

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4173741号
(P4173741)

(45) 発行日 平成20年10月29日(2008.10.29)

(24) 登録日 平成20年8月22日(2008.8.22)

(51) Int.Cl.	F I		
C07K 14/18	(2006.01)	C07K 14/18	ZNA
A61K 38/00	(2006.01)	A61K 37/02	
A61K 39/00	(2006.01)	A61K 39/00	H
A61P 31/14	(2006.01)	A61P 31/14	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N 33/53	N
請求項の数 33 (全 108 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-583616 (P2002-583616)
 (86) (22) 出願日 平成14年4月24日(2002.4.24)
 (65) 公表番号 特表2004-536052 (P2004-536052A)
 (43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/BE2002/000064
 (87) 国際公開番号 W02002/086101
 (87) 国際公開日 平成14年10月31日(2002.10.31)
 審査請求日 平成16年10月26日(2004.10.26)
 (31) 優先権主張番号 01870088.0
 (32) 優先日 平成13年4月24日(2001.4.24)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 60/305,604
 (32) 優先日 平成13年7月17日(2001.7.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 399044160
 イノジェネティックス・ナムローゼ・フェ
 ンノートシャップ
 INNOGENETICS N. V.
 ベルギー、ペー-9052ヘント、テヒノ
 ロギーパーク6番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100116311
 弁理士 元山 忠行
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コアグリコシル化されたHCVエンベロープタンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含み、酵母細胞の発現産物であり、さらにはN-グリコシル化部位の80%までが占有されており、該占有されたN-グリコシル化部位がコアグリコシル化されており、該コアグリコシル化が10%未満の末端1,3マンノースを含有することを特徴とする、単離されたHCVエンベロープタンパク質。

【請求項2】

前記コアグリコシル化された部位の70%よりも多くが8~10個のマンノースを含むオリゴマンノースでグリコシル化されている、請求項1に記載の単離されたHCVエンベロープタンパク質。

【請求項3】

Man(8)-GlcNAc(2)で定義される構造をもつオリゴマンノースによりコアグリコシル化された部位に対するMan(7)-GlcNAc(2)で定義される構造をもつオリゴマンノースによりコアグリコシル化された部位の比が、0.45以下である、請求項1または2に記載の単離されたHCVエンベロープタンパク質。

【請求項4】

前記酵母細胞がHansenula細胞である、請求項1から3のいずれか1項に記載の単離されたHCVエンベロープタンパク質。

【請求項5】

前記HCVエンベロープタンパク質に結合されたアミノ酸配列MRSLLILVLCF

L P L A A L G (配列番号 99) により定義されるニワトリリゾチームリーダーペプチド又はその機能的変異体を含むタンパク質から誘導される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質であって、前記機能的変異体は、前記 ニワトリリゾチームリーダーペプチドのアミノ酸配列 において 1 または数個 のアミノ酸の欠失、置換、又は付加を有し、かつプレタンパク質を粗面小胞体にターゲティングする能力を有する、タンパク質。

【請求項 6】

$C L - [(A 1)_a - (P S 1)_b - (A 2)_c] - H C V E N V - [(A 3)_d - (P S 2)_e - (A 4)_f]$

という構造を特徴とするタンパク質から誘導され、式中：

C L は、アミノ酸配列 M R S L L I L V L C F L P L A A L G (配列番号 99) により定義されるニワトリリゾチームリーダーペプチド又はその機能的等価物であり、

A 1、A 2、A 3 及び A 4 は、異なるもの又は同じものでありうるアダプタペプチドであり、

P S 1 及び P S 2 は、異なるもの又は同じものでありうるプロセッシング部位であり、

H C V E N V は、H C V エンベロープタンパク質又はその一部分であり、

a、b、c、d、e 及び f は 0 又は 1 であり、

ここで、前記機能的等価物は、前記 ニワトリリゾチームリーダーペプチドのアミノ酸配列 において 1 または数個 のアミノ酸の欠失、置換、又は付加を有し、かつプレタンパク質を粗面小胞体にターゲティングする能力を有し、A 1 及び / 又は A 2 は P S 1 の一部分であつてもよく、かつ / 又は A 3 及び / 又は A 4 は P S 2 の一部分であつてもよい、

請求項 5 に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 7】

A が配列番号 63 - 65、70 - 72 及び 74 - 82 から選択されるアミノ酸配列からなり、P S が配列番号 66 - 68 及び 83 - 84 から選択されるアミノ酸配列からなるか、又は P S が二塩基部位又は一塩基部位であり、かつ H C V E N V が配列番号 85 - 98 から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項 6 の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 8】

P S が L y s - L y s、A r g - A r g、L y s - A r g 及び A r g - L y s から選択される二塩基部位である、請求項 7 に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 9】

P S が一塩基部位 L y s である、請求項 7 に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 10】

単量体、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモオリゴマー及びヘテロオリゴマーからなるグループの中から選択される構造の中に含まれている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 11】

ウイルス様粒子内に含まれている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 12】

システインのチオール基が化学的に修飾されている請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 13】

抗原性である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の単離された H C V エンベロープタンパク質。

【請求項 14】

免疫原性である、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の H C V エンベロープタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

T細胞エプトープを含んで成る、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の単離された HCV エンベローブタンパク質。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の単離された HCV エンベローブタンパク質を含んで成る組成物。

【請求項 17】

薬学的に受容可能な担体をさらに含み、薬剤である、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

薬学的に受容可能な担体をさらに含み、ワクチンである、請求項 16 に記載の組成物。

10

【請求項 19】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の単離された HCV エンベローブタンパク質を産生するための方法。

【請求項 20】

抗-HCV抗体を含むことが疑われている試料中の抗-HCV抗体の存在を検出する方法であって、

(i) 前記 HCV エンベローブタンパク質と前記抗-HCV抗体の複合体化を可能にする条件下で前記試料と請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の HCV エンベローブタンパク質を接触させる段階；

(ii) (i) で形成された複合体を検出する段階；及び

(iii) 前記試料中の前記抗-HCV抗体の存在を (ii) から推論する段階、を含んで成る方法。

20

【請求項 21】

段階 (i) での前記接触が競合的条件で起こる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 HCV エンベローブタンパク質が固体支持体に結合させられている、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

抗-HCV抗体を含むことが疑われている試料中の抗-HCV抗体の存在を検出するための診断用キットであって、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の HCV エンベローブタンパク質を含んで成るキット。

30

【請求項 24】

前記 HCV エンベローブタンパク質が固体支持体に結合させられている、請求項 23 に記載の診断用キット。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の HCV エンベローブタンパク質を含む医薬。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の HCV エンベローブタンパク質を含むワクチン。

【請求項 27】

哺乳動物体内で HCV - 特異的免疫応答を誘発するための医薬組成物であって、有効量の請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の HCV エンベローブタンパク質を含んで成る、医薬組成物。

40

【請求項 28】

哺乳動物体内で HCV - 特異的抗体を誘発するための医薬組成物であって、有効量の請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の HCV エンベローブタンパク質を含んで成る、医薬組成物。

【請求項 29】

哺乳動物体内で、T細胞機能を誘発するための医薬組成物であって、有効量の請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の HCV エンベローブタンパク質を含んで成る、医薬組成物

50

。

【請求項 30】

薬学的に受容可能なアジュバントをさらに含んで成る、請求項 27 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

予防用組成物である、請求項 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 32】

治療用組成物である、請求項 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

前記哺乳動物が人間である、請求項 27 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、組換え型タンパク質発現の一般的分野、HCV 感染の診断、HCV 感染の治療又は予防そして慢性肝炎を患う個体の治療の臨床的効率の予後診断 / 監視又は自然疾病の予後診断 / 監視に関する。

【0002】

より詳細には、本発明は、酵素内の C 型肝炎ウイルスエンベロープタンパク質の発現、コアグリコシル化されたウイルスエンベロープタンパク質の発現のための酵母菌株及び本発明による HCV エンベロープタンパク質の診断、予防又は治療での使用に関する。

20

【0003】

発明の背景

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染は、開発国及び開発途上国の両方において大きな健康上の問題である。世界の人口の約 1 ~ 5 % がこのウイルスに冒されていると推定されている。HCV 感染は、輸血による肝炎の最も重要な原因であると考えられ、往々にして慢性肝臓障害へと進行する。その上、肝細胞ガン腫の誘発に HCV が関与することを示す証拠が存在している。その結果として、信頼性の高い診断方法及び有効な治療剤に対する需要は高い。同様に、HCV 感染した血液製剤の高感度かつ特異的スクリーニング方法及び HCV を培養するための改善された方法も必要とされている。

30

【0004】

HCV は、約 3000 のアミノ酸の単一のポリタンパク質前駆体をコードする約 9600 塩基の正鎖 RNA ウイルスである。翻訳後及び同時修飾と結合されたこの前駆体のタンパク質分解による開裂は、少なくとも 3 個の構造タンパク質及び 6 個の非構造タンパク質を結果としてもたらすことが示されてきた。配列相同性に基づいて、構造タンパク質は、1 つの単一コアタンパク質及び 2 つのエンベロープ糖タンパク質すなわち E1 及び E2 として機能的に帰属されてきた。E1 タンパク質は、192 個のアミノ酸から成り、HCV 遺伝子型に応じて、4 ~ 5 個の N - グリコシル化部位を含む。E2 タンパク質は、363 ~ 370 個のアミノ酸で構成され、HCV 遺伝子型に応じて 9 ~ 11 個の N - グリコシル化部位を含有する (レビューのためには、Major 及び Feinstein、1997; Maertens 及び Stuyver、1997 を参照のこと)。E1 タンパク質はさまざまな可変ドメイン (Maertens 及び Stuyver、1997) を含有する。E2 タンパク質は 3 つの超可変ドメインを含み、そのうち主要ドメインは、タンパク質の N 末端にある (Maertens 及び Stuyver、1997)。HCV 糖タンパク質は、ER 内に大部分が局在化しており、ここでこれらのタンパク質は修飾されオリゴマー複合体の形に組立てられる。

40

【0005】

真核生物においては、糖残渣は一般に、4 つの異なるアミノ酸残基に結合されている。これらのアミノ酸残基は、O 結合 (セリン、トレオニン及びヒドロキシリジン) 及び N 結合 (アスパラギン) されたものとして分類される。O 結合型糖は、ヌクレオチド糖から粗

50

面小胞体 (ER) 又はゴルジ内で合成される。N 結合型糖は、共通の前駆体から合成され、その後プロセッシングされる。HCV エンベロープタンパク質は N-グリコシル化されていると考えられている。当該技術分野においては、折畳み中間体の安定化ひいては効率の良い折畳み、小胞体内の折畳み不良及び分解の防止、オリゴマー化、生物活性及び糖のタンパク質の輸送のために、N 結合型炭水化物鎖の付加が重要であることが知られている (Rose ら、1988; Doms ら、1993; Helenius、1994 による再考を参照のこと)。ポリペプチド上のトリペプチド配列 Asn-X-Ser 及び Asn-X-Thr (ここで X は任意のアミノ酸でありうる) は、N 結合型オリゴ糖を結合するためのコンセンサス部位である。ポリペプチドに対する N 結合型オリゴ糖の付加の後、オリゴ糖はさらに (N-アセチルグルコサミン、マンノース、フコース、ガラクトース及びシアル酸を含有する) 複合体タイプ又は (N-アセチルグルコサミン及びマンノースを含有する) 高マンノースタイプへとプロセッシングされる。HCV エンベロープタンパク質は、高マンノースタイプのものであると考えられている。酵母の中の N 結合型オリゴ糖プロセッシングは、哺乳動物のゴルジプロセッシングとは非常に異なるものである。酵母内で、オリゴ糖鎖は、マンノースの工程的付加を通してゴルジ内で伸長され、過剰グリコシル化 (Hyperglycosylation) と呼ばれる、精巧な高マンノース構造を導く。これとは対照的に、原核生物内で発現されるタンパク質は、決してグリコシル化されることはない。

【0006】

タンパク質又はペプチドの高マンノースタイプのグリコシル化のパターンは、さまざまな真核細胞について決定されてきた。哺乳動物においては、平均 5 ~ 9 個のマンノース単位が、コアグリコシル化タイプのオリゴ糖内で 2 つの N-アセチルグルコサミン部分に結合されている (短縮して Man(5-9)GlcNAc(2) と表現される構造)。コアグリコシル化というのは、Herscovics 及び Orleans (1993) の図 3 中にあるボックス構造に類似した構造を意味する。

【0007】

メチロトロフ性酵母 *Pichia pastoris* は、グリコシル化部位 1 つあたり平均 8 ~ 14 個のマンノース単位すなわち Man(8-14)GlcNAc(2) を結合させることが報告されており (Tschopp の EP0256421)、N 結合型オリゴ糖の約 85% がサイズ範囲 Man(8-14)GlcNAc(2) 内にある (Grinna 及び Tschopp (1989)。その他の研究者らは、*P. pastoris* 中で発現された異種タンパク質に結合させられたわずかに異なるオリゴ糖構造を公表してきた: Man(8-9)(GlcNAc(2)) (Montesino ら (1998)、Man(9-14)GlcNAc(2) 又は Man(9-15)GlcNAc(2) (Kalidas ら (2001)) 及び Man(8-18)GlcNAc(2)、ただし優勢であるのは Man(9-12)GlcNAc(2) であり、主要な全体的オリゴ糖は Man(10)GlcNAc(2) である (Miele ら (1998))。 (Trimble ら (1991)) は、さらに N-グリコシル化部位の 17% が Man(10)GlcNAc(2) により占有され残りの 8% の部位が Man(11)GlcNAc(2) により占有されている状態で、N 結合型オリゴ糖の約 75% の中の Man(8)GlcNAc(2) 及び Man(9)GlcNAc(2) の等しい分布を報告した。時として *P. pastoris* で発現されたタンパク質の過剰グリコシル化が報告されてきた (Scorer ら (1993))。

【0008】

Aspergillus niger は、Man(5-10)GlcNAc(2) を N-グリコシル化部位に付加している (Panchal 及び Wodzinski (1998))。

【0009】

Saccharomyces cerevisiae グリコシル化欠損突然変異体 *mn9* は、それが過剰グリコシル化されたタンパク質ではなく Man(9-13)GlcN

10

20

30

40

50

Ac(2)から成る修飾されたオリゴ糖でグリコシル化済みのタンパク質を産生するという点で、野生型*S. cerevisiae*と異なっている(MackayらのUS5135854及びKniskernらのWO94/01132)。もう1つの*S. cerevisiae*突然変異体、och1mnn9が、タンパク質中のN-グリコシル化部位にMan(8)GlcNAc(2)を添加することが報告された(YoshifumiらのJP06277086)。

S. cerevisiae(野生型及びmnn9突然変異体)コアオリゴ糖の特徴は、末端の1,3-結合されたマンノース残基の存在にある(Montesinoら(1998))。P.pastoris又は*S. cerevisiae* och1mnn1の中で発現されたタンパク質のN-グリコシル化部位に結合されたオリゴ糖には、このような末端の1,3-結合されたマンノースが欠けている(Gellissenら(2000))。末端の1,3結合されたマンノースは、アレルギー誘発性であるとみなされている(Jenkinsら(1996))。従って、そのオリゴ糖上に末端の1,3-結合されたマンノース残基を担持しているタンパク質は、診断又は治療目的では適切でない。

【0010】

メチルトローフ性酵母*Hansenula polymorpha*内で発現されるタンパク質上のグリコシル化パターンは、多大な量の異種タンパク質を産生するためにこの酵母を使用するにもかかわらず(Gellissenら(2000)の表3参照)、詳細には研究されたことがない。Janowiczら(1991)およびDiminskyら(1997)の実験から、*H. polymorpha*は、大型又は小型のB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)を全く又はわずかしがグリコシル化していないと思われる。これは、HBsAgがシグナルペプチド無しで発現され、かくして産生されたHBsAgが小胞体(ER)の管腔内に入ることそしてグリコシル化を防ぐという事実に起因している確率が最も高い。*H. polymorpha*内で産生されたG-CSF(顆粒球コロニー刺激因子に対するモノ又はジヘキソースの制限された添加が、報告された(Fischerらの)。他方では、*H. polymorpha*細胞内で発現された非相同-ガラクトンダーゼの過剰グリコシル化が観察された(Fellingnerら1991)。

【0011】

これまでのところ、疾病に対するワクチン接種は、疾病を制御するための最も費用効果が高く効率の良い方法であることが立証されてきた。しかしながら、有望な結果にもかかわらず、効果のあるHCVワクチンを開発する研究努力は、困難をきわめた。ワクチンの必須条件は、患者の体内での免疫応答の誘発である。従って、HCV抗原決定基を同定し、適切な環境の中で患者に投与しなければならない。抗原決定基は、線形及びコンホーメーションエピトープという少なくとも2つの形態に分けることができる。コンホーメーションエピトープは、グリコシル化のごとき同時翻訳及び翻訳後修飾を含めた三次元空間内の分子の折畳みの結果得られる。一般には、コンホーメーションエピトープは、未変性様のHCVエピトープに類似しかつ実際の線形アミノ酸配列よりも保存が良い可能性のあるエピトープを表わしていることから、これらのエピトープは最も効果のあるワクチンを実現するであろうと考えられている。従って、HCVエピトープタンパク質の偶発的グリコシル化度は、未変性様のHCV抗原決定基を生成するために最大の重要性をもつものである。しかしながら、ほんのわずかな量のビリオンしか結果としてもたらさないHCVを培養することには克服しがたい問題点が存在すると思われる。さらに、少量のタンパク質、過剰グリコシル化タンパク質又はグリコシル化されていないタンパク質のいずれかを結果としてもたらす組換え型タンパク質の発現及び精製に関する莫大な問題が存在する。

【0012】

HCVエンベロープタンパク質は、大腸菌(*Escherichia coli*)、昆虫細胞、酵母細胞の中で組換え型技術により産生されてきた。しかしながら、より高等な真核生物内での発現は、場合によってワクチンを生産するための大量の抗原の入手の問題をその特徴としてきた。*E. coli*のごとき原核生物における発現は、グリコシル化されていないHCVエンベロープタンパク質を結果としてもたらす。酵母におけるHCVエ

10

20

30

40

50

ンペローブタンパク質の発現は、過剰グリコシル化を結果としてもたらした。(特許文献1)の中でMaertensらによりすで実証されているように、*Saccharomyces cerevisiae*内でのHCVエンペローブタンパク質E2の発現は、高度にグリコシル化されたタンパク質を導く。この過剰グリコシル化は、タンパク質エpiteの遮へいを導く。Mustilliら(1999)は、*S. cerevisiae*内でのHCV E2の発現の結果コア-グリコシル化がもたらされるということを断言しているものの、細胞内発現された材料の結果は、その一部分が少なくとも過剰グリコシル化されていることを実証し、一方この材料の残りの部分の適正なプロセッシングは示されなかった。さらに、Mustilliら(1999)が観察した過剰グリコシル化は、グリコシル化抑制剤であるツニカマイシンの存在下でしか防止できず、従ってこれは、正常な、自然の増殖条件下で発生するグリコシル化を反映していない。細胞内供給源に由来するHCVエンペローブタンパク質に対するニーズは、充分受け入れられている(特許文献6のMaertensら、Heileら(2000))。このニーズは、Mustilliら(1999)の図5中で立証されているように哺乳動物細胞培養由来のE2タンパク質で免疫化されたチンパンジーの血清と分泌された酵母由来のE2の反応性が低いことによって例証されている。このことはさらに、酵母由来のHCVエンペローブタンパク質での免疫化が抗原投与に対する防御を提供できないことを示すRosaら(1996)によって立証されている。

10

【0013】

従って、同時に末端の1, 3-結合マンノースを欠いた未変性様のグリコシル化パターンをもつHCVエンペローブタンパク質の大規模で費用効果性の高い量のHCVエンペローブタンパク質を結果としてもたらす効率的な発現システムに対する必要性が存在している。特に、かかるシステムはHCVエンペローブタンパク質の製造に必要である。

20

【0014】

発明の概要

本発明の第1の態様は、少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含み、真核細胞の発現産物であること、さらにはN-グリコシル化部位の最高80%がコアグリコシル化されていることを特徴とする、単離されたHCVエンペローブタンパク質又はそのフラグメントに関する。特に、前記コアグリコシル化された部位の70%超がMan(8-10)-GlcNAc(2)により定義された構造をもつオリゴマンノースでグリコシル化されている。さらに、構造Man(8)-GlcNAc(2)オリゴマンノースに対する構造Man(7)-GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースの比は、0.45以下である。より詳細には、前記オリゴマンノースは10%未満の末端1, 3マンノースを含有する。前記単離された*S. cerevisiae*又はその一部分を発現する真核細胞は、*Hansenula*細胞のごとき酵母細胞でありうる。

30

【0015】

本発明のさらなる態様は、前記HCVエンペローブタンパク質又はそのフラグメントに結合された鳥類リゾチームリーダーペプチド又はその機能的変異体を含むタンパク質から誘導される、本発明による単離されたHCVエンペローブタンパク質又はその一部分に関する。より詳細に言うと、HCVエンペローブタンパク質又はその一部分は、

40

$$CL - [(A1)_a - (PS1)_b - (A2)_c] - HCVENV - [(A3)_d - (PS2)_e - (A4)_f]$$

という構造を特徴とするタンパク質から誘導され、式中

CLは、鳥類リゾチームリーダーペプチド又はその機能的等価物であり、
A1、A2、A3及びA4は、異なるもの又は同じものでありうるアダプタペプチドであり、

PS1及びPS2は、異なるもの又は同じものでありうるプロセッシング部位であり、
HCVENVは、HCVエンペローブタンパク質又はその一部分であり、
a、b、c、d、e及びfは0又は1であり、

ここで、A1及び/又はA2はPS1の一部であってもよく、かつ/又はA3及び/

50

又はA 4はP S 2の一部であってもよい。

【0016】

本発明のもう1つの態様は、単量体、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモオリゴマー及びヘテロオリゴマーからなるグループの中から選択された構造の中に含まれている、本発明によるH C Vエンベロープタンパク質又はそのフラグメントを網羅している。あるいはまた、本発明による前記単離されたH C Vエンベロープタンパク質又はそのフラグメントは、ウイルス様粒子内に含まれている。より詳細には、本発明によるH C Vエンベロープタンパク質又はそのフラグメントは、システインを含む可能性があり、そのうちシステインのチオール基は化学修飾されている。

【0017】

本発明の特定の態様は、抗原性又は免疫原性でありかつ/又はT細胞刺激エピトープを含む本発明によるH C Vエンベロープタンパク質又はそのフラグメントに関する。

【0018】

さらなる一態様は、本発明によるH C Vエンベロープタンパク質又はそのフラグメントを含む組成物に関する。前記組成物はさらに、薬学的に受容可能な担体を含むことができ、薬剤又はワクチンでありうる。

【0019】

本発明は同様に、本発明による単離されたH C Vエンベロープタンパク質又はそのフラグメントを産生するための方法にも関する。

【0020】

本発明のもう1つの態様は、抗-H C V抗体を含むことが疑われている試料中の抗-H C V抗体の存在を検出する方法であって、

(i) 前記H C Vエンベロープタンパク質又はその一部分と前記抗-H C V抗体の複合体化を可能にする条件下で前記試料と請求項1 ~ 15のいずれか1項に記載のH C Vエンベロープタンパク質又はその一部分を接触させる段階；

(i i) (i) で形成された複合体を検出する段階；及び

(i i i) 前記試料中の前記抗-H C V抗体の存在を(i i) から推論する段階、を含んで成る方法である。

【0021】

より詳細に言うと、前記方法は、前記接触が競合的条件で起こる段階(i)を含むことができる。特に、前記方法は、前記H C Vエンベロープタンパク質又はその一部分が結合させられている固体支持体を利用することができる。

【0022】

本発明はさらに、抗-H C V抗体を含むことが疑われている試料中の抗-H C V抗体の存在を検出するための診断用キットであって、本発明によるH C Vエンベロープタンパク質又はその一部分を含んで成るキットに関する。より詳細に言うと、前記キットは、前記H C Vエンベロープタンパク質又はその一部分が固体支持体に結合させられている、前記H C Vエンベロープタンパク質又はその一部分を含むことができる。

【0023】

本発明は同様に、本発明によるH C Vエンベロープタンパク質又はその一部分を含む薬剤又はワクチンにも関する。

【0024】

同様に、本発明によって網羅されているのは、哺乳動物体内でH C V - 特異的免疫応答を誘発するための医薬組成物であって、有効量の本発明によるH C Vエンベロープタンパク質又はその一部分及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る、医薬組成物である。前記医薬組成物は、あるいはまた、哺乳動物の体内でH C V - 特異的抗体を誘発するか又は哺乳動物の体内でT細胞機能を誘発する能力をもつことができる。さらに、前記医薬組成物は、予防用組成物又は治療用組成物でありうる。特に前記哺乳動物は人間である。

【0025】

10

20

30

40

50

発明の詳細な記載

本発明に導く研究作業においては、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*及び*Hansenula polymorpha*内のグリコシル化されたHCVエンベロープタンパク質の発現が、前記HCVエンベロープタンパク質に結合されたシグナルペプチド配列を含むタンパク質としての前記HCVエンベロープタンパク質の発現によって可能であるということが観察された。しかしながらこれら3つの酵母種の中で発現されたHCVエンベロープタンパク質のグリコシル化パターンは、非常に異なっていた(実施例6、10、13及び25参照)。より詳細には、*S. cerevisiae*(グリコシル化欠損突然変異体)及び*H. polymorpha*により発現されたHCVエンベロープタンパク質は、コアグリコシル化に類似した要領でグリコシル化された。*Pichia pastoris*内で発現されたHCVエンベロープタンパク質は、この酵母内で発現されたタンパク質が通常、過剰グリコシル化されないという以前の報告(Gellisenら、2000、Sugrueら、1997)にも関わらず、過剰グリコシル化されていた。

10

【0026】

S. cerevisiae(グリコシル化欠損菌株)*H. polymorpha*及びHCV組換え型ワクシニアウイルスに感染した哺乳動物細胞の中で産生されたHCVタンパク質のグリコシル化パターンをさらに分析した時点で、驚くべきことに、*Hansenula*で産生されたHCVエンベロープタンパク質が、これらのHCVエンベロープタンパク質の診断、予防及び治療上の応用のために非常に有利であるグリコシル化パターンを示すということが見出された。この予想外の発見事実は、以下で紹介するような本発明の異なる態様及び実施形態の中に反映されている。

20

【0027】

本発明の第1の態様は、少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含む単離HCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントに関し、該タンパク質又はそのフラグメントは、真核細胞内の発現産物であり、さらにはN-グリコシル化部位の50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、又は80%までがコアグリコシル化されていることを特徴とする。より詳細には、N-グリコシル化部位の60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、又は95%よりも多くが、Man(8~10)-GlcNAc(2)によって定義される構造をもつオリゴマンノースでグリコシル化されている。上述のN-グリコシル化特徴をより詳細に説明すると、構造Man(8)-GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位に対する構造Man(7)-GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位の比率は、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.44、0.45又は0.50以下である。上述のN-グリコシル化特徴をさらに詳細に説明すると、前記オリゴマンノースは、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%又は5%未満の末端1,3マンノースを含有する。

30

40

【0028】

「Man(8~10)-GlcNAc(2)により定義づけられた構造をもつオリゴマンノースでグリコシル化されたN-グリコシル化部位」というのは、前記N-グリコシル化部位が、Man(8)-GlcNAc(2)、Man(9)-GlcNAc(2)又はMan(16)-GlcNAc(2)のうちのいずれか1つでグリコシル化されていることを意味している。

【0029】

50

2つのタンパク質中の同じN-グリコシル化部位が異なるオリゴマンノースにより占有され得ないということが明らかとなるだろう。

【0030】

「タンパク質」という語は、アミノ酸の重合体を意味し、産物の特定の長さを意味するものではない。かくして、ペプチド、オリゴペプチド及びポリペプチドがタンパク質の定義内に含まれる。この語は同様に、例えばグリコシル化、アセチル化、ホスホリル化などのごとき、タンパク質の発現後修飾を意味することもまた除外することもない。この定義内に入るのは、アミノ酸の単数又は複数のアナログ（例えば、非天然アミノ酸、PNAなどを含む）を含有するポリペプチド、置換された結合、ならびに、天然に発生する及び天然に発生しない両方の当該技術分野において既知のその他の修飾を伴うポリペプチドである。

10

【0031】

本明細書で使用される「プレプロタンパク質」または「プレタンパク質」という語は、問題のタンパク質に結合されたプレプロ配列を含むタンパク質又はこの問題のタンパク質に結合されたプロ配列を含むタンパク質を含むタンパク質をそれぞれ意味する。「プレ配列」の代替として、「シグナル配列」、「シグナルペプチド」、「リーダーペプチド」又は「リーダー配列」のごとき語が使用されている。全ては、(N-)グリコシル化のための前提条件である粗面小胞体(ER)にプレタンパク質をターゲティングするアミノ酸配列を意味する。「シグナル配列」、「シグナルペプチド」、「リーダーペプチド」、又は「リーダー配列」は、シグナルペプチドと呼ばれる宿主特異的プロテアーゼによりこのERの管腔側において、問題のタンパク質に結合されたシグナル配列を含むタンパク質から開裂、すなわち「除去」される。同様にして、プレプロタンパク質は、ERの管腔に対するトランスロケーションの時点でプロタンパク質に変換される。「プロ」アミノ酸配列の内容に応じて、これを、プレプロタンパク質を発現する宿主細胞により除去することができたりできなかったりする。周知のプレプロアミノ酸配列は、S.cerevisiae交配因子の交配因子プレプロ配列である。

20

【0032】

「HCVエンベロープタンパク質」というのは、前記タンパク質を任意の遺伝子型のHCV菌株から誘導させることのできるHCV E1又はHCV E2エンベロープタンパク質又はその一部分を意味する。より詳細に言うと、HCV ENVは、配列番号85~98と少なくとも90%の相同性をもつアミノ酸配列である配列番号85~98からなるアミノ酸配列のグループ及びそのいずれかのフラグメントの中から選択される。「同一の」アミノ酸としては、上述の通りの保存されたアミノ酸の複数のグループ、すなわちMet、Ile、Leu及びValからなるグループ；Arg、Lys及びHisからなるグループ；Phe、Trp及びTyrからなるグループ；Asp及びGluからなるグループ；Asn及びGlnからなるグループ；Cys、Ser及びThrからなるグループ；及びAla及びGlyからなるグループが考慮される。

30

【0033】

より詳細には、「HCVエンベロープタンパク質」という語は、グリコシル化部位以外にE1又はE2領域のいずれかの少なくとも1つのHCVエピトープを定義づけるアミノ酸配列（及び又はアミノ酸アナログ）を含むポリペプチド又はそのアナログ（例えばミモトープ）に関係する。これらのエンベロープタンパク質は両方共組換え型発現されたエンベロープタンパク質の単量体、ヘテロ-オリゴマー又はホモオリゴマー形態であり得る。標準的には、エピトープを定義づける配列は、HCVのE1又はE2領域のいずれかのアミノ酸配列に対応する（同一の形で、あるいはエピトープを破壊しない未変性アミノ酸残基のアナログの置換を介して）。

40

【0034】

HCVエピトープはグリコシル化部位と同じ場所に位置してもよいということがわかるだろう。

【0035】

50

一般に、エピトープ定義づけ配列の長さはアミノ酸3～4個、より標準的には5、6又は7個、さらに標準的には8又は9個そしてさらに一層標準的には10個以上となる。コンホーメーションエピトープに関しては、エピトープ定義づけ配列の長さは、これらのエピトープが抗原の3次元形状により形成されている(例えば折畳み)と考えられていることから、幅広く変動を受ける可能性がある。かくして、エピトープを定義づけするアミノ酸は、比較的数が少ないが、折畳みを介して適正なエピトープコンホーメーションへともっていかれる状態で一定長の分子に沿って広く分布させられている可能性がある。エピトープを定義づけする残基と残基との間の抗原の部分は、エピトープのコンホーメーション構造にとってさほど重要でない可能性がある。例えば、これらの介在する配列の欠失又は置換は、エピトープでコンホーメーションにとってきわめて重要な配列が維持される(例えば、ジスルフィド結合に關与するシステイン、グリコシル化部位など)ことを条件として、コンホーメーションエピトープに影響を及ぼさないかもしれない。コンホーメーションエピトープは同様に、ホモ-オリゴマー又はヘテロ-オリゴマーのサブユニットの2つ以上の必須領域によって形成され得る。

【0036】

本明細書で使用されている指定されたポリペプチドのエピトープというのは、指定されたポリペプチド内のエピトープと同じアミノ酸配列をもつエピトープ及びその免疫学的等価物を意味する。かかる等価物は同様に、例えば現在知られている配列をもつ菌株、亜型(遺伝子型)又は型(群)特異的変異体又は遺伝子型1a、1b、1c、1d、1e、1f、2a、2b、2c、2d、2e、2f、2g、2h、2i、3a、3b、3c、3d、3e、3f、3g、4a、4b、4c、4d、4e、4f、4g、4h、4i、4j、4k、4l、5a、5b、6a、6b、6c、7a、7b、7c、8a、8b、9a、9b、10a、11(及びその亜型)、12(及びその亜型)、または13(及びその亜型)に属する菌株又はその他の新たに定義づけされたあらゆるHCV(亜)型を包含する。エピトープを構成するアミノ酸は、線形配列の一部である必要はなく、任意の数のアミノ酸が散在してコンホーメーションエピトープを形成していてもよい。

【0037】

本発明のHCV抗原は、HCVのE1及び/又はE2(エンベロープ)ドメイン由来のコンホーメーションエピトープを含む。ウイルスエンベロープタンパク質に対応すると考えられているE1ドメインは、現在、HCVポリプロテインのアミノ酸192-383にわたると推定されている(Hijkataら、1991)。(グリコシル化された)哺乳動物系内での発現時点で、それはSDS-PAGEを介して決定されるように、およそ35kDaの分子量をもつと考えられている。以前NS1と呼ばれていたE2タンパク質は、HCVポリプロテインのアミノ酸384-809又は384-746にわたるものであり(グラコヴィ(Grakovi)ら、1993)、又エンベロープタンパク質であるものと考えられている。(グリコシル化された)ワクシニア系における発現時点で、それは約72kDaの見かけのゲル分子量を有すると考えられている。これらのタンパク質の終点は近似であるものと了解される(例えば、E2のカルボキシ末端は、例えばアミノ酸730、735、740、742、744、745、好ましくは746、747、748、750、760、770、780、790、800、809、810、820で終わる730～820個のアミノ酸領域内のどこかにあり得る)。E2タンパク質は同様に、E1、及び/又はコア(aa1-191)及び/又はP7(aa747-809)、及び/又はNS2(aa810～1026)、及び/又はNS3(aa1027-1657)、及び/又はNS4A(aa1658-1711)及び/又はNS4B(aa1712-1972)及び/又はNS5A(aa1973-2420)、及び/又はNS5B(aa2421-3011)及び/又はE2と異なるいかなるこれらのHCVタンパク質の一部と共に発現され得る。同様にして、E1タンパク質は、E2及び/又はコア(aa1～191)、及び/又はP7(aa747～809)、及び/又はNS2(aa810～1026)、及び/又はNS3(aa1027～1657)、及び/又はNS4A(aa1658～1711)、及び/又はNS4B(aa1712～1972)、及び/又はNS5A

10

20

30

40

50

(a a 1 9 7 3 ~ 2 4 2 0)、及び/又は N S 5 B (a a 2 4 2 1 ~ 3 0 1 1) 及び/又は E 2 と異なるいかなるこれらの H C V タンパク質の一部と共にでも発現され得る。これらのその他の H C V タンパク質と合わせた発現は、適正なタンパク質折畳みを得るために重要であり得る。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する「 E 1 」という語には、天然の E 1 と免疫学的に交叉反応する末端切断形態及びアナログが包含され、遺伝子型 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 又は 13 又はその他の新しく同定されたあらゆる H C V 型又は亜型が含まれる。本明細書で使用する「 E 2 」という語には、天然の E 2 と免疫学的に交叉反応する末端切断形態及びアナログが包含され、遺伝子型 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 又は 13 又はその他の新しく同定されたあらゆる H C V 型又は亜型が含まれる。例えば、コドン 3 8 3 ~ 3 8 4 の間の多数のコドンの挿入ならびに、アミノ酸 3 8 4 ~ 3 8 7 の欠失が K a t o ら、(1 9 9 2) によって報告されてきた。かくして、本発明の実施例の部で使用された分離株は本発明の範囲を制限することを意図したものではないこととして H C V の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 又は 13 型又はその他のあらゆる新遺伝子型からのあらゆる H C V 分離株が本発明を實踐するための適切な E 1 及び/又は E 2 配列供給源であることも了解される。同様にして、上述のように、本発明の H C V エンベロープタンパク質と同時発現される H C V タンパク質は、あらゆる H C V 型から、ひいては本発明の H C V エンベロープタンパク質と同じ型からも誘導可能である。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する「 E 1 / E 2 」というの少なくとも 1 つの E 1 成分と少なくとも 1 つの E 2 成分を含有するエンベロープタンパク質のオリゴマー形態を意味する。

【 0 0 4 0 】

「特異的オリゴマーの」 E 1 及び/又は E 2 及び/又は E 1 / E 2 エンベロープタンパク質という語は、集合体でない組換え発現された E 1 及び/又は E 2 エンベロープタンパク質の考えられる全てのオリゴマー形態を意味する。 E 1 及び/又は E 2 特異的オリゴマーエンベロープタンパク質は同様に、ホモ - オリゴマー E 1 又は E 2 エンベロープタンパク質 (以下参照) と呼ばれる。「単一又は特異的オリゴマーの」 E 1 及び/又は E 2 及び/又は E 1 / E 2 エンベロープタンパク質という語は、単一の単量体 E 1 又は E 2 タンパク質 (厳密な意味での単一) ならびに特異的オリゴマー E 1 及び/又は E 2 及び/又は E 1 / E 2 組換え発現済みタンパク質を意味する。本発明によるこれらの単一又は特異的オリゴマーエンベロープタンパク質は、さらに、(E 1)_x (E 2)_y という式で定義づけできる。なお式中、 x と y が両方共 0 ではないことを条件として、 x は 0 ~ 1 0 0 の 1 つの数、 y は 0 ~ 1 0 0 の 1 つの数でありうる。 x = 1 及び y = 0 の場合、前記エンベロープタンパク質は、単量体 E 1 を包含する。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用する「ホモ - オリゴマー」という語は、複数の E 1 又は E 2 単量体を含む E 1 又は E 2 の複合体を意味し、例えば、 E 1 / E 1 二量体、 E 1 / E 1 / E 1 三量体又は E 1 / E 1 / E 1 / E 1 四量体及び E 2 / E 2 二量体、 E 2 / E 2 / E 2 三量体又は E 2 / E 2 / E 2 / E 2 四量体、 E 1 五量体及び六量体、 E 2 五量体及び六量体又は、 E 1 又は E 2 のあらゆる高次ホモ - オリゴマーが全て、この定義の範囲内の「ホモ - オリゴマー」である。オリゴマーは、例えば、共に当該出願人による、 M a e r t e n s らの W O 9 4 / 2 5 6 0 1 及び W O 9 6 / 1 3 5 9 0 の中で記載されたものを包含する C 型ウイルスの異なる型又は亜型から得られる E 1 又は E 2 の異なる単量体を 1、2 又は数個含有することができる。かかる混合オリゴマーは、本発明の範囲内でおもホモ - オリゴマーであり、 H C V のより一般的な診断を可能にし得る。

【 0 0 4 2 】

本発明において使用される E 1 及び E 2 抗原は、全長ウイルスタンパク質、実質的にはその全長バージョン、その機能的フラグメント (例えば、少なくとも 1 つのエピトープ及

10

20

30

40

50

びノ又はグリコシル化部位)であり得る。さらに、本発明のHCV抗原は同様に、問題のコンホーメーションエピトープの形成を遮断又は防止しないその他の配列をも包含することができる。コンホーメーションエピトープの有無は、抗体(コンホーメーションエピトープに対しモノクローナルの又はポリクローナルの血清)を用いて問題の抗原をスクリーニングしその反応性を線形エピトープのみを保持する抗原の変性済みバージョンの反応性と比較することによって容易に決定可能である。ポリクローナル抗体を用いた、かかるスクリーニングにおいては、まず第1に変性済み抗原でポリクローナル血清を吸着し、それが問題の抗原に対する抗体を保持するかどうかを見るのが有利であり得る。

【0043】

本発明のHCVタンパク質はグリコシル化されうる。グリコシル化されたタンパク質というのは、単数又は複数の炭水化物基特に糖基を含有するタンパク質を意味する。一般に全ての真核細胞はタンパク質をグリコシル化することができるHCV遺伝子型の異なるエンベロープタンパク質配列を整列させた後、適切な折畳み及び反応性のためにHCV E1タンパク質上の6個のグリコシル化部位の全てが必要とされるわけではないということ推論することができる。325の位置におけるグリコシル化部位は、N-グリコシル化により修飾されないことはさらに既知である(Fournillier-Jacobら、1996、Meunierら、1999)。さらに、HCV亜型1bE1タンパク質は6個のグリコシル化部位を含有するが、これらのグリコシル化部位の一部は、或る種の他の(亜)型には存在しない。型1b、6a、7、8及び9の中に存在する第4の炭水化物モチーフ(Asn250上)は、今日知られているその他全ての型において不在である。この糖付加モチーフは、突然変異を受けて、改善された反応性をもつ1bE1型タンパク質を生成することができる。同様に、2b型配列は、V5領域内に追加のグリコシル化部位を示す(Asn299上)。遺伝子型2Cに属する分離株S83には、その他全ての分離株上で存在するにもかかわらずV1領域内の第1の炭水化物モチーフさえ欠如している(Stuyverら、1994)。しかしながら、完全に保存された糖付加モチーフの間でさえ、炭水化物の存在は折畳みのために必要とされなかったものの、免疫監視機構の回避において1つの役割を果たす可能性がある。かくして、グリコシル化の役割の同定は、グリコシル化モチーフの突然変異誘発によって、さらにテストすることができる。グリコシル化モチーフの突然変異誘発(NXS又はNXT配列)は、N、S、又はTについてのコドンがNの場合にはNと異なるアミノ酸及びノ又はS及びTの場合にはS又はTと異なるアミノ酸をコードするような形で、これらのコドンを突然変異させることによって達成可能である。あるいはまた、NPS又はNPTが炭水化物で頻繁に修飾されないことがわかっていることから、X位置をPへ突然変異させることができる。折畳み及びノ又は反応性のためにどの炭水化物-付加モチーフが必要でどれが不要であるかを立証した後、かかる突然変異の組合せを行なうことができる。かかる実験は、参照により本明細書に一体化されるMaertensらによるWO96/04385の実施例8の中で広範に記載されてきた。

【0044】

本発明内で用いられるグリコシル化という語は、相反する規定のないかぎり、N-グリコシル化を意味する。

【0045】

特に、本発明は、コア-グリコシル化されたHCVエンベロープタンパク質又はその一部分に関する。この点において、「コア-グリコシル化」という語は、Hercovics及びOrlean(1993)の図3中のボックス構造に描かれている通りの構造に「類似した」構造を意味する。かくして、言及された炭水化物構造は10~11個の単糖を含有する。とりわけ、前記開示は参照により本明細書に一体化される。「類似の」という語は、構造に対し4個以下の付加的単糖しか付加されていないこと、又は構造から約3個以下の単糖しか除去されていないことを意味する。従って、本発明で言及されているコアグリコシル化炭水化物構造は、最小7個そして最大15個の単糖から成り、8、9、10、11、12、13又は14個の単糖から成り得る。含まれる単糖は好ましくは、グルコ

10

20

30

40

50

ース、マンノース又はN - アセチルグルコサミンである。

【0046】

本発明の一変形態様は、少なくとも一つのN - グリコシル化部位を含む単離HCVエンペロープタンパク質又はそのフラグメントを包含し、該タンパク質又はそのフラグメントは真核細胞内の発現産物であり、さらにはN - グリコシル化部位の60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、又は95%までが、Man(8~10) - GlcNAc(2)によって定義される構造をもつオリゴマンノースでグリコシル化されていることを特徴とする。上述のN - グリコシル化特徴をより詳細に説明すると、構造Man(8) - GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位に対する構造Man(7) - GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位の比率は、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.44、0.45又は0.50以下である。上述のN - グリコシル化特徴をさらに詳細に説明すると、前記オリゴマンノースは20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%又は5%未満の末端1,3マンノースを含有する。

10

【0047】

本発明のもう一つの変形態様は、少なくとも一つのN - グリコシル化部位を含み、真核細胞内の発現産物であるり、さらにはN - グリコシル化部位が構造Man(8) - GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースに対する構造Man(7) - GlcNAc(2)をもつオリゴマンノース比率が0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.44、0.45又は0.50以下であることを特徴とする、単離されたHCVエンペロープタンパク質又はそのフラグメントに関する。上述のN - グリコシル化特徴をさらに詳細に説明すると、前記オリゴマンノースは、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%又は5%未満の末端1,3マンノースを含有する。

20

【0048】

本発明のもう一つの変形態様では、少なくとも一つのN - グリコシル化部位を含み、非哺乳動物真核細胞内の発現産物であり、さらには、N - グリコシル化部位の数が、ワクシニアウイルスに感染しやすい真核細胞内でワクシニアウイルスから発現された同じタンパク質又はそのフラグメント内のN - グリコシル化部位の数よりも少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%又は15%少ないことを特徴とする単離されたHCVエンペロープタンパク質又はそのフラグメントが網羅されている。上述のN - グリコシル化特徴にさらに詳細に言うと、前記N - グリコシル化部位の50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%又は80%までがコアグリコシル化されている。より詳細には、N - グリコシル化部位の60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、又は95%よりも多くが、Man(8~10) - GlcNAc(2)によって定義される構造をもつオリゴマンノースでグリコシル化されている。上述のN - グリコシル化特徴のいずれかにより詳細に言うと、構造Man(8) - GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位に対する構造Man(7) - GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位の比率は、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.44、0.45又は0.50以下である。上述のN - グリコシル化特徴のいずれかにさらに詳

30

40

50

細に言うと、前期オリゴマンノースは、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、又は5%未満の末端1,3マンノースを含有する。

【0049】

発明のもう1つの態様においては、発明に従った単離されたHCVエンベロープタンパク質又はその一部分は、酵母細胞内の発現産物である。より詳細には、本発明による単離されたHCVエンベロープタンパク質又はその一部分は、*Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces kluyveri*又は*Saccharomyces uvarum*のごとき*Saccharomyces*菌株、*Schizosaccharomyces pombe*のごとき*Schizosaccharomyces*、*Kluyveromyces laetis*のごとき*Kluyveromyces*、*Yarrowia lipolytica*のごとき*Yarrowia*、*Hansenula polymorpha*のごとき*Hansenula*、*Pichia pastoris*のごとき*Pichia*、*Aspergillus*菌株、*Neurospora crassa*のごとき*Neurospora*、又は*Schwanniomyces occidentalis*のごとき*Schwanniomyces*菌株の細胞又はそのいずれかから誘導された突然変異体細胞の中の発現産物である。より詳細には、本発明による単離されたHCVエンベロープタンパク質又はその一部分は*Hansenula*細胞内の発現産物である。より一層詳細には、本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はその一部分は、ツニカマイシンのごときグリコシル化阻害物質の不在下での例えば*Hansenula*のごとき酵母細胞内の発現産物である。

【0050】

本発明のもう1つの態様では、本発明による単離されたHCVエンベロープタンパク質又はその一部分は、前記HCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントに結合された鳥類リゾチームリーダーペプチド又はその機能的変異体を含むタンパク質から誘導される。より詳細に言うと、本発明による単離されたHCVエンベロープタンパク質又はその一部分は、

$$CL - [(A1)_a - (PS1)_b - (A2)_c] - HCVENV - [(A3)_d - (PS2)_e - (A4)_f]$$

という構造を特徴とするタンパク質から誘導され、式中：

CLは、鳥類リゾチームリーダーペプチド又はその機能的等価物であり、

A1、A2、A3及びA4は、異なるもの又は同じものでありうるアダプタペプチドであり、

PS1及びPS2は、異なるもの又は同じものでありうるプロセッシング部位であり、

HCVENVは、HCVエンベロープタンパク質又はその一部分であり、

a、b、c、d、e及びfは0又は1であり、

ここで、A1及び/又はA2はPS1の一部分であってもよく、かつ/又はA3及び/又はA4はPS2の一部分であってもよい。

【0051】

「HCVエンベロープタンパク質又はその一部分に結合された鳥類リゾチームリーダーペプチド又はその機能的等価物」という語は、前記リーダーペプチドのC末端アミノ酸が前記HCVエンベロープタンパク質又はその一部分のN末端アミノ酸にペプチド結合を介して共有結合的に結合されていることを意味する。あるいはまた、前記リーダーペプチドのC末端アミノ酸は、ペプチド又はタンパク質により、前記HCVエンベロープタンパク質又はその一部分のN末端アミノ酸から分離される。前記ペプチド又はタンパク質は、上述のように $-(A1)_a - (PS1)_b - (A2)_c$ という構造をもつ可能性がある。

【0052】

HCVエンベロープタンパク質又はその一部分に結合された鳥類リゾチームリーダーペプチド又はその機能的等価物を含むタンパク質からの問題のHCVエンベロープタンパク

質の又は、構造 C L - [(A 1)_a - (P S 1)_b - (A S)_c] - H C V E N V - [(A 3)_d - (P S 2)_e - (A 4)_f] によって特徴づけされるタンパク質の誘導は、内部でタンパク質が発現される細胞のタンパク質分解メカニズムによって *in vivo* で行なうことができる。より詳細には、鳥類リゾチームリーダーペプチドの除去から成る段階は、好ましくはプレタンパク質が内部で発現される細胞のタンパク質分解メカニズムによって *in vivo* で行なわれる。しかしながら、プレタンパク質を発現する細胞及び/又はプレタンパク質を発現する細胞が中で増殖させられる培養液からプレタンパク質及び/又はタンパク質を単離及び/又は精製した後及び/又はその間だけ、誘導を実施することもできる。あるいはまた、前記 *in vivo* 誘導は、前記 *in vitro* 誘導と組合せて実施される。組換えにより発現されたプレタンパク質からの問題の H C V タンパク質の誘導は、さらに、問題のタンパク質と同時に存在する汚染性タンパク質の全て又は大部分が分解され、問題のタンパク質が研磨性タンパク質分解酵素（複数も可）に対する耐性をもつ研磨段階における単数又は複数のタンパク質分解酵素の使用を含む可能性がある。誘導及び研磨は、互いに排他的プロセスではなく、同じ単一のタンパク質分解酵素を用いることによって得ることができる。一例として、ここでは、L y s 残基が欠けている H C V 遺伝子型 1 b の H C V E 1 タンパク質（配列番号 2）が示されている。エンドプロテイナーゼ L y s - C (e n d o - l y s C) で前記 E 1 タンパク質を含有するタンパク質抽出物を消化することにより、E 1 タンパク質は分解されなくなり、一方単数又は複数の L y s 残基を含有する汚染性タンパク質が分解される。かかるプロセスは、H C V E 1 タンパク質の単離及び/又は精製を大幅に単純化又は増強する可能性がある。さらに、プレタンパク質内で例えばリーダーペプチドと H C V E 1 タンパク質の間に付加的な L y s 残基を包含させることにより、H C V E 1 プレタンパク質からリーダーペプチドの適正な *in vitro* 分離というさらなる有利な可能性が得られる。その他の H C V E 1 タンパク質は、位置 4、40、42、44、61、65 又は 179 のいずれか単数又は複数の位置において（なおここで位置 1 は E 1 タンパク質の最初の N 末端天然アミノ酸、すなわち H C V ポリタンパク質内の位置 192 である）L y s 残基を含むことができる。上述のように、e n d o - l y s C の使用を可能にするため、前記 L y s 残基をもう 1 つのアミノ酸残基、好ましくは A r g 残基内に突然変異させることができる。

【 0 0 5 3 】

「適正に除去された」リーダーペプチドという語は、問題のタンパク質に結合されたシグナル配列を含むタンパク質から前記リーダーペプチドが、高効率で除去された（すなわち多数のプレ（プロ）タンパク質がプロタンパク質に又はタンパク質に転換される）かつ高い忠実度で除去される（すなわち、プレアミノ酸配列のみが除去され前記プレアミノ酸配列に結合された問題のタンパク質のいかなるアミノ酸も除去されない）ことを意味する。「高効率でのリーダーペプチドの除去」というのは、プレタンパク質の少なくとも約 40%、ただしより好ましくは約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% さらにはまた 99% が、プレ配列が除去されているタンパク質へと転換させられるということの意味している。あるいはまた、発現されたプレタンパク質の実質的部分が、プレ配列が除去されているタンパク質へと転換されない場合、これらのプレタンパク質はなおも精製され得る。

【 0 0 5 4 】

「鳥類リゾチーム（C L）リーダーペプチドの機能的等価物」というのは、単数又は複数のアミノ酸がもう 1 つのアミノ酸と置換されており、そのためにこの置換が保存的アミノ酸置換であるような C L リーダーペプチドを意味する。「保存的アミノ酸置換」というのは、同じ保存されたアミノ酸グループに属するもう 1 つのアミノ酸で、1 つの保存されたアミノ酸グループに属する 1 つのアミノ酸を置換することを意味している。保存されたアミノ酸のグループとしては、M e t、I l e、L e u 及び V a l からなるグループ；A r g、L y s 及び H i s からなるグループ；P h e、T r p 及び T y r からなるグループ；A s n 及び G l n からなるグループ；C y s、S e r 及び T h r からなるグループ；及び A l a 及び G l y からなるグループが考慮される。C L リーダーペプチド内の保存的ア

10

20

30

40

50

ミノ酸置換の例としては、位置6における自然変異がありこの位置にあるアミノ酸はVal又はIleである；もう1つの変動は位置17で起こり、この位置におけるアミノ酸は、なかんずく、Leu又はPro（配列番号1参照）である。かくして結果として得られるCLリーダーペプチドは、機能的等価物とみなされるべきである。CLリーダーペプチドのその他の機能的等価物としては欠失変異体及び挿入変異体を含め、本発明全体を通して記載されている通りのCLリーダーペプチドと同じ技術的態様を再現するようなリーダーペプチドが含まれる。

【0055】

「A」又は「アダプタペプチド」というのは、例えばリーダーペプチドとプロセッシング部位（PS）、リーダーペプチドと問題のタンパク質、PSと問題のタンパク質及び/又は、問題のタンパク質とPSの間のリンカーとして役立つことができかつ/又は、例えばリーダーペプチド、PS又は問題のタンパク質のリンカーN-又はC-末端として役立つことができるペプチド（例えば1~30個のアミノ酸）又はタンパク質を意味する。アダプタペプチド「A」は、例えば、-らせん又は-シート構造又はその組合せのごとき或る種の3次元構造を有することができる。あるいはまた、Aの3次元構造は、明確でなく例えば高次コイル構造である。アダプタAは、例えばプレ配列、プロ配列、問題の配列のタンパク質又はプロセッシング部位の一部であり得る。アダプタAは、Aが一部を成すタンパク質の検出及び/又は精製及び/又はプロセッシングを可能にするか又は増強するタグとして役立つことができる。Aペプチドの一例としては、nが通常6であるが7、8、9、10、11又は12であり得るhis-tagペプチド（HHHHHH：配列番号63）H_nである。A-ペプチドのその他の例としては、問題のタンパク質のN末端に存在するとき、発酵収量を増大させるだけでなくジペプチジルアミノペプチターゼによるプロセッシングに対し問題のタンパク質のN末端を保護し、かくしてポリペプチドの均質なN末端を結果としてもたらすものとして報告されているペプチドEEGEPK（Kjeldsenら；WO98/28429中；配列番号64）又はEEAEPK（Kjeldsenら；WO97/22706中；配列番号65）が包含される。同時に、問題のタンパク質のin vitro成熟、すなわち前記ペプチドEEGEPK（配列番号64）及びEEAEPK（配列番号65）の問題のタンパク質からの除去は、例えば前記ペプチド内でLys残基のC末端を開裂するendo-lyscを用いることにより達成できる。かくして前記ペプチドは、アダプタペプチド（A）ならびにプロセッシング部位（PS）の機能を果たす（以下参照）。アダプタペプチドは、配列番号63-65、70-72及び74-82の中で与えられている。アダプタペプチドのもう一つの例は、G4S免疫サイレントリンカーである。アダプタペプチド又はアダプタタンパク質のその他の例は、Stevensの表2に列挙されている（Stenensら、2000）。

【0056】

「PS」又は「プロセッシング部位」というのは、特異的タンパク質のプロセッシング中の又はプロセッシング可能な部位を意味する。特異的酵素プロセッシングを受けやすいプロセッシング部位の例としては、IEGRX（配列番号66）、IDGRX（配列番号67）、AEGRX（配列番号68）があり、これらは全て、ウシ因子Xaproteアーゼにより「」で表わされたArg及びXaa（任意のアミノ酸）残基により認識され、これらの中で開裂される（Nagai, K.及びThogersen, H, C. 1984）。PS部位のもう一つの例は、例えば酵母Kex2プロテアーゼによる開裂可能なArg-Arg、Lys-Lys、Arg-Lys又はLys-Argのごとき二塩基部位である（Julius, D.ら、1984）。PS部位は同様に、一塩基Lys部位でありうる。前記一塩基Lys-PS-部位は、AペプチドのC末端に包含されてもよい。C末端一塩基Lys-PS部位を含むAアダプタペプチドの例は、配列番号64-65及び74-76によって示されている。His-タグ（HHHHHH、配列番号63）のエキソタンパク質開裂除去は、ジペプチジルアミノペプチターゼI（DAPase）を単独で又はグルタミンシクロトランスフェラーゼ（Qcycase）及びピログルタミンアミノペプチターゼ（pGAPase）と組合せた形で使用することによって可能である（

10

20

30

40

50

Pedersen, J.ら、1999)。(固定化金属アフィニティクロマトグラフィ、IMACにより反応混合物からペプチダーゼを除去できるようにする)組換え型His-タグを含む前記エキソペプチダーゼは、例えばUnizyme Laboratorie s (Horsholm, DK)のTAGZyme系として市販されている。「プロセッシング」という語は、前記プロセッシング部位がそのタンパク質内に存在する場合、少なくとも1つのプロセッシング部位で脱タンパク質が特異的に開裂されるか又は開裂可能であるようにするあらゆる方法又は手順を一般に意味している。PSは、エンド型プロテアーゼ開裂を受けやすい場合もあれば、エキソ型プロテアーゼ開裂を受けやすい可能性もあるが、いずれにせよ、脱開裂は特異的である。すなわちタンパク質分解酵素をプロセッシングすることにより認識された部位以外の部位まで拡大しない。一定数のPS部位が配列番号66-68及び83-84内に与えられている。

10

【0057】

以上で概略的に記した $[(A1/3)_{a/d} - (PS1/2)_{b/e} - (A2/4)_{c/f}]$ 構造の汎用性は、いくつかの例を用いて実証される。第1の例では、前記構造は、プレタンパク質内に含まれた問題のタンパク質のC末端に存在しており、ここでA3は、因子Xa「IEGRX」PS部位(配列番号66)と重ね合わさっている「VIEGR」ペプチド(配列番号69)であり、 $X = A4$ はヒスチジン-タグ(配列番号63)(かくしてd、e及びfはこの場合全て1である)。問題のHCVタンパク質は、(任意には)IMACにより精製され得る。Xa因子でプロセッシングした後、(場合によって精製された)問題のHCVタンパク質はそのC末端に、「IEGR」であるプロセッシングされたPS部位(配列番号70)を担持することになる。プロセッシングされたXa因子の別のプロセッシング部位は、IDGR(配列番号71)又はAEGR(配列番号72)でありうる。さらなる例では、 $[(A1/3)_{a/d} - (PS1/2)_{b/e} - (A2/4)_{c/f}]$ 構造は、問題のHCVタンパク質のN末端に存在している。さらに、A1はヒスチジン-タグ(配列番号63)であり、PSは、Xa因子認識部位(配列番号66-68のいずれか)であり、ここでXは問題のタンパク質で、 $a = b = 1$ 、 $c = 0$ である。例えば宿主細胞によるリーダーペプチドの適正な除去の時点で、結果として得られた問題のHCVタンパク質をIMACにより精製することができる(任意)。Xa因子でのプロセッシングの後、問題のタンパク質には $[(A1)_a - (PS1)_b - (A2)_c]$ 構造が欠如している。

20

30

【0058】

A1、A2、A3、A4、PS1及びPS2のいずれかが存在する場合、それは反復構造で存在するということが明らかとなるだろう。このような反復構造は、それが存在する場合、この状況下ではなお1として計数される。すなわちa、b、c、d、e又はfは、例えばA1が例えば2つの反復(A1-A1)として存在している場合であっても1である。

【0059】

本発明のさらにもう一つの態様は、システインのチオール基が化学的に修飾されている本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントのいずれかに関する。

【0060】

本発明のさらにもう一つの態様は、抗原性である本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントのいずれかに関する。

40

【0061】

本発明のさらにもう一つの態様は、免疫原性である本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントのいずれかに関する。

【0062】

本発明のさらにもう一つの態様は、T細胞エпитープを含んで成る本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントのいずれかに関する。

【0063】

本発明のもう一つの態様は、単量体、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ホモオリゴマー

50

及びヘテロオリゴマーからなるグループの中から選択された構造の中に含まれている、本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントのいずれかに関する。

【0064】

本発明のさらにもう1つの態様は、ウイルス様粒子内に含まれている本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントのいずれかに関する。

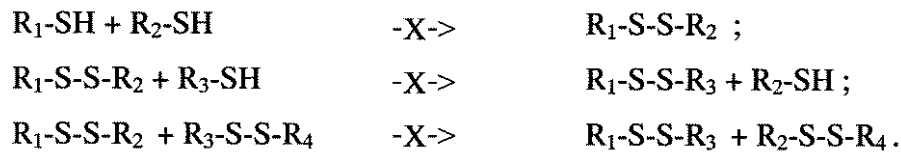
【0065】

少なくとも1つのシステイン残基、ただし好ましくは2つ以上のシステイン残基を含む、本明細書に記載されている通りのHCVエンベロープタンパク質又はその一部において、システインのチオール基は化学的又は酵素的手段によって不可逆的に保護されうる。特に、化学的手段による「不可逆的保護」又は「不可逆的遮断」は、アルキル化、好ましくは例えば活性ハロゲン、エチレンイミン又はN-(ヨードエチル)トリフルオロアセタミドのごときアルキル化剤を用いたHCVエンベロープタンパク質のアルキル化を意味する。この点において、システインのチオール基のアルキル化が、 $(CH_2)_nR$ (なお式中nは0、1、2、3又は4であり、RはH、COOH、NH₂、CONH₂、フェニル又はそれらのあらゆる誘導体である)によるチオールの水素の置換を意味していると了解すべきである。アルキル化は、例えば、XをI、Br、Cl又はFのごときハロゲンとして活性ハロゲン $X(CH_2)_nR$ のごとき当該技術分野で既知のあらゆる方法によって実施可能である。活性ハロゲンの例としては、ヨウ化メチル、ヨード酢酸、ヨードアセタミド、及び2-ブロモエチルアミンがある。アルキル化のその他の方法としては、NEM(N-エチルマレイミド)又はピオチン-NEM、その混合物又は、両方共 $-CH_2-CH_2-NH_2$ による-Hの置換を結果としてもたらすエチレンイミン又はN-(ヨードエチル)トリフルオロアセタミドの使用が含まれる(Hermanson, G. T. 1996)。本明細書で使用されるような「アルキル化剤」という語は、本明細書に記載されているようなアルキル化を実施することのできる化合物を意味する。かかるアルキル化は最終的に、その他のアミノ酸を模倣できる修飾されたシステインを結果としてもたらす。エチレンイミンによるアルキル化は、結果として、リジンに似た構造をもたらす、そのため、トリプシンのための新しい開裂部位が導入されることになる(Hermanson, G. T. 1996)。同様に、ヨウ化メチルの利用は、結果としてメチオンに似たアミノ酸をもたらす、一方ヨードアセテート及びヨードアセタミドの利用は、結果として、それぞれグルタミン酸及びグルタミンに似たアミノ酸をもたらす。同様に、これらのアミノ酸は好ましくは、システインの直接的突然変異において用いられる。従って、本発明は、本明細書に記載されているようなHCVエンベロープタンパク質の少なくとも1つのシステイン残基が天然アミノ酸、好ましくはメチオニン、グルタミン酸、グルタミン又はリジンに突然変異させられる、本明細書に記載するとおりのHCVエンベロープタンパク質に関係する。「突然変異させられる」という語は、これらのアミノ酸をコードする核酸の部位特異的突然変異誘発、すなわち例えばPCRを用いた部位特異的突然変異誘発又は(Sambrook, Jら、1989)に記載されているようなオリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発を介したものなどの、当該技術分野において周知の方法を意味する。本発明の実施例の部については、相反する規定のないかぎり、アルキル化はアルキル化剤としてのヨードアセタミドの使用を意味するものと理解すべきである。

【0066】

さらに、本発明のHCVタンパク質又はその一部分のシステインのチオール基は可逆的に保護できるということが了解される。可逆的な保護の目的は、HCVタンパク質又はその一部を安定化させることにある。特に、可逆的な保護の後、硫黄含有官能基(例えばチオール及びジスルフィド)は、非反応性条件下で保持される。硫黄含有官能基はかくしてその他の化合物と反応できず、例えば、以下のようなジスルフィド結合を形成又は交換する傾向は全くもたない。

【化1】



【0067】

チオール及びノ又はジスルフィド残基間の記載された反応は、分子間プロセスに限らず、同様に分子内でも起こり得る。

10

【0068】

本明細書で使用される「可逆的に保護する」又は「可逆的にブロックする」という語は、システインのチオール基に対して修飾作用物質を共有結合させることならびに、システインのチオール基の酸化還元状態が精製手順のその後の工程全体にわたり影響されない状態にとどまるような形でHCVタンパク質の環境を操作すること（遮へい）を意図している。

【0069】

システインのチオール基の可逆的保護は、化学的又は酵素的に実施可能である。

【0070】

本明細書で使用する「酵素的手段による可逆的保護」は、例えばパルミトイルアシルトランスフェラーゼのごときチオ - エステル化の触媒として作用することに関与するアシルトランスフェラーゼなどのアシル - トランスフェラーゼのごとき酵素により媒介される可逆的保護を意図している（以下を参照のこと）。

20

【0071】

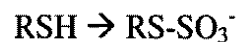
本明細書で使用する「化学的手段による可逆的保護」は、次のものによる可逆的保護を意図している：

1. 例えばスルホン化及びチオエステル化によるようなシステニルを可逆的に修飾する修飾剤による：

スルホン化は、ジスルフィド架橋に関与するチオール又はシステインがS - スルホネートに修飾される反応である：

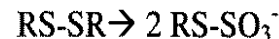
30

【化2】



(Darbre, A. 1986) 又は

【化3】



$RSH \rightarrow RS-SO_3^-$ (Darbre, A. 1986) 又は $RS-SR \rightarrow 2 RS-SO_3^-$ (亜硫酸分解: Kumar, N.ら, 1986)。スルホン化のための試薬は、例えば Na_2SO_3 又はテトラチオン酸ナトリウムである。後者のスルホン化試薬は、10 ~ 200 mM、より好ましくは50 ~ 200 mMの濃度で使用される。任意にはスルホン化は、例えば Cu^{2+} (100 μ M ~ 1 mM) 又はシステイン (1 ~ 10 mM) のごとき触媒の存在下で実施可能である。

40

反応は、タンパク質変性ならびに未変性条件下で実施可能である (Kumar, N.ら, 1985; Kumar, N.ら, 1986)

チオエステル結合形成又はチオエステル化は、以下の式によって特徴づけされる：

【化4】



50

なお式中、Xは好ましくは化合物R'CO-X内のハロゲンである。

2. 例えば重金属、特に Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、モノ-、ジチオ及びジスルフィド-化合物(例えばアリル-及びアルキルメタンチオスルホネート、ジチオピリジン、ジチオモルフォリン、ジヒドロリポアミン、エルマン試薬、アルドロチオール^{T M}(アルドリッチ(Aldrich))(Rein, A.ら、1996)、ジチオカルバメート)、又はチオール化剤(例えばグルタチオン、N-アセチルシステイン、システインアミン)などにより本発明のシステイニルを可逆的に修飾する修飾用作用物質による。ジチオカルバメートは、スルフヒドリル基と反応する能力を付与する R_1 、 R_2 NC(S)SR₃官能基を有する広範なクラスの分子を含んで成る。などにより本発明のシステイニルを可逆的に修飾する修飾用作用物質による。チオール含有化合物が、好ましくは0.1~50mM、より好ましくは1~50mM、さらに一層好ましくは10~50mMの濃度で使用される。

10

3. 10 μ M~10mM、より好ましくは1~10mMの濃度範囲内の例えばDTT、ジヒドロアスコルベート、ビタミンS及び誘導体、マンニトール、アミノ酸、ペプチド及び誘導体(例えばヒスチジン、エルゴチオネイン、カルノシン、メチオニン)、没食子酸塩、ヒドロキシアニソール、ヒドロキシトルエン、ハイドロキノン、ヒドロキシメチルフェノール及びその誘導体のごとき、チオール状態を保存する(安定化させる)修飾用作用物質、特に酸化防止剤の存在による。

4. 例えば(i)金属イオン(Zn^{2+} 、 Mg^{2+})、ATPのごとき補因子、(ii)pH制御(例えば、タンパク質については大部分のケースにおいてpH~5又はpHは好ましくはチオールpK_a-2;例えば逆相クロマトグラフィにより精製されたペプチドについてはpH~2)のごときチオール安定化条件による。

20

【0072】

(1)、(2)、(3)、及び(4)で記載した通りの可逆的保護の組合せは、同じように純粋かつ再度折畳みされたHCVタンパク質を結果としてもたらす可能性がある。実際には、組合せ化合物、例えばZ103(Znカルノシン)を、好ましくは1~10mMの濃度で使用することができる。可逆的保護は又、上述の修飾基又は遮へい以外に、ペプチドバックボーンを分断することなく酵素的又は化学的に逆転させることのできるあらゆるシステイニル保護方法をも意味する。この点において、本発明は、特に、例えばチオエステル結合がチオエステラーゼ、塩基性緩衝液条件(Beekman, N. J.ら、1997)又はヒドロキシシルアミン処理(Vingerhoads, M. H.ら、1996)によって開裂される、従来の化学合成(以上参照)によって調製されるペプチドを特に基準としている。

30

【0073】

チオール含有HCVタンパク質は、例えば、(1)ジスルフィド結合を含む開裂可能なコネクタアーム(例えば固定化された5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(Jayabaskaran, C.ら、1987)及び活性化されたチオール-セファロース4B(Pharmacia)上の電子対共有クロマトグラフィ)又は(2)固定化されたリガンドとしてのアミノヘキサノイル-4-アミノフェニルアルシンを含有するアフィニティクロマトグラフィ樹脂上で精製可能である。後者のアフィニティマトリックスは、酸化還元調節を受けるタンパク質及び酸化的ストレスについての標的であるジチオールタンパク質のために使用されてきた(Kalef, E.ら、1993)。

40

【0074】

ペプチドの可溶性及び抽出を増大させるために、可逆的保護を使用することもできる(Pomroy, N. C. & Deber, C. M. 1998)。

【0075】

可逆的保護及びチオール安定化化合物は、単量体、重合体又はリボソームの形態で提示できる。

【0076】

システイン残基の可逆的保護状態の除去は、例えば以下のことによって、化学的又は酵素的に達成可能である:

50

- 特に1~200mM、より好ましくは50~200mMの濃度での還元剤、特にDTT、DTE、 γ -メルカプトエタノール、ジチオナイト、 SnCl_2 、水素化ホウ酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン、TCEP；
- 例えばpH増大によるチオール安定化条件又は作用物質の除去；
- 特に0.01~5 μM 、より一層詳細には0.1~5 μM の濃度範囲内の、特にチオエステラーゼ、グルタレドキシソ、チオレドキシソのごとき酵素；
- 上述の化学的及び/又は酵素条件の組合せ。

【0077】

システイン残基の可逆的保護状態の除去は、例えば細胞内又は個体内のごとき*in vivo*又は*in vitro*で実施できる。

10

【0078】

精製手順内では、システイン残基は不可逆的に遮断されてもされなくてもよく、又、以上で挙げたようなあらゆる可逆的修飾用作用物質により置換されてもされなくてもよいということがわかるだろう。

【0079】

本発明による還元剤は、システイン残基中の硫黄例えば「S-S」ジスルフィド架橋の還元、システイン残基の脱スルホン化($\text{RS-SO}_3^- \rightarrow \text{RSH}$)を達成するあらゆる作用物質である。酸化防止剤は、チオール状態を保存するか又は「S-S」形成及び/又は交換を保存するあらゆる試薬である。「S-S」ジスルフィド架橋の還元は、ジスルフィドをチオール(-SH)に還元させる化学反応である。MaertensらによるWO96/04385中に開示されているジスルフィド架橋破壊用作用物質及び方法は、ここで参照により本明細書中に一体化される。「S-S」還元は、(1)酵素カスケード経路によってか又は(2)還元化合物によって得ることができる。チオレドキシソ、グルタレドキシソのごとき酵素が、ジスルフィドの*in vivo*還元に関与するものとして知られており、*in vitro*で「S-S」架橋を還元する上で有効であることも示されてきた。ジスルフィド結合は、DTTでの反応について一定である対応する速度よりも 10^4 倍前後大きい見かけの二次速度で、pH7.0で還元済みチオレドキシソにより急速に開裂される。還元反応速度は、1mMのDTT又はジヒドロリポアミドと共にタンパク質溶液を予めインキュベートすることにより劇的に増大させることができる(Holmgren, A. 1979)。

20

30

【0080】

タンパク質ジスルフィド架橋を還元することのできるチオール化合物は、例えばジチオトレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、 γ -メルカプトエタノール、チオカルバメート、ビス(2-メルカプトエチル)スルホン及びN,N'-ビス(メルカプトアセチル)ヒドラジン及び亜ジチオン酸ナトリウムである。HCVタンパク質の還元のためには、モノクローナル抗体内のジスルフィド架橋の還元において非常に有用であることが示された(Thakur, M.L.ら、1991)、アスコルビン酸塩又は塩化第1スズ(SnCl_2)のごときチオール基無しの還元剤も使用することができる。さらにpH値の変化はHCVタンパク質の酸化還元状態に影響を及ぼし得る。水素化ホウ素ナトリウム処理が、ペプチド内のジスルフィド架橋の還元のために有効であることが示されてきた(Gailit, 1993)。トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)は、低いpHでジスルフィドを還元できる(Burns J.ら、1991)。還元剤としてDTT又は水素化ホウ素ナトリウムが用いられる場合、セレノールがジスルフィドからチオールへの還元の前駆体として作用する。市販のジセレニドであるセレノシステアミンが、触媒の前駆体として使用された(Singh及びKats, 1995)。

40

【0081】

「免疫原性」という語は、免疫応答を生成する1つのタンパク質又は物質の能力を意味する。免疫応答は、抗体形成、細胞性免疫、過敏症、又は免疫学的寛容を含む抗原の導入に対する身体の全応答である、細胞性免疫とは、T-ヘルパー細胞及び/又はCTL-応答を意味する。

50

【 0 0 8 2 】

「抗原性」という語は、1つのタンパク質又は物質が抗体の形成をひき起こす又は細胞応答を惹起する能力を意味する。

【 0 0 8 3 】

本発明による「T細胞刺激エピトープ」という表現は、それぞれT細胞又はCTL細胞を刺激する能力をもつエピトープを意味する。Tヘルパー細胞刺激エピトープは、そのアミノ酸配列内に(推定上の)T細胞刺激エピトープを含有するポリペプチドに向かったのリンパ増殖性応答を監視することによって選択可能である。前記リンパ増殖性応答は、T細胞刺激活性についてテストすべきペプチドの濃度が変動する状態で患者の血清からの末梢血単核細胞(PMBC)を*in vitro*刺激し放射線標識づけされたチミジン摂取量を計数することを含むTヘルパー検定によって測定することができる。CTL刺激エピトープは、⁵¹Cr放出を用いて細胞毒性細胞の分解活性を測定する細胞毒性T細胞(CTL)検定を用いて選択可能である。増殖は、刺激指数(抗原刺激された培養の平均cpm/対照培養の平均cpm)が1より大きい、好ましくは2より大きい、最も好ましくは3より大きい場合に、陽性とみなされる。

10

【 0 0 8 4 】

本発明のもう1つの態様は、本発明による単離されたHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントを含む組成物に関する。前記組成物はさらに、薬学的に受容可能な抗体を含むことができ、薬剤又はワクチンであり得る。

【 0 0 8 5 】

本発明のさらなる態様は、本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はその一部分を含む薬剤又はワクチンを網羅する。

20

【 0 0 8 6 】

本発明のさらにもう1つの態様は、哺乳動物体内でHCV-特異的免疫応答を誘発するための医薬組成物において有効量の本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はその一部分及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る医薬組成物を含む。本発明による有効量のHCVエンベロープタンパク質又はその一部分を含む前記医薬組成物は同様に、哺乳動物の体内でHCV-特異的抗体を誘発する能力又は哺乳動物の体内でT細胞機能を誘発する能力を有することもできる。本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はその一部分を有効量含む前記医薬組成物は予防用組成物又は治療用組成物であり得る。特定の実施形態においては、前記哺乳動物はヒトである。

30

【 0 0 8 7 】

「哺乳動物」というのは、生児出産、体毛、子供を育てるための乳汁を分泌する乳腺を雌が有することを特徴とするヒトを含む高等脊椎動物哺乳綱のあらゆる成員として理解すべきである。かくして哺乳動物は、非ヒト霊長類及びtrimeraマウスも包含している(Zaubermaierら、1999)。

【 0 0 8 8 】

「ワクチン」又は「薬剤」というのは、部分的であるか完全であるかに関わらず、また急性又は慢性のいずれの疾患に対するものであるかに関わらず、1つの疾病に対する防御を惹起する能力をもつ組成物である。この場合、ワクチン又は薬剤は、予防用ワクチン又は薬剤である。ワクチン又は薬剤は、すでに病気の個体を治療するためにも有用であり得るが、その場合、それは治療用ワクチンと呼ばれる。同様に、医薬組成物を予防用及び/又は治療用のいずれの用途でも使用することができ、その場合、それはそれぞれ予防用及び/又は治療用組成物である。

40

【 0 0 8 9 】

本発明のHCVエンベロープタンパク質は、そのままの状態、ビオチニル化された形で(WO93/18054中で説明されるように)及び/又はNeutralite Avidin'(Molecular Probes Inc., 米国オレゴン州ユージーン)、アビジン又はストレプトアビジンに複合体化された状態で使用することができる。又「ワクチン」又は「薬剤」が、活性物質に加えて、それだけでは組成物を受ける個体に

50

とって有害な抗体の産生を誘発せず、防御を惹起することもない適切な賦形剤、希釈剤、担体及び/又はアジュバントでありうる「薬学的に受容可能な担体」又は「薬学的に受容可能なアジュバント」を含んで成る、ということも指摘しておくべきである。適切な担体は、標準的には、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合体アミノ酸、アミノ酸共重合体及び不活性ウイルス粒子のごとき、大きくゆっくりと代謝される巨大分子である。かかる担体は、当業者にとっては周知である。組成物の有効性を増強するための好ましいアジュバントとしては、制限的な意味なく、以下のものが含まれる：水酸化アルミニウム、WO 93 / 19780中に記載されているような3-O-脱アシル化モノホルホル脂質A、WO 93 / 24148に記載されているようなリン酸アルミニウム、米国特許第4,606,918号に記載されているようなN-アセチル-ムラミル-L-トレオニン-D-イソグルタミン、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミル-L-アラニン2-(1'2'ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)エチルアミン及び、モノホスホリル脂質A、解毒されたエンドトキシン、トレハロース-6,6-ジミコレ-ト及び細胞壁骨格(MPL+TDM+CWS)を2%のスクアレン/Tween 80エマルジョン中に含有するRIBI(イムノケムリサーチ社(Immuno Chem Research Inc.))、米国モンタナ州ハミルトン)。3つの成分MPL, TDM又はCWSのいずれかを、単独でも又は2つずつ組合わせた状態でも使用することができる。MPLを、RC529と呼ばれるその合成アナログによって置換することもできる。さらに、Stimulon(ケンブリッジバイオサイエンス(Cambridge Bioscience))、米国マサチューセッツ州ウォーチェスター)、SAF-1(Syntex)又はISS(Dynavax)又はCpG(Coley Pharmaceuticals)などの細菌性DNAベースのアジュバントのごときアジュバント、ならびにQS21及び3-デオ-アセチル化モノホスホリル脂質A(WO 94 / 00153)又はMF-59(チロン(Chiron))又はポリ〔ジ(カルボキシラトフェノキシ)フォスファゼン〕、ベースのアジュバント(ヴィールスリサーチインスティテュート(Virus Research Institute))、又はOptivax(ヴァクセル(Vaxcel))、サイテックス(Cytex))のごときブロック共重合体ベースのアジュバント、又はAlgammulin及びGamma Inulin(アニユテック(Anutech))、不完全フロインドアジュバント(IFA)又はGerbu調製物(ゲルブバイオテヒニク(Gerbu Biotechnik))のごときインシュリンベースのアジュバントの組合せのごときアジュバントも使用可能である。非ヒト利用分野そして研究目的のためにも、完全フロインドアジュバント(CFA)を使用することができるということを理解すべきである。「ワクチン組成物」はさらに、水、食塩水、グリセロール、エタノール、湿潤剤又は乳化剤pH緩衝物質、防腐剤などのごとき本質的に非毒性で非治療用のものである賦形剤及び希釈剤を含有しうる。標準的には、ワクチン組成物は、注入物質として、液体溶液又は懸濁液のいずれかとして調製される。注入は、皮下、筋肉、静脈内、腹腔内、鞘内、皮内であり得る。その他のタイプの投与としては、移植、坐薬、経口摂取、腸溶性適用、吸入、エアロゾル化又は鼻内噴霧が含まれる。注入に先立ち液体ビヒクル上で溶解させるか、又は液体ビヒクル中に懸濁させるために適した固体形態も同じく調製可能である。該調製は同様に、アジュバント効果を増強させるためリポソーム内に乳化又は封入することもできる。ポリペプチドは同様に、サポニン例えばQuil A(ISCOMS)と合わせてImmune Stimulating Complex(免疫促進性複合体)の中に取込むこともできる。ワクチン組成物は、反応性物質ならびにその他の上述の成分のいずれかを免疫学的に有効な量だけ含む。「反応性物質の有効量」というのは、単一用量又は一連の用量。一部として個体に対しその量を投与することが病気の予防又は治療のために、または所望の効果をまたらすのにも有効であることを意味している。この量は、治療すべき個体の健康及び身体条件、治療されるべき個体の分類学的群(例えばヒト、非ヒト霊長類、霊長類など)、有効な免疫応答をしかける個体の免疫系の能力、望まれる防御の度合、ワクチンの処方、治療担当医の査

10

20

30

40

50

定、感染性HCVの菌株及びその他の関連性ある要因によって変動する。この量は、日常的な試行を通して決定できる比較的広い範囲内に入ることになると予想される。通常、この量は、1用量につき0.01~1000 μ g、より詳細には0.1~100 μ gとなる。投与治療は単一用量計画又は多用量投与計画でありうる。ワクチンは、その他の免疫調節剤と合わせて投与することができる。

【0090】

本発明のもう1つの態様は、本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はそのフラグメントを産生するための方法に関する。

【0091】

HCVエンベロープタンパク質又はその一部分を産生するための前記方法は、例えば、
 該HCVエンベロープタンパク質又はその一部分をコードする読取り枠を含む組換え型核
 酸又はベクターでの宿主細胞の形質転換を含んでおり、ここで前記宿主細胞は、前記HCV
 エンベロープタンパク質又はその一部分を発現する能力をもつ。前記方法はさらに、前
 記タンパク質の発現を得るための適切な培地での前記宿主細胞の培養、前記宿主細胞の培
 養からの又は前記宿主細胞からの発現済みタンパク質の単離を含む可能性がある。前記単
 離には、(i)カオトロピック剤の存在下での前記宿主細胞の分解、(ii)可逆的又は
 不可逆的でありうる単離されたタンパク質内のシステインのチオール基の化学的修飾及び
 (iii)ヘパリンアフィニティクロマトグラフィの単数又は複数が包含され得る。

【0092】

「カオトロピック剤」の例としては、塩化グアジニウム及び尿素がある。一般に、カオ
 トロピック剤は、水の水素結合構造を分断できる化学物質である。濃縮された溶液中で、
 これらは、疎水性効果を低減させることからタンパク質を変性させることができる。

【0093】

「組換え型核酸」というのは、制限酵素消化、PCR、連結、脱ホスホリル化、ホスホ
 リル化、突然変異誘発、非相同細胞内の発現のためのコドンの適合化などのごとき少なく
 とも1つの組換え型DNA技術操作に付された天然又は合成由来の核酸のことである。一
 般に、組換え型核酸は、天然に発生する核酸のフラグメントであり、そうでなければ、天
 然に会合されていない少なくとも2つの核酸フラグメントを含むか又は完全に合成の核酸
 である。

【0094】

「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、「核酸
 分子」、「オリゴヌクレオチド」、「プローブ」、又は「プライマ」という語は、本明細
 書で使用される場合、あらゆる長さ又はあらゆる形状の重合体形態(例えば分枝DNA)
 での、ヌクレオチドつまりリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ペプチドヌク
 レオチド又はロックヌクレオチド又はそれらの組合せを意味する。さらに前記用語は、2
 本鎖(ds)及び1本鎖ポリヌクレオチドを包含する。前記用語は、同様に、メチル化、
 環化及び「caps」のごとき既知のヌクレオチド修飾及びイノシンのごときアナログ又
 はHEG(ヘキサエチレングリコール)のごとき増幅不能な単量体での単数又は複数の天
 然に発生するヌクレオチドの置換をも包含する。リボヌクレオチドは、NTPと、デオキ
 シリボヌクレオチドはdNTPと、ヌジデオキシリボヌクレオチドはddNTPと記され
 る。

【0095】

ヌクレオチドは一般に、放射線、化学発光、蛍光、リン光によって又は赤外線染料で又
 は表面増強ラマン標識又はプラズモン共鳴粒子(PP)で標識することができる。

【0096】

前記用語「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」
 、「核酸分子」、「オリゴヌクレオチド」、「プローブ」、又は「プライマ」は同様に、
 バックボーンが、糖ではなくむしろN-(2-アミノエチル)-グリシン単位から成る偽
 ペプチドであるDNAアナログであるペプチド核酸(PNA)をも包含する。PNAは、
 DNAの挙動を模倣し、相補的核酸ストランドを結合する。PNAの中性バックボーンは

、結果として、通常達成されるものよりもさらに強い結合及びより大きい特異性をもたらす。さらに、PNAがもつ独特の化学的、物理的及び生物学的特性は、強力な生体分子手段、アンチセンス及び抗原作用物質、分子プローブ及びバイオセンサーを産生するために開発利用されてきた。PNAプローブは、一般にDNAプローブよりも短いものであり得、一般には6～20個、より最適には12～18個の長さの塩基(Nielsen, P. E. 2001)という長さをもつ。前記用語はさらに、2'酸素と4'炭素の間のメチレン結合によってリボース環が制約されているRNA誘導体であるロック核酸をも包含する。LNAは、DNA又はRNA標的配列に向かって、類をみない結合親和力を示す、LNAヌクレオチドはオリゴマー化され得、キメラ又はミックスマーLNA/DNA又はLNA/RNA分子の中に取り込まれ得る。LNAは、培養された細胞に対し毒性をもたないように見える(Orum, H. 及びWengel, J. 2001、Wahlestedt, C.ら、2000)。一般に、DNA、RNA、PNA及びLNAのいずれかのキメラ又はミックスマーが、ウラシルでチミンが置換されているこれらのいずれかと同様に考慮される。

10

【0097】

以上のことから、本発明が同様に、HCVワクチン組成物の製造のための、本発明によるコア-グリコシル化されたHCVエンベロープタンパク質又は本発明による組成物の使用にも関していることは明白である。特に、本発明は、慢性HCVのキャリアにおいてHCVに対する免疫性を誘発するための、本発明によるコア-グリコシル化されたHCVエンベロープタンパク質の使用にも関する。より詳細には、本発明は、例えば、リバビリンなどのHCV治療用の小さい薬物の投与と組合せた形又は組合せない形のいずれかでの周知のインターフェロン療法のごときその他のあらゆる療法の前に、同時に又は後で慢性HCVキャリアにおいてHCVに対する免疫性を誘発するための、本明細書に定義された通りのコア-グリコシル化されたHCVエンベロープタンパク質の使用に関する。かかる組成物は同様に、肝臓移植の前後、又は例えば針で刺したけがなどのような推定感染の後にも利用されうる。

20

【0098】

本発明のもう1つの態様は、抗-HCV抗体を含むことが疑われている試料中の抗-HCV抗体の存在を検出する方法であって、

(i) 前記HCVエンベロープタンパク質又はその一部分と前記抗-HCV抗体の複合体化を可能にする条件下で前記試料と本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はその一部分を接触させる段階；

(ii) (i) で形成された複合体を検出する段階；及び

(iii) 前記試料中の前記抗-HCV抗体の存在を(ii)から推論する段階、を含んで成る方法に関する。特定の実施形態においては、段階(i)での接触は競合的条件で起こる。前記方法に対するもう1つの特定の実施形態においては、前記HCVエンベロープタンパク質又はその一部分は固体支持体に結合させられている。さらなる一実施形態においては、抗-HCV抗体を含むことが疑われている前記試料は生体試料である。

30

【0099】

本発明のさらなる一態様は、抗-HCV抗体を含むことが疑われている試料中の抗-HCV抗体の存在を検出するための診断用キットであって、本発明によるHCVエンベロープタンパク質又はその一部分を含んで成るキットに関する。その特定の一実施形態においては、前記HCVエンベロープタンパク質又はその一部分は、固体支持体に結合させられている。さらなる一実施形態においては、抗-HCV抗体を含むことが疑われている前記試料は、生体試料である。

40

【0100】

本明細書で使用する「生体試料」という語は、血清、血漿、リンパ液、皮ふ、気道、腸管及び尿生殖路の外部切片、卵母細胞、涙、唾液、乳汁、血球、腫瘍、器官、胃分泌物、粘液、脊髄液、例えば排泄物、尿、精液などのごとき外分泌物を含む(ただしこれらに限られるわけではない)、個体から単離された組織又は流体の試料を意味する。

50

【 0 1 0 1 】

本発明のHCVエンベロープタンパク質又はその一部分は、抗-HCV抗体の検出及び/又はHCVの遺伝子型特定のための免疫検定に取込むため、HCV疾患の診断/監視のため又は治療剤として、特に適している。

【 0 1 0 2 】

本発明による免疫検定方法は、HCVの感染を受けた個体からの血清中で抗体により認識された線形（ペプチドの場合）及びコンホーメーションエピトープを維持する本発明のHCVエンベロープタンパク質を利用している。本発明のHCV E1及びE2抗原は、抗体を検出するために既知の抗原を利用する実質的に任意の検定方式で利用することができる。当然のことながら、HCVコンホーメーションエピトープを変性する方式は避けるか
10
適合させるべきである。これらの検定全てに共通の特長は、成分中に存在するそのようなあらゆる抗体に抗原が結合できるようにする条件の下で、HCV抗体を含有することが推測されている身体成分と抗原を、接触させるという点にある。かかる条件は、標準的には、余剰の抗原を用いたイオン強度、生理的温度及びpHとなる。供与体との抗原のインキュベーションの後には、抗原を含む免疫複合体の検出が行なわれる。

【 0 1 0 3 】

免疫検定の設計は、大きく変貌を遂げ、数多くの方式が当該技術分野において知られている。例えば、プロトコルは、固定支持体又は免疫沈降を使用することができる。大部分の検定には、標識づけされた抗体又はポリペプチドの使用が関与している。標識は、例えば酵素、蛍光、化学発光、放射性又は染料分子でありうる。免疫複合体からのシグナルを増幅する検定も同様に知られている。その例としては、ピオチン及びアビジン又はストレプトアビジンを利用する検定及び、ELISA及びRIA検定のごとき酵素標識づけ及び媒介された免疫検定がある。
20

【 0 1 0 4 】

免疫検定は、不均質又は均質方式、及び標準型又は競合型であってよいがこれらに限られない。不均質方式では、ポリペプチドは、標準的に、インキュベーション後ポリペプチドからの試料の分離を容易にするため固体マトリックス又は支持体に結合されている。使用可能な固体支持体の例としては、ニトロセルロース（例えば膜又はマイクロタイターウエル形態）、ポリ塩化ビニル（例えばシート又はマイクロタイターウエル状）、ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズ又はマイクロタイタープレート状）、ポリフッ化ピリニデン（ImmunolonTMとして知られている）、ジアゾ化紙、ナイロン膜、活性化ビス及びプロテインAビーズがある。例えば、不均質方式では、Dynatech ImmunolonTM 1又はImmunolonTM 2マイクロタイタープレートを使用することができる。抗原性ポリペプチドを含有する固体支持体は、標準的に、試験試料からそれを分離した後に、及び結合された抗体の検出に先立って洗浄される。標準方式と競合方式の両方が、当該技術分野で知られている。
30

【 0 1 0 5 】

均質方式では、試験試料は、溶解状態の抗原の組合せと共にインキュベートされる。例えば、それは、形成されているあらゆる抗原抗体複合体を沈降させることになる条件下にあってよい。これらの検定のための標準方式及び競合方式が、当該技術分野において知られている。
40

【 0 1 0 6 】

標準方式では、抗体抗原複体内のHCV抗原などの量は、直接監視される。これは、前記抗-HCV抗体のような前記抗体上のエピトープを認識する標識づけされた抗異種（例えば抗ヒト）抗体が複合体形成に起因して結合するか否かを決定することによって達成され得る。競合方式では、試料中の前記HCV抗体のような前記抗体の量は、複体内における既知の量の（標識づけされた）抗体（又はその他の競合するリガンド）、又は抗原の結合に対する競合効果を監視することによって、演繹される。

【 0 1 0 7 】

抗原抗体複合体は、方式に応じて、一定の既知の技術のいずれかによって検出される。
50

例えば、複合体中の標識づけされていない抗 - H C V 抗体のような抗体は、標識（例えば酵素標識）で複合体化された抗 - 異種 I g の抱合体を用いて検出可能である。

【 0 1 0 8 】

免疫沈降又は凝集検定方式においては、抗原と抗体の間の反応は、溶液又は懸濁液から沈降して沈降物の目に見える層又はフィルムを形成するタンパク質クラスターを形成する。供与体中、又は試料中に抗体が存在しない場合、沈降物は全く形成されない。

【 0 1 0 9 】

コンホーメーションエピトープで構成された本発明の H C V エンベロープタンパク質又はその特定の部分は、標準的には、これらの免疫検定中で使用するためキットの形で包装されることになる。キットは、通常は、別々のコンテナ内に、未変性 H C V 抗原；対照抗体製剤形態（ポジティブ及び/又はネガティブ）、検定方式が必要とする場合には標識づけされた抗体及び標識が直接シグナルを生成しない場合にはシグナル生成用試薬（例えば酵素基板）を収納することになる。未変性 H C V 抗原はすでに固体マトリクスに結合されていてよいし、又はそれをマトリクスに結合するための試薬を伴って別々であってもよい。キットの中には、通常、検定を実施するための説明書（例えば書面、テープ、C D - R O M）が包含される。

【 0 1 1 0 】

選択された固相には、ガラスビーズ、ニトロセルロース、微粒子、反応トレイのマイクロウェル）試験管、及び磁気ビーズが含まれ得る。シグナル生成用化合物としては、酵素、発光性化合物、色原体、放射性元素及び化学発光性化合物が含まれ得る。酵素の例としては、アルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びベータ - ガラクトシダーゼが含まれる。エンハンサー化合物には、ビオチン、抗ビオチン及びアビジンが含まれる。エンハンサー化合物結合成員の例としては、ビオチン、抗ビオチン及びアビジンが含まれる。リウマチ因子様物質の効果を遮断するために、試験試料は、リウマチ因子様物質の効果を遮断するのに十分な条件に付される。これらの条件には、混合物を形成するべく一定量の抗 - ヒト I g G と試験試料を接触させること及び、実質的にリウマチ因子様物質を含まない反応混合物製品を形成するのに十分な時間、十分な条件下で混合物をインキュベートすることが含まれる。

【 0 1 1 1 】

特に、本発明は、診断用キットを調製するための、本発明による H C V エンベロープタンパク質又はその一部分の使用に関係する。

【 0 1 1 2 】

本発明によるコア - グリコシル化された H C V エンベロープタンパク質は免疫原性がきわめて高く、体液性及び細胞性の両方の免疫応答を刺激することから、本発明はさらに、本発明の精製された単一の H C V エンベロープタンパク質又はオリゴマー粒子を含む、H C V 関連 T 細胞応答を検出するためのキットにも関する。H C V T 細胞応答は、例えば、L e r o u x - R o e l s ら、により W O 9 5 / 1 2 6 7 7 明細書中で記載されている通りに測定することができる。

【 0 1 1 3 】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物の体内で H C V - 特異的免疫応答を誘発する方法であって、薬学的に受容可能なアジュバントを任意に含む本発明による有効量の H C V エンベロープタンパク質又はその一部分を前記哺乳動物に投与する段階を含んで成る方法に関する。本発明による有効量の H C V エンベロープタンパク質又はその一部分を前記哺乳動物に投与する段階を含む前記方法は、哺乳動物の体内で H C V - 特異的抗体を誘発するため又は哺乳動物内で特異的 T 細胞機能を誘発するためにも使用することができる。前記方法においては、前記投与は、予防目的（すなわち予防的投与）又は治療目的（すなわち治療的投与）をもち得る。

【 0 1 1 4 】

本発明のさらにもう 1 つの態様は、哺乳動物を免疫化する方法であって、任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含む本発明による有効量の H C V エンベロープタンパク質

10

20

30

40

50

又はその一部分を前記哺乳動物に投与する段階を含む方法に関する。

【0115】

本発明は、同様に、HCVに感染した哺乳動物を治療する方法であって、任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含む本発明による有効量のHCVエンベロープタンパク質又はその一部分を前記哺乳動物に投与する段階を含んで成る方法にも関する。

【0116】

本発明の上述の態様又は前記態様に特定の実施形態はいずれも、一般に、真核細胞内の発現産物であり2つの異なるHCVエンベロープタンパク質について上述したものと同一特性によって特徴づけられる問題のタンパク質にも適用可能である。

【0117】

より詳細に言うと、本発明は、少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含む単離タンパク質又はそのフラグメントに関し、該タンパク質又はそのフラグメントは、真核細胞内の発現産物であり、さらにはN-グリコシル化部位の50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%又は80%までがコアグリコシル化されていることを特徴とする。より詳細には、N-グリコシル化部位の60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%又は95%よりも多くが、Man(8~10)-GlcNAc(2)によって定義される構造をもつオリゴマンノースでグリコシル化されている。上述のN-グリコシル化特徴のいずれかにより詳細に言うと、構造Man(8)-GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位に対する構造Man(7)-GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースでコアグリコシル化された部位の比率は、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.44、0.45又は0.50以下である。上述のN-グリコシル化特徴のいずれかにさらに詳細に言うと、前記オリゴマンノースは、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、又は5%未満の末端1,3マンノースを含有する。

【0118】

本発明のもう1つの変形態様は、少なくとも1つのN-グリコシル化部位を含む単離されたタンパク質において、真核細胞内の発現産物であることそしてさらには、構造Man(8)-GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースに対する構造Man(7)-GlcNAc(2)をもつオリゴマンノースの比率が、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.44、0.45又は0.50以下であるオリゴマンノースにより、N-グリコシル化部位が占有されていることを特徴とする単離されたタンパク質に関する。上述のN-グリコシル化特徴のいずれかにさらに詳細に言うと、前記オリゴマンノースは、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%又は5%未満の末端1,3マンノースを含有する。

【0119】

特に、前記単離された問題のタンパク質及びそのフラグメントは、Hansenula細胞のごとき酵母細胞内の発現産物である。前記単離された問題のタンパク質又はそのフラグメントは、例えばHCVエンベロープタンパク質又はHBV(B型肝炎)エンベロープタンパク質又はそのフラグメントのごときウイルスエンベロープタンパク質又はそのフラグメントであり得る。その他のウイルスエンベロープタンパク質の例としては、HIV(ヒト免疫不全ウイルス)エンベロープタンパク質gp120及び、Flaviridaeに属するウイルスのウイルスエンベロープタンパク質が含まれる。一般に、前記単離された問題のタンパク質又はそのフラグメントは、本発明のN-グリコシル化特性を必要

10

20

30

40

50

とするあらゆるタンパク質であり得る。

【0120】

「HCV組換え型ワクシニアウイルス」というのは、HCVタンパク質又はその一部分をコードする核酸配列を含むワクシニアウイルスを意味する。

【0121】

「HCVエンベロープタンパク質から形成されるHCVウイルス様粒子」、「HCVエンベロープタンパク質から形成されるオリゴマー粒子」という語は、ここでは、それ自体それぞれ1つ又は2つのE1及び/又はE2単量体から成ると考えられているHCV E1及び/又はE2エンベロープタンパク質の複数の基本単位を含有する特定の性質及び形状の構造として定義づけされる。本発明の粒子が、感染性HCV RNAゲノムが欠如しているものとして定義づけされていることは明白であるはずである。本発明の粒子、脂質、界面活性剤、HCVコアタンパク質又はアジュバント分子を中に取りこむことのできるエンベロープタンパク質のシェルから成る、空であって良い球状の高次粒子であり得る。後者の粒子は、同様に、例えばアポリポタンパク質B又は低密度リポタンパク質のごときリポソーム又はアポリポタンパク質によってか又は特定の器官又は組織に前記粒子をターゲティングするその他のあらゆる手段により包埋され得る。この場合、このような空の球状粒子は往々にして、「ウイルス様粒子」又はVLPと呼ばれる。あるいはまた、高次粒子は、中で完全な球がHCV E1又はE2エンベロープタンパク質オリゴマーで構成され、脂質、界面活性剤、HCVコアタンパク質又はアジュバント分子が中にさらに取込まれる可能性があるか又はそれ自体、例えば、アポリポタンパク質B、低密度リポタンパク質のごときリポソーム又はアポリポタンパク質又は、例えば、アジアログリコタンパク質のごとき特定の器官又は組織に前記粒子をターゲティングするその他のあらゆる手段によって包埋され得る、固体球状構造であり得る。該粒子は同様に、通常は丸い（以下参照）形状をもち通常はHCVエンベロープタンパク質を単一層しか含まないより小さな構造（上述の空の又は固体球形構造に比べて）で構成される可能性もある。かかる小さな粒子の標準的例は、通常4～16の間のより少ない数のHCVエンベロープタンパク質から成るロゼット様の構造である。後者の特定の例には、明らかに8～10個のE1単量体を含有する、ここで例示されている通りの0.2%のCHAPS中でE1で得られるさらに小さい粒子が含まれる。かかるロゼット様の構造は、通常1つの平面内で組織され、丸形、例えばホイール形状をしている。ここでも又、脂質、界面活性剤、HCVコアタンパク質、又はアジュバント分子をさらに取込ませることもできるし、又、例えばアポリポタンパク質B又は低密度リポタンパク質のごときリポソーム又はアポリポタンパク質によってか又は特定の器官又は組織に前記粒子をターゲティングする他のあらゆる手段により、さらに小さい粒子を包埋させることもできる。より小さい粒子は、同様に、脂質、界面活性剤、HCVコアタンパク質、又はアジュバント分子をさらに中に取込ませることができ、又それ自体アポリポタンパク質B又は低密度リポタンパク質のごときリポソーム又はアポリポタンパク質によってか又は特定の器官又は組織に前記粒子をターゲティングする他のあらゆる手段により、包埋させることのできる、同様のより少数のHCV E1又はE2エンベロープタンパク質から成る小さい球状又は小球形構造をも形成し得る。当該技術分野において周知の動的光散乱技術（さらに例の項を参照のこと）によって測定される通りの上述の粒子のサイズ（すなわち直径）は、通常1～100nmの間、より好ましくは2～70nmの間、さらに一層好ましくは2～40nm、3～20nm、5～16nm、7～14nm又は8～12nmの間にある。

【0122】

特に、本発明は、免疫検定又はワクチンでの使用に適した、コア-グリコシル化されたC型肝炎ウイルス(HCV)エンベロープタンパク質又はその任意の一部分を精製するための方法であって：

(i) HCV E1及び/又はHCV E2タンパク質又はその任意の一部分をコードするエンベロープ遺伝子で形質転換された*Hansenula*又は*Saccharomyces*グリコシル化マイナス菌株を適切な培地で増殖させる段階；

10

20

30

40

50

(i i) 前記 H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 遺伝子又はその任意の一部分の発現をひき起こす段階、及び

(i i i) 前記コア - グリコシル化された H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 タンパク質又はその任意の一部分を前記細胞培養から精製する段階、を含んで成る方法に関する。

【 0 1 2 3 】

本発明はさらに、免疫検定又はワクチンでの使用に適した、コア - グリコシル化された C 型肝炎ウイルス (H C V) エンベロープタンパク質又はその任意の一部分を精製するための方法であって：

(i) H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 タンパク質又はその任意の一部分をコードするエンベロープ遺伝子で形質転換された *Hansenula* 又は *Saccharomyces* グリコシル化マイナス菌株を適切な培地で増殖させる段階、

(i i) 前記 H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 遺伝子又はその任意の一部分の発現をひき起こす段階、及び

(i i i) 前記細胞内で発現されたコア - グリコシル化済み H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 タンパク質又はその任意の一部分を、形質転換された宿主細胞が溶解してから精製する段階、を含んで成る方法に関連する。

【 0 1 2 4 】

本発明はさらに、免疫検定又はワクチンでの使用に適した、コア - グリコシル化された C 型肝炎ウイルス (H C V) エンベロープタンパク質又はその任意の一部分を精製するための方法であって：

(i) 少なくとも 2 つの C y s - アミノ酸を含む H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 タンパク質又はその任意の一部分をコードするエンベロープ遺伝子で形質転換された *Hansenula* 又は *Saccharomyces* グリコシル化マイナス菌株を適切な培地で増殖させる段階、

(i i) 前記 H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 遺伝子又はその任意の一部分の発現をひき起こす段階、及び

(i i i) 前記 C y s - アミノ酸が化学的及び / 又は酵素的手段で可逆的に保護されている、前記コア - グリコシル化された H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 タンパク質又はその一部分を前記細胞培養から精製する段階、を含んで成る方法に関連する。

【 0 1 2 5 】

本発明はさらに、免疫検定又はワクチンでの使用に適した、コア - グリコシル化された C 型肝炎ウイルス (H C V) エンベロープタンパク質又はその任意の一部分を精製するための方法であって、

(i) 少なくとも 2 つの C y s - アミノ酸を含む H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 タンパク質又はその任意の一部分をコードするエンベロープ遺伝子で形質転換された *Hansenula* 又は *Saccharomyces* グリコシル化マイナス菌株を適切な培地で増殖させる段階、

(i i) 前記 H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 遺伝子又はその任意の一部分の発現をひき起こす段階、及び

(i i i) 前記 C y s - アミノ酸が化学的及び / 又は酵素的手段で可逆的に保護されている、前記細胞内で発現されたコア - グリコシル化された H C V E 1 及び / 又は H C V E 2 タンパク質又はその一部分を、形質転換された宿主細胞が溶解してから精製する段階、を含んで成る方法に関連する。

【 0 1 2 6 】

本発明は、詳細にはヘパリンアフィニティクロマトグラフィが包含される、本明細書中に記載される通りの組換え型コア - グリコシル化済み H C V 酵母タンパク質又はその任意の一部分を精製するための方法に関する。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 7 】

従って、本発明は同様に、前記化学的手段がスルホン化である、以上で記載されている通りの組換え型コア - グリコシル化済み酵母タンパク質又はその任意の一部を精製するための方法に関する。

【 0 1 2 8 】

従って本発明は同様に、C y s - アミノ酸の前記可逆的保護が化学的及び / 又は酵素的的手段による不可逆的保護と交換される、以上で記載されている通りの、組換え型コア - グリコシル化済みH C V酵母タンパク質又はその任意の一部を精製するための方法にも関する。

【 0 1 2 9 】

従って本発明は同様に、化学的手段による前記不可逆的保護がヨードアセタミドである、以上で記載されている通りの、組換え型コア - グリコシル化済みH C V酵母タンパク質又はその任意の一部を精製するための方法にも関する。

【 0 1 3 0 】

従って本発明は同様に、前記化学的手段による不可逆的保護がN E M又はビオチン - N E M又はその混合物である、以上で記載された通りの、組換え型コア - グリコシル化済みH C V酵母タンパク質又はその任意の一部を精製するための方法にも関する。

【 0 1 3 1 】

本発明は同様に、H C Vコア、E 1、E 2、P 7、N S 2、N S 3、N S 4 A、N S 4 B、N S 5 A及び / 又はN S 5 B タンパク質又はその一部をも含む上述の通りの組成物にも関する。本発明のコア - グリコシル化されたタンパク質E 1、E 2、及び / 又はE 1 / E 2は例えば、その他のH C V抗原例えばコア、P 7、N S 3、N S 4 A、N S 4 B、N S 5 A及び / 又はN S 5 Bと組み合わせることもできる。これらのN S 3タンパク質の精製は、好ましくは、システイン残基の可逆的修飾、そしてさらに一層好ましくは、システインのスルホン化を包含することになる。スルホン化を含めた、かかる可逆的修飾を得るための方法がN S 3タンパク質についてM a e r t e n sら、(P C T / E P 9 9 / 0 2 5 4 7) の中で記載されてきた。後者の文書における全ての定義づけを含めた全内容が、参照により本明細書に一体化されるという点を強調しておくべきである。

【 0 1 3 2 】

また、本発明は、コア - グリコシル化されたエンベロープタンパク質が、一連の時間及び化合物の一部として使用されることを特徴とする、H C Vに対する免疫性を誘発するための本明細書に記載された通りのコア - グリコシル化されたエンベロープタンパク質の使用に関する。この点において、「一連の時間及び化合物」という語は、免疫応答を惹起するために用いられる化合物を個体に対し時間的間隔をおいて投与することを意味すると理解すべきである。後者の化合物は、次の成分のうちのいずれかを含むことができる：コア - グリコシル化されたエンベロープタンパク質、H C V D N Aワクチン組成物、H C Vポリペプチド。

この点において、一連のものには、以下のような投与が含まれる：

(i) 時間的間隔をおいた、例えばコア - グリコシル化されたエンベロープタンパク質のごときH C V抗原の投与、又は

(i i) 前記コア - グリコシル化されたエンベロープタンパク質オリゴマー粒子及び前記H C V D N Aワクチン組成物を同時に、又は交番する時間的間隔を含めた、異なる時間的間隔をおいて投与できる、H C V D N Aワクチン組成物と組合せた形での、例えばコア - グリコシル化されたエンベロープタンパク質のごときH C V抗原の投与、又は

(i i i) 時間的間隔を置いた、場合によってはその他のH C Vペプチドと組合せた形での(i) 又は(i i) のいずれかの投与。

【 0 1 3 3 】

この点において、H C V D N Aワクチン組成物が、E 1 - 、E 2 - 、E 1 / E 2 - ペプチド、N S 3ペプチド、その他のH C Vペプチド又は前記ペプチドの一部を含めたH C Vエンベロープペプチドをコードする核酸を含んで成ることは明白であるはずである。

10

20

30

40

50

その上、前記HCVペプチドは、E1-、E2-、E1/E2-ペプチド、その他のHCVペプチド又はその一部分を含めたHCVエンベロープペプチドを含んで成ることを了解すべきである。「その他のHCVペプチド」という語は、あらゆるHCVペプチド又はそのフラグメントを意味する。上述のスキームの項目(i i)において、HCV DNAワクチン組成物は、好ましくはHCVエンベロープペプチドをコードする核酸を含んで成る。上述のスキームの項目(i i)において、HCV DNAワクチン組成物は、より一層好ましくは、場合によってはHCV-NS3 DNAワクチン組成物と組合せた形でHCVエンベロープペプチドをコードする核酸で構成されている。この点において、HCV DNAワクチン組成物が転写調節要素に作動可能な形で連結された上述のとおりHCVペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むプラスミドベクターを含んで成ることは明白であるはずである。本明細書で使用するように「プラスミドベクター」とは、それが連結されたもう1つの核酸を輸送する能力をもつ核酸分子を意味する。一般に、制限的な意味はないものの、プラスミドベクターは、そのベクター形態で染色体に結合されていない環状2本鎖DNAループである。本明細書で使用されている「ポリヌクレオチド配列」は、デオキシリボ核酸(DNA)のごときポリヌクレオチドそして該当する場合には、リボ核酸(RNA)を意味する。この語は、等価物として、ヌクレオチドアナログ及び1本鎖(センス又はアンチセンス)及び2本鎖ポリヌクレオチドから作られたRNA又はDNAのいずれかのアナログを包含するものとして理解されるべきである。本明細書で使用されている「転写調節要素」という語は、生きた脊椎動物の細胞の中に導入した時点で、該ポリヌクレオチドによりコードされた翻訳産物を産生するべく細胞メカニズムを導くことができるような形で必須調節要素を含有するヌクレオチド配列を意味する。作動可能な形で連結されたという語は、構成要素がその通常の機能を果たすように構成されている並置を意味する。かくして、ヌクレオチド配列に対し作動可能な形で連結された転写調節要素は、前記ヌクレオチド配列の発現をもたらす能力をもつ。当業者であれば、異なる転写プロモータ、ターミネーター、担体ベクター又は特異的遺伝子配列をうまく使用することが可能であるということ認識できる。あるいはまた、アデノウイルス、カナリア痘瘡ウイルス、MVAなどのごとき生きたベクターを通してDNAワクチンを送達することも可能である。

10

20

【0134】

本発明は、以下に記載の実施例により例示される。これらの例は、単なる一例にすぎず、いかなる形であれ本発明を制約又は制限するものとみなされるものではない。

30

【0135】

実施例1

PFPMT-MF - E1-H6シャトルベクターの構築

Hansenula polymorpha形質転換のためのプラスミドを以下のように構築した。pFPMT-MF - E1-H6シャトルベクターを多工程手順で構築した。最初に、HCV E1sタンパク質をコードする核酸配列CSN21をCHHリーダー配列(CHH=Carcinus maenas血糖上昇ホルモン)に従ってクローニングし、これをその後MF リーダー配列に変更した(MF = Saccharomyces cerevisiae - 交接因子)。

40

【0136】

最初に、シームレスクローニング方法によりEcoRI/BamHIフラグメントとしてCHH-E1-H6単位を包含したpUC18誘導体を構築した(パジェット(Padgett), K.A. および、ゾルゲ(Sorge), J.A. 1996)。さらに、E1s-H6-コーディングDNAフラグメント及びpCHH-Hiv-由来の受容体プラスミドを以下に記載する通りPCRにより得た。

【0137】

E1s-H6-コーディングDNAフラグメントの生成

プラスミドPGEMTE1sH6(配列番号6、図1)からPCRにより、[6-His-残基で伸長されたE1sのアミノ酸192~326から成るHCV1bE1s型タン

50

パク質についてコードする（配列番号5）] E1-H6 DNAフラグメントを単離した。
さらに、以下のプライマーを使用した。

- CHHE1-F :
【化5】

5'-agttactcttca.aggtatgaggtgCGcaacgtgtccg-3'

（配列番号7）；

Eam1104I部位には下線が付され、ドットは開裂部位をマークしている。太字で印刷された塩基は、プライマーCHH-linksの塩基に対し相補的である。マークの付いていない塩基は、センス方向でE1の開始領域（192～326）中にアニールする

10

- CHHE1-R :
【化6】

5'-agttactcttca.cagggatcctccttaatggtgatggtggtggtgcc-3'

（配列番号8）；

Eam1104I部位には下線が付され、ドットは開裂部位をマークしている。太字で印刷された塩基は、プライマーMF30-rightsの塩基に対し相補的である。その後のクローニング手順に有用なBamHI部位を形成する塩基はイタリックで印刷されている。マークの付いていない塩基は、停止コドン及び停止コドンとBamHI部位との間の3つの塩基を含め、E1-H6単位の末端中にアンチセンス方向にアニールする。

20

【0138】

反応混合物は、以下の通りに構成されていた。20ngのEco311-線形化pGEMTE1sH6、各々0.2μMのプライマーCHHE1-F及びCHHE1-R、dNTP'S（各々0.2μMで）、1×緩衝液2（Expand Long Template PCRシステム；ベーリンガー：カタログ番号1681 834）、2.5uのポリメラーゼ混合物（Expand Long Template PCRシステム；ベーリンガー：カタログ番号1681 834）を含有する合計体積50μL。

【0139】

以下の工程から成るプログラム1を使用した

30

1. 変性：95 で5分
2. 95 での変性30秒、65 でのアニーリング30秒、及び68 での伸長130秒を10サイクル。
3. 4 での終結。

【0140】

その後50μLの10×緩衝液2（Expand Long Template PCRシステム；ベーリンガー；カタログ番号1681 834）、40μLのH₂O及び5μLの[dATP、dGTP及びdTTP（各2mM）；10mM5-メチルdCTP]を、プログラム1に由来する試料に添加し、以下の工程から成るプログラムに従って増幅を実施した。

40

1. 変性；95 で5分
2. 95 での変性45秒、65 でのアニーリング30秒、68 での伸長130秒を5サイクル。
3. 4 で終結。

【0141】

pCHH-Hir由来の受容体プラスミドの生成

pCHH-Hirプラスミド（配列番号9；図2）からPCRにより受容体プラスミドを製造し、これは、Hirコーディング配列がPCR産物内には存在しないという点を除いて、ほぼ完全なpCHH-Hirプラスミドで構成されている。このPCRのためには、以下のプライマーを使用した。

50

1. CHH - Links :

【化7】

5'-agttactcttca.cctcttttccaacgggtgtgtag-3'

(配列番号10) ;

Eam1104I部位には下線が付され、ドットは開裂部位をマークしている。太字で印刷された塩基は、プライマーCHHE1-Fの塩基に対し相補的である。マークの付いていない塩基はアンチセンス方向でCHH配列の末端中にアニールする。

2. CHH - Lichts :

【化8】

10

5'-agtcactcttca.ctgcaggcatgcaagcttggcg-3'

(配列番号11) ;

Eam1104I部位には下線が付され、ドットは開裂部位をマークしている。太字で印刷された塩基は、プライマーCHHE1-Rの塩基に対し相補的である。マークの付いていない塩基は、インサートから離れるような方向で、pCHH-HirのクローニングされたCHH-Hirudin HL20の後ろのpUC18配列中にアニールする。

【0142】

反応混合物は、以下の通りに構成されていた。20ngのAsp718I-線形化pCHH-Hir、各々0.2μMのプライマーCHH-links及びMF30-rechts、dNTP(各々0.2μMで)、1×緩衝液2(Expand Long Template PCRシステム;ベーリンガーカタログ番号1681834)、2.5uのポリメラーゼ混合物(Expand Long Template PCRシステム;ベーリンガー:カタログ番号-1681834)を含有する合計体積50μL。

20

【0143】

上述の通りのプログラムを使用した。

【0144】

その後5μLの10×緩衝液2(Expand Long Template PCRシステム;ベーリンガー;カタログ番号1681834)、40μLのH₂O及び5μLの[dATP、dGTP及びdTTP(各2mM);10mM5-メチル dCTP]を、プログラム1に由来する試料に添加し、上述の通りにプログラムに従って増幅を実施した。

30

【0145】

ベクターpCHHE1の生成

上述の通りPCRにより生成されたpCHH-Hir由来の受容体プラスミドとE1s-H6-コーディングDNAフラグメントを、供給業者の仕様書に従って、PCR産物精製キット(キアゲン(Qiagen))を用いて精製した。その後、精製されたフラグメントをEam1104Iで別々に消化した。その後、E1s-H6DNAフラグメントを供給業者の仕様書に従って、T4リガーゼ(ベーリンガー)を用いてpCHH-Hir由来の受容体プラスミド内に連結させた。

40

【0146】

連結混合物でE.Coli.XL-Gold細胞を形質転換し、EcoRI及びBamHIでの消化により、複数のアンピシリン耐性コロニーのプラスミドDNAを分析した。陽性クローンを選択し、これをpCHHE1と呼称した。

【0147】

ベクターpFPMT-CHH-E1H6の生成

pCHHE1kのEcoRI/BamHIフラグメントをEcoRI/BamHIで消化したベクターpFPMT121(配列番号12:図3)と連結させた。供給業者の指示に従ってT4リガーゼ(ベーリンガー)を使用した。E.Coli.DH5F細胞を形質転換するために連結混合物を使用した。プラスミドDNAの制限パターン上でいくつかの

50

形質転換体を分析し、陽性クローンを保留し、これを p F P M T - C H H - E 1 H 6 と呼称した（配列番号 1 3 : 図 4 ）。

【 0 1 4 8 】

p F P M T - M F - E 1 - H 6 の生成

最後に、以下のような 3 つのフラグメントの連結により、シャトルベクター p F P M T - M F - E 1 - H 6 を生成した。

1 . 6 . 9 6 1 k b の E c o R I / B a m H I で消化された p F P M T 1 2 1 （配列番号 1 2 : 図 3 ）

2 . 0 . 2 4 5 (k b) の p U C 1 8 - M F a の E c o R I / H i n d I I I フラグメント（配列番号 6 2 : 図 3 6 ）及び

3 . p F P M T - C H H - E 1 H 6 に由来する 0 . 4 5 4 k b の P C R 産物の 0 . 4 4 2 k b の H i n d I I I / B a m H I フラグメント。

【 0 1 4 9 】

以下のプライマーを用いて、P C R により、フラグメント N o . 3 を発生させる 0 . 4 5 4 k b の P C R 産物を得た。

1 . プライマー M F a - E 1 f - H i :

【 化 9 】

5'-aggggtaagcttggataaaaaggtatgaggtgcgcaacgtgtccgggatgt-3'

（配列番号 1 4 ）及び

2 . プライマー E 1 b a c k - B a m

【 化 1 0 】

5'-agttacggatccttaatggtgatggtggtggtgccagttcat-3'

（配列番号 1 5 ）

【 0 1 5 0 】

反応混合物は、以下の通りに構成されていた。反応混合物体積 5 0 μ L、p F P M T - C H H - E 1 - H 6 (E c o R I 線形化 ; 1 5 n g / μ L)、0 . 5 μ L ; プライマー M F a - E 1 f - H i (5 0 μ M)、0 . 2 5 μ L ; プライマー E 1 b a c k - B a m (5 0 μ M) ; 0 . 2 5 μ L ; d N T P (全 2 m M で)、5 μ L ; D M S O、5 μ L ; H ₂ O、3 3 . 5 μ L ; E x p a n d L o n g T e m p l a t e P C R システム (ベーリンガーマンハイム (B o e h r i n g e r M a n n h e i m) ; カタログ番号 1 6 8 1 8 3 4) 緩衝液 2 (1 0 倍に濃縮)、5 μ L ; E x p a n d L o n g T e m p l a t e P C R システムポリメラーゼ混合物 (1 U / μ L)、0 . 5 μ L。

【 0 1 5 1 】

以下の工程から成る P C R プログラムを使用した。

1 . 変性 : 9 5 ° C で 5 分

2 . 9 5 ° C での変性 4 5 秒、5 5 ° C でのアニーリング 4 5 秒、及び 6 8 ° C での伸長 4 0 秒を 2 9 サイクル。

3 . 4 ° C での終結。

【 0 1 5 2 】

使用されたプライマーに基づいて、結果としてもたらされた 0 . 4 5 4 k b の P C R 産物は、E 1 (1 9 2 - 3 2 6) のコドンとそれに続く 6 個のヒスチジンコドン及び「 t a a 」停止コドンを含み、これは上流で、(クローニング関連 H i n d I I I 部位プラス 6 塩基対オーバーハングを含む) M F プレプロ S A の 2 2 の 3 ' 末端塩基対によりフランキングされ、下流で (クローニング関連) B a m H I 部位及び 6 塩基対オーバーハングによりフランキングされていた。

【 0 1 5 3 】

連結反応のためには、供給業者の条件 (試料体積 2 0 μ L) に従って、T 4 D N A リガゼ (ベーリンガーマンハイム (B o e h r i n g e r M a n n h e i m)) を使用し

10

20

30

40

50

た。

【0154】

E. coli HB101細胞を連結混合物で形質転換させ、複数の形質転換体から単離されたプラスミドの制限分析の後陽性クローンを保留した。陽性プラスミドを選択し、これを pFPMT-MF-E1-H6 (配列番号16、図5) と呼称した。

【0155】

実施例2

pFPMT-CL-E1-H6シャトルベクターの構築

Hansenula polymorphaの形質転換のためのプラスミドを以下のように構築した。pFPMT-CL-E1-H6シャトルベクターを、pFPMT-MF-E1-H6 (配列番号16、図5) から出発して3工程で構築した。

【0156】

第1工程では、pUC18ベクター内にpFPMT-MFのMF-E1-H6読み取り枠をサブクローニングした。従って、(FMDプロモータープラスMF-E1-H6を含む)pFPMT-MF-E1-H6の1.798kbのSalI/BamHIフラグメントを、供給業者の条件に従ってT4リガーゼ(ベーリンガー)を用いてpUC18のSalI/BamHIベクターフラグメントに連結させた。この結果、図6に描かれているプラスミド(配列番号17)が得られ、さらにこれをpMa12-1(pUC18-FMD-MF-E1-H6)と呼称した。E. coli DH5 F'細胞を形質転換するために連結混合物を使用した。複数のアンピシリン耐性コロニーを採取し、採取したクローンから単離したプラスミドDNAの制限酵素消化により分析した。MF-E1-H6コーディング配列のDNA配列を決定することにより、陽性クローンをさらに分析した。MFプレプロ配列を鳥類リゾチームプレ配列のコドンで置換するべくPCR誘導型突然変異誘発のために適正なクローンを使用した(「CL」：鳥類リゾチームのアミノ酸1~18に対応する；配列番号1)。適用されたPCR誘導型突然変異誘発方法の原理は、プライマーの5'末端にある所望の改変を伴う全プラスミドの増幅に基づいている。下流側の工程では、線形PCR産物の終りは、自己連結に先立ち修飾され、所望の改変済みプラスミドをもたらす。

【0157】

PCR反応のためには、以下のプライマーが用いられた。

1. プライマー CL hin ;

【化11】

5'-tgcttctaccactagcagcactaggatagaggtgcgcaacgtgtccggg-3'

(配列番号18)

2. プライマー CL her neu ;

【化12】

5'-tagtactagtattagtaggcttcgcatgaattcccgatgaaggcagagagcg-3'

(配列番号19)

【0158】

プライマーの下線のある5'領域は、鳥類リゾチームプレ配列の約半分のコドンを含む。プライマーCL her neuは、SpeI制限部位(イタリック体)を包含する。プライマーの下線の付されていない領域は、E1(CL hin)のアミノ酸残基192~199についてコドン、又はEcoRI部位を越えてFMDプロモーターの位置-19(EcoRI部位から因子)までの「atg」開始コドンとアニールする。該プライマーは完全なpMa12-1を増幅し、かくしてMfaプレプロ配列のコドンを鳥類リゾチームプレ配列のコドンで置換する。

【0159】

反応混合物は、以下のように構成されていた；pUC18-FMD-MF-E1-H

10

20

30

40

50

6 (pMa12-1; 1.3 ng/μL)、1 μL; プライマー CL hin (100 μM)、2 μL; プライマー CL her neu (100 μM)、2 μL; dNTP (全て2.5 mM)、8 μL; H₂O、76 μL; Expand Long Template PCRシステム (ベーリンガー; カタログ番号1681 834) 緩衝液2 (10倍に濃縮)、10 μL; Expand Long Template PCRシステムポリメラーゼ混合物 (1 U/μL)、0.5 μL。

【0160】

以下の工程から成るPCRプログラムを使用した;

1. 変性: 95 °C で15分
2. 95 °C での変性30秒、60 °C でのアニーリング1分、及び72 °C での伸長1分を35サイクル。
3. 4 °C での終結。

【0161】

結果として得られたPCR産物を、その適正なサイズ(3.5 kb)についてアガロースゲル電気泳動により検査した。その後PCR産物の3'-Aオーバーハング形態をT4ポリメラーゼ反応によって除去し、結果として、3'-及び5'-OH基を伴う平滑末端がもたらされた。従ってPCR産物をT4ポリメラーゼ(ベーリンガー; 1 U/μL)で処理した。すなわち、残った95 μLのPCR反応混合物に対して1 μLのT4ポリメラーゼ及び4 μL dNTP (全て2.5 mM)を添加した。37 °C で20分間試料をインキュベートした。その後、DNAをエタノールで沈降させ16 μLのH₂O中で取り上げた。

【0162】

その後、5'-リン酸塩をキナーゼ反応により平滑末端PCR産物に添加した。従って、16 μLの平滑末端PCR産物に対して、1 μLのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ベーリンガー; 1 U/μL)、2 μLの10倍濃縮T4ポリヌクレオチドキナーゼ反応緩衝液(ベーリンガー)及び1 μLのATP (10 mM)を添加した。試料を37 °C で30分間インキュベートした。

【0163】

その後、DNAを1%のアガロースゲル上に適用し、供給業者の条件に従ってゲル抽出キット(キアゲン)を用いて適正な産物バンドを単離した。その後50 ngの精製済み産物を供給業者の条件に従ってT4リガーゼ(ベーリンガー)を用いて自己連結させた。16 °C で72時間インキュベートした後、連結混合物中のDNAをエタノールで沈降させ、20 μLの水中で溶解させた。

【0164】

その後、E. coli DH5α-F'細胞を10 μLの連結試料で形質転換した。複数のアンピシリン耐性クローンのプラスミドDNAを制限酵素消化を用いて検査した。陽性クローンを保留し、これをp27d-3と呼称した(pUC18-FMD-CL-E1-H6、配列番号20、図7)。その後、CL-E1-H6読取り枠をDNA配列決定によって確認した。

【0165】

最終工程では、以下に記載する通りにpFPMTM-CL-E1-H6シャトルベクターを構築した。p27d-3の0.486 kb EcoRI/BamHIフラグメント(CL-E1(192-326)-H6を包含するものを)をEcoRI/BamHIで消化されたpFPMT121(配列番号12、図3)と連結させた。反応のためには供給業者の推奨事項に従って、T4リガーゼ(ベーリンガー)を使用した。連結試料中のDNAをエタノールで沈降させ、10 μLのH₂O中に溶解させた。10 μLの連結試料を用いて、E. coli DH5α-F'細胞を形質転換させ、複数のアンピシリン耐性コロニーのプラスミドDNAをEcoRI及びBamHIでの消化により分析した。プラスミドクロンp37-5(pFPMT-CL-E1-H6; 配列番号21、図8)は、0.486 kb及び6.961 kbの所望のフラグメントサイズを示した。配列決定により、p37-

5 の C L - E 1 - H 6 の適正な配列を確認した。

【 0 1 6 6 】

実施例 3

p F P M T - M F - E 2 - H 6 及び p M P T - M F - E 2 - H 6 シヤトルベクターの構築

H a n s e n u l a p o l y m o r p h a の形質転換用プラスミドを以下の通りに構築した。M F - E 2 s (H C V E 2 アミノ酸 3 8 4 - 6 7 3) - V I E G R - H i s 6 (配列番号 5) をコードする D N A 配列を、プラスミド p S P 7 2 E 2 H 6 (配列番号 2 2、図 9) から 1 . 3 3 1 k b の E c o R I / B g l I I フラグメントとして単離した。このフラグメントを、供給業者の推奨事項に従って、T 4 D N A リガーゼ (ベーリンガーマンハイム (B o e h r i n g e r M a n n h e i m)) を用いて E c o R I / B g l I I で消化された p F P M T 1 2 1 (配列番号 1 2、図 C + 2) 又は p M P T 1 2 1 (配列番号 2 3、図 1 0) のいずれかと連結させた。E . c o l i を形質転換させ制限酵素消化により異なる形質転換体から単離されたプラスミド D N A を検査した後、陽性クローンを保留し、結果として得られたシヤトルベクターをそれぞれ p F P M T - M F - E 2 - H 6 (配列番号 2 2、図 1 1) 及び p M P T - M F - E 2 - H 6 (配列番号 2 3、図 1 2) と呼称した。

10

【 0 1 6 7 】

実施例 4

p F P M T - C L - E 2 - H 6 シヤトルベクターの構築

20

3 工程手順で、シヤトルベクター p F P M T - C L - E 2 - H 6 を組み立てた。E 2 コーディング配列が S c h w a n n i o m y c e s o c c i d e n t a l i s の - アミラーゼのシグナル配列の後ろでクローニングさせた。これは、シームレスクローニング方法 (パジエット (P a d g e t t) , K . A . および、ゾルゲ (S o r g e) J . A , 1 9 9 6) により行われた。

【 0 1 6 8 】

E 2 s - H 6 コーディング D N A フラグメントの生成

最初に、E 2 - H 6 をコードする D N A 配列 (リンカーペプチド「V I E G R」及び 6 H i s 残基、配列番号 5 で伸長された H C V E 2 のアミノ酸 3 8 4 - 6 7 3) を p S P 7 2 E 2 H 6 プラスミド (配列番号 2 4、図 1 1) から、P C R により増幅させた。使用したプライマーは、M F 3 0 E 2 / F 及び M F 3 0 E / R と記され、以下の配列を有している。

30

- プライマー M F E 2 / F ;

【 化 1 3 】

5'-agtcactcttca.aggcataccgcgtgtcaggaggg-3'

(配列番号 2 6) ; E a m I 1 0 4 I 部位には下線が付され、ドットは酵素の開裂部位をマークしている。S . o c c i d e n t a l i s シグナル配列の前後のコドンは太字で印刷されている ; マークの付いていない塩基は E 2 のコドン (H C V E 2 のアミノ酸 3 8 4 ~ 3 9 0) とアニールする。

40

- プライマー M F 3 0 E 2 / R

【 化 1 4 】

5'-agtcactcttca.cagggatccttagtgatgggtgatg-3'

(配列番号 2 7) ; E a m I 1 0 4 I 部位には下線が付され、ドットは酵素の開裂部位をマークしている。太字で印刷された塩基は、プライマー M F 3 0 - R e c h t s の塩基に対し相補的である。(以下参照)、構築物に導入されるべき B a m H I 部位は、イタリック体で印刷されている。マークされていない配列は停止コドン及び E 2 (3 8 4 - 6 7 3) - V I E R - H 6 (配列番号 5) の 6 つの末端 H i s コドンとアニールする。

【 0 1 6 9 】

50

反応混合物は、以下の通りに構成されていた；20 ngのpSP72E2H6の1.3 kb EcoRI / BglIIフラグメント各々0.2 μMのプライマーMF30E2 / F及びMF30E2 / R、dNTP（各々0.2 μMで）、1×緩衝液2（Expand Long Template PCRシステム；ベーリンガー、カタログ番号1681834）、2,5Uのポリメラーゼ混合物（Expand Long Template PCRシステム；ベーリンガー、カタログ番号1681834）を含有する合計体積50 μL。

【0170】

以下の工程から成るプログラム3を使用した

1. 変性； 95 で5分
2. 95 での変性30秒、65 でのアニーリング30秒、及び68 での伸長1分を10サイクル。
3. 4 での終結。

10

【0171】

その後、10 μLの10×緩衝液2（Expand Long Template PCRシステム；ベーリンガー、カタログ番号1681834）、40 μLのH₂O及び5 μLの[dATP、dGTP及びdTTP（各2 mM）；10 mM、5-メチル-dCTP]をPCRプログラム3に由来する試料に添加し、以下の工程から成るプログラム4で続行した。

1. 変性；95 で5分
2. 95 での変性45秒、65 でのアニーリング30秒、68 での伸長1分で5サイクル。
3. 4 で終結。

20

【0172】

PMF30由来の受容体プラスミドの生成

第2のフラグメントはプラスミドpMF30（配列番号28、図13）に由来し、アンプリコンは、S. occidentalisの成熟 - アミラーゼのコードンを除いて、完全なpMF30プラスミドであり、クローニングに関連する修飾をプライマー設計により導入した。以下のプライマーセットを使用した。

- プライマーMF30 - Links ;

30

【化15】

5'-agtcactcttca.cctcttgtcaaaaataatcggttgag-3'

（配列番号29；EamI104I部位には下線が付され、ドットは酵素の開裂部位をマークしている。太字で印刷された「cct」は、プライマーMF30E2 / Fの太字で印刷された「agg」に対し相補的である。（以上参照）；マークの付いていない及び太字印刷された塩基は、pMF30内のS. occidentalisの - アミラーゼのコードンの26の末端塩基とアニールする）- プライマーMF30 - Rechts ;

【化16】

5'-agtcactcttca.ctgcaggcatgcaagcttggcg-3'

40

（配列番号29；EamI104I部位には下線が付され、ドットは酵素の開裂部位をマークしている。太字で印刷された「ctg」は、プライマーMF30E2 / Rの太字印刷された「cag」に対し相補的である。（以上参照）マークの付いていない塩基はpMF30中のS. occidentalisの - アミラーゼの停止コードンの下流側のpUC18配列とアニールする。）

【0173】

反応混合物は、以下の通りに構成されていた；20 ngの - BglII - 線形化pMF30、各々0.2 μMのプライマーMF30 - Links及びMF30 - Rechts、dNTP（各々0.2 μMで）、1×緩衝液1（Expand Long Temp la

50

te PCRシステム；ベーリンガー：カタログ番号1681 834）、2.5 Uのポリメラーゼ混合物（Expand Long Template PCRシステム；Boehringer：カタログ番号1681 834）を含有する合計体積50 μL。両方のプログラムで1分から4分に延長された伸長時間を除き、上述のものと同じPCRプログラム（プログラム3及び4）を使用した。

【0174】

ベクターpAMY-E2の生成

PCRにより得たpMF30由来の受容体プラスミド及びE2s-H6コーディングDNAフラグメントを1%のアガロースゲル上のゲル電気泳動によりそのそれぞれのサイズに基づき検査した。供給業者の指示に従って、PCR産物精製キット（キアゲン）でPCR産物を精製した。その後、精製したフラグメントをEam11004Iで別々に消化した。供給業者の推奨事項に従ってT4リガーゼ（ベーリンガー（Boehringer））を用いることで、pMF30由来の受容体プラスミドとのE2s-H6フラグメントの連結を実施した。連結混合物を用いて、E.coli DH5 F'細胞を形質転換し、複数のクローンのプラスミドDNAをEcoRI/BamHI消化により分析した。陽性クローンを選択し、そのプラスミドをさらにpAMY-E2と呼称し、以下に記載するようなさらなる修飾のために利用した。

【0175】

ベクターpUC18-CL-E2-H6の生成

- アミラーゼシグナル配列のコドンと鳥類リゾチームプレ配列のコドンと置換する目的で、pAMY-E2をPCR誘導突然変異誘発に付した。これは、さらに「CL」と呼称され、鳥類リゾチームORFの最初の18個のアミノ酸（配列番号1）に対応している。この突然変異誘発のためには、以下のプライマーが用いられた：

- プライマー CL hin :

【化17】

5'-tgcttctaccactagcagcactaggacatacccgctgtcaggagggcag-3'

（配列番号30）及び

- プライマー CL2 her :

【化18】

5'-tagtactagtattagtaggcttcgcatggaattcactggccgctcgtttta-caacgtc-3'

（配列番号31）

【0176】

プライマーの下線のある5'領域は、鳥類リゾチームプレ配列の約半分のDNA配列を含有する。プライマーCL2 herは、SpeI（イタリック体）及びEcoRI（イタリック体、2重下線付き）制限部位を包含する。プライマーの下線の付されていない領域は、E2（CL2 hin）のアミノ酸残基384-392のコドン、又はEcoRI部位を越えてFMDプロモーターの位置-19（EcoRI部位から因子）までの「atg」開始コドンとアニールする。該プライマーは、完全なpAMY-E2ベクターを増幅し、かくして - アミラーゼシグナル配列のコドンと鳥類リゾチームプレ配列のコドンと置換する。

【0177】

PCR反応は、以下のプログラムに従って実施した：

1. 変性；95 で15分、
2. 95 での変性30秒、60 でのアニーリング1分、及び72 での伸長1分を35サイクル。
3. 4 での終結。

【0178】

以下の反応混合物を使用した：pAMY-E2（1 ng / μL）、1 μL；プライマー

10

20

30

40

50

CL hin (100 μM)、2 μL; プライマー CL 2 her (100 μM)、2 μL; dNTP (全て2.5 mM)、8 μL; H₂O、76 μL; Expand Long Template PCRシステム(ベーリンガー(Boehringer)); Cat No 1681 834) 緩衝液2 (10倍に濃縮)、10 μL; Expand Long Template PCRシステムポリメラーゼ混合物(1 U/μL)、0.75 μL。

【0179】

結果として得られたPCR産物を、1%のアガロースゲル上でゲル電気泳動により検査した。連結に先立ちPCRフラグメントを以下のように修飾した。3'-AオーバーハングをT4ポリメラーゼによって除去し、結果として、3'-及び5'-OH基を伴う平滑末端がもたらされた。さらに残った95 μLのPCR反応混合物に対して1 μLのT4ポリメラーゼ(Boehringer; 1 U/μL)を4 μL dNTPと共に(全て2.5 mMで)を添加した。37 °Cで20分間試料をインキュベートした。その後、DNAをエタノールで沈降させ16 μLの脱イオン水中に溶解させた。これに続いて平滑末端PCR産物に5'-リン酸塩を添加するためキナーゼ処理を行なった16 μLの溶解した平滑末端PCR産物に対して、1 μLのT4ポリヌクレオチドキナーゼ(ベーリンガー); 1 U/μL)、2 μLの10倍濃縮T4ポリヌクレオチドキナーゼ反応緩衝液(ベーリンガー)及び1 μLのATP(10 mM)を添加した。試料を37 °Cで30分間インキュベートした。

【0180】

その後、キナーゼ処理した試料を、1%のアガロースゲル上で分離した。供給業者の推奨事項に従って、ゲル抽出キット(キアゲン)を用いてアガローススライスからDNAを抽出した。その後50 ngの精製済み産物を、供給業者の条件に従ってT4リガーゼ(ベーリンガー)を用いて自己連結させた。16 °Cで16時間インキュベートした後、連結混合物中のDNAをエタノールで沈降させ、20 μLの水中で溶解させた(連結試料)。

【0181】

E. coli DH5α-F'細胞を10 μLの連結試料で形質転換した。複数のアンピシリン耐性クローンを単離されたプラスミドDNAの制限分析を用いて特徴づけした。陽性クローンをPUC18-CL-E2-H6と呼称し、これを以下で記載する通りのさらなる修飾のために使用した。

【0182】

シャトルベクターpFPMT-CL-E2-H6の生成
(CL-E2(384-673)-VIEGR-H6を包含する)pUC18-CL-E2-H6から0.966 kbのEcoRI/BamHIフラグメントを単離し、EcoRI/BamHIで消化されたpFPMT121(配列番号12、図3)の中に連結させた。反応のためには、供給業者の条件に従って、T4リガーゼ(ベーリンガー)を使用した。連結試料をエタノールで沈降させ、10 μLの水中で溶解させた。これを用いて、E. coli DH5α-F'細胞を形質転換し、制限分析の後に陽性クローンを保留し、それぞれのプラスミドをpFPMT-CL-E2-H6(配列番号32、図4)と呼称した。

【0183】

実施例5

pFPMT-CL-K-H6-E1シャトルベクターの構築

シャトルベクターの構築は、2工程から成る。

【0184】

第1工程では、pUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6構築物を、部位特異的突然変異誘発によって構築した。pUC18-FMD-CL-E1-H6を鋳型として使用した(配列番号20; 図7)。以下のプライマーを使用した。

- プライマー H6K hin neu :

10

20

30

40

【化19】

5'-catcacaatatgaggtgcgcaacgtgtccgggatgtac-3'

(配列番号37)

- プライマー H6KRK her neu :

【化20】

5'-gtgatggtggtgtcctagtgctgctagtggttaggaagcatag-3'

(配列番号38)

(付加的なコドンを提供する塩基には下線が付されている)。

10

【0185】

PCR反応混合物は、以下の通りに構成されていた：pUC18 - FMD - CL - E1 - H6 (2 ng / μL)、1 μL；プライマー H6K hin neu (100 μM) 2 μL；プライマー H6KRK her neu (100 μM)、2 μL；dNTP (各々2.5 mM)、8 μL；H₂O、76 μL；Expand Long Template PCRシステム (Boehringer；Cat No 1681 834) 緩衝液2 (10倍に濃縮)、10 μL；Expand Long Template PCRシステムポリメラーゼ混合物 (1 U / μL)、0.75 μL

【0186】

使用されたPCRプログラムは、以下の工程で構成されていた：

20

- 変性；95 で15分
- 95 での変性30秒、60 でのアニーリング1分、72 での伸長5分を35サイクル。
- 4 で終結。

【0187】

PCR試料のアリコートをして1%のアガロースゲル上で分析してそのサイズを検査し、それは適正なものであった (~4.2 kb)。

【0188】

その後、PCR産物からの3' - Aオーバーハングを、T4ポリメラーゼ反応によって除去し、3' - 及び5' - OH基を伴う平滑末端を結果としてもたらした。従って、PCR反応の残りの95 μLに対して、1 μLのT4ポリメラーゼ (Boehringer；1 U / μL) 及び4 μLのdNTP (各々2.5 mM) を添加した。試料を37 で20分間インキュベートした。その後、試料中のDNAをエタノールで沈降させ、16 μLのH₂O中で溶解させた。

30

【0189】

その後、キナーゼ反応により、平滑末端PCR産物に5' - リン酸塩を添加した。従って、16 μLの溶解した平滑末端PCR産物に対して、1 μLのT4ポリヌクレオチドキナーゼ (ベーリンガー)；1 U / μL)、2 μLの10倍濃縮T4ポリヌクレオチドキナーゼ反応緩衝液 (ベーリンガー) 及び1 μLのATP (10 mM) を添加した。試料を37 で30分間インキュベートした。

40

【0190】

その後、試料を、1%のアガロースゲル上に適用し、供給業者の条件に従ってゲル抽出キット (キアゲン) を用いて適正な産物バンドを単離した。その後50 ngの精製済み産物を、供給業者の推奨事項に従ってT4リガーゼ (ベーリンガー) を用いて自己連結させた。16 で72時間インキュベートした後、連結混合物中のDNAをエタノールで沈降させ、10 μLの水の中に溶解させた。

【0191】

E. coli DH5 - F'細胞を5 μLの連結試料で形質転換した。複数のアンピシリン耐性コロニーを制限酵素消化により分析し、陽性クローンを保留し、対応するプラスミドを次のように呼称した；pUC18 - FMD - CL - H6 - E1 - K - H6 (配列

50

番号39、図17)。

【0192】

第2工程では、2フラグメント連結によりトランスファベクターを構築した。以下では、BclI 附着末端を伴う構築フラグメントが関与した。BclI は、メチル化されていないDNA上でのみその部位を開裂できることから、E. coli dam-菌株を、関与するプラスミドpUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6(配列番号39、図17)及びpFPMT-CL-E1(配列番号36、図16)で形質転換させた。各々の形質転換から、アンピシリン耐性コロニーを採取し、液体培養中で増殖させ、メチル化されていないプラスミドDNAをさらなる使用のために調製した。(FMDプロモーター、CL-H6-K単位のコドン及びE1の開始部分を包含する)未メチル化プラスミドpUC18-FMD-CL-H6-K-E1-H6の1.273kbのBclI/HindIIIフラグメント、及び(FMDプロモーターを除きpFPMT121にあるエレメントならびにC末端Hisタグを伴わないBclI部位から始まったE1読取り枠の欠如部分を包含する)プラスミドpFPMT-CL-E1の6.057kbのBclI/HindIIIフラグメントを調製し、供給業者の仕様に従って合計体積20μLでT4リガーゼ(ペーリンガー)を用いて16℃で72時間連結させた。その後、連結混合物を脱塩する目的でこの混合物を無菌脱イオン水上で浮遊する1片のニトロセルロース膜の上に置いた(室温で30分間のインキュベーション)。5μLの脱塩試料での電気泳動によりE. coli TOP10細胞を形質転換した。制限酵素消化により、結果として得られた複数のアンピシリン耐性コロニーのプラスミドDNAを分析した。陽性クローンを保留し、これをpFPMT-CL-H6-K-E1(配列番号40、図18)と呼称した。

【0193】

実施例6

Hansenula polymorphaの形質転換及び形質転換体の選択

H. polymorpha菌株RB11を、実施例1~5に記載されている通りの異なる親シャトルベクターでの修飾(Roggenkamp, R.)ら、1986)を用いて、形質転換させた(基本的にKlebe, R.J.)ら、1983)に記載の通りのPEG媒介DNA摂取プロトコル)。各々の形質転換について、72ウラシル原栄養コロニーを選択し、以下の手順により菌株生成のために使用した。各コロニーについて、2mLの液体培養を、48時間試験管の中で(37℃; 160rpm; 角度45°)、選択培地(YNB/グルコース、Difco)内に接種し増殖させた。この工程は、第1継代工程として定義づけされる。第1の継代工程の培養の150μLのアリコートを用いて、2mLの新鮮なYNB/グルコース培地に接種した。ここでも又、上述のように培養をインキュベートした(第2の継代工程)。一緒にかかる継代工程を8回実施した。2mLの非選択的YPD培地(Difco)を接種するために、第3及び第8の継代工程の実施後の培養アリコートを使用した。37℃で48時間のインキュベーション(160rpm; 角度45°; いわゆる第1の安定化工程)の後、これらのYPD培養の150μLのアリコートを用いて、上述のとおりインキュベートした新鮮な2mLのYPD培養を接種した(第2の安定化工程)。その後第2の安定化工程の培養のアリコートを、選択的YNB/寒天を含有する平板上で、画線培養した。これらの平板を、肉眼的コロニーが目に見えるようになるまで4時間インキュベートした。各分離の明確な単一のコロニーを菌株として定義し、さらなる発現分析のために使用した。

【0194】

発現分析を小規模振とうフラスコ培養上で実施した。上述のYNB/寒天平板からコロニーを採取し、2mLのYPD内に接種し、上述のように48時間インキュベートした。この2mLのアリコートを、2mLの振とうフラスコ培養のための種培養として用いた。培地として、YPグリセロール(1%)を用い、振とうフラスコを回転振とう機(200rpm、37℃)上でインキュベートした。48時間の増殖後、発現カセットの誘発のため1%のMeOHを培養に加えた。異なる時間的間隔で、1mLアリコートの細胞ペレットを収集し、さらなる分析まで-20℃で保管した。SDS-PAGE/ウエスタンブロ

ッティングにより、特異的タンパク質発現を分析した。従って、細胞ペレットを試料緩衝液（トリスHCl - SDS）中で可溶化させ、95℃で15分超の間インキュベートした。

【0195】

15%のポリアクリル - アミドゲル上でタンパク質を分離し、ニトロセルロース膜上にブロットングした（湿式ブロット；重炭酸塩緩衝液）。特異的マウス抗E1（IGH201）又はマウス抗E2（WO96/04385の中でメルテンスら、によって記載されたIGH216）を第1の抗体として用いて、ブロットを発達させ、ウサギ抗マウス - APを第2の抗体として使用した。NBT - BCIPで染色を実施した。

【0196】

さらなる調査のため、陽性菌株を保留した。

【0197】

振とうフラスコ発現実験の中で、これらの陽性クローンのうちの5個を使用した。それぞれの菌株のコロニーをYNB平板から採取し、2mLのYPDを接種するのに使用した。これらの培養を上述の通りにインキュベートした。この細胞懸濁液を用いて、500mL入り振とうフラスコ内で100mLのYPD培地の第2の種培養を接種した。この振とうフラスコを37℃、200rpmで48時間回転振とう機上で培養した。この種培養の25mLのアリコートを用いて、250mLのYPグリセロール（1%）培地に接種し、バッフル付き2L入り振とうフラスコの中で上述の条件下でインキュベートした。接種から48時間後に、1%のMeOH（プロモーター誘発）を添加し、振とうフラスコをさらに上述の条件下でインキュベートした。誘発から24時間後に、実験を停止し、遠心分離により細胞ペレットを収集した。SDS - PAGE / ウエスタンブロットングにより5つの異なるクローンの発現レベルを分析した（条件は上述の通り）。ゲル上の各クローンの滴定系列を投入し、生産性の最も高い菌株をさらなる発酵及び精製試行のために選択した。

【0198】

驚くべきことに、*Pichia pastoris* (Gellissen, G. 2000)に近い関係をもつ酵母菌株である*H. polymorpha*は、基本的に過剰グリコシル化無しの、ひいてはHCV組換え型ワクシニアウイルスに感染した哺乳動物の細胞により発現されるHCVウイルス様粒子に匹敵するサイズの糖部分を伴うHCVタンパク質を発現することができる。

【0199】

*Hansenula polymorpha*菌株RB11は、UCLのマイコテーク (MUC L) ルーヴァンカトリック大学菌学研究所 (Place Croix du Sud 3bte 6, B - 1348 Louvain - la - Neuve、ベルギー) にブタベスト条約の条件に基づき2002年4月19日に寄託され、MUC L受託番号MUC L 43805を有する。

【0200】

実施例7

pSY1aMFE1sH6aベクターの構築

S. cerevisiae 発現プラスミドを以下の通りに構築した。E1コーディング配列をpGEMT - E1sH6（配列番号6、図1）からのNsI1 / Eco52Iフラグメントとして単離し、これを（T4DNAポリメラーゼを用いて）平滑末端化し、供給業者の仕様に従ってT4DNAリガーゼ（ベーリンガー）を用いてpY1G5ベクター（配列番号41、図19）内でクローニングした。クローニングは、E1s - H6コーディングフラグメントが直接的にかつaMFコーディング配列と同一枠内で接合されるようなものであった。連結混合物を*E. coli* DH5 F'細胞内で形質転換させた。その後、複数のアンピシリン耐性クローンのプラスミドDNAを制限消化により分析し、陽性クローンを保留し、pYIG5E1H6（ICCG3470；配列番号42、図20）と呼称した。

10

20

30

40

50

【0201】

(His-tag を伴うE1sコーディング領域及び MF-配列を含有する)発現カセットを、BamHIで消化したE.coli/S.cerevisiae pSY1シャトルベクター(配列番号21、図43)内にpYIG5E1H6のBamHIフラグメント(2790bp)として移した。供給業者の条件に従って、T4DNAリガーゼ(ベーリンガー)で連結を実施した。連結混合物をE.coli DH5 F'細胞へと形質転換し、複数のアンピシリン耐性コロニーのプラスミドDNAを制限酵素消化により分析した。陽性クローンを保留し、これをpSY1aMFE1sH6a(ICC G3479;配列番号44、図22)と呼称した。

【0202】

実施例8

pSY Y I G S E 2 H 6ベクターの構築

S.cerevisiae 発現プラスミドpSY Y I G S E 2 H 6を以下の通りに構築した。E2コーディング配列をpBSK-E2sH6(配列番号45、図23)からのSalI/KpnIフラグメントとして単離し、これを(T4DNAポリメラーゼを用いて)平滑末端化し、その後、供給業者の仕様に従ってT4DNAリガーゼ(ベーリンガー)を用いてpY1G5ベクター(配列番号41、図19)内でクローニングした。クローニングは、E2-H6コーディングフラグメントが直接的にかつaMFコーディング配列と同一枠内で接合されるようなものであった。次に、連結混合物をE.coli DH5 F'細胞内で形質転換させ、複数のアンピシリン耐性クローンのプラスミドDNAを制限消化により分析し、陽性クローンを保留し、pYIG5HCC L-22aH6(ICC G2424;配列番号46、図24)と呼称した。

【0203】

(His-tag を伴うE2(384-673)コーディング領域及び MF-配列を含有する)発現カセットを、BamHIで開かれたE.coli/S.cerevisiae pSY1シャトルベクター(配列番号43、図21)内にpYIG5HCC L-22aH6のBamHIフラグメント(3281bp)として移した。供給業者の条件に従って、T4DNAリガーゼ(ベーリンガー)で連結を実施した。連結混合物をE.coli DH5 F'細胞へと形質転換し、複数のアンピシリン耐性コロニーのプラスミドDNAを制限酵素消化により分析した。制限陽性クローンを保留し、これをpSY I G S E 2 H 6(ICC G2466;配列番号47、図25)と呼称した。

【0204】

実施例9

pSY 1 Y 1 G 7 E 1 sベクターの構築

S.cerevisiae 発現プラスミドpSY 1 Y 1 G 7 E 1 sを以下の通りに構築した。E1コーディング配列をpGEMT-E1s(配列番号6、図1)からのNsiI/Eco52Iフラグメントとして単離し、これを平滑末端化し、供給業者の仕様に従ってT4DNAリガーゼ(ベーリンガー)を用いてpY1G7ベクター(配列番号48、図26)内でクローニングした。クローニングは、E1コーディングフラグメントが直接的にかつaMFコーディング配列と同一枠内で接合されるようなものであった。連結混合物をE.coli DH5 F'細胞へと形質転換させ、複数のアンピシリン耐性クローンのプラスミドDNAを制限消化により分析し、陽性クローンを保留し、pY I G 7 E 1(配列番号49、図27)と呼称した。

【0205】

(E1(192-326)コーディング領域及びCLリーダー配列を含有する)発現カセットを、BamHIで消化したE.coli/S.cerevisiae pSY1シャトルベクター(配列番号43、図21)内にpYIG7E1のBamHIフラグメント(2790bp)として移した。供給業者の条件に従って、T4DNAリガーゼ(ベーリンガー)で連結を実施した。連結混合物をE.coli DH5 F'細胞へと形質転換し、複数のアンピシリン耐性コロニーのプラスミドDNAを制限酵素消化により分析した

10

20

30

40

50

。陽性クローンを保留し、これを pSY1YIG7E1s (配列番号50、図28) と呼称した。

【0206】

実施例10

Saccharomyces cerevisiae の形質転換及び形質転換体の選択
Saccharomyces cerevisiae 内で過剰発現されたタンパク質について報告されることの多い過剰グリコシル化の問題を克服するために、突然変異体スクリーニングをセットした。このスクリーニングは、自然発生的劣性オルトバナジウム酸塩耐性突然変異体を選択する Ballou の方法 (Ballou L.ら、1991) に基づいていた。初期菌株選択は、未変性グル電気泳動の後に見られるようなインペルターゼのグリコシル化パターンに基づいて実施された。グリコシル化能力が低減した菌株を、さらなる組換え型タンパク質発現実験のために保留し、これは菌株 IYCC155 より優勢であった。突然変異の性質についてはこれ以上研究しなかった。

10

【0207】

前記グリコシル化欠損菌株 IYCC155 を、基本的にエルブル (Eible, R. 1992) によって記載されているような酢酸リチウム方法により、実施例7~9で記載した通りにプラスミドで形質転換させた。選択的 YNB + 2% の寒天平板 (Difco) から複数の Ura 相補菌株を採取し、2ml の YNB + 2% グルコースを接種するために使用した。これらの培養を 37 で72時間、軌道振とう機上で 200 rpm でインキュベートし、E1 特異的マウスモノクローナル抗体 (IGH201) で発達させたウエスタンブロットにより、E1 の発現のため、培養上清及び細胞内画分を分析した。さらなる実験のため、生産性の高いクローンを保留した。

20

【0208】

ここで使用される S. cerevisiae グリコシル化欠損突然変異内のタンパク質の発現は、野生型 S. cerevisiae 菌株に比べて低いバイオマス収量ひいては所望のタンパク質のより低い収量を導く、かかる菌株の最適以下の増殖特性により妨げられている。所望のタンパク質の収量は、なおも哺乳動物細胞中よりも実質的に高いものであった。

【0209】

実施例11

pPICZalphaD'E1sH6 及び pPICZalphaE'E1sH6 ベクターの構築

pPICZalphaA ベクター (Invitrogen; 配列番号51、図29) から出発して、シャトルベクター pPICZalphaE'E1sH6 を構築した。第1工程では、それぞれ KEX2 又は STE13 処理用プロテアーゼの開裂部位のすぐ後ろで E1 コーディング配列のクローニングを可能にするように、前記ベクターを適合させた。従って、XhoI 及び NotI で pPICZalphaA を消化した。消化物を 1% のアガロースゲル上で分離させ、3519 kb のフラグメント (ベクターの大部分) を、ゲル抽出キット (キアゲン) を用いて単離させ精製した。この FG を、その後、供給業者の条件に従って特異的オリゴヌクレオチドの存在下で T4 ポリメラーゼ (ペーリンガー) を用いて連結させて、pPICZalphaD' (配列番号52、図30) 又は pPICZalphaE' (配列番号53、図31) を生成した。

30

40

【0210】

以下のオリゴヌクレオチドを使用した。

- pPICZalphaD を構築するためには ;

【化21】

8822: 5'-TCGAGAAAAGGGGCCCGAATTCGCATGC-3'

(配列番号54) 及び

【化 2 2】

8823: 5'-GGCCGCATGCGAATTCGGGCCCCTTTTC-3'

(配列番号 5 5)

これは、アニーリングの後、以下のリンカーオリゴヌクレオチドを生成する：

【化 2 3】

TCGAGAAAAGGGGCCCGAATTCGCATGC

(配列番号 5 4)

【化 2 4】

CTTTTCCCCGGGCTTAAGCGTACGCCGG

(配列番号 5 5)

- p P I C Z a l p h a E を構築するためには、

【化 2 5】

8649: 5'-TCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCCTGCAGCATATGC-3'

(配列番号 5 6)

【化 2 6】

8650: 5'-GGCCGCATATGCTGCAGGCTTCAGCCTCTCTTTTC-3'

(配列番号 5 7)

これは、アニーリングの後、以下のリンカーオリゴヌクレオチドを生成する：

【化 2 7】

TCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCCTGCAGCATATGC

(配列番号 5 6)

【化 2 8】

CTTTTCTCTCCGACTTCGGACGTCGTATACGCCGG

(配列番号 5 7)

【 0 2 1 1】

これらのシャトルベクター p P I C Z a l p h a D ' 及び p P I C Z a l p h a E ' は、それぞれの処理用プロテアーゼ、K E X 2 及び S T E 1 3 の開裂部位の直ぐ後ろにクロニング部位を新たに導入した。

【 0 2 1 2】

E 1 - H 6 コーディング配列を p G E N T - E 1 s H 6 (配列番号 6、図 1) から N s I 1 / E c o 5 2 I フラグメントとして単離させた。1%のアガロースゲル上での消化物の分離の後、ゲル抽出キット(キアゲン)を用いて、フラグメントを精製した。結果として得たフラグメントを(T 4 D N A ポリメラーゼを用いて)平滑末端化し、それぞれの処理用プロテアーゼ開裂部位の直ぐ後ろで p P I C Z a l p h a D ' 又は p P I C Z a l p h a E ' のいずれかの中に連結させた。

【 0 2 1 3】

連結混合物を E . c o l i T O P 1 0 F ' 細胞に形質転換し、複数のゼオシン耐性コロニーのプラスミド D N A を制限酵素消化により分析した。陽性クローンを保留し、それぞれ p P I C Z a l p h a D ' E 1 s H 6 (I C C G 3 6 9 4 ; 配列番号 5 8、図 3 2) 及び p P I C Z a l p h a E ' E 1 s H 6 (I C C G 3 4 7 5 ; 配列番号 5 9、図 3 3) を呼称した。

【 0 2 1 4】

実施例 1 2

10

20

30

40

50

pPICZalphaD'E2sH6及びpPICZalphaE'E2sH6ベクターの構築

実施例11で記載された通りにシャトルベクターpPICZalphaD'及びpPICZalphaE'を構築した。

【0215】

E2-H6コーディング配列をpBSK-E2sH6(配列番号45、図23)からSalI/KpnIフラグメントとして単離させた。1%のアガロースゲル上での消化物の分離の後、ゲル抽出キット(キアゲン)を用いて、フラグメントを精製した。結果として得たフラグメントを(T4DNAポリメラーゼを用いて)平滑末端化し、それぞれの処理用プロテアーゼ開裂部位の直ぐ後ろでpPICZalphaD'又はpPICZalphaE'のいずれかの中に連結させた。

10

【0216】

連結混合物をE.coliTOP10F'細胞に形質転換し、複数のゼオシン耐性コロニーのプラスミドDNAを制限酵素消化により分析した。陽性クローンを保留し、それぞれpPICZalphaD'E2sH6(ICCG3692;配列番号60、図34)及びpPICZalphaE'E2sH6(ICCG3476;配列番号61、図35)を呼称した。

【0217】

実施例13

Pichia pastorisの形質転換及び形質転換体の選択

20

実施例11及び12に記載されている通りのP.pastorisシャトルプラスミドを、供給業者の条件(Invitrogen)に従ってP.pastoris細胞へと形質転換させた。E1-及びE2-産生菌株をさらなる特徴づけのために保留した。

【0218】

過剰グリコシル化が通常不在(Gellissen、G.2000)であり以前のGST融合として Deng 熱ウイルスEタンパク質を発現するために使用されている(Sugrue)、R.J.ら、1997)という事実のために周知の酵母菌株であるP.pastorisの中で、HCVウイルス様粒子を発現させた。注目すべきことに、結果として得られたP.pastoris発現されたHCVウイルス様粒子は、野生型Saccharomyces菌株で見られるものに匹敵するグリコシル化を示した。より詳細に言うと、P.pastorisにより産生されたHCVウイルス様粒子は、過剰グリコシル化される(形質転換されたP.pastoris細胞から単離されたタンパク質のウエスタンブロットの中で検出される発現産物の分子量に基づく)。

30

【0219】

実施例14

Saccharomyces cerevisiae、Hansenula polymorpha及びPichia pastorisのための培養条件

Saccharomyces cerevisiae

セルバンキング

選択された組換え型クローンから、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクを調製した。対数増殖中期の振とうフラスコ培養(発酵種培養の場合と同様のインキュベーション条件、以下参照)からクリオ-バイアル(cryo-vials)を調製した。凍結防止剤としてグリセロール(最終濃度50%)を添加した。

40

【0220】

発酵

低温保存されたワーキングセルバンクから種培養を開始し、48時間200rpm、37で2L入り振とう三角フラスコの中で500mLの培地(2%のスクロールを補足したYNB、Difco)内でこれを増殖させた。

【0221】

発酵は、標準的には、15Lの作業体積でBiostat C発酵装置の中で実施され

50

た(ビー・ブラウン社(B. Braun Int.,)ドイツ、メルズンゲン(Melsungen, Germany))。発酵培地は、炭素源として1%の酵母エキス、2%のペプトン及び2%のスクロースを含有していた。消泡剤としてポリエチレングリコールを使用した。

【0222】

標準的に温度、pH及び溶存酸素を、発酵中制御した。表1に適用可能な設定点をまとめる。溶存酸素を、攪拌及び/通気によりカスケード制御した。NaOH(0.5M)又はH₃PO₄溶液(8.5%)を添加することによってpHを制御した。

【0223】

【表1】

表1. S.cerevisiaeの発酵用の標準的パラメータ設定値

パラメータ	設定値
温度	33 - 37 °C
pH	4.2 - 5.0
DO (成長期)	10 - 40 %空気飽和
DO (誘導)	0 - 5 %
通気	0.5 - 1.8 vvm*
攪拌	150 - 900 rpm

* 1分あたりの体積置換

【0224】

発酵を10%の種培養の添加により開始した。増殖期間中、スクロース濃度をHPLC分析によりオフラインで監視した(Polysphere Column OAKC Merck)

【0225】

増殖期中溶存酸素をカスケード制御により制御した(攪拌/通気)。スクロースが完全に代謝した後、濃度を約0.5%に維持するべくEtOHを段階的に添加することで補充しながら内部で産生したエタノールにより異種pN産生を駆動した(オフラインHPLC分析、polysphere OAKCカラム)。この誘導期の間、溶存酸素を、空気流速及び攪拌機速度の手動式調整により、5%の空気飽和未満に制御した。

【0226】

標準的には、細胞ペレットを得るためタンジェンシャルフローろ過を介した濃縮とそれに続く濃縮した細胞懸濁液の遠心分離により、誘導から48~72時間後に発酵物を収獲した。直ちに分析されない場合には、細胞ペレットを-70で保管した。

【0227】

Hansenula polymorpha
セルバンキング

選択された組換え型クローンから、マスターセルバンク及びワーキングセルバンクを調製した。対数増殖中期の振とうフラスコ培養(発酵種培養の場合と同様のインキュベーション条件、以下参照)からクリオ-バイアルを調製した。凍結防止剤としてグリセロール(最終濃度50%)を添加した。

【0228】

発酵

低温保存された(-70)ワーキングセルバンクから種培養を開始し、48時間200rpm、37で2L入り三角振とうフラスコの中で500mLの培地(YPD、Difco)内でこれを増殖させた。

10

20

30

40

50

【0229】

発酵は、標準的には、15 Lの作業体積で *Biostat C* 発酵装置の中で実施された (*B. Braun Inc.*、*Melsungen*、ドイツ)。発酵培地は、炭素源として1%の酵母エキス、2%のペプトン及び1%のグリセロールを含有していた。消泡剤としてポリエチレングリコールを使用した。

【0230】

標準的に温度、pH、空气中及び溶存酸素を、発酵中制御した。表2に適用可能な設定点をまとめる。溶存酸素を、攪拌及び/通気によりカスケード制御した。NaOH (0.5 M) 又は H_3PO_4 溶液 (8.5%) を添加することによってpHを制御した。

【0231】

【表2】

表2. *H. polymorpha*の発酵用の標準的パラメータ設定値

パラメータ	設定値
温度	30 - 40 °C
pH	4.2 - 5.0
DO	10 - 40 %空気飽和
通気	0.5 - 1.8 vvm*
攪拌	150 - 900 rpm

* 1分あたりの体積置換

【0232】

発酵を10%の種培養の添加により開始した。増殖期中、グリセロール濃度をオフラインで監視し (*Polysphere Column OAKC merck*)、完全なグリセロール消費から24時間後に1%メタノールを添加して異種タンパク質の発現を誘導した。細胞ペレットを得るためタンジェンシャルフローろ過を介した濃縮とそれに続く濃縮した細胞懸濁液の遠心分離により、誘導から24時間後に発酵を収獲した。直ちに分析されない場合には、細胞ペレットを -70 °C で保管した。

【0233】

Pichia pastoris

振とうフラスコ培養中に、組換え型 *Pichia pastoris* での小規模タンパク質産生実験をセットした。YPD培地 (*Difco*) 内で一晚、種培養を増殖させた。初期培地のpHを4.5に補正した。回転振とう機上で37 °C、200~250 rpmで振とうフラスコをインキュベートした。

【0234】

小規模産生は、標準的に2 L入り振とうフラスコ内で500 mLの規模で実施し、1%の酵母エキス、2%のペプトン (共に *Difco*) 及び2%のグリセロールを炭素源として含有する発現培地で10%の接種から始めた。接種条件は、種培養の場合と同様であった。誘導は、接種から約72時間後に1%のMeOHの添加により開始した。遠心分離により、誘導から24時間後に細胞を収集した。直ちに分析されない場合、細胞ペレットを -70 °C に保管した。

【0235】

実施例15

選択された酵母細胞内で発現されたMfa-E1-H6及びMfa-E2-H6タンパク質からのリーダーペプチドの除去

*S. Cerevisiae*のa-交配因子 (aMF) リーダー配列を伴うHCVE1及びE2タンパク質構築物の *Hansenula polymorpha* 及び *Saccharomyces cerevisiae* グリコシル化マイナス菌株の中の発現産物をさ

10

20

30

40

50

らに分析した。両方の遺伝子型 1b HCV E1s (aa192-326) 及び HCV E2s (VIEGR (配列番号69) - 配列で伸長された aa383-673) は、共に C 末端 his タグ付けされた (H6、HHHHHH、配列番号63; この HCV タンパク質は本例ではさらに MF-E1-H6 及び MF-E2-H6 と記される) タンパク質として発現されたため、酵母細胞の塩化グアニジニウム (GuHCl) 可溶化後の発現済み産物の迅速かつ効率の良い精製が Ni-IDA (Ni-イミノジ酢酸) 上で実施された。簡単に言うと、細胞ペレットを 50 mM のリン酸塩、6 M の GuHCl、pH 7.4 (9 vol/g の細胞) 中に再懸濁させた。320 mM (4% w/v) の亜硫酸ナトリウム及び 65 mM (2% w/v) の 4 チオン酸ナトリウムの存在下で室温 (RT で一晩、タンパク質をスルホン化した。溶解物を、遠心分離 (10,000 g、30 分、4) による凍結 - 解凍サイクルの後に清澄させ、エンピゲン (アイブライト & ウィルソン (Aibright & Wilson)、英国) 及び イミダゾールを、それぞれ 1% (w/v) 及び 20 mM の最終濃度まで上清に添加した。試料をろ過し (0.22 µm)、Ni-IDA セファロース FF カラム上に投入し、50 mM のリン酸塩、6 M の GuHCl、1% のエンピゲン (緩衝液 A) に 20 mM のイミダゾールを補足したものをを用いてこれを平衡化した。その後、カラムをそれぞれ 20 mM 及び 50 mM のイミダゾールを含有する緩衝液 A を用いて、280 nm という達成基線レベルまで洗浄した。緩衝液 D、50 mM リン酸塩、6 M の GuHCl、0.2% (E1 について) 又は 1% (E2 について) エンピゲン、200 mM イミダゾールを適用することによって、his タグ付生成物を溶出させた。溶出した材料を、E1 (IGH201)、又は E2 (IGH212) に対し向けられた特異的モノクローナル抗体を用いた SDS-PAGE 及び ウエスタンブロットにより分析した。

【0236】

E1 産物を、Edman 分解により直ちに分析した。

【0237】

この工程で、SDS-PAGE はすでに HCV E2 についてのタンパク質バンドのきわめて複雑なピクチャを顕示したため、サイズ排除クロマトグラフィーによるさらなる分留を実施した。Ni-IDA 溶出液を、限外ろ過 (MWC10kDa、centiplex、Amicon、millipore) により濃縮し、PBS、1% エンピゲン又は PBS、3% エンピゲン中で Superdex G200 (10/30 又は 16/10; Pharmacia) 上に投入した。80 kDa と 45 kDa の間の Mr をもつ E2 産物を含有する溶出画分、すなわち、SDS-PAGE (図 381 上の遊走に基づく図 37 中の溶出プロフィールの画分 17-23 をプールし、アルキル化させた (RT で 3 時間 10 mM の DTT でのインキュベーションとそれに続く RT で 3 時間の 30 mM のヨードアセタミドでのインキュベーション)。アミノ末端配列決定のための試料は EndoH (ロシユバイオケミカルズ) で処理するか、又は未処理のまま放置した。アミノ末端配列決定のための PVDf 膜上で、グリコシル化及び脱グリコシル化された E2 産物をプロットした。グリコシル化及び脱グリコシル化した E2 のアミドブラックで染色したプロットは、図 39 に示されている。

【0238】

E1 及び E2 の両方の精製済み産物の配列決定から、残念なことに、HCV ウイルス様粒子からのシグナル配列の除去が部分的にしか発生していないという考察が導かれる (表 3 参照)。さらに、副産物の大部分 (分解産物及びなおもリーダー配列又はその一部分を含有する産物) は、グリコシル化されている。このグリコシル化は、部分的であれ、N-グリコシル化部位をも含有するシグナル配列の未開裂フラグメント上にある。これらの部位とは、グリコシル化された副産物を少なくする結果となるように突然変異させることができる。しかしながら、より一層問題が大きいのは、交互に開裂された一部の産物が所望の無傷のエンベロープタンパク質に比べて 1~4 個のアミノ酸の差異しかないという発見事実にある。その結果、適正にプロセッシングされた産物の精製は、異なる発現産物間に充分に弁別できる生化学物特性が欠如しているために、事実上不可能である。分解産物のいくつかは、a-交差因子リーダーの開裂にも必要とされかくしてこの必須プロセスを混

10

20

30

40

50

乱させることなく遮断され得ないKex - 2様の開裂（例えば、アルギニンの後での開裂であるE1のaa196後に見られる開裂）の結果であり得る。

【0239】

pSY1YIG7E1s（配列番号50；図28）での*S. Cerevisiae* IYCC155の形質転換から誘導された高E1生産性クローンを、pSY1aMFE1sH6aYIG1E1s（配列番号44；図22）での*S. Cerevisiae* IYCC155の形質転換から誘導された高生産性クローンと比較した。E1タンパク質の細胞内発現を誘導から2～7日後に、E1特異的モノクローナル抗体（IGH201）を用いてウエスタンブロットを用いて評価した。図40から判断できるように、両方の菌株について2日後に最大の発現が観察されたが、両方の菌株についての発現パターンは全く異なっている。 - 交因子リーダーでの発現は、非常に複雑なバンドパターンを結果とともたすが、これは、リーダーのプロセッシングが効率の良いものではないという事実由来する結果である。こうして、異なるアミノ末端をもち一部が1～5N-グリコシル化により修飾されている複数の発現産物が導かれる。しかしながら、CLリーダーで発現されたE1については、制限された数の全く異なるバンドが目に見え、このことは、適正なCLリーダーの除去レベルが高いこと及び、同じCLリーダーが発現されたHansenula由来のE1について観察されるようにN-グリコシル化（1～5鎖）によって、この適正にプロセッシングされた材料のみを修飾することができるという事実を反映している。（実施例6参照）。

10

【0240】

E1に対し導かれたモノクローナル抗体（IGH201）を産生するハイドーマ細胞系統は、欧州細胞培養収集機関、応用微生物学研究センター、ウイルトシャー州、ソールズベリー（Salisbury, Wiltshire）SP4 0JG、英国においてブタベスト条約の条件下で1998年3月12日に寄託され、受託番号ECACC98031216を有している。E2に対して向けられたモノクローナル抗体（IGH212）は、WO96/04385中でメルテンスら、により実施例7.4中に抗体12D11F2として記載されている。

20

【0241】

【表3】

表3. S. Cerevisiae又はH. Polymorpha内で発現されたMF-E1-H6及びMF-E2-H6タンパク質のN末端の同定。N末端配列決定に基づいて、成熟E1-H6及びE2-H6タンパク質のN末端の量を推定することができた（「成熟」というのは、MFシグナル配列の適正な除去を表す）。タンパク質産物の合計量を、Edman分解により回収されたピークの強度に基づいてタンパク質のpmolとして計算した。その後、各々の特異的タンパク質について（すなわち各々の「検出されたN末端」について）、合計に対するモル%を推定した。

酵母	α MF-E1-H6	α MF-E2-VIEGR-H6
S. cerevisiae	<u>実験1</u> - 16%のタンパク質がなおも α MF配列を含有する - 18%のタンパク質が、E1のaa195と196の間で開裂された - 66%のタンパク質は、適正に α MFが除去されている	/
	<u>実験2</u> - 18%のタンパク質がなおも α MF配列を含有する - 33%のタンパク質がE1のaa195と196の間で開裂された - その他のタンパク質の8%がその他のE1開裂産物である - 44%のタンパク質は、適正に α MFが除去されている	/
H. polymorpha	- 64%のタンパク質がなお α MF配列を含有する - 6%のタンパク質が、E1のaa192と193の間で開裂されている - 30%のタンパク質は、適正に α MFが除去されている	- 75%のタンパク質はなおも α MF配列を含有する - 25%のタンパク質は、適正に α MFが除去されてる

10

20

【0242】

実施例16

大規模産生及び精製に適した酵母中のE1構築物の発現

S. Cerevisiae α MFリーダーペプチドに置き換えるため、CHH (Carcinus maenas 高血糖ホルモンのリーダー配列)、Amg1 (S. Occidentalis からのアミラーゼのリーダー配列)、Gam1 (S. Occidentalis からのグルコアミラーゼのリーダー配列)、Phy5 (真菌性フィターゼからのリーダー配列)、pho1 (Pichia pastoris からのリーダー配列)及びCL (鳥類リゾチームC、1,4-ベータ-N-アセチルムラミダーゼCのリーダー)を含むその他の複数のリーダー配列を使用し、E1-H6 (すなわちC末端his-タグを伴うE1)に連結させた。全ての構築物を、Hansenula polymorpha 内で発現させ、結果として得られた細胞溶解物の各々をウエスタンブロット分析に付した。これによりすでに、CLがリーダーペプチドとして使用される構築物を除いて、リーダー又はシグナル配列又はペプチドの除去程度がきわめて低いという結論を下すことができた。このことは、Ni-IDAで精製された材料のEdman分解により、CHH-E1-H6構築物について確認された：複数の異なる配列が回収されたものの、適正に開裂された産物を検出することはできなかった (表4参照)。

30

40

【0243】

【表 4】

表 4. PVDF膜に対するSDS-PAGE及びブロッティングによる分離の後の異なるタンパク質バンドの N 末端アミノ酸配列決定に基づく *H. polymorpha* の中で発現された CHH-E1-H6 タンパク質の N 末端の同定

分子サイズ	同定されたN末端
45 kD	CHHリーダーのアミノ酸 27 から開始=プレ配列のみ開裂、プロ配列はなおも付着されている
26 kD	- CHHリーダーのアミノ酸1から部分的に開始=プレプロ配列の除去無し - CHHリーダーのアミノ酸9から部分的に開始=第2のAUGコドンから開始する 代替的翻訳の産物
24 kD	- CHHリーダーのアミノ酸1から部分的に開始=プレプロ配列の除去無し - CHHリーダーのアミノ酸9から部分的に開始=第2のAUGコドンから開始する 代替的翻訳の産物

10

【0244】

すでに言及したように、細胞溶解物のウエスタンブロットは、CLリーダーペプチドの高度の適正な除去を表わす E1 特異的タンパク質バンドのパターンを顕示した。このリーダーは酵母に由来するものでないことから、これは驚くべきことである。GuHClで可溶化され Ni-IDA で精製された材料の Edman 分解によるアミノ酸配列決定は、実際、E1 タンパク質の 84% が適正に開裂され、材料が基本的に分解産物を含まないということを確認した。なおも 16% の未プロセッシング材料が存在しているが、この材料は未グリコシル化材料であるため、混合物から容易に除去でき、適正に開裂されグリコシル化された E1 の特異的豊富化を可能にする。かかる豊富化方法は、レクチン上のアフィニティクロマトグラフィーであり得、その他の代替案も実施例 19 で示されている。あるいはまた、その他の豊富化手順を選択し最適化するために、未グリコシル化材料のより高い疎水特性を使用することができる。CL-E1-H6 タンパク質からの CLリーダーペプチドの適正な除去はさらに質量分析法によって確認され、この質量分析法は、同様に、遺伝子型 1bE1s の 5N-グリコシル化部位のうち最高 4 つまでが占有され得、かくして配列 NNS (アミノ酸 233 ~ 236、配列番号 73) は単一の N-グリコシル化部位であるとみなされるということも確認した。

20

30

【0245】

実施例 17

CL-E2-H6 コーディング構築物からの *Hansenula polymorpha* 内で発現された HCV-E2 タンパク質の精製及び生化学的特徴づけ
Hansenula polymorpha 内で発現された CL-E2-VIEGR-H6 (本例では以下「CL-E2-H6」と記す) タンパク質からの CLリーダーペプチドの除去効率を分析した。HCV-E2s (aa383-673) は his-タグ付けされたタンパク質として発現されたことから、Ni-IDA について、収集済み細胞の GuHCl 可溶化後の発現済みタンパク質の効率の良い高速精製を行った。簡単に説明すると、30 mM のリン酸塩、6 M の GuHCl、pH 7.2 の中に細胞ペレットを再懸濁させた (細胞 1 g あたり 9 mL の緩衝液)。タンパク質を、320 mM (4% w/v) の亜硫酸ナトリウム及び 65 mM (2% w/v) の四チオン酸ナトリウムの存在下で室温で一晩、スルホン化させた。遠心分離 (10,000 g、30 分、4 / による凍結-解凍サイクルの後、溶解物を清澄させた。それぞれ 1% (w/v) 及び 20 mM の最終濃度までエンピゲン BB (アイブライト&ウィルソン) 及びイミダゾールを添加した。さらなるクロマトグラフィー工程はすべて、Akta FPLC ワークステーション (Pharmacia) 上で実施した。0.22 µm の孔径の膜 (酢酸セルロース) を通して試料をろ過し、N

40

50

i - I D A カラム (Ni^{2+} と共に投入されるキレート化セファロース F F) 上に投入し、これを 20 mM のイミダゾールで補足された 1 % エンピゲン B B、pH 7.2 (緩衝液 A)、6 M の $G u H C l$ 、50 mM のリン酸塩で平衡化した。カラムをそれぞれ 20 mM 及び 50 mM のイミダゾールを含有する緩衝液 A で、280 nm での吸光度が基線レベルに達するまで洗浄した。緩衝液 D、50 mM のリン酸塩、6 M の $G H C l$ 、0.2 % のエンピゲン B B (pH 7.2)、200 mM のイミダゾールを適用することにより、his - タグ付けされた産物を溶出した。E 2 に対し向けられた特異的モノクローナル抗体 E 2 (I G H 2 1 2) を用いて S D S - P A G E 及びウエスタンブロットにより、精製された材料を分析した (図 4 1)。I M A C で精製された E 2 - H 6 タンパク質を同様に、E d m a n 分解による N 末端配列決定に付した。さらに、タンパク質を N - グリコシダーゼ F (ロシュ (R o c h e)) (0.2 U / μg の E 2、P B S / 3 % エンピゲン B B 中で 37 °C で 1 時間のインキュベーション) で処理するか、又は未処理のまま放置した。グリコシル化及び脱グリコシル化された E 2 - H 6 タンパク質を S D S - P A G E に付し、アミノ酸配列決定のため P V D F 膜上でプロットした (分析は、アプライドバイオシステム (A p p l i e d B i o s y s t e m s) の P R O C I S E ^{T M} 492 タンパク質シーケンサ、上で実施した。この工程で、S D S - P A G E は幾分かの分解産物を顕示したため、サイズ排除クロマトグラフィーによるさらなる分画を実施した。これに関して、Ni - I D A 溶出液を限外ろ過によって濃縮させ (M W C O 10 k D a、centriplus、ミリポアアミコン (A m i c o n、M i l l i p o r e))、P B S、1 % のエンピゲン B B 中で Superdex G 200 (ファーマシア (P h a r m a c i a)) 上に投入した。S D S - P A G E 上の移動に基づき、~ 30 k D a と ~ 70 k D a の間の Mr をもつ無傷の E 2 s 関連産物を主として含有する溶出画分をプールし、場合によってアルキル化させた (37 °C で 30 分間 5 mM の D T T でのインキュベーションとそれに続く 37 °C で 30 分間 20 mM のヨードアセタミドでのインキュベーション)。I M A C 精製の後に分解産物が存在する可能性は、かくしてサイズ排除クロマトグラフィーを用いた無傷の産物のさらなる分画によって克服できる。予想外に優れた結果を得ることができた。N 末端配列決定に基づいて、C L リーダーペプチドが除去されている E 2 産物の量を推定することができた。タンパク質産物の合計量を E d m a n 分解により回収されたピークの強度に基づいて、タンパク質の p m o l として計算する。その後、各々の特異的タンパク質 (すなわち各々の「検出された N 末端」) について、合計に対するモル % を推定する。現行の実験では、E 2 - H 6 の適正な N 末端のみが検出され、E 2 タンパク質内に含まれていない N 末端アミノ酸を含有するか又は E 2 タンパク質の E 2 - H 6 欠如アミノ酸のその他の変異体は存在しなかった。結論としては H . p o l y m o r p h a により C L - E 2 - H 6 タンパク質として発現された E 2 - H 6 タンパク質は、95 % 以上の適正に開裂されたタンパク質としてそれ以上のいかなる i n v i t r o 処理も行なわずに、単離された。これは、単離されたタンパク質の 25 % 中に発生すると推定された、E 2 - H 6 タンパク質に対する M F - E 2 - H 6 タンパク質の H . p o l y m o r p h a によるリーダーペプチド除去の忠実度と好対照をなすものである (表 3 参照)。

【 0 2 4 6 】

実施例 1 8

C L - H 6 - K - E 1 コーディング構築物からの H a n s e n u l a p o l y m o r p h a 内で発現された H C V E 1 タンパク質の精製及び生化学的特徴づけ及び H 6 含有タンパク質の i n v i t r o 処理

H . P o l y m o r p h a 内で発現された C L - H 6 - K - E 1 タンパク質から C L リーダーペプチドの除去の効率、ならびに H 6 (h i s - タグ) - アダプタペプチド及び E n d o L y s - C プロセッシング部位を除去するためのその後の i n v i t r o プロセッシングの効率を分析した。H C V E 1 s (a a 1 9 2 - 3 2 6) は、N 末端 H i s - K - タグ付けされたタンパク質 C L - H 6 - K - E 1 として発現されたことから、実施例 1 7 で記載された通り高速かつ高効率の精製を実施することができた。H 6 - K - E 1 (そして場合によっては C L - H 6 - K - E 1) タンパク質の I M A C - クロマトグラ

10

20

30

40

50

フィー精製の溶出プロフィールは、図42に示されている。ゲルのSDS-PAGE及び銀染色及びE1に対して向けられた特異的モノクローナル抗体(IGH201)(図43)、組換え型E1s産物を含有する溶出画分(63-69)をプールし(「IMACプール」)、一晚エンドプロテイナーゼLys-C(ロシュ)処理(酵素/基質比1/50(w/w)、37)に付してH6-K-融合テールを除去した。未処理の融合産物の除去をNi-IDAカラム上での頁のIMACクロマトグラフィー工程によって実施し、かくしてフロースルー画分内でEndo-Lys-C処理されたタンパク質を収集する。さらに、10mMのNaH₂PO₄・3H₂O;1%(v/v)のエンピゲンB、pH7.2(緩衝液B)での10倍希釈の後、Ni-IDAカラム上にエンドプロテイナーゼLys-C消化されたタンパク質試料を適用し、その後、280nmでの吸光度が基線レベルに達するまで緩衝液Bで洗浄した。フロースルーを異なる画分(1-40)の形で収集し、これらの画分をE1s産物の存在についてスクリーニングした(図44)。(SDS-PAGE上の遊走とそれに続く銀染色又はE1に対して向けられた特異的モノクローナル抗体(IGH201)を用いたウエスタンブロット分析に基づき~15kDaと~30kDaの間のMrでの)N末端H6-K(そして場合によっては残留CL-H6-K)テールが除去されている無傷のE1を含有する画分(7~28)をプールし、アルキル化した(37で30分間5mMのDTTでのインキュベーションとそれに続く37で30分間20mMのヨードアセタミドでのインキュベーション)。

10

【0247】

この材料をN末端配列決定に付した(Edman分解)。さらに、タンパク質試料をN-グリコシダーゼF(ロシュ)(0.2U/μgのE1、PBS/3%エンピゲンBB中で37で1時間のインキュベーション)で処理するか、又は未処理のまま放置した。グリコシル化及び脱グリコシル化されたE1を次にSDS-PAGEで分離し、エドマン分解によるさらなる分析のためPDV下膜上でブロットした(分析は、アプライドバイオシステムのPROCISETM492タンパク質シーケンサ上で実施した)。N末端配列決定に基づいて、適正にプロセッシングされたE1産物の量を推定することができた(プロセッシングには、H6-K-配列の適正な開裂が含まれる)。タンパク質産物の合計量は、エドマン分解によって回収されたピークの強度に基づいてタンパク質のpmolとして計算される。その後、各々の特異的タンパク質(すなわち各々の「検出されたN末端」)について、合計に対するモル%を推定する。現行の実験では、E1の適正なN末端のみが検出され、H6-K-E1のその他のプロセッシング変異体のN末端は検出されない。それに基づいて、E1タンパク質に対するH6-K-E1E1(そして場合によっては残留CL-H6-K-E1)タンパク質のEndo-Lys-Cによるin vitroプロセッシングが、95%超の忠実度で発生すると推定された。

20

30

【0248】

実施例19

ヘパリンによるHCV E1の低グリコシル化形態の特異的除去
酵母細胞由来のHCVウイルス様粒子のための特異的精製工程を発見するために、ヘパリンとの結合を評価した。ヘパリンは、複数のウイルスに結合することがわかっており、その結果、HCVウイルス様粒子に対する結合がすでに示唆されてきた(Garson J.A.ら、1999)。この潜在的結合を分析するため、ヘパリンをビオチニル化し、H.Polyomophaからのスルホン化されたHCV E1、H.Polyomopha由来のアルキル化されたHCV E1(共に実施例16に記載されている通りに産生される)及びワクシニア発現ベクターでのトランスフェクションを受けた哺乳動物細胞の培養由来のアルキル化されたHCV E1のいずれかでコーティングされたマイクロタイタープレートの中で、HCV E1との相互作用を分析した。驚くべきことに、強い結合は、H.Polyomopha由来のスルホン化されたHCV E1でのみ観察され、一方哺乳動物の細胞培養由来のHCV E1での結合は全く存在しなかった。ウエスタンブロットを用いて、我々は、この結合が、低グリコシル化された成熟HCV E1に対応するHCV E1sタンパク質混合物のさらに低い分子量のバンドに特異的であること(図45

40

50

)を示すことができた。図45は同様に、スルホン化を除去した時点でもなお結合が低分子量のE1について観察される(レーン4)ことから、このスルホン化がヘパリン結合にとって必須でないということをも顕示している。あるいはまた、アルキル化がこの結合を実質的に低減させているが、これは、この例で用いられている特異的なアルキル化剤(ヨード-アセタミド)により引き起こされ得る。驚くべきことに、高度のグリコシル化を有する(すなわちより多くのグリコシル化部位が占有されている)HCV E1タンパク質を伴う調製物を得るためにHCV E1調製物を豊富化することが特異的に可能であることから、この発見事実はさらに、酵母のためのCL-HCV-エンベロープ発現カセットの工業的な利用可能性を実証した。

【0249】

10

実施例20

ウイルス様の粒子(VLP)の形成と分析

H. Polymorpha内で発現されたHCV E1及びE2タンパク質(実施例16~18)のVLPへの変換は、基本的に、WO99/67285中でDep1ら、によって又WO01/30815中でボスマン(Bosman)ら、によって記載されている通りに行なわれた。簡単に言うと、HCVウイルス様粒子が発現された形質転換済みH. Polymorpha細胞の培養の後、細胞を収穫し、実施例17で記載された通りにGuHCl中で溶解させスルホン化させた。His-タグ付けされたタンパク質をその後IMACによって精製し、実施例17で記載されているように、限外ろ過により濃縮した。

20

【0250】

スルホン化されたCys-チオール基でのHCVウイルス様粒子のVLP形成

単離手順中にスルホン化された濃縮HCVウイルス様粒子を還元処理に付さずPBS、1%(v/v)のエンピゲンで平衡化されたサイズ排除クロマトグラフィーカラム(Superdex G200, pharmacia)上に投入した。溶出した画分をSDS-PAGE及びウエスタンブロット法で分析した。相対Mr~29~15kD(SDS-PAGE移動に基づき)をもつ画分をプールし、濃縮し、Superdex G200上に投入し、PBS、3%(w/v)ベタインで平衡化して、ウイルス様粒子(VLP)を形成させた。画分でプールし、濃縮し、PBS、0.5%(w/v)ベタインに対し脱塩した。

30

【0251】

非可逆的に修飾したCys-チオール基でのHCVウイルス様粒子のVLP形成

単離手順中にスルホン化された濃縮HCVウイルス様粒子を還元処理(PBS中の5mMのDTTの存在下でのインキュベーション)に対して、スルホン化されたCys-チオール基を遊離Cys-チオール基に変換した。(i)20mMのヨードアセタミドの存在下での30分間のインキュベーション又は(ii)5mMのN-エチルマレイミド(NEM)及び15mMのピオチン-N-エチルマレイミドの存在下での30分間のインキュベーションにより、不可逆的Cys-チオール修飾を実施した。その後、ヨードアセタミド遮断の場合にはPBS、1%(v/v)エンピゲン、又はNEM及びピオチン-NEMでの遮断の場合にはPBS、0.2%CHAPSで平衡化されたサイズ排除クロマトグラフィーカラム(Superdex G200, Pharmacia)上に、タンパク質を投入した。溶出した画分をSDS-PAGE及びウエスタンブロット法で分析した。~29~15kD(SDS-PAGE移動に基づく)の相対Mrをもつ画分をプールし、濃縮し、ウイルス様粒子(VLP)を形成させるために、PBS、3%(w/v)ベタインで平衡化された、Superdex G200上に投入した。画分をプールし、濃縮し、ヨードアセタミド遮断の場合にはPBS、0.5%(w/v)ベタインに対して、又NEM及びピオチン-NEMでの遮断の場合にはPBS、0.05%のCHAPSで脱塩した。

40

【0252】

可逆的に修飾されたCys-チオール基でのHCVウイルス様粒子のVLP形成

単離手順中にスルホン化された濃縮HCVウイルス様粒子を還元処理(PBS中の5m

50

MのDTTの存在下でのインキュベーション)に付して、スルホン化されたCys-チオール基を遊離Cys-チオール基に変換した。ジチオジピリジン(DTDP)、ジチオカルバメート(DTC)又はシステインの存在下での30分間のインキュベーションにより、可逆的Cys-チオール修飾を実施した。その後、PBS、1%(v/v)エンピゲンで平衡化されたサイズ排除クロマトグラフィーカラム(Superdex G200、Pharmacia)上に、タンパク質を投入した。溶出した画分をSDS-PAGE及びウエスタンブロット法で分析した。~29-~15kD(SDS-PAGE移動に基づき)の相対Mrをもつ画分をプールし、濃縮し、ウイルス様粒子(VLP)を形成させるために、PBS、3%(w/v)ベタインで平衡化された、Superdex G200上に投入した。画分をプールし、濃縮し、PBS、0.5%(w/v)ベタインに対して脱塩した。

10

【0253】

H. Polymorphaで発現されたE2-H6のVLPを得るためのPBS、3%(w/v)ベタイン中のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロフィールは、図46(スルホン化)及び図47(ヨードアセタミドでアルキル化)の中で示されている。

【0254】

H. Polymorphaで発現されたE1のVLPを得るためのPBS、3%(w/v)ベタイン中のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロフィールは、図48(スルホン化)及び図48(ヨードアセタミドでアルキル化)の中で示されている。結果として得られたVLPは、図50に示されているように、SDS-PAGE及びウエスタンブロット法により分析された。

20

【0255】

H. Polymorphaで発現されたHCVウイルス様粒子により形成されたVLPのサイズ分析

動的光散乱によりVLP粒度を決定した。光散乱実験のためには、光子相関分光法(PCS、ソフトウェアにより制御される粒度分析装置(Zetasizer 1000 HS型、マルバーンインストロメント社(Malvern Instruments Ltd.,)ウスターマルバーン(Malvern, Worcester)英国)を使用した。光子相関分光法又は動的光散乱(DLS)は、ブラウン運動を測定しそれを粒度に関係づけする光学的方法である。連続的な可視レーザービームからの光は、懸濁状態にありブラウン運動に基づいて移動する巨大分子又は粒子全体を通して導かれる。レーザー光の一部は、粒子によって散乱され、この散乱光は、光電子増倍管によって測定される。散乱光の強度の変動は、相関装置内に供給される。こうして適切なデータ解析が実施されるコンピュータへと渡される自動相関関数が生成される。使用されたレーザーは、633nmの固定波長をもつ10mwの単色コヒーレントHe-Neレーザーであった。各試料について、3~6個の連続的測定が行なわれた。これらの実験の結果は表5にまとめられている。

30

【0256】

【表5】

表5. H. Polymorphaによって発現されたHCVウイルス様粒子の指示されたVLP組成についての動的光散乱分析の結果。VLP粒子サイズは、粒子の平均直径として示されている。

40

Cys-チオール修飾	E1-H6	E2-VIEGR-H6	E1
スルホン化	25-45 nm	20 nm	20-26 nm
アルキル化(ヨードアセタミド)	23-56 nm	20-56 nm	21-25 nm

【0257】

H. polymorphaに由来するスルホン化されたHCV E1がなおも、Hansenula由来のアルキル化されたHCV E1と同じ範囲内の1つのサイズをもつ粒子を形成するという観察事実は、驚くべきものである。スルホン化の結果としての負の電荷の高い(最高8個のCys-チオール基をHCV E1上で修飾できる)正味の増加が

50

サブユニット間のイオン斥力を誘発するはずであることから、かかる効果は、予想されていなかった。テストされたその他の可逆的システイン修飾的物質も粒子形成を可能にしたが、このようにして産生されたHCV E1は、スルホン化された材料よりも安定性が悪く、HCV E1のジスルフィドベースの凝集を結果としてもたらずことが立証された。これらのその他の可逆的遮断薬を使用するためには、条件のさらなる最適化が必要とされる。

【0258】

実施例21

Hansenu laが産生したHCV E1 - H6及びワクシニア感染した哺乳動物細胞が産生したHCV E1の抗原的等価性

10

HCV慢性キャリアからの血清とHansenu la産生したHCV E1 - H6との反応性を、WO99/67285でデブラ(Depla)ら、により記載されている通りに、HCV組換え型ワクシニアウイルス感染哺乳動物細胞が産生したHCV E1の反応性と比較した。テスト対象の両方のHCV - E1調製物は共に、HCV E1タンパク質がNEM及びヒオチン - NEMでアルキル化されたVLPで構成されていた。HCV慢性キャリアからの血清との両方のHCV E1 VLP調製物の反応性は、ELISAによって決定された。結果は表6にまとめられている。表6から導出できるように、HCV組換え型ワクシニアウイルス感染哺乳動物細胞内で発現されたHCV E1と、H. polymorphaの中で発現されたHCV E1の間には反応性の違いは全く認められなかった。

20

【0259】

【表6】

表6. 哺乳動物細胞培養内で産生されたE1の抗原性又はH. polymorpha内で産生されたE1の抗原性を、ヒトHCV慢性キャリアからの血清パネルについて評価した。この目的で、ヒオチン化されたE1をストレプトアビジンでコーティングされたELISAプレートに結合させた。その後、1/20希釈度でヒト血清を添加し、E1に結合した血清からの結合免疫グロブリンを、ペルオキシダーゼで標識づけされたウサギ抗ヒトIgG-Fc特異的二次抗体で検出した。結果は、OD値で表わされている。平均値は、テスト対象の全ての血清標本のOD値の平均である。

血清	Hansenu la	哺乳動物	血清	Hansenu la	哺乳動物
17766	1.218	1.159	55337	1.591	1.416
17767	1.513	1.363	55348	1.392	1.261
17777	0.806	0.626	55340	1.202	0.959
17784	1.592	1.527	55342	1.599	1.477
17785	1.508	1.439	55345	1.266	1.428
17794	1.724	1.597	55349	1.329	1.137
17798	1.132	0.989	55350	1.486	1.422
17801	1.636	1.504	55352	0.722	1.329
17805	1.053	0.944	55353	1.065	1.157
17810	1.134	0.999	55354	1.118	1.092
17819	1.404	1.24	55355	0.754	0.677
17820	1.308	1.4	55362	1.43	1.349
17826	1.163	1.009	55365	1.612	1.608
17827	1.668	1.652	55368	0.972	0.959
17849	1.595	1.317	55369	1.506	1.377
55333	1.217	1.168	平均値	1.313	1.245

30

40

【0260】

50

実施例 2 2

Hansenu l a が産生した H C V E 1 - H 6 及びワクシニア感染した哺乳動物細胞により産生された H C V E 1 の免疫原性等価性

Hansenu l a が産生した H C V E 1 - H 6 の免疫原性を、W O 9 9 / 6 7 2 8 5 でデブラら、が記載している通りに H C V 組換え型ワクシニア感染哺乳動物細胞により産生された H C V E 1 の免疫原性と比較した。テスト対象の両方の H C V - E 1 調製物は共に、H C V E 1 タンパク質がヨードアセタミドでアルキル化された V L P で構成されていた。V L P 調製物は両方共ミヨウバンと共に処方され、B a l b / c マウスの体内に注入された(各々 3 週間の間隔をおいて、各々 0 . 1 3 % の A l h y d r o g e l、S u p e r f o s、デンマークを含有する 1 2 5 μ l 中 5 μ g の E 1 から成る三回の筋内 / 皮下注射)。3 回目の免疫化の後 1 0 日目にマウスを放血させた。

10

【 0 2 6 1 】

この実験の結果は、図 5 1 に示されている。図 5 1 の上部部分については、哺乳動物細胞内で産生された E 1 の V L P での免疫化の後に発生した抗体を決定した。哺乳動物細胞内で産生された E 1 (「M」) 又は Hansenu l a が産生した E 1 (「H」) のいずれかを直接 E L I S A 固体支持体上にコーティングし、その後カゼインで遮断する E L I S A 法(実施例 2 1 参照)により抗体力価を決定した。図 5 1 の下部については、Hansenu l a が産生した E の V L P での免疫化の後に発生した抗体を決定した。哺乳動物細胞内で産生された E 1 (「M」) 又は Hansenu l a が産生した E 1 (「H」) のいずれかを直接 E L I S A 固体支持体上にコーティングし、その後カゼインで遮断する E L I S A 法(実施例 2 1 参照)により抗体力価を決定した。

20

【 0 2 6 2 】

決定した抗体力価は終点力価であった。終点力価は、検定のバックグラウンドの平均を 2 倍したものに等しい O D (E L I S A に決定されるもの) を結果としてもたらず血清の希釈度として決定される。

【 0 2 6 3 】

図 5 1 は、両方の E 1 組成物の免疫原性特性の間にいかなる著しい差異も観察されなかったこと、及び決定された抗体力価が、終点力価を実施するべく E L I S A の中で使用される抗原と無関係であることを示している。

【 0 2 6 4 】

酵母由来の H C V E 1 は、ワクチン接種時点で、哺乳動物の細胞培養に由来するアルキル化された H C V E 1 でのワクチン接種時点で得られる防御反応に類似した防御反応を誘発した。後者の応答は、急性感染後の H C V の慢性的進行を防ぐことができた。

30

【 0 2 6 5 】

実施例 2 3

スルホン化されている Hansenu l a 産生 H C V E 1 - H 6 の抗原性及び免疫原生

H C V 慢性キャリアの血清と Hansenu l a 産生 H C V E 1 - H 6 血清の反応性を W O 9 9 / 6 7 2 8 5 内の D e p l a ら、により記載されている通りに、H C V 組換え型ワクシニアウイルス感染哺乳動物細胞により産生された H C V E 1 の反応性と比較した。テスト対象の H C V - E 1 調製物は両方共、Hansenu l a により産生された H C V E 1 タンパク質がスルホン化され哺乳動物細胞により産生された H C V E 1 がアルキル化された V L P で構成されていた。結果は、表 7 に示されている。全体的(平均的)反応性は、同一であったが、個々の血清についていくつかの主要な差異が指摘された。このことは、スルホン化された材料が、アルキル化された H C V E 1 とは異なる形でそのエピトープの少なくともいくつかを提示するという暗に意味する。

40

【 0 2 6 6 】

スルホン化された Hansenu l a によって産生された H C V E 1 - H 6 の免疫原性を、アルキル化された Hansenu l a によって産生された H C V E 1 - H 6 の免疫原性と比較した。テスト対象の両方の H C V - E 1 調製物は共に、V L P で構成されて

50

いた。VLP調製物は両方共ミョウバンと共に処方され、Balb/cマウスの体内に注入された。(各々3週間の間隔を置いて、各々0.13%のAlhydrogel、Superfos、デンマークを含有する125µl中5µgのE1から成る三回の筋内/皮下注射)。3回目の免疫化の後10日目にマウスを放血させた。

【0267】

実施例22に記載されているものと同様に、抗体力価を決定した。驚くべきことに、スルホン化された材料での免疫化は、これらの力価を査定するためにELISAにおいて使用される抗原の如何に関わらず、より高い抗体力価を結果としてもたらした(図51:上の図版:アルキル化されたE1に対し発生させられた抗体の滴定;下の図版:スルホン化されたE1に対して発生させられた抗体の滴定;ELISAプレート上にコーティングされたアルキル化されたE1;「S」:ELISAプレート上にコーティングされたスルホン化されたE1)。しかしながらこの実験においては、個々の力価は、HCV患者からの血清に関して得られた観察事実を確認する分析のために用いられる抗原により異なる。従って、システイン・チオール基が可逆的に修飾されているHCV E1は、より免疫原性であり得、かくしてHCV(慢性感染)に対し防御するワクチンとして増大した効能を有する。それに加えて、不可逆的遮断によって誘発されるネオエピトープに対する応答の誘発が起こる可能性は低い。

10

【0268】

【表7】

表7. ヒトHCV慢性キャリアからの血清パネル(「患者血清」)及び対照血清パネル(「血液ドナー血清」)について、アルキル化されたE1(哺乳動物細胞培養の中で産生されたもの)又はスルホン化されたE1-H6(H. polymorpha内で産生されたもの)の抗原性を評価した。この目的のため、E1をELISAプレートに結合させ、その後プレートをさらにカゼインで飽和させた。ヒト血清を1/20の希釈度で添加し、結合した免疫グロブリンを、ペルオキシダーゼで標識づけられたウサギ抗ヒトIgG-Fc特異的二次抗体で検出した。

20

結果はOD値として表現されている。平均値は、テスト対象の全ての血清標本のOD値の平均である。

患者血清

血清	Hansenula	哺乳動物
17766	0.646	0.333
17777	0.46	0.447
17785	0.74	0.417
17794	1.446	1.487
17801	0.71	0.902
17819	0.312	0.539
17827	1.596	1.576
17849	0.586	0.964
55333	0.69	0.534
55338	0.461	0.233
55340	0.106	0.084
55345	1.474	1.258
55352	1.008	0.668
55355	0.453	0.444
55362	0.362	0.717
55369	0.24	0.452
平均値	0.706	0.691

血液ドナー血清

血清	Hansenula	哺乳動物
F500	0.055	0.054
F504	0.05	0.05
F508	0.05	0.054
F510	0.05	0.058
F511	0.05	0.051
F512	0.051	0.057
F513	0.051	0.052
F527	0.057	0.054
平均値	0.052	0.054

30

40

【0269】

実施例24

ワクチン接種を受けたチンパンジーからの血清との、Hansenulaで産生されたHCV E1-H6及びワクシニア感染した哺乳動物細胞によって産生されたHCV E

50

1の同一の抗原反応性

HCV組換え型ワクシニアウイルス感染哺乳動物細胞により産生されたE1及びHansenulaにより産生されたE1-H6(両方共アルキル化されている)の、ワクチン接種を受けたチンパンジーからの血清及びモノクローナル抗体との反応性を比較した。さらに、前記E1タンパク質をELISA内のプレートに直接コーティングしその後カゼインでプレートを飽和させた。ELISAプレートにコーティングされたE1タンパク質を結合させる抗体の終点力価を、全て哺乳動物細胞によって産生されたE1で免疫化された動物から得られた特異的マウスモノクローナル抗体及びチンパンジー血清について決定した。終点力価決定は、実施例22に記載されている通りに行なわれた。使用されたマウスモノクローナル抗体はIGH201(実施例15を参照)、IGH198(IGH198=WO96/04385内のメルテンスら、中の23C12)、IGH203(IGH203=WO96/04385内のメルテンスら、中の15G6)及びIGH202(IGH202=WO99/50301内のメルテンスら、中の3F3)であった。

10

【0270】

図53から導出できるように、7匹の異なるチンパンジーの反応性は、Hansenula又は哺乳動物細胞のいずれかにより産生されたE1タンパク質でテストされたとき同一である。HCV E1に対するモノクローナル抗体の反応性も同様にほぼ等しいものである。チンパンジーのうち2匹(Yoran及びMartini)が、予防的ワクチン研究に関与し、抗原投与時点で急性感染を一掃することができたのに対し、対照動物は、感染を一掃できなかった。その他の5匹のチンパンジー(Ton、Phil、Marcel、Peggy、Femma)は、治療的ワクチン接種研究に関与し、HCV E1免疫化の時点で、肝臓生検材料上の組織学的活性指標及び/又は血清中のALTにより測定されるように、肝臓損傷の低減を示した。

20

【0271】

この実験で得られた結果はSaccharomyces cerevisiaeとKluyveromyces lactis両方においてECVE2タンパク質を発現した。Mustilli及び協同研究者(Mustilli, A.C.ら、, 1999)の発見事実とは明らかに異なっている。しかしながら、精製された酵母により産生されたE2は、モノクローナル抗体との反応性が酵母により産生されたHCV E2についてより高いものであったものの哺乳動物細胞により産生されたHCV E2で免疫化されたチンパンジーからの血清ではより低い反応性が観察されたという点において、哺乳動物(CHO)細胞によって産生されたHCV E2とは異なっていた。

30

【0272】

実施例25

蛍光体援用型炭水化物電気泳動(FACE)によるHCV E1の糖プロファイリンググリコシル化プロフィールをWO99/67285でデブラら、によって記載されているように、HCV組換え型ワクシニアウイルスに感染した哺乳動物細胞により産生されたHCV E1及びHansenula産生HCV E1について比較した。これは、蛍光体援用型炭水化物電気泳動(FACE)を用いて行なわれた。さらに、オリゴ糖を、ペプチド-N-グリシダーゼ(タンパク質Gase F)により哺乳動物細胞又はHansenulaにより産生されたE1sから遊離させ、ANTSで標識づけした(PNGase F消化に先立ち、ヨートアセタミドでE1タンパク質をアルキル化した)。2-3時間4で15mAの電流にて21%のポリアクリルアミド上でPAGEにより、ANTS標識づけされたオリゴ糖を分離した。図54から哺乳動物細胞により産生されたE1及びHansenulaにより産生されたE1-H6上のオリゴ糖が単糖7~11個という重合度でオリゴマルトースのように移動するということが結論づけされた。このことはすなわち、Hansenula発現系が驚くべきことに、過剰グリコシル化されずかつ哺乳動物細胞中で産生されたE1タンパク質に添加された糖鎖と類似の長さをもつ糖鎖を有するE1タンパク質を導く、ということを表わしている。

40

【0273】

50

実施例 26

Saccharomyces 及び Hansenula で産生された E1s 及び HCV 組換え型ワクシニアウイルスに感染した哺乳動物細胞により産生された E1s から誘導された N-結合したオリゴ糖の配列決定

PBS、0.5%ベタイン中に存在し Saccharomyces 又は Hansenula 培養 (実施例 15 - 16 参照) 又は HCV 細胞型ワクシニアウイルスに感染した RK13 細胞の培養 (Maertensら W096/04385 明細書参照) から精製された E1s (225 µg) を、40 µg/ml という最終濃度まで、脱グリコシル化インキュベーション緩衝液 (50 mM、Na₂HPO₄、0.75%の Nonidet P-40) で希釈した。溶液の pH を濃 H₃PO₄ で pH 5.5 に調整した。この溶液に対し、2 U の PNGase F (Flavobacterium meningosepticum のペプチド-N⁴-(アセチル-ベータ-グルコサニル)-アスパラギンアミダーゼ; EC 3.5.1.52; Roche 社より入手) を添加し、試料を 37 °C で一晩インキュベートした。一晩インキュベートした後、溶液の pH を濃 H₃PO₄ で pH 5.5 に調整した。タンパク質及びオリゴ糖をその後、4 体積のアセトン (-20 °C で) を添加することで沈殿させ、混合物を 15 分間 -20 °C でインキュベートした。試料を 4 °C で 5 分間 1300 rpm で遠心分離させた。アセトン上清を廃棄し、150 µL の氷冷 60% メタノールを添加した後 1 時間 -20 °C でペレットをインキュベートした。遊離されたオリゴ糖を含有するメタノール上清を収集し、ロータリーエバポレーション (Speed Vac) により乾燥させた。

【0274】

乾燥させた E1s グリカンならびに基準オリゴ糖 (全て Glyko、Bicester、英国からのもの、図 55 参照 1、Man-9 (11 の単糖単位)、Man-8 (10 の単糖単位)、Man-7 (9 単糖単位)、Man-6 (8 単糖単位) 及び Man-5 (7 単糖単位) を 5 µL の 2-アミノベンズアミド (2-AB) 標識付け試薬中で溶解させ (30% HOAc / 70% の DMSO 中の ±0.35 M の 2-AB と ±1 M の NaCNBH₃)、5 ~ 100 µM の間の最終グリカン濃度を得た。その後グリカン溶液を 65 °C に 2 時間インキュベートした。30 分後、試料をボルテックスにより混合した。結合の後、余剰の 2-AB を以下のように除去した。試料を 16-µL の精製水 (MilliA) で希釈し、Sephadex G-10 カラム (直径 1 cm、高さ 1.2 cm、Amersham Biosciences; Vac Elut システム、Varian にカップリング) をプルドライ (pulled dry) した後このカラムに試料を適用した。

【0275】

カラムに 2 × 100-µL の精製水 (MilliA) を適用することによって、標識づけされたオリゴ糖を溶出させた。基準炭水化物 (Man-9、Man-8、Man-7 及び Man-6) の溶出液を乾燥させ、HPLC 分析まで -70 °C で保管した。4 本の番号入り PCR 管に E1s 試料の溶出液ならびに Man-9 基準グリカンを分配した。表 8 中に概略的に記した通りの反応を実施し、1 時間後に終了させた管 3 中の反応を除いて、全ての反応を 37 °C で一晩進行させた。使用されたエキソグリコシダーゼ酵素 (全て Glyko、Bicwster、英国より入手) の最終濃度は、以下の通りであった: 1-2 マンノシダーゼ (Aspergillus saitoi) については: 2 mU/ml; α-マンノシダーゼ (Jack Bean) については: 50 U/mL; そして β-マンノシダーゼ (Helix pomatia) については: 4 U/mL。

【0276】

10

20

30

40

【表 8】

表 8. オリゴ糖の配列決定用反応混合物の概要

	チューブ ^o 1	チューブ ^o 2	チューブ ^o 3	チューブ ^o 4	チューブ ^o 5
E1s (pmol)	400	400	400	400	400
α 1-2マンノシダーゼ (μL)	-	4	-	-	-
α マンノシダーゼ (μL)	-	-	5	5	5
β マンノシダーゼ (μL)	-	-	-	-	4
インキュベーション緩衝液4X(μL)	5	5	5	5	5
MilliQ H ₂ O (μL)	15	11	10	10	6

10

【0277】

図56は、キトビオースにカップリングされた10個のマンノース部分から成る高次オリゴマンノースを示す。各々の末端マンノース残基は、1-3結合により非末端マンノース残基に結合される。図56のオリゴマンノースは、エキソグリシダーゼ1-2マンノシダーゼによる開裂に対する完全な耐性をもつ。エキソグリシダーゼ-マンノシダーゼでの図56のオリゴマンノースの長時間(一晚)インキュベーションの結果、全ての-結合(1-2, 1-3, 1-6)は開裂されるが-結合は開裂されない。かくして、結果としてもたらされるオリゴ糖は、4'-マンノシルキトビオースとなる。この4'-マンノシルキトビオース部分は、エキソグリコシダーゼである-マンノシダーゼの作用を通してマンノースとキトビオースに転換され得る。供給業者(Glyko)仕様に従うと、-マンノシダーゼは、基準オリゴ糖Man-6(図55.D参照)を4'-マンノシルキトビオースに完全に転換し、-マンノシダーゼによるマンノース及びキトビオースへのそのさらなる変換は、同様に完全であることが報告されている。

20

30

【0278】

図57は、キトビオースにカップリングされた9マンノース部分から成るより高いオリゴマンノースを示している。このオリゴマンノースにおいては、1つの末端マンノース残基は、非末端マンノース残基に1-2結合により結合される。エキソグリコシダーゼ1-2マンノシダーゼの作用時点で、前記1-2結合されたマンノースは除去されることになる。-マンノシダーゼ及び-マンノシダーゼのその後の作用時点で、図56のオリゴマンノースについて記載された通りの反応産物が得られることになる。供給業者(Glyko)の仕様に従って、1-2マンノシダーゼは、90%を上回る効率で基準オリゴ糖Man-9及びMan-6をMan-5(図55参照)に転換させることができる。

40

【0279】

図58は、キトビオースにカップリングされた9個のマンノース部分から成る基本高次オリゴマンノースMan-9を示す。このオリゴマンノースにおいては、全ての末端マンノース残基は1-2結合によって非末端マンノース残基に結合される。エキソグリコシダーゼ1-2マンノシダーゼの作用時点で、Man-9は、かくして、90%を上回る割合で供給業者の仕様に従ってMan-5に転換されることになる。-マンノシダーゼでのその後の消化は、Man-5を4'-マンノシルキトビオースに転換することになる。

【0280】

表8に記されているような異なる反応チューブの中味を遠心真空蒸発機内又は凍結乾燥

50

機内で乾燥させ、HPLC分析まで - 70 °C で保管した。カラムに適用する前に、各試料 (E1s 及び基準) を 25 µL の水中に溶解させ、Waters Alliance HPLCステーションにカップリングされたTSKゲル-Amide-80 (0.46 × 2.5 cm、Tosoh Biosep) 上に投入した。

【0281】

オリゴ糖の分離を 1.0 mL / 分で周囲温度で実施した。溶剤 A は、アセトニトリル中の 0.1 % の酢酸から成り、溶剤 B は、水中の 0.2 % の酢酸 - 0.2 % のトリエチルアミンから成っていた。2 - AB で標識づけされたオリゴ糖の分離を 28 % の B を用いて実施し、5 カラム体積中は一定組成とし、その後 15 カラム体積全体にわたり 45 % B となるまで線形に増加させた。

10

【0282】

基準オリゴ糖 Man-6 は 53 ± 1 分で溶出しており、Man-7 は 59 ± 1 分で、Man-8 は 67 ± 2 分で、Man-9 は 70 ± 1 分で; 4' - マンノシルキトピオースは 10 ± 1 分で、キトピオースは 6 ± 1 分 (図示せず) で溶出している。このことは、エキソグリコシダーゼ無しで一晩のインキュベーション後 (図 63 内のクロマトグラムのトレース 1; Man-9 のみ)、1 - 2 マンノシダーゼで一晩のインキュベーションの後 (図 63 内のクロマトグラムのトレース 2; Man-5 及び Man-6 の混合物)、- マンノシダーゼで 1 時間又は一晩のインキュベーションの後 (図 63 のクロマトグラムのそれぞれトレース 3 及び 4; 4' - マンノシルキトピオースのみ)、及び - マンノシダーゼで一晩のインキュベーションの後 (図 63 中のクロマトグラムのトレース 5; キトピオースのみ)、Man-9 の反応産物について例示されている。図 63 のクロマトグラムのトレース 6 は、適用された溶剤勾配を表わしている。

20

【0283】

エキソグリコシダーゼ無しで (PNGase 処理の後に得られた) Saccharomyces 産生 E1s のオリゴ糖の反応の産物は主として、59 ± 1 分 (15 %)、67 ± 1 分 (45 %)、70 ± 1 分 (25 %) 及び 75 ± 1 分 (15 %) で溶出して存在する 4 つの炭水化物であった。Saccharomyces により産生された E1s 中の Man(8) - GlcNAc(2) 及び Man(9) GlcNAc(2) の全含有率は最高 65 % であった。1 - 2 マンノシダーゼとの反応において、保持時間 70 ± 1 分の炭水化物のみが消滅した。保持時間 75 ± 1 分の炭水化物の強度は同じにとどまり、保持時間 67 ± 1 分の炭水化物の強度は増大した。このことはすなわち、全ての末端マンノース単位が (1 - 2) 立体配置を有するわけではないということの意味している。マンノシダーゼとの一晩のインキュベーションの後、全ての炭水化物鎖は、4' - マンノシルキトピオース部分に還元された。このことはすなわち、炭水化物が高次マンノースであり 1 つを除く全てのマンノース残基が コンホーメーションを有することを意味している。この 4' - マンノシルキトピオース部分からキトピオースへの還元は、- マンノシダーゼとの一晩のインキュベーションの後明らかになった。結果として得られたクロマトグラムは、図 63 のクロマトグラムについて記載されたものと同じ条件下で得られた図 64 に記されている。結果は、表 9 にまとめられている。

30

【0284】

ワクシニアに感染した細胞によって産生された E1s で同じ実験を反復し、それは驚くべきことに全く異なる写真を示した。酵素無しの反応においては、炭水化物の複合混合物が存在した (図 65 及び表 9 を参照のこと)。単糖 (8) - GlcNAc(2) 及び単糖 (9) - GlcNAc(2) の全含量率は 37 % であった。1 - 2 マンノシダーゼでの反応後、保持時間 70 ± 1 及び 59 ± 1 分の炭水化物は消滅した。マンノシダーゼとの一晩のインキュベーションの後、4' - マンノシルキトピオース産物のほかに、実質的量の単糖 (6) - GlcNAc(2) が残った。これは、オリゴ糖分岐の 1 つが マンノシダーゼ分解に対する耐性をもつことを表わしている。これは、N 結合されたオリゴ糖の Man(1 - 2) で終結した分岐に結合した 1 つ又は 2 つのグルコース - 残基の存在によって説明がつく。かかるグルコース含有オリゴ糖の推定上の構造が図 62 に描かれて

40

50

いる。グルコース含有オリゴ糖の考えられる反応産物は、表 10) に示されている。Man - 7 等価オリゴ糖 (すなわち 9 個の単糖から成るオリゴ糖) は 1 - 2 マンノシダーゼ反応の後全く残っていないことから、これらのグルコース残基は、図 6 2 に示されたオリゴ糖構造の B 分岐に結合されている確率が最も高い。しかしながら、図 6 2 のオリゴ糖の A 及び B 分岐の両方がグルコースにより部分的に終結されているということを排除することはできない。

【 0 2 8 5 】

キトビオースへの 4' - - マンノシルキトビオース部分の還元は、マンノシダーゼでの一晚のインキュベーションの後明らかになった。図 6 5 には、図 6 3 - 6 4 のクロマトグラムについて記載されているのと同じ条件の下で得られた、結果としてのクロマトグラムが描かれている。

10

【 0 2 8 6 】

得られた結果は表 9 でまとめられている。

【 0 2 8 7 】

Hansenu1a で産生された E 1 s で同じ実験を反復し、驚くべきことにそれは、完全に異なる写真を示した。酵素無しの反応においては、主として 67 ± 2 分及び 70 ± 1 分の保持時間の 2 つの炭水化物が存在し、これはそれぞれ Man - 8 及び Man - 9 に対応していた。Hansenu1a で産生された E 1 s 内の Man (8) - GlcNAc (2) 及び Man (9) GlcNAc (2) の全含有率は最高 90 % であった。1 - 2 マンノシダーゼでの反応後、炭水化物は主として保持時間 45 ± 1 min の Man - 5 及び保持時間 53 ± 1 分の Man - 6 へと還元された。マンノシダーゼとの一晚のインキュベーションの後、全ての炭水化物鎖は 4' - - マンノシルキトビオース部分に還元された。このことはすなわち、炭水化物が高次マンノースであり、1 つを除くすべてのマンノース残基がコンホーメーションを有することを意味している。この 4' - - マンノシルキトビオース部分からキトビオースへの還元は、マンノシダーゼとの一晚のインキュベーションの後明らかになった。図 6 6 には、図 6 3 - 6 5 のクロマトグラムについて記載されているものと同じ条件下で得られた、結果としてのクロマトグラムが描かれている。得られた結果は表 9 にまとめられている。

20

【 0 2 8 8 】

【表 9】

表9. Saccharomyces (「Sc」) 及びHansenula (「Hp」) で産生されたEIsから、ならびにHCV組換え型ワクシニア感染した哺乳動物細胞 (「Vac」) により産生されたEIsから誘導されたオリゴマンノースの消化の結果として得られるオリゴマンノース。それらのクロマトグラフィー保持時間 (分単位で「Rt」) 及び合計オリゴマンノース含有率 (最上行) との関係における一定のオリゴマンノースの百分率ならびに、図55~62のいずれかを参考にして記された各々の観察されたオリゴマンノースについての最も確率の高い構造とともに、異なるオリゴマンノースをここに示す。末端 α 1-3マンノースを伴うオリゴマンノースは「°」でマークされた。末端グルコースを伴うオリゴマンノースは、a「*」でマークされ、一部については「from 62*」という参照がなされ、これは、その構造を図62に示された構造から誘導できるということを示している。「1」はエキソグリコシダーゼ無しの「反応」であり、「2」は α 1-2マンノシダーゼとの反応である。45±1分という保持時間をもつオリゴマンノースは、おそらくキトピオースにリンクされた5個のマンノース残基を含むオリゴマンノースであると思われる。保持時間75±1分のオリゴマンノースは、おそらく、キトピオースにリンクされた10個のマンノース残基を含むオリゴマンノースであると思われる。

	(Man-5) Rt: 45±1	Man-6 Rt: 53±1	Man-7 Rt: 59±1	Man-8 Rt: 67±1	Man-9 Rt: 70±1	(Man-10) Rt: 75±1
Sc 1 構造	/	1 % 55.D	14 % 55.C	42 % 59°	23 % 57° 61°	18 % 56°
Sc 2 構造	17 % 55.E	/	8 % 60°	50 % 59°	6 % 57° 61°	16 % 56°
Vac 1 構造	3 % 55.E	32 % 62*および 表10から	20 % 55.C	23 % 62*および 表10から	14 % 62*および 表10から	5 % 62*および 表10から
Vac 1 構造	74 % 55.E	2 % 62*および 表10から	/	20 % 62*および 表10から	4 % 62*および 表10から	/ 62*および 表10から
Hp 1 構造	/	2 % 55.D	7 % 55.C	54 % 55.B	36 % 58	/
Hp 2 構造	80 % 55.E	20 % 55.D	/	/	/	/

【0289】

【表 10】

表10. α 1-2マンノシダーゼ又は α 1-2マンノシダーゼ及び α マンノシダーゼとの反応後のグルコースを含有するN-結合されたオリゴ糖の産物

	Man-等価物	α 1-2マンノシダーゼ 産物 (1)	α 1-2マンノシダーゼ 産物 ((1)の後)
分岐A + 2 Glc	Man-10	Man-8	Man-6
分岐A + 1 Glc	Man-9	Man-7	Man-6
分岐A Glc無	Man-8	Man-5	4'- β -マンノシルキトピオース
分岐B + 2 Glc	Man-10	Man-9	Man-6
分岐B + 1 Glc	Man-9	Man-8	Man-6
分岐B Glc無	Man-8	Man-5	4'- β -マンノシルキトピオース

10

20

30

40

50

【0290】

実施例27

組換え型HCV E1内のN-グリコシル化部位の占有

占有されたN-グリコシル化部位の量に応じて、E1sは、SDS-PAGE分析上で異なる泳動挙動を示す。この特性に基づいて、E1産物内の占有されたN-グリコシル化部位の平均的量を推定することができた。この点に関し、精製されたE1産物の試料を、SDS-PAGE及びクーマシーブリリアントブルー染色に付し(図67)、Image Master 1D Prime Softwareパッケージ(Pharmacia)を用いてさらに分析した。簡単に説明すると、ゲルをスキャンし、各々の特定のタンパク質バンドについて、出現%(全てのバンドの合計を100%にする異なるバンドの合計強度との関係におけるその強度)を推定した(表11)。各々の特定のタンパク質バンドが、同じ占有されたN-グリコシル化部位数をもつE1s^{*}分子を表わしているということに留意すべきである。

10

【0291】

得られた結果は、Hansenulaで産生されたE1産物の主要部分(>90%)が、ワクチニア発現系(Maertens et al., W096/04385中で記載しているような)から得られるE1sよりも占有率の低い単数又は複数のN-グリコシル化部位を有することを示した。ワクチニア由来のE1産物中全てのN-グリコシル化部位が占有されている(ここではE1の位置233-236上の配列「NNS S」(配列73)が1つのグリコシル化部位であるとみなされる)ということ仮定すると、Hansenulaで発現されたE1タンパク質内の占有されたN-グリコシル化部位の平均数が、利用可能な全N-グリコシル化部位の80%を超えないという結論を下すのがきわめて無難である。

20

【0292】

【表11】

表11. SPDS-PAGE及びクーマシーブリリアントブルー染色強度分析を用いた、Hansenula polymorpha及びワクチニア/ペロ発現系から得られたE1タンパク質内の占有されたN-グリコシル化部位の平均数の推定。タンパク質バンドはその分子量によって表わされている。図67参照。

アルキル化されたE1s	占有% (相対強度)	
<u>Hansenula polymorpha</u>	実験1	実験2
MW 29	9	8
MW 25	25	27
MW 21	38	42
MW 18	27	22
MW 14-15	定量化せず	定量化せず
<u>ワクチニア/ペロ</u>		
MW 29	100	100

30

【0293】

実施例28

組換え型HCV E2内のN-グリコシル化部位の占有

Hansenulaにより産生された200µgのE2-H6タンパク質をPNGase下で脱グリコシル化した。脱グリコシル化されたE2s-H6をミニ・ゲル(10µg/レーン)上に投入した。タンパク質バンドをトリプシン及びエンドAsp-Nで消化した。結果として得られたペプチドの質量をMALDI-MS(乾燥液滴及び薄層法)で決定した。

40

【0294】

この方法をN-グリコシル化度を決定する目的で使用することができる: 酵素PNGase下での脱グリコシル化中、完全な糖鎖を開裂して外し、同時にアスパラギン(N)

50

をアスパラギン酸 (D) へと加水分解させる。これら 2 つのアミノ酸の間の質量差は、質量分光法によって決定可能な 1 Da である。さらに、N から D への加水分解は、Asp-N 酵素のための新しい開裂部位を作り出す。

【0295】

E 2 s 内の考えられるグリコシル化部位は、N₄₁₇、N₄₂₃、N₄₃₀、N₄₄₈、N₄₇₈、N₅₃₂、N₅₄₀、N₅₅₆、N₅₇₆、N₆₂₃ 及び N₆₄₅ (図 68 を参照) である。Maldi-MS 分析は、これらのグリコシル化部位の各々について、PNGase 下での脱グリコシル化の後ペプチドがグリコシル化部位に N 又は D のいずれかを伴って (質量差 1 Da) 発見されたことから、N-グリコシル化が完全でなかったことを示した。N 残基の数に対する D 残基の数の比は、Hansenula により発現され分析対象試料中に存在する全ての E 2 タンパク質全体にわたる、糖鎖による単一 N-グリコシル化部位の平均的占有の表示を提供する。これらの結果は、表 12 - 14 にまとめられている。

【0296】

これらの結果から、平均して各々のグリコシル化部位が約 54% グリコシル化されるということが計算された。

【0297】

【表 12】

表12. 1つのN-グリコシル化部位を含有するトリプシン消化ペプチドから決定されたグリコシル化百分率

N-グリコシル化部位	グリコシル化済み	未グリコシル化
N430	60 %	40 %
N448	50 %	50 %
N556	80 %	20 %
N576	90 %	10 %
N623	20 %	80 %
N645	10 %	90 %

【0298】

【表 13】

表13. 2つのN-グリコシル化部位を含有するトリプシン消化ペプチドから決定されたグリコシル化百分率

N-グリコシル化部位	両方の部位がグリコシル化されている	2つの部位のうち一方がグリコシル化されている	いかなる部位をもグリコシル化されていない	個々のNについての計算値
N417およびN423	70 %	25 %	5 %	85 %
N532およびN540	0 %	80 %	20 %	40 %

【0299】

【表 14】

表14. Asp-N消化物内のN478について決定されたグリコシル化百分率

N-グリコシル化部位	グリコシル化	未グリコシル化
N478	35 %	65 %

【0300】

実施例29

Saccharomyces 又は *Hansenula* により産生された HCV E1 との血液ドナー血清の反応性

(- MFリーダーで発現された) *Saccharomyces* により産生された E1 s - H6 及び (CLリーダーで発現された) *Hansenula* により産生された H1 s - H6 を両方共、実施例15及び16の中で記載されている通りに精製し、実施例20中で記載されている通りに最終的にアルキル化及びVLP形成に付した。両方のタンパク質を直接 0.5 µg / mL のマイクロタイタープレート上に吸着させ (1時間 37 °C)、プレートを遮断した後 (PBS - 0.1% カゼイン、1時間 37 °C)、HCVスクリーニングを受け陰性の血液ドナーからの血清を 1 / 20 の希釈度 (PBS - 0.5% カゼイン、10% (w / v) スクロース、0.2% (v / v) Triton - X - 705、1時間、37 °C) でインキュベートした。最終的に、1 / 50000 の希釈度で (PBS - 0.1% カゼイン、1時間、RT) ペルオキシダーゼ (Dako、Denmark) にカップリングされた二次的ウサギ抗ヒト IgG - Fc 特異的抗血清を用いて結合を検出し、その後発色させた。全ての段階の間でプレートを PBS - 0.05% (w / v) Tween - 20 で3回洗浄した。比較のため、Dep laら、が W099 / 67285 明細書中で記載した通りに産生され精製された哺乳動物細胞由来の E1 s についても同一の要領で血清を分析した。

10

【0301】

この ELISA についてのカットオフ値は、バックグラウンド (すなわち、同じセットアップであるがストレプトアビジンが壁に吸着された状態の全ての血清の反応性) の平均の2倍に設定された。

20

【0302】

表15から、数多くの (75%) 血清が、*Saccharomyces* で産生された E1 に関するカットオフ値より高い反応性を示すものの、*Hansenula* 産生 E1 とカットオフ値より高い幾分かの反応性を示す血清はわずか (6%) でしかない、ということが判断できる。この反応性の差は、実施例26で立証されるように、*Saccharomyces* 産生 E1 上の 1 - 2 マンノースに結合された末端 1 - 3 マンノースの存在に原因があった。Young 及びその共同研究者ら (1998) はすでに以前に、このタイプのマンノースが *Saccharomyces* 由来のマンナンとヒト血清の反応性の原因でもあるということを示した。*Saccharomyces* 由来の E1 に対する反応性がこのタイプの残基に起因するというのをさらに確認するために、希釈緩衝液に添加された 1 又は 5 mg / mL のマンナン (Sigma) で予備インキュベートされた (37 °C で 1時間) 血液ドナーの希釈液を用いて *Saccharomyces* 産生 E1 について ELISA を反復した。表16から判断できるように、マンナンでの予備インキュベーションは、濃度依存的に 1 つ (F556) を除くすべての分析対象血清についてバックグラウンドレベルまで、血液ドナー血清とのこの E1 の反応性を低減させた (5 mg のマンナン / mL を用いると、平均 OD はマンナンによる競合なしの 0.24 から 0.06 まで減少せられる)。

30

40

【0303】

【表 15】

表 15. Hansenula, Saccharomyces及び哺乳動物細胞で産生されたE1の反応性。カットオフ値より高い反応性は、
黒塗りの細胞内で表示される。

血清番号	Hansenula E1	Saccharomyces E1	哺乳動物 E1	ブランク		
F552	0,18	0,224	0,056	0,05	10	
F553	0,062	0,449	0,056	0,052		
F555	0,06	0,079	0,054	0,051		
F556	0,073	0,679	0,054	0,051		
F557	0,059	0,173	0,053	0,05		
F558	0,066	0,232	0,06	0,058		
F559	0,084	0,309	0,056	0,053		
F560	0,062	0,338	0,052	0,052		
F562	0,056	0,128	0,053	0,053		
F563	0,064	0,181	0,059	0,056		20
F570	0,056	0,135	0,054	0,055		
F571	0,06	0,209	0,054	0,055		
F572	0,061	0,427	0,055	0,056		
F575	0,079	0,104	0,062	0,056		
F576	0,061	0,144	0,058	0,057		
F577	0,063	0,224	0,055	0,058		
F578	0,089	0,131	0,057	0,061		
F581	0,064	0,098	0,061	0,057	30	
F594	0,055	0,116	0,056	0,057		
F595	0,059	0,539	0,057	0,058		
F598	0,076	0,311	0,056	0,059		
F450	0,205	0,078	0,099	0,059		
F453	0,059	0,128	0,057	0,06		40
F456	0,058	0,121	0,056	0,06		
F458	0,055	0,088	0,054	0,054		
F459	0,054	0,069	0,056	0,054		
F463	0,055	0,083	0,054	0,056		
F466	0,086	0,208	0,071	0,094		

【 0 3 0 4 】

【表 16】

表 16. 表15と同様であるが5mgマンナン/mLの存在下でのSaccharomyces 細胞で産生されたE1の反応性。
カットオフ値より高い反応性は、黒塗り細胞内で表示される。

血清番号	マンナン濃度		
	0 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL
F552	0,207	0,128	0,103
F553	0,487	0,098	0,050
F555	0,066	0,044	0,041
F556	0,769	0,540	0,372
F557	0,158	0,094	0,088
F558	0,250	0,076	0,046
F559	0,300	0,077	0,066
F560	0,356	0,088	0,044
F562	0,122	0,106	0,089
F563	0,164	0,091	0,049
F570	0,110	0,043	0,040
F571	0,212	0,057	0,042
F572	0,464	0,087	0,043
F575	0,095	0,081	0,062
F576	0,138	0,042	0,043
F577	0,216	0,042	0,041
F578	0,125	0,100	0,093
F581	0,083	0,064	0,042
F594	0,102	0,044	0,041
F595	0,520	0,088	0,044
F598	0,340	0,054	0,042
F450	0,053	0,060	0,053
F453	0,116	0,049	0,044
F456	0,112	0,050	0,043
F458	0,086	0,051	0,042
F459	0,054	0,044	0,042
F463	0,078	0,043	0,041
F466	0,172	0,111	0,085

10

20

30

40

【0305】

参考文献一覧

Reference List

Agaphonov, M.O., Bebuurov, M.Y., Ter Avanesyan, M.D., and Smirnov, V.N. (1995) : Hanse nula polymorpha内への外来性遺伝子のターゲティングされた組込みのた

50

めの分断 - 置換アプローチ。 *Yeast* 11:1241-1247.

Agaphonov, M.O., Trushkina, P.M., Sohn, J.H., Choi, E.S., Rhee, S.K., and Ter Avanesyan, M.D. (1999) : 酵母 *Hansenula polymorpha* DL1 内の異なるプラスミドコピー数を伴う構成要素の急速選択用ベクター。 *Yeast* 15:541-551.

Alber, T. and Kawasaki, G. (1982) : *Saccharomyces cerevisiae* の磷酸トリオースイソメラーゼのヌクレオチド配列。 *J. Mol. Appl. Genet* 1:419-434. 10

Ammerer, G. (1983) : ADCIプロモータを用いた酵母内の遺伝子発現。 *Methods Enzymol.* 101:192-201.

Ballou, L., Hitzeman, R.A., Lewis, M.S., and Ballou, C.E. (1991) : バナジウム酸塩耐性酵母突然変異体にはタンパク質グリコシル化が欠損している。 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3209-3212. 20

Beekman, N.J., Schaaper, W.M., Tesser, G.I., Dalsgaard, K., Kamstrup, S., Langeveld, J.P., Boshuizen, R.S., and Meloen, R.H. (1997) : 合成ペプチドワクチン: チオエステル結合によるペプチド抗原のパルミトイル化が免疫原性を増大させる。 *J. Pept. Res.* 50:357-364.

Burns, J., Butler, J., and Whitesides, G. (1991) : トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンによるジスルフィドの選択的還元。 *J. Org. Chem.* 56:2648-2650. 30

Cox, H., Mead, D., Sudbery, P., Eland, R.M., Mannazzu, I., and Evans, L. (2000) : PMA1プロモータを用いたメチロトロフィック酵母 *Hansenula polymorpha* 内での組換え型タンパク質の構成性発現。 *Yeast* 16:1191-1203.

Cregg, J.M. (1999) : メチロトロフィック酵母 *Pichia pastoris* 内での発現。 遺伝子発現系内で: 発現技術のための自然の利用。 J.M. Fernandez and J.P. Hoeffler, eds (San Diego: Academic Press), pp. 157-191. 40

Darbre, A. (1986) : 実践タンパク質化学; 便覧。 *Wiley & Sons Ltd.*

Diminsky, D., Schirmbeck, R., Reimann, J., and Barenholz, Y. (1997) : 哺乳動物細胞 (CHO) 及び酵母細胞 (*Hansenula polymorpha*) から誘発されたB型肝炎表面抗原 (HBsAg) 粒子の間の比較: 組成、構造及び免疫原性。 *Vaccine* 15:637-647.

Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose, J.K., and Hel 50

enius, A. (1993) : ウイルス膜タンパク質の折畳みと組立て. *Vir*
ology 193: 545 - 562.

Elble, R. (1992) : 酵母の形質転換のための単純でかつ効率の良い手順。
Biotechniques 13: 18 - 20.

Fellinger, A. J., Verbakel, J. M., Veale, R. A.
, Sudbery, P. E., Bom, I. J., Overbeeke, N.,
and Verrips, C. T. (1991): *Hansenula polym*
orpha による *Cyamopsis tetragonoloba* (グアール) 由
来のガラクトシダーゼの発現. *Yeast* 7: 463 - 473.

10

Fournillier, J. A., Cahour, A., Escriveau, N.,
Girad, M., and Wychowski, C. (1996) : 哺乳動物
細胞内で発現された C 型肝炎ウイルスの E1 糖タンパク質のプロセッシング. *J. Gen*
Virol. 77 (Pt 5): 1055 - 1064.

Gailit, J. (1993) : 合成ペプチド中の遊離スルフィドリル基の復元. *A*
nal. Biochem. 214: 334 - 335.

20

Garson, J. A., Lubach, D., Passas, J., Whitb
y, K., and Grant, P. R. (1999) : スラミンは、*in vi*
tro でヒト肝臓ガン細胞に結合する C 型肝炎を遮断する. *J. Med. Virol.*
57: 238 - 242.

Gatzke, R., Weydemann, U., Janowicz, Z. A.,
and Hollenberg, C. P. (1995) : *Hansenula po*
lymorpha 内でのベクター配列の安定したマルチコピー組込み. *Appl. Mic*
robiol. Biotechnol. 43: 844 - 849.

30

Gellissen, G. (2000) : メチロトロフ酵母における異種タンパク質
産生. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 741 - 750
.

Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinst
one, S. M., and Rice, C. M. (1993) : C 型肝炎ウイルスポ
リタンパク質開裂産物の発現と同定. *J. Virol.* 67: 1385 - 1395.

Grinna, L. S. and Tschopp, J. F. (1989) : Sメチロ
トロフ酵母 *Pichia pastoris* 由来の N 結合されたオリゴ糖のサイズ分布
と一般構造特長. *Yeast* 5: 107 - 115.

40

Heile, J. M., Fong, Y. L., Rosa, D., Berger, K
, Saletti, G., Campagnoli, S., Bensi, G.,
Capo, S., Coates, S., Crawford, K., Dong, C.
, Wininger, M., Baker, G., Cousens, L., Chi
en, D., Ng, P., Archangel, P., Grandi, G., H
oughton, M., and Abrignani, S. (2000) : ワクチ
ン設計のための C 型肝炎ウイルス糖タンパク質 E2 の評価: 小胞体で保留された組換え型
タンパク質は、分泌された組換え型タンパク質及び DNA ベースのワクチン候補より優れ

50

ている。J. Virol. 74:6885-6892.

Helenius, A. (1994): N結合されたオリゴ糖は、小胞体内での糖タンパク質の折畳みにどのような影響を及ぼすか。Mol Biol. Cell 5:253-265.

Hermanson, G.T. (1996): 生物結合体技術。San Diego: Academic Press.

Herscovics, A. and Orlean, P. (1993): 酵母中の糖タンパク質の生合成。FASEB J. 7:540-550. 10

Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., and Shimotohno, K. (1991): *in vitro* プロセッシング分析によるC型肝炎ウイルスゲノムの推定上の構造領域の遺伝子マッピング。Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 88:5547-5551.

Hitzeman, R.A., Clarke, L., and Carbon, J. (1980): 免疫スクリーニング技術による酵母3-ホスホグリセロキナーゼ遺伝子(PGK)の単離と特徴づけ。J. Biol. Chem. 255:12073-12080. 20

Hollenberg, C.P. and Gellissen, G. (1997): メチロトローフ酵母による組替え型タンパク質の産生。Curr. Opin. Biotechnol. 8:554-560.

Holmgren, A. (1979): チオレドキシンは、ジチオトレイトール及びジヒドロリポアミドによるインシュリンジスルフィドの還元触媒として作用する。J. Biol. Chem. 254:9627-9632. 30

Janowicz, Z.A., Melber, K., Merckelbach, A., Jacobs, E., Harford, N., Comberbach, M., and Hollenberg, C.P. (1991): B型肝炎のS及びL表面抗原の同時発現及びメチロトローフ酵母Hansenula polymorpha内の混合粒子の形成。Yeast 7:431-443.

Jayabaskaran, C., Davison, P.F., and Paulus, H. (1987): ジスルフィド結合を含有する開裂可能なコネクタアームを伴う親和性基質の手軽な調製及びいくつかの応用。Prep. Biochem. 17:121-141. 40

Jenkins, N., Parekh, R.B., and James, D.C. (1996): グリコシル化の権利を獲得する: バイオテクノロジー産業への関与。Nat. Biotechnol. 14:975-981.

Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., and Thorner, J. (1984): 酵母プレプロアルファ因子のプロセッシングに必要とされるリシン-アルギニン-開裂エンドペプチダーゼのための推定上の構造遺伝子の単離。Cell 37:1075-1089. 50

- Kalef, E., Walfish, P.G., and Gitler, C. (1993): 近隣ジチオール含有タンパク質のヒ素ベースのアフィニティークロマトグラフィ: L1210白血病細胞質タンパク質及び組換え型ラット c-erb A ベータ1T3 レセプタの精製。Anal. Biochem. 212: 325 - 334.
- Kalidas, C., Joshi, L., and Batt, C. (2001): *Pichia pastoris* 内で発現されたベータラクトグロブリンのグリコシル化された変異体の特徴づけ。Protein Eng 14: 201 - 207.
- Kato, N., Ootsuyama, Y., Tanaka, T., Nakagawa, M., Nakazawa, T., Muraiso, K., Ohkoshi, S., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1992): C型肝炎ウイルスの推定上のエンベロープタンパク質内の著しい配列多様性。Virus Res. 22: 107 - 123. 10
- Kawasaki, G. and Fraenkel, D.G. (1982): 相補による酵母解糖遺伝子のクローニング。Biochem. Biophys. Res. Commun. 108: 1107 - 1122.
- Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D., and Douglas, M.G. (1983): 細菌及び酵母のポリエチレングリコールで誘発された遺伝子形質転換のための一般的方法。Gene 25: 333 - 341. 20
- Kumar, N., Kella, D., and Kinsella, J.E. (1985): 変性剤の不在下でのタンパク質のジスルフィド結合の制御された開裂のための方法。J. Biochem. Biophys. Methods 11: 251 - 263.
- Kumar, N., Kella, D., and Kinsella, J.E. (1986): タンパク質ジスルフィド結合の亜硫酸分解に対する変性剤の異常な効果。Int. J. Peptide Prot. Res. 28: 586 - 592. 30
- Maertens, G. and Stuyver, L. (1997): C型肝炎ウイルスの遺伝子型及び遺伝的変異。「ウイルス性肝炎の分子医学」中、T.J. Harrison and A.J. Zuckerman, eds John Wiley & Sons), pp. 183 - 233.
- Major, M.E. and Feinstone, S.M. (1997): C型肝炎の分子ウイルス学。Hepatology 25: 1527 - 1538.
- Miele, R.G., Nilsen, S.L., Brito, T., Brettbauer, R.K., and Castellino, F.J. (1997): 組織タイプのプラスミノゲン活性化物質の *Pichia pastoris* で発現された組換え型クリングル2領域のグリコシル化特性。Biotechnol. Appl. Biochem. 25 (Pt 2): 151 - 157. 40
- Meunier, J.C., Fournillier, A., Choukhi, A., Cahour, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J., and Wyckowski, C. (1999): C型肝炎ウイルス(HCV)糖タンパク質E1のグリコシル化部位の分析及びE1グリカンがHCV糖タンパク質複合体の形成に及ぼす影響。J. Gen Virol. 80 (Pt 4): 887 - 8 50

96.

Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O., and Cremata, J. A. (1998) : メチロトロフ酵母 *Pichia pastoris* によって分泌された異種タンパク質上の N - 結合されたオリゴ糖構造の変異。 *Protein Expr. Purif.* 14 : 197 - 207 .

Mustilli, A. C., Izzo, E., Houghton, M., and Galeotti, C. L. (1999) : *Saccharomyces cerevisiae* 及び *Kluyveromyces lactis* における C 型肝炎ウイルス糖タンパク質の分泌の比較 *Res. Microbiol.* 150 : 179 - 187 .

10

Nagai, K. and Thogersen, H. C. (1984) : *Escherichia coli* 内で産生されるハイブリッドタンパク質の配列特異的タンパク質分解によるベータグロビンの生成 。 *Nature* 309 : 810 - 812 .

Nielsen, P. E. (2001) : ペプチド核酸 (PNA) を用いた 2 本鎖 DNA のターゲティング。 *Curr Med Chem* 8 : 545 - 550 .

Okabayashi, K., Nakagawa, Y., Hayasuke, N., Ohi, H., Miura, M., Ishida, Y., Shimizu, M., Murakami, K., Hirabayashi, K., Minamino, H., and (1991) : 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 内のヒト血清アルブミン遺伝子の分泌発現。 *J. Biochem. (Tokyo)* 110 : 103 - 110 .

20

Orum, H. and Wengel, J. (2001) : ロックされた核酸 : 遺伝子機能解析及びアンチセンス薬剤の開発のための将来性のある分子系統群 。 *Curr Opin. Mol. Ther.* 3 : 239 - 243 .

30

Padgett, K. A. and Sorge, J. A. (1996) : PCR クローニングにおける制限部位とは独立した継目の無い結合部の作成。 *Gene* 168 : 31 - 35 .

Panchal, T. and Wodzinski, R. J. (1998) : *Aspergillus niger* (*A. ficuum*) NRRL 3135 由来のフィターゼと組換え型フィターゼの間のグリコシル化パターンの比較。 *Prep. Biochem. Biotechnol.* 28 : 201 - 217 .

Pedersen, J., Lauritzen, C., Madsen, M. T., and Weis, D. S. (1999) : 工学処理されたアミノペプチダーゼを用いた組換え型タンパク質からの N 末端ポリヒスチジンタグの除去。 *Protein Expr. Purif.* 15 : 389 - 400 .

40

Pomroy, N. C. and Deber, C. M. (1998) : 可逆的システイン PEG 化による疎水性ペプチドの可溶化。 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245 : 618 - 621 .

Raymond, C. K. (1999) : *Pichia methanolica* 内の組換え型タンパク質発現。 遺伝子発現系内 : 発現技術のための自然の利用。 *J. M. Fe*

50

rnandez and J. P. Hoeffler, eds (San Diego : Academic Press), pp. 193 - 209.

Rein, A., Ott, D. E., Mirro, J., Arthur, L. O., Rice, W., and Henderson, L. E. (1996): ウィルスヌクレオカプシドタンパク質内でジンクフィンガーと反応する化合物によるマウス白血病ウイルスの不活性化。J. Virol. 70: 4966 - 4972.

Roggenkamp, R., Hansen, H., Eckart, M., Janowicz, Z., and Hollenberg, C. P. (1986): 自律的複製及び組み込みベクターによるメチロトローフ酵母 *Hansenula polymorpha* の形質転換。Mol Gen Genet 202: 302 - 308.

10

Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A. J., Lau, J. Y., Choo, Q. L., Chien, D., Pileri, P., Houghton, M., and Abrignani, S. (1996): C型肝炎ウイルスに対する中和抗体を推定するための定量試験: 標的細胞に結合するエンベロープ糖タンパク質2のサイトフルオリメトリーによる査定。Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93: 1759 - 1763.

20

Rose, J. K. and Doms, R. W. (1988): 小胞体からのタンパク質排出の調節。Annu. Rev. Cell Biol. 4: 257 - 288.

Russell, D. W., Smith, M., Williamson, V. M., and Young, E. T. (1983): 酵母アルコールデヒドロゲナーゼ I 遺伝子のヌクレオチド配列。J. Biol. Chem. 258: 2674 - 2682.

Russell, P. R. (1983): 酵母内での mRNA 転写開始メカニズムの進化的分岐。Nature 301: 167 - 169.

30

Russell, P. R. (1985): *Schizosaccharomyces pombe* のトリオース燐酸イソメラーゼ遺伝子の転写は *Saccharomyces cerevisiae* 中とは異なる開始点から開始する。Gene 40: 125 - 130.

Russell, P. R. and Hall, B. D. (1983): 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子の1次構造。J. Biol. Chem. 258: 143 - 149.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989): 分子クローニング; 実験室マニュアル。Cold Spring Harbor Laboratory Press.

40

Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romanos, M. A., and Sreerikrishna, K. (1994): 高レベルの外來遺伝子発現のための *Pichia pastoris* の高コピー数形質転換体の G418 を用いた急速選択。Biotechnology (N. Y.) 12: 181 - 184.

Singh, R. and Kats, L. (1995): セレノールによる二硫化

50

- 物還元触媒作用。 *Anal. Biochem.* 232:86-91.
 Sohn, J. H., Choi, E. S., Kang, H. A., Rhee, J. S., and Rhee, S. K. (1999): 末端小粒会合した自律的に複製する配列の系統群及び *Hansenula polymorpha* DL-1 内のターゲティングされた組換えにおけるその機能。 *J. Bacteriol.* 181:1005-1013.
- Stuyver, L., van Arnhem, W., Wyseur, A., Hernandez, F., Delaporte, E., and Maertens, G. (1994): エンペロープ 1 及び非構造 5 B 領域の系統発生解析に基づく C 型肝炎ウイルスの分類及び 5 つの追加亜型の同定。 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:10134-10138. 10
- Sugrue, R. J., Cui, T., Xu, Q., Fu, J., and Han, Y. C. (1997): *Escherichia coli* 及び *Pichia pastoris* を用いた組換え型 Dengue 熱ウイルス E タンパク質の産生。 *J. Virol. Methods* 69:159-169.
- Thakur, M. L., DeFulvio, J., Richard, M. D., and Park, C. H. (1991): テクネチウム-99m で標識づけされたモノクローナル抗体: 還元剤の評価。 *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* 18:227-233. 20
- Trimble, R. B., Atkinson, P. H., Tschopp, J. F., Townsend, R. R., and Maley, F. (1991): メチロトローフ酵母 *Pichia pastoris* により分泌された *Saccharomyces SUC2* インベルターゼ上のオリゴ糖の構造。 *J. Biol. Chem.* 266:22807-22817.
- Vingerhoeds, M. H., Haisma, H. J., Belliot, S. O., Smit, R. H., Crommelin, D. J., and Storm, G. (1996): 抗体特異的酵素プロドラッグ療法 (ADEPT) のための酵素-担体 (イムノエンザイゾーム) としてのイムノリポソーム: プロドラッグ活性化能力の最適化。 *Pharm. Res.* 13:604-610. 30
- Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hokfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren, K., Ossipov, M., Koshkin, A., Jakobsen, N., Skouy, J., Oerum, H., Jacobsen, M. H., and Wengel, J. (2000): ロック核酸を含有する強力かつ無毒なアンチセンスオリゴヌクレオチド。 *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5633-5638. 40
- Weydemann, U., Keup, P., Piontek, M., Strasser, A. W., Schweden, J., Gellissen, G., and Janowicz, Z. A. (1995): *Hansenula polymorpha* によるヒルジンの高レベル分泌 - 3 つの異なるプレプロヒルジンの真正なプロセッシング。 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:377-385.
- Young, M., Davies, M. J., Bailey, D., Gra 50

dwell, M. J., Smestad-Paulsen, B., Wold, J. K., Barnes, R. M. R., Hounsell, E. (1998): *Saccharomyces cerevisiae* の抗原性マンナン由来のオリゴ糖の特徴づけ. *Glycoconjugate Journal* 15: 815-822.

Zauberman, A., Nussbaum, O., Ilan, E., Eren, R., Ben-Moshe, O., Arazi, Y., Berre, S., Lubin, I., Shouval, D., Galun, E., Reisner, Y., and Dagan, S. (1999): マウス系: C型肝炎感染及び治療用作用物質の評価用のマウスモデル. C型肝炎および関連ウイルスに関する第6回国際シンポジウム. Bethesda 6-9 June, 1999.

【図面の簡単な説明】

【0306】

【図1】配列番号6中に定義されている通りの配列を有するベクターpGEMT-E1sH6RBの概略的地図である。

【図2】配列番号9中に定義されている通りの配列を有するベクターpCHH-Hirの概略的地図である。

【図3】配列番号12中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT121の概略的地図である。

【図4】配列番号13中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT-CHH-E1-H6の概略的地図である。

【図5】配列番号16中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT-MFa-E1-H6の概略的地図である。

【図6】配列番号17中に定義されている通りの配列を有するベクターpUC18-FMD-MFa-E1-H6の概略的地図である。

【図7】配列番号20中に定義されている通りの配列を有するベクターpUC18-FMD-CL-E1-H6の概略的地図である。

【図8】配列番号21中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT-CL-E1-H6の概略的地図である。

【図9】配列番号22中に定義されている通りの配列を有するベクターpSP72E2H6の概略的地図である。

【図10】配列番号23中に定義されている通りの配列を有するベクターpMPT121の概略的地図である。

【図11】配列番号24中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT-MFa-E2-H6の概略的地図である。

【図12】配列番号25中に定義されている通りの配列を有するベクターpMPT-MFa-E2-H6の概略的地図である。

【図13】配列番号28中に定義されている通りの配列を有するベクターpMF30の概略的地図である。

【図14】配列番号32中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT-CL-E2-H6の概略的地図である。

【図15】配列番号35中に定義されている通りの配列を有するベクターpUC18-FMD-CL-E1の概略的地図である。

【図16】配列番号36中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT-CL-E1の概略的地図である。

【図17】配列番号39中に定義されている通りの配列を有するベクターpUC18-FMD-CL-H6-E1-K-H6の概略的地図である。

【図18】配列番号40中に定義されている通りの配列を有するベクターpFPMT-C

10

20

30

40

50

L - H 6 - K - E 1 の概略的地図である。

【図 19】配列番号 4 1 中に定義されている通りの配列を有するベクター p Y I G 5 の概略的地図である。

【図 20】配列番号 4 2 中に定義されている通りの配列を有するベクター p Y I G 5 E 1 H 6 の概略的地図である。

【図 21】配列番号 4 3 中に定義されている通りの配列を有するベクター p S Y 1 の概略的地図である。

【図 22】配列番号 4 4 中に定義されている通りの配列を有するベクター p S Y 1 a M F E 1 s H 6 a の概略的地図である。

【図 23】配列番号 4 5 中に定義されている通りの配列を有するベクター p B S K - E 2 s H 6 の概略的地図である。 10

【図 24】配列番号 4 6 中に定義されている通りの配列を有するベクター p Y I G 5 H C C L - 2 2 a H 6 の概略的地図である。

【図 25】配列番号 4 7 中に定義されている通りの配列を有するベクター p Y Y I G S E 2 H 6 の概略的地図である。

【図 26】配列番号 4 8 中に定義されている通りの配列を有するベクター p Y I G 7 の概略的地図である。

【図 27】配列番号 4 9 中に定義されている通りの配列を有するベクター p Y I G 7 E 1 の概略的地図である。

【図 28】配列番号 5 0 中に定義されている通りの配列を有するベクター p S Y 1 Y I G 7 E 1 s の概略的地図である。 20

【図 29】配列番号 5 1 中に定義されている通りの配列を有するベクター p P I C Z a l p h a A の概略的地図である。

【図 30】配列番号 5 2 中に定義されている通りの配列を有するベクター p P I C Z a l p h a D ' の概略的地図である。

【図 31】配列番号 5 3 中に定義されている通りの配列を有するベクター p P I C Z a l p h a E ' の概略的地図である。

【図 32】配列番号 5 8 中に定義されている通りの配列を有するベクター p P I C Z a l p h a D ' E 1 s H 6 の概略的地図である。

【図 33】配列番号 5 9 中に定義されている通りの配列を有するベクター p P I C Z a l p h a E ' E 1 s H 6 の概略的地図である。 30

【図 34】配列番号 6 0 中に定義されている通りの配列を有するベクター p P I C Z a l p h a D ' E 2 s H 6 の概略的地図である。

【図 35】配列番号 6 1 中に定義されている通りの配列を有するベクター p P I C Z a l p h a E ' E 2 s H 6 の概略的地図である。

【図 36】配列番号 6 2 中に定義されている通りの配列を有するベクター p U C 1 8 M F a の概略的地図である。

【図 37】M F a - E 2 - H 6 を発現する *Hansenula polymorpha* から発現された I M A C による精製済みの E 2 - H 6 タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロフィール（実施例 1 5 参照）。X 軸は、溶出体積（m L 単位）を表わす。溶出プロフィールを通る垂直線は、収集された画分を表わしている。「P 1」= プールされた画分 4 ~ 9、「P 2」= プールされた画分 3 0 ~ 3 5 そして「P 3」= プールされた画分 3 7 ~ 4 4。Y 軸は、m A u（ミリ吸光度単位）で与えられた吸光度を表わす。X 軸は、m L 単位の溶出体積を表わす。 40

【図 38】サイズ排除クロマトグラフィー（図 3 7 参照）の後に収集された異なるプール及び画分を、非還元性 S D S - P A G E とそれに続くポリアクリルアミドゲルの銀染色により分析した。分析されたプール（「P 1」、「P 2」及び「P 3」）及び画分（1 6 ~ 2 6）は、銀染色されたゲルの写真の上部に示されている。左（レーン「M」）には、分子質量マーカーのサイズが示されている。

【図 39】図 3 7 に示されている通りのサイズ排除クロマトグラフィー工程の画分 1 7 ~ 2 50

3をプールし、アルキル化した。その後、タンパク質材料を、脱グリコシル化のための Endo H 処理に付した。未処理材料及び Endo H 処理済み材料を、SDS-PAGEゲル上で分離し、PVDF膜に対しブロットニングした。ブロットをアミドブラックで染色した。 レーン1: Endo H-処理前のアルキル化されたE2-H6 レーン2: Endo H-処理後のアルキル化されたE2-H6

【図40】*Saccharomyces cerevisiae* 中で発現されたE1の細胞溶解物のウエスタンブロット分析。ウエスタンブロットは、E1特異的モノクローナル抗体IGH201を用いて発色させた。 レーン1~4: E1-H6に結合されたニワトリリゾチームリーダーペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むpSY1YIG7E1s (配列番号50、図28)で形質転換された*Saccharomyces* クローン内での、それぞれ2日、3日、5日又は7日間の発現の後の発現産物。 レーン5~7: E1-H6に結合された α -交配因子リーダーペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むpSY1aMFE1sH6aYIGI (配列番号44、図22)で形質転換された*Saccharomyces* クローン内での、それぞれ2日、3日、又は5日間の発現の後の発現産物。 レーン8: 表示された通りのサイズをもつ分子量マーカー レーン9: HCV-組換え型ワクシニアウイルス感染した哺乳動物細胞によって産生された精製済みE1。

10

【図41】*H. polymorpha*により発現されこれによりCL-E2-H6からE2-H6までプロセッシングされた固定化金属イオンアフィニティクロマトグラフィ (IMAC)で精製済みのE2-H6タンパク質分析 (実施例17参照)。異なる洗浄画分 (レーン2-4)及び溶出画分 (レーン5~7)内のタンパク質を、還元性SDS-PAGEとそれに続くゲルの銀染色 (A、写真上)またはE2に対して向けられた特異的モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法 (B、写真下)により分析した。分子量マーカーのサイズは、左に記されている。

20

【図42】*H. polymorpha*により産生されたスルホン化されたH6-K-E1タンパク質の精製のための、Ni-IDAカラム上の第1のIMACクロマトグラフィ工程の溶出プロフィール (Ni²⁺が投入されたキレート化セファロースFF、Pharmacia) (実施例18参照)。カラムは、20mMのイミダゾールで補足された緩衝液A (50mMのリン酸塩、6MのGuHCl、1%のエンピゲンBB (v/v)、pH7.2)で平衡化された。試料適用後、カラムを、(クロマトグラム上で示されているように)それぞれ20mM及び50mMのイミダゾールを含有する緩衝液Aで逐次的に洗浄した。Hisタグ付けされた産物のさらなる洗浄及び溶出工程を、(クロマトグラム上で示されているように)それぞれ50mMのイミダゾール及び200mMのイミダゾールで補足された緩衝液B (PBS 1% エピゲンBB、pH7.2)を逐次的に適用することによって実施した。以下の画分をプールした: 洗浄プール1 (画分8~11、50mMのイミダゾールでの洗浄)。溶出した材料を、別々の画分63~72として収集するか又は、溶出プール (画分63~69)を製造した。Y軸は、mAU (ミリ吸光度単位)で与えられた吸光度を表わす。X軸は、mL単位の溶出体積を示している。

30

【図43】*H. polymorpha*により発現され、CL-H6-K-E1からH6-K-E1までプロセッシングされたIMACで精製されたH6-K-E1タンパク質の分析 (図42参照)。洗浄プール1 (レーン12)及び溶出画分63~72 (レーン2~11)中のタンパク質を、還元性SDS-PAGEとそれに続くゲルの銀染色 (A、写真上)によって分析した。E1に対して向けられた特異的モノクローナル抗体 (IGH201)を用いたウエスタンブロット法により、IMAC前の試料中 (レーン2)、フロースループール中 (レーン4)、洗浄プール1中 (レーン5)、及び溶出プール (レーン6)中に存在するタンパク質を分析した (B、写真下; レーン3中にはいかなる試料も投入されなかった)。分子量マーカー (レーンM)のサイズは、左側に示されている。

40

【図44】Endo Lys-CでのH6-K-E1の*in vitro*処理 (精製: 図42参照)の結果をもたらされるE1の精製のための、Ni-IDAカラム上の第2のIMACクロマトグラフィ工程の溶出プロフィール (Ni²⁺が投入されたキレート化セフ

50

アローズFF、Pharmacia)。フロースルーは、異なる画分(1~40)の形で収集し、E1-産物の存在についてこれをスクリーニングした。H6-K-E1から処理された無傷のE1を含有する画分(7~28)をプールした。mAU(ミリ吸光度単位)で与えられた吸光度を表わす。X軸は、mL単位の溶出体積を示している。

【図45】ピオチニル化されたヘパリンと反応する特異的にE1sタンパク質バンドを示すウエスタンブロット分析(実施例19も同様に参照のこと)。HCV組換え型ワクシニアウイルス感染した哺乳動物培養から精製された又はH.polyomorphaにより発現されたE1s調製物を分析した。垂直線から右側の図版は、ピオチニル化されたE1特異的モノクローナルIGH200で発達されたウエスタンブロット法を示す。垂直線から左側の図版は、ピオチニル化されたヘパリンで現像されたウエスタンブロット法を示す。これらの結果から、主として比較的低いグリコシル化を受けたE1sがヘパリンに対する高いアフィニティを有するという結論が導かれた。レーンM;分子量マーカ(分子量は左に表示)。レーン1;単離中にアルキル化された、哺乳動物細胞からのE1s。レーン2;H.polyomorphaにより発現され、単離中に、スルホン化されたE1s-H6。レーン3;H.polyomorphaにより発現され、単離中に、アルキル化されたE1s-H6。レーン4;レーン2で投入された通りであるものの、スルホン化されたCys-チオール基をCys-チオールへと転換するためのシチオトトレイトールで処理された同じ材料。

10

【図46】ベタインに対するエンピゲンBBの交換により、ウイルス様粒子を形成させるためのPBS、3%ベタイン中のランに付された、スルホン化された形の精製済みのH.polyomorphaで発現されたE2-E6のサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)プロフィール。さらなる研究のために使用されるVLPを含有するプールされた画分は、「」で表わされている。Y軸は、mAU(ミリ吸光度単位)で与えられた吸光度を示す。X軸は、mL単位で表わした溶出体積を表わす。実施例20も同様に参照のこと。

20

【図47】ベタインに対するエンピゲンBBの交換により、ウイルス様粒子を形成させるためのPBS、3%ベタイン中のランに付された、アルキル化された形の精製済みのH.polyomorphaで発現されたE2-E6のサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)でプロフィール。VLPを含有するプールされた画分は、「」で表わされている。Y軸は、mAU(ミリ吸光度単位)で与えられた吸光度を示す。X軸は、mL単位で表わした溶出体積を表わす。実施例20も同様に参照のこと。

30

【図48】ベタインに対するエンピゲンBBの交換により、ウイルス様粒子を形成させるためのPBS、3%ベタイン中のランに付された、スルホン化された形の精製済みのH.polyomorphaで発現されたE1のサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)でプロフィール。VLPを含有するプールされた画分は、「」で表わされている。Y軸は、mAU(ミリ吸光度単位)で与えられた吸光度を示す。X軸は、mL単位で表わした溶出体積を表わす。実施例20も同様に参照のこと。

【図49】ベタインに対するエンピゲンBBの交換により、ウイルス様粒子を形成させるためのPBS、3%ベタイン中のランに付された、アルキル化された形の精製済みのH.polyomorphaで発現されたE1のサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)でプロフィール。VLPを含有するプールされた画分は、「」で表わされている。Y軸は、mAU(ミリ吸光度単位)で与えられた吸光度を示す。X軸は、mL単位で表わした溶出体積を表わす。実施例20も同様に参照のこと。

40

【図50】図48及び49中で記載されているようにサイズ排除クロマトグラフィ(SEC)後に単離された通りのVLPのSDS-PAGE(還元性条件下の)及びウエスタンブロット分析。左側図版:銀染色されたSDS-PAGEゲル。右側図版:E1対して向けられた特異的モノクローナル抗体(IGH201)を使用するウエスタンブロット法。レーン1:分子量マーカ(分子量は左側に表示);レーン2:スルホン化されたE1を含有するVLPのプール(図48参照);レーン3:アルキル化されたE1を含有するVLPのプール(図49参照)。実施例20も同様に参照のこと。

50

【図5 1】哺乳動物細胞中で産生されたE 1を用いたマウスのワクチン接種の後又は(図版上)又はHansenu 1aで産生されたE 1でのマウスのワクチン接種後(図版下)に血清中に存在する抗体の終点力価を決定するための、ELISA固体支持体上に、哺乳動物細胞内で産生されたE 1(「M」)又はHansenu 1aで産生されたE 1(「H」)をコーティングした。水平方向の棒は、平均抗体力価を表わす。終点力価(希釈倍数)は、Y軸に表わされている。実施例2 2も同様に参照のこと。

【図5 2】Hansenu 1a産生されたE 1をアルキル化(「A」又は(「S」)させ、アルキル化されたHansenu 1a産生E 1でのマウスのワクチン接種後(図版上)又はスルホン化されたHansenu 1a産生E 1でのマウスのワクチン接種後(図版下)の血清中に存在する抗体の終点力価を決定するためにELISA固体支持体上にコーティングした。水平方向棒は、平均抗体力価を表わす。終点力価(希釈倍数)は、Y軸に表わされている。実施例2 3も参照のこと。

【図5 3】HCV組換え型ワクシニアウイルスに感染した哺乳動物細胞によって産生されたHCV E 1及びH. polyomorph aにより産生されたHCV E 1を直接ELISAプレートにコーティングした。哺乳動物細胞によって産生されたE 1に対し発生させられたマウスのモノクローナル抗体(図版下)及び哺乳動物細胞により産生されたE 1でワクチン接種されたチンパンジー(図版上)の血清中の抗体の終点力価を決定した。チンパンジーYoran及びMart iは予防的にワクチン接種を受けた。チンパンジーTon、Phil、Marcel、Peggy及びFemmaは、治療的にワクチン接種を受けた。黒色棒線：哺乳動物細胞により産生されたE 1でコーティングされたELISAプレート。白色棒線：Hansenu 1aにより産生されたE 1でコーティングされたELISAプレート。終点力価(希釈倍数)はY軸に示されている。実施例2 4も参照のこと。

【図5 4】組換え型ワクチンウイルスに感染した哺乳動物細胞によって産生されたE 1及びHansenu 1aによって産生されたE 1-H 6タンパク質から遊離されたオリゴ糖の蛍光体援用炭水化物ゲル電気流動法。レーン1：単糖類の数(3~10、G3~G10により表示)が左に示されているグルコースラダー標準。レーン2：哺乳動物細胞によって産生された(アルキル化された)E 1から遊離された25 µgのN結合したオリゴ糖。レーン3：Hansenu 1aによって産生された(アルキル化された)E 1-H 6から遊離された25 µgのN結合したオリゴ糖。レーン4：100 pmol esのマルトテトラオース。図2 5も参照のこと。

【図5 5】この図は、基準オリゴマンノースMan - 9(図5 5、A)、Man - 8(図5 5、B)、Man - 7(図5 5、C)、Man - 6(図5 5、D)、及びMan - 5(図5 5、E)の単純化された構造を示す。「Man」=マンノース；「GlcNAc」=N-アセチルグルコサミン；「」=2つのマンノースの間の結合；「」=2つのマンノース間の結合；「(1-3)」、「(1-4)」及び「(1-6)」=それぞれ2つのマンノース間の(1-3)、(1-4)及び(1-6)結合。図5 5、B及び5 5、C内のカッコは、カッコの左側にそれぞれ2つ及び1つのマンノース残基(単複)が、そのカッコから右に3個の残基のうちのそれぞれ2つ及び1つに(1-2)結合の形でカップリングされていることを表わしている。実施例2 6も参照のこと。

【図5 6】この図は、キトビオースにカップリングされた10個のマンノース部分から成るより高いオリゴマンノースを示している。各々の末端マンノース残基は、非末端マンノース残基に対する1-3結合によって結合されている。細い上向き矢印は、1-2マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わししており(このオリゴマンノースについては無し)、太い上向き又は左向き矢印は、1-2結合されたマンノースの除去後マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合(このオリゴマンノースには該当せず)を表わし、白抜きの下向き矢印は、結合されたマンノースの除去後のマンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わす。実施例2 6も参照のこと。

【図5 7】この図は、キトビオースにカップリングされた10個のマンノース部分から成

10

20

30

40

50

るより高いオリゴマンノースを示している。このオリゴマンノースでは、1つの末端マンノース残基が、非末端マンノース残基に対する 1 - 2 結合によって結合されている。細い上向き矢印は、1 - 2 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わしており、太い上向き又は左向き矢印は、1 - 2 結合されたマンノースの除去後 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わし、白抜きの下向き矢印は、結合されたマンノースの除去後の マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わす。実施例 26 も参照のこと。

【図 5 8】この図は、キトビオースにカップリングされた 9 個のマンノース部分から成るより高い基準オリゴマンノース M a n - 9 を示している。このオリゴマンノースの中では、全ての末端マンノース残基は、非末端マンノース残基に対する 1 - 2 結合によって結合されている。細い上向き矢印は、1 - 2 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わしており、太い上向き矢印は、1 - 2 結合されたマンノースの除去後 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わし、白抜きの下向き矢印は、結合されたマンノースの除去後の マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わす。実施例 26 も参照のこと。

10

【図 5 9】この図は、キトビオースにカップリングされた 8 個のマンノース部分から成るより高いオリゴマンノース M a n - 8 を示している。このオリゴマンノースの中では、全ての末端マンノース残基は、この構造にを 1 - 2 マンノシダーゼによる開裂に対する完全な耐性を持つものにする非末端マンノースに対する 1 つの 1 - 3 又は 1 つの 1 - 6 結合によって結合されている。太い上向き矢印は、マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わし、白抜きの下向き矢印は、結合されたマンノースの除去後の マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わす。例えば、実施例 26 を参照のこと。

20

【図 6 0】この図は、キトビオースにカップリングされた 7 個のマンノース部分から成るより高いオリゴマンノース M a n - 7 を示している。このオリゴマンノース中では、全ての末端マンノース残基は、構造を 1 - 2 マンノシダーゼによる開裂に対する完全な耐性を持つものにする非末端マンノース残基に対する 1 - 3 結合によって結合されている。太い上向き矢印は、マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合（このオリゴマンノースには該当せず）を表わし、白抜きの下向き矢印は、結合されたマンノースの除去後の マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わす。実施例 26

30

【図 6 1】この図は、キトビオースにカップリングされた 9 個のマンノース部分から成るより高いオリゴマンノースを示している。このオリゴマンノースの中では、1つの末端マンノース残基が、非末端マンノース残基に対する 1 - 2 結合によって結合されている。細い上向き矢印は、1 - 2 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わしており、太い上向き又は左向き矢印は、1 - 2 結合されたマンノースの除去後 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わし、白抜きの下向き矢印は、結合されたマンノースの除去後の マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わす。実施例 26 も参照のこと。

【図 6 2】この図は、キトビオースにカップリングされた 8 個のマンノース部分及び 1 個又は 2 個のグルコース部分から成る推定上のグルコース含有オリゴ糖を示している。このオリゴ糖の中では、カッコの左側の (G l c) G l c によって示されている通り、A - 又は B 分岐 (図中の「 A 」及び「 B 」) の末端 1 - 2 結合されたマンノース残基のいずれか 1 つが、1 個又は 2 個のグルコース残基を担持している。細い上向き矢印は、末端マンノース残基にグルコースが全く結合されていないことを前提として、1 - 2 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わしている。太い上向き又は左向き矢印は、1 - 2 結合されたマンノースの除去後 マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わし、白抜きの下向き矢印は、結合されたマンノースの除去後の マンノシダーゼによる開裂を受けやすいオリゴ糖結合を表わす。考えられる反応生成物の概要は、実施例 26 の表 10 に示されている。

40

50

【図63】エキソグリコシダーゼを伴う又は伴わない一晩のインキュベーション後のMan-9の反応生成物を、Waters Allinace HPLCステーションにカップリングされたTSKゲル-Amide-80(0.46×25cm、Tosoh Biosep)カラム上で分離した。オリゴ糖の分離を、1.0mL/分で周囲温度で実施した。溶剤Aは、アセトニトリル中の0.1%の酢酸から成り、溶剤Bは、水中の0.2%の酢酸-0.2%のトリエチルアミンから成っていた。2-ABで標識づけされたオリゴ糖の分離を28%のBを用いて実施し、5カラム体積までは定組成とし、その後15カラム体積全体にわたり45%Bとなるまで線形に増加させた。溶出溶剤の組成は右側Y軸上に、溶剤A中の溶剤Bの%(v/v)として示されている。溶出時間はX軸上に分単位で示されている。左側Y軸は、溶出している2-アミノゼンズアミド(2-AB)標識づけされたオリゴ糖の蛍光度を示している。2-ABの励起波長は330nmで、発出波長は420nmである。クロマトグラムのトレース1(“1”)はエキソグリコシダーゼを伴わずに一晩インキュベートされたMan-9の溶出を示している。トレース2(“2”)は、1-2マンノシダーゼでMan-9を一晩インキュベートした後のMan-5及びMan-6の混合物の溶出を示している。トレース3及び4(“3”及び“4”)は、
 -マンノシダーゼでのMan-9の、それぞれ1時間及び一晩のインキュベーション後の4'-マンノシルキトピオースの溶出を示している。トレース5(“5”)は、
 -及び-マンノシダーゼでMan-9を一晩インキュベートした後のキトピオースの溶出を示している。トレース1~5は、オーバーレイとして表されており、そのために、それぞれの基線は全てゼロレベルにはない。トレース6(“6”)は、適用された溶剤勾配を示している。図の上部にA~Kの文字で示されているピークは、それが存在する場合、以下のものを表す：A、キトピオース；B、4'-マンノシル-キトピオース；C、Man-2；D、Man-3；E、Man-4；F、Man-5；G、Man-6；H、Man-7；I、Man-7；J、Man-8；及びK、Man-10。実施例26も参照のこと。

10

20

【図64】のSaccharomycesにより産生されたE1sから誘導されたオリゴ糖の反応生成物を、エキソグリコシダーゼを伴う又は伴わない一晩のインキュベーション後Waters Allinace HPLCステーションにカップリングされたTSKゲル-Amide-80(0.46×25cm、Tosoh Biosep)カラム上で分離した。オリゴ糖の分離を、1.0mL/分で周囲温度で実施した。溶剤Aは、アセトニトリル中の0.1%の酢酸から成り、溶剤Bは、水中の0.2%の酢酸-0.2%のトリエチルアミンから成っていた。2-ABで標識づけされたオリゴ糖の分離を28%のBを用いて実施し、5カラム体積までは定組成とし、その後15カラム体積全体にわたり45%Bとなるまで線形に増加させた。溶出溶剤の組成は右側Y軸上に、溶剤A中の溶剤Bの%(v/v)として示されている。溶出時間はX軸上に分単位で示されている。左側Y軸は、溶出している2-アミノゼンズアミド(2-AB)標識づけされたオリゴ糖の蛍光度を示している。2-ABの励起波長は330nmで、発出波長は420nmである。クロマトグラムのトレース1(“1”)はエキソグリコシダーゼを伴わずに一晩インキュベートされたSaccharomycesにより産生されたE1sから誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース2(“2”)は、1-2マンノシダーゼでMan-9を一晩インキュベーション後のSaccharomycesにより産生されたE1sから誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース3及び4(“3”及び“4”)は、
 -マンノシダーゼでの、それぞれ1時間及び一晩のインキュベーション後のSaccharomyces生成E1sから誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース5(“5”)は、
 -及び-マンノシダーゼでの一晩のインキュベート後のSaccharomycesにより産生されたE1sから誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース1~5は、オーバーレイとして表されており、そのために、それぞれの基線は全てゼロレベルにはない。トレース6(“6”)は、適用された溶剤勾配を示している。図の上部にA~Kの文字で示されているピークは、それが存在する場合、以下のものを表す：A、キトピオース；B、4'-マンノシル-キトピオース；C、Man-2；D、Man-

30

40

50

3 ; E、Man - 4 ; F、Man - 5 ; G、Man - 6 ; H、Man - 7 ; I、Man - 7 ; J、Man - 8 ; 及び K、Man - 10。実施例 26 も参照のこと。

【図 65】エキソグリコシダーゼを伴う又は伴わない一晩のインキュベーション後のワクシニアトランスフェクションを受けた哺乳動物細胞内で産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の反応生成物を、Waters Allinace HPLCステーションにカップリングされた TSKゲル-Amide-80 (0.46 x 25 cm、Tosoh Biosep) カラム上で分離した。オリゴ糖の分離を、1.0 mL / 分で周囲温度で実施した。溶剤 A は、アセトニトリル中の 0.1% の酢酸から成り、溶剤 B は、水中の 0.2% の酢酸 - 0.2% のトリエチルアミンから成っていた。2-AB で標識づけされたオリゴ糖の分離を 28% の B を用いて実施し、5 カラム体積までは定組成とし、その後 15 カラム体積全体にわたり 45% B となるまで線形に増加させた。溶出溶剤の組成は右側 Y 軸上に、溶剤 A 中の溶剤 B の % (v/v) として示されている。溶出時間は X 軸上に分単位で示されている。左側 Y 軸は、溶出 2-アミノゼンズアミド (2-AB) 標識づけされたオリゴ糖の蛍光度を示している。2-AB の励起波長は 330 nm で、発出波長は 420 nm である。クロマトグラムのトレース 1 (“1”) はエキソグリコシダーゼを伴わずに一晩インキュベートされたワクシニアトランスフェクションを受けた哺乳動物細胞内で産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 2 (“2”) は、1-2 マンノシダーゼで Man-9 を一晩インキュベートした後のワクシニアトランスフェクションを受けた哺乳動物細胞内で生成された E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 3 及び 4 (“3” 及び “4”) は、 α -マンノシダーゼでの、それぞれ 1 時間及び一晩のインキュベーション後のワクシニアトランスフェクションを受けた哺乳動物細胞内で産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 5 (“5”) は、 β -及び α -マンノシダーゼでの一晩のインキュベート後のワクシニアトランスフェクションを受けた哺乳動物細胞で産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 1 ~ 5 は、オーバーレイとして表されており、そのために、それぞれの基線は全てゼロレベルにはない。トレース 6 (“6”) は、適用された溶剤勾配を示している。図の上部に A ~ K の文字で示されているピークは、それが存在する場合、以下のものを表す：A、キトピオース；B、4'- α -マンノシル-キトピオース；C、Man-2；D、Man-3；E、Man-4；F、Man-5；G、Man-6；H、Man-7；I、Man-7；J、Man-8；及び K、Man-10。実施例 26 も参照のこと。

【図 66】エキソグリコシダーゼを伴う又は伴わない一晩のインキュベーション後の Hansenula により産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の反応生成物を、Waters Allinace HPLCステーションにカップリングされた TSKゲル-Amide-80 (0.46 x 25 cm、Tosoh Biosep) カラム上で分離した。オリゴ糖の分離を、1.0 mL / 分で周囲温度で実施した。溶剤 A は、アセトニトリル中の 0.1% の酢酸から成り、溶剤 B は、水中の 0.2% の酢酸 - 0.2% のトリエチルアミンから成っていた。2-AB で標識づけされたオリゴ糖の分離を 28% の B を用いて実施し、5 カラム体積までは定組成とし、その後 15 カラム体積全体にわたり 45% B となるまで線形に増加させた。溶出溶剤の組成は右側 Y 軸上に、溶剤 A 中の溶剤 B の % (v/v) として示されている。溶出時間は X 軸上に分単位で示されている。左側 Y 軸は、溶出している 2-アミノゼンズアミド (2-AB) 標識づけされたオリゴ糖の蛍光度を示している。2-AB の励起波長は 330 nm で、発出波長は 420 nm である。クロマトグラムのトレース 1 (“1”) はエキソグリコシダーゼを伴わずに一晩インキュベートされた Hansenula により産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 2 (“2”) は、1-2 マンノシダーゼで Man-9 を一晩インキュベートした後の Hansenula により産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 3 及び 4 (“3” 及び “4”) は、 α -マンノシダーゼで一晩インキュベーションした後の Hansenula 生成 E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 5 (“5”) は、 β -及び α -マンノシダーゼでの一晩のインキュ

10

20

30

40

50

バージョンの後の *Hansenu*la により産生された E1s から誘導されたオリゴ糖の溶出を示している。トレース 1 ~ 5 は、オーバーレイとして表されており、そのために、それぞれの基線は全てゼロレベルにはない。トレース 6 (" 6 ") は、適用された溶剤勾配を示している。図の上部に A ~ K の文字で示されているピークは、それが存在する場合、以下のものを表す：A、キトビオース；B、4' - マンノシル - キトビオース；C、Man - 2；D、Man - 3；E、Man - 4；F、Man - 5；G、Man - 6；H、Man - 7；I、Man - 7；J、Man - 8；及び K、Man - 10 を表している。実施例 26 も参照のこと。

【図 67】*Hansenu*la 及び HCV - 組換え型ワクシニアウイルス感染を受けた哺乳動物細胞により産生された E1 タンパク質の SDS - PAGE 分析及びクーマシーブリリアントブルー染色。レーン 1：左側に示された分子量をもつ分子量マーカー；レーン 2：*Hansenu*la *polymorpha* によって産生されたアルキル化された E1s (10 μ g)；レーン 3：*Hansenu*la *polymorpha* により産生されたアルキル化された E1 (5 μ g)；レーン 4：*Hansenu*la *plymorpha* により産生されたアルキル化された E1 (2.5 μ g)；レーン 5：HCV 組換え型ワクシニアウイルス感染されたベロ細胞によって産生されたアルキル化された E1 (10 μ g)；レーン 6：HCV 組換え型ワクシニアウイルスに感染したベロ細胞により産生されたアルキル化された E1 (5 μ g)；レーン 7：HCV - 組換え型ワクシニアウイルスに感染したベロ細胞により産生されたアルキル化された E1 (2.5 μ g)。実施例 27 も同様に参照のこと。

【図 68】脱グリコシル化したタンパク質のトリプシン消化フラグメント (ボックス配列) の表示を伴う、HCV E2 - H6 タンパク質の配列 (配列番号 5)。グリコシル化された Asn - 残基は、PNGアーゼ F 酵素により Asp - 残基に変換され、配列の下の「*」により表わされている。Asn - 残基は、Asp - N エンドプロテイナーゼによりタンパク質分解開裂を受けやすい。E2 - H6 (配列 5) 中の考えられる N - グリコシル化部位は、HCV ポリプロテイン内の番号付けに従って N₄₁₇、N₄₂₃、N₄₃₀、N₄₄₈、N₄₇₈、N₅₃₂、N₅₄₀、N₅₅₆、N₅₇₆、N₆₂₃ 及び N₆₄₅ である；これらの部位は、この囲みの中で N₃₄、N₄₀、N₄₇、N₆₅、N₉₅、N₁₄₉、N₁₅₇、N₁₇₃、N₁₉₃、N₂₄₀ 及び N₂₆₂ と番号付けされている。実施例 28 も参照のこと。

10

20

30

【 図 1 】

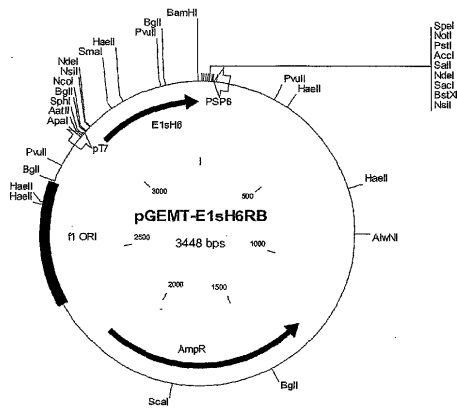


FIGURE 1

【 図 2 】

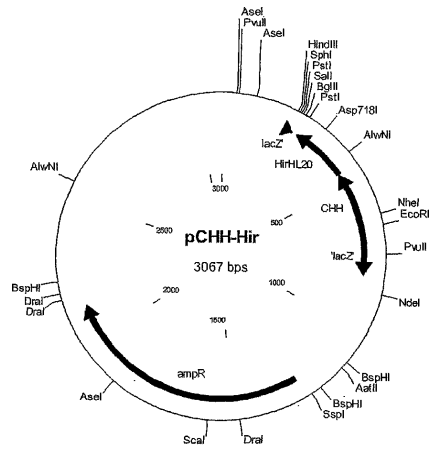


FIGURE 2

【 図 3 】

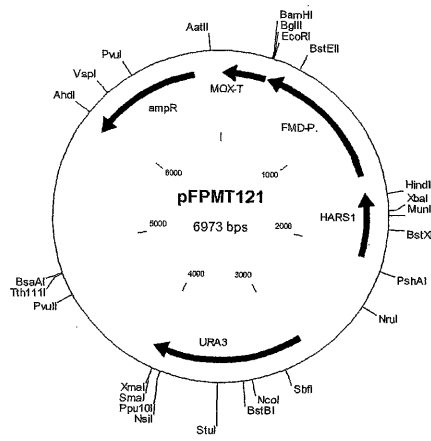


FIGURE 3

【 図 4 】

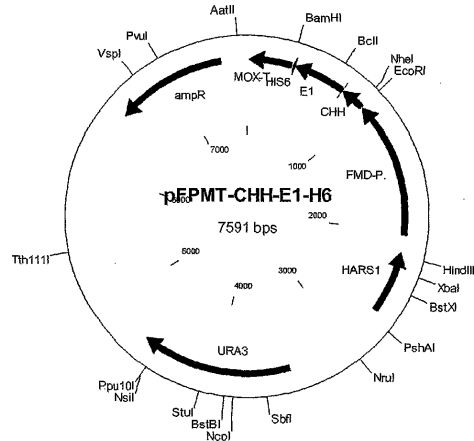


FIGURE 4

【 図 5 】

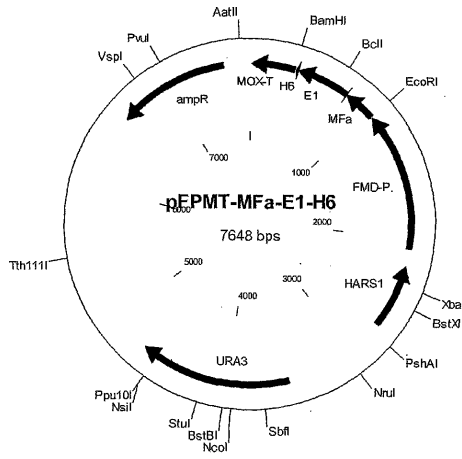


FIGURE 5

【 図 6 】

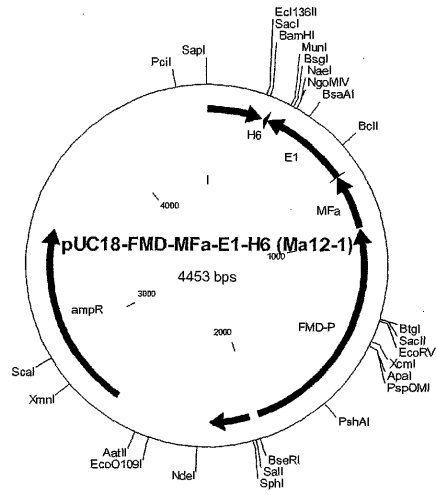


FIGURE 6

【 図 7 】

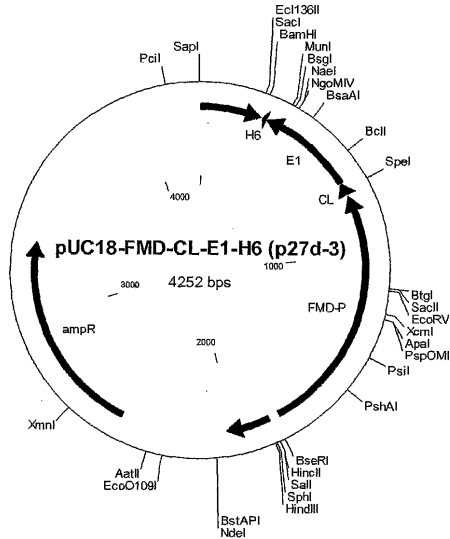


FIGURE 7

【 図 8 】

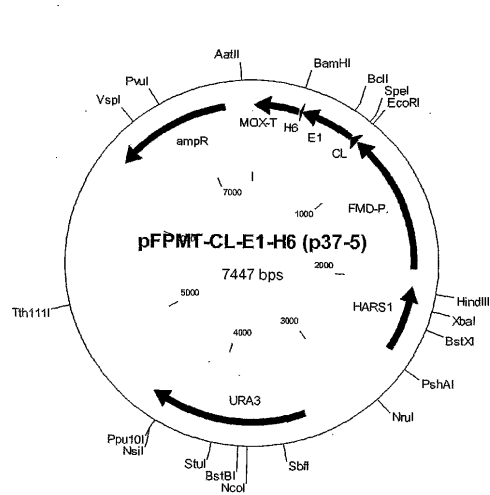


FIGURE 8

【 図 9 】

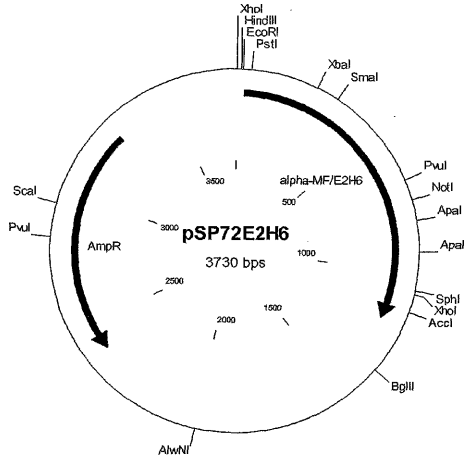


FIGURE 9

【 図 10 】

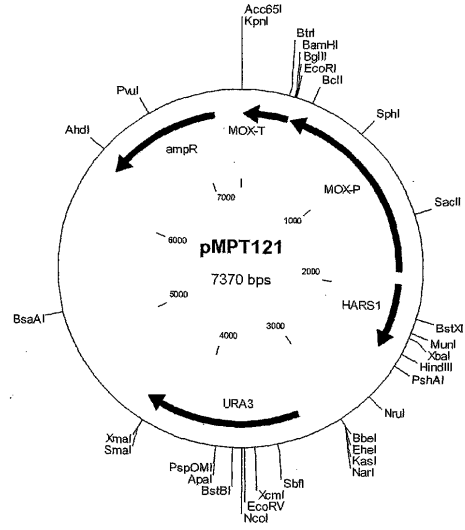


FIGURE 10

【 図 11 】

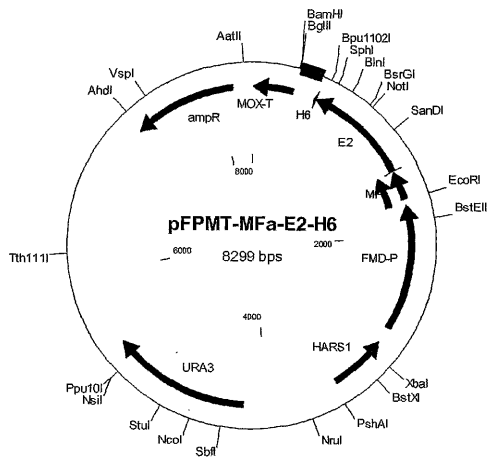


FIGURE 11

【 図 12 】

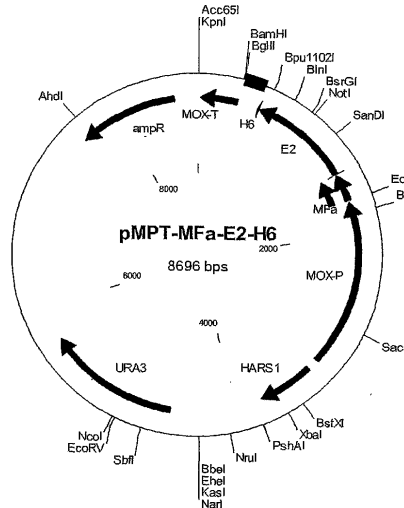


FIGURE 12

【 13 】

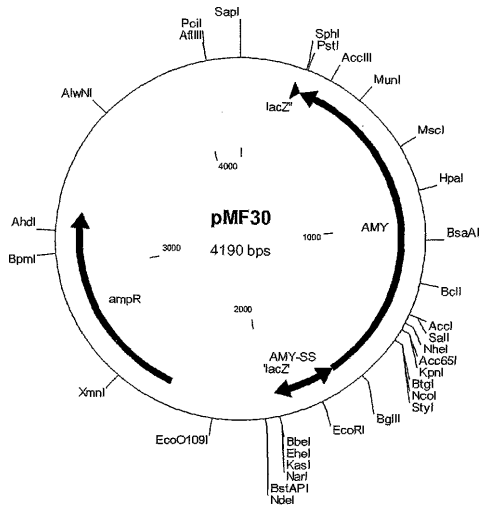


FIGURE 13

【 14 】

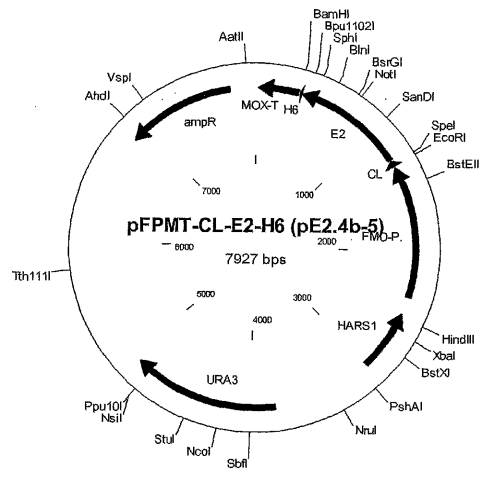


FIGURE 14

【 15 】

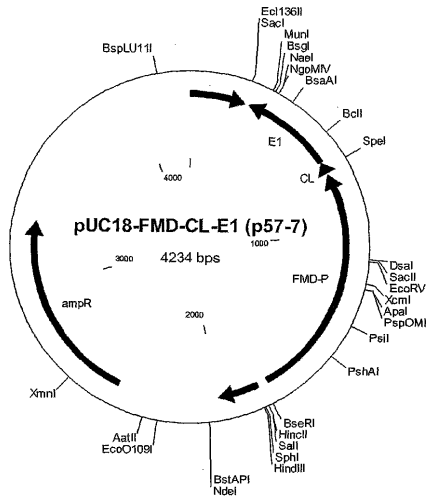


FIGURE 15

【 16 】

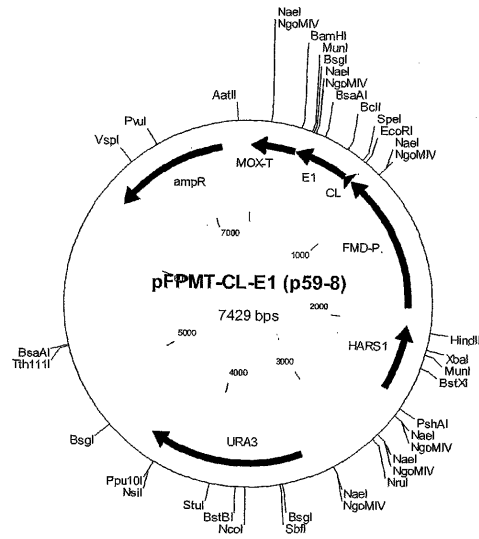


FIGURE 16

【 17 】

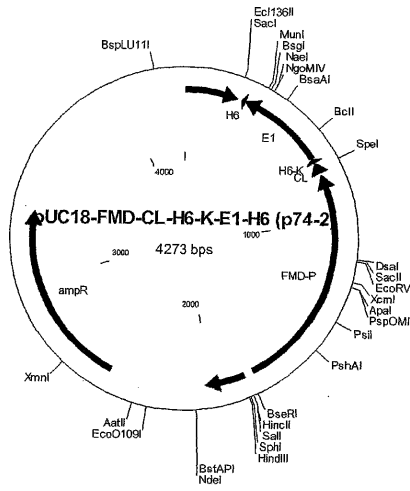


FIGURE 17

【 18 】

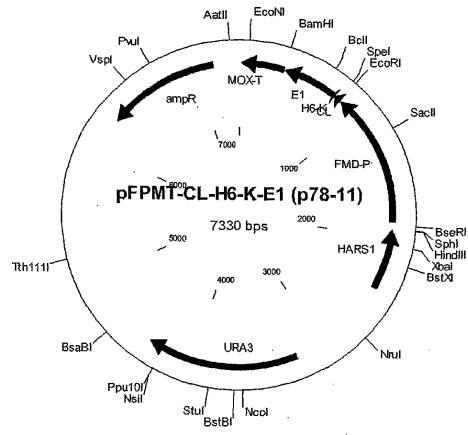


FIGURE 18

【 19 】

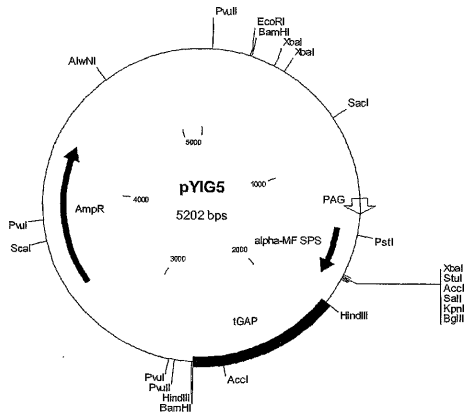


FIGURE 19

【 20 】

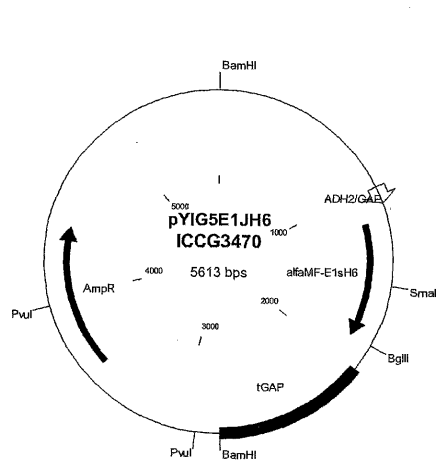


FIGURE 20

【 25 】

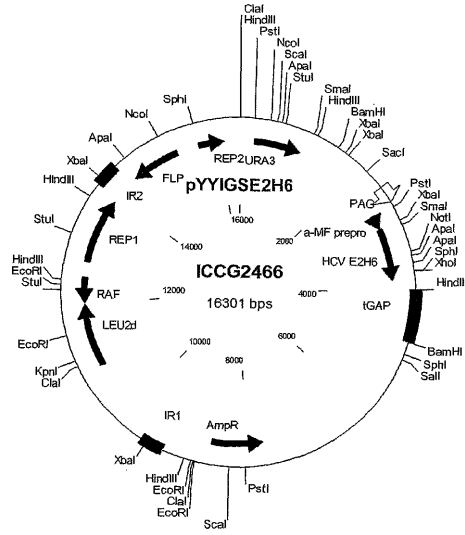


FIGURE 25

【 26 】

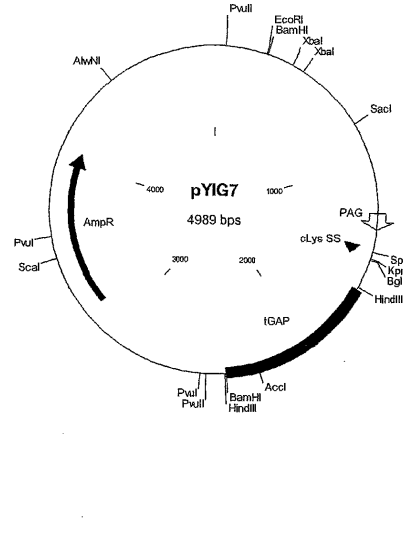


FIGURE 26

【 27 】

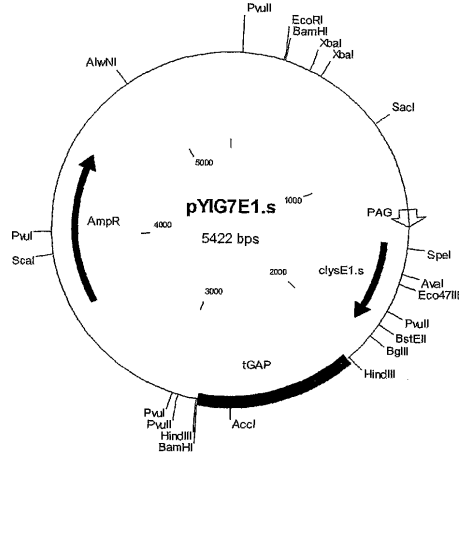


FIGURE 27

【 28 】

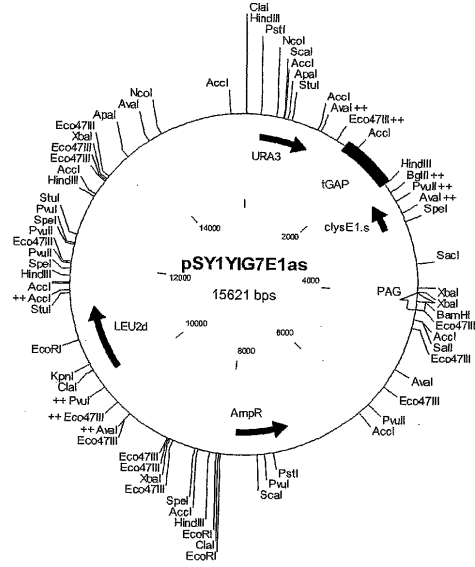


FIGURE 28

【 29 】

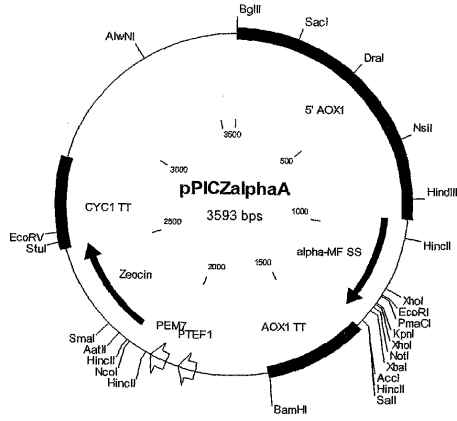


FIGURE 29

【 30 】

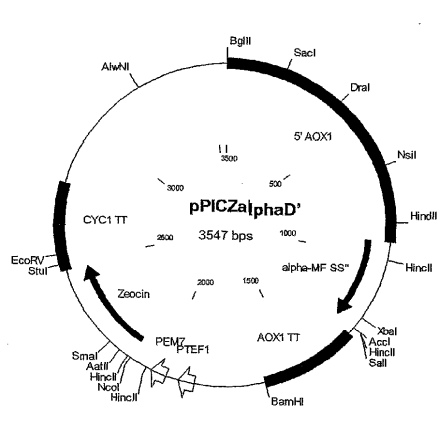


FIGURE 30

【 31 】

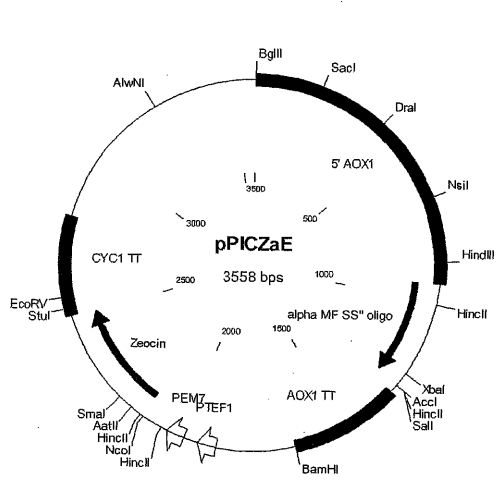


FIGURE 31

【 32 】

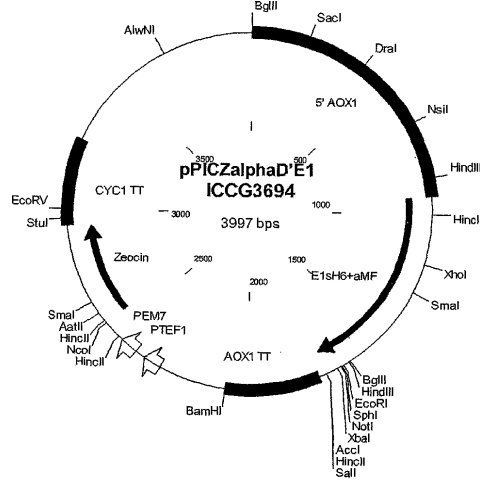


FIGURE 32

【 3 3 】

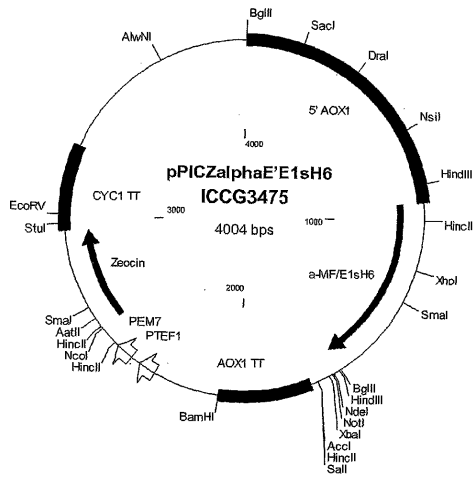


FIGURE 33

【 3 4 】

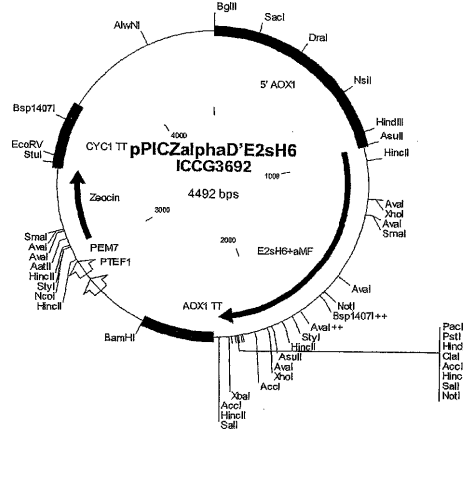


FIGURE 34

【 3 5 】

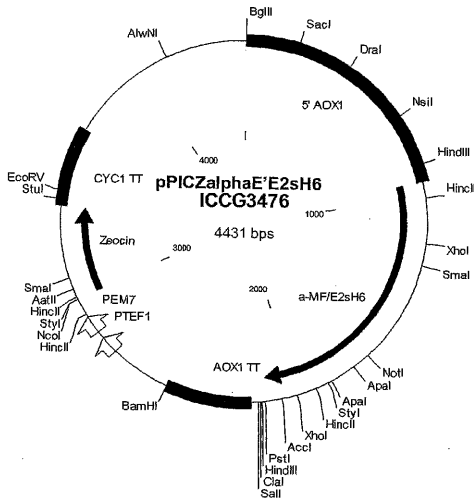


FIGURE 35

【 3 6 】

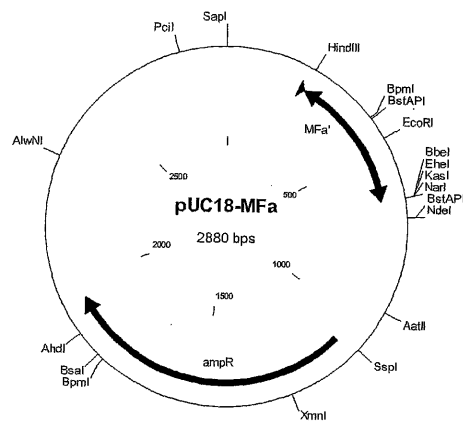


FIGURE 36

【 37 】

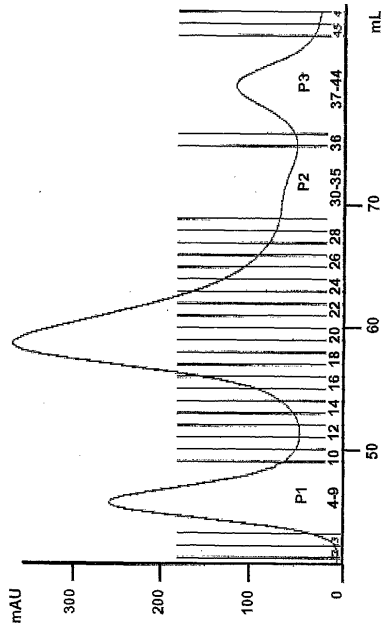


FIGURE 37

【 38 】

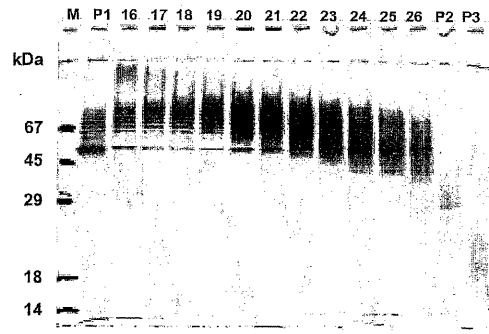


FIGURE 38

【 39 】

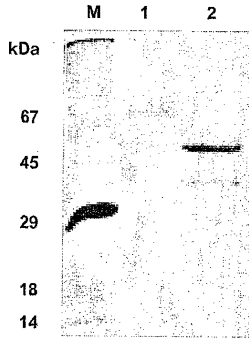


FIGURE 39

【 40 】

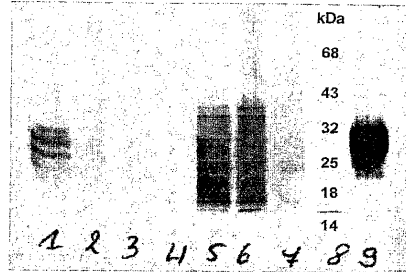


FIGURE 40

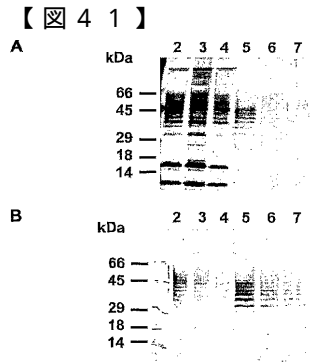


FIGURE 41

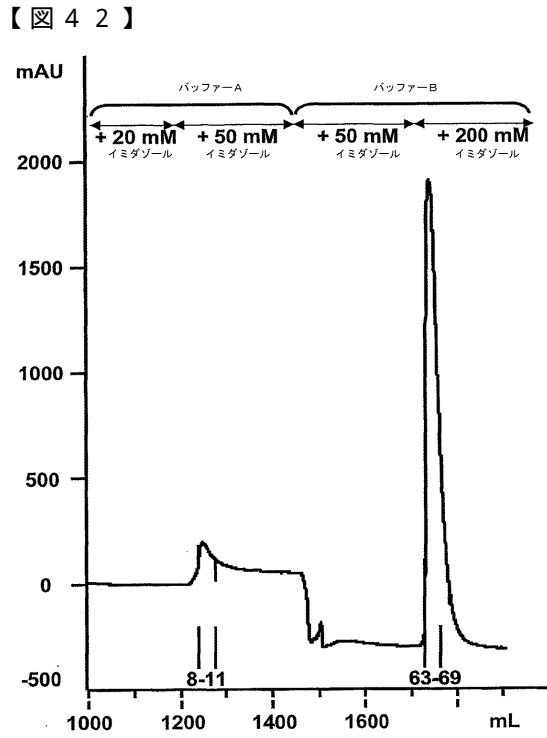


FIGURE 42

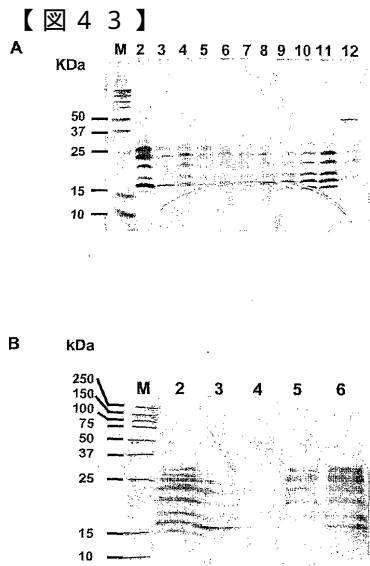


FIGURE 43

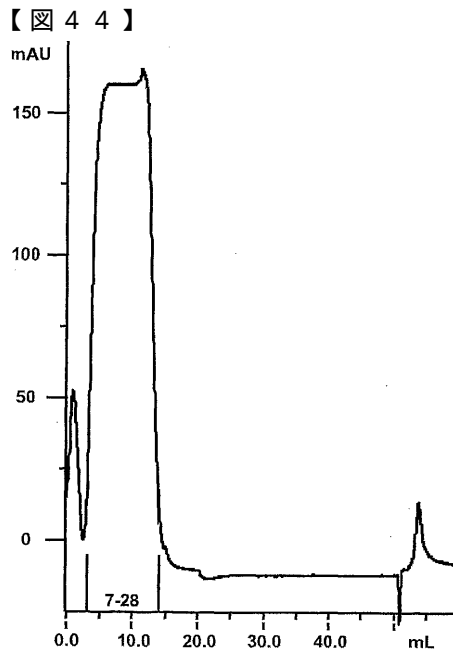


FIGURE 44

【 図 4 5 】

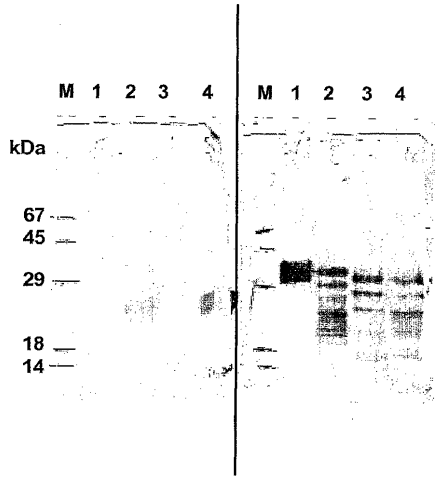


FIGURE 45

【 図 4 6 】

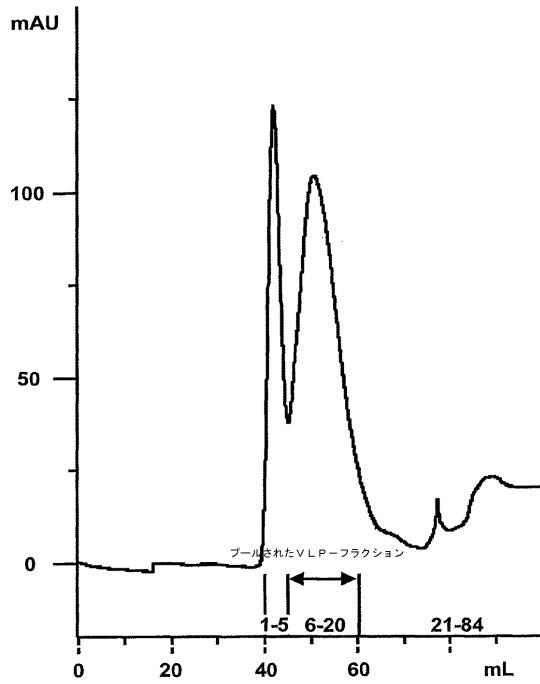


FIGURE 46

【 図 4 7 】

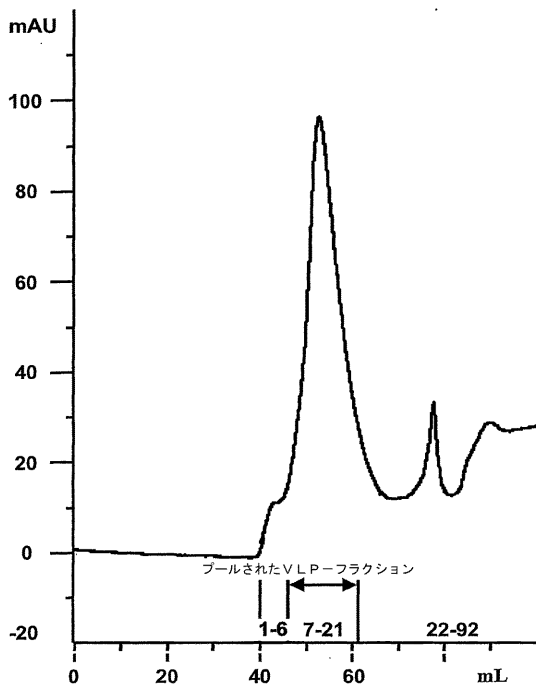


FIGURE 47

【 図 4 8 】

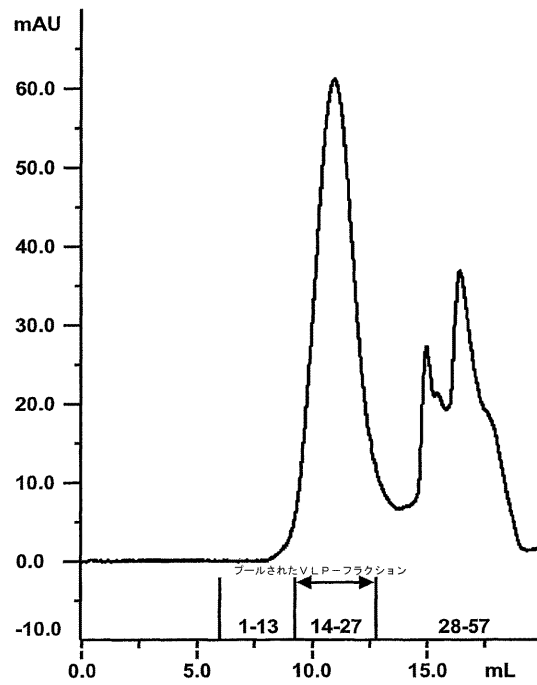


FIGURE 48

【 図 49 】

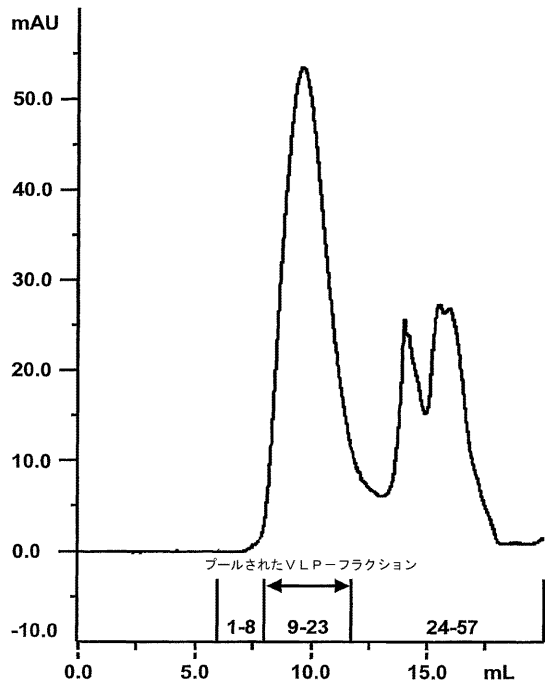


FIGURE 49

【 図 50 】

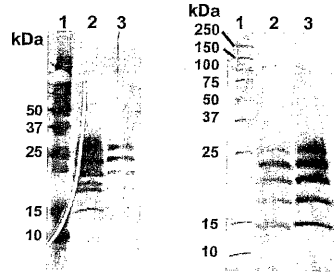


FIGURE 50

【 図 51 】

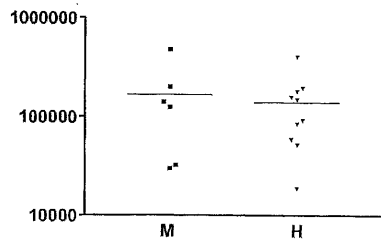


FIGURE 51

【 図 52 】

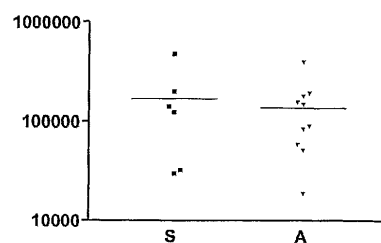
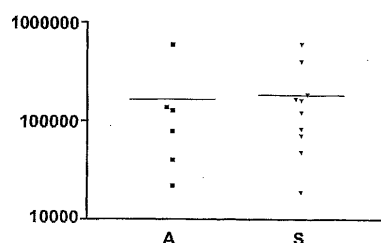
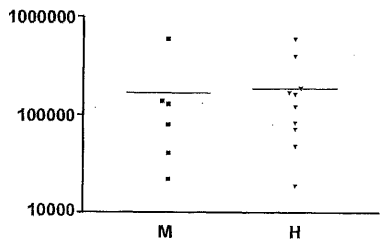


FIGURE 52



【 5 3 】

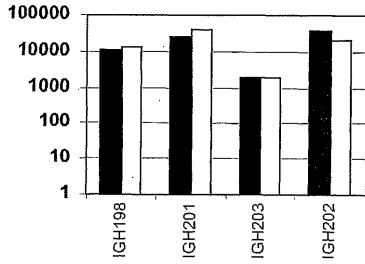
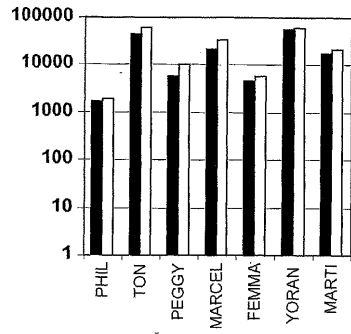


FIGURE 53

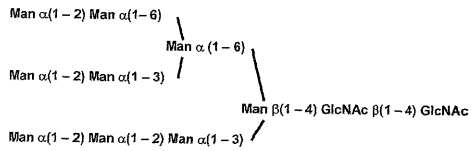
【 5 4 】



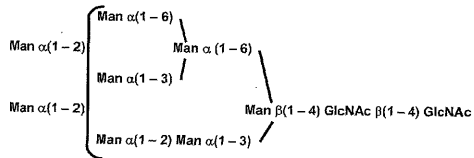
FIGURE 54

【 5 5 】

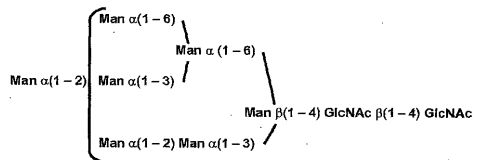
A. MAN-9



B. MAN-8



C. MAN-7



D. MAN-6

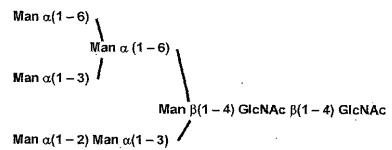


FIGURE 55 (continued)

FIGURE 55

E. MAN-5

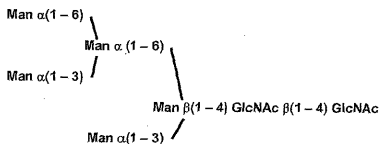


FIGURE 55 (continued)

【 図 5 6 】

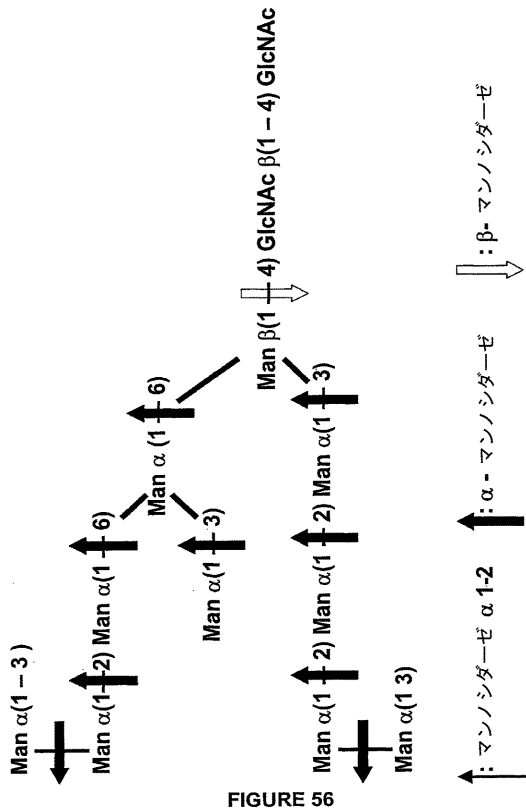


FIGURE 56

【 図 5 7 】

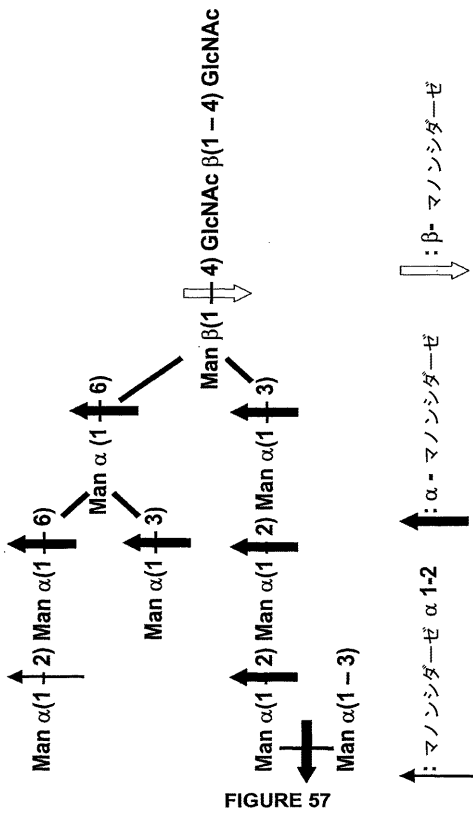


FIGURE 57

【 図 5 8 】

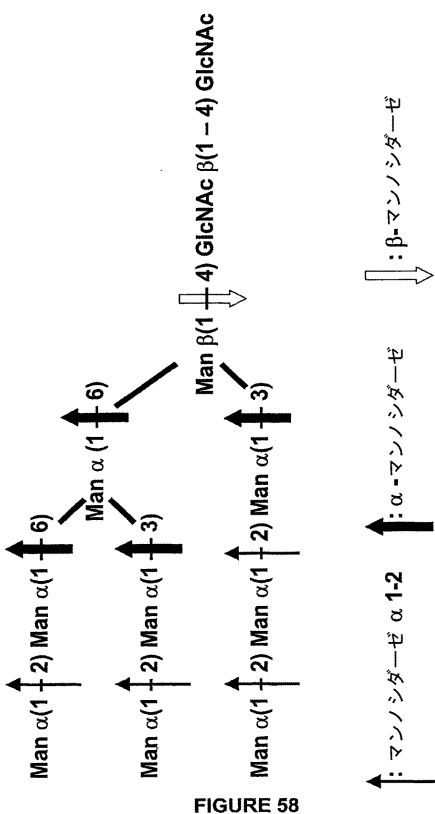


FIGURE 58

【 図 5 9 】

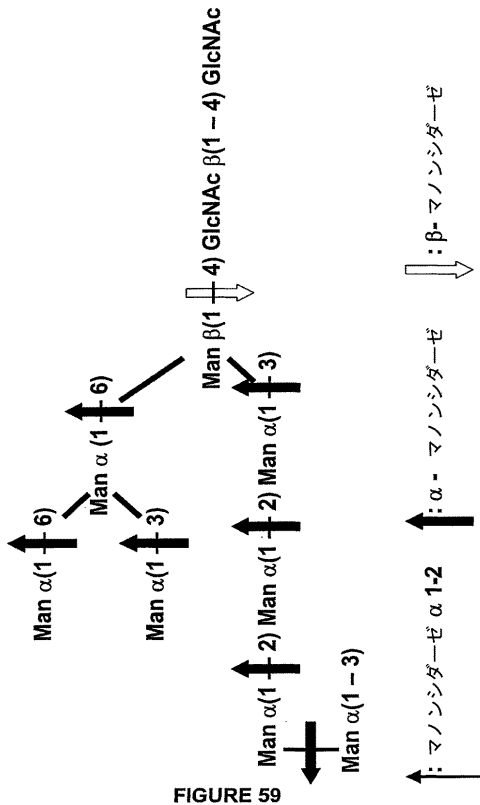


FIGURE 59

【 図 6 0 】

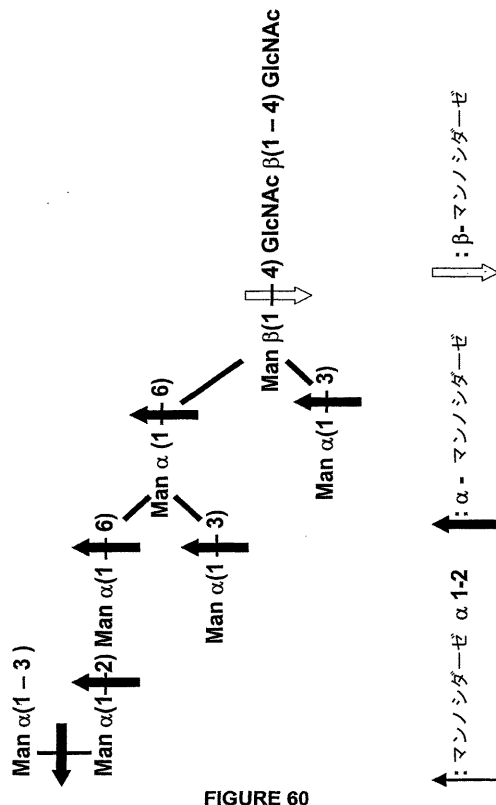


FIGURE 60

【 図 6 1 】

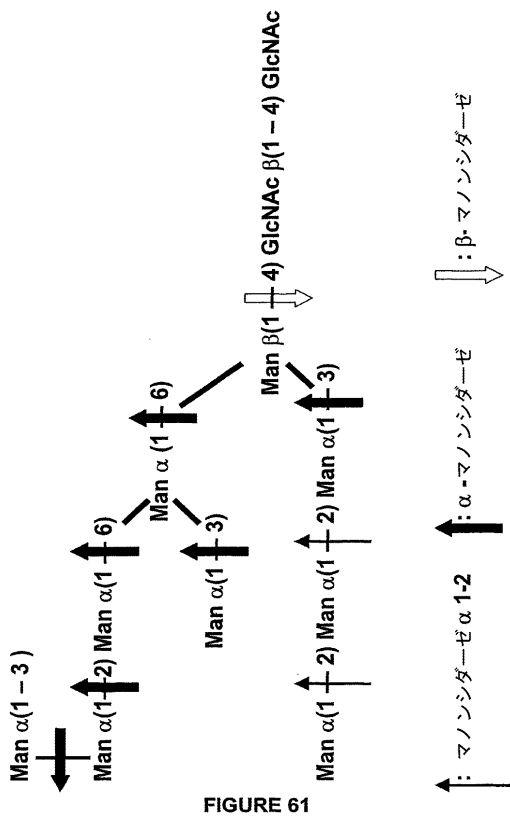


FIGURE 61

【 図 6 2 】

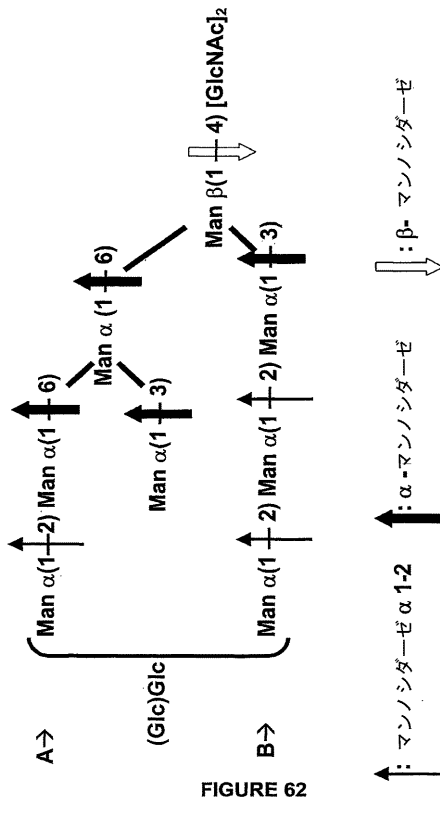


FIGURE 62

【 図 6 3 】

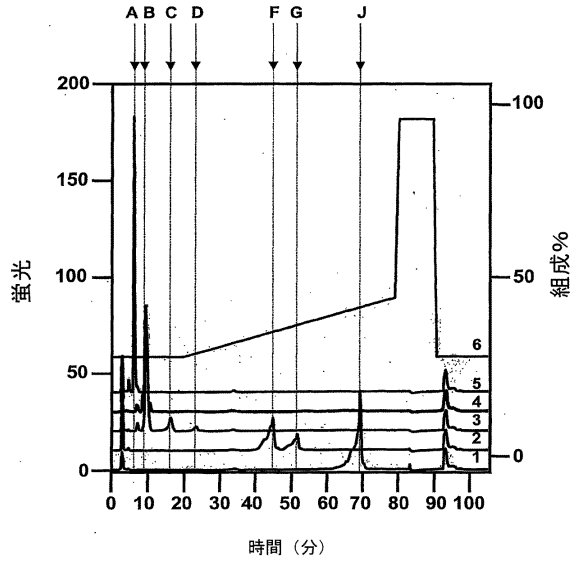


FIGURE 63

【 図 6 4 】

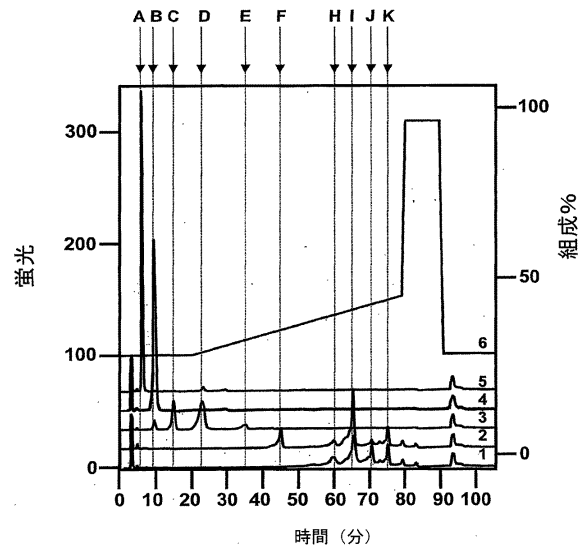


FIGURE 64

【 図 6 5 】

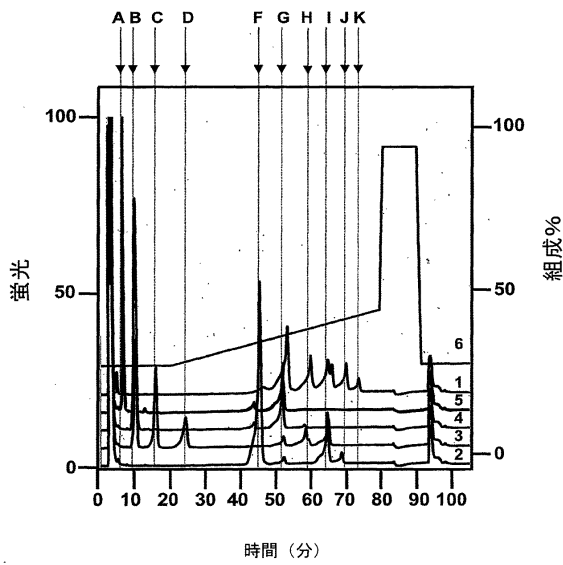


FIGURE 65

【 図 6 6 】

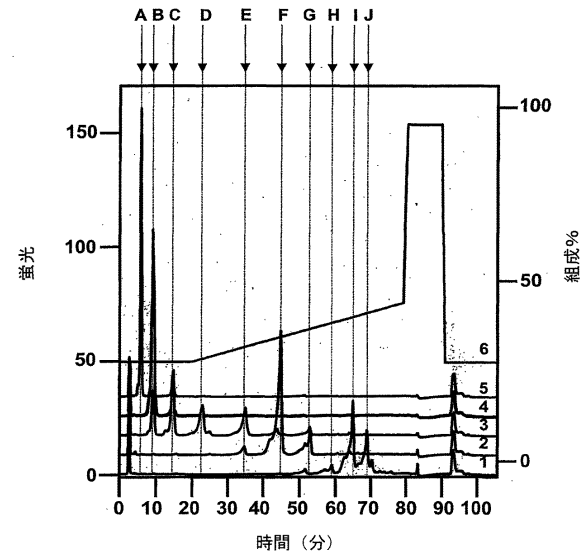


FIGURE 66

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/576 (2006.01)		G 0 1 N 33/576	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 エリック・デプラ

ベルギー、ベ- 9 0 7 0 デステルベルヘン、ブルフストラート 5 8 番

(72)発明者 アルフォンス・ボスマン

ベルギー、ベ- 1 7 4 5 オブウエイク、フルスト 1 6 5 番

(72)発明者 ヘルト・デスハンブス

ベルギー、ベ- 9 8 8 0 アールター、ハンゼプラス 3 1 番

(72)発明者 エルウィン・サブロン

ベルギー、ベ- 1 7 8 5 メルヒテム、ロブレークラーン 1 アー番

(72)発明者 マンフレート・ズッコヴ

ドイツ連邦共和国デー - 4 0 5 9 3 デュッセルドルフ、ウルデンバッハー・ドルフシュトラッセ 3 5 番

(72)発明者 イサベレ・サムソン

ベルギー、ベ- 8 5 0 1 ヘーレ、ヘット・ランケ・リート 9 番

(72)発明者 ヘルト・フェルハイデン

ベルギー、ベ- 3 2 2 0 ホルスベーク、デレストラート 4 5 番

審査官 山中 隆幸

(56)参考文献 特表平 0 9 - 5 0 3 3 9 6 (J P , A)

特開平 0 2 - 0 0 0 4 4 9 (J P , A)

特表 2 0 0 4 - 5 3 2 0 2 9 (J P , A)

The Journal of Biological Chemistry , 1 9 9 2 年 , vol.267 , p.1953-1961

Gene , 1 9 8 6 年 , vol.43 , p.273-279

Appl. Microbiol. Biotechnol. , 1 9 9 3 年 , vol.40 , p.333-340

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N15/00-15/90

REGISTRY(STN)

BIOSIS/WPI(DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed

JSTPlus(JDreamII)

专利名称(译)	核心糖基化的HCV包膜蛋白		
公开(公告)号	JP4173741B2	公开(公告)日	2008-10-29
申请号	JP2002583616	申请日	2002-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司南玫瑰汾笔记本闭嘴 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司, Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
当前申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司, Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	エリックデプラ アルフォンスボスマン ヘルトデスハンプス エルウィンサブロン マンフレートズッコヴ イサベレサムソン ヘルトフェルハイデン		
发明人	エリック・デプラ アルフォンス・ボスマン ヘルト・デスハンプス エルウィン・サブロン マンフレート・ズッコヴ イサベレ・サムソン ヘルト・フェルハイデン		
IPC分类号	C07K14/18 A61K38/00 A61K39/00 A61P31/14 G01N33/53 G01N33/576 C12N15/09 A61K39/29 C07K C12N C12N1/16 C12N1/19 C12N7/01 C12N7/04 C12P21/02 G01N33/543		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/5258 A61P31/14 C07K14/005 C07K2319/02 C07K2319/50 C12N7 /00 C12N2770/24222 C12N2770/24223		
FI分类号	C07K14/18.ZNA A61K37/02 A61K39/00.H A61P31/14 G01N33/53.N G01N33/576.Z C12N15/00.A		
代理人(译)	田中, 三夫 富田健二		
审查员(译)	山隆行		
优先权	2001870088 2001-04-24 EP 60/305604 2001-07-17 US		
其他公开文献	JP2004536052A JP2004536052A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及HCV包膜蛋白,它是真核细胞或其部分的表达产物。更具体地,所述HCV包膜蛋白的特征在于,平均而言,其N-糖基化位点的高达80%是核心糖基化的。在这些N-糖基化位点中,超过70%被具有由Man(8-10)-GlcNAc(2)定义的结构低聚甘露糖糖基化。此外,具有结构Man(7)-GlcNAc(2)的低聚甘露糖与具有结构Man(8)-GlcNAc(2)的低聚甘露糖的比例为0.45或更低。少量10%的低聚甘露糖用 α 1,3连接的甘露糖封端。本发明的HCV包膜蛋白特别适用于诊断,预防和治疗目的。用于产生本发明的HCV包膜蛋白的合适的真核细胞是汉逊酵母细胞。

表 2. H. polymorphaの発酵用の標準的パラメータ設定値

パラメータ	設定値
温度	30 - 40 °C
pH	4.2 - 5.0
DO	10 - 40 %空気飽和
通気	0.5 - 1.8 vvm*
攪拌	150 - 900 rpm