels (HBsAg et anti-HBc).

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

L'incapacité à détecter HBsAg chez des patients porteurs de séquences ADN du virus pourrait avoir plusieurs explications, telles qu'une faible expression de l'antigène de surface ou la présence de mutations au niveau du déterminant antigénique de la protéine S. Dans le premier cas, une co-infection virale pourrait supprimer la réplication de HBV (Jilg W et al., J. Hepatol, 1995, 23 : 14-20, Jylberberg et al., Clinical infection diseases, 1996, 23 : 1117-1125, Ushida et al., J. of Med. Virol. 1997, 52 : 399-405, Hofer et al., Eur. J. Clin ;
5 Microbiol. Infect. Dis., 1998, 17 : 6-13. Une autre explication pourrait être que l'antigène HBs est masqué lors de la formation *in vivo* de complexes immuns avec les anticorps anti-HBs.

Mais, plus récemment, la présence d'HBsAg a été observée dans des sérums anti-HBs de patients. La présence de l'antigène HBsAg chez ces patients pourrait être lié au fait qu'il n'a pas été neutralisé par les anti-HBs présents, suggérant la présence de variants.

La présence de variants ou mutants a été associée à la vaccination et à la thérapie utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. L'analyse de mutants semble montrer qu'ils ont été sélectionnés à partir d'une population mélangée et présentent des mutations
15 ponctuelles causant des substitutions en acides aminés dans le déterminant « a ». Les mutants semblent être le produit de mutations au hasard dans le gène qui conduisent à un pool de génotypes. On pense par ailleurs que la réponse immune est le facteur prédominant dans la sélection des mutants. Généralement, l'addition d'anticorps monoclonaux à des cellules infectées par un virus *in vitro* conduit à une sélection d'isolats qui ne sont pas neutralisés par
20 l'anticorps. Il n'est donc pas surprenant que des anticorps monoclonaux donnés à des patients avec une réplication virale active puissent avoir comme résultat une sélection de mutants d'échappement. Plusieurs mutants d'échappement séparés d'importance clinique ont été trouvés chez des individus vaccinés. Dans plusieurs cas, ils présentaient une mutation ponctuelle au niveau du codon qui code pour l'acide aminé 145 dans le déterminant « a » de
25 l'antigène HBsAg, avec comme résultants le changement d'une glycine en arginine. L'administration de sérum contenant un tel mutant à un chimpanzé a montré que ces agents sont transmissibles. Une autre mutation ponctuelle induisant le remplacement d'une lysine par un acide glutamique à la position 141 du déterminant « a » a également été trouvée chez des sujets vaccinés. Il est donc important de pouvoir détecter de manière sûre et fiable, non
30 seulement HBV de type sauvage, mais également les mutants ou variants. En effet, si une mutation significative survient au niveau de l'épitope de HBsAg et qu'elle n'est pas reconnue par les anticorps anti-HBs alors, soit le mutant ne sera pas détecté, soit le test ne sera pas

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

suffisamment sensible. Or, le fait de ne pas détecter un mutant d'échappement a non seulement une incidence pour la personne qui le porte, mais peut également conduire à la transmission de l'infection par les dons de sang, de produits sanguins et d'organes. Par ailleurs, un mutant HBsAg peut infecter des individus même s'ils ont été antérieurement immunisés et présentent une réponse de type anti-HBs. Il a été décrit, dans la demande de brevet internationale WO 94/26904, un anticorps monoclonal qui permet de discriminer la forme HBsAg sauvage d'un mutant d'échappement qui comprend une mutation à la position 122. Mais, il existe un besoin sérieux de caractériser des anticorps monoclonaux qui soient capables de détecter à la fois le type sauvage et les formes mutantes de l'antigène HBsAg pour le développement de tests de diagnostic fiables (Coleman et al. (1999), *Journal of Medical Virology* 59 : 19-24 ; Ireland et al. (2000), *Hepatology* 31 : 1176-1181). En effet, dans certains cas, des formes mutantes de HBV affectant la région du gène d'enveloppe codant pour le déterminant « a » ne sont pas reconnues par les anticorps monoclonaux utilisés dans les tests de diagnostic commerciaux (Carman et al. (1990), *Lancet* 336 : 325-329 ; Seddigh-Tonetakaboni et al. (2000), *Journal of Medical Virology* 60 : 113-121 ; Weinberger et al. (2000), *Journal of General Virology* 81 : 1165-1174).

Ainsi la présente invention a pour objet un anticorps monoclonal capable de se lier à un antigène HBsAg de type sauvage et à au moins une, de préférence au moins deux et avantageusement plus de deux, formes mutantes de l'antigène HBsAg, ledit anticorps monoclonal se liant à une séquence peptidique consistant en au moins 6 acides aminés contigus dans la région 199-208 de l'antigène HBsAg, et avantageusement se liant à la séquence peptidique constituée par la région 199-208 de l'antigène HBsAg.

Aussi, la présente invention a pour objet un anticorps monoclonal qui est capable de spécifiquement se lier à un antigène HBsAg de type sauvage et à au moins une, de préférence au moins deux et avantageusement plus de deux, formes mutantes de l'antigène HBsAg, ledit anticorps monoclonal se liant spécifiquement à la région 199-208 de l'antigène HBsAg.

La capacité de l'anticorps monoclonal de la présente invention à se lier spécifiquement à des formes sauvage et mutantes de l'antigène HBsAg est reliée au fait qu'il reconnaît une région de l'antigène de surface très conservée, comme montré pour la première fois par les inventeurs par « mapping » d'épitopes, à la fois chez les formes sauvage et mutantes de HBV qui correspond à la région ou épitope localisé entre les acides aminés 199 et

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

208 de l'antigène HBsAg, et ceci indépendamment de la présence d'autres mutations ou substitutions en acides aminés qui peuvent survenir au niveau du déterminant « a » ou à proximité du déterminant « a » de l'antigène HBsAg. Ainsi, l'anticorps monoclonal de l'invention est capable de reconnaître et de se lier spécifiquement à au moins une forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution d'un acide aminé dans le déterminant « a » de l'antigène HBsAg et, en particulier, des formes mutantes de l'antigène HBsAg qui présentent au moins une substitution en acides aminés aux positions 127, 133, 134, 142, 143, 144 et 145 du déterminant « a » de l'antigène HBsAg et éventuellement au moins une autre substitution en acides aminés aux positions 100, 118, 120, 122 de l'antigène HBsAg. Les mutations ou substitutions identifiées sont positionnées par rapport à la séquence en acides aminés de l'antigène HBsAg de type sauvage.

Les formes mutantes qui sont spécifiquement reconnues par les anticorps monoclonaux de l'invention sont identifiées dans les exemples qui suivent. Il s'agit plus précisément des mutants :

- 15 - 1043 Sp dans lequel une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine,
- AP 3.1 dans lequel un acide aspartique à la position 144 de l'antigène HBsAg est remplacée par une alanine,
- Arg 1.2 dans lequel une glycine à la position 145 de l'antigène HBsAg est remplacée par une arginine,
- 20 - 1157 Sp dans lequel une proline à la position 127 de l'antigène HBsAg est remplacée par une alanine et une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine,
- 1056 Sp dans lequel une proline à la position 120 de l'antigène HBsAg est remplacée par une sérine et une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine, et
- 25 - M5 dans lequel une tyrosine à la position 100 de l'antigène HBsAg est remplacée par une sérine, une thréonine à la position 118 de l'antigène HBsAg est remplacée par une valine, une arginine à la position 122 de l'antigène HBsAg est remplacée par une lysine, une méthionine à la position 133 de l'antigène HBsAg est remplacée par une isoleucine, une tyrosine à la position 134 de l'antigène HBsAg est remplacée par une asparagine, une proline à la position 142 de l'antigène HBsAg est remplacée par une sérine,
- 30

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

une sérine à la position 143 de l'antigène HBsAg est remplacée par une leucine, et une glycine à la position 145 de l'antigène HBsAg est remplacée par une lysine.

Les mutants précités peuvent être utilisés pour le criblage d'anticorps monoclonaux. Les anticorps de l'invention peuvent être, par exemple, criblés contre de l'antigène HBsAg de type sauvage et contre un ou plusieurs mutants tels que décrits ci-dessus. En particulier, les anticorps de l'invention peuvent être criblés contre de l'antigène HBsAg de type sauvage et contre un ou plusieurs mutants HBsAg chacun ayant une ou plusieurs substitutions à au moins une des positions 127, 133, 134, 142, 143, 144 et 145 de l'antigène HBsAg, plus particulièrement à au moins une des positions 143, 144 et 145 de l'antigène HBsAg et éventuellement au moins une autre substitution à au moins une des positions 100, 118, 120, 122 de l'antigène HBsAg.

En particulier, les anticorps monoclonaux de l'invention sont capables de se lier à un antigène HBsAg de type sauvage et à au moins un mutant HBsAg portant un déterminant « a » codé par des séquences présentant des mutations ponctuelles au niveau d'un ou plusieurs codons codant pour les acides aminés 127, 133, 134, 142, 143, 144 et 145 de l'antigène HBsAg. Les anticorps préférentiels de l'invention sont les anticorps référencés 2G2G10 et 8B4H7 qui appartiennent à la classe des immunoglobulines G. L'anticorps monoclonal 2G2G10 appartient à la classe des immunoglobulines IgG2b. L'anticorps monoclonal 8B4H7 appartient à la classe des IgG2a et a été obtenu par traitement aux UV de l'anticorps 2G2G10.

La présente invention englobe également les fragments et dérivés des anticorps monoclonaux de l'invention, en particulier les fragments Fab, Fab', F(ab)2 et sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 et Bird et al., 1988, Science 242 : 423-426), ainsi que les conjugués. Les dérivés des anticorps monoclonaux de l'invention comprennent, entre autres, les anticorps humanisés. Les méthodes pour produire des fragments d'anticorps monoclonaux et des dérivés d'anticorps monoclonaux, incluant les dérivés humanisés, sont bien connues de l'homme du métier. Les formes « humanisées » d'anticorps non humains, par exemple murins, sont des anticorps chimères qui comprennent une séquence minimale dérivée d'une immunoglobuline non humaine. Pour la plupart, les anticorps humanisés sont des immunoglobulines humaines (anticorps récepteur) dans lesquelles des résidus d'une région hypervariable du récepteur sont remplacés par des résidus d'une région hypervariable d'une espèce donneur (anticorps donneur) non humaine, telle que souris, rat, lapin ou primate non humain, ayant la spécificité, l'affinité et la capacité souhaitées. Dans certains cas, les résidus

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

(FR) de la région Fv de l'immunoglobuline humaine sont remplacés par des résidus correspondants non humains. De plus, les anticorps humanisés peuvent comprendre des résidus qui ne sont pas trouvés dans l'anticorps receveur ou dans l'anticorps donneur. Ces modifications sont effectuées pour améliorer les performances de l'anticorps. En général, l'anticorps humanisé comprendra au moins et de préférence deux domaines variables, dans lesquels tout ou à peu près tout des boucles hypervariables correspondent à une immunoglobuline non humaine et tout ou à peu près tout des régions FR seront celles d'une immunoglobuline humaine. Les anticorps humanisés facultativement pourront aussi comprendre au moins une partie d'une région constante (Fc) d'une immunoglobuline, telle qu'une immunoglobuline humaine (Jones et al., Nature 321 : 522-525 (1986) ; Reichmann et al., Nature 332 : 323-329 (1988) ; et Presta et al., Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593-596 (1992)).

Les anticorps monoclonaux de l'invention et, en particulier les anticorps 2G2G10 et 8B4H7, sont produits par des lignées d'hybridomes selon le protocole décrit dans l'exemple 1 qui suit ou selon un protocole dérivé de celui décrit dans l'exemple 1 et l'invention a aussi pour objet un tel procédé de production des anticorps monoclonaux de l'invention qui consiste à produire une lignée d'hybridome en immunisant un animal mammifère, de préférence murin, avec un antigène HBsAg de type sauvage ou une forme mutante d'un antigène HBsAg, éventuellement sous la forme d'un fragment ou d'un dérivé antigénique approprié, en immortalisant les cellules productrices d'anticorps pour former des hybridomes, en criblant les cultures d'hybridomes contre de l'antigène HBsAg de type sauvage et au moins une forme mutante telle que définie précédemment, éventuellement sous la forme d'un fragment ou dérivé antigénique approprié, et en sélectionnant les hybridomes qui produisent des anticorps qui se lient à l'antigène HBsAg de type sauvage et à au moins une forme mutante telle que définie ci-dessus.

L'invention englobe également un hybridome capable de produire un anticorps monoclonal de l'invention et un procédé pour produire un anticorps monoclonal de l'invention, qui consiste à cultiver un hybridome ou susceptible d'être obtenu selon un procédé tel que défini ci-dessus *in vitro* ou *in vivo* et à récupérer l'anticorps monoclonal à partir du milieu de culture ; ainsi que l'anticorps monoclonal susceptible d'être obtenu par le procédé de culture d'un hybridome.

Les anticorps monoclonaux de l'invention sont utilisables dans un immunoessai pour la détection et/ou quantification de l'antigène HBsAg dans un échantillon présumé le

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

contenir et donc pour la détection de virus HBV (sauvage et/ou mutants). De tels essais sont applicables au diagnostic clinique et au criblage de produits sanguins. Aussi, la présente invention concerne un procédé de détection et/ou de quantification d'antigène HBsAg dans un échantillon, qui consiste à mettre en contact l'échantillon avec au moins un anticorps monoclonal de l'invention, ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps monoclonal et à mettre en évidence la présence d'au moins un complexe antigène/anticorps, fragment ou dérivé.

Dans un mode de réalisation du procédé de l'invention, l'échantillon est mis en contact avec un anticorps monoclonal de l'invention, ou un fragment ou dérivé de celui-ci et avec au moins un autre anticorps choisi parmi les anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-HBsAg dirigés contre une région ou épitope différent de celui reconnu par les anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de l'invention.

De tels procédés sont réalisés selon la technique dite sandwich ou de compétition bien connues de l'homme du métier, en une ou deux étapes, en phase homogène ou hétérogène. De plus, les procédés de l'invention peuvent être couplés, dans un même essai, à la détection d'anticorps anti-HBc dans l'échantillon à analyser.

Les compositions diagnostiques correspondantes comprennent au moins un anticorps monoclonal de l'invention, ou un fragment ou dérivé de celui-ci, éventuellement en association avec au moins un réactif pour la détection d'anticorps anti-HBc et peuvent comprendre de plus au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal pour la détection de l'antigène HBsAg qui reconnaît une région ou épitope différent de celui reconnu par les anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de l'invention. Les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention peuvent être immobilisés sur une phase solide, comme anticorps de capture de l'antigène HBsAg ou utilisés en détection quand marqués avec tout marqueur approprié. Il est également envisagé d'utiliser les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention comme phase de capture de l'antigène HBsAg et d'utiliser au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre un épitope différent de celui reconnu par les anticorps de l'invention comme conjugué de détection, ou inversement. De même, les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention et au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre un épitope différent de celui reconnu par les anticorps de l'invention peuvent être immobilisés sur une même phase solide. Et de plus, un réactif capable de capturer les anticorps anti-HBc dans l'échantillon peut être immobilisé sur cette même phase

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

solide ou être inclus dans une composition de l'invention mais en étant immobilisé sur une phase solide différente de celle sur laquelle sont immobilisés les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention et éventuellement au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal anti-HBsAg reconnaissant un épitope différent de celui reconnu par les anticorps de l'invention.

L'invention concerne aussi un antisérum approprié pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique pour une immunisation passive contre HBV qui comprend un anticorps monoclonal de l'invention ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps ou leurs combinaisons. L'antisérum peut de plus comprendre au moins anticorps monoclonal ou anticorps polyclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-HBsAg, autres que l'anticorps monoclonal, fragment ou dérivé de l'invention.

Une composition appropriée pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique pour une immunisation passive contre HBV comprend un anticorps monoclonal, ou un fragment ou dérivé de l'invention ou leurs combinaisons, en mélange avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Par « véhicule pharmaceutiquement acceptable » on entend les supports et véhicules administrables à l'être humain ou à un animal, tels que décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co.

L'invention comprend donc de plus une méthode d'immunisation passive à but thérapeutique ou prophylactique contre HBV qui consiste à administrer à un individu une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'un anticorps monoclonal, fragment ou dérivé de l'invention ou leurs combinaisons. Un ou plusieurs autres anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-HBsAg et dirigés contre un épitope différent de celui reconnu par les anticorps, fragments ou dérivés de l'invention peuvent également être administrés.

L'invention inclut également un anticorps anti-idiotype ou anti-idiotypique à un anticorps de l'invention tel que défini ci-dessus. L'anticorps anti-idiotype est un anticorps produit contre un autre anticorps et qui réagit avec le site spécifique de liaison antigénique de ce dernier ou idiotype. Les anticorps anti-idiotype fonctionnent comme l'antigène reconnu par l'idiotype. De tels anticorps sont particulièrement utiles dans le cas d'épitopes conformationnels. Les anticorps anti-idiotype qui représentent l'image interne de pathogènes externes, tels que les virus, sont utilisés comme « substituts » des antigènes pour la vaccination. L'importance

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

des anticorps anti-idiotypes *in vivo* a été démontrée dans de nombreuses expérimentations. L'administration d'anticorps anti-idiotype *in vivo* a pour effet soit une suppression ou une augmentation des réponses à l'idiotype spécifique. Les anticorps anti-idiotypes de l'invention sont capables d'induire chez l'animal une réponse par production d'anticorps anti-anti-idiotypes qui reconnaissent l'épitope 199-208 de l'antigène HBsAg et à ce titre ils sont capables d'immuniser un animal contre HBV, voire de neutraliser une infection par HBV. Aussi, la présente invention a pour objet une composition vaccinale qui comprend une quantité suffisante, pour immuniser un animal contre HBV, d'une composition active comprenant un anticorps monoclonal anti-idiotype qui induit chez l'animal la production d'un anticorps anti-anti-idiotype qui reconnaît la région 199-208 de l'antigène HBsAg ou un fragment Fab dudit anticorps anti-idiotype ou leur mélange et un adjuvant pharmaceutiquement acceptable, par exemple de l'hydroxyde d'aluminium ou du phosphate d'aluminium. Les adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier et on peut donner à titre de référence les adjuvants cités dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents mouillants ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH. Le procédé pour immuniser un animal contre HBV consiste à lui administrer, en une ou plusieurs administrations, une composition vaccinale telle que définie ci-dessus. Bien entendu, après les essais *in vivo* sur les animaux, le but ultime d'une vaccination contre le virus HBV est de prévenir une infection chez l'homme. Aussi, le terme « animal » tel qu'utilisé ci-dessus fait référence à la fois aux animaux et à l'être humain. Le vaccin est préparé en mélangeant l'anticorps anti-idiotype de l'invention ou son fragment Fab dans un diluent approprié, qui peut être un tampon phosphate aqueux ou autre, de façon à obtenir une concentration finale de l'ordre de 1 mg par ml de protéine. Pour une administration à un homme de taille normale, par exemple, 50 µl (50 µg) à 100 µl (100 µg) de la solution sont dilués dans 4 500 µl et mélangés avec 500 µl d'un adjuvant pharmaceutiquement acceptable (pH 6,0 + 0,1). La dose variera en fonction de l'animal, de son âge et de son poids.

Les anticorps monoclonaux idiotype de l'invention sont produits par des techniques bien connues de l'homme du métier. L'épitope ou région 199-208 de l'antigène HBsAg est obtenu et purifié par toute technique actuellement disponible. L'anticorps idiotype (Ab1) est produit en immunisant un animal, de préférence murin, et en particulier une souris,

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

avec l'épitope précité, comme antigène. Les cellules de rate de l'animal sont ensuite identifiées, isolées et fusionnées avec des cellules de lymphome ou de myélome en présence d'un agent de fusion tel que le polyéthylène glycol (Köhler et Milstein, Nature 256 :459 (1975)). Les cellules fusionnées sont ensuite incubées dans un milieu sélectif qui inhibe la croissance des cellules malignes non fusionnées. Les cellules d'hybridome sont clonées par dilution limitante et testées pour la sécrétion d'un anticorps monoclonal de spécificité recherchée. Les anticorps monoclonaux peuvent également être obtenus par croissance d'ascite *in vivo*. L'anticorps idiotype Ab1 est utilisé pour produire un anticorps anti-idiotype (Ab2) qui possède les propriétés d'immunisation, voire de neutralisation, contre HBV. Les anticorps anti-idiotype Ab2 sont obtenus par les mêmes procédés que ceux utilisés pour la production des anticorps Ab1, mais l'anticorps Ab1 est alors l'immunogène utilisé.

L'invention a également pour objet l'épitope conservé de l'antigène HBsAg mis en évidence par les inventeurs dont la séquence peptidique, représentée dans l'identificateur de séquences SEQ ID NO : 1, commence à l'acide aminé 199 et se termine à l'acide aminé 208 de l'antigène HBsAg et son utilisation comme peptide immunogène, ainsi que des peptides immunogènes caractérisés en ce que leur séquence peptidique comprend respectivement au moins trois et au moins quatre acides aminés homologues ou identiques aux acides aminés de l'épitope référencé en SEQ ID NO : 1, en particulier les peptides immunogènes illustrés en SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3. Dans la comparaison des séquences SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 2 illustrée à la figure annexée, la séquence SEQ ID NO : 2 comporte trois acides aminés, W (tryptophane), P (proline), S (sérine) qui sont strictement homologues ou identiques aux acides aminés correspondants de SEQ ID NO :1 et un acide aminé I (isoleucine) qui est équivalent à L (leucine) de SEQ ID NO :1. Dans la comparaison des séquences SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO : 3 illustrée à la figure annexée, la séquence SEQ ID NO : 3 comporte quatre acides aminés qui sont strictement homologues ou identiques à ceux de SEQ ID NO : 1, il s'agit des acides aminés W (tryptophane), P (proline), Y (tyrosine), S (sérine), et deux acides aminés T (thréonine) et L (leucine) qui sont équivalents respectivement à S (sérine) et I (isoleucine) de SEQ ID NO :1. Les acides aminés dits équivalents sont des acides aminés qui peuvent se substituer les uns aux autres sans affecter le pouvoir immunogène des peptides. De tels peptides immunogènes sont utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, de fragments d'anticorps monoclonaux ou de dérivés d'anticorps monoclonaux répondant aux définitions données précédemment et

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

capables de reconnaître à la fois la forme sauvage et au moins une forme mutante de l'antigène HBsAg. La production d'anticorps monoclonaux, de fragments ou dérivés d'anticorps monoclonaux est bien connue de l'homme du métier. On peut citer à titre d'exemple Köhler et Milstein, Nature 256 : 45-47 (1975) et European Journal of Immunology 6 : 511-519 (1976) ainsi que Galfré G. et al. Nature, 266 : 522-550 (1977). L'épitope peut être produit par synthèse chimique ou par recombinaison génétique ou par une combinaison de différentes méthodes. La séquence codant pour l'épitope de l'invention peut ainsi être exprimée dans une cellule hôte appropriée sous le contrôle d'un promoteur approprié. Les cellules hôtes comprennent tout organisme unicellulaire capable de transcrire et de traduire des molécules d'ADN recombinant, telles que les cellules issues d'un organisme procaryote ou eucaryote incluant les cellules de mammifères, de levures et de bactéries, et permettant l'expression du fragment du gène S codant pour l'épitope de l'invention, le fragment du gène étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression. Par ailleurs, les peptides immunogènes SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 peuvent aisément être obtenus par synthèse chimique.

L'invention concerne enfin une sonde nucléique ou amorce capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN qui code pour l'épitope représenté en SEQ ID NO : 1 ou à la séquence nucléotidique ADN complémentaire de ladite séquence nucléotidique codant pour l'épitope représenté en SEQ ID NO : 1 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN.

L'invention concerne également une sonde nucléique ou amorce capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN représentée en SEQ ID NO : 4 qui code pour l'épitope représenté en SEQ ID NO : 1 ou à la séquence nucléotidique ADN complémentaire de SEQ ID NO : 4 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN ; une composition diagnostique comprenant au moins une sonde ou au moins une amorce telle que définie ci-dessus pour la détection et/ou la quantification de virus HBV (sauvage et/ou mutants) dans un échantillon biologique et un procédé de diagnostic d'ADN et/ou d'ARN de virus HBV (sauvage et/ou mutants) dans un échantillon biologique, selon lequel on prélève un échantillon biologique, tel que sérum, plasma ou échantillon tissulaire chez un patient suspecté d'être infecté par au moins un virus EBV, on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN et/ou l'ARN, on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde ou au moins une amorce,

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

dans des conditions de stringence déterminées et on détecte et/ou quantifie l'ADN et/ou ARN viral dans l'échantillon, soit par mise en évidence d'une hybridation dudit ADN et/ou ARN viral avec au moins une sonde, soit par amplification dudit ADN et/ou ARN. Dans le cas de l'utilisation de sondes nucléotidiques, la mise en évidence de la formation du complexe d'hybridation peut être effectuée directement par utilisation d'une sonde complémentaire ou sensiblement complémentaire de la séquence de la cible et marquée par tout marqueur approprié ou encore par mise en œuvre de la technique dite « sandwich » en une ou deux étapes qui consiste à utiliser une sonde de capture complémentaire ou sensiblement complémentaire d'une partie de la séquence de la cible et une sonde marquée par tout marqueur approprié ou sonde de détection complémentaire ou sensiblement complémentaire d'une autre partie de la séquence de la cible. Dans le cas d'utilisation d'amorces, celles-ci peuvent être directement marquées pour la mise en évidence d'un produit d'amplification marqué ou ne pas être marquées, auquel cas les produits d'amplification générés peuvent être sélectionnés en fonction de la taille attendue par passage sur gel d'acrylamide ou analysés à l'aide de sondes de détection appropriées.

A partir de la sélection de la séquence nucléotidique ADN qui code pour l'épitope 199-208 de l'invention, correspondant aux nucléotides 751-780 du génome de HBV décrit par Galibert et al. (Nature 280 : 646-650 (1979), représentée en SEQ ID NO : 4, de sa séquence complémentaire et de la séquence ARN correspondante, il est à la portée de l'homme du métier de déterminer et obtenir des sondes nucléotidiques ou des amorces capables de s'hybrider à SEQ ID NO : 4, à sa séquence complémentaire ou à la séquence ARN correspondante. On peut citer à titre d'exemples pour la production d'oligonucléotides l'utilisation d'enzymes de restriction et la synthèse chimique sur synthétiseur automatique. Les sondes et amorces susceptibles de s'hybrider dans des conditions de stringence déterminées à une séquence nucléotidique d'ADN ou d'ARN de l'invention font partie de cette définition. Il est à la portée de l'homme du métier de définir les conditions de stringence appropriées. Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. Tout ceci fait partie des connaissances générales de l'homme du métier et on peut citer à titre d'illustration l'enseignement donné dans le livre intitulé « DNA PROBES » de George H. Keller et Mark M. Manak, Second Edition, édité en 1993 par Stockton Press, 49 West 24th St., New York,

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

N.Y. 10010, USA (voir plus précisément : Section 1-Molecular Hybridization Technology, pp. 1-21).

Figure 1

5 La figure 1 annexée représente la séquence en acides aminés de l'antigène HBsAg. Sur cette figure est localisé l'épitope 199-208, mis en évidence par cartographie ou « mapping » d'épitopes comme illustré dans les exemples qui suivent. Les deux clones HWWKHPTRYSLG et HPLKQYWWRPSI qui présentent des acides aminés communs ou homologues ou identiques et des acides aminés équivalents aux acides aminés de la séquence de l'antigène HBsAg de type sauvage dans la région comprise entre les acides aminés 194-209 de la séquence en acides aminés de l'antigène HBsAg sont représentés en dessous de la séquence de l'antigène HBsAg de type sauvage. Les acides aminés communs ou homologues ou identiques et équivalents sont représentés en caractère gras dans la figure 1.

15 Exemples.

Exemple 1 : Production et caractérisation des anticorps monoclonaux.

Des souris femelles BALB/c JYco, âgées de 4 à 6 semaines (IFFA Credo), ont été immunisées par injection intrapéritonéale de 50 µg d'HBsAg *ay* recombinant émulsifié avec un volume égal de l'adjuvant complet de Freund. La protéine recombinante HBsAg *ay* a été obtenue auprès de Pasteur Mérieux Connaught. Cette protéine correspond à la souche *ayw* séquencée par Gallibert et al. (Nature 280 : 646-650 (1979)) et a été exprimée dans des cellules CHO (Michel et al., PNAS 81/ 7708-7712 (1984)). Elle est composée des régions pré-S et S. Les 55 acides aminés situés en position NH₂ terminale correspondent à la région pré-S2.

25 Trois injections ont ensuite été effectuées toutes les deux semaines en présence d'adjuvant incomplet. Quatre jours après la dernière injection, les cellules de la rate ont été prélevées et fusionnées avec la lignée cellulaire de myéiomes de souris Sp 2/O-Ag14, selon la technique décrite par Köhler & Milstein (Nature 256 : 45-47 (1975) ; European Journal of Immunology 6 : 511-519 (1976)). Après avoir cultivé les cellules pendant 12 à 14 jours, les surnageants de culture ont été criblés par un test ELISA indirect avec l'antigène HBsAg plasmatique *ay* recombinant fixé sur la phase solide. Mille cinquante huit surnageants de

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

culture, dilués au $1/10^{20}$, ont ainsi été criblés. Soixante six clones positifs ont été sélectionnés pour lesquels la DO à 405 nm était d'environ 2, soit six fois supérieure à la valeur seuil, à cette même longueur d'onde, de 0,3. Les soixante six surnageants de culture des clones positifs, dilués au $1/10^{20}$, ont ensuite été criblés par un test ELISA indirect avec de l'antigène HBsAg plasmatique *ay* natif. Vingt clones ont été sélectionnés pour lesquels la DO à 405 nm était supérieure à 2, soit 24 fois supérieure à la valeur seuil, à cette même longueur d'onde, de 0,1. Les surnageants de culture de 12 sur ces 20 clones, dilués au $1/10^{20}$, ont ensuite été testés par un test ELISA indirect, respectivement avec de l'antigène HBsAg *ay* natif et de l'antigène HBsAg *ad* natif, fixé sur la phase solide. Six clones ont été sélectionnés dans chacun de ces tests, pour lesquels la DO à 405 nm était de 1,2 ou plus pour l'essai avec l'antigène HBsAg *ay* natif et d'environ 1,1 pour l'essai avec l'antigène HBsAg *ad* natif, à une dilution au $1/1600^{20}$ du surnageant de culture, soit une DO environ dix fois supérieure à la valeur seuil de 0,1. Quatre de ces six clones positifs ont été sous-clonés deux fois par dilution limitante et produits sous forme d'ascite. Les ascites ont été obtenus à partir de souris, ayant reçu au préalable une injection de Pristane (nom commercial), et auxquelles 10^6 cellules d'hybridomes ont été injectées.

Les quatre IgGs ainsi obtenues ont été purifiées sur une colonne de sépharose couplée à la protéine A 4FF, selon le protocole fourni par le fabricant (Pharmacia) et ont été utilisées pour la suite des expériences. En final, l'anticorps monoclonal 2G2G10, qui appartient à la classe des immunoglobulines IgG2b, a été retenu en raison de ses excellentes performances.

Exemple 2 : Changement de classe de l'anticorps 2G2G10.

La classe de l'anticorps monoclonal 2G2G10 a été changée d'IgG2b en IgG2a par traitement aux UV selon le protocole de Rosén et Klein (Nature 306 : 189-190 (1983)). L'anticorps modifié a été nommé 8B4H7.

Exemple 3 : Criblage d'une banque de peptides portés par des phages.

La banque Ph.D.-12™ commercialisée par New England Biolabs Inc. a été criblée par les anticorps monoclonaux 2G2G10 et 8B4H7 biotinylés selon la méthode décrite par Gretch et al. (Analytical Biochemistry 163 : 270-277 (1987)). C'est une banque combinatoire de dodécapeptides exprimés en N-terminal d'une protéine mineure d'enveloppe

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

(pIII) du phage M13. Elle contient environ 4.10^{12} phages/ml, représentant $1,9.10^9$ séquences différentes.

Lors du premier « biopanning », 10 µg de streptavidine en tampon NaHCO_3 0,1 M (pH 8,6) sont fixés dans une boîte de Pétri de 35 mm de diamètre, pendant une nuit, à 4°C, en chambre humide, sous agitation. La boîte est ensuite saturée pendant 2h à 4°C avec une solution de saturation [5mg/ml BSA; 0,02% NaN_3 dans NaHCO_3 0,1M (pH 8,6)]. Après 6 lavages en TBS (Tris Buffer Saline) [Tris 0,5 M; NaCl 0,75 M, pH 7,5]-Tween 0,1%, les anticorps monoclonaux biotinylés 2G2G10 ou 8B4H7 sont incubés à une concentration de 170 nM en TBS Tween 0,1% avec 0,02% NaN_3 et 1 mg/ml de BSA pendant 1 nuit à 4°C, en chambre humide et sous agitation. Pour bloquer les sites non occupés par l'anticorps, 40 µg de biotine sont ajoutés et incubés pendant 1 heure à 4°C, en chambre humide et sous agitation. Après 6 lavages en TBS Tween 0,1%, 10 µl de la banque (4.10^9 phages) dilués dans du TBS Tween 0,1 %-biotine 0,1nM sont incubés 1 heure à température ambiante, sous agitation. Les phages non fixés sont ensuite éliminés par 10 lavages en TBS Tween 0,1%. L'éluat des phages fixés se fait par une incubation de 7 minutes avec le tampon d'éluat [0,1M HCl-Glycine; pH 2,2; 1 mg/ml BSA; 0.1 mg/ml rouge de phéno]. L'éluat est neutralisé par 200 µl de Tris-HCl 1M pH 9,1.

Les éluats correspondant aux criblages de la banque, soit avec 2G2G10, soit avec 8B4H7 sont amplifiés séparément par infection de la souche ER2537 d'*Escherichia coli* en milieu LB [tryptone 10 g/l ; extrait de levure 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5]. Après 4h30 d'incubation à 37°C à 250 rpm, les débris cellulaires sont éliminés par deux centrifugations successives de 10 min. à 10 000 rpm. Les phages contenus dans les surnageants sont précipités deux fois avec 1/6^{ème} de Polyéthylène glycol/NaCl [Polyéthylène glycol 16,7 %, NaCl 3,3 M]. Après une centrifugation de 15 min. à 14 000 rpm, les culots sont repris par 200 µl de TBS- NaN_3 0,02%. 100 µl de ces éluats amplifiés sont utilisés pour les deuxièmes biopannings.

Pour les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} « biopannings », 100 µl des éluats amplifiés précédents sont préincubés avec respectivement 100 nM, 1 nM et 0,1 nM des anticorps biotinylés 2G2G10 ou 8B4H7 pendant une nuit à 4°C, pendant que 10 µg de streptavidine sont fixés sur une boîte de Pétri, comme précédemment. Les mélanges phages/anticorps sont ajoutés après saturation des boîtes, pendant 15 minutes à température ambiante. La suite du protocole est semblable à celui des premiers « biopannings ».

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

Exemple 4 : Clonage et amplification des clones de phages.

Une culture d'*E. coli* est incubée à 37°C à 250 tpm jusqu'à ce que la densité optique (DO) atteigne 0.5. Pendant la croissance bactérienne, de l'agarose top [1 l LB ; 10 g bacto-tryptone ; 5 g extrait de levure ; 5 g NaCl ; 1 g MgCl₂ · 6H₂O ; 7g agarose] est fondu et aliquoté par 3 ml, et conservé à 55°C. Lorsque les cellules sont prêtes, 200 µl de culture sont incubées de 1 à 5 minutes à température ambiante avec 10 µl des éluats obtenus après les 4^{ème} biopannings et dilués en milieu LB. Les mélanges sont ensuite transférés dans 2 tubes d'agarose, vortexés et rapidement étalés sur des boîtes LB IPTG/XGal. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

36 colonies choisies au hasard sur les boîtes correspondants au criblage par 2G2G10 ou 8B4H7 sont amplifiées par infection d'1 ml d'une culture d'*E. coli* pendant 4 à 5 heures à 37°C, puis les cellules sont éliminées par centrifugation 30 s à 14 000 tpm. 500 µl du surnageant sont utilisés pour le séquençage, le reste est centrifugé de nouveau, dilué 1:1 dans du glycérol et conservé à -20°C.

2 µl de phages conservés en LB/Glycérol sont amplifiés par infection de 1,7 ml d'une culture de *E. coli* pendant 24 heures à 37°C et 250 tpm. Les cellules sont éliminées par centrifugation 5 min. à 14 000 tpm. Le surnageant est précipité par du PEG/NaCl. Après une centrifugation de 15 min. à 14 000 tpm, le culot est repris par 500 µl de TBS. Ces solutions de phages sont dosées par spectrométrie d'absorption à 269 nm et utilisées pour les tests en ELISA.

Exemple 5 : Séquençage des séquences insérées dans les clones phagiques.

L'extraction et la purification de l'ADN des différents clones sont effectuées à partir de 500 µl de surnageant qui sont précipités par 200 µl de PEG/NaCl pendant 10 min. à température ambiante. Après centrifugation 10 min. à 14 000 tpm, le culot est repris par 100 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaI 4M et 250 µl d'éthanol absolu puis incubé 10 min. à température ambiante. Après centrifugation 10 min. à 14 000 tpm, le culot est lavé une fois par 500 µl d'éthanol 70%, puis séché 10 min. sous vide. Il est finalement repris par 30 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM.

Le séquençage nucléotidique de l'insert est effectué selon la méthode modifiée de Sanger avec un séquenceur automatique (modèle 377A, Perkin Elmer) en utilisant le kit de

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

séquençage "Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin-Elmer) et l'amorce 5'HO-CCCTCATAGTTAGCGTAAACG-OH3' correspondant à la séquence sauvage du phage. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl d'ADN à séquençer, 2,5 pmolés d'oligonucléotides dans 2,5 µl d'eau, 8 µl de mélange "Big Dye™" contenant les didésoxyribonucléotides et la Taq™ polymérase, et 4,5 µl de H₂O. Les 25 cycles de séquençage (30 s à 96°C, 15 s à 50°C, 4 min. à 60 °C) sont effectués dans un appareil PCR (Polymerase Chain Reaction) Trioblock de Biométra. Les fractions de séquence sont purifiées sur colonne Sephadex G50 équilibrée avec du tampon TE [Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM], séchées et conservées à -20°C jusqu'au séquençage. Les séquences protéiques sont déduites des séquences nucléotidiques avec le logiciel Geneworks,

Exemple 6 : Analyse immunologique des clones de phages.

100 µl des anticorps anti-HBsAg 2G2G10 ou 8B4H7 ou d'un anticorps non pertinent utilisé comme contrôle négatif à la concentration finale de 100 µg/ml en tampon NaHCO₃ 0,1 M sont fixés pendant une nuit à 4°C, en chambre humide, sur des rangées de puits de plaques ELISA "Nunc Maxisorb". La plaque est ensuite saturée 2 heures à 4°C en solution de saturation [NaHCO₃ 0,1 M ; BSA 50 mg/ml ; NaN₃ 0,02 %]. Après 4 lavages en TBS-Tween 0.5 %, 100 µl de différentes concentrations de phages dilués en TBS Tween (1.10¹², 2,5.10¹¹, 6,2.10¹⁰ et 4.10⁹ phages/ml) sont ajoutés par puits et incubés 2 heures à température ambiante, sous agitation. Après 4 lavages en TBS Tween 0.5 %, 100 µl/puits d'anticorps anti-M13 couplé à la peroxydase et dilué au 1/5000 en solution de saturation sont incubés pendant 2 heures à température ambiante, sous agitation. Après incubation de 1 heure à 37°C, la plaque est lavée 4 fois en TBS-Tween 0,5 %. Pour la révélation, la plaque est incubée avec une solution d'o-phénylènediamine et de peroxyde d'hydrogène (kit colorEIA, bioMérieux) pendant 10 min. à l'obscurité. La réaction est stoppée par de l'acide sulfurique 1,8 N et la plaque est lue à 492 nm, avec un lecteur de plaques ELISA (Axia microreader). Pour chaque dilution de chaque clone les résultats sont exprimés par la différence des valeurs obtenues entre l'anticorps anti-HBsAg et l'anticorps contrôle. Les résultats sont ensuite confirmés en testant les dilutions optimales en triplicate.

Aucun clone immunoréactif n'a pu être sélectionné par l'anticorps 2G2G10. Par contre, l'anticorps équivalent 8B4H7 ayant le même paratope mais de classe IgG 2a a permis

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

de sélectionner des clones immunoréactifs (tableau 1). De plus deux de ces clones (HWWKHPTRYSLG et HPLKQYWWRPSI) sont aussi reconnus par l'anticorps 2G2G10.

Tableau 1

Fréquence et immunoréactivité des clones phagiques sélectionnés avec l'anticorps 2G2G10 et l'anticorps modifié 8B4H7.

Séquence des clones	Fréquence des clones	Réactivité avec 8B4H7 ^a		Réactivité avec 2G2G10 ^b
HKMHSHPRLTSP	13/36	< 0,1		
HWGNHKSHPQR	6/36	< 0,1		
WHKAVPRWLASP	4/36	0,8	0,4 ^c	< 0,1 ^c
HMAHRWQSELRP	2/36	< 0,1		
RVHKRHRRTQKNA	1/36	> 2,5	< 0,1	
HWWKHPTRYSLG	1/36	> 2,5	0,5	> 2,5
HFFKLSNWRTPP	1/36	22,5	< 0,1	
HPLKQYWWRPSI	1/36	< 0,1		0,4

L'immunoréactivité des clones a été déterminée par ELISA comme indiqué dans l'exemple 6, avec 8B4H7^a ou 2G2G10^b fixé sur la phase solide et les clones de phage sont ajoutés à la dilution finale de 8×10^{10} phages /ml^c et 2×10^{10} phages /ml^d.

10

Exemple 7: Localisation des séquences des clones phagiques immunoréactifs sur la séquence de l'HBsAg.

Les séquences en acides aminés des peptides ont été comparées à la séquence de la protéine recombinante d'HBsAg ayant servi à l'obtention de l'anticorps monoclonal (Galibert et al, 1979) en utilisant le logiciel Mac Vector, Ver.4.5 (Kodack). Brielvement, les régions de haute similarité sont détectées avec le programme LFASTA qui recherche les meilleures identités locales (Pearson et Lipman, PNAS 85 : 2444-2448 (1988)). Les deux clones immunoréactifs vis à vis de 2G2G10 ont permis de localiser clairement l'épitope reconnu par 2G2G10 et 8B4H7 dans la région 199-208 de HBsAg (Figure 1). En effet, HWWKHPTRYSLG a 4 résidus identiques et 3 résidus similaires avec la séquence 199-208 tandis que HPLKQYWWRPSI partage 3 résidus identiques et 1 résidu similaire avec la séquence 201-205.

20

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

Exemple 8 : Détection de l'antigène HBsAg de type sauvage et de variants HBsAg à l'aide des anticorps monoclonaux 2G2G10 et 8B4H7.

Le format utilisé est un format de type sandwich utilisant l'anticorps monoclonal 2G2G10 ou 8B4H7 en capture et un anticorps polyclonal de chèvre anti-HBs en détection.

5 - Détection de l'antigène HBsAg sauvage dans des sérums de patients :

Des sérums de patients fournis par la Société Nationale de Transfusion Sanguine de Lille comprenant plusieurs sous types (échantillons dilués) ont été testés avec l'anticorps monoclonal 2G2G10 en capture et un anticorps polyclonal de chèvre anti-HBs en détection. Les résultats sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous. Les échantillons testés sont identifiés
10 selon leur sous type et leur origine. Les résultats sont exprimés en signal détecté par rapport à une valeur seuil. La valeur seuil correspond à cinq fois le signal de l'échantillon négatif. Les valeurs dont le signal/valeur seuil est supérieur à 1 sont positives.

Tableau 2

Identification de l'échantillon / sous types	Signal / Valeur seuil
41 - adw2 - (US+Asie)	2,91
42 - adw4 - (Eur.+Am.sud)	3,04
43 - adr - (Asie)	2,94
44 - ayw1	3,00
45 - ayw2 - (Europe sud)	3,94
46 - ayw3 - (Europe-Asie)	3,42
47 - ayw3	3,07
48 - ayw4 - (Afrique)	4,02
49 - ayr - (Japon)	4,00
50 - Négatif / Diluant des échantillons	0,2

15

- Détection de l'antigène HBsAg sauvage dans des plasmas :

Des plasmas de la sérothèque de bioMérieux ont été testés dans les mêmes conditions que ci-dessus en utilisant à la fois l'anticorps monoclonal 2G2G10 et l'anticorps monoclonal 8B4H7 en capture. Les résultats sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous. Ils
20 sont exprimés en signal/valeur seuil. La valeur seuil correspond à cinq fois le signal de l'échantillon négatif. Les valeurs dont le signal/valeur seuil est supérieur à 1 sont positives.

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

Tableau 3

Echantillon	2G2G10 // signal/valeur seuil	8B4H7 // signal/valeur seuil
MAP 52 1/600	25,7	29,4
MAP 97 1/50000	24,6	36,1
MAP 59 1/3000	42,2	43,0
MAP 62 1/7000	46,0	47,6
MAP 64 1/6000	54,7	70,7
H80 1/7000	58,9	56,9
I44519 1/6000	52,2	54,0
I44344 1/16000	62,7	69,3

- Détection des variants HBsAg :

L'anticorps 2G2G10 a été testé pour sa capacité à détecter des mutants HBsAg à partir de surnageants de culture des variants HBsAg recombinants qui ont été obtenus auprès du Dr Carman et préparés selon la méthode décrite précédemment par Ireland et al., (Hepatology 31 : 1176-1181(2000)).

Les dosages ont été effectués en utilisant un test qualitatif fluoro-immunoenzymatique développé sur l'analyseur automatique Vidas (marque enregistrée) (Weber et al., Journal of Virological Methods 42 : 63-74 (1993); Mikkelsen et al., Gynecologic Obstetric Investigation 41 : 35-40 (1996)). Ce test de capture en deux étapes a été effectué comme suit :

L'anticorps 2G2G10 été fixé sur le réceptacle phase solide (SPR pour Receptacle Solid Phase) à la concentration finale de 10 µg/ml. Le SPR a ensuite été mis à incuber simultanément avec les surnageants de culture contenant les protéines recombinantes correspondant aux différents variants et l'anticorps polyclonal de chèvre biotinylé anti-HBsAg. La seconde étape a ensuite utilisé le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline pour la réaction fluorométrique.

Ainsi que le montre le tableau 4, en comparaison d'un autre anticorps anti-HBsAg 6H6B6, l'anticorps 2G2G10 est capable de détecter les différents variants testés. En effet, les échantillons BA3.2 et T5N portent respectivement les mutations C124R et T23N qui affectent ainsi que l'ont rapporté Ireland et al., (Hepatology 31 : 1176-1181 (2000)) la sécrétion de l'antigène dans les surnageants de cultures testés. L'absence de détection de ces deux surnageants ne peut donc être prise en compte.

25

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

Tableau 4
Réactivité des anticorps anti-HBsAg vis à vis de variants HBsAg.

Mutations dans le MHR	Echantillon	2G2G10	6H6B6
Séquence standard	Gly D	3.3	3.0
Séquence standard	Gly Y	4.9	4.3
plasmide contrôle ^a		0.2	0.3
P120T	BA 2.4	3.3	3.5
C121R	J1 ^a	6.7	27.5
T123N	BA 3.4	2.2	0.3
T123N/C124R	BA 3.2 ^a	0.2	0.3
M133T	SA7	3.0	2.1
F134L	J2	2.3	3.0
D144A	AP 3.1	4.7	0.7
G145R	Arg 1.2	7.2	0.4
Q129R/G130N/A166V	SA6	4.6	2.6
Q30R/S53L/L98V/Q101R/S210T	HK188	27.4	24.2
S143L	1043 Sp	3.0	0.7
P127A/S143L	1157 Sp	3.4	0.3
P120S/S143L	1056 Sp	1.8	0.5
Y100S/T118V/R122K/M133I/Y134N/P142S/S143L/G145K	M5	2.0	0.7
polysubstitution including D144E	PA17	2.5	2.3
D99N/I22NT123/G145R	TSN ^a	0.2	0.3

MHR : signifie région hydrophile majeure.

5 Les résultats sont exprimés par le signal moyen de duplicate /une valeur seuil.

Pour chaque anticorps, la valeur seuil a été définie par le signal moyen de duplicatas obtenus avec 0.16 ng/ml d'HBsAg plasmatique purifié des sous-types, *ad lay*.

^a Echantillons non dilués.

10

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

REVENDEICATIONS

1. Anticorps monoclonal capable de se lier à un antigène HBsAg de type sauvage
5 et à au moins une, de préférence au moins deux et avantageusement plus de deux, formes
mutantes de l'antigène HBsAg, ledit anticorps monoclonal se liant à une séquence peptidique
consistant en au moins 6 acides aminés contigus dans la région 199-208 de l'antigène HBsAg,
et avantageusement se liant à la séquence peptidique constituée par la région 199-208 de
l'antigène HBsAg.

10 2. Anticorps monoclonal selon la revendication 1, capable de se lier à au moins
une forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution d'un acide
aminé dans le déterminant « a » de l'antigène HBsAg.

3. Anticorps monoclonal selon la revendication 2, capable de se lier à au moins
une forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution d'un acide
15 aminé dans le déterminant « a » de l'antigène HBsAg aux positions 127, 133, 134, 142, 143,
144 ou 145 de l'antigène HBsAg et éventuellement au moins une autre substitution d'un acide
aminé à la position 100, 118, 120, 122 de l'antigène HBsAg.

4. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
20 remplacement d'une sérine par une leucine à la position 143 de l'antigène HBsAg.

5. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
remplacement d'un acide aspartique par une alanine à la position 144 de l'antigène HBsAg.

6. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
25 mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
remplacement d'une glycine par une arginine à la position 145 de l'antigène HBsAg.

7. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme
mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un
remplacement d'une proline par une alanine à la position 127 de l'antigène HBsAg et au
30 moins une substitution correspondant en un remplacement d'une sérine par une leucine à la
position 143 de l'antigène HBsAg.

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

8. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend au moins une substitution correspondant en un remplacement d'une proline par une sérine à la position 120 de l'antigène HBsAg et au moins une substitution correspondant en un remplacement d'une sérine par une leucine à la position 5 143 de l'antigène HBsAg.

9. Anticorps monoclonal selon la revendication 3, capable de se lier à la forme mutante de l'antigène HBsAg qui comprend une substitution correspondant en un remplacement d'une tyrosine par une sérine à la position 100 de l'antigène HBsAg, une substitution correspondant en un remplacement d'une thréonine par une valine à la position 10 118 de l'antigène HBsAg, une substitution correspondant en un remplacement d'une arginine par une lysine à la position 122 de l'antigène HBsAg, une substitution correspondant en un remplacement d'une méthionine par une isoleucine à la position 133 de l'antigène HBsAg, une substitution correspondant en un remplacement d'une tyrosine par une asparagine à la position 134 de l'antigène HBsAg, une substitution correspondant en un remplacement d'une proline par une sérine à la position 142 de l'antigène HBsAg, une substitution correspondant en un remplacement d'une sérine par une leucine à la position 143 de l'antigène HBsAg, et une substitution correspondant en un remplacement d'une glycine par une lysine à la position 15 145 de l'antigène HBsAg.

10. Anticorps monoclonal capable de se lier à un antigène HBsAg de type sauvage et à au moins un mutant HBsAg portant un déterminant « a » codé par des séquences présentant des mutations ponctuelles au niveau d'un ou plusieurs codons codant pour les acides aminés 127, 133, 134, 142, 143, 144 et 145 de l'antigène HBsAg, ledit anticorps monoclonal se liant à la région ou épitope 199-208 de l'antigène HBsAg.

11. Anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il appartient à la classe des immunoglobulines G.

12. Anticorps monoclonal selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il consiste en l'anticorps monoclonal 2G2G10 ou 8B4H7.

13. Anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications précédentes sous une forme humanisée.

14. Fragment ou dérivé d'un anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

15. Procédé pour produire un hybridome capable de produire un anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 qui consiste à immuniser un animal mammifère, de préférence murin, avec un antigène HBsAg de type sauvage ou une forme mutante d'un antigène HBsAg, éventuellement sous la forme d'un fragment ou d'un dérivé antigénique approprié, à immortaliser les cellules productrices d'anticorps pour former des hybridomes, à cribler les cultures d'hybridomes contre de l'antigène HBsAg de type sauvage et au moins une forme mutante telle que définie dans l'une quelconque des revendications 2 à 10, éventuellement sous la forme d'un fragment ou dérivé antigénique approprié, et à sélectionner les hybridomes qui produisent des anticorps qui se lient à l'antigène HBsAg de type sauvage et à au moins une forme mutante telle que définie dans l'une quelconque des revendications 2 à 10.

16. Hybridome capable de produire un anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

17. Procédé pour produire un anticorps monoclonal selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, qui consiste à cultiver un hybridome selon la revendication 16 ou susceptible d'être obtenu selon un procédé tel que défini dans la revendication 15 *in vitro* ou *in vivo* et à récupérer l'anticorps monoclonal à partir du milieu de culture.

18. Anticorps monoclonal susceptible d'être obtenu par le procédé de la revendication 17.

19. Procédé de détection d'antigène HBsAg dans un échantillon, qui consiste à mettre en contact l'échantillon avec au moins un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13, et à mettre en évidence la présence d'au moins un complexe antigène/anticorps, fragment ou dérivé.

20. Procédé selon la revendication 19, qui consiste à mettre en contact l'échantillon avec un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13 et au moins un autre anticorps choisi parmi les anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-HBsAg.

21. Procédé selon la revendication 19 ou 20 réalisé selon la technique dite sandwich ou de compétition.

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, dans lequel la détection de l'antigène HBsAg est effectué simultanément avec la détection d'anticorps anti-HBe.

23. Composition diagnostique qui comprend au moins un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13, éventuellement en association avec au moins un réactif pour la détection d'anticorps anti-HBe.

24. Composition diagnostique selon la revendication 23, qui comprend de plus au moins un autre anticorps monoclonal ou polyclonal pour la détection de l'antigène HBsAg.

25. Antisérum qui comprend un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13 ou leurs combinaisons.

26. Antisérum selon la revendication 25, qui comprend également au moins anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-HBsAg, autres que l'anticorps monoclonal défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18 ou d'un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13.

27. Composition appropriée pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique pour une immunisation passive contre HBV qui comprend un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18, ou un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13 ou leurs combinaisons, en mélange avec un support pharmaceutiquement acceptable.

28. Composition appropriée pour une utilisation thérapeutique ou prophylactique pour une immunisation passive contre HBV qui comprend également au moins anticorps monoclonal ou un anticorps polyclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-HBsAg, autres que l'anticorps monoclonal défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18 ou d'un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13.

29. Anticorps anti-idiotype à un anticorps monoclonal tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 ou dans la revendication 18 ou d'un fragment ou dérivé tel que défini dans la revendication 14 et la revendication 13.

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

30. Composition vaccinale qui comprend une quantité suffisante, pour immuniser un animal contre HBV, d'une composition active biologiquement comprenant un anticorps monoclonal anti-idiotype selon la revendication 29 qui induit chez l'animal la production d'un anticorps anti-anti-idiotype qui reconnaît la région 199-208 de l'antigène HBsAg ou un fragment Fab dudit anticorps anti-idiotype ou leur mélange et un adjuvant pharmaceutiquement acceptable.
31. Epitope de l'antigène HBsAg dont la séquence peptidique commence à l'acide aminé 199 et se termine à l'acide aminé 208 de l'antigène HBsAg et est représentée en SEQ ID NO : 1.
32. Peptide immunogène qui comprend l'épitope ou qui consiste en l'épitope de la revendication 31.
33. Peptide immunogène dont la séquence peptidique comprend au moins trois acides aminés homologues ou identiques aux acides aminés de la séquence peptidique de l'épitope de la revendication 31.
34. Peptide immunogène selon la revendication 33 dont la séquence peptidique consiste en la séquence SEQ ID NO : 2.
35. Peptide immunogène dont la séquence peptidique comprend au moins quatre acides aminés homologues ou identiques aux acides aminés de la séquence peptidique de l'épitope de la revendication 31.
36. Peptide immunogène selon la revendication 35 dont la séquence peptidique consiste en la séquence SEQ ID NO : 3.
37. Procédé d'obtention d'anticorps monoclonaux selon la revendication 17, de fragments d'anticorps monoclonaux, ou de dérivés d'anticorps monoclonaux en utilisant un peptide immunogène selon l'une quelconque des revendications 32 à 36.
38. Sonde nucléique ou amorce capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN qui code pour l'épitope de la revendication 31 ou à la séquence nucléotidique ADN complémentaire de ladite séquence nucléotidique codant pour l'épitope de la revendication 31 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN.
39. Sonde nucléique ou amorce selon la revendication 38 capable de s'hybrider, dans des conditions de stringence déterminées, à une séquence nucléotidique ADN représentée en SEQ ID NO : 4 qui code pour l'épitope de la revendication 31 ou à la séquence

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

nucléotidique ADN complémentaire de SEQ ID NO : 4 ou au produit de transcription ARN desdites séquences nucléotidiques ADN.

40. Composition diagnostique comprenant au moins une sonde ou au moins une amorce selon l'une des revendications 38 ou 39 pour la détection et/ou la quantification de virus HBV dans un échantillon biologique.

41. Procédé de diagnostic *in vitro* d'ADN et/ou d'ARN de virus HBV dans un échantillon biologique, selon lequel on prélève un échantillon biologique, tel que sérum, plasma ou échantillon tissulaire chez un patient suspecté d'être infecté par au moins un virus HBV, on traite si nécessaire ledit échantillon pour en extraire l'ADN et/ou l'ARN, on met en contact ledit échantillon avec au moins une sonde ou au moins une amorce selon la revendication 38, dans des conditions de stringence déterminées et on détecte et/ou quantifie l'ADN et/ou ARN viral dans l'échantillon, soit par mise en évidence d'une hybridation dudit ADN et/ou ARN viral avec au moins une sonde, soit par amplification dudit ADN et/ou ARN.

15

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

1/1

10 20 30
 M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F L L T R I L T I P Q
 40 50 60
 S L D S W W T S L N P L G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H
 70 80 90
 S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F I I F L F I L L L C
 100 110 120
 L I F L L V L L D Y Q G M L P V C P L I P G S S T T S T G P
 130 140 150
 C R T C M T T A Q G T S M Y P S C C C T K P S D G N C T C I
 160 170 180
 P I P S S W A F G K F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V
 150 200 210
 Q W F V G L S P T V W L S V I W M M W Y W G P S L Y S I L S
 H P L K Q Y W W R P S I
 H W W K H P T R Y S L G
 220
 P F L P L L P I F F C L W V Y I

FIGURE 1

WO 02/34789

PCT/FR01/03169

1

LISTE DE SEQUENCES

5 <110> BIOMERIEUX
 <120> ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES VIRUS DE
 L'HEPATITE B
 10 <130> IFB BIOM TOPE
 <140>
 <141>
 15 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 25 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de la protéine HBSAg du virus de l'hépatite B
 <400> 1
 Tyr Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
 1 5 10
 30 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de la protéine HBSAg du virus de l'hépatite B
 40 <400> 2
 His Pro Leu Lys Gln Tyr Trp Trp Arg Pro Ser Ile
 1 5 10
 45 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de la protéine HBSAg du virus de l'hépatite B
 55 <400> 3
 His Trp Trp Lys His Pro Thr Arg Tyr Ser Leu Gly
 1 5 10
 60 <210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

WO 02/34789

2

PCT/FR01/03169

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence nucléotidique codant pour la
protéine HBsAg du virus de l'hépatite B

5

<400> 4
tgggatggg ggccaagtct gtacagcctc

30

10

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/JP 01/03169
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/08 A61K39/42 C12N5/20 G01N33/53 C12Q1/70 A61P31/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 030 616 A (WATERS ET AL.) 29 February 2000 (2000-02-29) column 7; example 4 column 3, line 43 - line 57	1
Y	WO 95 16704 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 22 June 1995 (1995-06-22) page 16, line 1	1
A	PAULIJ W P ET AL: "Localization of a unique hepatitis B virus epitope sheds new light on the structure of hepatitis B virus surface antigen." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 80, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 2121-2126, XP002174119 ISSN: 0022-1317 the whole document	1-41
--- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 3 April 2002		Date of mailing of the international search report 17/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. rLi/FR 01/03169
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COOREMAN MICHEL P ET AL: "Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring "a" loop escape mutations." HEPATOLOGY, vol. 30, no. 6, November 1999 (1999-11), pages 1287-1292, XP001015475 ISSN: 0270-9139 the whole document	1-41
P,X	JOLIVET-REYNAUD C ET AL: "Localization of hepatitis B surface antigen epitopes present on variants and specifically recognised by anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, (2001 OCT) 65 (2) 241-9. , XP002195005 the whole document	1-41
P,A	IJAZ SAMREEN ET AL: "Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface 'Escape' mutants and its application in liver transplant recipients." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 63, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 210-216, XP001015468 ISSN: 0146-6615 the whole document	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/03169

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6030616	A	29-02-2000	AU 681636 B2 04-09-1997
			AU 6287094 A 11-10-1994
			CA 2158866 A1 29-09-1994
			CN 1121357 A 24-04-1996
			EP 0689605 A1 03-01-1996
			WO 9421812 A2 29-09-1994
			JP 8510635 T 12-11-1996
			NO 953749 A 22-11-1995
			NZ 262929 A 22-08-1997
			PL 310699 A1 27-12-1995
			WO 9516704

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		le Internationale No PCT/FR 01/03169
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K16/08 A61K39/42 C12N5/20 G01N33/53 C12Q1/70 A61P31/20		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 6 030 616 A (WATERS ET AL.) 29 février 2000 (2000-02-29) colonne 7; exemple 4 colonne 3, ligne 43 - ligne 57 ---	1
Y	WO 95 16704 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 22 juin 1995 (1995-06-22) page 16, ligne 1 ---	1
A	PAULIJ W P ET AL: "Localization of a unique hepatitis B virus epitope sheds new light on the structure of hepatitis B virus surface antigen." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 80, no. 8, août 1999 (1999-08), pages 2121-2126, XP002174119 ISSN: 0022-1317 le document en entier ---	1-41
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent; l'inven. non revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		*Y* document particulièrement pertinent; l'inven. non revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
C document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*S* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
3 avril 2002	17/04/2002	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Palatman 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Le Flao, K	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		E de Internationale No PCT/FR 01/03169
C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	No. des revendications visées
A	COOREMAN MICHEL P ET AL: "Characterization of the reactivity pattern of murine monoclonal antibodies against wild-type hepatitis B surface antigen to G145R and other naturally occurring "a" loop escape mutations." HEPATOLOGY, vol. 30, no. 6, novembre 1999 (1999-11), pages 1287-1292, XP001015475 ISSN: 0270-9139 le document en entier	1-41
P,X	JOLIVET-REYNAUD C ET AL: "Localization of hepatitis B surface antigen epitopes present on variants and specifically recognised by anti-hepatitis B surface antigen monoclonal antibodies." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, (2001 OCT) 65 (2) 241-9, XP002195005 le document en entier	1-41
P,A	IJAZ SAMREEN ET AL: "Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface 'Escape' mutants and its application in liver transplant recipients." JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY, vol. 63, no. 3, mars 2001 (2001-03), pages 210-216, XP001015468 ISSN: 0146-6615 le document en entier	1-41

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 de Internationale No
 PCT/FR 01/03169

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6030616	A	29-02-2000	AU 681636 B2 04-09-1997
			AU 6287094 A 11-10-1994
			CA 2158866 A1 29-09-1994
			CN 1121357 A 24-04-1996
			EP 0689605 A1 03-01-1996
			WO 9421812 A2 29-09-1994
			JP 8510635 T 12-11-1996
			NO 953749 A 22-11-1995
			NZ 262929 A 22-08-1997
			PL 310699 A1 27-12-1995
WO 9516704	A	22-06-1995	WO 9516704 A1 22-06-1995

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 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/576	B
G 0 1 N 33/576	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 レセネシャル, ミレン

フランス国、エフ - 6 9 1 0 0 ビュールバンヌ、リュ・アナートル - フランス 8 4

(72) 発明者 バッタール - ポワロ, ニコル

フランス国、エフ - 6 9 0 0 2 リヨン、ケ・ジュール・クルモン 6

(72) 発明者 ベックアール, ローレンス

フランス国、エフ - 6 9 8 0 0 サン・プリエ、リュ・ポール・パンルベ 6

F ターム(参考) 4B024 AA14 BA51 CA01 CA09 CA11 DA02 GA01 HA12 HA15
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ10 QQ42 QQ52 QQ79 QR08 QR42 QR55
 QR62 QS25 QS34 QX02
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15
 4B065 AA90X AB02 BA08 CA24 CA25 CA46
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 DA86 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	抗乙型肝炎病毒的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2004516824A	公开(公告)日	2004-06-10
申请号	JP2002537775	申请日	2001-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
[标]发明人	ジョリヴェレノーコレット レセネシャルミレン バッテリーポワロニコル ベックアールローレンス		
发明人	ジョリヴェレノー,コレット レセネシャル,ミレン バッテリー-ポワロ,ニコル ベックアール,ローレンス		
IPC分类号	G01N33/53 A61P31/20 C07K14/02 C07K16/08 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P31/20 C07K16/082		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.C C07K14/02 C07K16/08 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/576.B G01N33/577.B C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA14 4B024/BA51 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/GA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15 4B065/AA90X 4B065/AB02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2000013454 2000-10-20 FR		
其他公开文献	JP4293788B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及能够结合野生型HBsAg抗原和至少一种，优选至少两种并且有利地多于两种突变形式的HBsAg抗原的单克隆抗体，所述单克隆抗体结合由以下组成的肽序列 HBsAg抗原的199-208区域中的至少6个连续氨基酸，并且有利地结合由HBsAg抗原的199-208区域构成的肽序列。

		(P2004-51682)
		(43) 公表日 平成16年6月10日(2004.6.10)
(51) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード(参考)
C12N 15/02	C12N 15/00	ZNAC 4B024
C07K 14/02	C07K 14/02	4B063
C07K 16/08	C07K 16/08	4B064
C12N 5/10	C12P 21/08	4B065
C12P 21/08	C12Q 1/68	A 4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 61 頁) 最終頁に*
(21) 出願番号	特願2002-537775 (P2002-537775)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成13年10月12日(2001.10.12)	バイオメリュー・ソシエテ・アノニム
(85) 簡訳文提出日	平成15年4月21日(2003.4.21)	BIOMERIEUX SA
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/003169	フランス・69280・マルシ・レトワ
(87) 国際公開番号	W02002/034789	ル・シュアマン・ドゥ・ロルム 376
(87) 国際公開日	平成14年5月2日(2002.5.2)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	00/13454	100078662
(32) 優先日	平成12年10月20日(2000.10.20)	弁理士 津国 肇
(33) 優先権主張国	フランス(FR)	(74) 代理人
		100075225
		弁理士 篠田 文雄
		(72) 発明者
		ジョリヴェレノー, コレット
		フランス国, エフ-69720 サン-
		ネー・ドゥ・ミュール, ルート・ナシオ
		ル、レ・セードル 29