

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-500837  
(P2020-500837A)

(43) 公表日 令和2年1月16日(2020.1.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 1/113 (2006.01)</b>	C07K 1/113 ZNA	4B063
<b>C07K 14/005 (2006.01)</b>	C07K 14/005	4C085
<b>C07K 14/82 (2006.01)</b>	C07K 14/82	4H045
<b>C07K 16/08 (2006.01)</b>	C07K 16/08	
<b>C12Q 1/04 (2006.01)</b>	C12Q 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-517034 (P2019-517034)  
 (86) (22) 出願日 平成29年9月22日 (2017. 9. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月21日 (2019. 5. 21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2017/051037  
 (87) 国際公開番号 WO2018/058177  
 (87) 国際公開日 平成30年4月5日 (2018. 4. 5)  
 (31) 優先権主張番号 2016903961  
 (32) 優先日 平成28年9月29日 (2016. 9. 29)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 510332958  
 マクファーレン バーネット インスティ  
 テュート フォー メディカル リサーチ  
 アンド パブリック ヘルス リミテッ  
 ド  
 MACFARLANE BURNET I  
 NSTITUTE FOR MEDICA  
 L RESEARCH AND PUBL  
 IC HEALTH LTD  
 オーストラリア国 3004 ビクトリア  
 州 メルボルン コマーシャル ロード  
 85  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アセンブルした糖タンパク質

(57) 【要約】

天然低次抗原から細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法であって、方法が以下のステップ：(i) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び5つの条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、(ii) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i) の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること；を含み、低次抗原の少なくとも10%がステップ(ii) で高次の抗原に変換され、それにより、アセンブルした高次抗原が、低次抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する、方法。ワクチン組成物を生成する方法であって、方法のステップに従うこと、次に、アセンブルした高次抗原を薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合することを含む、方法。15の高次の細胞外でアセンブルした抗原を含み、アセンブルした抗原が天然対照高次抗原と比較して非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す組成物。免疫応答を刺激するための、または抗原に特異的なB細胞などの免疫細胞の検出及び/または単離のための、アセンブルした高次抗原の使用。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

天然低次抗原から細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法であって、前記方法が、以下のステップ：

( i ) 1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること、

ならびに

( i i ) 前記還元剤を除去もしくは希釈するか、または前記還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、( i ) の低次抗原をアセンブルした高次抗原にアセンブリさせることを誘発すること；を含み、

前記低次抗原の少なくとも10%がステップ( i i ) で高次の抗原に変換され、それにより、前記アセンブルした高次抗原が、前記低次抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する、前記方法。

**【請求項 2】**

低次抗原を高次抗原にアセンブリさせる方法の効率を向上させるために、第1ステップ( i ) 及び( i i ) が、ステップ( i i ) の残りの低次抗原を含む溶液と共に繰り返される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

ステップ( i ) 中またはステップ( i ) の前に、低次抗原を含む前記溶液から、天然オリゴマーまたは高次抗原をほぼ枯渇させる、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記低次抗原の少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%以上が、高次抗原に変換される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 5】**

天然対照高次抗原が1つ以上の中和抗体に結合するか、またはこれらを誘発する能力を、前記アセンブルした高次抗原が保持するか、または上回る、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記アセンブルした高次抗原が、HCV E2の受容体結合ドメイン(RBD)である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記アセンブルした高次抗原が、超可変領域1(HVR1)もしくはその一部、超可変領域2(HVR2)もしくはその一部、及び/または遺伝子型間可変領域(igVR/VR3)もしくはその一部のうちの1つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記アセンブルしたオリゴマー抗原が、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に、非システイン置換または変異を含む、請求項6または7に記載の方法。

**【請求項 9】**

ワクチン組成物の製造方法であって、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法を含み、前記アセンブルした高次抗原が、薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合される、前記方法。

**【請求項 10】**

前記抗原が、ウイルスエンベロープ抗原または癌抗原である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記ウイルスエンベロープ抗原が、肝炎ウイルス抗原またはHIVエンベロープ抗原で

10

20

30

40

50

ある、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法により低次抗原から産生される、アSEMBルした高次抗原またはそれを含む組成物。

【請求項 13】

組成物であって、高次の細胞外でアSEMBルした抗原を含み、前記アSEMBルした抗原が天然対照高次抗原と比較して非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す、前記組成物。

【請求項 14】

前記アSEMBルした高次抗原が、HCV-E2 または HCV E2 の受容体結合ドメイン (RBD) である、請求項 13 に記載の組成物。

10

【請求項 15】

前記 E2 高次抗原が、超可変領域 1 (HVR1) もしくはその一部、超可変領域 2 (HVR2) もしくはその一部、及び / または遺伝子型間可変領域 (igVR / VR3) もしくはその一部のうちの 1 つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 E2 抗原が、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及び C569 からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの 1 つ以上に、非システイン置換または変異を含む、請求項 14 または 15

20

【請求項 17】

薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントを含む、請求項 12 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 18】

前記抗原と関連する状態もしくは HCV 感染の処置もしくは予防における、またはこのための薬品の調製における、請求項 12 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 19】

HCV 感染の診断もしくは監視または抗 HCV 処置プロトコールの監視のための診断薬の調製における、請求項 12 に記載のアSEMBルした高次抗原または請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

30

【請求項 20】

対象または患者における免疫応答を誘発するための方法であって、前記方法が、免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で、前記対象もしくは患者に、請求項 12 に記載のアSEMBルした高次抗原または請求項 13 ~ 17 の 1 項に記載の組成物を有効量投与することを含む、前記方法。

【請求項 21】

HCV の感染に対して対象を免疫するための方法であって、請求項 12 に記載のアSEMBルしたオリゴマー E2 抗原、または請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 22】

対象の HCV 感染症を処置または予防するための方法であって、HCV E2 及び HCV 感染などの抗原に関連する状態を処置または予防するのに十分な時間及び条件下で、請求項 12 に記載のアSEMBルしたオリゴマー抗原、または請求項 13 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の組成物を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 23】

前記アSEMBルした高次抗原が検出可能なタグまたは精製タグを含む、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 24】

請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の高次のアSEMBルした抗原に対する精製抗体

50

を生成するための方法であって、対象に有効量の抗原を投与すること、及び産生された前記抗体を精製することを含む、前記方法。

【請求項 25】

請求項 12 ~ 16 の 1 項に記載のアセンブルした抗原を特異的に認識する抗体。

【請求項 26】

請求項 12 に記載のアセンブルした高次抗原、または請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物を含むキット、または固体もしくは半固体基質。

【請求項 27】

抗原特異的免疫細胞と結合する / これを検出するための、請求項 12 に記載のアセンブルした高次抗原、または請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

10

【請求項 28】

前記抗原に特異的な B 細胞などの免疫細胞の検出及び / または単離のための、請求項 12 に記載のアセンブルした高次抗原、または請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

【請求項 29】

HCV に特異的な免疫細胞 / B 細胞の検出及び / または単離のための方法であって、

i) 請求項 13 ~ 16 に記載のアセンブルした高次 E2 抗原を用いて、HCV に特異的な免疫細胞 / B 細胞を標識すること ; ならびに

ii) 前記標識された免疫細胞 / B 細胞をサイトメトリーで検出及び / または単離すること、を含む、前記方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は一般に、ワクチン及び診断用組成物に関する。特に、本明細書は、HCV エンベロープ 2 (E2) 糖タンパク質及び HIV エンベロープタンパク質などの目的の高次形態の抗原の生成を容易にする。高次抗原は、ワクチン製造及び *ex vivo* 結合用途に適する。

【背景技術】

【0002】

本明細書の参考文献の書誌詳細は、本明細書の最後にも記載される。

30

【0003】

本明細書におけるあらゆる先行技術への言及は、この先行技術があらゆる国において共通の一般知識の一部を形成するという知見または任意の形態の示唆でなく、それと見なされるべきではない。

【0004】

C 型肝炎ウイルスは、世界人口の 3 % に慢性的に感染し、且つ慢性肝疾患の主要な原因である非常に多様な病原体である。HCV は、7 の高度に分岐した遺伝子型 (G1 ~ G7) 及び 67 を超えるサブタイプ (a、b、c など) として広がり、このために、予防ワクチンが利用できない。近年、直接作用型抗ウイルス薬 (DAA) が診療所に行き渡って、95 % を超える処置された個人において、ウイルス除去を達成することができている。しかし、DAA は再感染を予防することができず、高コストのために、医療制度に大きな経済的負担がかかる。さらに、推定 5000 万人が感染症の診断を受けておらず、継続的なウイルス拡散の手段となっている。予防ワクチンは、新たな感染症、おそらく、再感染を防ぎ、DAA の使用を伴う除去プログラムを著しく強化するであろう。それ故、予防ワクチンは、開発にとって優先すべきものと、世界保健機関により認識されている。

40

【0005】

主要な表面糖タンパク質 E2 は、宿主細胞受容体 CD81 にビリオンを結合させ、遺伝子型特異的で広域 (交差遺伝子型保護の) 中和抗体 (bNAb) を生じる。自然感染では、30 % の個人が、自発的に感染を除去し、これは、bNAb の急速な誘導及び広範に反

50

応性のあるT細胞応答と関連している。加えて、広域中和モノクローナル抗体(NMAb)のカクテルは、HCVの小動物モデルにおける確立されたHCV感染を予防及び除去し得る。しかし、全長または切断型のE2を含むワクチン及び第I相臨床試験の組み換えHCV糖タンパク質を使用して、動物で行われた従前のワクチン接種試験は、高力価NAbを誘発せず、非常に限られた交差遺伝子型の中和が観察された。HCV E2は、高度にグリコシル化され、急速な配列変化を受け、免疫回避に全て関与する複数の可変領域を有する。中和抗体の結合を阻害するために、非中和抗体が提案されている。

#### 【0006】

改良されたHCVワクチンを開発する従来技術のアプローチは、CD81結合を保持しながら、可変領域を除去するようにE2を改変することに焦点を当てている。最近、オリゴマー、特に、高分子量のオリゴマー(HMW形態)が、所望の広域中和抗体応答を生じさせることにおいて、単量体よりも優れていると、本発明者らは結論付けた。本アプローチは、有望であるが、高分子量(HMW)形態の野生型HCV E2、及び超可変領域(例えば、デルタ123 HCV E2)を欠いている改変E2は一般に、低収量で発現され、構造的に不均一であり、これにより、ワクチン生成のための課題が生じた。現在では、オリゴマーは、E2を発現させるプラスミドの宿主細胞へのトランスフェクションにより産生され、細胞にE2を天然オリゴマーへとフォールディングさせることが可能になる。次に、オリゴマーは、必要に応じて、他の構成要素から分離される。

10

#### 【0007】

この背景に対して、一部の実施形態では、コスト及び精製の複雑さの低減などの、市販のワクチン製造目的のためのいくつかの潜在的な利点を有するオリゴマー形態のE2を製造するための方策を、本発明者(複数可)は開発している。この方法は、任意の目的の抗原に、及びアセンブルした高次形態の抗原の製造に、広く適用可能である。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

一態様では、本開示は、天然低次抗原から、細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法を可能にし、方法は以下のステップ:(i)1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること;ならびに、(ii)還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i)の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること、を含む。本方法の一実施形態では、少なくとも10%の低次抗原が、ステップ(ii)で高次抗原に変換される。本方法の一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、低次抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。本方法の一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

30

#### 【0009】

一実施形態では、抗原は、ウイルスエンベロープ抗原である。一実施形態では、ウイルスエンベロープ抗原は、HCVまたはHIVである。

#### 【0010】

別の実施形態では、抗原は、癌抗原である。

#### 【0011】

一実施形態では、高次癌抗原は、四量体、五量体、六量体、十量体など、最大23量体である。

40

#### 【0012】

一実施形態では、天然低次抗原から細胞外でアセンブルした高次抗原を調製する方法が提供され、方法は、以下のステップ:(i)1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること;ならびに、(ii)還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i)の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること;を含み、低次抗原の少なくとも10%は、ステップ(ii)で高次抗原に変換され、それにより、アセンブルした高次抗原は、低次抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なく

50

とも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

【0013】

一実施形態では、高次抗原は、予防的または治療的ワクチンとして対象に送達される前に、精製され、薬学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合される。

【0014】

一実施形態では、本開示は、天然低次HCV E2から細胞外でアSEMBルした高次C型肝炎ウイルス(HCV)エンベロープ糖タンパク質2(E2)抗原を調製する方法を可能にし、方法は、以下のステップ：(i)1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次E2を接触させること；ならびに、(ii)還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元されたE2を酸化剤と接触させて、高次HCV E2への(i)の低次E2のリアSEMBルを誘発すること、を含む。本方法の一実施形態では、低次E2抗原の少なくとも20%が、ステップ(ii)で高次抗原にアSEMBルする。一実施形態では、アSEMBルした高次HCV E2は、低次E2と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

10

【0015】

従って、一実施形態では、本開示は、天然低次HCV E2から細胞外でアSEMBルした高次C型肝炎ウイルス(HCV)エンベロープ糖タンパク質2(E2)抗原を調製する方法を可能にし、方法は、以下のステップ：(i)1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次E2を接触させること；ならびに、(ii)還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元されたE2を酸化剤と接触させて、高次HCV E2への(i)の低次E2のリアSEMBルを誘発すること、を含み、低次抗原の少なくとも20%が、ステップ(ii)で高次抗原にアSEMBルし、それにより、アSEMBルした高次HCV E2は、低次E2と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示し、少なくとも1つの中和抗体との結合を保持する。

20

【0016】

別の一実施形態では、本開示は、天然低次HIV envから細胞外でアSEMBルした高次HIVエンベロープ糖タンパク質抗原を調製する方法を可能にし、方法は、以下のステップ：(i)1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次HIV envを接触させること；ならびに、(ii)還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元されたenvを酸化剤と接触させて、高次HIV envへの(i)の低次envのリアSEMBルを誘発すること、を含み、低次抗原の少なくとも10%は、ステップ(ii)で高次抗原にアSEMBルする。

30

【0017】

一実施形態では、低次抗原の高次抗原へのアSEMBルの方法の効率を向上させるために、ステップ(ii)の残りの低次抗原を含む溶液を用いて、第1のステップ(i)及び(ii)を繰り返す。

【0018】

驚くべきことに、さらに、本明細書に記載の方法を使用する、A1a7構築物などのシステイン改変バージョンのHCV E2単量体さえも、より高次形態にアSEMBルする。A1a7などのシステイン改変形態は主に単量体型で組み換え発現されるので、例えば、HCV E2 RBD形態またはデルタ123形態で通常生成されるような異なる形態の混合物から単量体形態を精製するよりもむしろこの物質から高次形態を生成するのに有用である。従って、本方法において、システイン改変形態もアSEMBルするという知見により、低次または単量体の有用な供給源を提供することによりワクチン製造が容易になる。さらに、本明細書で決定されるように、最初に高次形態にアSEMBルしなかった低次抗原は、方法を繰り返した時に、高次形態を形成して、高収率の高次形態さえ可能にすることができる。

40

【0019】

本方法の一実施形態では、ステップ(i)中またはステップ(i)の前に、低次抗原を

50

含む溶液は、天然オリゴマーまたは高次抗原がほぼ除去される。

【0020】

一実施形態では、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%以上の低次抗原が高次抗原に変換される。

【0021】

別の実施形態では、本発明者らは、高次抗原の収量における遺伝子型特異的な差異を見出した。従って、一実施形態では、方法は、最大収率のアセンブルしたオリゴマー抗原を生成するウイルスまたは抗原遺伝子型を選択することをさらに含む。

【0022】

一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、天然対照高次抗原が1つ以上の中和抗体に結合するか、またはこれを誘発する能力を保持するか、または上回る。

【0023】

一実施形態では、アセンブルした高次抗原は、HCV E2の受容体結合ドメイン(RBD)である。

【0024】

一実施形態では、アセンブルした高次HCV E2抗原は、超可変領域1(HVR1)もしくはその一部、超可変領域2(HVR2)もしくはその一部、及び/または遺伝子型間可変領域(igVR/VR3)もしくはその一部のうちの1つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている。

【0025】

一実施形態では、アセンブルしたオリゴマー抗原は、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に、非システイン置換または変異を含む。本明細書で検討されるように、システイン改変形態の使用は、驚くべきことに、高次形態にアセンブルすることが可能な低次抗原の供給源を提供する。

【0026】

別の態様では、本開示は、以下のステップ：(i)1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、(ii)還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i)の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること、を含む本明細書に開示のアセンブリ方法を含むワクチン組成物を製造する方法を提供し、この後、アセンブルした高次抗原は、薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントと混合される。

【0027】

一部の実施形態では、抗原は、ウイルスエンベロープ抗原または癌抗原である。

【0028】

一部の実施形態では、ウイルスエンベロープ抗原は、肝炎ウイルス抗原またはHIVエンベロープ抗原である。

【0029】

別の態様では、本開示は、以下のステップ：(i)1つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、(ii)還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、(i)の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること、を含む本明細書に開示の方法により低次抗原から生成された、アセンブルした高次抗原、またはそれを含む組成物を提供する。

【0030】

一実施形態では、高次の細胞外でアセンブルした抗原を含む組成物が可能である。一実施形態では、高次のアセンブルした抗原は、宿主細胞で産生される対照抗原と比較して、より好ましい免疫原性プロファイルを示す。一実施形態では、好ましい免疫原性プロ

10

20

30

40

50

ファイルは、ウイルスエンベロープ抗原の、1つ以上の非中和エピトープが、より閉じ込められ、及び/または1つ以上の中和エピトープが、より露出することを含む。一実施形態では、好ましい免疫原性プロファイルは、宿主細胞の環境でアセンブルして高次抗原になる対照抗原と比較して、より有効な免疫応答を決定するアセンブルした抗原を含む。一実施形態では、好ましい免疫原性プロファイルは、対象の腫瘍発生を低減または防止することができる、より強い免疫応答を含む。一実施形態では、アセンブルした抗原は、天然対照高次(オリゴマー)抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を示すことで、天然対照高次抗原と区別可能である。結合の低下は、検出可能な結合を全く含まない(エピトープがアセンブルした抗原に閉じ込められて、非中和抗体と結合することができないが、エピトープが非中和抗体と結合する天然対照抗原に閉じ込められていない)。特に、抗体CBH4Gにより認識されるエピトープは、本明細書に記載のアセンブルしたE2中に閉じ込められる。

10

#### 【0031】

別の実施形態では、本開示は、高次の細胞外でアセンブルしたHCV E2糖タンパク質抗原を含む組成物を可能にし、アセンブルしたE2は、非中和抗体との結合の低下を示す。特に、非中和抗体CBH4Gは、天然対照オリゴマーHCV E2と比較して、アセンブルしたE2との結合の低下を示した。この抗体は、文献、例えば、Keck et al. *PLoS Pathogens*: 8(4)e1002653, April 2012に記載される。また、抗体2A12は、天然対照オリゴマーHCV E2と比較して、アセンブルしたE2との結合の低下を示した。抗体パネル及びそれらの生成の仕方は、参照により本明細書に組み込まれるVieth et al. *Hepatology*: 55(4), 1117-1131, 2017、ならびに、参考文献5、33~36、17、及び37ならびに出版者から入手可能な補足資料などの本明細書で参照された参考文献に記載される。

20

#### 【0032】

従って、一実施形態では、アセンブルした抗原は、エピトープ及び/または抗体2A12もしくは抗体CBH4Gにより結合されたエピトープ残基の露出を低下させているか、あるいは当該技術分野で既知の抗体2A12または抗体CBH4Gなどの非中和抗体により認識されない。

#### 【0033】

別の実施形態では、本開示は、高次の細胞外でアセンブルした高次ウイルスエンベロープ抗原を含む組成物を可能にし、アセンブルしたウイルスenv抗原は、天然対照高次ウイルスエンベロープ抗原と比較して非中和抗体との結合の低下を示す。

30

#### 【0034】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー抗原は、  
 (i) 対照天然抗原形態または単量体形態と比較して、非中和抗体との結合が低下した、  
 (ii) 対照天然抗原形態と比較して、中和抗体との結合が少なくともほぼ同じ、  
 (iii) 対照天然抗原形態または単量体抗原と比較して、より低い力価の非中和抗体の産生を誘発する、  
 (iv) 中和抗体の産生を誘発する、  
 (v) 広域中和抗体の産生を誘発する、  
 (vi) 任意に、より高い力価の中和抗体の産生を誘発する、  
 (vii) 任意に、より高い力価の広域中和抗体の産生を誘発する、  
 からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を示す。

40

#### 【0035】

別の実施形態では、本開示は、高次の細胞外でアセンブルした高次HIVエンベロープ抗原を含む組成物を可能にし、アセンブルしたHIV env抗原は、天然対照高次HIVエンベロープ抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

#### 【0036】

好適な対照は、本開示の文脈において当業者に十分に理解されるであろう。一実施形態

50

では、対照抗原は、細菌もしくは哺乳動物、酵母、植物、または昆虫細胞などの宿主細胞中で組み換え産生された目的の試験抗原と同じ遺伝子型である。

【0037】

一実施形態では、アSEMBルした高次抗原は、HCV E2の受容体結合ドメイン(RBD)である。

【0038】

一実施形態では、HCV E2抗原は、超可変領域1(HVR1)もしくはその一部、超可変領域2(HVR2)もしくはその一部、及び/または遺伝子型間可変領域(igVR/VR3)もしくはその一部のうちの1つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている。HVR1、HVR2、及びigVR/VR3配列の例は、図12に示される。

10

【0039】

一部の実施形態では、E2抗原は、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569からなる群より選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に、非システイン置換または変異を含む。一実施形態では、この文脈での1つ以上のアミノ酸への言及は、2、3、4、5、6、または7つのアミノ酸が、非システイン置換であるか、または欠失もしくは別の方法で変異していることを意味する。

【0040】

一実施形態では、本開示は、アSEMBルした高次HCV E2抗原(単量体E2からアSEMBルした)ならびに薬学的または生理学的に許容される担体及び/または希釈剤を含む組成物を提供する。

20

【0041】

一実施形態では、組成物は、薬学的または生理学的に許容される希釈剤、担体、またはアジュバントを含む。一実施形態では、抗原は、ワクチン組成物に適する任意の形態の担体中で提示され得る。

【0042】

一実施形態では、本開示は、HCVもしくはHIV感染などのウイルス感染、または癌、またはウイルスエンベロープもしくは癌抗原に関連する状態の処置または予防のための薬品の調製における、本明細書に記載の組成物の使用を提示する。

【0043】

一実施形態では、本開示は、アSEMBルした高次抗原の使用、または診断もしくはE2、HCV感染などの抗原と関連する状態の監視もしくは抗HCV処置プロトコルの監視のための診断薬の調製における組成物を提供する。

30

【0044】

一実施形態では、本開示は、対象または患者において免疫応答を誘発するための方法を提供し、方法は、免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で、有効量の明細書に記載のアSEMBルした高次抗原、または本明細書に記載の組成物を対象または患者に投与することを含む。

【0045】

一実施形態では、本開示は、アSEMBルしたオリゴマー抗原、または本明細書に記載の組成物を対象に投与することを含む、HCVの感染に対して対象を免疫する方法を提供する。

40

【0046】

一実施形態では、本開示は、HCV感染を処置または予防するのに十分な時間及び条件下で、アSEMBルしたオリゴマー抗原、または記載の組成物を対象に投与することを含む、対象のHCV感染を処置または予防するための方法を提供する。

【0047】

一実施形態では、組成物は、異なる病原体由来の第2の高次抗原をさらに含む。

【0048】

一実施形態では、アSEMBルした高次抗原は、検出可能タグまたは精製タグを含む。

50

## 【 0 0 4 9 】

一実施形態では、本開示は、有効量の抗原を対象に投与すること、及び産生された抗体を精製することを含む、本明細書に記載の高次アセンブルした抗原に対する精製抗体の生成を提供する。

## 【 0 0 5 0 】

一実施形態では、本明細書に記載のアセンブルした高次抗原 / E 2 抗原を特異的に認識する抗体が提供される。代わりにまたは加えて、天然のアセンブルしていない抗原、またはアセンブルした、且つ天然でない抗原に曝露されたエピトープを認識する抗体を同定することができる。

## 【 0 0 5 1 】

一実施形態では、本明細書に記載のアセンブルした高次抗原、または本明細書に記載の組成物を含むキット、または固体もしくは半固体基質が提供される。

## 【 0 0 5 2 】

一実施形態では、本開示は、以下のステップ：( i ) 1 つ以上の天然システインを還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、低次抗原を接触させること；ならびに、( i i ) 還元剤を除去もしくは希釈するか、または還元された低次抗原を酸化剤と接触させて、( i ) の低次抗原のアセンブルした高次抗原へのアセンブリを誘発すること、を含む本明細書に開示の方法により低次抗原から生成されたアセンブルした高次抗原の使用を提示し、組成物は、高次の細胞外でアセンブルした高次癌抗原またはウイルスエンベロープ抗原を含み、アセンブルしたウイルス e n v 抗原は、抗原特異的免疫細胞と結合 / これを検出するための天然対照高次ウイルスエンベロープ抗原と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

## 【 0 0 5 3 】

一実施形態では、主題の高次のアセンブルした抗原は、抗原に特異的な B 細胞などの免疫細胞の検出及び / または単離に適するか、またはそれに使用される。一実施形態では、免疫細胞は、抗原に特異的な T 細胞である。

## 【 0 0 5 4 】

別の実施形態では、本開示は、i ) 本明細書に記載のアセンブルした高次抗原を用いて、抗原に特異的な免疫細胞 / B 細胞を標識すること、ならびに、i i ) 標識された免疫細胞 / B 細胞をサイトメトリーで検出及び / または単離すること、を含む、抗原に特異的な免疫細胞 / B 細胞の検出及び / または単離のための方法を可能にする。

## 【 0 0 5 5 】

別の実施形態では、本開示は、i ) アセンブルした高次形態の抗原を用いて、H C V または H I V などの抗原に特異的な免疫細胞 / B 細胞を標識すること；ならびに、i i ) 標識された免疫細胞 / B 細胞をサイトメトリーで検出及び / または単離すること、を含む、H C V または H I V などの抗原に特異的な免疫細胞 / B 細胞の検出及び / または単離のための方法を可能にする。

## 【 0 0 5 6 】

この発明の概要は、本明細書に記載の全ての実施形態の網羅的列挙ではない。

## 【 0 0 5 7 】

一部の図は、色表現または実体を含有する。カラー版の図は、要求に応じて特許権者から、または適切な特許庁から入手できる。特許庁から取得した場合、手数料が課され得る。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 5 8 】

【 図 1 】 1 2 3 含有プラスミドのアガロースゲル電気泳動を示す。上のバンドは、ベクター骨格を表し、下のバンドは、1 2 3 インサートを表す。これらを、制限酵素での消化によりベクターから単離した。p c D N A - H 7 7 c 1 2 3 - H I S 及び p c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S を両方ともに、N h e I 及び X b a I で消化し、一方、p c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S を、N h e I 及び X h o I で消化した。H 7 7 c、C o

10

20

30

40

50

n 1、及び S 5 2 1 2 3 含有プラスミドから放出されるインサートの予想される長さは、それぞれ、7 6 2 b p、7 5 9、及び 7 1 0 b p である。サイズマーカー (M) として、GeneRuler 1 k b DNA ラダーを使用した。

【図 2 - 1】 1 2 3 のトランスフェクション及び精製を示す。(A - B) サンドイッチ E L I S A により分析された、F S 2 9 3 F 細胞への、p c D N A - C o n 1 1 2 3 - H I S (A) 及び p c D N A - S 5 2 1 2 3 - H I S (B) の一過性トランスフェクションのタンパク質発現。トランスフェクション後の 3、5、7、及び 9 日目に採取した細胞培養上清を 2 倍希釈した後、これらの半対数段階希釈物を、二量体 M B P - C D 8 1 - L E L <sup>1 1 3</sup> - <sup>2 0 1</sup> でコーティングされた酵素免疫アッセイプレートに塗布した。単量体 H 7 7 c 1 2 3 (1 μ g / m L) 及び 6 × H I S タグを欠いている H I V g p 1 4 0 を含有する細胞培養上清の半対数段階希釈物がまた、それぞれ、陽性対照及び陰性対照として含まれた。この後に、1 / 1 0 0 0 に希釈されたウサギ抗 H I S 抗体を添加し、1 / 1 0 0 0 に希釈された H R P コンジュゲートヤギ抗ウサギ免疫グロブリンの単一希釈物を用いて検出した。(C - D) 同様に行ったサンドイッチ E L I S A により分析された、アフィニティークロマトグラフィー後の C o n 1 1 2 3 (C) 及び S 5 2 1 2 3 (D)。細胞培養上清に含まれるタンパク質を、コバルト荷電 T A L O N ビーズに適用して、6 × H i s タグ付けした 1 2 3 の結合を可能にし、T A L O N 相互作用後の上清をフルースローとして収集した。次に、タンパク質を洗浄し、3 つの別々の画分に溶出させた。元の調製物と比較して、E L I S A について量を等しくするために、全ての試料を必要に応じて希釈した。

【図 2 - 2】 図 2 - 1 と同様である。

【図 3 - 1】 1 2 3 のゲル濾過プロファイルを示す。(A) F S 2 9 3 F 細胞における安定なトランスフェクションから産生され、且つ Superdex 2 0 0 を使用したゲル濾過クロマトグラフィーにより分析された、アフィニティー精製された H 7 7 c 1 2 3 糖タンパク質。点線及びピーク高さは、単量体 (7 8)、二量体 (7 0)、H M W 2 (5 9)、及び H M W 1 (4 6) 1 2 3 に対応する画分を示す。(B ~ C) F S 2 9 3 F 細胞へのラウンド 1 の一過性トランスフェクションから生成された、アフィニティー精製された C o n 1 1 2 3 (B) 及び S 5 2 1 2 3 (C) の、Superdex 2 0 0 を使用するゲル濾過クロマトグラフィーを示す。点線及びピーク高さは、それぞれ、C o n 1 及び S 5 2 の場合、番号 7 7、6 8、6 6、4 6、及び 7 8、6 9、6 5、4 6 とラベル付けされた、それぞれ、単量体、二量体、H M W 2、及び H M W 1 に対応する画分を示す。(D - E) F S 2 9 3 F 細胞への、C o n 1 1 2 3 (D) 及び S 5 2 1 2 3 (E) の一過性トランスフェクションを繰り返し (すなわち、ラウンド 2)、生成された 1 2 3 糖タンパク質を、アフィニティー精製した後、ラウンド 1 と同様に、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分析にかけたことを示す。

【図 3 - 2】 図 3 - 1 と同様である。

【図 4 - 1】 S D S - P A G E で分析された、分画された 1 2 3 のゲル濾過を示す。2 つの連続した画分のそれぞれから 2 0 u L がプールされ、且つ 5 ~ 1 2 % のポリアクリルアミド勾配ゲル上にロードされ、ゲル濾過で分画した (A) C O N 1 1 2 3 及び (B) S 5 2 1 2 3 の非還元 S D S - P A G E 及びクマシー染色。1 2 % のアクリルアミドゲル上にロードされた非還元 S D S - P A G E と同じ量で、ゲル濾過分画した (C) C o n 1 1 2 3 及び (D) S 5 2 1 2 3 の還元 S D S - P A G E 及びクマシー染色。B i o - R a d の広範囲 S D S - P A G E スタンダードをマーカー (M) としてロードした。

【図 4 - 2】 図 4 - 1 と同様である。

【図 5 A】 M A b が単量体及び H M W 1 1 2 3 に結合する能力の一例を示す。陰性対照としての単量体 1 2 3 (赤色) (2 μ g / m L) 及び H M W 1 1 2 3 (青色) (5 μ g / m L) 及び B S A (緑色) を酵素免疫アッセイプレートにコーティングした。次に、一次抗体の半対数段階希釈物を添加し、結合を適切な H R P コンジュゲート二次抗体で検出した。次に、この技術を使用して、各結合曲線の中点を比較することにより、H M W 1 1 2 3 に対するパネル M A b の相対的結合を計算し、これを、最高の光学濃度値の半分

10

20

30

40

50

とした。表7の作成のために、単量体及びH77c HMW1 123と比較して、結合の倍数差を計算した。

【図5B】MAbのパネルに対する123の異なる株の反応性を示す。単一希釈点評価を実施し、それにより、H77c、Con1、及びS52 123単量体(5µg/mL)及び陰性対照としてのBSA(5µg/mL)を、酵素免疫アッセイプレートにコーティングした。一次抗体の単一希釈物を添加し、結合をHRPコンジュゲート二次抗体に特異的な適切な種で検出した。

【図6】(A)は、小規模のトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)還元を示す。PBS(pH9.6)中で調製された異なる濃度のTCEP(0~500mM)を用いて、酵素免疫アッセイプレート上にコーティングされたH77 123単量体を37で30分間還元した。立体配座依存性マウスH53(1µg/mL)、ならびにそれぞれ陽性及び陰性対照を表す、ウサギ抗HIS(1/1000)及びヒト抗CMV R04(1/1000)を含む、一次抗体の単一希釈物を添加した。結合を適切なHRPコンジュゲート二次抗体で検出した。一次抗体のそれぞれに対する反応を、三連で試験し、標準偏差を示すエラーバーを有する線グラフとして、平均光学濃度値をプロットした。(B)は、TCEP及びBMOEで処理された単量体H77c 123を示す。表8に記載される1~7とラベル付けされた異なる条件下でのTCEP還元及びBMOE架橋剤を用いるリフォールディング後の単量体H77c 123(10µg)の非還元SDS-PAGE及びクマシー染色。123試料を、対照としての単量体及びHMW1 H77c 123(それぞれ、5µg)ならびに広範囲SDS-PAGEマーカー(M)と一緒に、5~12%のポリアクリルアミド勾配ゲルにロードした。

【図7-1】(A)は、グルタチオンで処理された単量体H77c 123を示す。表9に記載される1~5とラベル付けされた異なる条件下で、酸化還元シャフリングシステムを使用して、GSH及びGSSGでリフォールディングした後の、単量体H77c 123(10µg)の非還元SDS-PAGE及びクマシー染色。対照としての単量体及びHMW1 H77c 123(各5µg)ならびに広範囲SDS-PAGEマーカー(M)と一緒に、H77c 123試料を5~12%のポリアクリルアミド勾配ゲルにロードした。(B)は、グルタチオンで処理された単量体H77c 123のゲル濾過プロファイルを示す。Superdex200を使用した、未処理単量体H77c 123のゲル濾過クロマトグラフィー。(C)は、Superdex200を使用した、10µg/µLの糖タンパク質を2mMのGSH及び0.4mMのGSSGで処理した後のH77c 123のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。点線及びピーク高さは、単量体(78)及び二量体(69)に対応する画分を示す。

【図7-2】図7-1と同様である。

【図8-1】(A)は、小規模DTT還元を示す。酵素免疫アッセイプレート上にコートされたH77c 123単量体を、pH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中で調製された異なる濃度のDTT(0~10mM)で、37で30分間還元した。立体配座依存性マウスH53(1µg/mL)、ならびにそれぞれ陽性及び陰性対照を表すウサギ抗HIS(1/1000)及びヒト抗CMV R04を含む、一次抗体の単一希釈物を添加した。結合を適切なHRPコンジュゲート二次抗体で検出した。一次抗体のそれぞれに対する反応を、三連で試験し、標準偏差を示すエラーバーを有する線グラフとして、平均光学濃度値をプロットした。(B)は、DTTで処理された単量体H77c 123を示す。異なる条件下(1~12とラベル付けされ、表3.6に記載される)でのDTT還元ならびに徐々に希釈する方法を使用したリフォールディング後の単量体H77c 123(10µg)の非還元SDS-PAGE及びクマシー染色。対照としての単量体及びHMW1 H77c 123(各5µg)ならびに広範囲SDS-PAGEマーカー(M)と一緒に、H77c 123試料を5~12%のポリアクリルアミド勾配ゲルにロードした。(C)は、Superdex200を使用した未処理単量体H77c 123のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。(D)は、Superdex200を使用して、1µg/µLの糖タンパク質を1mMのDTTで処理した後のH77c 123のゲル濾過クロマトグラ

10

20

30

40

50

フィーを示す。点線及びピーク高さは、単量体（77～78）、二量体（69）、及びHMW 123（59）に対応する画分を示す。

【図8-2】図8-1と同様である。

【図9-1】DTT処理 123及びALA7 123の抗原特性決定を示す。DTT処理 123及びALA7 123は、実施例15に記載されるように、抗体（A）AR3C（B）CBH4G（C）HC84.27及び（D）HCV1との結合の評価により特性決定されている。

【図9-2】図9-1と同様である。

【図10】ゲル濾過クロマトグラフィーを使用した、DTT処理 123のリフォールディングから生じた生成物の分析を示す。未処理単量体のプロファイルが示され、続いて、実施例14に記載されるようなDTTでの処理数（1、2、または3ヒット）を増加させる。

10

【図11】実施例14に記載されるようなゲル濾過クロマトグラフィーを使用した、プロテアーゼ阻害剤の存在下での非リフォールディング 123単量体のリフォールディング及び 123のリフォールディングから生じた生成物の分析を示す。

【図12】使用したHCV分離株の対応するE2<sub>661</sub>領域のClustalWアラインメントを提示する。H77c（AF009606、G1a、配列番号11）、J6（AF177036、G2a、配列番号16）、s52（GU814263、G3a、配列番号13）、ED43（GU814265、G4a、配列番号10）、SA13（AF064490、G5a、配列番号12）、EUHK2（Y12083、G6a、配列番号14）、QC69（EF108306、G7a、配列番号15）。HVR1、HVR2、及びigVR/VR3は、赤/オレンジ色で示される。ED43のアミノ酸残基GFLASLFY、YTWGENETD、及びYRLWHFに対応する残基は、CD81結合領域である。

20

【図13】 123Ala7コドン最適化に対するヌクレオチド構築物を示し；下線領域は、制限酵素部位GGTACC=KpnI、GGATCC=BamHI、CTCGAG=XhoI、及び 123Ala7のタンパク質配列に対応する。

【図14-1】図14～図14cは、タンパク質配列：AF009606コード配列（配列番号6）、AF009606全長E2（配列番号7）、AF009606E2<sub>661</sub>（配列番号8）、WT\_\_E2<sub>661</sub>（配列番号4）、及び 123（配列番号3）のClustalOmegaアミノ酸アラインメントを示す。下線領域は、残基630～635に対応する。

30

【図14-2】図14-1と同様である。

【図14-3】図14-1と同様である。

【図14-4】図14-1と同様である。

【図14-5】図14-1と同様である。

【図14-6】図14-1と同様である。

【図14-7】図14-1と同様である。

【図14-8】図14-1と同様である。

【図14-9】図14-1と同様である。

40

【図14-10】図14-1と同様である。

【図14-11】図14-1と同様である。

【図15】（A）は、異なる濃度のメルカプトエタノールで還元されて、アセンブルした試料の非還元SDS-PAGEを示す。精密サイズマーカーは、左側に示され、分子量は、kDaで示される。右に示される単量体、二量体、及び高分子量形態の表示サイズ。（B）は、Superdex200を使用した、100mMのBMEで処理した後の単量体 123（破線）または未処理の単量体 123（実線）のゲル濾過クロマトグラフィーを示す。

【図16】アセンブルしたHCVタンパク質でワクチン接種された動物の抗体価を示す。表15に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、単量体 123タ

50

ンパク質と結合する能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann-Whitney独立t検定を使用する2-F及び4-F+5-Fの間の抗体価の差は統計的に有意であった(p=0.0281)。プリズムv7.0。

【図17】アセンプルしたHCVタンパク質でワクチン接種された動物のエピトープIに対する抗体価を示す。表15に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、遺伝子型1a H77c配列の残基409~428を包含する合成ペプチドと結合するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann-Whitney独立t検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズムv7.0。

【図18】アセンプルしたHCVタンパク質でワクチン接種された動物のエピトープIIに対する抗体価を示す。表15に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、遺伝子型1a H77c配列の残基523~549を包含する合成ペプチドと結合するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann-Whitney独立t検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズムv7.0。

【図19】アセンプルしたHCVタンパク質でワクチン接種された動物の遺伝子型2aエピトープIに対する抗体価を示す。表15に列挙された抗原でワクチン接種された動物からの最終採血を、遺伝子型2a J6配列の残基409~428を包含する合成ペプチドと結合するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann-Whitney独立t検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズムv7.0。

【図20】免疫血清が、HCV E2及びその細胞内受容体CD81の相互作用を阻害する能力を示す。表15に列挙された抗原でワクチン接種された動物の最終採血を、(A) H77c G1a E2及びCD81と(B) J6 G2a E2及びCD81との間の結合を阻害するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、平均値であり、上下バーは、標準偏差を表す。Mann-Whitney独立t検定を使用して、群間の抗体価の差を決定した。プリズムv7.0。

【図21】免疫血清が肝細胞の遺伝子型1aウイルスによる感染を予防する能力を示す。表15に列挙された抗原でワクチン接種された動物の最終採血を、G1a HCVppによる感染を予防するそれらの能力について分析した。各群の逆数抗体価を示す。横線は、その平均値である。

【図22】HMW1及び単量体免疫血清の特異性を示す。モルモット血清の段階希釈物を、一定量のHCV1(A)、HC84-27(B)、AR3C(C)、及び2A12(D)に添加した。抗体を単量体123に添加し、結合したMAbを抗ヒトFab<sub>2</sub>で検出した。Mann-Whitney t検定(Prism v7)を使用して、群を比較した。

【図23】アセンプルした123を使用した、選別されたB細胞集団のFACSプロットを示す。CD19陽性及び抗E2陽性B細胞を、抗CD19 Cy7抗体及びアセンプルした123で検出した。

【図24】アセンプルしたタンパク質のサイズを決定するサイズ排除クロマトグラフィー-マルチアングル光散乱を示す。アセンプルした123A7(青)及びアセンプルした123(赤)試料のUV(A<sub>280</sub>nm)シグナル及びモル質量の重ね合わせ。

【図25】DTTでの第2ラウンドの変性についで、続いて、アセンプルした、DDTでの処置の後にHMW形態にアセンプルしていない123A7単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。単量体及びHMW種は、矢印で示され、それぞれの%は、表に示される。

【図26】DTTでの変性についで、続いて、アセンプルしたRBD単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。単量体及びHMW種は、矢印で示され、それぞれの%は、表に示される。

10

20

30

40

50

【図 27】DTTでの変性についで、続いて、アセンブリしたRBD A7単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。単量体及びHMW種は、矢印で示され、それぞれの%は、表に示される。

【図 28】DTTでの変性についで、続いて、アセンブリしたenv単量体のサイズ排除クロマトグラフィーを示す。HMW種は、矢印で示される。

【0059】

表の簡単な説明

表 1 は、一過性トランスフェクション条件を示す。

表 2 は、MAbのリストを示す。

表 3 は、DTT還元のための条件を示す。

表 4 は、グルタチオンによるタンパク質のリフォールディングの条件を示す。

表 5 は、TCEP還元のための条件を示す。

表 6 は、異なるオリゴマー形態の 123 の発現を示す。ゲル濾過曲線上のそれらの対応するピークの下面積(図 3 B ~ E)を全曲線下面積で除することにより、単量体、二量体、HMW2、及びHMW1の百分率を計算した。GE Healthcare Life SciencesのUNICORN制御ソフトウェアを使用して、曲線下面積を定量した。

表 7 は、HMW1 123の抗原特性を示す。

表 8 は、123のTCEP還元及びBMOE媒介リフォールディングの条件を示す。

表 9 は、グルタチオンを用いるH77c 123リフォールディング条件を示す。グルタチオン処理されたH77c 123の非還元SDS-PAGE分析の単量体のデンストメトリーを二量体のデンストメトリーで除することにより、単量体対二量体の比を計算した(図 7 A)。LI-COR Odysseyシステムを使用して、デンストメトリーを定量した。

表 10 は、グルタチオン処理された単量体H77c 123からの多量体形成の定量を示す。曲線下総面積の百分率として計算されたゲル濾過曲線上の単量体及び二量体のピーク下面積(図 7 B)、ならびに単量体のピーク下面積を二量体のもので除することにより計算された単量体対多量体の比。

表 11 は、DTTで処理された単量体H77c 123からの多量体形成の定量を示す。曲線下総面積の百分率として計算されたゲル濾過曲線上の単量体及びHMWのピーク下面積(図 7 C ~ D)、ならびに単量体のピーク下面積を多量体のもので除することにより計算された単量体(76分)対多量体(58分)の比。

表 12 は、DTTで処理された単量体H77c 123からの多量体形成の定量を示す。曲線下総面積の百分率として計算されたゲル濾過曲線上の単量体及び多量体のピーク下面積(図 7 B)、ならびに単量体のピーク下面積を多量体のもので除することにより計算された単量体対多量体の比。

表 13 は、抗原 123を使用して、リフォールディングタンパク質を生じた方法を示す。

表 14 は、異なるリフォールディング方法により生じた%リフォールディングタンパク質を示す。

表 15 は、免疫化群を示す。

表 16 は、単量体 123に対する免疫血清反応性の統計分析を示す。

表 17 は、免疫血清がH77cエピトープIと結合する能力の統計分析を示す。

表 18 は、免疫血清がH77cエピトープIIIと結合する能力の統計分析を示す。

表 19 は、免疫血清がJ6エピトープIと結合する能力の統計分析を示す。

表 20 は、免疫血清がH77c G1a E2のCD81との結合をブロックする能力の統計分析を示す。

表 21 は、免疫血清がJFH-1 G2a E2のCD81との結合をブロックする能力の統計分析を示す。

表 22 は、免疫血清がH77c HCVウイルスの肝細胞への感染を予防する能力の統

10

20

30

40

50

計分析を示す。

表 2 3 は、免疫血清が H C V 1 の結合を防止する能力の統計分析を示す。

表 2 4 は、免疫血清が H C 8 4 - 2 7 の結合を防止する能力の統計分析を示す。

表 2 5 は、免疫血清が A R 3 C の結合を防止する能力の統計分析を示す。

表 2 6 は、免疫血清が 2 A 1 2 の結合を防止する能力の統計分析を示す。

表 2 7 は、リアセンブルしたタンパク質の S E C - M A L S を示す。

#### 【 0 0 6 0 】

配列表のキー

配列番号 1 : コドン最適化 1 2 3 A 1 a 7 に対する D N A 構築物。

配列番号 2 : コドン最適化 1 2 3 A 1 a 7 をコードする D N A 配列。

10

配列番号 3 : アミノ酸配列 1 2 3 A 1 a 7 。

配列番号 4 : W T E 2 6 6 1 をコードするアミノ酸配列 ( R B D ) 。

配列番号 5 : 1 2 3 E 2 6 6 1 。

配列番号 6 : A F 0 0 9 6 0 6 コード配列に対応するアミノ酸残基。

配列番号 7 : A F 0 0 9 6 0 6 全長 E 2 タンパク質配列に対応するアミノ酸残基。

配列番号 8 : A F 0 0 9 6 0 6 E 2 6 6 1 に対応するアミノ酸残基。

配列番号 9 : N 末端シグナル配列。

配列番号 1 0 : アミノ酸配列 E D 4 3 。

配列番号 1 1 : アミノ酸配列 H 7 7 c 。

配列番号 1 2 : アミノ酸配列 S A 1 3 。

20

配列番号 1 3 : アミノ酸配列 s 5 2 。

配列番号 1 4 : アミノ酸配列 E U H K 2 。

配列番号 1 5 : アミノ酸配列 Q C 6 9 。

配列番号 1 6 : アミノ酸配列 J 6 。

配列番号 1 7 : C 末端膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を欠いている H I V e n v に対応するアミノ酸残基。

配列番号 1 8 : N 末端リーダー配列を有する H I V e n v に対応するアミノ酸残基。

配列番号 1 9 : コドン H 7 7 c 1 2 3 をコードする D N A 配列。

配列番号 2 0 : C o n 1 1 2 3 をコードする D N A 配列。

配列番号 2 1 : s 5 2 1 2 3 をコードする D N A 配列。

30

配列番号 2 2 : ヒトトリプシノーゲンシグナルペプチド。

配列番号 2 3 : ヒト組織プラスミノーゲンアクチベーターシグナルペプチド ( t P A )

。

配列番号 2 4 : 6 H i s タグ。

#### 【 発明を実施するための形態 】

#### 【 0 0 6 1 】

主題の開示は、薬剤についての特定のスクリーニング手順、薬剤の特定の製剤、及び種々の医学的方法論に限定されず、それ自体は変わり得る。

#### 【 0 0 6 2 】

本明細書の各実施形態は、別途明記のない限り、他の全ての実施形態に準用されるべきである。

40

#### 【 0 0 6 3 】

別途記載のない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の任意の物質及び方法を使用して、本発明を実施または試験することができる。実務家は、当該技術分野の定義及び用語ならびに当業者に既知の他の方法については、特に、Sambrook et al., 1989 (上掲), Coligan et al. Current Protocols In Protein Science, John Wiley & Sons, Inc., 1995 - 1997、特に、1章、5章、及び6章、ならびに Ausubel et al., Current Protoc

50

ols in Molecular Biology, Supplement 47, John Wiley & Sons, New York, 1999; Colowick and Kaplan, eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir and Blackwell, eds., Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications, 1986; Joklik ed., Virology, 3rd Edition, 1988; Fields and Knipe, eds, Fundamental Virology, 2nd Edition, 1991; Fields et al., eds, Virology, 3rd Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa., 1996に導かれる。さらに、Staby, Rathore and Ahuga, eds Preparative Chromatography for Separation of Proteins; Whiley, 2017、特に、3章及び7章が参照されてもよい。さらに、Wen, Ellis, Pujar, eds, Vaccine Development and Manufacturing, Wiley, 2014、特に、4章、6章、8章、11章。さらに、方法及び物質については、WO2008022401、WO2012016290、及びWO2012068637が参照されてもよい。

#### 【0064】

##### 定義

本明細書を通して、文脈に別途要求のない限り、「含む (comprise)」という用語、または「含む (comprises)」もしくは「含むこと (comprising)」などの変形形態は、記載された要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を含むが、他の任意の要素もしくは整数、または要素もしくは整数の群を排除しないことを意味すると理解されるであろう。「からなる」は、「からなる」という語句の後に続くものはいかなるものを含み、且つそれに限定されることを意味する。従って、「からなる」という語句は、列挙された要素が必要または必須であること、及び他の要素が全く存在し得ないことを示す。「から本質的になる」は、本語句の後に列挙された任意の要素を含み、且つ列挙された要素に対し開示で指定された活性または作用を阻害または寄与しない他の要素に限定されることを意味する。

#### 【0065】

本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈に別途明示のない限り、複数の態様を含む。従って、例えば、「1つの組成物」への言及は、単一の組成物及び2つ以上の組成物を含み；「薬剤」への言及は、1つの薬剤及び2つ以上の薬剤を含み；「本開示」への言及は、本開示の単一及び複数の態様などを含む。

#### 【0066】

実施例は、単量体 HCV E2 由来のオリゴマー HCV E2 のアセンブリ及び単量体 HIV env 由来のオリゴマー HIV env のアセンブリを説明するが、本開示は、これらの特定の実施例に制限されず、ワクチン産生のための、または ex vivo 結合用途におけるウイルスエンベロプタンパク質及び癌抗原のアセンブリに拡張する。これに関して、方法は、低次抗原からの高次抗原の産生を提示する。「高次」抗原への言及は、三量体以上の倍数を意味するが、「低次形態」は、単量体または二量体を意味する。「抗原」、「種」、及び「形態」という用語は、互換的に使用される。

#### 【0067】

「天然」への言及は、抗原が細胞内の細胞機序を使用してアセンブルしていることを意味する。「アセンブルした」及び「フォールディングした」または「リフォールディングした」という用語は、互換的に使用されるが、「アセンブルした」は、アセンブルした抗原の部分的な de novo 性質をもたらすために使用される。アセンブルしたへの言及は、「無細胞」アセンブルしたを意味する。一実施形態では、アセンブルした抗原は、それらの天然対応物と同程度に有効であるか、またはそれよりも有効である免疫原である。

## 【0068】

本明細書で使用される場合、「非中和抗体」は、ウイルス抗原と結合するが、ウイルス侵入を減少させないか、または阻害しない抗体を指す。一実施形態では、それは、E2と結合するがウイルス侵入を減少させないか、または阻害しない抗体を指す。癌抗原に関して、非中和抗体への言及は、腫瘍細胞死滅を媒介しない抗体を意味する。

## 【0069】

本明細書で使用される場合、「中和抗体」は、ウイルス抗原と結合し、且つ、結合時にウイルス侵入を阻害する抗体を指す。一実施形態では、E2と結合し、且つE2との結合時にウイルス侵入を阻害する抗体を指す。癌抗原に関して、中和抗体への言及は、直接的または間接的に腫瘍細胞死滅を媒介する抗体を意味する。

10

## 【0070】

本明細書で使用される場合、「広域中和抗体」は、抗原/HCV抗原の複数の遺伝子型またはサブタイプに対して交差防御を提供する抗体を指す。

## 【0071】

高次またはオリゴマー形態は、三量体及びより大きなフォールディング形態を含む抗原の構造形態である。高次抗原または形態または種は、低次形態、抗原、または種からアセンブルする。低次形態は、抗原の単量体または二量体形態を含む。

## 【0072】

「制御」への言及は、当業者により理解されることになり、本発明との関係で意味がある結果を生じることになるか、またはそれを生じる可能性がある比較器（複数可）を用いることを意味する。通常は、対照は、宿主細胞または無細胞発現系で産生される対応物である。

20

## 【0073】

本明細書に記載の方法を使用して、任意のウイルスエンベロープ抗原が操作されてもよい。ウイルスファミリーの非限定例としては、Adenoviridae、アフリカ豚コレラウイルス様ウイルス、Arenaviridae、アルテリウイルス、Astroviridae、Baculoviridae、Birnaviridae、Bunyaviridae、Caliciviridae、Circoviridae、Coronaviridae、デルタウイルス、Filoviridae、Flaviviridae、Hepadnaviridae、Hepeviridae、Herpesviridae、Orthomyxoviridae、Paramyxoviridae、Picornaviridae、Poxviridae、Reoviridae、Retroviridae、及びRhabdoviridaeが挙げられる。特定のウイルスエンベロープ抗原は、Paramyxoviridae、Retroviridae、及びFiloviridaeに由来する。

30

## 【0074】

ウイルスエンベロープ抗原の非限定例は、インフルエンザヘマグルチニン（HA）などの病原性ウイルス；R2サブタイプもしくはHIV-2 gp125を含むHIV-1糖タンパク質（gp）120などのレンチウイルス；SARS-Si糖タンパク質などのコロナウイルス；呼吸器合胞体ウイルス（RSV）F2などのパラミクソウイルス；または DengueウイルスのEタンパク質などのフラビウイルスに由来する。

40

## 【0075】

1つの重要な群の抗原は、Coccidioides immitis、Histoplasma capsulatum、Blastomyces dermatitidis、及びParacoccidioides brasiliensisなどのヒトの一次全身性真菌病原体などの病原体に由来する。免疫不全宿主に依存する傾向がある重要な日和見性真菌病原体は、Cryptococcus neoformans、Pneumocystis jirovecii、Candida spp.、Aspergillus spp.、Penicillium marneffei、及びZygomycetes、Trichosporon beigelii、ならびにFusarium sp

50

pを含む。幅広い病原性真菌は、とりわけ、エイズを有する対象、化学療法誘発性好中球減少症を有する対象、または造血幹細胞移植を受けている患者を含む免疫不全対象と関連する。

【0076】

一部の実施形態では、抗原は、細菌、真菌、ウイルス、藻類、寄生虫（外部寄生虫または内部寄生虫を含む）、プリオン、卵菌、粘菌、カビ、線虫、マイコプラズマなどを含む微生物に由来する。非限定例として、以下の：Acinetobacter、Actinobacillus、Actinomycetes、Actinomyces、Aeromonas、Bacillus、Bacteroides、Bordetella、Borrelia、Brucella、Burkholderia、Campylobacter、Citrobacter、Clostridium、Corynebacterium、Enterobacter、Enterococcus、Erysipelothrix、Escherichia、Francisella、Haemophilus、Helicobacter、Klebsiella、Legionella、Leptospira、Listeria、Micrococcus、Moraxella、Morganella、Mycobacterium（結核）、Nocardia、Neisseria、Pasteurella、Plesiomonas、Propionibacterium、Proteus、Providencia、Pseudomonas、Rhodococcus、Salmonella、Serratia、Shigella、Staphylococcus、Stenotrophomonas、Streptococcus、Treponema、Vibrio（コレラ）及びYersinia（伝染病）、Adenoviridae、アフリカ豚コレラウイルス様ウイルス、Arenaviridae（例えば、ウイルス性出血熱、ラッサ熱）、Astroviridae（アストロウイルス科）Bunyaviridae（ラクロス）、Caliciviridae（ノロウイルス）、Coronaviridae（コロナウイルス）、Filoviridae（例えば、エボラウイルス、マールブルグウイルス）、Parvoviridae（B19ウイルス）、Flaviviridae（例えば、C型肝炎ウイルス、デングウイルス）、Hepadnaviridae（例えば、B型肝炎ウイルス、デルタウイルス）、Herpesviridae（単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス）、Orthomyxoviridae（インフルエンザウイルス）、Papovaviridae、（パピローマウイルス）、Paramyxoviridae（例えば、ヒトパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、ヒトRSウイルス）、Picornaviridae（風邪ウイルス）、Poxviridae（天然痘ウイルス、伝染性膿疱性皮膚炎ウイルス、サル痘ウイルス）、Reoviridae（ロタウイルス）、Retroviridae（ヒト免疫不全ウイルス）、Paroviridae（パルボウイルス）、Papillomaviridae（パピローマウイルス）、アルファウイルス、Rhabdoviridae（狂犬病ウイルス）、Trypanosoma、Leishmania、ジアルジア、トリコモナス症、Entamoeba、Naegleria、Acanthamoeba、Plasmodium、トキソプラズマ、Cryptosporidium、Isospora、Balantidium、Schistosoma、Echinostoma、Fasciolopsis、Clonorchis、Fasciola、Opisthorchis、Paragonimus、Pseudophyllidea（例えば、Diphyllbothrium）、Cyclophyllidea（例えば、Taenia）の目、属、または種のうちの1つ以上から選択される。病原性線虫は、Rhabditida（例えば、Strongyloides）、Strongylida（例えば、Ancylostoma）、Ascaridia（例えば、Ascaris、Toxocara）、Spirurida（例えば、Dracunculus、Brugia、Onchocerca、Wuchereria）、ならびにAdenophorea（例えば、Trichuris及びTrichinella）、Prototheca、Pfiesteria、Absidia、Aspergill

10

20

30

40

50

us、Blastomyces、Candida(酵母)、Cladophialophera、Coccidioides、Cryptococcus、Cunninghamella、Fusarium、Histoplasma、Madurella、Malassezia、Microsporium、Mucor、Paecilomyces、Paracoccidioides、Penicillium、Pneumocystis、Pseudallescheria、Rhizopus、Rhodotorula、Scedosporium、Sporothrix、Trichophyton、ならびにTrichosporon目由来の種を含む。誤解を避けるために、病原体は、新たな病原体を含んでもよい。

【0077】

例示的な癌抗原としては、CD抗原、糖タンパク質、糖脂質(ガングリオシド)、炭水化物(Lewis-Y)血管標的(VEGF/R)、成長因子及び間質または細胞外マトリックス抗原(FAP、Tenascin)などが挙げられる。例えば、以下のもの:KS1/4汎癌腫抗原、卵巣癌腫抗原(CA125)、前立腺酸性リン酸塩、前立腺特異抗原、メラノーマ関連抗原p97、メラノーマ抗原gp75、高分子量のメラノーマ抗原(HMW-MAA)、前立腺特異的膜抗原、癌胎児性抗原(CEA)、多形上皮ムチン抗原、ヒト乳脂肪球抗原、結腸直腸腫瘍関連抗原、CEA、TAG-72、LEA、Burkittリンパ腫抗原38.13、CD19、ヒトBリンパ腫抗原CD20、CD33、メラノーマ特異的抗原、ガングリオシドGD2、ガングリオシドGD3、ガングリオシドGM2、ガングリオシドGM3、腫瘍特異的移植型の細胞表面抗原(TSTA)、ウイルス誘導腫瘍抗原、T抗原DNA腫瘍ウイルス、RNAウイルスのエンベロープ抗原、癌胎児性抗原 - フェトプロテイン、大腸CEA、膀胱腫瘍癌胎児性抗原、分化抗原、ヒト肺癌抗原L6、L20、線維肉腫の抗原、ヒト白血病T細胞抗原-Gp37、ネオ糖タンパク質、スフィンゴ脂質、乳癌抗原、EGFR(上皮成長因子受容体)、HER2抗原、多形上皮ムチン、悪性ヒトリンパ球抗原-APO-1、胎児赤血球に見出されたI抗原、一次内胚葉、成人赤血球に見出されたI抗原、着床前の胚、胃腺癌に見出されたI(Ma)、M18、乳房上皮に見出されたM39、骨髓細胞に見出されたSSEA-1、VEP8、VEP9、My1、VIM-D5、結腸腺癌で見出されたDu56-22、TRA-1-85(血液型H)、結腸腺癌で見出されたC14、肺腺癌で見出されたF3、胃癌で見出されたAH6、Yハプテン、胎児性癌細胞で見出されたLeY、TL5(血液型A)、A431で見出された細胞EGF受容体、膀胱癌で見出されたE1シリーズ(血液型B)、胎児性癌細胞で見出されたFC10.2、胃腺癌抗原、腺癌で見出されたCO-514(血液型Lea)、腺癌で見出されたNS-10、CO-43(血液型Leb)、A431細胞のEGF受容体で見出されたG49、結腸腺癌で見出されたMH2(血液型ALeb/Ley)、結腸癌で見出された19.9、胃癌ムチン、骨髓細胞で見出されたTsA7、メラノーマで見出されたR24、胎児性癌細胞で見出された4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2、及びM1:22:25:8を含む分化抗原、ならびに4~8細胞期の胚で見出されたSSEA-3及びSSEA-4が記載される。

【0078】

本明細書で使用される場合、「ヒト免疫不全ウイルス」または「HIV」という用語は、レンチウイルス属のエンベロープ陽性一本鎖RNAメンバー及びRetroviridaeファミリーの一部を指す。経時的に、HIVは、後天性免疫不全症候群(AIDS)を引き起こす。本明細書で使用される場合、用語は、例えば、限定されないが、HIV1もしくはHIV2、またはそれらの任意の群もしくはサブタイプを含む任意のHIV遺伝子型を指す。一実施形態では、HIV-1は、M群、N群、O群、またはP群由来である。一実施形態では、HIV-1は、A、B、C、D、E、F、G、H、J、K、またはそれらの循環組み換え形態(CRF)から選択されるサブタイプである。HIVは、エンベロープタンパク質糖タンパク質(gp)120及びenvをコードする。

【0079】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「C型肝炎ウイルス」または「HCV」という用語は、Flaviviridaeファミリーのヘパシウイルス属に属するエンベロープ陽性センス一本鎖RNAウイルスを指す。本明細書で使用される場合、用語は、任意の遺伝子型のHCV、例えば、限定されないが、HCV遺伝子型1(G1)、HCV遺伝子型2(G2)、HCV遺伝子型3(G3)、HCV遺伝子型4(G4)、HCV遺伝子型5(G5)、HCV遺伝子型6(G6)、HCV遺伝子型7(G7)の株、を指し、それらの任意のサブタイプ、例えば、サブタイプa、b、c、d、eなどを含み得る。HCVは、宿主細胞へのウイルス侵入に必要とされる2つの糖タンパク質E1及びE2をコードする。

#### 【0080】

本明細書で使用される場合、「E2」とも呼ばれる「HCV E2」は、HCVの任意の遺伝子型/サブタイプ由来のE2ポリペプチドを含む。一実施形態では、E2は、HCV遺伝子型G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7、またはそれらのキメラバージョンに由来する。由来するは、これらの遺伝子型のうちの1つ以上に直接的または間接的に基づくものを意味する。遺伝子型は、自然に変化し、人によりさらに改変され得、保存的変異を通常含む、このような機能的多様体が包含される。1つ以上のアミノ酸変異を含む機能的多様体は、当業者に既知であり、組み換えE2細胞外ドメインを含む機能的多様体を含んでもよい。用語は、例えば、受容体結合を媒介する全長E2ポリペプチドの一部、立体配座もしくは他のエピトープを認識し及び/またはE1E2二量体形成を媒介する1つ以上の抗体による抗体結合、を含む多様体をさらに含む。用語は、免疫原性を増加させるための改変(デルタ123形態)または単量体産生を増加させるための改変(例えば、「A1a7」)などのE2の改変形態を含む。

10

20

#### 【0081】

1つの例示的な親HCV E2ポリペプチドは、遺伝子型H771aのアミノ酸384~661(E2 661もしくはE2e)を含むE2ポリペプチドの受容体結合部分、または別のHCV遺伝子型由来の対応する部分である。従って、使用可能なE2ポリペプチドは、膜貫通ドメインがない時、CD81結合に必要とされる細胞外ドメインの全部または一部を含む。さらなる多様体は、切断または分泌に必要な配列の付加または欠失/破壊を含んでもよい。例えば、シグナルペプチド切断及び糖タンパク質分泌を改変するために、E384THが含まれるか、欠失しているか、または改変され得る(McCaffrey et al., 2007)。一実施形態では、E2ポリペプチドは、1つ以上の超可変領域またはその一部を欠いている。一実施形態では、E2は、超可変領域、例えば、超可変領域1(HVR1)またはその一部、超可変領域2(HVR2)またはその一部、及び遺伝子型間可変領域(igVR/VR3)またはその一部：のうちの1つ以上、を欠いている。

30

#### 【0082】

一実施形態では、E2は、HVR1、HVR2、及びigVR/VR3を欠いている。一実施形態では、E2は、123である。一実施形態では、E2は、配列番号3、4、5、6、7、もしくは8に記載の配列；またはCD81結合活性を保持するそれらのフラグメント；またはそれらと少なくとも50%、もしくは少なくとも55%、もしくは少なくとも60%、もしくは少なくとも65%、もしくは少なくとも70%、もしくは少なくとも75%、もしくは少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは、少なくとも90%、もしくは少なくとも95%、もしくは少なくとも97%、もしくは少なくとも98%、もしくは少なくとも99%同一の配列を含む。

40

#### 【0083】

一実施形態では、E2は、0または1つ以上の変異型または破壊型システイン(複数可)を含む。従って、一実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のシステインが欠失しているか、または破壊されている。一実施形態では、これらは、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、C569、及び/またはC620から選択される。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C486、C581

50

、及びC 6 5 2である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C 5 8 1、C 5 8 5、及びC 6 5 2である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C 4 5 2、C 4 8 6、C 5 8 1、及びC 6 5 2である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C 5 6 9、C 5 8 1、C 5 8 5、及びC 6 5 2である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C 4 8 6、C 5 8 1、及びC 6 5 2である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C 4 5 2、C 4 8 6、C 5 6 9、C 5 8 1、C 5 8 5、及びC 6 5 2である。一実施形態では、変異型または破壊型システインは、C 4 5 2、C 4 8 6、C 5 6 9、C 5 8 1、C 5 8 5、C 5 9 7、及びC 6 5 2である。特許請求の範囲を含む本明細書を通して、H C V糖タンパク質E 2のポリペプチド残基の全ての番号付けは、図1 4に示されるプロトタイプH C V - H 7 7ポリペプチド配列、G e n b a n kアクセッション番号A F 0 0 9 6 0 6 (配列番号6)に基づく。E 2の成熟形態は、配列番号7に別々に提示される、配列番号6のアミノ酸残基3 8 4 ~ 7 4 6に包含される。配列番号6に示され、且つ図1 4に示されるようなアミノ酸番号付けに関して、本明細書で言及され改変がなされる。

10

#### 【0084】

1つの例示的なシステイン変異バージョンのE 2<sub>661</sub>は、以下のシステイン：C 5 8 1、C 5 8 5、C 6 5 2、C 4 8 6、C 4 5 2、C 5 9 7、及びC 5 6 9の変異または破壊を含む。この変異体は、「A 1 a 7」と呼ばれる。さらなるシステイン改変バージョンのE 2は、全体が本明細書に組み込まれている国際公開第W O 2 0 1 2 / 0 1 6 2 9 0号に記載される。

20

#### 【0085】

本明細書で使用される場合、「C D 8 1」は、テトラスパニンスーパーファミリーの膜貫通タンパク質であり、且つH C V宿主受容体である分化抗原群8 1を指す。

#### 【0086】

H C V E 2の受容体結合ドメイン(R B D)は、C D 8 1結合モチーフを含み、異なるジスルフィド及びグリカン配置をそれぞれ含有する異なる種の領域へとフォールディング及びオリゴマー化する。単量体及び二量体W T E 2<sub>661</sub>及び1 2 3 E 2<sub>661</sub>上のジスルフィド結合配置を同定するためかなりの作業を、本発明者(複数可)は行っており、このことは、これらのタンパク質の両方が、単量体タンパク質としてでさえ、実際に不均一であり、複数の交互に分子内でジスルフィド結合した形態で存在することを示唆する。

30

#### 【0087】

H C V E 2が組み換え的に産生される時、用いられる遺伝子型に応じて(本明細書で決定されるように)、一般に2 0 ~ 3 0 %がオリゴマー性であり、およそ7 0 %が単量体性である。A 1 a 7などのシステイン改変形態を用いて、より多くの単量体を産生する。

#### 【0088】

一例として、F S 2 9 3 F細胞へのデルタ1 2 3の遺伝子型1 a H 7 7 c配列の安定なトランスフェクションから生じた、「デルタ1 2 3」または「1 2 3」と呼ばれる、超可変領域1(H V R 1)、超可変領域2(H V R 2)及び遺伝子型間可変領域(i g V RまたはV R 3)が除去されているE 2受容体結合ドメイン(残基3 8 4 ~ 6 6 1)のおよそ2 0 %にすぎない形態のみが、単量体の場合の6 4 . 9 %と比較して、H M W形態のものである(図3 A)。本明細書に示される場合、この百分率は、増加した量のオリゴマー形態を生成する遺伝子型を選択することにより増加させることができる。

40

#### 【0089】

従来、還元及びリフォールディング方法は、望ましくない凝集物から低次種を再生するために使用されている。本発明によれば、還元及びリフォールディングを用いて、単量体からオリゴマーを生じるか、または単量体及びオリゴマーからオリゴマーを生じる。

#### 【0090】

一実施形態では、本発明は、天然H C V E 2からリフォールディングした組み換えオリゴマーC型肝炎ウイルス(H C V)エンベロープ糖タンパク質2(E 2)を調製する方

50

法を提供し、該方法は、以下のステップ：

( i ) 1つ以上の天然システイン（またはジスルフィド結合）を還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、天然 E 2 を接触させること；ならびに、

( i i ) 還元剤を除去するか、または還元された天然 E 2 を酸化剤と接触させて、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 への還元された単量体 E 2 のリフォールディングを誘発すること；を含み、

少なくとも 20% の単量体が、ステップ ( i i ) でオリゴマーに変換され、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 は、単量体 E 2 と比較して非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。

【 0 0 9 1 】

一実施形態では、ステップ ( i ) は、ステップ ( i i ) の前に 2 回実施される。一実施形態では、ステップ ( i i ) は、ステップ ( i i ) の前に 3 回以上実施される。一部の実施形態では、ステップ ( i ) 及び ( i i ) は、2 回以上繰り返される。

【 0 0 9 2 】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 は、以下：

( i ) 対照天然 H C V E 2 形態または単量体 E 2 と比較して、非中和抗体との結合が低下した、

( i i ) 対照天然 H C V E 2 形態と比較して、中和抗体との結合が少なくともほぼ同じ、

( i i i ) 対照天然 H C V E 2 形態または単量体 E 2 と比較して、より低い力価の非中和抗体の産生を誘発する、

( i v ) 中和抗体の産生を誘発する、

( v ) 広域中和抗体の産生を誘発する、

( v i ) 任意に、より高い力価の中和抗体の産生を誘発する、

( v i i ) 任意に、より高い力価の広域中和抗体の産生を誘発する、

からなる群より選択される少なくとも 1 つの特性を示す。

【 0 0 9 3 】

天然 H C V E 2 単量体は、異なる H C V E 2 種の混合物から効率的に産生され、効果的に精製することができる。本明細書に記載の、または当技術分野で既知の、天然単量体 H C V E 2 の産生。本明細書に記載の、または当該技術分野で既知の、天然単量体及びオリゴマー H C V E 2 の産生。通常は、タンパク質は、H C V E 2 をコードする好適な発現ベクターで形質転換された宿主細胞において組み換え産生される。

【 0 0 9 4 】

好適な哺乳動物細胞株としては、BHK、VERO、HT1080、293、293T、FS293F、Exp1293、RD、COS-7、CHO、Jurkat、HUT、SUPT、C8166、MOLT4/クローン8、MT-2、MT-4、H9、PML、CEM、骨髄腫細胞（例えば、SB20細胞）及びCEMX174が挙げられるが、これらに限定されず、例えば、ATCCから入手可能である。他の宿主細胞としては、酵母、例えば、Pichia pastoris、または Sf9 細胞などの昆虫細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 9 5 】

細胞は、500 mL、1 L、1.5 L、2 L、2.5 L、または 3 L の体積で培養され得る。一例では、細胞は、バッチ細胞培養プロセスを使用して培養される。一例では、細胞は、灌流細胞培養プロセスを使用して培養される。一例では、細胞は、種培地及び産生培地で培養される。一例では、細胞は、攪拌槽型反応器で培養される。一例では、反応器の容積は、約 1 L ~ 約 2500 L である。一例では、反応器は、1 L の反応器、1.5 L の反応器、2 L の反応器、2.5 L の反応器、または 3 L の反応器である。一例では、細胞は、ウェーブバイオリアクターで培養される。一例では、細胞は、セルファクトリーシステム、例えば、Nunc セルファクトリーシステム、で培養される。

【 0 0 9 6 】

10

20

30

40

50

合成DNAは、好適なプロモーター及び他の好適な転写制御エレメントを含有する発現ベクターへの分子クローニングにより組み換え発現させ、原核生物または真核生物宿主細胞に移して組み換えタンパク質を産生させ得る。このような操作のための技術は、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988.に記載される。  
【0097】

例えば、酵母内で発現させるための構築物は、好ましくは、合成遺伝子を含有し、プロモーター（例えば、GAL10、GAL7、ADH1、TDH3、またはPGK）及び終結配列（例えば、*S. cerevisiae* ADH1ターミネーター）などの関連転写及び翻訳制御配列が合成遺伝子に作動可能に連結される。酵母は、*Saccharomyces cerevisiae*、*Hansenula polymorpha*、*Pichia pastoris*、*Kluyveromyces fragilis*、*Kluyveromyces lactis*、及び*Schizosaccharomyces pombe*からなる群より選択することができる。*Yeast Genetics: Rose et al., A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1990も参照のこと。核酸分子は、当該技術分野で既知の酵母内の発現に最適化されたコドンとし得る（Sharp and Cowe, *Yeast*, 7: 657-678, 1991を参照）。所与の任意の細胞型に適するベクター及び制御エレメントは、本明細書の教示及び発現ベクターについて当該技術分野で既知の情報を考慮して当業者が選択することができる。

【0098】

宿主細胞株におけるクローニング及び発現のために入手可能なベクター、当該技術分野で周知であり、哺乳動物細胞株または酵母（真菌）の細胞におけるクローニング及び発現のためのベクター、細菌細胞株におけるクローニング及び発現のためのベクター、ファージにおけるクローニング及び発現のためのベクター、ならびに、昆虫細胞株におけるクローニング及び発現のためのベクターを含むが、これらに限定されない。発現されたタンパク質は、標準的なタンパク質精製方法を使用して回収することができる。翻訳制御エレメントは、M. Kozak（例えば、Kozak, *Mamm Genome*, 7(8): 563-74, 1996; Kozak, *Biochimie.*, 76(9): 815-21, 1994; Kozak, *J Cell Biol*, 108(2): 229-241, 1989; Kozak and Shatkin, *Methods Enzymol*, 60: 360-375, 1979)に概説されている。

【0099】

HCV E2をコードする例示的なポリヌクレオチドは、配列表に提示されており、配列番号1または2に示されるポリヌクレオチド配列を含む。

【0100】

天然HCV E2は、100kDaを超えるか、または200kDaを超える分子量を有する形態（例えば、HMW1またはHMW2形態）を含む、単量体、二量体、三量体、四量体、五量体、最大約23merであり得る。単量体形態及びオリゴマー形態は、サイズ、ゲル濾過特性、抗体反応性などに基づいて選択され得る。発現タンパク質は、抗体アフィニティークロマトグラフィーなどのアフィニティークロマトグラフィーにより細胞構成要素から精製され得る。

【0101】

一実施形態では、方法は、本明細書に記載の方法で処理する前に、天然HCV E2と比較して、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2の純度を増加させる。一実施

10

20

30

40

50

形態では、方法は、細胞培養物から単離された天然オリゴマーHCV E2と比較して、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2の純度を増加させる。本明細書で使用される場合、「精製された」または「純粋」という用語は、汚染物質、すなわち、細胞またはウイルス汚染物質、例えば、限定されないが、タンパク質、脂質、核酸、及び炭水化物、からのオリゴマーHCV E2の分離を指す。

【0102】

さらに、一実施形態では、方法は、試料中のオリゴマーHCV E2の濃度を増加させ、すなわち、単量体HCV E2を含有する試料から、本明細書に記載の方法を用いる試料の処理は、オリゴマーのHCV E2の濃度を少なくとも10%の、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%増加させる。一実施形態では、方法は、二量体の濃度を少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%増加させる。一実施形態では、方法は、三量体及び/または高次形態の濃度を少なくとも10%、または少なくとも20%、または少なくとも30%、または少なくとも40%、または少なくとも50%、または少なくとも60%、または少なくとも70%、または少なくとも80%、または少なくとも90%、または少なくとも95%増加させる。

10

【0103】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、天然対照オリゴマーHCV E2と比較して、安定性の改善、すなわち、熱力学的安定性及び/または動的安定性の改善、を示す。一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、天然対照オリゴマーHCV E2と比較して、安定性の増加を示す。

20

【0104】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、天然オリゴマーHCV E2と同等の、非中和抗体との結合を示す。実施形態では、オリゴマーは、二量体、または三量体、または四量体、または五量体、最大23merである。

【0105】

HCV E2単量体の部分還元が好ましい。立体構造エピトープを認識する抗体との一部の抗体反応性が保持される時、部分還元が達成される。例えば、10%、20%、または30%のタンパク質立体配座は、本明細書で使用される部分還元プロトコールにおいて保持され得る。

30

【0106】

一実施形態では、還元条件は、使用される還元剤に応じて約7を超えるpHを含む。

【0107】

「オリゴマー」または「多量体」という用語は、三量体、四量体など、または高分子量(HMW)形態としてフォールディングさせる抗原またはE2のバージョンを含む。異なる形態は、例えば、非還元ゲル電気泳動におけるそれらの移動パターンにより、またはゲル濾過クロマトグラフィーにより、もしくはそれらの抗体反応性により同定される。一実施形態では、単量体、二量体、HMW2、及びHMWデルタ123形態は、それぞれ、約46、97、239、及び2400の分子量を有する。

40

【0108】

特定の一実施形態では、低次形態が二量体形態を含むか、または低次形態が単量体形態を含む。

【0109】

一実施形態では、オリゴマー形態は、三量体形態である。

【0110】

一実施形態では、オリゴマー形態は、三量体形態及び/または高次形態である。

【0111】

50

一実施形態では、オリゴマーは、本明細書に記載のHMW2もしくはHMW、または本明細書に記載のその改変型などの、より高次の形態を形成する。

【0112】

一実施形態では、天然E2は、受容体結合ドメインを含み、且つステム領域及び膜貫通ドメインを欠いているE2の改変形態である。

【0113】

当技術分野で知られている通り、膜貫通ドメインは、残基715～746であり、ステム領域は、残基662～714である。一実施形態では、この形態は、WT E2<sub>661</sub>である。

【0114】

本明細書に記載されるように、HCV E2の全ての天然形態は、異なる分子内及び(二量体以上の場合)分子間ジスルフィド結合形態を含む。本開示の一実施形態によれば、単量体が還元されて、オリゴマーにリフォールディングするか、オリゴマーが還元されて、オリゴマーにリフォールディングするか、または単量体及びオリゴマーが還元されて、二量体またはオリゴマーにリフォールディングする。

【0115】

本方法の一実施形態では、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%の単量体が、オリゴマーに変換される。

【0116】

別の実施形態では、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、または少なくとも86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%の単量体が、オリゴマーに変換される。

【0117】

一実施形態では、オリゴマーは、100kDaを超える見かけの分子量を有する。一実施形態では、オリゴマーは、200kDaを超える見かけの分子量を有する。一実施形態では、オリゴマーは、2000kDaを超える見かけの分子量を有する。

【0118】

一実施形態では、方法は、最大収量のリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を生じるHCV遺伝子型を選択することをさらに含む。一実施形態では、HCV遺伝子型は、G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7、及び/または他のHCV遺伝子型から選択される。例示的で非限定的な実施形態では、HCV遺伝子型は、Con1またはS52である。

【0119】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、単量体リフォールディングで調製されていない対照オリゴマーHCV E2と比較して、抗体CBH4Gとの結合の低下を示す。天然オリゴマーは、細胞外単量体のリフォールディングで調製されていない対照オリゴマーHCV E2の例である。

【0120】

本方法の一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、対照オリゴマーHCV E2が中和抗体に結合する能力をほぼ保持する。本方法の一実施形態では、オリゴマーHCV E2は、対照オリゴマーHCV E2が広域中和抗体と結合する能力をほぼ保持する。

【0121】

一実施形態では、還元剤は、可逆的還元剤であり、例えば、DTTまたは2-メルカプトエタノール、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、または他のチオール含有剤から選択される。

【0122】

本方法の一実施形態では、還元剤は、約0.1~1.0mMで用いられて、天然E2の

10

20

30

40

50

部分還元を引き起こすジチオスレイトールである。

【0123】

本方法の一実施形態では、溶液は、7～9を超えるpHの緩衝液である。

【0124】

一実施形態では、抗原濃度は、pH9.6の炭酸緩衝液中1mg/mlである。0.6mmのDTT（最終濃度）が使用され、インキュベーションは、37で1時間である。溶液をpH6.8のPBSで徐々に希釈して、抗原濃度及び緩衝液をpH6.8のPBSと交換する。

【0125】

一実施形態では、天然E2（及びその結果としてリフォールディングしたオリゴマー）は、超可変領域1（HVR1）もしくはその一部、超可変領域2（HVR2）もしくはその一部、及び/または遺伝子型間可変領域（igVR/VR3）もしくはその一部のうちの1つ以上などの超可変領域の全部または一部を欠いている。

10

【0126】

受容体結合ドメインは、ウイルス侵入に必須ではない領域に免疫応答を集中させること及び広域中和抗体のエピトープを遮蔽することによる免疫回避に関与している可変領域HVR1、HVR2、及びigVRを含む。HVR2及び/またはigVR及び/またはHVR1の少なくとも一部の欠失を生じさせて、広域中和抗体を誘発する保存エピトープに免疫応答を集中させる。

【0127】

RBDを含み、且つ3つ全ての可変領域を欠いている構築物は、WO2008/022401に記載されるように、E2<sub>661</sub>デルタ123または123と呼ばれる。欠失した領域は、Gly、Ser、Ala、及びArg（例えば、GSSGまたはETHGSSG）を含む群より選択される残基を含む最大20アミノ酸のペプチド配列などのWO08/022401（全体が本明細書に組み込まれる）に記載のフレキシブルなリンカー配列と任意に置換される。

20

【0128】

一実施形態では、天然E2は、精製を助けるシグナル配列またはタンパク質タグを含む。一実施形態では、シグナル配列は、細胞からのタンパク質の分泌もたらず。一実施形態では、シグナル配列は、配列番号9に提示されるアミノ酸配列「MNPLLIILTFVAAALA」を含むN末端シグナル配列である。一実施形態では、タンパク質タグは、C末端Hisタグである。一実施形態では、C末端Hisタグは、アミノ酸配列「HHHHHH」を含む。

30

【0129】

単量体E2でさえ不均一であり、異なる分子内ジスルフィド配置を示すことを、本発明者らは発見している。単量体の還元により、より均一なオリゴマーをリフォールディングするための良い出発点が提供されると、本発明者らは判断した。

【0130】

一実施形態では、天然E2は、C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、C569、及び/またはC620から選択される1つ以上のアミノ酸残基に非システイン置換または変異を含む。驚くべきことに、「Ala7」と呼ばれる）非システイン残基と置換された7つのシステイン残基であるC452、C486、C569、C597、C581、C585、C652の非システイン置換を有するHCV E2単量体でさえ、より高レベルのオリゴマーにリフォールディングする。

40

【0131】

E2は、糖タンパク質の三次構造を足場にするER中で9個の分子内ジスルフィド結合を形成する18の高度に保存されたシステイン残基を含む。WO12/016290（全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、これらのジスルフィドの一部は、CD81結合及びMAb H53結合には重要でない。また、7つのシステイン

50

残基の除去を含むシステイン改変形態は、単量体産生を有意に増加させ、オリゴマーの産生を減少させる。通常、E 2 は、宿主細胞中で組み換え産生される時、異なる単量体及びオリゴマー形態の混合物を産生する。W O 1 2 / 0 1 6 2 9 0 は、種々のシステイン改変 H C V E 2 の生成について記載していた。C 4 5 2、C 4 8 6、C 5 6 9、及び C 5 9 7 から選択される 2、3、または 4 つのシステインが変異または破壊されている A 1 a 置換形態などの W O 1 2 / 0 1 6 2 9 0 に開示の他の構築物が本明細書では考えられる。E 2<sub>661</sub> は、C 6 7 7 のシステインを欠いており、1 7 のシステインを有する。

【0132】

一部の実施形態では、天然 H C V E 2 は、発現される時、天然形態中に少なくとも 4 0 % の単量体及び 7 0 % 未満のオリゴマー、または、少なくとも 5 0 % の単量体及び 5 0 % 未満のオリゴマーを組み換え産生する A 1 a 4、A 1 a 5、A 1 a 6、または A 1 a 7 改変形態の H C V E 2 などのシステイン改変形態である。

【0133】

本明細書で決定されるように、C 6 2 0 - A 1 a の変異導入は、高分子量のオリゴマー形成をブロックする。従って、高次形態の産生のための天然 H C V E 2 形態は一般に、C 6 2 0 である。

【0134】

別の幅広い態様では、本明細書は、単量体エンベロープ糖タンパク質から組み換えオリゴマーウイルスエンベロープ糖タンパク質を調製する方法を提供し、該方法は、以下のステップ：

( i ) 1 つ以上のジスルフィド結合を部分的に還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、天然 E 2 を接触させること；ならびに

( i i ) 還元剤を除去するか、または ( i ) の E 2 を酸化剤と接触させて、オリゴマーエンベロープ糖タンパク質への単量体 E 2 のリフォールディングを誘発すること；を含み、

少なくとも 2 0 % の単量体がステップ ( i i ) でオリゴマーに変換され、オリゴマーが単量体糖タンパク質と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。

【0135】

一実施形態では、ステップ ( i ) は、ステップ ( i i ) の前に 2 回実施される。一実施形態では、ステップ ( i i ) は、ステップ ( i i ) の前に 3 回実施される。

【0136】

別の実施形態では、本明細書は、本明細書で上述した還元及びリフォールディング方法により産生された、組み換えリフォールディングしたオリゴマー C 型肝炎ウイルス ( H C V ) E 2 糖タンパク質を含む組成物を可能にする。

【0137】

一実施形態では、リフォールディングしたオリゴマータンパク質は、配列番号 3、4、5、6、7、8 のうちの 1 つに提示されるアミノ酸または切断バージョンもしくは改変バージョン、またはそれらの機能的多様体を含む。機能的多様体及び改変型は、前改変形態または任意の他の好適な対照と比較して、増強された免疫原性を示し得る。

【0138】

一実施形態では、組成物は、本明細書に記載の還元及びリフォールディング方法で生成された組み換えリフォールディングしたオリゴマー C 型肝炎ウイルス ( H C V ) E 2 糖タンパク質を含み、オリゴマーの H C V E 2 は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照 H M W E 2 と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

【0139】

一実施形態では、組成物は、本明細書に記載の還元及びリフォールディング方法で生成されたリフォールディングした組み換えオリゴマー C 型肝炎ウイルス ( H C V ) E 2 糖タンパク質を含み、リフォールディングしたオリゴマー H C V E 2 は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照 H M W E 2 と比較して、抗体 C B H 4 G または A R 3 C との結合の低下を示す。

10

20

30

40

50

## 【0140】

一実施形態では、組成物は、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含み、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照HMW E2と比較して、抗体CBH4Gとの結合の低下を示す。一実施形態では、組成物は、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含み、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、単量体還元及びリフォールディングで調製されていない対照HMW E2と比較して、抗体AR3Cとの結合の低下を示す。

## 【0141】

一実施形態では、組成物は、単量体リフォールディングしたオリゴマーHCV E2、ならびに、薬学的または生理学的に許容される担体及び/または希釈剤を含む。

10

## 【0142】

一実施形態では、組成物は、アジュバントをさらに含む。

## 【0143】

アジュバントは組成物が免疫応答を誘導する能力を増強する任意の薬剤とし得ることを、当業者は理解するであろう。一実施形態では、アジュバントは、抗原に対する免疫応答を増加させることにより作用し得る。一実施形態では、アジュバントは、Th1及び/またはTh2免疫応答を増加し得る。一実施形態では、アジュバントは、Petrovsky et al (2004)及びWilson-Welder et al. (2009)に記載されるようなミョウバン塩もしくは他のミネラルアジュバント；張力活性剤；細菌誘導體；ピヒクルもしくは徐放物質、またはサイトカインとし得る。一実施形態では、アジュバントは、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム（ミョウバン）、リン酸カルシウム、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、MF-59、サポニン、QS-21、リポ多糖体（LPS）、モノホスホリルリピドA（MPLA）、Th1活性化ペプチド（例えば、IMP321）、TLR-2リガンド（例えば、OsxA、ムラミルジペプチド（MDP）、マクロファージ活性化リポペプチド-2（MALP-2）、CpGアジュバント、百日咳毒素、熱感受性毒素（LTK63及びLT-R192G）、ジフテリア毒素、イミキモド、Addavax、ISCOMATRIX、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、IL-12、IL-6、IL-4、IL-2、IL-1、IFN-g、AS04（MPLA及びQS-21を含有するリポソーム製剤）、グリセリン、ならびにパラフィン、鉱油、ラノリン、スクアレン、ISA-70、及びモンタニドなどの油性エマルジョンから選択され得る。例示的な一実施形態では、アジュバントは、サポニン系アジュバントである。関連する態様では、アジュバントは、コレステロール及びステロールをさらに含むサポニン系アジュバントであり、これの例示的実施例は、ISCOMATRIXアジュバントである。例示的な一実施形態では、アジュバントは、MF59である。例示的な一実施形態では、アジュバントは、Addavaxである。一実施形態では、アジュバントは、炭水化物アジュバント、例えば、グルカン、デキストラン、レンチナン、グルコマンナン、またはガラクトマンナンである。

20

30

## 【0144】

一実施形態では、本明細書は、HCV感染の処置もしくは予防における、またはこのための薬品の調製における、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物の使用を提示する。

40

## 【0145】

一実施形態では、本明細書は、HCV感染の診断もしくは監視または抗HCV処置プロトコルの監視における、あるいはこのための診断薬の調製における、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物の使用を提示する。

## 【0146】

一実施形態では、組成物は、70重量%を超える、または80重量%を超える三量体または三量体及び高次形態のHCV E2を含む。

## 【0147】

50

一実施形態では、組成物は、70重量%を超える、または80重量%を超える二量体HCV E2を含む。

【0148】

一実施形態では、組成物は、70重量%を超える、または80重量%を超える高次形態のHCV E2糖タンパク質を含む。

【0149】

一実施形態では、本明細書は、方法は、対象または患者において免疫応答を誘発するための方法を提供し、方法は、免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で、本明細書に記載のリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む有効量の組成物を対照または患者に投与することを含む。

10

【0150】

これらの実施形態によれば、組成物は一般に、広域中和抗体の生成を含む免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下で投与される。本発明の組成物は、単回投与または適用として投与され得る。あるいは、組成物は、反復投与または適用を含んでもよく、例えば、組成物は、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回またはそれ以上投与され得る。

【0151】

本発明はさらに、対象または患者において免疫応答を誘発するための方法を提供し、方法は、対象または患者に、本明細書に記載のリフォールディングオリゴマーHCV E2を含む組成物を有効量投与することを含む。さらに、本明細書に記載のリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含むC型肝炎ウイルスの感染に対して対象を免疫するための組成物、特に、ワクチン組成物が、本発明では考えられる。

20

【0152】

本明細書で使用される「ワクチン」という用語は、対象において免疫学的応答を誘導する少なくとも1つの免疫学的に活性な構成成分及び必ずしもそうとは限らないが、該活性構成成分の免疫学的活性を増強する1つ以上の追加の構成成分（例えば、アジュバント）を含む医薬組成物を指す。さらに、ワクチンは、医薬組成物に典型的なさらなる構成成分を含んでもよい。ワクチンの免疫学的に活性な構成成分は、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2組成物などの高次のアSEMBルした抗原を含む。「ワクチン」及び「ワクチン組成物」という用語は、本発明では互換的に使用される。

30

【0153】

本発明で考えられる「対象」は、ヒト、または実験室もしくは技術分野で認められた試験もしくはビヒクル動物を含む動物である。「患者」は、処置または予防処置を必要とするヒト対象を含む。

【0154】

一実施形態では、本明細書は、抗原に関連する状態に対して対象を免疫するための方法も可能にし、方法は、本明細書に記載のアSEMBルまたはリフォールディングしたオリゴマー抗原を含む組成物を対象に投与することを含む。

【0155】

一実施形態では、本明細書はまた、本明細書に記載の細胞外でリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物を対象に投与することを含む、HCVの感染に対して対象を免疫する方法を可能にする。

40

【0156】

一実施形態では、本明細書はまた、HCV感染を処置または予防するのに十分な時間及び条件下で、本明細書に記載の細胞外でリフォールディングしたオリゴマーHCV E2を含む組成物を対象に投与することを含む対象のHCV感染を処置または予防するための方法を可能にする。

【0157】

本明細書で使用される「治療的有效量」及び「予防的有效量」を含む「有効量」という用語は、一部の対象において望ましい治療的、予防的、または生理学的効果を提供する、

50

単回投与での、または一連のもしくは徐放系の一部としての、本発明の組成物の十分な量を意味する。望ましくない効果、例えば、副作用は、望ましい治療効果と共に現れることがある：従って、実務家は、適切な「有効量」を決定する際に、潜在的なリスクに対する潜在的な利益のバランスをとる。必要とされる組成物の正確な量は、対象の種、年齢及び全身状態、投与様式などに応じて、対象ごとに変動するであろう。従って、正確な「有効量」を特定することが不可能であり得る。しかし、任意の個々の場合における適切な「有効量」は、日常的な技術または実験を使用して当業者により決定され得る。当業者は、組成物または他の薬剤の事前投与、対象のサイズ、対象の症状の重症度または感染集団における症状の重症度、ウイルス負荷、及び選択された特定の組成物または投与経路のような要因に基づいて必要量を決定することが可能であろう。

10

**【0158】**

「処置」という用語は、E2抗原などの抗原に関連する状態の1つ以上の症状及びHCV感染症の、またはHCVの進行した症状を発症するリスクもしくは子孫に伝わるHCVのリスクのある、少なくとも一部の対象における任意の測定可能なまたは統計的に有意な改善を指す。

**【0159】**

「予防」及び「予防処置」などの用語は、交換可能に使用され、HCV感染に関連する状態または状態の兆候の、予防、またはその後の感染を減弱させること、または感染するリスクを低減すること、または重症度もしくは発症を低減させることのために、HCVに感染していることが知られていない対象への本発明の組成物の投与を含む。

20

**【0160】**

ワクチン組成物の投与は一般に、予防目的のためである。組成物の予防的投与は、その後のあらゆる感染を予防または減弱させるのに役立つ。一実施形態では、ワクチン組成物は、病原体による対象の再感染を予防するものである。「薬理的に許容される」組成物は、レシピエント患者により忍容されるものである。有効量のワクチンが投与されると考えられる。「有効量」は、十分な体液性または細胞性免疫を誘導するなどの所望の生物学的効果を達成するのに十分な量である。これは、ワクチンの種類、レシピエントの年齢、性別、健康状態、及び体重に依存し得る。所望の生物学的効果の例としては、症状が生じないこと、症状の低減、組織中のウイルス価の低減、または鼻分泌物、C型肝炎ウイルスによる感染に対する完全な防御、及びC型肝炎ウイルスによる感染に対する部分的な防御が挙げられるが、これらに限定されない。

30

**【0161】**

一部の実施形態では、本発明のワクチンまたは組成物は、その存在が、感染性C型肝炎ウイルスの少なくとも1つの株に対する少なくとも1つの一次または二次体液性または細胞性免疫応答を増強するか、またはこれにおける増強を示すレシピエント患者の生理学の検出可能な変化をもたらす場合、生理学的に有意である。ワクチン組成物は、ウイルス感染を防ぐために投与される。「防御」は絶対的なものである必要はなく、すなわち、C型肝炎感染は、対照集団または患者群と比較して統計的に有意な改善がある場合、完全に予防または根絶される必要はない。防御は、C型肝炎ウイルス感染の症状の重症度または発症の早さを低減することに限定され得る。

40

**【0162】**

一実施形態では、本発明のワクチン組成物は、感染症の発症前に（予想される感染を防止または減弱させるように）、または感染の開始後のいずれかで、対象に提供され、それにより、ウイルス感染を防ぐ。一部の実施形態では、本発明のワクチン組成物は、対象間のウイルス伝染を低減させるために、感染症の発症の前または後に対象に提供される。

**【0163】**

本発明の組成物は、C型肝炎感染もしくはHCV感染に関連する症状などのウイルス性もしくは癌状態を処置もしくは予防するために、単独で活性な医薬品として投与することができるか、または1つ以上の薬剤と組み合わせて使用することができることがさらに理解されるであろう。本発明の組成物または組成物の組み合わせと併用で投与されるべき他

50

の薬剤としては、HCV感染により引き起こされる疾患に対する療法、または直接的もしくは間接的な機序によりHCVウイルス複製を抑制する療法が挙げられる。これらの薬剤としては、宿主免疫調節剤（例えば、インターフェロン-アルファ、ペグ化インターフェロン-アルファ、コンセンサスインターフェロン、インターフェロン-ベータ、インターフェロン-ガンマ、CpGオリゴヌクレオチドなど）；イノシンーリン酸デヒドロゲナーゼなどの宿主細胞機能を阻害する抗ウイルス化合物（例えば、リバビリンなど）；免疫機能を調節するサイトカイン（例えば、インターロイキン2、インターロイキン6、及びインターロイキン12）；1型ヘルパーT細胞応答の発生を増強する化合物；干渉RNA；アンチセンスRNA；HCV抗原またはHCVに対する抗原アジュバントの組み合わせを含むワクチン；HCVウイルス複製の内部リボソーム進入部位（IRES）開始翻訳ステップを阻害することにより、ウイルスタンパク質合成をブロックするために、または、ウイルス粒子の成熟をブロックするために、宿主細胞構成要素と相互作用する、且つ、例えば、HCV P7などの膜タンパク質のピロポリンファミリーを標的とする薬剤と共に放出する薬剤；ならびにNS3/NS4Aプロテアーゼ、NS3ヘリカーゼ、NS5Bポリメラーゼ、NS4Aタンパク質、及びNS5Aタンパク質の阻害剤などの、ウイルス複製に關与するウイルスゲノムの他のタンパク質を標的とすることにより、HCVの複製を阻害し、及び/または他のウイルス標的の機能を干渉する任意の薬剤または薬剤の組み合わせ、が挙げられるが、これらに限定されない。

10

**【0164】**

さらに別の実施形態によれば、本発明の医薬組成物は、限定されないが、ヘリカーゼ、ポリメラーゼ、メタロプロテアーゼ、NS4Aタンパク質、NS5Aタンパク質、及び内部リボソーム進入部位（IRES）を含むHCVライフサイクルにおける標的の他の阻害剤（複数可）をさらに含み得る。

20

**【0165】**

投与は一般に、E2特異的抗体の生成または細胞性免疫応答を含む免疫応答を誘発するのに十分な時間及び条件下のものである。免疫原性組成物は、経肺、経口、静脈内（水溶性の場合）、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、髄腔内、もしくは座薬経路、または（例えば、徐放製剤を使用する）移植などによる都合の良い方法で投与され得る。投与は、全身または局所であり得る。但し、全身がより都合が良い。他の考えられる投与経路は、パッチ、細胞移植、インプラント、舌下、眼内、局所的、経口、直腸内、経膈、経鼻または経皮によるものである。

30

**【0166】**

本明細書で使用される場合、「免疫応答」は、抗体を生成すること及び組成物に対して免疫を高めることを含む、本発明の組成物の存在に対する身体全体の反応を指す。従って、抗原に対する免疫応答は、目的の抗原に対する体液性及び/または細胞性免疫応答の対象における向上も含む。「体液性免疫応答」は、形質細胞により産生される抗体により媒介される。「細胞性免疫応答」は、Tリンパ球及び/または他の白血球により媒介されるものである。本明細書で使用される場合、「抗体価」は、各対象について免疫前の試料の値よりも大きい値をもたらした、免疫後の血清中の最高希釈倍数として定義することができる。

40

**【0167】**

本発明の実施形態はまた、HCV E2などのリフォールディングしたオリゴマー抗原に対する免疫応答を評価するためのアッセイを提供する。アッセイは、抗体応答及び遅延型過敏反応を測定するためのアッセイなどのin vivoアッセイを含み得る。一実施形態では、抗体応答を測定するためのアッセイは、主に、B細胞機能及びB細胞/T細胞相互作用を測定し得る。抗体応答アッセイのために、血液中の抗体価は、抗原チャレンジ後に比較され得る。

**【0168】**

本明細書は、対象にHCV E2などのリフォールディングしたオリゴマー抗原を有効量投与すること、及び産生された抗体を精製することを含む、本明細書に記載のHCV

50

E2などのリフォールディングしたオリゴマー抗原に対する精製抗体を生成するための方法を提供する。

【0169】

別の実施形態では、本発明は、HCV E2などのリフォールディングしたオリゴマー抗原に対して惹起された抗体を提供する。特異的抗体は、天然抗原を認識できないが、アセンブルした抗原を認識し、及び/または、逆もまた同様に、抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナルとし得る。さらに、抗体は、当業者らに既知の基準を通常使用して、診断、予後、治療、予防、及びスクリーニング目的のために選択され得る。

【0170】

「抗体」（複数可）という用語は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、ならびに、限定されないが、全長抗体（例えば、インタクトなFc領域を有する）を含む、モノクローナル抗体に由来する全ての種々の形態、例えば、Fv、Fab、Fab'、及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを含む抗原結合フラグメント、ならびに単鎖抗体などの組み換え方法を使用して産生される抗体由来ポリペプチドを含む。本明細書で使用される「抗体」（複数可）という用語は、例えば、トランスジェニック動物において、またはファージディスプレイを介して、産生されるヒト抗体、ならびに抗体、ヒトもしくはヒト化抗体、霊長類化抗体、または脱免疫化抗体を指す。それは、治療上許容され得る他の形態の抗体及びそれらの抗原結合フラグメント、例えば、軟骨性海洋動物もしくはCamelid由来の、またはこのような抗体に基づくライブラリー由来の単ドメイン抗体、も含む。フラグメント形態または改変形態の抗体の選択は、フラグメントまたは改変形態が、抗体またはフラグメントの半減期に与えるあらゆる影響を考慮することも含み得る。

10

20

【0171】

一部の実施形態では、抗体は、薬学的または薬理的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と共に提供される。他の実施形態では、診断または予後のために、抗体が選択される。一部の実施形態では、リフォールディングしたオリゴマー形態のHCV E2糖タンパク質抗体を含むキットが提供される。

【0172】

「薬学的に許容される担体及び/または希釈剤」は、別の理由で望ましくないわけではない物質からなる医薬ビヒクルである。すなわち、それは、それ自体でまたは活性組成物と実質的に有害な反応を引き起こす可能性が低い。担体は全て、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、及び抗真菌剤、等張性を調整するための薬剤、吸収もしくはクリアランス速度を増加もしくは減少するための薬剤、pHを維持するための緩衝剤、キレート剤、膜またはバリア横断剤を含み得る。薬学的に許容される塩は、別の理由で望ましくないものではない塩である。薬剤または薬剤を含む組成物は、酸付加塩または金属錯体などの薬学的に許容される無毒の塩の形態で投与され得る。

30

【0173】

経口投与のために、組成物は、カプセル剤、丸剤、錠剤、甜剤、散剤、懸濁剤、または乳剤などの固体または液体調製物に製剤化することができる。組成物を経口剤形に調製する際には、経口液体調製物（例えば、懸濁液、エリキシル剤、及び溶液）の場合には、例えば、水、グリコール、油、アルコール、着香剤、防腐剤、着色剤、懸濁剤など通常の薬学的媒体；または、経口固体調製物（例えば、散剤、カプセル剤、及び錠剤）の場合には、デンプン、糖、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などの担体のいずれかが用いられてもよい。投与が容易であるので、錠剤及びカプセル剤は、最も有利な経口投薬単位形態に相当し、その場合には、固体の薬学的担体が当然用いられる。錠剤は、トラガカント、コーンスターチ、またはゼラチンなどの結合剤；アルギン酸などの崩壊剤；及びステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤を含有してもよい。必要に応じて、錠剤は、標準的な技術により糖衣または腸溶コーティングされ得る。活性組成物は、胃腸管を通過するのを安定させるためにカプセル化することができる。例えば、国際特許公開第WO96/11698号を参照のこと。

40

50

## 【0174】

非経口投与のために、組成物は、担体に溶解され、溶液または懸濁液として投与され得る。経粘膜または経皮（パッチを含む）送達のために、当該技術分野で既知の適切な浸透剤が、組成物を送達するために使用される。吸入のために、送達は、乾燥粉末エアロゾル、液体送達システム、エアジェットネブライザー、噴射剤システムなどの任意の都合の良いシステムを使用する。例えば、製剤はエアロゾルまたはミストの形態で投与することができる。組成物はまた、持続送達または持続放出形式で送達され得る。例えば、生分解性マイクロスフェアまたはカプセルまたは持続送達が可能な他のポリマー構造を製剤に含めることができる。製剤は、薬物動態及び生体内分布を変更するように変更することができる。薬物動態の一般的な考察については、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, U.S.A. 1990（上掲）を参照のこと。一部の実施形態では、製剤は、リポソームまたはミセルなどの脂質単層または二重層に組み込まれ得る。当該技術分野で既知の標的化療法は、特定の種類の細胞または組織により特異的に薬剤を送達するために使用され得る。

10

## 【0175】

投与される活性剤の実際の量ならびに投与の速度及び時間経過は、疾患の性質及び重症度に依存するであろう。処置の処方、例えば、投与量、時期など、の決定は、一般実務家または専門家の責任の範囲内であり、通常は、個々の患者の状態、送達の部位、投与方法、及び他の実務家に既知の要因を考慮に入れる。技術及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990（上掲）に見出すことができる。

20

## 【0176】

調製され得る徐放性調製物は、免疫応答を誘導するのに特に都合が良い。徐放性調製物の例としては、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセタート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ならびにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日を超える分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、タンパク質をより短い期間放出する。小さい（約200～800オングストローム）単層型のリポソームが使用され得、これの中で、脂質含有量がコレステロールの約30%よりも大きく、選択された割合は、最適な療法のために調整される。

30

## 【0177】

タンパク質の安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、含水量を制御し、適切な添加剤を使用し、且つ特定のポリマーマトリックス組成物を開発することにより達成され得る。タンパク質のin vivo半減期は、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）基などの他の要素の結合によることを含む、当該技術分野に既知の技術を使用して延長され得る。

40

## 【0178】

当該技術分野において開示されているようなプライムブースト免疫化方策が考えられる。例えば、国際公開第WO/2003/047617号を参照のこと。従って、組成物は、ワクチン、初回免疫剤、または追加免疫剤の形態のものとし得る。

## 【0179】

一実施形態では、本明細書は、本明細書に記載されるように、還元されて、リフォールディングしたオリゴマーHCVE2形態を含む組成物を含むキット、または固体もしくは半固体の基質を提供する。

## 【0180】

50

「単離された」という用語は、その本来の状態ですれに通常付随する構成成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を意味する。例えば、「単離された核酸分子」は、天然に存在する状態でそれに隣接する配列から単離された核酸またはポリヌクレオチド、例えば、フラグメントに通常隣接する配列から除去されているDNAフラグメント、を指す。限定されないが、単離された核酸、ポリヌクレオチド、ペプチド、またはポリペプチドは、精製により単離される天然配列、または組み換えもしくは合成手段により産生される配列を指すことができる。一部の実施形態では、精製リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、少なくとも95～99%の純度である。

#### 【0181】

本明細書に記載の方法により製造されたリフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、例えば、以下のステップ：遠心分離、精密濾過、抗体精製、深層濾過、限外濾過、ダイアフィルトレーション、沈殿、ビーズクロマトグラフィー（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、またはアフィニティークロマトグラフィー）、膜吸着剤（例えば、イオン交換クロマトグラフィーまたはアフィニティークロマトグラフィー）のうちの一つ以上を含む、当業者に既知の任意の方法により精製できることを、当業者は理解するであろう。一例では、本明細書に記載の方法により生成されるリフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2の精製を助けるHISタグなどのタンパク質タグを含む。

10

#### 【0182】

一実施形態では、本明細書は、組み換えHCV E2のリフォールディングした組み換えオリゴマーC型肝炎ウイルス(HCV)エンベロープ糖タンパク質2(E2)を調製する方法を可能にし、組み換えE2は、単量体E2であるか、または単量体及びオリゴマー組み換えE2の混合物を含み、該方法は、以下のステップ：(i)一つ以上の単量体ジスルフィド結合を還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、組み換えE2を接触させること；ならびに(ii)還元剤を除去するか、または単量体を酸化剤と接触させて、オリゴマーHCV E2への組み換えE2のリフォールディングを誘発すること；を含み、リフォールディングした組み換えオリゴマーE2は、リフォールディング(i)前の組み換えE2よりも少なくとも20%多いオリゴマーを含み、リフォールディングしたオリゴマーHCV E2は、組み換え単量体E2と比較して、非中和抗体との結合の低下を示す。

20

30

#### 【0183】

一部の実施形態では、リフォールディングしたオリゴマーE2は、二量体、三量体、及び/または高次形態のE2を含む。

#### 【0184】

別の態様では、本明細書は、天然エンベロープ糖タンパク質から、リフォールディングした組み換えオリゴマーウイルスエンベロープ糖タンパク質を調製する、より一般的な方法を提供し、該プロセスは、以下のステップ：(i)一つ以上の単量体ジスルフィド結合または天然システインを部分的に還元するのに十分な時間及び条件下で、還元剤を含む溶液と、天然E2を接触させること；ならびに

(ii)還元剤を除去するか、または還元された天然HCV E2を酸化剤と接触させて、オリゴマーエンベロープ糖タンパク質への還元された単量体エンベロープ糖タンパク質のリフォールディングを誘発すること；を含み、

40

単量体の少なくとも20%は、ステップ(ii)で、リフォールディングしたオリゴマーに変換され、オリゴマーは、単量体糖タンパク質と比較して、非中和抗体との結合の低下を少なくとも示す。

#### 【0185】

記載されるような一旦生成された高次抗原が、当業者に既知の任意の方法により精製され得ることを、当業者は理解するであろう。例えば、「精製すること」または「精製」は、以下のステップ：遠心分離（例えば、超遠心分離）、クロマトグラフィー（例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、もしくはアフィニティー

50

クロマトグラフィー)、及び/または膜吸着剤(例えば、イオン交換クロマトグラフィーもしくはアフィニティークロマトグラフィー)、濾過(例えば、膜濾過、限外濾過、もしくは透析濾過)のうちの1つ以上を含んでもよい。

【0186】

精製された高次抗原がワクチン組成物などの医薬製剤に製剤化され得ることを、当業者は理解するであろう。このような組成物は、アジュバント、賦形剤、結合剤、防腐剤、担体カップリング剤、緩衝剤、安定化剤、乳化剤、湿潤剤、非ウイルスベクター、及びトランスフェクション促進化合物のうちの1つ以上を含み得る。このようなワクチン組成物が凍結乾燥することができることを、当業者はさらに理解するであろう。一実施形態では、生成されたワクチン組成物は、ヒトでの使用に適する。別の実施形態では、ワクチンは、獣医学的使用に適する。

10

【0187】

本明細書に記載の高次抗原または組成物は、抗原特異的免疫細胞と結合する/これを検出するために使用され得る。一実施形態では、免疫細胞は、B細胞である。一実施形態では、免疫細胞は、T細胞である。抗原性免疫細胞の検出は、対象が抗原に関連する病原体に感染していること、及び/または対象が抗原でワクチン接種されていることを示す。一実施形態では、本明細書に記載の高次抗原、または本明細書に記載の組成物は、エンベロープウイルスに特異的なB細胞の検出及び/または単離のために使用され得る。一実施形態では、エンベロープウイルスは、HCVである。一実施形態では、エンベロープウイルスは、HIVである。

20

【0188】

本発明の高次抗原が診断アッセイ及び/または免疫細胞の単離での使用に適することを、当業者は理解するであろう。一実施形態では、高次抗原は、フローサイトメトリーにおける免疫細胞の染色またはマーカーとして使用され得る。一実施形態では、フローサイトメトリーを使用する検出を可能にするために、高次抗原は、マーカー、染料、または蛍光団と複合化される。一実施形態では、マーカーは、d-ビオチンである。

【0189】

免疫細胞(複数可)の単離は、例えば、Altmanら(1996)、Vollersら、2008年及びDoltonら、2015年に記載されるように、「四量体アッセイ」または「四量体染色」を含み得、本明細書に記載の高次抗原は、アッセイにおける主要組織適合遺伝子複合体(MHC)四量体の役割を置き換える。

30

【0190】

一実施形態では、本発明は、i)本明細書に記載の高次抗原を用いて、HCVに特異的な免疫細胞/B細胞を標識すること;ならびに、ii)標識された免疫細胞/B細胞をサイトメトリーで検出及び/または単離すること、を含む、HCVに特異的な免疫細胞/B細胞の検出及び/または単離のための方法を提供する。

【0191】

多様体への言及は、部分、誘導体、及び化学的アナログを含む。考えられる化学的アナログは、側鎖の修飾、合成中の非天然アミノ酸及び/またはそれらの誘導体の取り込み、ならびに、リンカーもしくはクロスリンカーまたはとりわけ、立体配座の制約を課す他の方法の使用を含む。

40

【0192】

本開示は、アセンブリ方法及びアセンブルした高次抗原の特徴の以下の非限定例で完了される。上述したように、本開示は、肝炎抗原及びHIVエンベロープ抗原を使用して説明されるが、本発明は、主題の方法を使用して産生された抗原に拡張して、抗原の抗原性及び免疫原性を増強するために低次抗原から高次オリゴマーを形成する。本明細書に記載されるように、高次抗原は、当該技術分野で既知の一連の技術を使用してさらに特性決定される。しかし、今日までの分析は、本明細書に記載の還元及びアセンブリ方法により生成された、アセンブルしたオリゴマーが、細胞内で産生された対照抗原には見られない抗体結合プロファイルを示し、それにより、本組成物が、これに基づき、先行技術の抗原と

50

区別することができることを示す。

【実施例】

【0193】

実施例1：発現ベクター及びプラスミド  
クローニング

HCV E2 123のDNA配列をC末端6×ヒスチジン(HIS)タグ(配列番号24)と融合させ、pcDNA3.1哺乳動物発現ベクター(Invitrogen)にクローニングした。Con1遺伝子型1b(G1b) 123(配列番号20)を、CSLによりクローニングした。H77c遺伝子型1a(G1a) 123(配列番号19)もまた、CSLによるが、独自のCSL改変pcDNA3.1ベクターにクローニングした。得られたH77c 123及びCon1 123を含有するプラスミドを、それぞれ、pcDNA-H77c 123-HIS及びpcDNA-Con1 123-HISと命名した。T4 DNAリガーゼを使用して、S52 G3a 123のDNA配列(配列番号21)をpcDNA3.1のNheI及びXbaI部位にライゲーションして、pcDNA-S52 123-HISを生成した。

10

【0194】

DNAの発現及び精製

ヒートショック法を使用して、pcDNA-Con1 123-HIS及びpcDNA-S52 123-HISをDH5 E. coliに形質転換し(Froger及びHall、2007)、次に、Luria-Bertani(LB)アンピシリン(100 µg/mL)アガープレート上で成長させた。単一のコロニーを、アンピシリン含有(100 µg/mLの)LBブロス中で培養し、製造者の推奨に従ってQIAGENプラスミドマキシプレップキットを使用して、DNAプラスミドを抽出した。クローン化プラスミドの良好なライゲーション及びスケールアップを確認するために、マキシプレップのpcDNA-Con1 123-HIS及びpcDNA-S52 123-HISを、それぞれ、NheI及びXhoI；ならびにNheI及びXbaI制限酵素で消化した。次に、得られた消化物をアガロースゲル電気泳動にかけ、Gel Doc XR+システム(Bio-Rad Laboratories)及びQuantity One 1-D分析ソフトウェア(Bio-Rad Laboratories)を使用して、ゲルを観察して、予想される制限パターンを確認した。さらに、BigDye Terminator v3.1化学を使用して、プラスミドを(Micromonにより)配列決定し、CLC Sequence Viewer(QIAGEN)及びFinchTV(Geospiza)を使用して、配列を解析した。

20

30

【0195】

実施例2：タンパク質発現及び精製  
一過性トランスフェクション。

ヒト胚腎臓293細胞株由来のFreeStyle293-F(FS293F)細胞(Invitrogen)を、1LのErlenmeyer細胞培養フラスコ(Corning)で150mL中 $1 \times 10^6$ 生細胞/mLで播種し、FreeStyle293(FS293)発現培地(Invitrogen)中で維持した。Steri-サイクルCO<sub>2</sub>インキュベーター(Thermo Electron Corporation)を使用して、4×相対遠心力(RCF)で回転するオービタルシェーカー上で、細胞を8%のCO<sub>2</sub>を伴う加湿雰囲気中37°Cでインキュベートした。表1に示される体積を使用して、製造者の使用説明書に従って、293fectinトランスフェクション試薬(Invitrogen)を使用して、FS293F細胞への、pcDNA-Con1 123-HIS及びpcDNA-S52 123-HISの一過性トランスフェクションを実施した。トランスフェクション後1日目に、100mLのFS293発現培地を添加し、総トランスフェクション容量を250mLに上げた。さらに、細胞培養物に、0.5%のルビンペプトン(Solabia Biotechnology)及び0.02%のPluronic F-68(Gibco)を補充した。トランスフェクション後3、5、及び7

40

50

日目に、半分の培地交換を実施し、それにより、 $300 \times RCF$ で5分間遠心分離することにより、細胞培養上清の半分(125 mL)を採取した。ペレット化された細胞を、125 mLの新しいFS293発現培地に再懸濁させ、さらに、0.5%のルビンペプトン及び0.02%のPluronic F-68を補充し、次に、細胞培養フラスコに戻した。最後に、トランスフェクション後9日目に、細胞培養上清(250 mL)の完全採取を実施した。回収した全ての上清を、 $15,344 \times RCF$ で30分間さらなる遠心分離にかけ、ペレットを廃棄して残留細胞及び細胞片を除去した。トリパンブルー染料排除法及び血球計を使用して、細胞計数を収集日ごとに実施して、細胞密度及び生存率を決定した。

#### 【0196】

##### アフィニティークロマトグラフィー

分泌されたHISタグ化123糖タンパク質を含有する細胞培養上清を、10 mL(すなわち、1カラム体積)のコバルト荷電TALON金属親和性樹脂(Clontech)に、室温(RT)のロッカーで2時間適用して、HISタグ付きタンパク質の結合を可能にした。ピーズを、5 mL/分の流速の洗浄緩衝液の20カラム体積(50 mMのリン酸ナトリウム、300 mMの塩化ナトリウム、pH 7.0)で2回洗浄し、1 mL/分の流速の5カラム体積の溶出緩衝液(50 mMのリン酸ナトリウム、300 mMの塩化ナトリウム、200 mMのイミダゾール、pH 7.0)で溶出した。30 kDaの分子量カットオフ(MWCO)を有するAmicon Ultra遠心分離フィルターユニット(Merck Millipore)を使用して、溶出液中に含有されるタンパク質を濃縮し、塩酸(HCl)を使用してpH 6.8に調整したリン酸緩衝食塩水(PBS、Gibco)(pH 6.8のPBS)で洗浄し、使用するまで4 で保存した。

#### 【0197】

##### 実施例3：ゲル濾過クロマトグラフィー

Akta高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)システム(GE Healthcare)を使用して、タンパク質を、Superdex 200 prep grade 16/600カラム(GE Healthcare)のゲル濾過クロマトグラフィーにかけた。ランニング緩衝液として濾過及び脱気されたpH 6.8のPBSを使用して、流出を流速0.5 mL/分で行った。所望のオリゴマー種を含有する画分をプールし、次に、10 kDaのMWCOを有するアミコンウルトラ遠心式フィルターユニットを使用して濃縮し、使用するまで、pH 6.8のPBSの中に保存した。1 cmの経路長を有するキュベットを使用する280 nm( $OD_{280}$ )の光学密度の分光光度法により、タンパク質濃度を決定し、以下の式を使用して、mg/mLで計算した。

吸光係数  $\times OD_{280}$  での吸光度

#### 【0198】

123のアミノ酸配列を使用して、吸光係数を決定した。以下の式を使用して、これを計算した。

分子量(Da) / ( (5690  $\times$  #トリプトファン) + (1280  $\times$  #チロシン) )

#### 【0199】

##### 実施例4：ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)

必要に応じて、還元条件下または非還元条件下で、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-PAGEを介してタンパク質を分析した。SDS-PAGEを還元させるために、2% (v/v)のβ-メルカプトエタノールを含有する1  $\times$  試料緩衝液中のタンパク質試料を100 で5分間加熱し、次に、広範囲SDS-PAGEスタンダード(Bio-Rad Laboratories)と共に12%のポリアクリルアミドゲルにロードした。1  $\times$  ランニング緩衝液(25 mMのTris塩基、192 mMのグリシン、0.1%のSDS、pH 8.3)中で垂直電気泳動装置(CLP)を使用して、電気泳動を180 Vで約1.5時間行った。4~12%ポリアクリルアミド勾配ゲルを用い、且つ試料緩衝液中にβ-メルカプトエタノールを含まない以外は、非還元SDS-PAGEを同様に実施した。ゲルを0.25% (v/v)のクマシーブリリアントブルーR-250(Bio-Rad

10

20

30

40

50

Laboratories)、10%(v/v)の酢酸、及び50%(v/v)のメタノールで染色し、次に、10%(v/v)の酢酸及び50%(v/v)のメタノールで脱色し、Odyssey赤外線イメージングシステム(LI-COR)を使用して、スキャンした。Odysseyシステムを使用して、バンド強度を定量した。

#### 【0200】

##### 実施例5：抗体

モノクローナル抗体(MAb)AR3A、AR3B、AR3C、及びAR3Dは、The Scripps Research Institute(Law et al., 2008)のMansun Law博士からの親切な贈物であった。CBH-4B、CBH-4D、HC-11、及びHCV-1は、Stanford大学のSteven Founong博士からの親切な贈物であった。H52及びH53は、Jean Dubuisson博士及びHarry Greenberg博士の親切な贈物であった。MAb1、7、10、12、16、20、24、及び60を、CSL Ltdと共同で発明者らの研究室で生成した(表2)。好適な抗体パネルは、文献、例えば、Keck et al. PLoS Pathogens: 8(4)e1002653, April 2012に記載される。また、抗体2A12は、天然対照オリゴマーHCV E2と比較して、アセンブルしたE2との結合の低下を示した。抗体パネル及びそれらをどのように生成するかは、参照により本明細書に組み込まれるViethier P. et al. Hepatology: 65(4), 1117-1131, 2017、ならびに、参考文献5、33~36、17、及び37、ならびに出版者から入手可能な補足資料などの本明細書で参照された参考文献に記載される。

10

20

#### 【0201】

##### 実施例6：酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

##### サンドイッチELISA。

良好なタンパク質発現及び精製を確認するために、Maxisorb平底96ウェルプレート(Nunc)を使用して、サンドイッチELISAを実施した。ウェルを、pH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液50mM中の5µg/mLの二量体マルトース結合タンパク質(MBP)-CD81-LEL<sup>113-201</sup>でコーティングし、次に、4で一晩インキュベートした。このステップ及びその後の洗浄ステップで、0.05%のTween 20を含有するPBS(PBST)中でプレートを4回洗浄し、次に、PBS中10mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA, Sigma-Aldrich)(BSA10PBS)で1時間室温でブロックした。洗浄後、5mg/mLのBSAを含有するPBST(BSA5PBST)中で、組織培養上清の半対数段階希釈を実施し、続いて、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、BSA5PBST中のウサギ抗6xHISエピトープタグ抗体(Rockland Immunochemicals)の単一希釈物を添加し、室温で1時間インキュベートした。洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ免疫グロブリン(Dako)の単一希釈物を添加した。洗浄後、製造者の使用説明書に従って、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質(Sigma-Aldrich)を使用して、ELISAの発色を実施し、反応物を1MのHClで停止させた。最後に、Multiskan Ascentマイクロプレートリーダー(Thermo Electron Corporation)を使用して、光学濃度を450nmで測定した。

30

40

#### 【0202】

##### 単一希釈点評価及び直接ELISA。

実施例5/表2に記載の抗体パネルなどの当該技術分野で既知の抗体のパネルに対する123の反応性を評価するために、単一希釈点評価を最初に実施し、それにより、Maxisorb平底96ウェルプレートを5µg/mLの単量体123で直接コーティングし、次に、4で一晩インキュベートした。BSA10PBSで洗浄及びブロッキングした後、一次抗体の単一希釈物、続いて、洗浄しながら二次抗体(Dako)を添加し、各添加の間は室温で1時間インキュベーションした。サンドイッチELISAのために、

50

上記のように、プレートを発色させて測定した。直接ELISAを同じ方法で実施したが、必要に応じて、ウェルを $2\mu\text{g}/\text{mL}$ の単量体 123または $5\mu\text{g}$ のHMW 123のいずれかでコーティングし、一次抗体をBSA5PBSTの半対数段階希釈にかけた。

#### 【0203】

実施例7：タンパク質還元及びリフォールディング

小規模還元

タンパク質還元で使用される最適DTT (Pierce)濃度を決定するために、Maxisorb平底96ウェルプレートを、 $\text{pH}9.6$ の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液 $50\text{mM}$ 中の $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の単量体H77C 123でコーティングし、RTで最低2時間インキュベートした。PBSTで4回洗浄した後、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中で調製された異なる濃度のDTT ( $0\sim 10\text{mM}$ )を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。次に、プレートを直ちにPBSTで6回洗浄して、DTTを除去し、続いて、BSA10PBSTでブロックした。実施例6に記載のように、抗HIS、H53、及びR04を含む一次抗体、続いて、適切な二次抗体を添加した。最後に、結合抗体を、実施例6に記載されるように、検出及び測定した。還元剤としてTCEPを使用して、同じ実験を繰り返した。

10

#### 【0204】

溶液中のDTTを用いる還元及びリフォールディング

炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中で調製したH77c 123単量体を、異なる条件(表3)下でDTT還元をかけ、最適なHMW 123形成のための要件を決定した。タンパク質のリフォールディングは徐々に希釈することにより行われた。 $\text{pH}6.8$ のPBSを最初の試料量の半分である一定量で3回段階的に添加することにより、これを達成した。例えば、 $\text{pH}6.8$ のPBS  $4\times 200\mu\text{L}$ を、 $400\mu\text{L}$ の試料に添加する。各添加後、室温で15分間インキュベートした。 $10\text{kDa}$ のMWC0を有するAmicon Ultra遠心フィルターユニットを使用して、DTTを除去し、続いて、 $\text{pH}6.8$ のPBS中で2回すすいだ。次に、リフォールディングしたタンパク質を、実施例4に記載のように非還元SDS-PAGEにより分析した。実施例3に記載されるように、多量体が良好に形成され、且つゲル濾過クロマトグラフィーにより分析された場合、より大規模なリフォールディングが行われた。

20

30

#### 【0205】

酸化還元シャフリングシステムを使用する還元及びリフォールディング

1:5の比の酸化L-グルタチオン(GSSG、Pierce)対還元L-グルタチオン(GSH、Pierce)を、炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中で調製されたH77c 123単量体に添加し、異なる条件(表4)を調べた。実施例7に記載されるように、L-グルタチオンを除去することにより反応を停止させ、次に、リフォールディングしたタンパク質を分析した。実施例3に記載されるように、多量体が良好に形成され、且つゲル濾過クロマトグラフィーにより分析された場合、より大規模なリフォールディングが行われた。

40

#### 【0206】

ビスマレイミドエタン(BMOE)を用いるトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)還元タンパク質の架橋

異なる濃度のTCEPを、異なる濃度の $\text{pH}6.8$ のPBS中で調製されたH77c 123単量体に添加し(表5)、 $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートした。次に、使用直前にジメチルスルホキシド(Sigma)に溶解させたBMOE(Sigma)を、 $0.2\text{mM}$ の最終濃度まで添加し、製造者の指示に従って、RTで1時間インキュベートした。実施例7に記載されるように、BMOE及びTCEPを除去することにより、反応を停止させ、次に、リフォールディングしたタンパク質を分析した。

#### 【0207】

実施例8：123の産生

50

H77c株、Con1株、及びS52株由来の123のDNA配列を、pcDNA3.1系ベクターに組み込み、以下のプラスミド：pcDNA-H77c123-HIS、pcDNA-Con1123-HIS、及びpcDNA-S52123-HISを生じさせた。これらのプラスミドは、アガロースゲル電気泳動で予想される制限パターンを示し、H77c、Con1、及びS52123インサートを表すバンドは全て、それぞれ、762、759、及び710bpの予想された長さに相当する(図1)。H77c123を独自のCSL改変pcDNA3.1ベクターにクローニングして、それぞれ同じ水平位置に移動したCon1及びS52を含有する標準Invitrogenベクターと比較して、観察されたより大きなベクターサイズを説明する(図1)。

#### 【0208】

哺乳動物FS293F細胞への、Con1及びS52123プラスミドの一過性トランスフェクションを実施して、123糖タンパク質を産生した。細胞を流体力学的な力から保護するPluronic F-68、及び成長効率を高めるためのルピナスペプトンが補充されたFS293発現培地中、懸濁状態で、細胞を維持した。細胞を $1 \times 10^6$ 生細胞/mLで播種し、トランスフェクション後0~9日目に、細胞生存率を約90%に維持した。123糖タンパク質の良好な発現を確認するために、細胞培養上清を、サンドイッチELISAにより分析した(図2A~B)。トランスフェクション後の3、5、7、及び9日目に採取した上清の半対数段階希釈物を、二量体MBP-CD81-LEL<sup>113-201</sup>でコーティングされた酵素免疫アッセイプレートに塗布し、捕捉された123糖タンパク質を、ウサギ抗his抗体及びHRPコンジュゲートヤギ抗ウサギ免疫グロブリンで検出した。最初のウェルに $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の単量体H77c123は、陽性対照として役立つが、最初のウェルで1/2に希釈したHIVエンベロープタンパク質gp140含有上清は、陰性対照として役立つ。全ての細胞培養上清は、CD81との陽性結合を示し、上清中の123糖タンパク質の存在、それによる、良好なタンパク質発現を示す。さらに、細胞培養上清を表す曲線は、陽性対照より上に現れ、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ を超える123糖タンパク質-Con1及びS52の場合、それぞれ、およそ $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の収率を示した。光学密度(OD)値は、5日目及び7日目で実施された採取について最も高く、タンパク質発現がこれらの中間時点で幾分より効率的であったことが示唆された。S52123トランスフェクションからの上清は、Con1123のものと比較して、より高いレベルのCD81結合を実証し、S52株の場合、より効率的なタンパク質発現が示唆されたこと、またはS52123が、CD81に対してより強い親和性を有することも認められていた。

#### 【0209】

細胞培養上清から123糖タンパク質を単離するために、コバルトを充填したセファロースマトリックスであるTALONビーズを使用して、アフィニティークロマトグラフィーを実施し、これは、従来のニッケル親和性支持体よりも高い特異性でhisタグ化タンパク質と効率的に結合する。タンパク質精製の有効性も、細胞培養上清について行われたのと同じ方法で、サンドイッチELISAで分析した(図2C~D)。溶出液を3つの別々の画分に順次収集し、最初の画分に溶出されたタンパク質は、精製前の上清と同様のレベルのCD81結合を示し、画分1が大部分の123糖タンパク質を含有したことが示された。画分2で溶出されたタンパク質は、CD81結合の減少を示し、より少ない量の123が存在したことが示されたが、画分3のものは、ごくわずかなCD81結合を示し、HIV gp140陰性対照と位置合わせされた曲線を生成した。精製後の上清(すなわち、フロースルー)及びS52123精製の洗浄液は、陽性対照と結合するCD81とほぼ同程度のレベルを示したが、Con1123のものに対して低いレベルが観察され、Con1123精製がより効果的に実施されたことが示された。

#### 【0210】

実施例9：123発現プロファイル

ゲル濾過クロマトグラフィーによりアフィニティークロマトグラフィーで精製されたH77c123の発現の分析前の株由来の123のDNA配列は、H77c123が異なるサイズの種の領

10

20

30

40

50

域として存在することを明らかにした(図3A)。これらは、それぞれ、46、97、239、及び2402kDaの分子質量を有する単量体、二量体、HMW2、及びHMW1123から成り、抗原性及び免疫原性が変化する(H. Drummer、未発表データ)。HMW種は、bNAbを誘導することができるが、単量体は、型特異的NAbを誘導する(H. Drummer、未発表データ)。しかし、H77c123のFS293F細胞への安定なトランスフェクション(本プロジェクトの開始前にDr. Rob J Centerで実施された)から生じた123の23.13%のみが、モノマーの場合の64.90%と比較して、HMW形態のものであった(図3A及び表6)。

#### 【0211】

任意の遺伝子型からの123は、E2の最も保存された領域を含むので、bNAbを同様に引き出すことができるはずである。しかし、WT E2及び123の発現プロファイルは、異なる遺伝子型間で変動するであろう。Con1123及び/またはS52123が、より高収率のHMW種を発現するかどうかを判定するために、FS293F細胞への一過性トランスフェクションからのアフィニティー精製された123糖タンパク質を、AKTA FPLCシステムを使用するSuperdex200 prep grade 16/600カラムでのゲル濾過クロマトグラフィーにより分析した。UNICORNソフトウェアを使用して、ピーク下面積を定量すると、Con1(図3B)及びS52(図3C)株の両方が実際に、より高い収率のHMW123を生じ、H77cの23.13%と比較して、HMW形態(組み合わせたHMW1及びHMW2)の、生成された全123糖タンパク質の46.02%(Con1)及び44.88%(S52)であったことが明らかにされた。(表6)。

#### 【0212】

これらの結果の再現性を評価するために、一過性トランスフェクション及び123の精製を繰り返し、ゲル濾過クロマトグラフィーを再度実施して、123発現を分析した。第2ラウンドでは、y軸の目盛りで示されるように、Con1123の発現レベルは、ラウンド1のもののおよそ2倍であったが、S52123の発現レベルは、比較的安定したままであった(図3D~E)。発現レベルの変動にもかかわらず、Con1及びS52123の発現プロファイルは、ラウンド1及びラウンド2の両方に対して類似したままであったことに留意することが重要であった。H77cと比較して、HMW123の収率の改善が再び観察され、第2ラウンドで生成されたHMW種は、同様の割合であり、Con1が46.98%、S52が41.56%であった(表6)。

#### 【0213】

ゲル濾過分画された123糖タンパク質をSDS-PAGEで分析した。5~12%のポリアクリルアミド勾配ゲル上での非還元SDS-PAGEは、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を補強し、123が種々のジスルフィド結合オリゴマー形態として存在することを再度実証し、バンド強度と分子量の反比例関係を示した(図4A~B)。さらに、ジスルフィド結合を破壊する還元剤であるβ-メルカプトエタノールを使用して、還元SDS-PAGE分析を12%のアクリルアミドゲル上で行った。β-メルカプトエタノールは、順次、疎水性接触も破壊する、結果により、ジスルフィドがβ-メルカプトエタノールにより開裂されると、全てが単量体として移動するので、ジスルフィド結合は、高次構造の形成及び安定化に不可欠であることが明らかにされる(図4C~D)。疎水性相互作用は、高次種の形成に寄与し得る。

#### 【0214】

これらのデータにより、Con1及びS52株は実際に、H77cと比較して、高収率のHMW123を発現することが明らかにされ、HMW123産生を改善する1つの可能な方法を実証する。

#### 【0215】

実施例10: HMW123の抗原特性決定

Con1及びS52株により生成されたHMW123が、H77cのものの抗原性パターンを反復するかどうかを評価するために、3つの株全てのゲル濾過分画単量体及びH

10

20

30

40

50

MW1 123を、ELISAフォーマットで立体配座感受性及び非感受性MAbのパネルに対して試験した(図5A)。迅速試験として単一希釈点評価(図5B)を最初に実施して、H77cの123ならびにCon1及びS52の一方または両方に対して、どのMAbが陽性反応性を示すかを判定し、それにより、株間の抗原性を比較することが可能になった。この基準を満たすMAbを直接ELISAでさらに試験し、それにより、MAbの半対数段階希釈物を、単量体及びHMW1 123で別々にコーティングされた酵素免疫アッセイプレートに塗布し、続いて、適切なHRPコンジュゲート二次抗体で検出した。次に、各結合曲線の間点を比較することにより、最大光学濃度値の半分とされた、HMW1 123に対する各MAbの相対結合を計算した(表7)。

#### 【0216】

単一希釈点評価は、立体配座感受性マウスH53及びMAb1、7、12、16、及び20が全て、H77c 123に対して陽性反応性を示したが、Con1及びS52 123に対してごくわずかな反応性が実証され、これらのMAbsの標的エピトープを認識できないようにし、且つこれらのMAbが型特異的であるように、これらの2つの株のエピトープの完全性を変更したことが示された。この反対は、Con1及びS52 123に対する陽性反応性があるが、H77cに対してはない場合、立体配座感受性ヒトAR3Aにより示された(図5B)。

#### 【0217】

直接ELISAでさらに試験された11のMAbのうちの、8つ(AR3B、AR3C、AR3D、CBH-4B、CBH-4D、HC-11、MAb10、及び60)は、単量体形態(表7)と比較した時、123のHMW形態との結合の低下を示し、標的エピトープがより閉じ込められていたことが示された。マウスH52のみが、3つの株全てに対して、HMW1 123と結合する能力の著しい増強を実証し(表7)、残基C652へのアクセスの改善が示唆された。

#### 【0218】

各MAbがHMW形態のCon1及びS52に結合する能力を、H77cのものと比較する時、試験された11のMAbのうち5つ(HCV1、AR3B、AR3C、CBH-4D、HC-11)は、増加したまたは同等の結合レベルを示した。さらに、結合の増加が、AR3D及びH52により実証されたが、Con1 123に対してのみであり、一方、MAb10及び24は、両方の株に対して結合のレベルの低下を示した(表7)。

#### 【0219】

実施例11: TCEP及びBMOEを使用した123の還元及びリフォールディング  
単量体123を部分的に還元して、遊離スルフヒドリルを生じ、続いて、これらのスルフヒドリルを、多量体形成を媒介することになる分子間ジスルフィド結合に再共役させることにより、123単量体を単量体にリフォールディングする能力を評価した。

#### 【0220】

スルフヒドリルを含まない還元剤であるTCEPを使用した123の小規模還元を迅速試験として試行して、123の部分還元に必要なTCEPの最適濃度を決定した(図6)。酵素イムノアッセイプレート上にコーティングされた単量体H77c 123を、異なる濃度のTCEP(0~500mM)に37で30分間曝露させ、還元が起こる時間を与えることにより、これを実行した。TCEP還元から生じる構造変化の程度を判定するために、立体構造依存性マウスH53抗体の単一希釈物をプレートに塗布し、結合をHRPコンジュゲート抗マウス抗体で検出した。10~500mMのTCEPで処理されたH77c 123は、H53との結合が漸進的に低下し、全ての光学密度値は、R04陰性対照(ヒトサイトメガロウイルスに対するヒトMAb)のものよりも大きかった。これらの結果は、H53認識がある程度保持されているため、123の立体配座が完全には破壊されていないことを示し、部分還元が達成され、且つ還元がTCEP濃度の増加と共に漸進的に増加したことが示される。さらに、陽性抗HIS結合は、異なる濃度のTCEPの存在下で一貫して起こり、結合123の喪失がH53結合の低下の原因となり得る可能性が排除された。123立体配座の保持は、123の抗原性及び免疫原性特性

10

20

30

40

50

を保持し、且つHMW 123への後続の再形成を可能にするために必要と考えられたので、10~200mMのTCPE濃度がさらなるタンパク質還元実験に適していたことが判定された。

#### 【0221】

酵素イムノアッセイプレート結合タンパク質における還元は、多数の試薬濃度の迅速な試験を可能にする。しかし、潜在的なワクチン生成の点から、溶液中の還元がより適切である。従って、TCPEは、6~8の範囲のpHで最も効果的であるので、H77c 123単量体を、pH6.8のPBS中で調製した。最初に存在する異なる量のタンパク質が、単量体のHMW形態への変換効率に影響を与えるかどうかを調べるために、種々の濃度の123も調製した。次に、従前の小規模還元実験により導かれた濃度で、TCPEを添加した。続いて、部分還元された123単量体をHMW 123に変換するために、還元後に、タンパク質リフォールディング、ジスルフィド再形成、及びリシャフリングを伴うプロセスが続いた。6.5~7.5のpH範囲で遊離スルフィドリルと共にチオエーテル結合を形成する、短いホモ二官能性マレイミド架橋剤BMOEの添加により、これを促進した。その結果、スルフィドリル基が共役され、それにより、ジスルフィド再形成を再現する。また、TCPEは、スルフィドリルを含まず、それにより、スルフィドリル反応性BMOE架橋剤と組み合わせて使用するのに適切であり、この実験では還元剤としてTCPEの使用が正当化される。

10

#### 【0222】

リフォールディングした123糖タンパク質を非還元SDS-PAGEで分析した(図6B)。全ての試料は、単量体対照及びモック対照と同様の移動パターンを示し、さらに、これを、TCPE及びBMOEの不存在下であったが、還元及びリフォールディング手順にかけた(図6B及び表8のレーン7)。HMW 123対照のバンドと位置合わせしたバンドはなく、TCPE還元及びBMOEを使用したリフォールディングが、単量体123をHMW 123に変換するのに失敗したことが明らかにされた。

20

#### 【0223】

実施例12：酸化還元シャフリングシステムを使用した還元及びリフォールディング

酸化還元シャフリングシステムを利用して、還元されたスルフィドリル間の酸化を促進し、それにより、還元及びリフォールディングを、還元剤(GSH)及び酸化剤(GSSG)の両方の存在下で同時に行った。高pH環境が、それぞれ、GSH及びGSSGの還元能力及び酸化能力を促進するので、pH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液中でH77c 123単量体を調製することにより、これを実施した。凝集効率に対するタンパク質濃度の影響を調べるために、H77c 123単量体も種々の濃度で調製した(表9)。次に、2mMのGSH及び0.4mMのGSSGの最終濃度と等しい5GSH:1GSSGの比を添加し、これらは、市販のタンパク質リフォールディングキットで通常使用される濃度であり、90%を超えるタンパク質をリフォールディングすると報告されている(Thermo Fisher Scientificにより提供される情報)。次に、これら123試料を37で種々の時間インキュベートして(表9)、この直後に、pH6.8のPBSで50倍希釈し、遠心フィルターユニットを使用してグルタチオンを除去して、反応を停止させた。

30

40

#### 【0224】

123試料を非還元SDS-PAGEで分析し(図7A)、これにより、二量体バンドの出現及び二量体よりもサイズが大きい高次構造の存在により示されるように、単量体123の二量体123及び高次種への良好なリフォールディングが明らかにされた。単量体対照及びモック対照はそれぞれ、予想通りに、単量体123のサイズに対応するバンドを生成した。しかし、モック対照に対し、かすかな二量体バンドが観察された(図7Aのレーン1)。これは、単量体123のゲル濾過プロファイルと一致しており(図7B)、これは、少量の混入二量体123も示した。未処理123単量体を4で蓋付きチューブ中に予め保存していたので、二量体の検出は、空気またはより高温への曝露の結果としての自発的タンパク質凝集も示唆し得る。さらに、ゲルにロードする前に試料

50

をボイルすると、凝集を促進することができる。L I - C O R O d y s s e y システムを使用して単量体及び二量体バンドのデンシトメトリーを定量すると、モック対照は、二量体の 4 . 6 5 倍多い単量体を含有することが示された。1  $\mu$  g /  $\mu$  L の単量体 1 2 3 をグルタチオンで処理された時、大部分の単量体は高次種にリフォールディングすることができず、単量体は、モック対照に対して記録された量より多かった二量体の 6 . 8 9 倍多い。対照的に、より高濃度 ( 5 及び 1 0  $\mu$  g /  $\mu$  L ) を使用すると、多くの二量体形成がもたらされ、多量のタンパク質の存在下でのリフォールディングが 1 2 3 凝集効率を増強したことが示された。インキュベーション時間を 2 時間から 2 4 時間に増加させると、図 7 A の条件 3 及び 5 を並置することにより実証された、より多くの二量体の形成が誘導された。試験された全ての条件のうち、1 0  $\mu$  g /  $\mu$  L の単量体 1 2 3 を 2 4 時間グルタチオン処理にかけた時、単量体から二量体への変換が最も効率的であった。それ故、これらの条件を利用する実験のスケールアップした反復を実施し、ゲル濾過クロマトグラフィで分析した。

10

#### 【 0 2 2 5 】

反復実験の 1 2 3 のゲル濾過プロファイルは、非還元 S D S - P A G E からの結果 ( 図 7 A ) と一致する単量体及び二量体のピークを示した ( 図 7 C ) 。二量体ピーク上のシヨルダーも観察され、高次種の一部の形成が示された。U N I C O R N ソフトウェアを使用する曲線下面積の定量により、ほぼ半分の 1 2 3 単量体が、多量体にリフォールディングして、二量体が大部分のタンパク質を含むことが明らかにされた ( 表 1 0 ) 。全体として、これらの結果は、酸化還元シャフリングシステムの使用が実際に、グルタチオン還元 1 2 3 単量体間の分子間ジスルフィド結合形成をもたらすことを実証した。主に、これらの実験は、二量体の形成をもたらした。

20

#### 【 0 2 2 6 】

実施例 1 3 : ジチオスレイトール ( D T T ) を使用する還元及び徐々に希釈することによるリフォールディング

1 2 3 凝集についての本発明者らの研究を拡大するために、異なる還元剤及びリフォールディング技術 : それぞれ、D T T 及び徐々に希釈することを用いた。T C E P と同様に、E L I S A フォーマットにおける 1 2 3 の小規模 D T T 還元を最初に試行して、1 2 3 の部分還元を達成するのに必要な最適 D T T 濃度を決定した ( 図 8 A ) 。酵素免疫アッセイプレート上にコーティングされた H 7 7 c 1 2 3 単量体を、異なる濃度の D T T ( 0 ~ 1 0 m M ) に、3 7 ° C で 3 0 分間曝露することにより、これを実行した。次に、プレートを洗浄して D T T を除去し、それにより、さらなる還元を停止させ、続いて、ブロッキングし、一次抗体 ( 抗 H I S 、 H 5 3 、 及び R 0 4 ) を添加し、適切な H R P コンジュゲート二次抗体で検出した。2 m M を超える D T T を用いて、1 2 3 のほぼ完全な還元を達成した。0 . 1 ~ 1 . 0 m M の D T T で処理された 1 2 3 は、H 5 3 結合の漸進的低下を示し、これらの濃度をその後の D T T 還元実験でさらに調べた。均一な抗 H I S 結合が全ての D T T 濃度で観察され、H 5 3 結合の低下の要因としての結合 1 2 3 の喪失が排除された。

30

#### 【 0 2 2 7 】

次に、溶液中の D T T 還元を調査し、それにより、種々の濃度の H 7 7 C 1 2 3 単量体 ( 表 1 1 ) を、p H 9 . 6 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液中で調製し、D T T に曝露した。D T T は、7 を超える p H で還元能力を保持する。還元されたスルフィドは最終的に、還元剤の不存在下で自発的酸化を受け、ジスルフィド結合の再形成がもたらされる。このプロセスを可能にするために、続いて、還元された 1 2 3 糖タンパク質を、徐々に希釈することによるリフォールディングにかけた。徐々に希釈することは、p H 6 . 8 の P B S を 1 2 3 試料に段階的に添加することを含む。さらに、この手順は、p H 環境を徐々に中和することにより D T T を希釈し、その活性を減弱させ、それにより、スルフィドの酸化を促進する。

40

#### 【 0 2 2 8 】

リフォールディングした 1 2 3 糖タンパク質を非還元 S D S - P A G E で分析した (

50

図 8 B )。二量体バンドが単量体対照において観察されなかったので、モック対照は、予想通りの単量体バンド、及び二量体またはおそらく自発的タンパク質凝集を含む低レベルの混入物を示す二量体 1 2 3 に対応するおよそ 1 0 0 k D a のかすかなバンドを生じた。単量体及び二量体バンドのデンストメトリーを定量すると、モック対照が二量体タンパク質の 3 . 4 1 倍多い単量体タンパク質を含有することが示された ( 図 8 B 及び表 1 1 のレーン 1 )。全ての試験条件下で還元及びリフォールディングを受けた 1 2 3 試料に対して増加した量のオリゴマーが記録され ( 図 8 B )、成功した分子間ジスルフィド結合形成の結果として、1 2 3 単量体の割合が実際に多量体に変換されたことが明らかにされた。D T T 添加後 3 0 分間インキュベートされた試料に対して、単量体対二量体の比の有意な低下が記録され、これは、二量体タンパク質の 2 倍未満多い単量体をもたらした。2 時間以上のインキュベーションは、3 0 分のインキュベーションと比較して、より多量体形成を生じさせなかったもので、インキュベーション時間を延長したが、1 2 3 凝集を増強することはできなかった。グルタチオン処理からの結果とは対照的に、1  $\mu$  g /  $\mu$  L の単量体 1 2 3 を D T T で処理した時、低い単量体対二量体の比が記録された。1  $\mu$  g /  $\mu$  L の単量体 1 2 3 を 0 . 1 m M の D T T で 3 0 分間処理した時、1 . 3 3 の最低値が記録され ( 図 8 B 及び表 1 1 のレーン 1 1 )、これらの条件を使用する二量体への変換が最も効率的であることが示された。1  $\mu$  g /  $\mu$  L の単量体 1 2 3 を 1 m M の D T T で 3 0 分間処理した時、高次種の形成は、非還元 S D S - P A G E で最も明白であった ( 図 8 B のレーン 9 )。

10

#### 【 0 2 2 9 】

20

多量体形成のための最適条件 ( 3 0 分間、1 m M D T T ) を使用して、スケールアップした反復実験を実施した。次に、リフォールディングした 1 2 3 糖タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーで分析して、非還元 S D S - P A G E での観察を補強し、生成されたオリゴマー種のそれぞれについて、より正確な測定値を得た ( 図 8 C ~ D )。D T T 処理後の単量体ピークの保持により示されるように、単量体の割合は、影響を受けなかった。ゲル濾過プロファイルは、少量のタンパク質が二量体 1 2 3 に対応する領域内に溶出したので、二量体 1 2 3 の一部の形成も示し、これは、処理前のゲル濾過プロファイルのものよりも顕著である。最も重要なことには、H M W 2 1 2 3 について観察された溶出時間と同様に、2 0 0 k D a を超えるサイズに対応する広いピークがおよそ 5 9 分で溶出し、より大きな多量体への良好な 1 2 3 凝集が確認された。ピーク下面積を定量すると、およそ 5 分の 1 の単量体が H M W 1 2 3 に凝集したことが明らかにされた。単量体 1 2 3 を H M W 1 2 3 に変換するために用いられた 3 つの方法のうち、D T T 還元、続いて、徐々に希釈することが最も効果的であった。

30

#### 【 0 2 3 0 】

実施例 1 4 : リフォールディング D T T 処理 1 2 3 から生じた生成物のサイズの分析

以下のプロトコールを使用して、リフォールディング D T T 処理 1 2 3 から生じた生成物のサイズを分析した。

物質 :

単量体 1 2 3

p H 9 . 6 の炭酸水素塩緩衝液

ジチオトレイトール ( D T T )

p H 6 . 8 のリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S )

40

#### 【 0 2 3 1 】

単量体 1 2 3 を還元させるために、1 m L の単量体 1 2 3 を、炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液中で 5 m L の黄色の蓋付きチューブ中で 1 m L の総体積に調製した。プロテアーゼ阻害剤の存在下でリフォールディングする場合、5  $\mu$  g / m L のアプロチニン、8  $\mu$  g / m L のロイペプチン、及び 5  $\mu$  M のキフェネンシンも添加した。D T T を M i l l i - Q 水に溶解させ、0 . 3 m M の最終濃度 ( すなわち、1 0 0 m M の D T T 3  $\mu$  L ) でチューブに添加した。次に、混合物を 3 7 ° C で 3 0 分間インキュベートした。2 回の D T T 処理の場合、インキュベーション後、1 0 0 m M の D T T 3  $\mu$  L をチューブに添加し、混合物を

50

37 で30分間インキュベートした。3回のDTT処理の場合、2回目のインキュベーション後、100mMのDTT 3 $\mu$ Lをチューブに添加し、混合物を37 で30分間再度インキュベートした。

【0232】

リフォールディングのために、0.5mLのPBSを添加し、タンパク質を室温で15分間インキュベートした。このステップを3回繰り返した。Amicon Ultra遠心フィルターユニット(10kのMWCO)を使用することによりDTTを除去し、タンパク質をPBS中で2回すすいだ。

【0233】

サイズ分析のために、タンパク質は、1.5mLのエッペンドルフチューブに移し、13,000rpm、4 で10分間遠心分離した。次に、16/600 Superdex 200 prep gradeカラムを使用して、ゲル濾過クロマトグラフィーを実施した。

【0234】

DTT処理により、単量体 123が高次種にリフォールディングし、59分及び54分の溶出時間でピークを形成し得ることが明らかにされた(図10)。DTT処理数を増加させると、1ヒットで観察された59分の溶出時間から、2または3ヒット後の54分までのHMW様ピークの左へのシフトがもたらされた(図10)。一方で、単量体ピークについて、1、2、及び3ヒット(複数可)に対してそれぞれ77~76~75の溶出時間からの右へのわずかなシフトが観察された。プロテアーゼ阻害剤を添加すると、75分

【0235】

残りのリフォールディングしていない単量体タンパク質がリフォールディングすることが可能かどうかを検討するために、2回のDDT処理で処理され、且つAmicon Ultra遠心式フィルターユニット(10KのMWCO)を使用して濃縮された、上記の実施例の残りの単量体種(プールされたゲル濾過画分72~81)を収集した。試料を上記のようにDTTで2回再処理し、リフォールディングを実施し、タンパク質をサイズ分析にかけた。

【0236】

リフォールディングしていない単量体 123をリフォールディングすると(図11、上の実施例)、37%の二量体形成及びわずかなHMW様形成がもたらされたが、63%は単量体として残り、123単量体の分集団のリフォールディングが困難であることが示された。単量体ピークの右への比較的短いピークの形成も認められた。しかし、プロテアーゼ阻害剤の存在下でリフォールディングさせると、このピークのサイズに減少をもたらした。

【0237】

結果は、本発明の方法を使用して少なくとも60~70%のオリゴマー(100MWまたは200MWを超える)の収率が生じ得ることを実証している。

【0238】

実施例15: DTT処理 123及びALA7 123の抗原性の特性決定

以下のプロトコールを使用して、下記の抗体のパネルを使用して、DTT処理 123及びALA7 123の抗原性を比較した。

物質:

試薬:

pH 9.4の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液

ELISA洗浄液(PBST)

ELISA過酸化水素ブロック(BSA10PBS)

ELISA希釈剤(BSA5PBST)

10

20

30

40

50

クエン酸リン酸緩衝液； 3, 3, 5, 5 - テトラメチルベンジジン ( T M B )

塩酸 ( H C l )

タンパク質：

H M W 1 1 2 3

リフォールディング前の単量体 1 2 3

リフォールディング耐性 1 2 3

リフォールディングした多量体 1 2 3

リフォールディング前の単量体 A L A 7 1 2 3

リフォールディング耐性 A L A 7 1 2 3

リフォールディングした多量体 A L A 7 1 2 3

B S A

抗体：

一次抗体 A R 3 C、C B H 4 G、H C 8 4 . 2 7、H C V 1

二次抗体抗ヒト H R P コンジュゲート

【 0 2 3 9 】

N u n c M a x i s o r p 平底 9 6 ウェルプレートを、p H 9 . 6 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 5 0 m M 中で調製した 5 μ g / m L の上記のタンパク質でコーティングし、4 で一晩 ( 一晩 ) インキュベートした。翌日、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、1 0 0 μ L / ウェルの B S A 1 0 P B S で室温で 1 時間ブロックした。次に、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、資料中に列挙された 1 ° 抗体の半対数段階希釈を行い、室温で 1 時間インキュベートした。次に、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、資料に記載される 2 ° 抗体を 5 0 μ L / ウェル加え、室温で 1 時間インキュベートした。次に、プレートを P B S T で 4 回洗浄し、1 0 0 μ L / ウェルの T M B で発色させ、続いて、5 0 μ L / ウェルの H C l を添加した。結果は、図 9 に示す通りである。リフォールディングした 1 2 3 は、単量体 1 2 3 対照及びリフォールディング耐性 1 2 3 対照と比較して、A R 3 C 及び C B H 4 G との結合を低下させており、H M W 1 2 3 に特有のプロファイルである、標的エピトープがリフォールディングした 1 2 3 中に、より閉じ込められていたことが示された。リフォールディングした A L A 7 1 2 3 は、単量体 A L A 7 1 2 3 対照及びリフォールディング耐性 A L A 7 1 2 3 対照と比較して、A R 3 C 及び C B H 4 G との結合を低下させており、高分子量形態のタンパク質に特有のプロファイルである、標的エピトープがリフォールディングした A L A 7 1 2 3 中に、より閉じ込められていたことが示された。リフォールディングした 1 2 3 及びリフォールディングした A L A 7 1 2 3 に対する C B H 4 G の反応性の減少により、非中和エピトープが天然 H M W 物質中よりも、リフォールディングした物質中に閉じ込められていることが示され得る。非中和抗体応答の発生が抑制される可能性があるため、これは、リフォールディングした物質が免疫原として使用される時、利点を提供し得る。

【 0 2 4 0 】

実施例 1 6 : リフォールディング実験

上記で行ったさらなるリフォールディング実験の結果は、表 1 3 及び 1 4 にまとめられる。

【 0 2 4 1 】

要約すれば、アフィニティー精製された 1 2 3 のゲル濾過クロマトグラフィーにより、優勢な単量体形態に加えて、ジスルフィド結合二量体及び高次 H M W 多量体の不均一混合物の存在が明らかになる。H M W 1 2 3 は、魅力的なワクチン候補である。しかし、H M W 形態の 1 2 3 の魅力は、比較的低い発現収率及び混入タンパク質の存在により幾分弱められる。ワクチン製造に有益であると思われる H M W 1 2 3 産生の収率を改善するいくつかの方法を調べた。

【 0 2 4 2 】

ヒト由来の F S 2 9 3 F 細胞における一過性トランスフェクションからの 1 2 3 の発

10

20

30

40

50

現を評価し、 $123$ を捕捉するためにCD81-LEL<sup>113-201</sup>を利用するサンドイッチELISAを介して、良好な $123$ 産生及び精製を確認した。

【0243】

ゲル濾過クロマトグラフィーから得られた結果は、Con1及びS52株の両方が一貫して高い割合のHMW $123$ を発現し、Con1及びS52についてそれぞれおよそ23%及び20%の増加を示し、H77c株により生成されるHMW $123$ の割合をほぼ2倍にした。さらに、これらの結果は、異なるHCV株が様々な量のHMW $123$ を産生することが明らかにされる。結果は、トランスフェクション及び精製の独立した2ラウンドから生成されたCon1及びS52 $123$ の両方について再現性があった。

【0244】

コバルト荷電TALONビーズを使用するアフィニティークロマトグラフィーは細胞培養上清から分泌された $123$ 糖タンパク質を効率的に精製するが、これらのビーズからのコバルト浸出はワクチン生成に使用すると健康上の問題を引き起こし得る。より安全な代替法は、 $123$ を精製する時、抗体アフィニティークロマトグラフィーを使用することであり得る。

【0245】

HMW $123$ の構造は未定義のままであるが、本明細書に記載の結果は、分子間ジスルフィド結合が、WT E2及び単量体 $123$ において予め接近可能であった非特異的及びタイプ特異的中和領域を閉じ込める独特のフォールディング配置を媒介することを示唆する。単量体がbNAbを生成しなかったが、HMW形態が7つ全てのHCV遺伝子型を中和することができる抗体を誘発することが可能だったことを実証することにより、H77c $123$ の免疫原性試験は、このことをサポートし、これらの抗体応答が、これらの領域の閉じ込めにより、非中和エピトープから離れる方向に向かい、従って、代わりに広域中和エピトープに標的化されることが示された(H. Drummer、未発表データ)。

【0246】

単量体は、異なる $123$ 種の不均一混合物から効率的に生成され、効果的に精製され得るので、単量体 $123$ をHMW形態にリフォールディングするための方策を評価した。遊離スルフヒドリルを生じる単量体の部分還元、続いて、これらのスルフヒドリルの共役または再酸化は、H77c HMW $123$ 中のジスルフィド配置を再現するようにジスルフィド結合のリシャフリングをもたらすと仮定された。従来、望ましくないタンパク質凝集体から、特に、細菌封入体から低次種(単量体/二量体/三量体)を再生するために還元及びリフォールディング方法が採用される(Singh and Panda、2005)。

【0247】

ホモ二官能性BMOE架橋剤は、遊離スルフヒドリルと反応して、それらの共役をもたらす。さらに、共役が個々の $123$ サブユニット間で起こる場合、HMW $123$ への凝集を媒介する分子間相互作用が確立されることになる。しかし、リフォールディングプロセスにおいてBMOE架橋剤を利用すると、分子間ジスルフィド結合形成を促進することができなかった。これにより、おそらく立体障害または実験誤差のために、試行された条件に対してBMOEが $123$ 単量体を架橋しなかったことが示唆される。さらに、BMOE処理陽性対照が存在しないと、これらのBMOEリフォールディング実験の有効性を評価することは非常に困難になった。これは、他の架橋剤が架橋多量体を生成せず、且つ生成に有用な方法ではないということではない。逆に、DTT還元、続いて、徐々に希釈する方法、ならびにグルタチオンベースの酸化還元シャフリングシステムを使用すると、二量体及び高次種の形成がもたらされ、遊離スルフヒドリルが分子間ジスルフィド結合に酸化されたことが示された。具体的には、システイン残基452、486、569、及び597のスルフヒドリルは、個々の $123$ サブユニットを一緒に架橋することに直接関与し得るが、これは、これらの残基がE2 RBDの構造的完全性にとって必須ではないからである。

10

20

30

40

50

## 【0248】

試験した3つの方法のうち、DTTを使用した還元及び徐々に希釈することによるリフォールディングは、単量体 123をHMW種に変換することにおいて最も有効な方法であった。この方法は、およそ5分の1の123単量体のHMW種への変換を可能にした。酸化還元シャフリングシステムを使用すると、二量体ではあるが、およそ50%の123単量体においてリフォールディングが達成された。

## 【0249】

実施例17： -メルカプトエタノール (ME)を使用した還元及びアセンブリ

MEを使用した部分還元による123単量体の還元及び高分子量のオリゴマーへのアセンブリを評価した。

10

## 【0250】

単量体 123 (20 µg)をPBS中で調製して、各チューブ中の総体積を20 µLとした。MEを、最終濃度が0~100 mMとなるように添加し、室温で15分間インキュベートした。タンパク質をリアセンプルさせるために、10 µLのPBSを添加し、タンパク質を室温で7分間インキュベートし、2回繰り返した。Amicon Ultra遠心フィルターユニット (30kのMWCO)を使用して、MEを除去し、タンパク質を、PBSで2回すすいだ。タンパク質を非還元SDS-PAGEで分析した。ME処理 123 123 3及びHMW 1 123及び2 µLのタンパク質標準の試料をウェルに別々にロードし、次に、ゲル電気泳動を120 Vで実施した。染料の先端が分離ゲルの頂部に移動すると、電圧を160 Vに増加させた。クマシー (0.25%のクマシーブリリアントブルーG-250、50%のメタノール、及び10%の酢酸)でゲルを1時間染色し、次に、ゲルの背景が透明になるまで脱色した (50%のメタノール及び10%の酢酸)。最終的に、Li-Cor Odyssey イメージングシステムを使用して、ゲルを観察した。

20

## 【0251】

処理及び未処理タンパク質を、非還元条件下でSDS-PAGEで分析した。結果 (図15A)は、未処理の単量体 123がほとんどの場合は、単量体として移動し、少量の二量体が存在し、SDS-PAGEへの添加前の試料のポイリングの結果の可能性を示す。高濃度のMEでは、図15Aに示すように、より大きいHMWオリゴマーを観察することができる。それらの存在を確認するために、123単量体を100 mMのMEで還元し、ゲル濾過クロマトグラフィーでの分析前にアセンブルさせた。結果 (図15B)は、網掛け領域で示されるように、小さなショルダーが、100 mMのMEで処理された123単量体上に存在したことを示す。これは、非効率的ではあるが、MEが、123をより高次のオリゴマーにリアセンプルさせることができることを示唆する。

30

## 【0252】

実施例18：アセンブルした糖タンパク質の免疫原性

アセンブルしたタンパク質が単量体抗原と比較して、動物において、より免疫原性であるかどうかを判定するために、アジュバントとしてAddavaxを使用して、非近交系モルモットに3週間間隔で100 µgのタンパク質を4回ワクチン接種した (表15)。最終ワクチン接種の2週間後にモルモットから採血し、免疫血清を分析して、123単量体タンパク質に対する抗体価を決定した。

40

## 【0253】

Nunc MaxiSorp平底96ウェルプレートを、50 µL/ウェルのpH 9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液50 mM中で調製された5 µg/mLの単量体H77c E2 123でコーティングし、4で一晚インキュベートした。翌日、プレートをPBSTで4回洗浄し、100 µL/ウェルのBSA<sub>10</sub> PBSTで室温で1時間ブロックした。PBSTで4回洗浄した後、1/100で開始するモルモット血清の半対数段階希釈物を、プレートに室温で2時間添加した。プレートをPBSTで4回洗浄し、1/1000の抗HIS抗体を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗

50

浄し、100  $\mu$ L / ウェルのTMBで発色させ、続いて、50  $\mu$ L / ウェルのHClを添加した。450 nm ~ 650 nmの時の光学密度は、連続希釈に対する(y軸)をプロットし、0.5単位の光学濃度を得るために必要な逆数希釈を使用して、抗体価を決定した。群4-F及び5-Fはそれぞれ4匹の動物を有し、両方とも単量体バージョンのHCVタンパク質を投与されるので、これらの群からの結果を、他の群との比較のために組み合わせさせた。

#### 【0254】

結果は、リフォールディングした123及び123A7タンパク質でワクチン接種された動物が、これらのタンパク質の単量体形態でワクチン接種された動物よりも高い抗体価を生じたことを示す(組み合わせられた123及び123A7単量体群の場合、123 = 41826、123A7 = 28686対21756)(図16)。これらの群の平均力価もまた高かった。アSEMBルした123群の場合、幾何平均抗体価は、天然123HMWワクチン接種群より高かった(表16)。アSEMBルした123を投与された動物は、単量体抗原を投与された動物よりも統計的に有意に高い抗体価を有した( $p = 0.0286$ )(図16)。

#### 【0255】

##### 実施例19: 抗体応答の特異性

アSEMBルした抗原が抗体の異なる特異性を生じたかどうかを決定するために、HCVによる感染を予防する広域中和抗体の標的であるE2糖タンパク質の主要抗原領域を表す合成ペプチドに対して血清を試験した。エピトープIは、残基412~423にわたり、マウスAP33(Owsianka et al., 2001; Owsianka et al., 2005; Tarr et al., 2006); ラット3/11(Tarr et al., 2006; Flint et al. 2009); ヒトHCV1及び95-2(Broering et al. 2009); ヒトHC33.1及び関連抗体(Keck et al., 2013); H77.39(Sabo et al., 2011); MRCT10.v362及びhu5B3.v3(Pantua et al., 2013); ならびにMab24(Alhammad et al., 2015)などの広域中和抗体のエピトープを包含する。合成ペプチドは、このような特異性及びスパン残基408~428を検出するために使用され、モルモット血清中のポリクローナル抗体の反応性を特性決定するために以前に使用されている(Vietheerら、2017)。

#### 【0256】

Nunc MaxiSorp平底96ウェルプレートを、50  $\mu$ L / ウェルのpH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液50 mM中で調製された5  $\mu$ g / mLのH77cエピトープIペプチド(408~428)でコーティングし、4で一晚インキュベートした。翌日、プレートをPBSTで4回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルのBSA<sub>10</sub> PBSTで室温で1時間ブロックした。PBSTで4回洗浄した後、モルモット血清の半対数段階希釈物を、1/5から開始して加え、1時間結合させた。PBSTで4回洗浄した後、50  $\mu$ L / ウェルの抗モルモットHRP抗体を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルのTMBで発色させ、続いて、50  $\mu$ L / ウェルのHClを添加した。

#### 【0257】

結果は、アSEMBルした123及び123A7でワクチン接種された動物が、これらの単量体形態の抗原でワクチン接種された動物よりも有意に高い抗体価を有することを示す(図17)。アSEMBルした123の場合には、平均力価は、単量体群の1.5倍高く、天然123がワクチン接種された群の1.15倍高かった。アSEMBルした123A7の場合、平均力価は、単量体群の5倍高かった。データは、自然にフォールディングした状態(この実施例では、HCV E2の単量体である)から高次オリゴマーに抗原をアSEMBルすると、広域中和抗体エピトープに対する抗体の力価を増加させることにより抗原の免疫原性を有意に改善したことを示唆する。

#### 【0258】

10

20

30

40

50

## 実施例 20 : 抗体応答エピトープ I I I の特異性

アセンブルした抗原が異なる特異性の抗体を生じたかどうかを決定するために、残基 523 ~ 549 にわたる CD81 結合ループを表す合成ペプチドに対して、血清を試験した。この抗原領域は、抗原領域 3 の一部を含み、中和抗体の標的である。

## 【0259】

Nunc MaxiSorp 平底 96 ウェルプレート を、50  $\mu$ L / ウェルの pH 9.6 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 50 mM 中で調製された 5  $\mu$ g / mL の H77c エピトープ I I I ペプチド (523 ~ 549) でコーティングし、4 で一晩インキュベートした。翌日、プレートを PBST で 4 回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルの BSA<sub>10</sub> PBS で室温で 1 時間ブロックした。PBST で 4 回洗浄した後、モルモット血清の半対数段階希釈物を、1 / 5 から開始して加え、1 時間結合させた。PBST で 4 回洗浄した後、50  $\mu$ L / ウェルの抗モルモット HRP 抗体を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBST で 4 回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルの TMB で発色させ、続いて、50  $\mu$ L / ウェルの HCl を添加した。

## 【0260】

結果 (図 18) は、アセンブルした 123 及び 123A7 を投与された動物が、H77c エピトープ I I I に対する高力価の抗体を生じ、123 でワクチン接種された動物の平均及び幾何平均が、自然にフォールディングした単量体物質を投与された動物よりも高いことを示す (表 18)。加えて、アセンブルした 123 及び 123A7 タンパク質を投与される動物における抗体価は、単量体物質を投与される動物で観察された抗体価の広がりとは対照的に、一貫して高かった (123 及び 123A7 の場合の力価の 5 ~ 6 倍の範囲、対、単量体の場合の 200 倍)。これは、アセンブルしたタンパク質が、ワクチン接種された動物において一貫した免疫応答を誘導することができた一方、単量体出発物質が、この領域に特異的な抗体を一貫性なく生成したことを示唆する。

## 【0261】

## 実施例 21 : エピトープ I に対する抗体応答の交差反応性

H77c エピトープ I に対して生じた抗体が異なる遺伝子型の同等の配列と交差反応性であるかどうかを決定するために、残基 408 ~ 428 にわたる遺伝子型 2a J6 ペプチドを使用して、ELISA を実施した。

## 【0262】

Nunc MaxiSorp 平底 96 ウェルプレート を、50  $\mu$ L / ウェルの pH 9.6 の炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液 50 mM 中で調製された 5  $\mu$ g / mL の J6 エピトープ I ペプチドでコーティングし、4 で一晩インキュベートした。翌日、プレートを PBST で 4 回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルの BSA<sub>10</sub> PBS で室温で 1 時間ブロックした。PBST で 4 回洗浄した後、モルモット血清の半対数段階希釈物を、1 / 5 から開始して加え、1 時間結合させた。PBST で 4 回洗浄した後、50  $\mu$ L / ウェルの抗モルモット HRP 抗体を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBST で 4 回洗浄し、100  $\mu$ L / ウェルの TMB で発色させ、続いて、50  $\mu$ L / ウェルの HCl を添加した。

## 【0263】

結果 (図 19) は、123 及び 123A7 でワクチン接種された動物において生じた抗体は、エピトープ I の遺伝子型 2a 株 J6 配列と交差反応性であり、これらの群の抗体の平均及び幾何平均力価は、天然単量体形態のこれらの抗原でのワクチン接種により達成されたものよりも高かったことを示す (表 19)。123 でワクチン接種された動物の平均抗体価は、123 タンパク質を発現するプラスミドがトランスフェクトされた 293FS 細胞から直接採取された天然高分子量形態の 123 でのワクチン接種を介して達成されたもののほぼ 2 倍高かった (表 19)。

## 【0264】

## 実施例 22 : HCV E2 CD81 阻害の特性決定

HCV E2 は、細胞受容体 CD81 を使用して細胞に結合する。本発明者らの研究室

では、本発明者らは、免疫血清中に存在する抗体が可溶性E2の組み換えCD81への結合を妨げる能力を判定するためのアッセイを従前に用いている。

【0265】

Nunc MaxiSorp平底プレートを、pH9.6の炭酸塩-重炭酸塩緩衝液50mM中で調製された5 $\mu$ g/mlのMBP-CD81LELでコーティングし、4で一晩保存した。翌日、プレートを、100 $\mu$ L/ウェルのBSA<sub>10</sub>PBSで1時間ブロックし、PBST中でX4回洗浄した。BSA<sub>5</sub>PBST中、1/5で開始するモルモット免疫血清の半対数段階希釈物50 $\mu$ Lを、全てのウェルの1 $\mu$ g/mlの分画されていないE2 RBD(別々に、G1aH77c及びG2a JFH1)50 $\mu$ Lに添加し、次に、室温で1時間インキュベートした。80 $\mu$ LのE2 RBD-血清混合物をCD81がコーティングされたプレートに添加し、4で一晩インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗浄した後、1/500の50 $\mu$ L/ウェルのマウス抗HISを添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで4回洗浄し、100 $\mu$ L/ウェルのTMBで発色させ、50 $\mu$ L/ウェルの1MのHClを添加して、反応を停止させた。結果は、アSEMBルした123及び123A7でワクチン接種された動物が、H77cG1aE2とCD81の相互作用を妨げることができる高力価の抗体を生じ、天然123HMWタンパク質を投与されたマウスに存在するレベルと同様の、且つ単量体形態のこれらの抗原でワクチン接種されたマウスで達成された平均レベルと同様のレベルで存在したことを示す(図20A及び表20)。

10

【0266】

免疫血清がCD81と結合するG2a E2の結合を阻害する能力を評価した(図20B)。アSEMBルした123及び123A7でワクチン接種された動物の抗体価は、これらの抗原の単量体形態でワクチン接種された動物及び天然123HMWでワクチン接種された動物と同様であった。これらのデータは、アSEMBルした形態の123及び123A7が、細胞表面受容体CD81への異種遺伝子型のHCVの結合を妨げる交差反応性抗体を生じるのに、より有利であることを示唆する。

20

【0267】

実施例23：相同遺伝子型1aウイルスの中和

生じた抗体が肝細胞株のHCVによる感染を防止する能力をもたらしたかどうかを判定するために、相同遺伝子型1a偽型ウイルスを使用して、中和アッセイを実施した。

30

【0268】

G1a由来のE1E2ヘテロ二量体を組み込むHCVppを産生するための発現ベクターは、pE1E2H77cであった(Drummer et al., 2003)。pNL4-3.Luc.R.E-(pNL43)を、the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIHのNathaniel Landau博士から入手した(Connor et al., 1995; He et al., 1995)。6 $\mu$ gのE1E2H77c DNAを、1.5mLのエピンドルフチューブ中で6 $\mu$ gのpNL43DNAと混合した。空ベクター対照のために、1 $\mu$ gのpcDNA4cを1 $\mu$ gのpNL43DNAと混合した。312 $\mu$ LのFuGENE6を5200 $\mu$ LのOpti-MEM(+グルタマックス)に添加し、次に、室温で5分間インキュベートし、この混合物600 $\mu$ LをDNA混合物に添加した。100 $\mu$ Lを空対照に添加した。これらを室温で20分間インキュベートした。PC3実験室では、8本のチューブの内容物を、ステップ1の別々の293T細胞含有皿に滴加した。空対照を、ステップ1の293T細胞含有プレートの1つのウェルに添加した。FuGENE6/OptiMEM/DNA混合物を37及び5%のCO<sub>2</sub>で20分間インキュベートした後、293T細胞に滴加した。細胞を5%のCO<sub>2</sub>中37で3日間インキュベートした。3日後、感染性E1E2偽型ウイルス(HCVPP)または空ベクター偽型ウイルス(Emptypp)を含有する上清液を除去し、中和アッセイでの使用の準備ができている0.45 $\mu$ Mのフィルターを通して濾過した。

40

【0269】

50

熱不活化モルモット血清の半対数段階希釈を、1/20から開始して行い、250 µLの血清を、250 µLのHCVPに添加し、1時間インキュベートした。150 µL/ウェルの血清-ウイルス混合物を3連でHuH7.5細胞に添加した。150 µL/ウェルの空対照を、無抗原群のプレートの最下段に3連で添加した。次に、プレートを37及び5%のCO<sub>2</sub>でインキュベートした。

#### 【0270】

42時間後、培地をHuH7.5細胞から除去し、次に、これを1×PBS中で1回洗浄した。50 µL/ウェルの1×細胞培養溶解試薬を添加し、細胞溶解物をU底96ウェルプレートに移した。溶解物5 µLを384ウェル白色プレートに移し、CLARIOstarプレートリーダーで読み取った。3連の値の平均を血清希釈物に対してプロットし、非線形回帰分析を使用して、曲線フィッティングをし、ウイルス感染細胞の50%の阻害用量を達成するのに必要な血清の逆数希釈を計算した(プリズムV7)。

10

#### 【0271】

結果(図21)は、アSEMBルした123及び123A7でワクチン接種された8/8の動物が、G1a HCVPによる感染を予防することができる抗体を生じたことを示す。対照的に、単量体抗原を投与された群の7/8の動物のみが中和抗体を生じた。123A7を投与された群の平均及び幾何平均抗体価は、単量体抗原を使用して達成されたものよりも高く、アSEMBリの方法により抗原のサイズを増加させると、免疫原性が改善されることが示唆された(表22)。アSEMBリを通じて達成された抗体中和価は、天然HMW形態の抗原を使用して達成されたものと同様の範囲にあり(表22)、本方法がHCVの相同株に対して有効な中和抗体を生成する少なくとも同等の能力を有する抗原を産生し、且つ単量体抗原を超えて改善したことが示唆された。

20

#### 【0272】

実施例24：免疫血清がE2に対するヒトモノクローナル抗体の結合を阻害する能力

モルモットで生じた抗体が既知のヒト広域中和抗体のものと類似のエピトープを認識するかどうかに関して抗体応答の特異性をさらに調べるために、競合的酵素免疫アッセイを実施した。

#### 【0273】

組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)リーダーの指示の下でIgG1を発現させるために、VH及びVL領域(Geneart)の合成ならびにそれぞれpcDNA3-tPA-LC及びpcDNA3-tPA-HCへのクローニングにより、ヒト抗体HCV-1(Broering et al., 2009)、HC84-27(Krey et al., 2013)、AR3C(Law et al., 2008)、及び2A12(Khan et al., 2014)を生成させた。重鎖及び軽鎖をコードするプラスミドを、IgG産生のためにFS293F細胞にトランスフェクトした。

30

#### 【0274】

一定量のMAb及び各モルモット血清の半対数段階希釈物をブロックされたウェルに同時に加え、プレート結合単量体123に添加する前に室温で2時間インキュベートした。残留MAb結合を抗ヒトFab2で検出した。曲線を、非線形回帰によりフィットし、各血清試料についてID50を決定するために使用した。血清試料が試験した最高濃度(1:10希釈、log10<sup>-1</sup>)でID50を達成できなかった場合、log10<sup>-0.5</sup>の値をその血清に割り当てた。

40

#### 【0275】

結果は、アSEMBルした123及び123A7でワクチン接種された動物が、412~423領域を認識する抗体HCV1のエピトープ(エピトープI)と重複する抗体のより高い平均及び幾何平均力価を有することを示す(表23及び図22A)。HCV1抗体は、チンパンジーのHCVを予防及び処置することが示されている(Morin et al., 2012)。さらに、力価は天然HMW123を使用して達成されたものと同様であり、本方法が同等の抗原を産生することが示される。123を投与された動物における抗体価は、単量体ワクチン接種群におけるものよりも統計的に高かった(図22

50

A)。

【0276】

結果は、単量体ワクチン接種者または天然HMWワクチン接種者と比較して、アセンブルした123でワクチン接種された動物は、E2の430～446領域を認識し、且つ細胞受容体CD81と接触している領域の一部を含む抗体HC84-27のエピトープと重複する抗体の、より高い平均及び幾何平均力価を有したことを示す(表24及び図22B)。この抗体特異性は、広域中和であり、HCVエスケープ変異体の生成を妨げる(Krey et al., 2013; Keck et al., 2012)。このデータは、アセンブリ方法が、HC84-27により認識されるエピトープと重複する抗体の生成に関して改善された抗原を生成することを示す。123を投与された動物における抗体価は、単量体ワクチン接種群におけるものよりも統計的に高かった(図22B)。

10

【0277】

結果は、単量体ワクチン接種者と比較して、アセンブルした123及び123A7でワクチン接種された動物が、抗体AR3Cのエピトープと重複する抗体の、より高い平均及び幾何平均力価を有したことを示す(表25及び図22C)。123の場合、平均及び幾何平均力価は、同等の天然HMW抗原で生成されたものよりも高かった(表25)。

【0278】

結果は、単量体ワクチンと比較して、アセンブルした123及び123A7でワクチン接種された動物は、非中和抗体2A12の結合を妨げることができる抗体の、より低い平均及び幾何平均力価を有したことを示す(表26及び図22D)。データは、単量体123及び123A7のアセンブリが、HCVの中和(Zhang et al., 2009)及び中和抗体の生成(Viethier et al., 2017)を妨げることが示されている非中和エピトープを閉じ込めることを示唆する。

20

【0279】

実施例25：E2特異的B細胞を検出するアセンブルしたタンパク質の使用

アセンブルしたHCVタンパク質が、抗原に特異的な抗体を有する免疫細胞を同定するために使用することができるかを決定するために、慢性感染者から単離されたPBMCを使用して、以下のものを実施した。

凍結PBMCからのB細胞の濃縮

試薬

30

【表1】

MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec	カタログ#130-042-102
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec	カタログ#130-042-303
MS Columns	Miltenyi Biotec	カタログ#130-042-201
Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec	カタログ#130-090-101
B Cell Isolation Kit II (ヒト)	Miltenyi Biotec	カタログ#130-091-151

40

【0280】

HCV感染個体由来のPBMCを室温で解凍した。Dead Cell Removal kit (#130-090-101 Miltenyi Biotec)を使用して、死細胞を除去した。総細胞 $10^7$ 当たり、 $20\times$ 結合緩衝ストック溶液0.25mlを4.75mlの滅菌水で希釈する。総細胞 $10^7$ 当たり、100ulのDead Cell Removal Microbeadsを添加し、混合し、室温で15分間インキュベートした。死細胞をMACS Separatorで除去した。細胞をMACS緩衝液(PBS、0.5%のBSA、2mMのEDTA):50mlの冷PBS+0.25gのBSA、及び0.2mlの0.5MEDTA中に再懸濁させた。全細胞 $10^7$ 当たり、MACS緩衝液40ul及び全細胞 $10^7$ 当たりビオチン抗体カクテル10ulを添加し、

50

冷却装置中で10分間インキュベートした。総細胞 $10^7$ 当たり、MACS緩衝液300 $\mu$ lを添加する。200 $\mu$ lの抗ビオチンマイクロビーズを冷却装置中で20分間添加した。500 $\mu$ lのMACS緩衝液に再懸濁させ、MACS SeparatorのMSカラムで非B細胞集団を除去する。細胞は、以下の通りのFACS Aria Sortのための染色細胞であった。

【表2】

CD19 Pe-Cy7 マウス抗体(SJ25C1)	BD Pharmingen	カタログ#557835
精製された CD81 マウス抗体(JS-81)	BD Pharmingen	カタログ#555675
CD81 APC マウス抗体(JS-81)	BD Pharmingen	カタログ#551112
デルタ3 E2-HIS タンパク質 0.59mg/ml	Drummer Lab	
Penta-HIS Alexa Fluor488	Qiagen	カタログ#35310
Alexa Fluor488 抗マウス IgG	Life Tech	カタログ#A11001
FACS 緩衝液(PBS、2%の FCS、1mM の EDTA):50ml の冷 PBS+1ml の FCS+0.5M の EDTA0.1ml		

10

## 【0281】

FACS緩衝液中の100 $\mu$ lのCD19 PE-Cy7抗体(1:50)で、細胞を標識した。よく混合し、冷却装置中で30分間インキュベートする。FACS緩衝液中で2回洗浄した後、再懸濁した細胞ペレットをFACS緩衝液中の精製CD81抗体(1:50)100 $\mu$ lで4で30分間染色した。2回洗浄した後、再懸濁した細胞ペレットをFACS緩衝液100 $\mu$ l中のデルタ3タンパク質20 $\mu$ gで4で30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液500 $\mu$ lで、300g、5分間2回洗浄した。再懸濁した細胞ペレットを、FACS緩衝液中の100 $\mu$ lのCD81APC抗体(1:50)及びPenta-HIS488(1:100)で4で30分間染色した。細胞をFACS緩衝液500 $\mu$ lで、300g、5分間2回洗浄した後、細胞をFACS緩衝液200 $\mu$ lで再懸濁させ、直ちに、FACS Sortに進む。

20

【表3】

10%のFCS、1%のNEAA、2mMのL-グルタミン、0.1mg/mlのゲンタマイシン、1 $\mu$ g/mlのミノサイクリンが補充されたRPMI-1640培地。		
R848(1mg/ml)	Invivogen	カタログ#tlrl-r848
IL-2	GenScript	カタログ#Z00368

30

## 【0282】

結果(図23)は、C末端hisタグの複数コピーを含有するアセンブルした123がE2反応性B細胞を効率的に検出することができることを示す。B細胞集団のおよそ0.5%が、E2特異的であった。これは、免疫マーカー検出のための多価タンパク質として作用するアセンブルしたタンパク質の使用を実証する。

40

## 【0283】

実施例26:アセンブルしたタンパク質のサイズ

SEC-MALS分析を使用して、アセンブルした123A7及びアセンブルした123タンパク質のモル質量を決定した。

## 【0284】

試料ロード前に、Wyatt WTC-030-N5 4.6/300カラムをMT-PBSで平衡化した。流速は0.2ml/分であった。DAWN Heleos MALS検出器を、Agilent1200シリーズUVダイオードアレイ検出器及びOptilab T-rex RI検出器と直列にして使用した。BSAを使用して、MALS検出器を正規化した。

50

## 【0285】

262 ~ 675 kDaの範囲にわたるMW種を含有するアSEMBルした123A7試料は、多分散である。重量平均モル質量は、409 kDaである。210 ~ 744 kDaの範囲にわたるMW種を含有するアSEMBルした123試料は、多分散である。重量平均モル質量は、408.7 kDaである。アSEMBルした123A7試料中のE2プロトマーの範囲は、5 ~ 15であり、123中では4 ~ 16であり、各場合で平均は9であった。

## 【0286】

## 実施例27：タンパク質のアSEMBリ

還元剤DTTを使用して達成することができるアSEMBリの範囲を検討するために、複数の独立したアSEMBリ実験を実施した。結果は、単量体123A7を最大80%の効率でリフォールディングすることができるが、最大71%の123をHMW形態にアSEMBルすることができることを示す。

10

## 【0287】

残存単量体種をDTTで処理し、HMW形態にアSEMBルさせることができるかどうかを評価した。従前の実験からHMW形態にアSEMBルしなかった単量体123A7の1 mg/mlの溶液を、0.6 mMのDTTの最終濃度で37°Cで30分間処理した。さらに3 ulの100 mMのDTTをタンパク質調製物に添加し、混合し、37°Cでさらに30分間インキュベートした。次に、1 x PBS (pH 6.8) 250 ulを添加し、室温で15分間インキュベートし、さらに2回繰り返した。次に、タンパク質を緩衝液交換し、4 mlのAmiconウルトラ遠心式デバイス(30 KのMWCO)を使用して濃縮し、500 ulの体積が達成されるまで、pH 6.8の1 x PBSで2回洗浄し、エペンドルフチューブに移した。ゲル濾過クロマトグラフィーを使用して、処理されたタンパク質を分析した。結果は、残存単量体123A7の30%が、HMW形態にアSEMBルすることができたことを示した(図25)。これは、本方法を使用して、単量体HCVE2タンパク質をHMW形態にアSEMBルする能力に制限がなく、且つ実際には、最大100%の単量体形態がアSEMBルしたHMW形態に変換することができることを示唆する。

20

## 【0288】

## 実施例28：他のタンパク質のアSEMBリ

同じ方法を使用して、他の形態のHCVE2をHMW種にアSEMBルすることができるかどうかを検討した。実施例25に記載のように、残基384 ~ 661を含む単量体H77cE2をDTTで処理し、HMW形態にアSEMBルした。ゲル濾過クロマトグラフィーは、およそ40%がHMW形態にアSEMBルしていることを明らかにした(図26)。C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、及びC569(A7)にCys-Ala変異を含有する残基384 ~ 661を含む単量体H77cE2を同じ方法で処理したRBD A7タンパク質を使用して、同じプロセスを実施した。本実施例では、およそ10%をHMW形態にアSEMBルした(図27)。

30

## 【0289】

方法が他のタンパク質から高次種をアSEMBルすることに広く適用可能であるかどうかを調べるために、上記方法を使用してAD8配列からC末端膜貫通ドメイン及び細胞質尾部を除去するように切断された大部分が単量体のHIVエンベロープタンパク質(Env)を使用した。DTTでの処理及びアSEMBリの後、envのHMW種の形成に対応する、ゲル濾過プロファイルのわずかなシフトが観察された(図28)。高次オリゴマーは、広域中和抗体の結合を保持することが示されており、広域中和抗体の産生のための好ましいワクチン候補であるので、高次オリゴマー、特に、三量体の形成は、HIVにとって望ましい(de Taeye et al., 2015)。このデータは、方法が、単量体または低次種からの高次オリゴマーの形成が抗原産生にとって望ましい他のタンパク質に適用できることを示唆する。

40

## 【0290】

50

本発明の範囲から逸脱することなく、多くの変更が当業者らには明らかであろう。

【表 4】

表 1 :

トランスフェクション容量	総細胞数	DNA の量	DNA 希釈量 (Opti-MEM 中)	293 フェクチンの量	293 フェクチン希釈量 (Opti-MEM 中)
150mL	$1.5 \times 10^8$	150 $\mu$ g	3mL	150uL	3mL

【表 5】

表 2 :

抗体	種	N11 活性 <sup>1</sup>	エピトープ <sup>2</sup> 種類 <sup>2</sup>	残基 <sup>3</sup>	E2-CD81 <sup>4</sup>
抗 HIS	ウサギ	No	C	C 末端 6×HIS	No
HCV1	ヒト	Yes	C	L413、N415、W420	Yes
AR3A	ヒト	Yes	DC	S424、G523、P525、 G530、D535、V538、 N540	No
AR3B	ヒト	Yes	DC	Q412、T416、G418、 N423、S424、G523、 P525、G530、D535、 N540	Yes
AR3C	ヒト	Yes	DC	S424、H488、G523、 P525、G530、D535、 V538、N540	Yes
AR3D	ヒト	Yes	DC	Q412、S424、G523、 G530、D535	Yes
CBH-4B	ヒト	No	DC	R587-R596	No
CBH-4D	ヒト	No	DC	V536、P612、L615、 R587-R596	No
HC-11	ヒト	Yes	DC	S424、T425、A426、 L427、N428、C429、 Y527、W529、D535、 V536	Yes
H52	マウス	No	C	C652	No
H53	マウス	No	DC	N540、W549	No
1	マウス	No	DC	N/D	Yes
7	マウス	No	DC	N/D	Yes
10	マウス	Yes	DC	N/D	Yes
12	マウス	No	DC	N/D	Yes
16	マウス	No	DC	N/D	Yes
20	マウス	No	DC	N/D	Yes
24	マウス	Yes	C	N/D	Yes
60	マウス			N/D	

<sup>1</sup> MA b が少なくとも型特異的中和を誘導する能力。<sup>2</sup> 標的エピトープは、連続的／立体配座非依存性 (C) または不連続／立体配座依存性 (DC) のいずれかである。<sup>3</sup> 標的アミノ酸残基。測定なしは、N/D と略す。<sup>4</sup> MA b が E 2 - C D 8 1 相互作用をブロックする能力。

10

20

30

40

【表 6】

表 3.

	単 量 体 H77Δ123 の濃 度(μg/μL)	DTT の 濃 度 (mM)	インキュベーション時 間(h)	時間(°C)
1.	1	0.00	24.0	37
2.	10	0.10	24.0	37
3.	5	1.00	24.0	37
4.	5	0.50	24.0	37
5.	5	0.10	24.0	37
6.	5	0.10	2.0	37
7.	5	0.10	0.5	37
8.	1	0.10	2.0	37
9.	1	1.00	0.5	37
10.	1	0.30	0.5	37
11.	1	0.10	0.5	37
12.	1	0.05	0.5	37

10

20

【表 7】

表 4.

	単 量 体 H77cΔ123 の 濃 度 (μg/μL)	それぞれ、GSH 及びGSSGの濃 度(mM)	インキュベーション時 間(時間)	温度(°C)
1.	1	0.0, 0.0	24	37
2.	10	2.0, 0.4	24	37
3.	5	2.0, 0.4	24	37
4.	1	2.0, 0.4	24	37
5.	5	2.0, 0.4	2	37

30

【表 8】

表 5.

	単量体 H77c Δ 123 の濃度 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	TCEP の濃度 (mM)
1.	1	10
2.	1	50
3.	1	100
4.	1	200
5.	5	50
6.	5	200
7.	1	0

10

【表 9】

表 6.

株	ラウンド	% 単量体	% 二量体	% HMW2	% HMW1	合計% HMW
H77	N/A	64.90	11.67	18.90	4.23	23.13
Con1	1	25.46	28.52	40.62	5.40	46.02
Con1	2	14.37	38.64	44.56	2.42	46.98
S52	1	35.29	19.05	36.74	8.14	44.88
S52	2	34.81	23.59	39.77	1.79	41.56

20

【表 10】

表 7.

抗体	NAb 活性 <sup>1</sup>	エピトープ <sup>2</sup> 種類 <sup>2</sup>	対応する株の単量体 Δ 123 に 対する結合 <sup>3</sup>			H77cHMW1 Δ 123 に 対する結合 <sup>4</sup>	
			H77c	Con1	S52	Con1	S52
HCV1	Yes	C	1.21	1.46	0.92	2.05	2.08
AR3B	Yes	DC	<0.37	0.17	<0.09	<6.58	<1.68
AR3C	Yes	DC	0.18	0.13	0.54	3.92	6.17
AR3D	Yes	DC	<0.17	0.08		4.73	N/A
CBH-4B	No	DC	<0.27	<0.24	<0.62	<1.00	<1.00
CBH-4D	No	DC	<0.27	<0.11	<0.07	<1.23	<1.68
HC-11	Yes	DC	0.21	0.28	<0.20	6.97	1.00
H52	No	C	<9.53	<11.19	<6.14	1.47	0.56
10	Yes	DC	<0.07	<0.07	<0.25	<0.45	<0.45
24	Yes	C	3.03	0.82	0.52	0.67	0.28
60			<0.47	<0.57	-	<1.00	N/A

10

20

<sup>1</sup>MAbs が少なくとも型特異的中和を誘導する能力。<sup>2</sup>標的エピトープは、連続的/立体配座非依存性 (C) または不連続/立体配座依存性 (DC) のいずれかである。<sup>3</sup>単量体 Δ 123 と比較したMAb のHMW1 Δ 123 への結合。元のELISA結果については図6Aを参照のこと。青色は、単一希釈点評価 (図6B) 及びELISAでの中止試験の結果を表し、+は、陽性反応性を示し、-は、ごくわずかな反応性を示す。<sup>4</sup>H77c HMW1 Δ 123 と比較したMAb のCon1及びS52 HMW1 Δ 123 への結合。該当なしは、N/Aと略す。

30

【表 11】

表 8.

	単量体 H77c Δ 123 の濃度 (μg/μL)	TCEP の濃度 (mM)	BMOE の濃度 (mM)
1.	1	10	0.2
2.	1	50	0.2
3.	1	100	0.2
4.	1	200	0.2
5.	5	50	0.2
6.	5	200	0.2
7.	1	0	0.2

40

【表 1 2】

表 9.

	単量体の濃度 H77c Δ 123 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	それぞれ、GSH 及びGSSGの濃度 (mM)	インキュベーション時間 (時間)	温度( $^{\circ}\text{C}$ )	単量体対二量体の比
1.	1	0.0, 0.0	24	37	4.65
2.	10	2.0, 0.4	24	37	2.51
3.	5	2.0, 0.4	24	37	2.99
4.	1	2.0, 0.4	24	37	6.89
5.	5	2.0, 0.4	2	37	3.36

10

【表 1 3】

表 10.

H77c Δ 123	単量体の%	多量体の%	単量体対多量体の比
未処理	87.52	2.59	33.82
GSH/GSSG	52.68	43.13	1.22

20

【表 1 4】

表 11.

	単量体の濃度 H77c Δ 123 ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	DTT の濃度 (mM)	インキュベーション時間 (時間)	温度( $^{\circ}\text{C}$ )	単量体対二量体の比
1.	1	0.00	24.0	37	3.41
2.	10	0.10	24.0	37	3.02
3.	5	1.00	24.0	37	2.35
4.	5	0.50	24.0	37	2.32
5.	5	0.10	24.0	37	2.55
6.	5	0.10	2.0	37	2.66
7.	5	0.10	0.5	37	1.91
8.	1	0.10	2.0	37	2.16
9.	1	1.00	0.5	37	1.51
10.	1	0.30	0.5	37	1.45
11.	1	0.10	0.5	37	1.33
12.	1	0.05	0.5	37	1.95

30

40

50

【表 1 5】

表 1 2.

H77c Δ 123	単量体の%	多量体の%	単量体対多量体の比
未処理	87.52	2.59	33.82
DTT	69.51	28.84	2.41

10

【表 1 6】

表 1 3.

還元剤	リフォールディング方法	抗原	分析方法 (SDS-PAGE 及び/またはゲル濾過)	リフォールディングしたタンパク質の生成 (Yes/No)
0 ~ 500mM の TCEP	0.2mM の BMOE 架橋剤	Δ 123	SDS-PAGE	No
2.00mM の GSH	酸化還元シャフリンクシステム w. 0.4mM GSSG	Δ 123	SDS-PAGE 及びゲル濾過	Yes
0~1.00mM の DTT	徐々に希釈すること	Δ 123	SDS-PAGE 及びゲル濾過	Yes

20

30

【表 17】

表 14.

還元剤	抗原	溶出時間(分)	%リフォールディング <sup>a</sup>	利用可能な抗原性の特性決定 (Yes/No)
2.0mM の GSH	Δ 123	69.00	43.13	No
0.3mM の DTT の 1 ヒット	Δ 123	59.44	50.15	No
0.3mM の DTT の 2 ヒット	Δ 123	54.48	62.81	Yes
	Δ 123( 反復 1)	53.93	50.13	No
	D123w. フロテ アゼン阻害剤	54.55	52.67	No
	RBD	57.77	39.75	No
	ALA7 Δ 123	52.97	47.41	Yes
	ALA7RBD	59.46	10.38	No
0.3mM の DTT の 3 ヒット	Δ 123	53.95	54.47	No

10

20

30

【表 18】

表 15.

群の名称	抗原#	動物の数
1-F	天然 Δ 123HMW	8
2-F	アセンブルした Δ 123	8
3-F	アセンブルした Δ 123A7	8
4-F*	単量体 Δ 123	4
5-F*	単量体 Δ 123A7	4
6-F	無抗原	6

40

# 3 週間隔で 4 回、等量の Ad d a v a x と共に投与された 100 μ g の抗原。最終免疫化の 2 週間後の最終採血。

\*データの分析のために、群 4 及び 5 からの結果を組み合わせ、動物の均等な大きさの群を作成した。

【表 1 9】

表 1 6 .

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	30162	41866	28686	21756
平均	34701	44460	32444	24898

【表 2 0】

表 1 7 .

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	3756	2176	1339	232
平均	4588	5289	1763	344.4

10

【表 2 1】

表 1 8 .

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	3051	4627	1888	1191
平均	3638	5413	2150	3599
最小値	600	1800	900	90
25%の百分位数	2125	3250	1200	400
中央値	4500	4250	1950	1000
75%の百分位数	5000	8000	2400	4375
最大値	5000	12000	5000	18000

20

30

【表 2 2】

表 1 9 .

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	483.3	439.8	100.4	26.24
平均	587.5	1100	162.5	52.5

40

【表 2 3】

表 2 0 .

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	308.3	246.4	188.1	238.2
平均	326.3	261.3	215	307.5

50

## 【表 2 4】

表 2 1.

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	39.92	51.36	41.33	39.94
平均	41.25	58.75	45	46.25

10

## 【表 2 5】

表 2 2.

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	692.1	266.6	342.6	278.6
平均	773.1	361.7	484.6	430.6
最小値	220.3	43.31	102.1	20
最大値	1231	627.5	1521	1122

20

## 【表 2 6】

表 2 3.

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	118	104	79	45
平均	121	106	81	47
最小値	55	54	47	21
最大値	195	191	129	155

30

## 【表 2 7】

表 2 4.

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	18	20	12	14
平均	19	20	12	14
最小値	10	16	10	10
最大値	35	27	17	39

40

## 【表 2 8】

表 2 5.

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	46	50	38	33
平均	48	51	39	35
最小値	17	26	28	14
最大値	87	102	56	110

10

## 【表 2 9】

表 2 6.

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
幾何平均	119	207	222	353
平均	124	213	228	362
最小値	46	71	105	191
最大値	303	432	814	756

20

## 【表 3 0】

表 2 7.

	保持時間 (分)	モル質量の範囲 kDa	E2 範囲 の単位	モル質量 kDa Mw	E2 の平均 単位
Δ 123A7	12~14.5	674.8~262.2	5~15	408.7	9
Δ 123	12.5~15.5	744~210	4~16	408.7	9

30

## 【 0 2 9 1】

## 参考文献

Alhammad et al (2015) J Virol. 2015; 89 (24) : 12245 - 61. doi: 10.1128/JVI.02070-15. PubMed PMID: 26378182; PubMed Central PMCID: PMC4665232.

Altman et al (1996) Science 274 (5284) : 94 - 96.

Broering et al (2009) J Virol. 2009; 83 (23) : 12473 - 82. Epub 2009/09/18. doi: 10.1128/JVI.01138-09 JVI.01138-09 [pii]. PubMed PMID: 19759151; PubMed Central PMCID: PMC2786766.

40

Connor et al (1995) Virology. 206 (2) : 935 - 44. doi: 10.1006/viro.1995.1016. PubMed PMID: 7531918.

de Taeye et al (2015) Cell; 163 (7) : 1702 - 15. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.056. PubMed PMID: 26687358; PubMed Central PMCID: PMC4732737.

50

- Dolton et al (2015) *Immunology* 146 (1) : 11 - 22 /
- Drummer et al (2003) *FEBS Lett* . 546 (2 - 3) : 385 - 90 . PubMed PMID : 12832074 .
- Flint et al (1999) *J Virol* . 73 (8) : 6235 - 44 . PubMed PMID : 10400713 ; PubMed Central PMCID : PMC112700 .
- He et al (1995) *J Virol* . 69 (7) : 4587 - 92 . PubMed PMID : 7769729 .
- Keck et al (2012) *PLoS Pathog* . 8 (4) : e1002653 . Epub 2012/04/19 . doi : 10.1371/journal.ppat.1002653 PPATHOGENS - D - 11 - 02162 [pii] . PubMed PMID : 22511875 ; PubMed Central PMCID : PMC3325216 . 10
- Khan et al (2014) *Nature* . 2014 . doi : 10.1038/nature13117 . PubMed PMID : 2455313 .
- Krey et al (2013) 9 (5) : e1003364 . doi : 10.1371/journal.ppat.1003364 . PubMed PMID : 23696737 ; PubMed Central PMCID : PMC3656090 .
- Keck et al (2013) *J Virol* . 2013 ; 87 (1) : 37 - 51 . Epub 2012/10/26 . doi : 10.1128/JVI.01941-12 . JVI . 01941 - 12 [pii] . PubMed PMID : 23097455 ; PubMed Central PMCID : PMC3536422 . 20
- Law et al (2008) *Nat Med* . 2008 ; 14 (1) : 25 - 7 . Epub 2007/12/08 . doi : nm1698 [pii] 10.1038/nm1698 . PubMed PMID : 18064037 .
- McCaffrey et al (2007) *J Virol* 81 : 9584 - 9590 .
- Morin et al (2012) *PLoS Pathog* . 8 (8) : e1002895 . Epub 2012/09/07 . doi : 10.1371/journal.ppat.1002895 PPATHOGENS - D - 12 - 01073 [pii] . PubMed PMID : 22952447 ; PubMed Central PMCID : PMC3431327 . 30
- Owsianka et al (2001) *J Gen Virol* . 82 (Pt 8) : 1877 - 83 . Epub 2001/07/18 . PubMed PMID : 11457993 .
- Owsianka et al (2005) *J Virol* . 79 (17) : 11095 - 104 . PubMed PMID : 16103160 .
- Pantua et al (2013) *J Mol Biol* . 2013 ; 425 (11) : 1899 - 914 . Epub 2013/03/06 . doi : 10.1016/j.jmb.2013.02.025 S0022-2836(13)00127-7 [pii] . PubMed PMID : 23458406 . 40
- Petrovsky et al (2004) *Immunol Cell Biol* . Oct ; 82 (5) : 488 - 96 .
- Sabo et al (2011) *J Virol* . 2011 ; 85 (14) : 7005 - 19 . Epub 2011/05/06 . doi : 10.1128/JVI.00586-11 . JVI . 00586 - 11 [pii] . PubMed PMID : 21543495 ; PubMed Central PMCID : PMC3126585 .
- Tarr et al (2006) *Hepatology* . 43 (3) : 592 - 601 . Epub 2006/02/24 . doi : 10.1002/hep.21088 . 50

PubMed PMID: 16496330.

Viethier et al (2017) Hepatology. 2017; 65 (4): 1117-31. doi: 10.1002/hep.28989. PubMed PMID: 27997681; PubMed Central PMCID: PMC5408392.

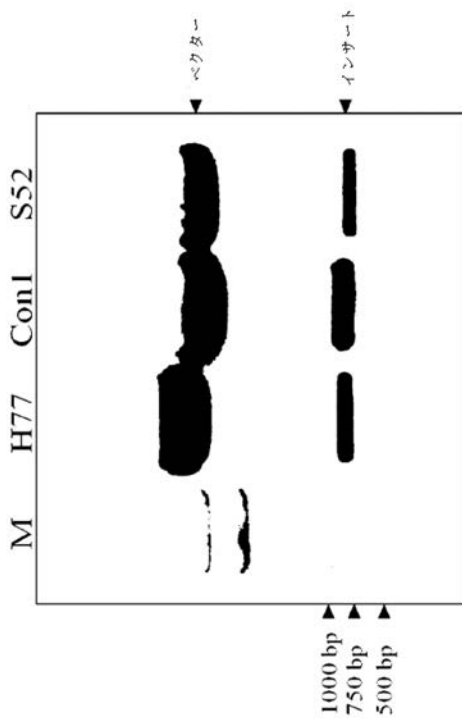
Vollers et al (2008) Immunology. 123 (3): 305-313.

Wilson-Welder et al (2009) J Pharm Sci. Apr; 98 (4): 1278-316. doi: 10.1002/jps.21523.

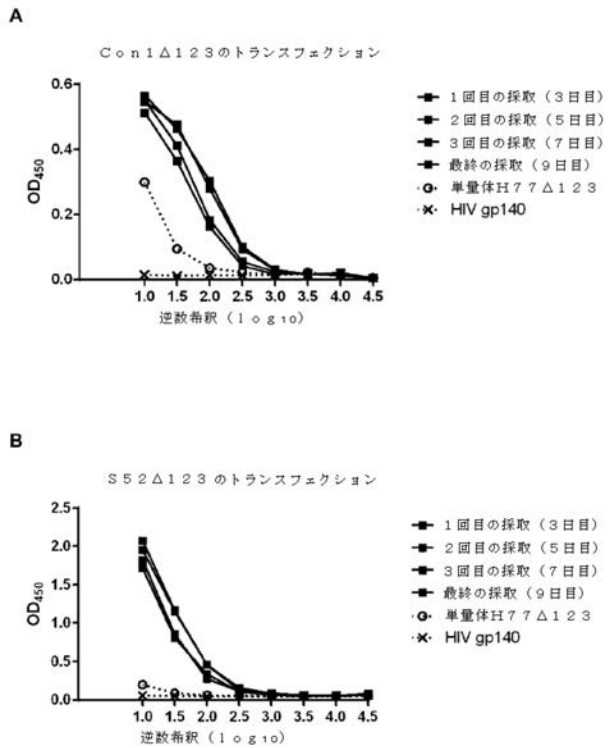
Zhang et al (2009) Proc Natl Acad Sci U S A. 106 (18): 7537-41. Epub 2009/04/22. doi: 0902749106 [pii] 10.1073/pnas.0902749106. PubMed PMID: 19380744; PubMed Central PMCID: PMC2670884.

10

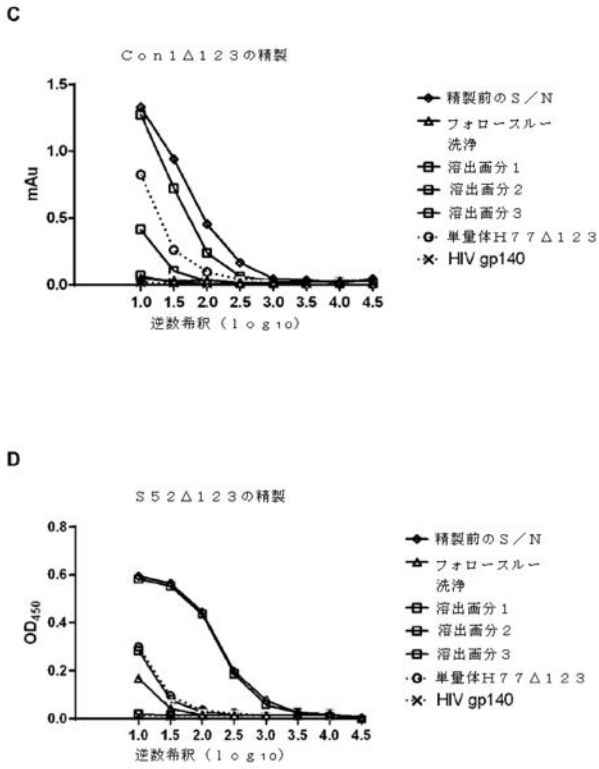
【図1】



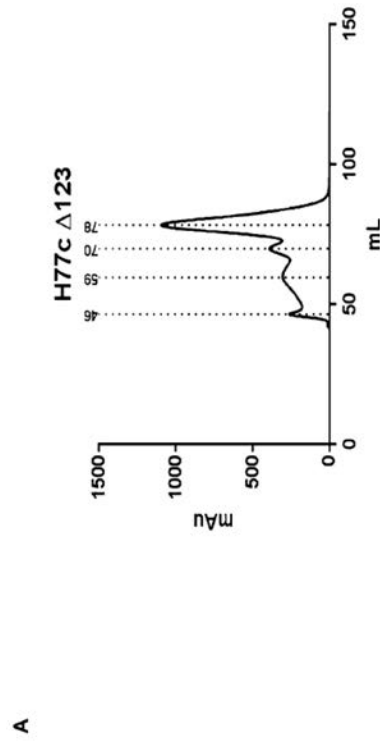
【図2-1】



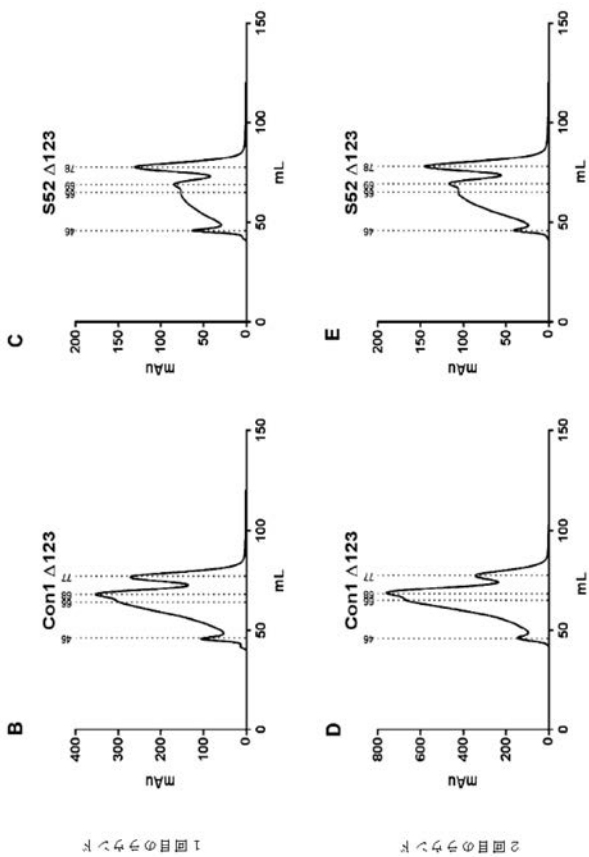
【 図 2 - 2 】



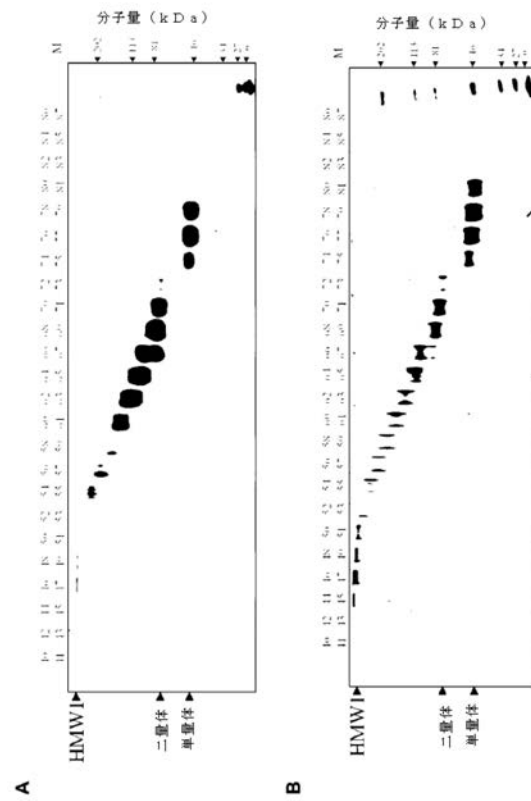
【 図 3 - 1 】



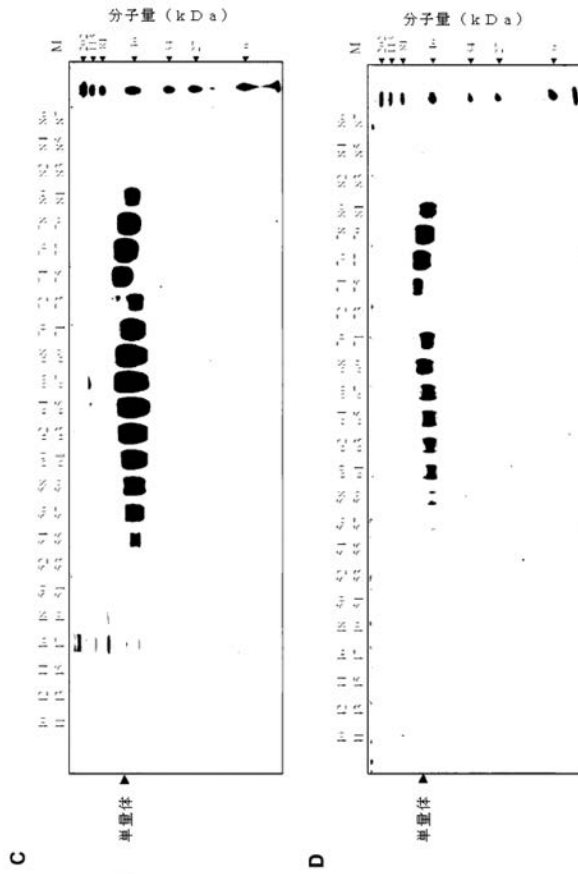
【 図 3 - 2 】



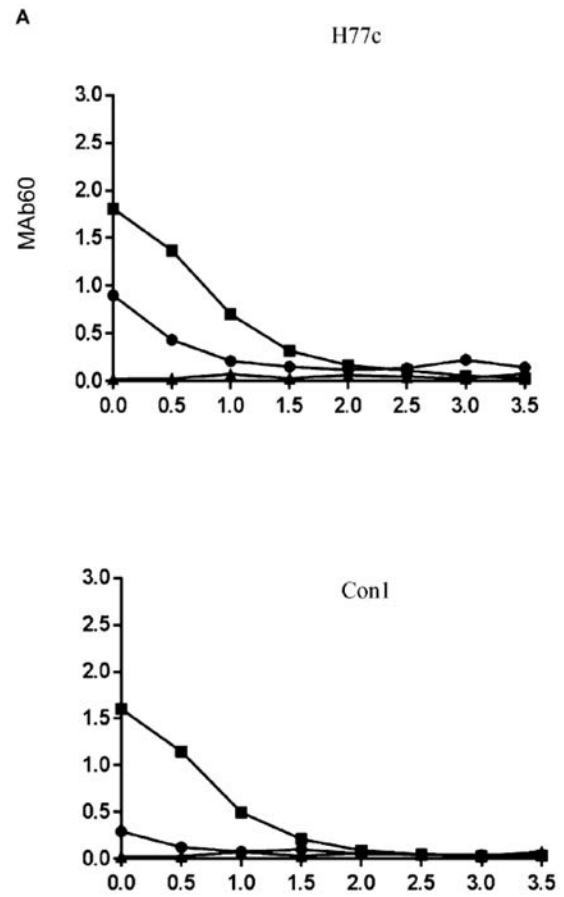
【 図 4 - 1 】



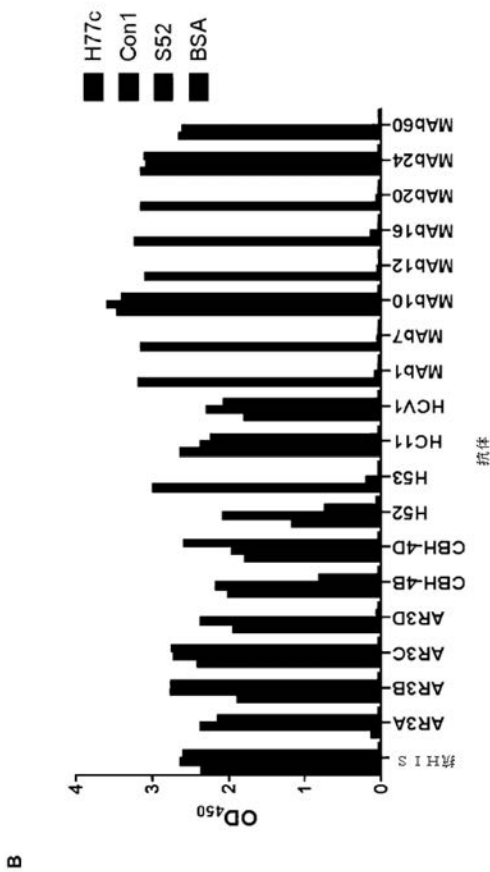
【 図 4 - 2 】



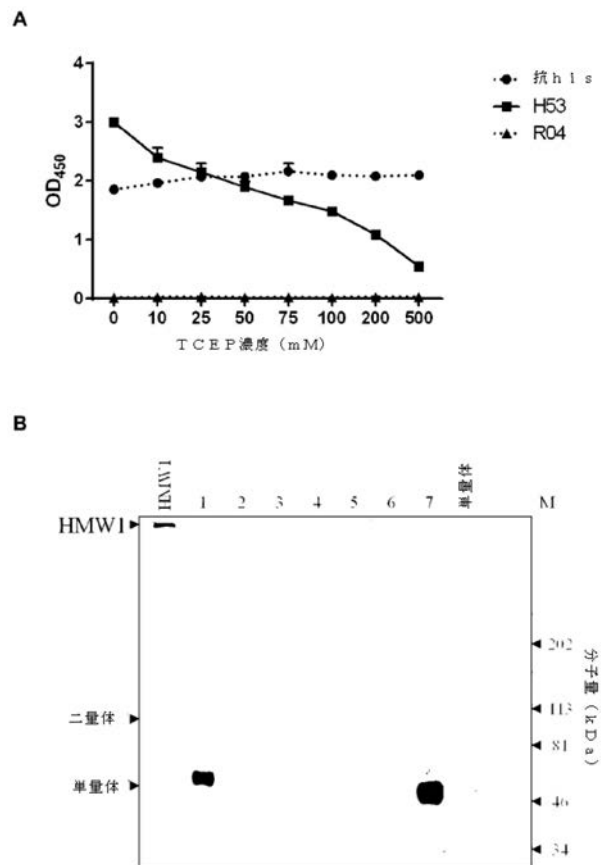
【 図 5 A 】



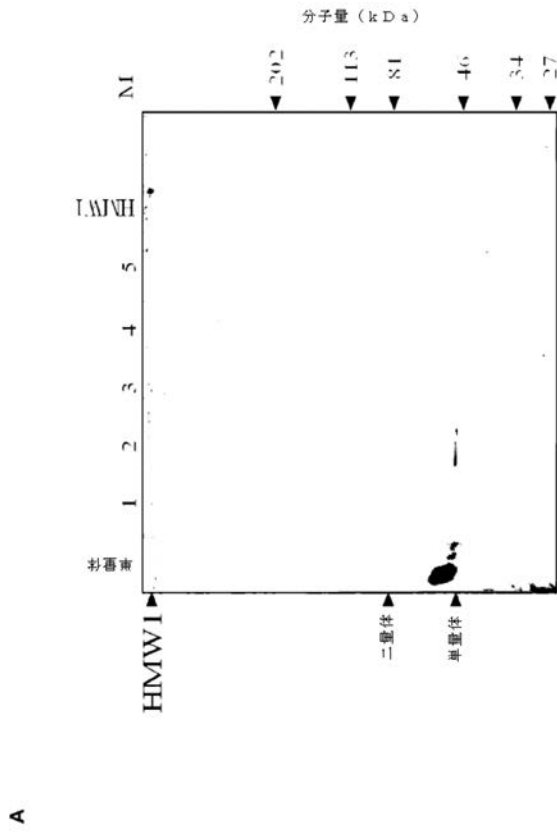
【 図 5 B 】



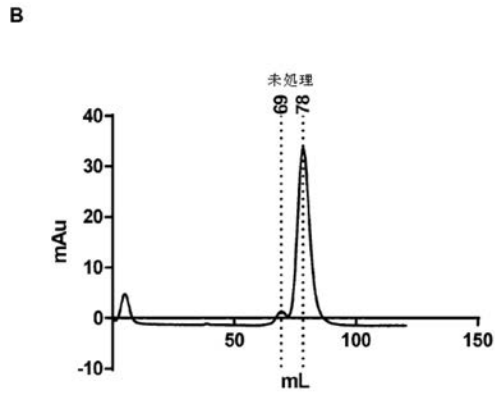
【 図 6 】



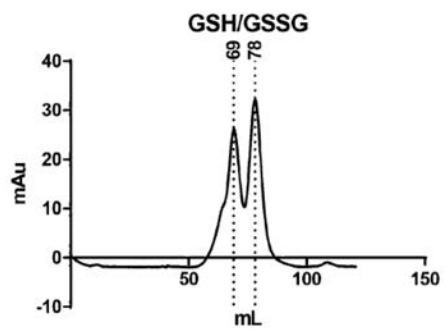
【 図 7 - 1 】



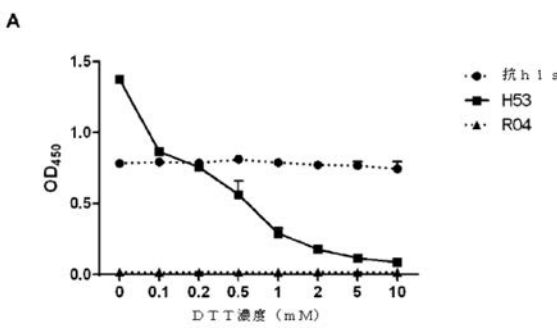
【 図 7 - 2 】



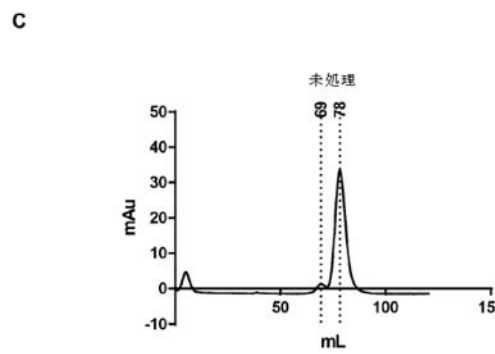
C



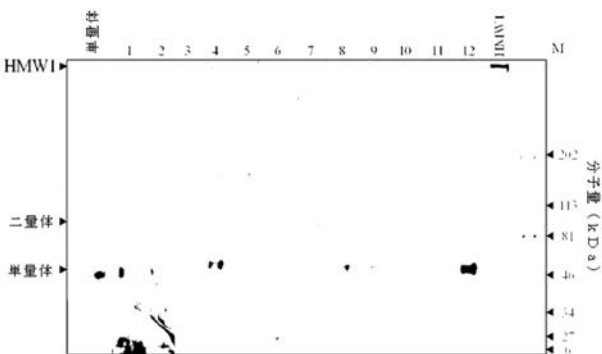
【 図 8 - 1 】



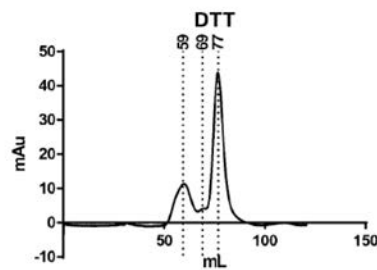
【 図 8 - 2 】



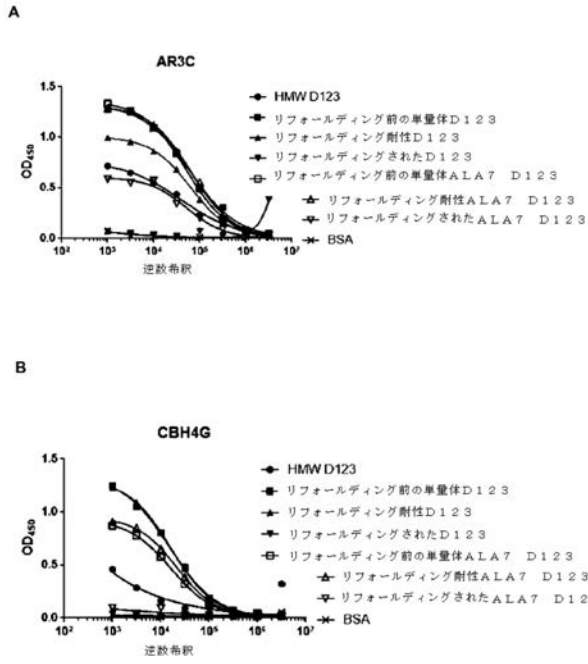
B



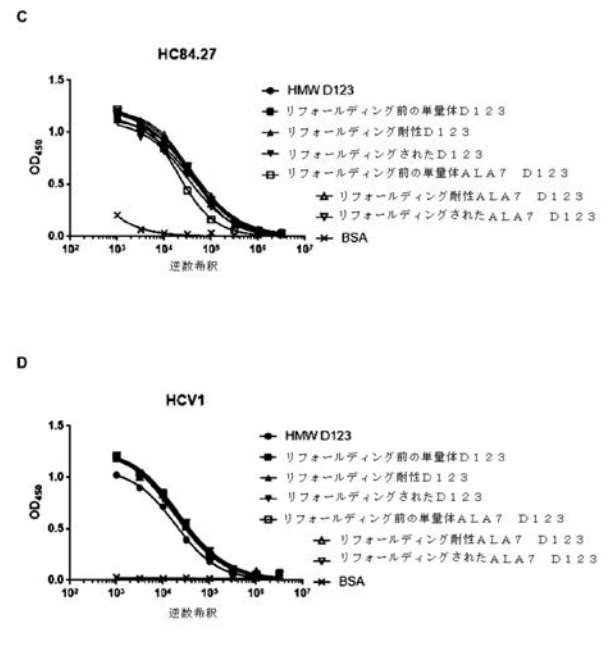
D



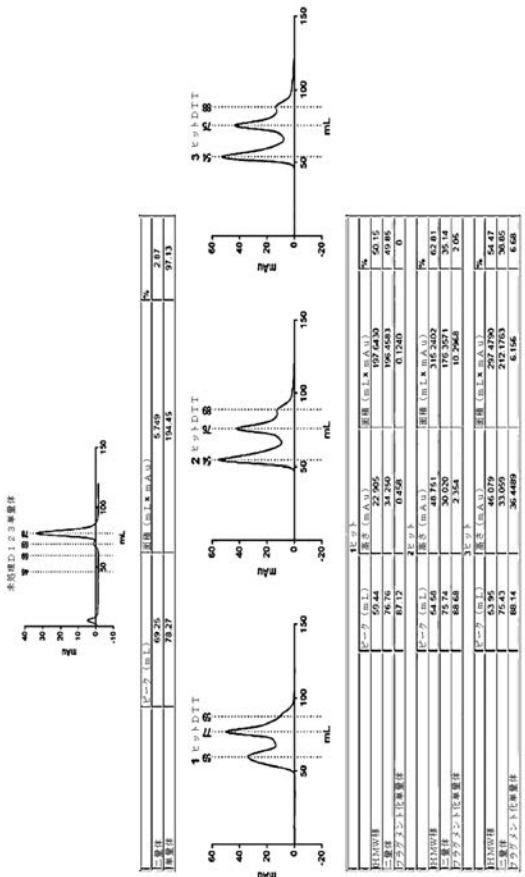
【 図 9 - 1 】



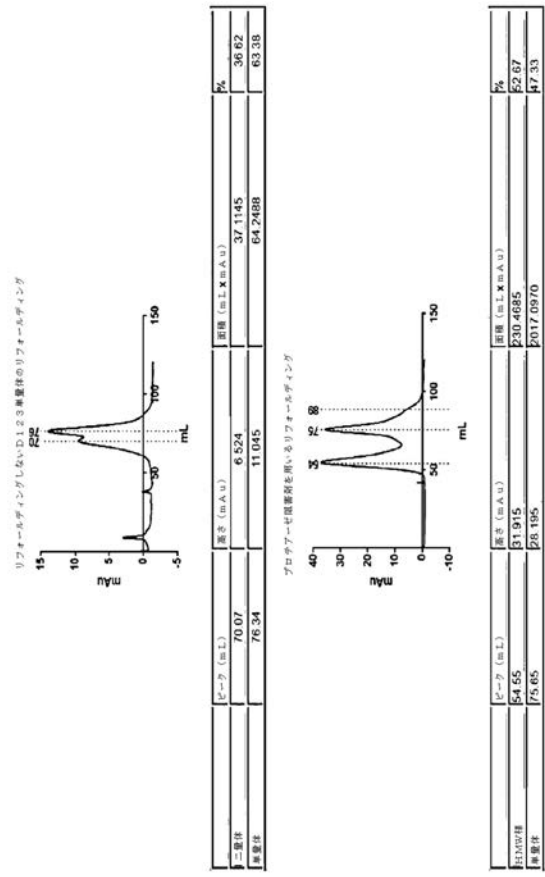
【 図 9 - 2 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】





【 1 4 - 3 】

660  
277  
277  
277  
226

PMITPRCWDYFRLWHYPCNTINTYIFKVRMYVGGVHRLEACNWTGERCDLEDRDS  
PMITPRCWDYFRLWHYPCNTINTYIFKVRMYVGGVHRLEACNWTGERCDLEDRDS  
PMITPRCWDYFRLWHYPCNTINTYIFKVRMYVGGVHRLEACNWTGERCDLEDRDS  
PMITPRCWDYFRLWHYPCNTINTYIFKVRMYVGGVHRLEACNWTGERCDLEDRDS  
PMITPRCWDYFRLWHYPCNTINTYIFKVRMYVGGVHRLEACNWTGERCDLEDRDS  
\*\*\*\*\*

720  
337  
278  
278  
227

ELSPLLSTTOMQVLPFCSTTIPALSTGLHLHONIVDVOYLVGGSSIASWALKMEYVW  
E-----  
E-----  
E-----

780  
363  
278  
278  
227

LLFLLADRVCSCILMMWLLISQEALENIILNRAASLACTHGLVSLVFFCFANKLHG  
LLFLLADRVCSCILMMWLLISQEA-----  
-----  
-----

840  
363  
278  
278  
227

RWTFGVAFYFKWFLLLLLLLLALPQRVALDTEVAQCSGVVVLGMLALFLSFFYRYS  
-----  
-----  
-----

14 (続き)

【 1 4 - 4 】

900  
363  
278  
278  
227

WCMWLOYLTVRVAQLVWVPELNVGRGSDAVILLMCVVHPTLVFDTKLLLALFGPFW  
-----  
-----  
-----

960  
363  
278  
278  
227

LIQASLLKPVFVYVQGLRICALARKLAGHYVQMAIKLGAITQTVVNHLPRLDWA  
-----  
-----  
-----

102C  
363  
278  
278  
227

HNGLRDLAVAVEPVVYSRMETHLITWADYACGDIINGLVPASRRQEEILGPDQRWYS  
-----  
-----  
-----

108C  
363  
278  
278  
227

KGWLLAPITAYAOQTGSLLSCLITSLTRDRKNQVEVOIVSTATQTFILATCINGVWT  
-----  
-----  
-----

114C  
363  
278  
278  
227

VYHGSATRTIASPKGPIYCKYINVDODLVGMPAQSRSLTFCCTGSSDLYLVTRHADVI  
-----  
-----  
-----

14A

【 1 4 - 5 】

1200  
363  
278  
278  
227

PVRRRDSRGLSRRPPLSYLKGSSGSLPCFAGHVGILFRAAVCTRGVAKAVIFIPVEN  
-----  
-----  
-----

1260  
363  
278  
278  
227

LETTMRSPVFTDMSRFAVFSQVAHLHAPTGSCKTRVRAVAQCYKVLNINYSVA  
-----  
-----  
-----

1320  
363  
278  
278  
227

TLGGVANSKAGVDPNIRKTVRVTITGSGPITVSYGRTLAXGCGSGGAVDILICDCHS  
-----  
-----  
-----

1380  
363  
278  
278  
227

TQATSLIGSTVLDQNETAGRLVLAETPERSVTVSHNIEVALSTGEIFPKWAI  
-----  
-----  
-----

1440  
363  
278  
278  
227

PLAVIKGRHLLFCHSKKCKDELAERVALGNAVAYRGLDVSVIPFSGDWWWSTIAL  
-----  
-----  
-----

14A (続き)

【 1 4 - 6 】

1500  
363  
278  
278  
227

KRGTSGFDSVDCNCTVQTVDFSLDPTFTIITTLPODRAVSRQRTGRKPKFSIYR  
-----  
-----  
-----

1560  
363  
278  
278  
227

FVAPGERBSGFDSSVLCYDAGCANVELTFAETVRLRANVNTGLPYCDDHLEWES  
-----  
-----  
-----

1620  
363  
278  
278  
227

VFTGLUTHIDAMFLSQYKQSGENFPVVAQATYCARAGAPFSPKQKWCILRLKPTLHG  
-----  
-----  
-----

1680  
363  
278  
278  
227

FTFLLYRLGAVQNEVLTHTPIKIMTCMSADLEVVSTWVLSVLAALAAVCLSTGV  
-----  
-----  
-----

14A (続き)

【 ☒ 1 4 - 7 】

1740	VIVGRIVLSGKFAIIPDBEVLYQFDEMEKESQHIPIYICQRWMLAQPKKALGLOIOTAS
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
1800	ROAEVITPAVQTNWVKLEVFNAKIMNNEFISGQYLAGLSTLPCNPAIASLMAFTAATVSP
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
1860	LITQQTILFNILGWRVAQIAPFGAATAFVAGLAGAATGVSIGKVIIDILAGYGAVVA
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
1920	GALVAFKIMSVEVPESTEDLVNLLPALLSPGALVGVVCAALIRRHVGHGEGAVQWNRLLI
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
1980	AFASGNHVSFTHYFESDAAARVALLSLLVTLRLRHQWISSECTTFCSSMERDI
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----

【 ☒ 1 4 - 9 】

2340	FARALPWARPDYNPELVEITWKKDYEPVWHGCEPLPPRSPPVPPNKKRTVVLTSTL
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2400	STALAEATKGFSSSTGIZGDMTTSSEPAESGPPDSVSEYSRPPLEGEQDPL
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2460	SDCSMTVSSGADTEIVVCCSMYSWTGALVTPCARFKOKLPIINALSNLLRHHNLVYST
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2520	TSRSACOROKV7FDRLQVLDHSYQVLEKYKAAKSKYKANLLSVEACSETFHSANSK
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----

14B

14B (続き)

【 ☒ 1 4 - 8 】

2040	WDMICEVLSDFKIMKAKLMPQLPGIPFVYQCRGVWGRSDIMKTRCHCGAEITGHVK
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2100	NGTMRIVGRTCRNWSGTFINAVTIGDCTLPAINYKFAIMRVSAEYVEIRRVGDFH
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2160	YVSGMTTUNLKPCFOIPSPBEFTELDGVRUHRFAPPKPLIREEYSKVGELHEYPVGSOL
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2220	FCPEPDAVULSMITDFSHITAAAGRLANGSFPMSASSASQISAPSLKATCTANHD
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2280	SFPAELIEMLLWQEMGNITRVSERNKVVILDSDFPLVAEEDEREYVPAEIRKRRR
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----

14B (続き)

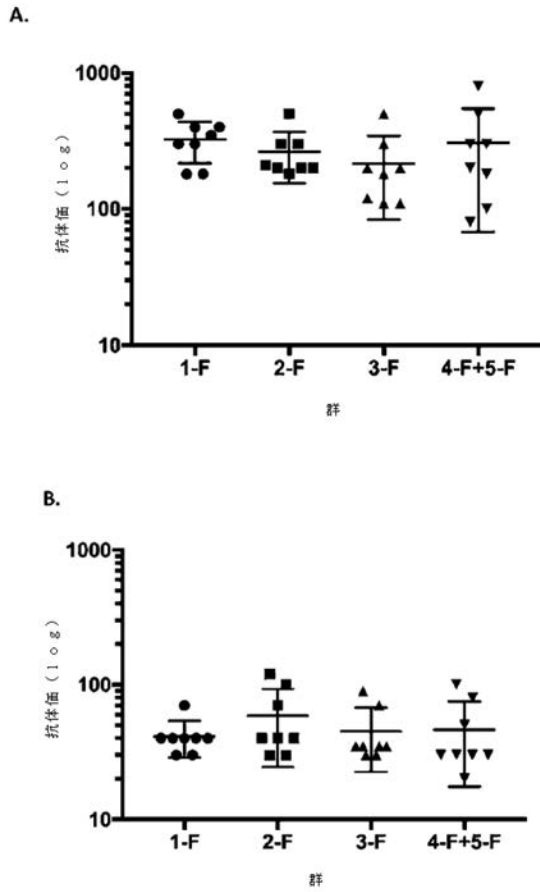
【 ☒ 1 4 - 10 】

2580	FYSGAKVCHARKAVAHINSWKDLEDVTPEDITIMARNEVFCYQPKGRKPARLLI
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2640	VFDLQVAVGERMALYDVVSKLEJAVNGSSYGFQYSGQRVEELVQAKSKRTMGFSYD
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2700	TRCFDSTWTSBIRTKFALYQCCDLDPOARVAIKSLTELYVGSPELTMGRGNCGYBRCR
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2760	ASGVLTSCGNLFCYIKARACRANGLOCTMVLGGBDELVYCSAGVQEDASLPAFT
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----
2820	EAMRTSAPFGDPPQPEYDLELITSCSSNVSVAHSGAKRVYVLTTRDFTTPJARAAMETA
363	-----
278	-----
278	-----
227	-----

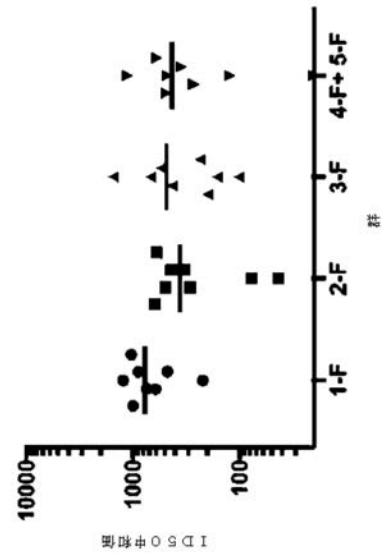
14C



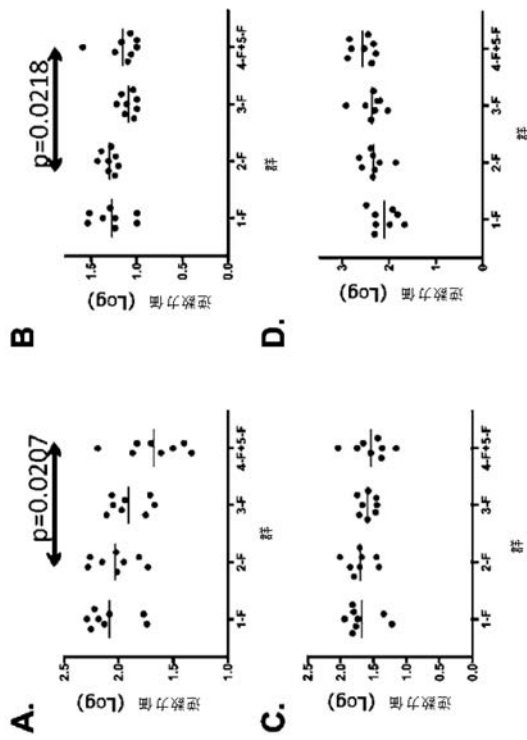
【 図 2 0 】



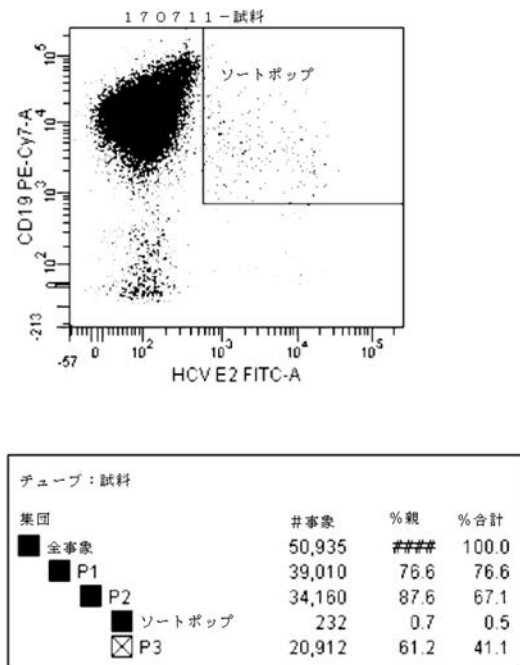
【 図 2 1 】



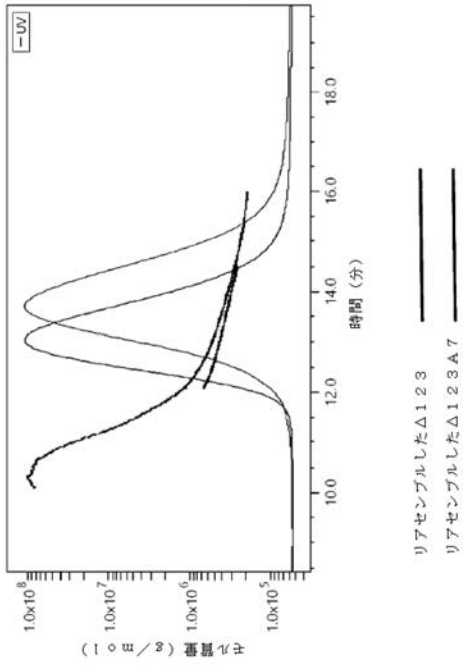
【 図 2 2 】



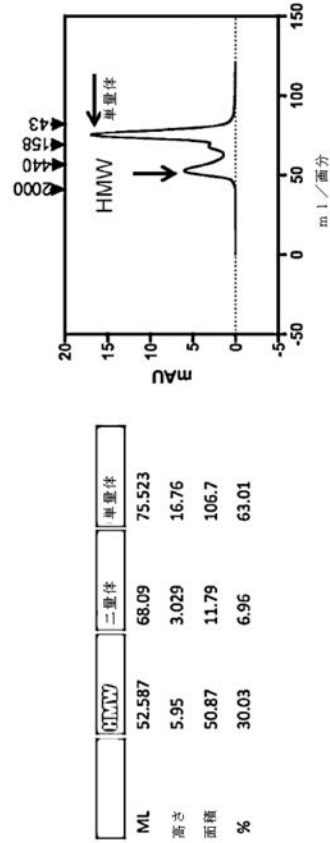
【 図 2 3 】



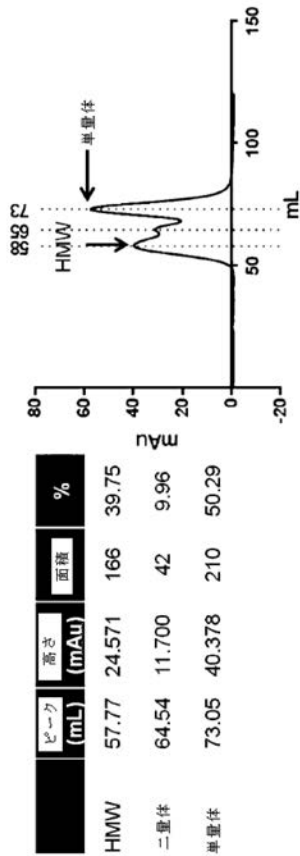
【 図 2 4 】



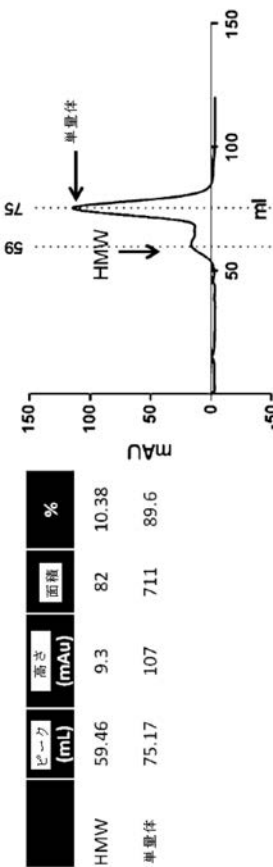
【 図 2 5 】



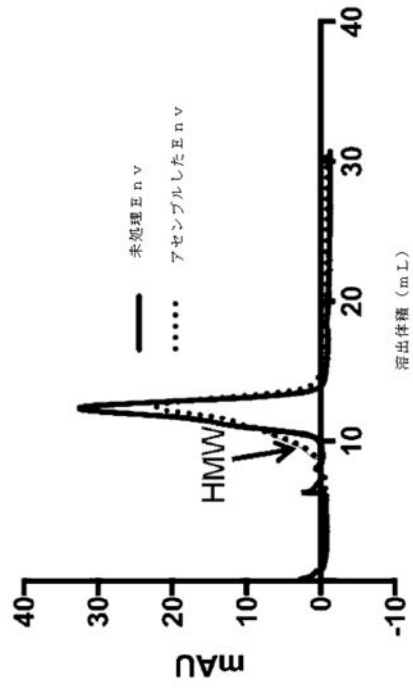
【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 配列表 】

2020500837000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2017/051037
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>C07K 1/02 (2006.01) C07K 14/18 (2006.01) A61K 39/29 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01) G01N 33/576 (2006.01)</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Search conducted in databases WPIAP, EPODOC, MEDLINE, all full text English language databases, CAPLUS, BIOSIS and EMBASE and Google (Internet search) using the following relevant CPC/IPC classification codes and keywords: C07K1/00, HCV, E2, oligomer, higher order, lower order, reducing agent, oxidising, refold, assemble, conserved cysteine, HVR1, HVR2, IGVR, extracellular, cell free, non-neutralizing and related terms. Search of the Applicant and Inventor names using the databases AusPat, Patentscope, PubMed and IP Australia internal databases.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 22 December 2017	Date of mailing of the international search report 22 December 2017	
<b>Name and mailing address of the ISA/AU</b>  AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au	<b>Authorised officer</b>  Shawn Lyons AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832081	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/AU2017/051037
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 1996/004385 A2 (INNOGENETICS N.V.) 15 February 1996 See the abstract; page 11, lines 28-32; the paragraph bridging pages 12 and 13; page 7, lines 19-28; page 2, lines 22-25; page 12, line 28; page 25, lines 4-9; page 2, line 22 - page 3, line 26; page 22, line 33 - page 27, line 3; page 21, lines 24-27	1-29
X	WO 2003/051912 A2 (INNOGENETICS N.V.) 26 June 2003 See the abstract; page 12, lines 17-21; page 13, lines 15-28; page 8, lines 15-24; page 8, lines 25-33; page 13, line 17; page 3, lines 28-30; page 25, lines 18-22; page 39, line 1 - page 49, line 20; page 25, lines 2-13; page 22, lines 8-11	1-29
X	WO 2003/052122 A2 (THE GOVERNMENT OF THE USA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 26 June 2003 See Examples 2 and 3; paragraph [0134]; paragraphs [0135]-[0142]; paragraphs [0008] and [0013]; paragraphs [0012] and [0068]; [0008] and [0043]; paragraph [0139]	1-5, 9-13, 17-18, 20 and 23-28
A	WO 2012/016290 A1 (THE MACFARLANE BURNET INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH LTD; POUMBOURIOS, P.) 09 February 2012 See page 5, lines 28-29; Example 5	6 and 8
A	MCCAFFREY K. et al., "Role of Conserved Cysteine Residues in Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Folding and Function", Journal of Virology, 2012, Vol. 86, No. 7, pages 3961-3974 See the abstract	6 and 8
A	WO 2008/022401 A1 (THE MACFARLANE BURNET INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH LIMITED) 28 February 2008 See page 3, lines 23-26; page 25, line 19 - page 26, line 15	1-29
A	WO 2012/068637 A1 (THE MACFARLANE BURNET INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH) 31 May 2012 See paragraphs [0112] and [0116]	6 and 7
A	DRUMMER H.E., "Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies", Frontiers in Microbiology, 2014, Vol. 5, Article 329 [online], [retrieved on 5 July 2017], Retrieved from the Internet <URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4080681/pdf/fmicb-05-00329.pdf">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4080681/pdf/fmicb-05-00329.pdf</a> > <DOI: 10.3389/fmicb.2014.00329> See the section entitled 'Interference of neutralization by variable regions of E2'; the section entitled 'Variable regions of the E2 Glycoprotein'	6 and 7
A	ALHAMMAD Y. et al., "Monoclonal Antibodies Directed toward the Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Detect Antigenic Differences Modulated by the N-Terminal Hypervariable Region 1 (HVR1), HVR2, and Intergenotypic Variable Region", Journal of Virology, December 2015, Vol. 89, No. 24, pages 12245-12261 See the abstract	6 and 7
A	RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ M. et al., "Structural properties of the ectodomain of hepatitis C virus E2 envelope protein", Virus Research, 2009, Vol. 139, No. 1, pages 91-99 See the abstract	6
A	MCCAFFREY K. et al., "Expression and Characterization of a Minimal Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Core Domain That Retains CD81 Binding", Journal of Virology, Sept. 2007, Vol. 81, No. 17, pages 9584-9590 See the abstract	6 and 7

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		<b>PCT/AU2017/051037</b>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOODY M.A. et al., "Antigen-Specific B Cell Detection Reagents: Use and Quality Control", Cytometry A, Nov 2008, Vol. 73, No. 11, pages 1086-92 See the section entitled 'Study of B cells via the BCR' on pages 1088-1089	29
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/AU2017/051037</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
WO 1996/004385 A2	15 February 1996	WO 9604385 A2	15 Feb 1996
		AR 026246 A1	05 Feb 2003
		AR 032240 A1	29 Oct 2003
		AU 3382495 A	04 Mar 1996
		AU 708174 B2	29 Jul 1999
		AU 5712799 A	17 Feb 2000
		AU 757962 B2	13 Mar 2003
		AU 4615299 A	10 Jan 2000
		AU 765940 B2	02 Oct 2003
		AU 1005702 A	11 Jul 2002
		AU 784198 B2	23 Feb 2006
		AU 1144501 A	08 May 2001
		AU 2002238502 A1	24 Jul 2002
		AU 2002238502 B2	06 Sep 2007
		BR 0015170 A	25 Jun 2002
		BR 0203518 A	17 Dec 2002
		BR 9506059 A	28 Oct 1997
		BR 9911397 A	15 Jan 2002
		CA 2172273 A1	15 Feb 1996
		CA 2330526 A1	29 Dec 1999
		CA 2387666 A1	03 May 2001
		CA 2400643 A1	18 Jul 2002
		CN 1313864 A	19 Sep 2001
		CN 1384839 A	11 Dec 2002
		CN 1547588 A	17 Nov 2004
		CN 101397335 A	01 Apr 2009
		EP 0721505 A1	17 Jul 1996
		EP 0721505 B1	08 May 2002
		EP 0721505 B2	10 May 2006
		EP 1090033 A1	11 Apr 2001
		EP 1090033 B1	29 Dec 2004
		EP 1090033 B2	19 Dec 2007
		EP 1211315 A1	05 Jun 2002
		EP 1223202 A1	17 Jul 2002
		EP 1223202 B1	07 Apr 2004
		EP 1224214 A1	24 Jul 2002

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/AU2017/051037</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
		EP 1463753 A2	06 Oct 2004
		EP 1555270 A1	20 Jul 2005
		EP 1561470 A1	10 Aug 2005
		EP 1845108 A2	17 Oct 2007
		HK 1037639 A1	29 Apr 2005
		HU 0102478 A2	28 Oct 2001
		HU 227275 B1	28 Jan 2011
		HU 0203195 A2	28 Dec 2002
		HU 0302416 A2	28 Oct 2003
		IL 140217 A	22 Sep 2009
		JP 2004222729 A	12 Aug 2004
		JP 3892443 B2	14 Mar 2007
		JP 2007105038 A	26 Apr 2007
		JP 4105203 B2	25 Jun 2008
		JP H09503396 A	08 Apr 1997
		JP 2002518037 A	25 Jun 2002
		JP 2003513022 A	08 Apr 2003
		JP 2004525885 A	26 Aug 2004
		KR 20020047286 A	21 Jun 2002
		MX PA02004052 A	07 Nov 2002
		MX PA02008886 A	25 Apr 2003
		NO 20021993 A	27 Jun 2002
		NO 20024325 A	11 Nov 2002
		NZ 508797 A	27 Feb 2004
		NZ 518095 A	26 Sep 2003
		NZ 521299 A	26 Aug 2005
		NZ 528952 A	24 Sep 2004
		PL 345018 A1	19 Nov 2001
		PL 201679 B1	30 Apr 2009
		PL 354990 A1	22 Mar 2004
		PL 363175 A1	15 Nov 2004
		RU 2002121632 A	20 Mar 2004
		RU 2002109480 A	10 Mar 2004
		SG 71728 A1	18 Apr 2000
		US 6150134 A	21 Nov 2000
		US 6245503 B1	12 Jun 2001

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/AU2017/051037</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
		US 6635257 B1	21 Oct 2003
		US 2002128367 A1	12 Sep 2002
		US 6664327 B2	16 Dec 2003
		US 6890737 B1	10 May 2005
		US 2002182706 A1	05 Dec 2002
		US 7026457 B2	11 Apr 2006
		US 2003147918 A1	07 Aug 2003
		US 7101561 B2	05 Sep 2006
		US 2003118603 A1	26 Jun 2003
		US 7108855 B2	19 Sep 2006
		US 2003036110 A1	20 Feb 2003
		US 2003095980 A1	22 May 2003
		US 2003202987 A1	30 Oct 2003
		US 2004185061 A1	23 Sep 2004
		US 2005037018 A1	17 Feb 2005
		US 2006275323 A1	07 Dec 2006
		US 2007048281 A1	01 Mar 2007
		US 2007128721 A1	07 Jun 2007
		US 2008138894 A1	12 Jun 2008
		WO 0130815 A1	03 May 2001
		WO 9967285 A1	29 Dec 1999
		WO 02055548 A2	18 Jul 2002
		ZA 200007318 B	10 Mar 2003
		ZA 200203169 B	23 Sep 2003
		ZA 200207272 B	13 Feb 2004

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b> Information on patent family members		International application No. <b>PCT/AU2017/051037</b>	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
<b>Patent Document/s Cited in Search Report</b>		<b>Patent Family Member/s</b>	
<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>	<b>Publication Number</b>	<b>Publication Date</b>
WO 2003/051912 A2	26 June 2003	WO 03051912 A2	26 Jun 2003
		AU 2002361160 A1	30 Jun 2003
		AU 2002361160 B2	03 Jul 2008
		BR 0215081 A	19 Oct 2004
		CA 2468690 A1	26 Jun 2003
		CN 1622828 A	01 Jun 2005
		EP 1461080 A2	29 Sep 2004
		JP 2005516939 A	09 Jun 2005
		KR 20040076869 A	03 Sep 2004
		MX PA04005891 A	13 Sep 2004
		NZ 533396 A	29 Apr 2005
		RU 2004116914 A	20 Apr 2005
		US 2004126395 A1	01 Jul 2004
		ZA 200405218 B	12 Jul 2005
WO 2003/052122 A2	26 June 2003	WO 03052122 A2	26 Jun 2003
		AU 2002360673 A1	30 Jun 2003
		EP 1463521 A2	06 Oct 2004
		US 2006165715 A1	27 Jul 2006
WO 2012/016290 A1	09 February 2012	WO 2012016290 A1	09 Feb 2012
		AU 2011286168 A1	21 Feb 2013
		AU 2011286168 B2	28 May 2015
		CA 2840993 A1	09 Feb 2012
		CN 103354748 A	16 Oct 2013
		CN 103354748 B	28 Sep 2016
		EP 2600894 A1	12 Jun 2013
		EP 2600894 B1	01 Feb 2017
		US 2013224246 A1	29 Aug 2013
		US 9079950 B2	14 Jul 2015
WO 2008/022401 A1	28 February 2008	WO 2008022401 A1	28 Feb 2008
		AU 2007288129 A1	28 Feb 2008
		AU 2007288129 B2	07 Mar 2013
		CA 2661814 A1	28 Feb 2008
		CN 101563362 A	21 Oct 2009

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2017/051037	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		CN 101563362 B	11 Feb 2015
		EP 2061805 A1	27 May 2009
		JP 2010501594 A	21 Jan 2010
		JP 5674310 B2	25 Feb 2015
		JP 2014240427 A	25 Dec 2014
		JP 5999524 B2	28 Sep 2016
		KR 20090053930 A	28 May 2009
		KR 101500017 B1	09 Mar 2015
		US 2011014209 A1	20 Jan 2011
		US 8535686 B2	17 Sep 2013
		US 2014120127 A1	01 May 2014
		US 9598467 B2	21 Mar 2017
WO 2012/068637 A1	31 May 2012	WO 2012068637 A1	31 May 2012
		AU 2011334543 A1	11 Apr 2013
		AU 2011334543 B2	21 May 2015
		CA 2856565 A1	31 May 2012
		CN 103533956 A	22 Jan 2014
		CN 104324373 A	04 Feb 2015
		EP 2643015 A1	02 Oct 2013
		HK 1201451 A1	04 Sep 2015
		JP 2014502959 A	06 Feb 2014
		JP 5897024 B2	30 Mar 2016
		KR 20140036127 A	25 Mar 2014
		US 2013323282 A1	05 Dec 2013
<b>End of Annex</b>			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	A
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/21 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/21	
C 1 2 N 15/33 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
	C 1 2 N 15/33	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100186897

弁理士 平川 さやか

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ドラマー, ヘイジ

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクフ  
アーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリッ  
ク ヘルス リミテッド内

(72)発明者 ポームボーリス, パンテリス

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクフ  
アーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリッ  
ク ヘルス リミテッド内

(72)発明者 センター, ロバート

オーストラリア国 3 0 0 4 ビクトリア州 メルボルン コマーシャル ロード 8 5 マクフ  
アーレン バーネット インスティテュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリッ  
ク ヘルス リミテッド内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QQ36 QR66 QS36 QS39 QX02

4C085 AA03 AA38 BA01 BA51 BA69 BA87 BA92 BB01 CC08 DD53

DD58 EE01 EE06 FF24 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA53 CA01 DA76 DA86 EA20 FA74

GA26

专利名称(译)	组装糖蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2020500837A</a>	公开(公告)日	2020-01-16
申请号	JP2019517034	申请日	2017-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	麥克法蘭博尼特醫學健康研究公司		
申请(专利权)人(译)	麦克法兰地榆医学研究所和公共保健品有限公司		
发明人	ドラー,ヘイジ ポームポリス,パンテリス センター,ロバート		
IPC分类号	C07K1/113 C07K14/005 C07K14/82 C07K16/08 C12Q1/04 A61P43/00 A61P37/04 A61P31/14 A61P35/00 A61P31/12 A61P31/18 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/12 A61K39/29 A61K39/21 G01N33/53 C12N15/33		
CPC分类号	A61K39/12 A61K2039/645 A61P31/14 C07K1/1133 C07K1/13 C07K1/22 C07K14/005 C12N2770 /24234 G01N33/5047 G01N33/5052 G01N33/5767 A61K39/29 C07K16/109 C07K2317/33 C07K2317 /76 C12N2770/24222 G01N33/56966		
FI分类号	C07K1/113.ZNA C07K14/005 C07K14/82 C07K16/08 C12Q1/04 A61P43/00.121 A61P37/04 A61P31 /14 A61P35/00 A61P31/12 A61P31/18 A61K39/00.A A61K39/39 A61K39/12 A61K39/00.H A61K39/29 A61K39/21 G01N33/53.Y C12N15/33		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QR66 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4C085 /AA03 4C085/AA38 4C085/BA01 4C085/BA51 4C085/BA69 4C085/BA87 4C085/BA92 4C085/BB01 4C085/CC08 4C085/DD53 4C085/DD58 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24 4C085/GG02 4C085 /GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74 4H045 /GA26		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
优先权	2016903961 2016-09-29 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
一种由天然的低级抗原制备细胞外组装的高阶抗原的方法，该方法包括以下步骤：(i)使低级抗原与包含还原剂的溶液接触一段时间，并在5种条件下足以还原一种或多种天然的抗原半胱氨酸(ii)去除或稀释还原剂或使还原的低级抗原与氧化剂接触，以引起低级抗原从(i)组装成组装的高级抗原；其中至少10%的低阶抗原在步骤(ii)中转化为高阶抗原，从而与低阶抗原相比，组装的高阶抗原10与非中和抗体的结合至少降低，并保持与至少一种中和抗体。一种生产疫苗组合物的方法，该方法包括遵循该方法的步骤，然后将组装的高级抗原与药学或生理上可接受的稀释剂，载体或佐剂混合。一种包含15种高阶细胞外组装抗原的组合物，其中与天然对照的高阶抗原相比，所述组装抗原显示出对非中和抗体的至少降低的结合。组装的高阶抗原用于刺激免疫应答或用于检测和/或分离对抗原具有特异性的免疫细胞，例如B细胞的用途。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表番号 特表2020-500837 (P2020-500837A) (43) 公表日 令和2年1月16日(2020.1.16)
(51) Int. Cl. C07K 1/113 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01) C07K 14/82 (2006.01) C07K 16/08 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)	FI C07K 1/113 ZNA C07K 14/005 C07K 14/82 C07K 16/08 C12Q 1/04	テーマコード(参考) 4B063 4C085 4H045
(21) 出願番号 特願2019-517034(P2019-517034)	(71) 出願人 510332958 マクファレーン バーネット インスティ テュート フォー メディカル リサーチ アンド パブリック ヘルス リミテッ ド MACFARLANE BURNET I NSTITUTE FOR MEDICA L RESEARCH AND PUBL IC HEALTH LTD オーストラリア国 3004 ビクトリア 州メルボルン コマーシャル ロード 85	(74) 代理人 100092783 弁理士 小林 浩
(86) (22) 出願日 平成29年9月22日(2017.9.22)	(87) 国際公開日 平成30年4月5日(2018.4.5)	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く
(85) 翻訳文提出日 令和1年5月21日(2019.5.21)	(31) 優先権主張番号 2016903961	(54) 【発明の名称】アセンブルした糖タンパク質
(88) 国際出願番号 PCT/AU2017/051037	(32) 優先日 平成28年9月29日(2016.9.29)	
(89) 国際公開番号 W02018/058177	(33) 優先権主張国・地域又は機関 オーストラリア(AU)	
(87) 国際公開日 平成30年4月5日(2018.4.5)		
(31) 優先権主張番号 2016903961		
(32) 優先日 平成28年9月29日(2016.9.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 オーストラリア(AU)		

最終頁に続く