(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2005-516939
(P2005-516939A)
(43)公表日　平成17年6月9日(2005.6.9)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 39/29	A61K 39/29		4B024
A61K 39/395	A61K 39/395	N	4C085
A61P 1/16	A61P 1/16		
A61P 31/12	A61P 31/12		
G01N 33/53	G01N 33/53	N	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 191 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-552792 (P2003-552792)
(86)(22)出願日　平成14年12月18日 (2002.12.18)
(85)翻訳文提出日　平成16年6月18日 (2004.6.18)
(86)国際出願番号　PCT/EP2002/014480
(87)国際公開番号　WO2003/051912
(87)国際公開日　平成15年6月26日 (2003.6.26)
(31)優先権主張番号　10/020,510
(32)優先日　平成13年12月18日 (2001.12.18)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/418,358
(32)優先日　平成14年10月16日 (2002.10.16)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　399044160
イノジェネティックス・ナムローゼ・フェンノートシャップ
ＩＮＮＯＧＥＮＥＴＩＣＳ　Ｎ．Ｖ．
ベルギー、ベー－９０５２ヘント、テヒノロギーパルク６番
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100116311
弁理士　元山　忠行
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】診断及び治療用途の精製Ｃ型肝炎ウイルス外被タンパク質

(57)【要約】
本発明は、Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２からなる群の中から選択された組換え型ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質を精製するための方法であって、組換えにより発現されたタンパク質を単離するべく形質転換された宿主細胞を溶解させた時点で、ジスルフィド結合開裂剤を用いたジスルフィド結合開裂又は還元工程が実施されることを特徴とする方法に関する。本発明は同様に、かかる方法により単離された組成物にも関する。本発明は同様に、これらの組成物の診断及び治療的応用にも関する。さらに、本発明は、ＨＣＶ治療の臨床的有効性及び／又は臨床的成果を予後診断し、監視することを目的としたＨＣＶＥ１タンパク質及びペプチドの使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物における肝疾患を低減させるための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項２】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物における肝線維症の進行を抑制するための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項３】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物における肝線維症を低減させるための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項４】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物において、全Ｉｓｈａｋ評点に従って少なくとも２点だけ肝疾患を低減させるための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項５】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物においてＩｓｈａｋ線維症評点に従って少なくとも１点だけ肝疾患を低減させるための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項６】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物における血清ＡＬＴレベルを低減させるための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項７】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物における脂肪症を低減させるための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項８】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物の肝臓における抗－Ｅ２免疫反応性を低減させるための治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項９】
ＨＣＶ抗原及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項１０】
前記ＨＣＶ抗原がＥ１又はＥ２抗原であるか又はＥ１又はＥ２抗原の免疫原性部分である、請求項９に記載の治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項１１】
前記薬学的に受容可能なアジュバントがミョウバンである、請求項９に記載の治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項１２】
慢性ＨＣＶ感染哺乳動物における肝疾患の変化を予測するための方法であって、
（ｉ）　Ｅ１抗原を含むＨＣＶワクチン組成物を用いた治療用ワクチン接種に先立って血清抗－Ｅ１抗体レベルを決定する工程；
（ｉｉ）　Ｅ１抗原を含むＨＣＶワクチン組成物を用いた治療用ワクチン接種後の血清抗－Ｅ１抗体レベルを決定する工程；
（ｉｉｉ）　（ｉ）及び（ｉｉ）で決定された血清抗－Ｅ１抗体レベルの差を推測し、そこから肝疾患の変化を予測する工程、
を含んで成る方法。
【請求項１３】
Ｅ１タンパク質、Ｅ２タンパク質、前記Ｅ１及びＥ２タンパク質の一部分、精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質又はその一部分から形成されたＥ１／Ｅ２タンパク質複合体からなる群の中から選択された治療上有効な量の少なくとも１つの精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る治療用ＨＣＶワクチン組成物。
【請求項１４】

異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導されたＥ１タンパク質、異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導されたＥ２タンパク質、前記Ｅ１及びＥ２タンパク質の一部分、及び異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導された精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質又はその一部分から形成されたＥ１／Ｅ２タンパク質複合体からなる群の中から選択された治療上有効な量の少なくとも２つの精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質の組合せ、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る治療用ＨＣＶワクチン組成物。

【請求項１５】

治療上有効な量の下記のＥ１及びＥ２ペプチド：

コア／Ｅ１Ｖ１領域のアミノ酸１８１～２００にわたるＥ１～３１（配列番号５６）、

Ｅ１領域のアミノ酸１９３～２１２にわたるＥ１～３３（配列番号５７）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０５～２２４にわたるＥ１～３５（配列番号５８）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０８～２２７にわたるＥ１～３５Ａ（配列番号５９）、

Ｅ１領域Ｖ１、Ｃ１及びＶ２領域のアミノ酸１９２～２２８にわたる１ｂＥ１（配列番号５３）、

Ｅ１領域のアミノ酸３０１～３２０にわたるＥ１～５１（配列番号６６）、

Ｅ１Ｃ４領域のアミノ酸３１３～３３２にわたるＥ１～５３（配列番号６７）、

Ｅ１領域のアミノ酸３２５～３４４にわたるＥ１～５５（配列番号６８）、

Ｅ２領域のアミノ酸位置３９７～４１８にわたるＥｎｖ６７又はＥ２～６７（配列番号７２）、

Ｅ２領域のアミノ酸位置４０９～４２８にわたるＥｎｖ６９又はＥ２～６９（配列番号７３）、

Ｅ２領域の位置５８３～６０２にわたるＥｎｖ２３又はＥ２～２３（配列番号８６）、

Ｅ２領域の位置５９５～６１４にわたるＥｎｖ２５又はＥ２～２５（配列番号８７）、

Ｅ２領域の位置６０７～６２６にわたるＥｎｖ２７又はＥ２～２７（配列番号８８）、

Ｅ２領域の位置５４７～５８６にわたるＥｎｖ１７Ｂ又はＥ２～１７Ｂ（配列番号８３）、

Ｅ２領域の位置５２３～５４２にわたるＥｎｖ１３Ｂ又はＥ２～１３Ｂ（配列番号８２）、

Ｅ１領域の位置１９２～２１１にわたるＩＧＰ１６２６（配列番号１１２）、

Ｅ１領域の位置２０４～２２３にわたるＩＧＰ１６２７（配列番号１１３）、

Ｅ１領域の位置２１６～２３５にわたるＩＧＰ１６２８（配列番号１１４）、

Ｅ１領域の位置２２８～２４７にわたるＩＧＰ１６２９（配列番号１１５）、

Ｅ１領域の位置２４０～２５９にわたるＩＧＰ１６３０（配列番号１１６）、

Ｅ１領域の位置２５２～２７１にわたるＩＧＰ１６３１（配列番号１１７）、

Ｅ１領域の位置２６４～２８３にわたるＩＧＰ１６３２（配列番号１１８）、

Ｅ１領域の位置２７６～２９５にわたるＩＧＰ１６３３（配列番号１１９）、

Ｅ１領域の位置２８８～３０７にわたるＩＧＰ１６３４（配列番号１２０）、

Ｅ１領域の位置３００～３１９にわたるＩＧＰ１６３５（配列番号１２１）、

Ｅ１領域の位置３１２～３３１にわたるＩＧＰ１６３６（配列番号１２２）、

のうちの少なくとも１つのペプチド、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る治療用ＨＣＶワクチン組成物。

【請求項１６】

Ｅ１タンパク質、Ｅ２タンパク質、前記Ｅ１及びＥ２タンパク質の一部分、精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質又はその一部分から形成されたＥ１／Ｅ２タンパク質複合体からなる群の中から選択された治療上有効な量の少なくとも１つの精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る治療用ＨＣＶ組成物。

【請求項１７】

異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導されたＥ１タンパク質、異なるＨＣＶ遺伝子型

又は亜型から誘導されたＥ２タンパク質、前記Ｅ１及びＥ２タンパク質の一部分、及び異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導された精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質又はその一部分から形成されたＥ１／Ｅ２タンパク質複合体からなる群の中から選択された治療上有効な量の少なくとも２つの精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質の組合せ、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る治療用ＨＣＶ組成物。

【請求項１８】

治療上有効な量の下記のＥ１及びＥ２ペプチド：

コア／Ｅ１Ｖ１領域のアミノ酸１８１～２００にわたるＥ１～３１（配列番号５６）、

Ｅ１領域のアミノ酸１９３～２１２にわたるＥ１～３３（配列番号５７）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０５～２２４にわたるＥ１～３５（配列番号５８）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０８～２２７にわたるＥ１～３５Ａ（配列番号５９）、

Ｅ１領域Ｖ１、Ｃ１及びＶ２領域のアミノ酸１９２～２２８にわたる１ｂＥ１（配列番号５３）、

Ｅ１領域のアミノ酸３０１～３２０にわたるＥ１～５１（配列番号６６）、

Ｅ１Ｃ４領域のアミノ酸３１３～３３２にわたるＥ１～５３（配列番号６７）、

Ｅ１領域のアミノ酸３２５～３４４にわたるＥ１～５５（配列番号６８）、

Ｅ２領域のアミノ酸位置３９７～４１８にわたるＥｎｖ６７又はＥ２～６７（配列番号７２）、

Ｅ２領域のアミノ酸位置４０９～４２８にわたるＥｎｖ６９又はＥ２～６９（配列番号７３）、

Ｅ２領域の位置５８３～６０２にわたるＥｎｖ２３又はＥ２～２３（配列番号８６）、

Ｅ２領域の位置５９５～６１４にわたるＥｎｖ２５又はＥ２～２５（配列番号８７）、

Ｅ２領域の位置６０７～６２６にわたるＥｎｖ２７又はＥ２～２７（配列番号８８）、

Ｅ２領域の位置５４７～５８６にわたるＥｎｖ１７Ｂ又はＥ２～１７Ｂ（配列番号８３）、

Ｅ２領域の位置５２３～５４２にわたるＥｎｖ１３Ｂ又はＥ２～１３Ｂ（配列番号８２）、

Ｅ１領域の位置１９２～２１１にわたるＩＧＰ１６２６（配列番号１１２）、

Ｅ１領域の位置２０４～２２３にわたるＩＧＰ１６２７（配列番号１１３）、

Ｅ１領域の位置２１６～２３５にわたるＩＧＰ１６２８（配列番号１１４）、

Ｅ１領域の位置２２８～２４７にわたるＩＧＰ１６２９（配列番号１１５）、

Ｅ１領域の位置２４０～２５９にわたるＩＧＰ１６３０（配列番号１１６）、

Ｅ１領域の位置２５２～２７１にわたるＩＧＰ１６３１（配列番号１１７）、

Ｅ１領域の位置２６４～２８３にわたるＩＧＰ１６３２（配列番号１１８）、

Ｅ１領域の位置２７６～２９５にわたるＩＧＰ１６３３（配列番号１１９）、

Ｅ１領域の位置２８８～３０７にわたるＩＧＰ１６３４（配列番号１２０）、

Ｅ１領域の位置３００～３１９にわたるＩＧＰ１６３５（配列番号１２１）、

Ｅ１領域の位置３１２～３３１にわたるＩＧＰ１６３６（配列番号１２２）、

のうちの少なくとも１つのペプチド、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る治療用ＨＣＶ組成物。

【請求項１９】

ＨＣＶ特異的抗体の誘発、Ｔ細胞活性の刺激及びサイトカイン分泌の刺激のうちの少なくとも１つのための、請求項１３～１８のいずれか１項に記載の治療用ＨＣＶ組成物。

【請求項２０】

前記Ｅ１、Ｅ２又はＥ１／Ｅ２タンパク質複合体が誘導された単数又は複数のＨＣＶ遺伝子型とは異なるＨＣＶ遺伝子型に感染したＨＣＶキャリヤにおいて治療上有効である請求項１３～１８のいずれか１項に記載の治療用ＨＣＶ組成物。

【請求項２１】

下記のＥ１及びＥ２ペプチド：

Ｅ１領域の位置１９２～２１１にわたるＩＧＰ１６２６（配列番号１１２）、
Ｅ１領域の位置２０４～２２３にわたるＩＧＰ１６２７（配列番号１１３）、
Ｅ１領域の位置２１６～２３５にわたるＩＧＰ１６２８（配列番号１１４）、
Ｅ１領域の位置２２８～２４７にわたるＩＧＰ１６２９（配列番号１１５）、
Ｅ１領域の位置２４０～２５９にわたるＩＧＰ１６３０（配列番号１１６）、
Ｅ１領域の位置２５２～２７１にわたるＩＧＰ１６３１（配列番号１１７）、
Ｅ１領域の位置２６４～２８３にわたるＩＧＰ１６３２（配列番号１１８）、
Ｅ１領域の位置２７６～２９５にわたるＩＧＰ１６３３（配列番号１１９）、
Ｅ１領域の位置２８８～３０７にわたるＩＧＰ１６３４（配列番号１２０）、
Ｅ１領域の位置３００～３１９にわたるＩＧＰ１６３５（配列番号１２１）、
Ｅ１領域の位置３１２～３３１にわたるＩＧＰ１６３６（配列番号１２２）、
のうちの少なくとも１つのペプチド、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る治療用ＨＣＶ組成物。

【請求項２２】

前記Ｅ１又はＥ２抗原、前記組換え型ＨＣＶ外被タンパク質又は前記Ｅ１及びＥ２ペプチドのシステインが遮断されている、請求項１０及び１３～２１のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２３】

前記Ｅ１又はＥ２抗原又は前記組換え型ＨＣＶ外被タンパク質がウイルス様粒子として添加されている、請求項１０、１３、１４、１６、１７、１９、２０及び２２のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２４】

前記Ｅ１抗原又は前記組換え型ＨＣＶＥ１外被タンパク質がＥ１ｓタンパク質である、請求項１０、１３、１４、１６、１７、１９、２０及び２２のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２５】

前記Ｅ１抗原又は前記Ｅ１ｓタンパク質が配列番号１２３によって定義づけされている、請求項２４に記載の組成物。

【請求項２６】

前記ＨＣＶ抗原又は前記組換え型ＨＣＶ外被タンパク質が組換え型哺乳動物細胞、組換え型酵母細胞又は組換え型ウイルスによって産生される、請求項１～１０、１３、１４、１６、１７、１９、２０及び２２～２５のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２７】

前記ペプチドが組換え型ペプチド又は合成ペプチドである、請求項１５及び１８～２５のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２８】

ＨＣＶに感染した哺乳動物を治療するための請求項１～１１及び１３～２７のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項２９】

前記哺乳動物がヒトである、請求項１～１１及び２８のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項３０】

前記哺乳動物がヒトである請求項１２に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（技術分野）

本発明は、組換え型タンパク質発現、組換え型タンパク質の精製、合成ペプチド、ＨＣＶ感染の診断、ＨＣＶ感染に対する予防的治療という一般的分野及び、慢性肝炎を患う個体の治療の臨床的効率の予後診断／監視又は自然疾患の予後診断／監視に関する。

【０００２】

より詳細には、本発明は、Ｃ型肝炎ウイルス外被タンパク質のための精製方法、本発明

で記載された方法に従って精製されたＨＣＶ外被タンパク質の診断、予防又は療法における使用、疾病を監視するための検定、及び／又は疾病の診断及び／又は疾病の治療における単一又は特異的オリゴマーＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２外被タンパク質の使用に関する。本発明は、同様に、Ｅ１及び／又はＥ２外被タンパク質のエピトープ及びそれに対するモノクローナル抗体、ならびに診断、予防又は治療におけるそれらの使用にも関する。

【０００３】

（背景技術）

本発明の中で記載されている方法に従った細胞溶解産物から精製されたＥ２タンパク質は、患者の血清の約９５％と反応する。この反応性は、ＣＨＯ細胞から分泌されるＥ２で得られる反応性と類似している（Ｓｐａｅｔｅら、１９９２年）。しかしながら、Ｅ２の細胞内発現された形態は、高いマンノース炭水化物モチーフを含有するため、未変性ウイルス外被タンパク質とより密に類似している可能性があり、これに対し、ＣＨＯ細胞から分泌されたＥ２タンパク質はガラクトシダーゼ及びシアル酸糖部分でさらに修飾されている。Ｅ２のアミノ末端半分がバキュロウイルス系内で発現された場合、複数の患者グループ由来の血清の約１３～２１％しか検出することができない（Ｉｎｏｕｅら、１９９２年）。Ｅ．ｃｏｌｉ由来のＥ２の発現の後、ＨＣＶ血清の反応性はさらに低くなり、１４（Ｙｏｋｏｓｕｋａら、１９９２年）から１７％（Ｍｉｔａら、１９９２年）の範囲内となった。Ｋｏｈａｒａら（１９９２年）及びＨｓｕら（１９９３年）の結果とはきわだった対照をなして、本発明の精製済みのワクチニア発現された組換え型Ｅ１タンパク質を用いると、ＨＣＶ血清の約７５％（そして慢性患者の９５％）が抗－Ｅ１陽性である。Ｋｏｈａｒａらは、ワクチニアウイルス発現されたＥ１タンパク質を使用し、患者の７～２３％において抗－Ｅ１抗体を検出したが、一方Ｈｓｕらは、バキュロウイルス発現されたＥ１を用いて１４／５０（２８％）の血清だけを検出した。

【０００４】

これらの結果は、ヒトの患者血清と外被タンパク質の反応性を高めるためには、優れた発現系のみならず優れた精製プロトコルも必要とされるということを示している。これは、タンパク質の天然の折畳みの保存を保証する本発明の適切な発現系及び／又は精製プロトコル、及び汚染性タンパク質の除去を保証しかつＨＣＶ外被タンパク質の立体配座ひいては反応性を保つ本発明の精製プロトコルを用いて得ることができる。診断的スクリーニング検定のために必要とされる精製済みＨＣＶ外被タンパク質の量は、年間グラム単位の範囲内である。ワクチンを目的とすると、外被タンパク質がさらに一層大量に必要となると思われる。従って、最良の発現構築物を選択するため及び制限されたスケールアップのためにワクチニアウイルス系を使用することが可能であり、複数の酵母菌株から発現された場合、高マンノース炭水化物を含有する単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質の大規模発現及び精製を達成することができる。例えばＢ型肝炎の場合、哺乳動物細胞からのＨＢｓＡｇの製造は、酵母由来のＢ型肝炎ワクチンに比べはるかにコストが高いものであった。

【０００５】

ＨＣＶ感染における壊死－炎症及び線維症の臨床的重要性

ＨＣＶ感染後の肝疾患の変遷は、まさに、患者毎に著しく異なる。急性感染者の約２０％は、自発的に感染を消散させることができるが、一方感染者の８０％は、慢性感染に至るまで進行する。慢性感染は、肝生検の組織学的分析により診断され得るか又は血清中の肝酵素ＡＬＴの存在といったような代理マーカーを用いて診断され得る肝臓内で進行する炎症及び／又は壊死（＝壊死－炎症）を結果としてもたらす。この慢性感染は、肝硬変そして究極的には肝ガンの発生を導く可能性のある線維症の発生の危険性を増大させる。進行中の壊死－炎症が線維症及び肝硬変への進行を駆動するということを、数多くのデータが示唆している。ＨＣＶ慢性キャリヤの最高２０％が、約２０年の期間にわたって肝硬変を発生する可能性があり、肝硬変を患う人のうち毎年１～４％が肝ガンを発生させる危険性を有するものと推定されている（Ｌａｕｅｒ及びＷａｌｋｅｒ　２００１年、Ｓｈｉｆ

ｆｍａｎ　１９９９年）。肝硬変と肝ガンの両方共、治療の選択肢が肝移植に限られる末期肝疾患である。従って、ＨＣＶに対する療法の最も重要なねらいは、肝臓の壊死－炎症を低減させ及び／又は線維症の進行を抑制することにより、末期肝疾患の発生危険度を低減させることにある。

【０００６】

肝臓の損傷の調査及び／又は診断に関しては、いくつかの評定システムが肝生検の組織学的解釈を目的として開発されてきた。これらの評定システムは、炎症、壊死及び線維症を組織学的活動指数（ＨＡＩ）といったような単一の評点の形に組合わせることができる。その他の評定システムは、壊死／炎症用評点（グレード決定）を線維症／肝硬変用評点（＝ステージ決定）から分離してきた。これらのシステムには、Ｉｓｈａｋが提案したシステム又はＭｅｔａｖｉｒ評定システムが含まれる。これらの評定システムの再考は、１９９７年にＬｅｆｋｏｗｉｔｃｈにより公表された。

【０００７】

インターフェロンでの治療、そしてより近年ではインターフェロンとリバビリンを伴う又は伴わないペジル化インターフェロンでの治療が、実際にＨＣＶの自然歴を変え、特に持続的ウイルス応答をもつ患者における肝線維症のさらなる進行を食い止めるということが、複数の研究で示されてきた（Ｓｃｈｖａｒｃｚら、１９９９年、Ｓｈｉｆｆｍａｎ　１９９９年、Ｒｅｉｃｈａｒｄら、１９９９年、Ｒｏｙｎａｒｄら、２００２年）。持続性ウイルス学的応答さらには持続性生化学応答を有する人における肝ガン誘発の危険性の減少も同様に調査されてきた（Ｔａｋｉｍｏｔｏら、２００２年）。

【０００８】

インターフェロンベースの療法に対する持続性ウイルス学的応答をもたない人については、組織学的進行を防止するためには、維持インターフェロン療法が役立つ可能性があるが、これも、一部の患者の場合にすぎない（Ａｌｒｉｃら、２００１年）。

【０００９】

かくして、インターフェロンベースの療法に応答しないか又は複数の理由でこれらの療法から除外されている数多くの患者（これは診療所に来る患者の最高７０％に昇り得る、Ｆａｌｃｋ－Ｙｔｔｅｒら、２００２年）は、今日、末期肝疾患を回避するべく肝臓の壊死／炎症を低減させかつ／又は線維症の進行を抑制するための治療上の選択肢が無い状態にあり続けている。

【００１０】

（発明の目的）

本発明の目的は、組換えにより発現されたＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の新規精製方法を提供して、該タンパク質を、凝集体の代わりに汚染物質を含まない単一または特異的なオリゴマー組換えタンパク質として、診断及びワクチンを目的として直接使用できるようにすることである。

【００１１】

本発明のもう１つの目的は、ＨＣＶのＥ１及び／又はＥ２ドメイン由来の立体配座エピトープを含む精製された（単一又は特異的オリゴマー）組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２糖タンパク質を含んで成る組成物を提供することにある。

【００１２】

本発明のさらにもう１つの目的は、Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質を組換えにより発現するための新規の組換え型ベクター構築物、ならびに前記ベクター構築物で形質転換された宿主細胞を提供することにある。

【００１３】

組換え型ＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質を生成させ、精製するための方法を提供することも又、本発明の１つの目的である。

【００１４】

本発明の組換え型ＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の診断及び免疫学的使用を提供すること、ならびに本発明の組換え型ＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及

び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質のいずれかを含む診断的使用、ワクチン又は治療法のためのキットを提供することも又、本発明の目的である。

【００１５】

本発明のさらにもう１つの目的は、ＨＣＶ感染を患う患者の（例えばインターフェロンを用いた）治療に対する応答を監視／予後診断するためのＥ１、Ｅ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の新しい使用を提供することにある。

【００１６】

同様に、ＨＣＶスクリーニング及び確認的抗体試験における本発明の組換え型Ｅ１、Ｅ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の使用を提供することも又、本発明の目的である。

【００１７】

ＨＣＶ感染の診断及び抗体の生成のために使用可能なＥ１及び／又はＥ２ペプチドを提供することも、本発明の目的である。

【００１８】

ペプチド内に含まれるＥ１及び／又はＥ２エピトープ又は組換え型タンパク質内に含まれる立体配座エピトープと特異的に反応する、モノクローナル抗体、より特異的にはヒトモノクローナル抗体又はヒト化されたマウスモノクローナル抗体を提供することも又、本発明の目的である。

【００１９】

本発明の目的は、ＨＣＶ抗原検出のため又は慢性ＨＣＶ感染の療法のための抗－Ｅ１又は抗－Ｅ２モノクローナル抗体の使用の可能性を提供することにもある。

【００２０】

本発明の目的は同様に、ＨＣＶ感染を患う患者の（例えばインターフェロンを用いた）治療に対する応答を監視／予後診断するか又は疾病の転帰を監視／予後診断するためのキットを提供することにもある。

【００２１】

本発明の目的は全て、以下で記す通りの実施形態により満たされたものと考えられている。

【００２２】

定義

以下の定義は、本発明の中で用いられるさまざまな用語及び表現を例示するのに役立つ。

【００２３】

「Ｃ型肝炎ウイルス単一外被タンパク質」という語は、Ｅ１又はＥ２のいずれかの領域の少なくとも１つのＨＣＶエピトープを定義するアミノ酸配列（及び／又はアミノ酸類似体）を含むポリペプチド又はその類似体（例えばミモトープ）を意味する。これらの単一の外被タンパク質は、その語の広い意味において、組換えにより発現された外被タンパク質の単量体又はホモオリゴマーの両方の形態でありうる。標準的には、エピトープを定義づける配列は、ＨＣＶのＥ１又はＥ２領域のいずれかのアミノ酸配列に（同一のものとしてか又はエピトープを破壊しない未変性アミノ酸残基の類似体の置換を介して）対応する。一般に、エピトープを定義づける配列は長さが３アミノ酸以上、５アミノ酸以上、より標準的には８アミノ酸以上、そしてさらに一層標準的には１０アミノ酸以上となる。立体配座エピトープに関しては、エピトープ定義づけ配列の長さは、これらのエピトープが抗原の三次元形状（例えば折畳み）により形成されていると考えられていることから、幅広く変動し得る。かくして、エピトープを定義づけるアミノ酸は、数が比較的少ないものの、折畳みを介して適正なエピトープ立体配座内に導かれている分子の長さに沿って広く分散している。エピトープを定義づける残基の間の抗原の部分は、エピトープの立体配座構造にとってさほど重要でないかもしれない。例えば、これらの介入する配列の欠失又は置換は、エピトープ立体配座にとってきわめて重要な配列が維持される（例えば、ジスルフィド結合に関与するシステイン、グリコシル化部位など）ことを条件として、立体配座エピトープに影響を及ぼさない可能性がある。立体配座エピトープは同様に、ホモオリゴマ

ー又はヘテロオリゴマのサブユニットの２つ以上の必須領域によって形成されてもよい。
【００２４】
本発明のＨＣＶ抗原は、ＨＣＶのＥ１及び／又はＥ２（外被）ドメインからの立体配座エピトープを含む。ウイルス外被タンパク質に対応すると考えられているＥ１ドメインは、現在ＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸１９２～３８３にわたると推定されている（Ｈｉｊｉｋａｔａら、１９９１年）。（グリコシル化された）哺乳動物系内での発現の時点で、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを介して決定されるように、それは３５ｋＤａのおおよその分子量を有すると考えられている。以前ＮＳ１と呼ばれていたＥ２タンパク質は、ＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸３８４～８０９又は３８４～７４６にわたると考えられ（Ｇｒａｋｏｕｉら、１９９３年）、同様に外被タンパク質であると考えられている。（グリコシル化された）ワクチニア系内での発現の時点で、それは約７２ｋＤａの見かけのゲル分子量をもつと考えられている。これらのタンパク質終点は近似であると理解される（例えば、Ｅ２のカルボキシ末端は、アミノ酸７３０、７３５、７４０、７４２、７４４、７４５、好ましくは７４６、７４７、７４８、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８０９、８１０、８２０で終わる７３０～８２０アミノ酸領域内のどこかに存在し得る）。Ｅ２タンパク質は同様に、Ｅ１、Ｐ７（ａａ７４７～８０９）、ＮＳ２（ａａ８１０～１０２６）、ＮＳ４Ａ（ａａ１６５８～１７１１）又はＮＳ４Ｂ（ａａ１７１２～１９７２）と合わせて発現され得る。これらのその他のＨＣＶタンパク質と一緒になった発現は、適正なタンパク質折畳みを得るために重要でありうる。
【００２５】
同様に、本発明の実施例の節で使用される分離株は本発明の範囲を制限するように意図されたものではなく、タイプ１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はその他のあらゆる新しいＨＣＶ遺伝子型からのあらゆるＨＣＶ分離株が、本発明の実践のためのＥ１及び／又はＥ２配列の適切な供給源である、ということもわかる。
【００２６】
本発明で使用されるＥ１及びＥ２抗原は、全長ウイルスタンパク質、その実質的全長バージョン又はその機能的フラグメント（例えば、エピトープの形成又は保持にとって不可欠な配列が欠如していないフラグメント）であってよい。さらに、本発明のＨＣＶ抗原は、同様に、問題の立体配座エピトープの形成を遮断又は防止しないその他の配列をも包含することができる。立体配座エピトープの有無は、抗体（ポリクローナル血清又は立体配座エピトープに対しモノクローナル）で問題の抗原をスクリーニングし、その反応性を線状エピトープ（該当する場合）のみを保持する抗原の変性バージョンの反応性と比較することを通し、容易に決定可能である。ポリクローナル抗体を使用するこのようなスクリーニングにおいては、まず最初にポリクローナル血清を変性抗原で吸着させ、それが問題の抗原に対する抗体を保持するか否かを見ることが有利であるかもしれない。
【００２７】
本発明のＨＣＶ抗原は、問題のエピトープを提供するあらゆる組換え型方法により作ることができる。例えば、哺乳動物又は昆虫の細胞における組換え型細胞内発現が、天然のＨＣＶ抗原についてそうであるように「未変性」立体配座のグリコシル化されたＥ１及び／又はＥ２抗原を提供するための好ましい方法である。酵母細胞及び突然変異体酵母菌株（例えばｍｎｎ９突然変異体（Ｋｎｉｓｋｅｒｎら、１９９４年）又はバナジウム酸塩耐性選択を用いて誘導されたグリコシル化突然変異体（Ｂａｌｌｏｕら、１９９１年）は、分泌された高マンノースタイプの糖の産生に理想的に適している可能性があるが、一方哺乳動物細胞から分泌されたタンパク質は、或る種の診断又はワクチン応用分野にとって望ましくないものでありうるガラクトース又はシアル酸を含む修飾を含有する可能性がある。しかしながら、タンパク質についてわかっているように、その他の組換え型宿主（例えばＥ．ｃｏｌｉ）内で抗原を発現し回収後タンパク質を再生することも又、可能であり、或る種の利用分野にとっては充分であるかもしれない。
【００２８】
「融合ポリペプチド」という語は、ＨＣＶ抗原（単複）が天然で発生しないアミノ酸の

連続一本鎖の一部であるポリペプチドを意味している。ＨＣＶ抗原は、ペプチド結合によって互いに直接連結されるか又は介入するアミノ酸配列により分離される可能性がある。融合ポリペプチドは、同じく、ＨＣＶに対し外因性のアミノ酸配列を含有することもできる。

【００２９】

「固相」という語は、それに対して個々のＨＣＶ抗原又はＨＣＶ抗原から成る融合ポリペプチドが共有的にか又は疎水性吸着といったような非共有手段によって結合される固形物を意味する。

【００３０】

「生物学的標本」という語は、個体により産生された抗体、より詳細にはＨＣＶに対する抗体を一般に含有する哺乳動物の個体（例えば、類人猿、ヒト）の流体又は組織を意味する。流体又は組織は同様に、ＨＣＶ抗原を含有し得る。このような構成成分は、当該技術分野において既知であり、制限的な意味なく血液、血漿、血清、尿、髄液、リンパ液、気道、腸管又は尿生殖器の分泌物、涙、唾液、乳汁、白血球及び骨髄腫が含まれる。身体構成成分は生物学的液体を含む。「生物学的液体」という語は、生体から得られる流体を意味する。一部の生物学的流体は、凝固因子（例えば第ＶＩＩＩ因子：Ｃ）、血清アルブミン、増殖ホルモンなどといったその他の産物の供給源として使用される。このような場合、生物学的流体の供給源がＨＣＶといったウイルスに汚染されていないことが重要である。

【００３１】

「免疫学的に反応性ある」という語は、問題の抗原が、ＨＣＶ感染した個体からの身体構成成分中に存在する抗ＨＣＶ抗体と特異的に反応することを意味する。

【００３２】

「免疫複合体」という語は、抗体が抗原上のエピトープに結合するときに形成される組合せを意味する。

【００３３】

本書で使用されている「Ｅ１」という語は、時としてＥ、ＥＮＶ又はＳタンパク質と呼ばれるＨＣＶポリタンパク質の最初の４００個のアミノ酸の内部で発現されるタンパク質又はポリペプチドを意味する。その天然の形態において、それは、膜と強く結びついた状態で発見される３５ｋＤａの糖タンパク質である。大部分の天然ＨＣＶ菌株の中で、Ｅ１タンパク質は、Ｃ（コア）タンパク質の後に続くウイルスポリタンパク質の中でコード化される。Ｅ１タンパク質は、全長ポリタンパク質のおおよそアミノ酸（ａａ）１９２から約ａａ３８３まで延びている。

【００３４】

本書で使用される「Ｅ１」という語は、天然のＥ１と免疫学的に交差反応する切形形態及び類似体をも包含し、遺伝子型１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０のＥ１タンパク質又はその他の新たに同定されたあらゆるＨＣＶ型又は亜型を包含する。

【００３５】

本書で使用されている「Ｅ２」というのは、時としてＮＳ１タンパク質とも呼ばれる。ＨＣＶポリタンパク質の最初の９００個のアミノ酸の内部で発現されるタンパク質又はポリペプチドを意味する。その天然の形態において、それは、膜と強く結びついた状態で発見される７２ｋＤａの糖タンパク質である。大部分の天然ＨＣＶ菌株の中で、Ｅ２タンパク質は、Ｅ１タンパク質の後に続くウイルスポリタンパク質の中でコード化される。Ｅ２タンパク質は、おおよそ位置３８４からアミノ酸位置７４６まで延び、もう１つの形のＥ２は、アミノ酸位置８０９まで延びている。本書で使用される「Ｅ２」という語は、天然のＥ２と免疫学的に交差反応する切形形態及び類似体をも包含する。例えば、コドン３８３と３８４の間の多重コドンの挿入ならびにアミノ酸３８４～３８７の欠失がＫａｔｏら（１９９２年）により報告されてきた。

【００３６】

本書で使用されているような「Ｅ１／Ｅ２」は、少なくとも１つのＥ１構成成分及び少

なくとも１つのＥ２構成成分を含有する外被タンパク質のオリゴマー形態を意味する。

【００３７】

「特異的オリゴマー」Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２外被タンパク質という語は、集合体でない組換えにより発現されたＥ１及び／又はＥ２外被タンパク質の考えられる全てのオリゴマー形態を意味する。Ｅ１及び／又はＥ２特異的オリゴマー外被タンパク質は、同様に、ホモ－オリゴマーＥ１又はＥ２外被タンパク質とも呼ばれる（以下参照）。

【００３８】

「単一又は特異的オリゴマー」Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２外被タンパク質は、単一の単量体Ｅ１又はＥ２タンパク質（厳密な意味での単一）ならびに特異的オリゴマーＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２組換え型発現タンパク質を意味する。本発明に従ったこれらの単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質は、以下の公式$(E1)_x(E2)_y$によってさらに定義づけされ得、ここでｘとｙが両方共０でないことを条件として、ｘは０～１００の間の数でありｙは０と１００の間の数であり得る。ｘ＝１でｙ＝０である場合、前記外被タンパク質は単量体Ｅ１を包含する。

【００３９】

本書で使用されている通りの「ホモ－オリゴマー」という語は、複数のＥ１又はＥ２単量体を含むＥ１及び／又はＥ２の複合体を意味し、例えばＥ１／Ｅ１二量体、Ｅ１／Ｅ１／Ｅ１三量体又はＥ１／Ｅ１／Ｅ１／Ｅ１四量体及びＥ２／Ｅ２二量体、Ｅ２／Ｅ２／Ｅ２三量体又はＥ２／Ｅ２／Ｅ２／Ｅ２四量体、Ｅ１五量体及び六量体、Ｅ２五量体及び六量体又はＥ１又はＥ２のより高次のあらゆるホモ－オリゴマーが全て当該定義の範囲内の「ホモオリゴマー」である。オリゴマーは、例えば、両方共当該出願人による国際公開第９４／２５６０１号パンフレット及び欧州出願第９４８７０１６６．９号明細書として公示された国際出願の中で記載されたものを含むＣ型肝炎ウイルスのさまざまな型又は亜型から得られたＥ１又はＥ２の１つ、２つ又は複数の異なる単量体を含み得る。このような混合オリゴマーはなお、本発明の範囲内のホモオリゴマーであり、ＨＣＶのより普遍的な診断、予防又は治療を可能にすることができる。

【００４０】

本書のタンパク質に適用される「精製された」という語は、所望のタンパク質が内部の合計タンパク質構成成分の少なくとも３５％を構成する組成物を意味する。所望のタンパク質は好ましくは合計タンパク質構成成分の少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも約５０％、より好ましくは少なくとも約６０％、なお一層好ましくは少なくとも約７０％、さらに一層好ましくは約８０％、さらに一層好ましくは少なくとも約９０％、そして最も好ましくは少なくとも約９５％を構成する。組成物は、本書で使用されているような百分率純度の決定に影響を与えることなく炭水化物、塩、脂質、溶媒などといったようなその他の化合物を含有できる。「単離された」ＨＣＶタンパク質というのは、少なくとも３５％の純度をもつＨＣＶタンパク質組成物を意味する。

【００４１】

「本質的に精製されたタンパク質」という語は、インビトロ診断方法用及び治療用化合物として使用できるように精製されたタンパク質を意味する。これらのタンパク質は、実質的に細胞タンパク質、ベクター由来のタンパク質又はその他のＨＣＶウイルス構成成分を含まない。通常、これらのタンパク質は、均質になるまで精製され（少なくとも純度８０％、好ましくは９０％、より好ましくは９５％、より好ましくは９７％、より好ましくは９８％、より好ましくは９９％、さらに一層好ましくは９９．５％）、最も好ましくは、汚染性タンパク質は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び銀染色法といった従来の方法で検出不可能であるべきである。

【００４２】

本発明の状況下で用いられる「組換えにより発現された」という語は、本発明のタンパク質が、以下で詳述するように、原核生物又は下等又は高等真核生物のいずれにおいてであれ組換え型発現方法により生成されているという事実を意味する。

【００４３】
「下等真核生物」というのは、酵母、真菌などといった宿主細胞を意味する。下等真核生物は一般に（ただし必然的にではなく）単細胞である。好ましい下等真核生物は酵母、特にＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ、Ｐｉｃｈｉａ（例えばＰｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）、Ｈａｎｓｅｎｕｌａ（例えばＨａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、Ｙａｒｏｗｉａ、Ｓｃｈｗａｎｉｏｍｙｃｅｓ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ、Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓなどの中に入る種である。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、 Ｓ．ｃａｒｌｓｂｅｒｇｅｎｓｉｓ及びＫ．ｌａｃｔｉｓは、最も一般的に用いられる母宿主であり、好都合な真菌宿主である。

【００４４】
「原核生物」という語は、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ、 Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ又はＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓといったような宿主を意味する。同様に、これらの宿主が、本発明の中で考慮されている。

【００４５】
「高等真核生物」という語は、哺乳動物、は虫類、昆虫などといったような高等動物に由来する宿主細胞を意味する。現在好ましい高等真核生物宿主細胞は、チャイニーズハムスター（例えばＣＨＯ）、サル（例えばＣＯＳ及びＶｅｒｏ細胞）、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）、ブタ腎臓（ＰＫ１５）、ウサギ腎臓１３細胞（ＲＫ１３）、ヒト骨肉腫細胞系統１４３Ｂ、ヒト細胞系統ＨｅＬａ及びヒト肝ガン細胞系統例えばＨｅｐＧ２、及び昆虫細胞系統（例えばＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）に由来する。宿主細胞は、懸濁液又はフラスコ培養、組織培養、器官培養などの中で提供され得る。代替的には、宿主細胞は同じく遺伝子導入動物でもありうる。

【００４６】
「ポリペプチド」という語は、アミノ酸重合体を意味し、産物の特定の長さを意味しない。かくしてペプチド、オリゴペプチド及びタンパク質が、ポリペプチドの定義内に含まれる。この語は同様に、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化などといったポリペプチドの発現後修飾を意味しないか又はこれを除外する。該定義中に含まれるのは、例えば、（例えば非天然アミノ酸、ＰＮＡなどを包含する）アミノ酸の単数又は複数の類似体を含有するポリペプチド、置換済みリンケージを伴うポリペプチドならびに天然に発生するもの及び非天然に発生するものの両方を含めた当該技術分野において既知のその他の修飾である。

【００４７】
「組換え型ポリヌクレオチド又は核酸」という語は、その由来又は操作によって、（１）それが天然に会合しているポリヌクレオチドと会合していない、（２）それが天然にリンクされているもの以外のポリヌクレオチドにリンクされている、又は（３）天然に発生しない、ゲノミック、ｃＤＮＡ、半合成又は合成由来のポリヌクレオチド又は核酸を意味している。

【００４８】
「組換え型宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系統」「細胞培養」その他の、単細胞実体として培養された微生物又は高等真核生物細胞系統を表わすこのような語は、組換え型ベクター又はその他のトランスファポリヌクレオチドのためのレシピエントとして用いることのできる又は用いられてきた細胞を意味し、トランスフェクションを受けてきたもとの細胞の後代を包含する。単一の親細胞の後代が天然の、偶発的な又は意図的な突然変異に起因して、もとの親と形態、又はゲノミック又は合計ＤＮＡ補体に関して必ずしも完全に同一でない可能性があるということがわかっている。

【００４９】
「レプリコン」という語は、例えばプラスミド、染色体、ウイルス、コスミドなどといった、１つの細胞内でポリヌクレオチド複製の自律的単位として挙動するすなわちその独

自の制御下で複製する能力をもつあらゆる遺伝的要素を意味する。

【００５０】

「ベクター」という語は、所望の読取り枠の複製及び／又は発現を提供する配列をさらに含むレプリコンである。

【００５１】

「制御配列」という語は、連結されているコーディング配列の発現をもたらすのに必要であるポリヌクレオチド配列を意味する。かかる制御配列の性質は、宿主生体に応じて異なる；原核、生物においては、かかる制御配列は一般にプロモータ、リボソーム結合部位、及びターミネータを包含する；真核生物においては、一般にかかる制御配列はプロモータ、ターミネータそして一部のケースではエンハンサを包含する。「制御配列」という語は、最小限、発現のためにその存在が必要である全ての構成成分を包含するように意図され、又、例えば分泌を支配するリーダー配列といったその存在が有利である付加的な構成成分をも包含し得る。

【００５２】

「プロモータ」という語は、ｍＲＮＡ産生が隣接する構造遺伝子のための正常な転写開始部位で開始するような形でＤＮＡ鋳型に対するＲＮＡポリメラーゼの結合を可能にするコンセンサス配列から成るヌクレオチド配列を表わす。

【００５３】

「作動可能に連結された」という表現は、このように記載された複数の構成成分が互いに意図された形で機能できるようにする関係にある並置を意味する。コーディング配列に対して「作動可能に連結された」制御配列は、コーディング配列の発現が該制御配列に適合する条件下で達成されるような形で連結されている。

【００５４】

「読取り枠」（ＯＲＦ）というのは、１つのポリペプチドをコードし、停止コドンを含まないポリヌクレオチド配列の１領域である。この領域は、コーディング配列の一部分又は全コーディング配列を表わす可能性がある。

【００５５】

「コーディング配列」というのは、適切な調節配列の制御下に置かれた場合にｍＲＮＡ内に転写される及び／又はポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。コーディング配列の境界は、５’末端の翻訳開始コドンと３’末端にある翻訳停止コドンにより決定される。コーディング配列には、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ（ｃＤＮＡを含む）、及び組換え型ポリヌクレオチド配列が含まれるが、これらに制限されるわけではない。

【００５６】

ここで使用される「エピトープ」又は「抗原決定基」というのは、免疫反応性あるアミノ酸配列である。一般に、１つのエピトープは少なくとも３～４個のアミノ酸から成り、より一般的には、少なくとも５個又は６個のアミノ酸から成り、時としてエピトープは約７～８個さらには約１０個のアミノ酸から成る。本書で使用する指定されたポリペプチドのエピトープというのは、指定されたポリペプチド内のエピトープと同じアミノ酸をもつエピトープ及びその免疫学的等価物を意味する。かかる等価物には同様に、例えば遺伝子型１ａ、１ｂ、１ｃ、１ｄ、１ｅ、１ｆ、２ａ、２ｂ、２ｃ、２ｄ、２ｅ、２ｆ、２ｇ、２ｈ、２ｉ、３ａ、３ｂ、３ｃ、３ｄ、３ｅ、３ｆ、３ｇ、４ａ、４ｂ、４ｃ、４ｄ、４ｅ、４ｆ、４ｇ、４ｈ、４ｉ、４ｊ、４ｋ、４ｌ、５ａ、５ｂ、６ａ、６ｂ、６ｃ、７ａ、７ｂ、７ｃ、８ａ、８ｂ、９ａ、９ｂ、１０ａ又はその他の新たに定義されたあらゆるＨＣＶ（亜）型に属する現在知られている配列又は菌株の、菌株、亜型（＝遺伝子型）又は型（グループ）特異的変異体も含まれる。エピトープを構成するアミノ酸が線状配列の一部である必要はなく、任意の数のアミノ酸が組入れられかくして立体配座エピトープを形成することができるということがわかっている。

【００５７】

「免疫原性」という語は、アジュバントの存在下又は不在下で、単独か又は担体にリンクされた場合に、体液性及び／又は細胞性応答をひき起こす１つの物質の能力を意味する

。「中和」というのは、感染性作用物質の伝染力を部分的又は完全に遮断する免疫応答を意味する。「ワクチン」というのは、部分的であれ完全であれ、ＨＣＶに対する保護を惹起する能力をもつ免疫原性組成物のことである。ワクチンは、個体の治療に有用でもあり得、その場合は治療的ワクチンと呼ばれる。

【００５８】

「治療的」という語は、ＨＣＶ感染を治療する能力をもつ組成物を意味する。

【００５９】

「有効量」という語は、投与対象の個体の中で免疫原性応答をひき起こす又はその意図された系の中でその他の要領で検出可能な形で免疫反応する（例えば免疫検定）のに充分なエピトープ担持ポリペプチドの量を意味する。好ましくは、有効量は、上で定義づけされた通りの治療を達成するのに充分なものである。正確な必要量は、利用分野に応じて変動することになる。例えば、ワクチンの利用分野又はポリクローナル抗血清／抗体の生成のためには、有効量は、個体の種、年齢及び全身状態、治療対象条件の重症度、選択された特定のポリペプチド及びその投与様式などに応じて変動し得る。有効量は比較的大きい非臨界的範囲内に見い出されることになるとも考えられている。適切な有効量は、日常的実験のみを用いて容易に決定可能である。ＨＣＶ疾患の予防のためのＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質の好ましい範囲は、１用量あたり０．０１～１００μｇ、好ましくは０．１～５０μｇである。ＨＣＶ疾患に対する充分な免疫応答及びその後の防御を達成するためには、一個体毎に数回の用量が必要となる可能性がある。

【００６０】

（発明の詳細な説明）

より特定的に言うと、本発明は、Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２からなる群の中から選択された組換え型ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質を単離又は精製するための方法であって、組換えにより発現されたタンパク質を単離するべく形質転換された宿主細胞を溶解させた時点で、ジスルフィド結合開裂剤を用いたジスルフィド結合開裂又は還元工程が実施されることを特徴とする方法に関する。

【００６１】

本発明のこれらの「単一又は特異的オリゴマー」外被タンパク質の最重要点は、それらが汚染性タンパク質を含まないこと、及びジスルフィド結合により汚染物質と連結されていないことにある。

【００６２】

本発明に従ったタンパク質は、下等又は高等真核生物細胞又は原核細胞の中で組換えにより発現される。本発明の組換え型タンパク質は好ましくはグリコシル化されており、高マンノースタイプ、ハイブリッド又は複合グリコシル化を含み得る。好ましくは、前記タンパク質は、実施例の節で詳述されるような哺乳動物細胞系統から発現されるか、又は同じく実施例の節で詳述されるような突然変異体酵母菌株といった酵母菌内で発現される。

【００６３】

本発明に従ったタンパク質は、ＥＲ又はゴルジ体といったような細胞の構成成分内部で分泌又は発現され得る。しかしながら、好ましくは、本発明のタンパク質は、高マンノースタイプのグリコシル化を担持し、哺乳動物細胞のＥＲ又はゴルジ体の中に保持されるか又は酵母細胞内に保持されるか又は酵母細胞から分泌され、好ましくは、ｍｎｎ９突然変異体といったような酵母突然変異体菌株（Ｋｎｉｓｋｅｒｎら、１９９４年）からか又はバナジウム酸塩耐性を用いて選択された突然変異体（Ｂａｌｌｏｕら、１９９１年）から分泌される。

【００６４】

ＨＣＶ外被タンパク質の発現時点で、当該発明者らは、分子内又は分子間ジスルフィド架橋に関与しないシステインの遊離チオール基のいくつかが宿主又は発現系由来（例えばワクシニア）タンパク質又はその他のＨＣＶ外被タンパク質（単一又はオリゴマー）のシステインと反応し、非特異的分子間架橋を形成するということを示すことができた。この

結果として、汚染性タンパク質と合わせてＨＣＶ外被タンパク質の「集合体」が形成されることになる。国際公開第９２／０８７３４号パンフレットの中でも、「集合体」が精製後に得られることが示されていたが、どのタンパク質相互作用が関与したかについては記載されていなかった。特許出願国際公開第９２／０８７３４号パンフレットの中では、ワクシニアウイルス系で発現された組換え型Ｅ１／Ｅ２タンパク質が、集合体として部分的に精製され、７０％の純度しかもたないことがわかり、精製された集合体は診断、予防又は治療目的にとって有用なものでなくなっていた。

【００６５】

従って、本発明の主たる目的は、汚染性タンパク質から単一又は特異的オリゴマーＨＣＶ外被タンパク質を分離すること、そして精製されたタンパク質（９５％を上回る純度）を診断、予防及び治療目的で使用することにある。これらの目的のため、当該発明者らは、集合したタンパク質複合体（「集合体」）がジスルフィド架橋及び非共有タンパク質－タンパク質相互作用に基づいて形成されるという証拠を提供することができた。かくして、本発明は特異的条件下でジスルフィド結合を選択的に開裂し、診断、予防及び治療向け利用分野と大幅に干渉する汚染性タンパク質から開裂済みタンパク質を分離するための手段を提供する。遊離チオール基は、ジスルフィド架橋の再形成を防止する目的で遮断される（可逆的又は不可逆的に）か又は、その他の外被タンパク質と酸化及びオリゴマー化するべく放置され得る（ホモ－オリゴマーの定義づけを参照のこと）。かかるタンパク質オリゴマーは、汚染性タンパク質のレベルが検出不可能であることから、基本的に、国際公開第９２／０８７３４号パンフレット及び国際公開第９４／０１７７８号パンフレットに記載されている「集合体」とは異なるものであることがわかっている。

【００６６】

前記ジスルフィド結合の開裂は、以下の要領でも達成可能である：

（１）　システイン酸を用いた過ギ酸酸化による。この場合システイン残基はシステイン酸へと修飾される（Ｍｏｏｒｅら、１９６３年）。

（２）　例えばCu^{2+}といったような適切な酸化剤と合わせて亜硫酸塩（SO^{2-}_{3}）を用いた亜硫酸分解（Ｒ－Ｓ－Ｓ－Ｒ→２Ｒ－SO^{-}_{3}）による。この場合、システインはＳ－フルフォシステインへと修飾される（Ｂａｉｌｅｙ及びＣｏｌｅ、１９５９年）。

（３）　ジチオトレイトール（ＤＴＴ）、β－メルカプト－エタノール、システイン、グルタチオンレッド、ε－メルカプト－エチルアミン又はチオグリコール酸といったような用いた還元（このうち、ＤＴＴ及びβ－メルカプト－エタノールが一般的に用いられる（Ｃｌｅｌａｎｄ、１９６４年）は、水環境内で実施できシステインが未修飾状態にとどまることから、本発明の好ましい方法である。

（４）　ホスフィン（例えばBu_3P）を用いた還元による（Ｒｕｅｇｇ及びＲｕｄｉｎｇｅｒ、１９７７年）。

【００６７】

かくしてこれらの化合物は全て、本発明に従ったジスルフィド結合を開裂するための作用物質又は手段としてみなされるべきものである。

【００６８】

本発明の前記ジスルフィド結合開裂（又は還元工程は、好ましくは、（部分的開裂又は還元条件下で実施される）部分的ジスルフィド結合開裂（還元）工程である。

【００６９】

本発明に従った好ましいジスルフィド結合開裂又は還元剤は、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）である。部分的還元は、前記還元剤を低濃度で用いることにより、すなわち例えばＤＴＴについては約０．１～約５０ｍＭ、好ましくは約０．１～約２０ｍＭ、好ましくは約０．５～約１０ｍＭ、好ましくは１ｍＭ超、２ｍＭ超又は５ｍＭ超、より好ましくは約１．５ｍＭ、約２．０ｍＭ、約２．５ｍＭ、約５ｍＭ又は約７．５ｍＭの濃度範囲内で用いることにより得られる。

【００７０】

前記ジスルフィド結合開裂工程は、ＤｅｃｙｌＰＥＧ、ＥＭＰＩＧＥＮ－ＢＢ、ＮＰ－

４０、コール酸ナトリウム、トリトンＸ－１００といったような発現されたタンパク質を解離することのできる適切な洗浄剤の（例えば開裂剤と組合わせた形での又はジスルフィド結合を開裂するための手段の）存在下で実施することも可能である。

【００７１】

前記還元又は開裂工程（好ましくは部分的還元又は開裂工程）は、洗浄剤の存在下で（を伴って）実施される。本発明に従った好ましい洗浄剤は、Ｅｍｐｉｇｅｎ－ＢＢである。使用される洗浄剤の量は、好ましくは、Ｅｍｐｉｇｅｎ－ＢＢといったような洗浄剤で１～１０％の範囲内、好ましくは３％超、より好ましくは約３．５％である。

【００７２】

ジスルフィド結合開裂を得るための特に好ましい方法では、以上で詳述されたとおりの古典的なジスルフィド結合開裂剤と（同じく以上で詳述された通りの）洗浄剤の組合せが用いられる。実施例の節で考慮されているように、低濃度のＤＴＴ（１．５～７．５ｍＭ）及び約３．５％のＥｍｐｉｇｅｎ－ＢＢの特定の組合せは、組換えにより発現されたＥ１及びＥ２タンパク質の精製にとって特に好ましい還元剤及び洗浄剤の組合せであることが立証されている。ゲルろ過クロマトグラフィの時点で、前記部分的還元は、２量体の可能性があるＥ１タンパク質の産生、及び免疫検定において使用した時点で偽反応性をひき起こす汚染性タンパク質からのこのＥ１タンパク質の分離を結果としてもたらすことが示されている。

【００７３】

しかしながら、システインにより優れたアクセス可能性を与えるための当該技術分野において既知のあらゆる洗浄剤又はその他の手段と当該技術分野において既知のあらゆる還元剤のその他のあらゆる組合せが、本発明で例示されている好ましい組合せと同じジスルフィド架橋開裂という最終目的を達成するかぎりにおいて、同様に本発明の範囲内に入る。

【００７４】

ジスルフィド結合を還元することとは別に、本発明に従ったジスルフィド結合開裂手段は同様に、以下のタイプの反応を発生させることができるようにする当該技術分野において既知のあらゆるジスルフィド架橋交換剤（競合薬は有機又はタンパク性のいずれかである。例えばＣｒｅｉｇｈｔｏｎ、１９８８年を参照のこと）：

Ｒ１Ｓ－ＳＲ２＋Ｒ３ＳＨ→Ｒ１Ｓ－ＳＲ３＋Ｒ２ＳＨ

＊　Ｒ１，Ｒ２：タンパク質集合体の化合物

＊　Ｒ３ＳＨ：競合薬（有機、タンパク性）

【００７５】

「ジスルフィド架橋交換剤」という語は、ジスルフィド結合再形成ならびにジスルフィド結合遮断薬を包含するものとして、解釈されるべきである。

【００７６】

本発明は同様に、以下のリストの中から選択されるような当該技術分野において既知あらゆるＳＨ遮断又は結合試薬の使用をさらに包含する、以上で記した通りのＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質を精製又は単離するための方法にも関する：

－　グルタチオン、

－　５，５’－ジチオビス－（２－ニトロ安息香酸）又はビス－（３－カルボキシ－４－ニトロフェニル）－ジスルフィド（ＤＴＮＢ又はＥｌｌｍａｎ試薬）（Ｅｌｍａｎｎ、１９５９年）、

－　Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ；Ｂｅｎｅｓｃｈら、１９５６年）、

－　タンパク質に色を与えるＮ－（４－ジメチルアミノ－３，５－ジニトロフェニル）マレイミド又はＴｕｐｐｙのマレイミド、

－　Ｐ－クロロ水銀ベンゾエート（Ｇｒａｓｓｅｔｔｉら、１９６９年）、

－４－ビニルピリジン（Ｆｒｉｅｄｍａｎ　及び　Ｋｒｕｌｌ、１９６９年）は、酸加水分解による反応後に遊離されうる。

－アクリロニトリル、これは酸加水分解による反応後に遊離され得る（Ｗｅｉｌ及びＳｅ

ｉｂｌｅｓ、１９６１年）、
－　ＮＥＭ－ビオチン（例えばＳｉｇｍａ　Ｂ１２６７から得られる）、
－　２，２’－ジチオピリジン（Ｇｒａｓｓｅｔｔｉ及びＭｕｒｒａｙ、１９６７年）、
－　４，４’－ジチオピリジン（Ｇｒａｓｓｅｔｔｉ及びＭｕｒｒａｙ、１９６７年）、
－　６，６’－ジチオジニコチン酸（ＤＴＤＮＡ；Ｂｒｏｗｎ及びＣｕｎｎｉｇｈａｍ、１９７０年）、
－　２，２’－ジチオビス（５’－ニトロピリジン）（ＤＴＮＰ；米国特許３５９７１６０）又はその他のジチオビス（複素環式誘導体）化合物（Ｇｒａｓｓｅｔｔｉ及びＭｕｒｒａｙ、１９６９年）。

【００７７】

列挙された刊行物を調査すると、往々にしてスルフヒドリル基のための異なる試薬が同じタンパク質又は酵素分子の種々の数のチオール基と反応することになるということがわかる。チオール基の反応性におけるこの変動が、分子の形状及び周囲の原子基及びその電荷といったようなこれらの基の立体構造環境、ならびに試薬分子又はイオンのサイズ、形状及び電荷に起因すると結論づけすることが可能である。往々にして、ドデシル硫酸ナトリウム、尿素又は塩酸グアニジンといったような変性剤が適切な濃度で存在することにより、チオール基のための試薬の全てに対し等しいアクセスを可能にするのに充分なタンパク質分子の折畳み解除がひき起こされることになる。変性剤の濃度を変動させることにより、折畳み解除の度合を制御し、かくして異なる反応性をもつチオール基を明らかにすることが可能である。これまでのところ、報告された研究作業の大部分はｐ－クロロ水銀ベンゾエート、Ｎ－エチルマレイミド及びＤＴＮＢを用いて行なわれてきたが、その他のさらに最近になって開発された試薬も同等に有用でありうる。それらの構造は様々であることから、実際にはそれらがチオール基の立体構造環境の変化に対し異なる形で応答する可能性が高いと思われる。

【００７８】

代替的には、遊離ＳＨ基が酸化するのを防ぎかくしてＥ１及びＥ２（外被）タンパク質の組換え型発現及び精製の時点での大きい分子間集合体の形成を防止するための低ｐＨ（好ましくはｐＨ６未満）といった条件が、同様に本発明の範囲内に入る。

【００７９】

本発明に従った好ましいＳＨ基遮断試薬は、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）である。前記ＳＨ基遮断試薬は、組換え型宿主細胞の溶解中及び上述の部分的還元プロセスの後又はジスルフィド架橋を開裂するためのその他の何らかのプロセスの後に投与され得る。前記ＳＨ基遮断試薬は同様に、例えばビオチニル化されたＮＥＭといった固体基板に対して前記組換え型タンパク質を固定化するのを助けるあらゆる基及び／又は検出可能な標識を提供する能力をもつあらゆる基で修飾させることもできる。

【００８０】

システイン架橋を開裂し遊離システインを遮断するための方法も同様に、Ｄａｒｂｒｅ（１９８７年）、Ｍｅａｎｓ及びＦｅｅｎｅｙ（１９７１年）及びＷｏｎｇ（１９９３年）により記載されてきた。

【００８１】

上で定義づけされたとおりの本発明に従った単一又は特異的なオリゴマー組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質を精製する方法はさらに、以下の工程を含むものとして特徴づけられる：
－　好ましくはＳＨ基遮断薬例えばＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）そして場合によっては適切な洗浄剤好ましくはＥｍｐｉｇｅｎ－ＢＢの存在下で、組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２発現宿主細胞を溶解させる工程、
－　例えば抗－Ｅ１及び／又は抗－Ｅ２特異的モノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィ又はレンチルレクチンクロマトグラフィといったレクチンクロマトグラフィを使用した親和性精製により、前記ＨＣＶ外被タンパク質を回収する工程、及びそれに続く、

－　好ましくは同じくＮＥＭ又はビオチン－ＮＥＭといったようなＳＨ基遮断薬の存在下での、ＤＴＴといったジスルフィド結合開裂剤を用いたジスルフィド結合の還元又は開裂工程；及び
－　例えばゲルろ過（サイズ排除クロマトグラフィ又は分子ふるい）そして場合によっては付加的なNi^{2+}－ＩＭＡＣクロマトグラフィ及び脱塩工程による、還元されたＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２外被タンパク質の回収工程。

【００８２】
上述の回収工程が同様に、当業者にとって既知のその他のあらゆる適切な技術を用いて実施することもできるということを理解すべきである。

【００８３】
好ましいレクチン－クロマトグラフィシステムには、実施例の節で例示されているように、Ｇａｌａｎｔｈｕｓ　ｎｉｖａｌｉｓアグルチニン（ＧＮＡ）－クロマトグラフィ又はＬｅｎｓ　ｃｕｌｉｎａｒｉｓアグルチニン（ＬＣＡ）（レンチル）レクチンクロマトグラフィが含まれる。その他の有用なレクチンには、Ｎａｒｃｉｓｓｕｓ　ｐｓｅｕｄｏｎａｒｃｉｓｓｕｓ　ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ（ＮＰＡ）、Ｐｉｓｕｍ　ｓａｔｉｖｕｍアグルチニン（ＰＳＡ）又はＡｌｌｉｕｍ　ｕｒｓｉｎｕｍアグルチニン（ＡＵＡ）といったような高マンノースタイプの糖を認識するものが含まれる。

【００８４】
好ましくは、前記方法は、以上で詳述したように細胞内で産生された単一又は特異的オリゴマーＨＣＶ外被タンパク質を精製するために使用可能である。

【００８５】
分泌されたＥ１又はＥ２又はＥ１／Ｅ２オリゴマーについては、Ｒｉｃｉｎｕｓ　ｃｏｍｍｕｎｉｓアグルチニンＩ（ＲＣＡＩ）といったような複合糖を結合するレクチンが好ましいレクチンである。

【００８６】
本発明は、より詳細には、基本的に、上述の方法により単離又は精製されることを特徴とするＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２からなる群の中から選択された、精製済みの組換え型ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質を意図している。

【００８７】
本発明はさらに詳細には、ワクシニアといったような組換え型哺乳動物細胞から発現される組換え型外被タンパク質の精製又は単離に関する。

【００８８】
本発明は、同様に、組換え型酵母細胞から発現される組換え型外被タンパク質の精製又は単離にも関する。

【００８９】
本発明は同様に、組換え型細菌（原核生物）細胞から発現される組換え型外被タンパク質の精製又は単離に関する。

【００９０】
本発明は同様に、ベクター配列、適切な原核生物、真核生物又はウイルス又は合成プロモータ配列とそれに続く本発明の単一又は特異的オリゴマーＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２の発現を可能にするヌクレオチド配列を含む組換え型ベクターをも意図する。

【００９１】
特に、本発明は、ベクター配列、適切な原核生物、真核生物又はウイルス又は合成プロモータ配列とそれに続く本発明の単一のＥ１又はＥ２の発現を可能にするヌクレオチド配列を含む組換え型ベクターをも意図する。

【００９２】
特に、本発明は、ベクター配列、適切な原核生物、真核生物又はウイルス又は合成プロモータ配列とそれに続く本発明の単一のＥ１又はＥ２の発現を可能にするヌクレオチド配列を含む組換え型ベクターをも意図する。

【００９３】
ベクター配列内に挿入された所望のＥ１及び／又はＥ２配列をコードするＨＣＶｃＤＮＡのセグメントは、シグナル配列に付着され得る。前記シグナル配列は、非ＨＣＶ源からのもの、例えば哺乳動物細胞内での発現のためのＩｇＧ又は組織プラスミノーゲン賦活物質（ｔｐａ）リーダー配列又は酵母細胞内への発現のためのα－交配因子配列でありうるが、本発明に従った特に好ましい構築物は、Ｅ１及びＥ２タンパク質のそれぞれの出発点の前にＨＣＶゲノム内に出現するシグナル配列を含有する。ベクター内に挿入された所望のＥ１及び／又はＥ２配列をコードするＨＣＶｃＤＮＡのセグメントは、例えば実施例の節で例示されているような疎水性ドメイン又はＥ２超可変領域Ｉの欠失をも包含し得る。
【００９４】
より詳細には、本発明に従った組換え型ベクターは、ＨＣＶ単一Ｅ１タンパク質の発現のため、ＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸位置１～１９２の間の領域内で開始し、位置２５０～４００の間の領域内、より好ましくは位置２５０～３４１の間の領域内、さらに一層好ましくは位置２９０～３４１の間の領域内のいずれかの位置で終わるポリタンパク質をコードするＨＣＶｃＤＮＡセグメントをもつ核酸を包含する。最も好ましくは、この組換え型ベクターは、ＨＣＶ単一Ｅ１タンパク質の発現のため、位置１１７～１９２の間の領域内で開始し位置２６３～３２６の間の領域内のいずれかの位置で終わるＨＣＶポリタンパク質の一部分をコードするＨＣＶｃＤＮＡセグメントをもつ組換え型核酸を包含している。同様に本発明の範囲内に入るのは、第１の疎水性ドメインを欠失させた（位置２６４～２９３＋／－８アミノ酸）形態又は、５’末端ＡＴＧコドン及び３’末端停止コドンが付加された形態、又は、第Ｘａ因子開裂部位を有するかつ／又は３～１０、好ましくは６個のヒマチジンコドンが付加された形態である。
【００９５】
より詳細には、本発明に従った組換え型ベクターは、ＨＣＶ単一Ｅ２タンパク質の発現のため、ＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸位置２９０～４６０の間の領域内で開始し、位置６００～８２０の間の領域内で終わり、より好ましくは位置３２２～４０６の間の領域内で開始し、さらに一層好ましくは位置３４７～４０６の間の領域内、さらに一層好ましくは位置３６４～４０６の間の領域内で開始するポリタンパク質をコードするＨＣＶｃＤＮＡセグメントをもつ核酸を包含する。最も好ましくは、この組換え型ベクターは、ＨＣＶ単一Ｅ２タンパク質の発現のため、位置２９０～４０６の間の領域内で開始し位置６２３、６５０、６６１、６７３、７１０、７１５、７２０、７４６又は８０９のいずれかの位置で終わるポリタンパク質をコードするＨＣＶｃＤＮＡセグメントをもつ組換え型核酸を包含している。同様に本発明の範囲内に入るのは、５’末端ＡＴＧコドン及び３’末端停止コドンが付加された形態、又は、第Ｘａ因子開裂部位を有するかつ／又は３～１０、好ましくは６個のヒマチジンコドンが付加された形態である。
【００９６】
本発明のＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質の組換え型発現を得るために、さまざまなベクターを使用することができる。酵母といった下等真核動物及びグリコシル化突然変異体菌株は、標準的にプラスミドで形質転換されるか又は組換え型ウイルスで形質転換される。ベクターは、宿主の内部で独立して複製するか又は宿主細胞ゲノムへと一体化することができる。
【００９７】
高等真核生物は、ベクターで形質転換されるか、又は例えば組換え型ワクシニアウイルスといった組換え型ウイルスに感染する可能性がある。ワクシニアウイルス内への外因性ＤＮＡの挿入のための技術及びベクターは、当該技術分野において周知であり、例えば相同組換えを利用する。全て哺乳動物の発現のために必要とされる多様なウイルスプロモータ配列、場合によってはターミネータ配列及びポリ（Ａ）－付加配列、場合によってはエンハンサ配列及び場合によっては増幅配列が、当該技術分野において利用可能である。ワクシニアは同様に、生きた組換え型ワクシニアウイルスで免疫化されている細胞又は個体内のＨＣＶのＥ１及びＥ２タンパク質の発現を可能にすることから、非常に好ましい。ヒ

トへのワクチン接種用には、アビポックス及びアンカラ修飾ウイルス（ＡＭＶ）が特に有用なベクターである。

【００９８】

同様に知られているのは、ヘルパー独立型ウイルス発現ベクターであるバキュロウイルスＡｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体病ウイルス（ＡｃＮＰＶ）に由来する昆虫発現トランスファベクターである。この系に由来する発現ベクターは通常、非相同遺伝子の発現を駆動するべく、強いウイルスポリヘドリン遺伝子プロモータを使用する。バキュロウイルス発現のためには、当業者はバキュロウイルスの所望の部位に非相同性ＤＮＡを導入するための異なるベクターならびに方法を利用することができる。同様に、当該技術分野においては、昆虫細胞により認識される翻訳後修飾のための異なるシグナルが知られている。

【００９９】

同じく本発明の範囲内に含まれているのは、集合体形成に関与するシステイン残基が、集合体形成を妨げるようなその他の残基によって核酸配列のレベルで置換されている、精製済みの組換え型単一又は特異的ＨＣＶＥ１又はＥ２又はＥ１／Ｅ２タンパク質を産生するための方法である。核酸をコードするこのような突然変異を受けたＥ１及び／又はＥ２タンパク質を担持する組換え型ベクターによって発現された組換え型タンパク質も同様に、本発明の範囲内に入る。

【０１００】

本発明は同様に、そのグルコシル化部位のうちの少なくとも１つが除去されその結果グリコシル化突然変異体と呼ばれることを特徴とする、組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質にも関する。実施例の節で説明するように、問題の患者に従ってＨＣＶ疾患を診断（スクリーニング、確認、予後診断など）しこれを防止するためには、異なるグリコシル化突然変異体が望まれる可能性がある。例えば、ＧＬＹ４の欠如したＥ２タンパク質グリコシル化突然変異体が、診断における或る種の血清の反応性を改善するということがわかった。これらのグリコシル化突然変異体は好ましくは、本発明に開示されている方法に従って精製される。同様に本発明の中で考慮されているのは、このようなＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２グリコシル化突然変異体をコードする核酸インサートを担持する組換え型ベクターならびに、かかる組換え型ベクターで形質転換された宿主細胞である。

【０１０１】

本発明は、同じく本発明の一部を成すポリヌクレオチドを包含する組換え型ベクターにも関する。本発明は、より詳細には、配列番号３、５、７、９、１１、１３、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７及び４９の中で表わされている通りの組換え型核酸又はその一部分に関する。

【０１０２】

本発明は同様に前記ＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２配列に作動可能に連結され前記ＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の発現を調節する能力をもつ調節配列に加えて上述の通りのＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む上述の組換え型ベクターで形質転換された宿主細胞をも意図している。

【０１０３】

真核生物宿主には、定義づけの節で記載された通りの下等及び高等真核生物宿主が包含される。下等真核生物宿主には、当該技術分野において周知である酵母細胞が含まれる。高等真核生物宿主には主として、当該技術分野において既知の哺乳動物細胞系統が含まれ、ＨｅＬａ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、ＰＫ１５、ＲＫ１３及び他の数多くの細胞系統を含めた、ＡＴＣＣから入手可能な数多くの不死化された細胞系統が含まれる。

【０１０４】

本発明は、詳細には、上で定義された通りの組換えベクターを含有する上で定義された

通りの宿主細胞によって発現された組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質に関する。これらの組換え型タンパク質は、特定的に、本発明の方法に従って精製される。

【０１０５】

上で定義されている通りのＨＣＶ外被タンパク質を単離又は精製するための好ましい方法は、少なくとも以下の工程を含むものとしてさらに特徴づけされる：

－　本発明に従った組換え型ベクター又はＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２ＨＣＶ外被タンパク質を発現する既知の組換え型ベクターで形質転換された、上で定義された通りの宿主細胞を適切な培地内で増殖させる工程、

－　適切な条件下で、上で定義された通りに前記ベクター配列の発現をひき起こす工程、及び

－　好ましくはＳＨ基遮断薬例えばＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）そして場合によっては適切な洗浄剤好ましくはＥｍｐｉｇｅｎ－ＢＢの存在下で、前記形質転換された宿主細胞を溶解させる工程、

－　例えば、レクチンが好ましくはレンチル－レクチン又はＧＮＡであるものとして、抗－Ｅ１及び／又は抗－Ｅ２特異的モノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィ又はレクチンクロマトグラフィを使用した親和性精製により、前記ＨＣＶ外被タンパク質を回収する工程、及びそれに続く、

－　好ましくはＮＥＭ又はビオチン－ＮＥＭといったようなＳＨ基遮断薬とのインキュベーションが後続する、ＤＴＴといったジスルフィド結合開裂手段を用いた、先行する工程の溶出物のインキュベーション工程、及び

－　例えばゲルろ過そして場合によっては同様にその後のNi^{2+}－ＩＭＡＣクロマトグラフィとそれに続く脱塩工程を用いた、ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマーＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質を単離する工程。

【０１０６】

上述のプロセスの結果として、Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質は、実施例の節で例示されているようにゲルろ過カラム又はＩＭＡＣカラムの空隙容量内でベクター由来の成分及び／又は細胞成分を含む大きな集合体とは異なる形で溶出する形態で産生することが可能である。ジスルフィド架橋開裂工程は有利には同様に、宿主及び／又は発現系由来のタンパク質の存在に起因する為反応性をも無くする。ＮＥＭ及び適切な洗浄剤が細胞の溶解中に存在することですでに、ＨＣＶ外被タンパク質と汚染物質の間の集合を部分的に又さらには完全に防止することができる。

【０１０７】

Ni^{2+}－ＩＭＡＣクロマトグラフィとそれに続く脱塩工程は、好ましくはＪａｎｋｎｅｃｈｔら、１９９１年、及びＨｏｃｈｕｌｉら、１９８８年により記載された通りの$(His)_6$を担持する構築物のために使用される。

【０１０８】

本発明は同様に、マウス又はラットといった小動物の体内でモノクローナル抗体を産生するための方法ならびに本発明のＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質を用いて抗－ＨＣＶ抗体を認識するヒトＢ細胞をスクリーニングし単離するための方法にも関する。

【０１０９】

本発明はさらに、表３に列挙され本書の他の箇所で記載されているような以下のＥ１ペプチドのうちの少なくとも１つを含む組成物にも関する：

コア／Ｅ１Ｖ１領域のアミノ酸１８１～２００にわたるＥ１～３１（配列番号５６）、

Ｅ１領域のアミノ酸１９３～２１２にわたるＥ１～３３（配列番号５７）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０５～２２４にわたるＥ１～３５（配列番号５８）（エピトープＢ）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０８～２２７にわたるＥ１～３５Ａ（配列番号５９）（エピトープＢ）、

Ｅ１領域（Ｖ１、Ｃ１及びＶ２領域（エピトープＢを含む））のアミノ酸１９２～２２８にわたる１ｂＥ１（配列番号５３）、
Ｅ１領域のアミノ酸３０１～３２０にわたるＥ１～５１（配列番号６６）、
Ｅ１Ｃ４領域のアミノ酸３１３～３３２にわたるＥ１～５３（配列番号６７）（エピトープＡ）、
Ｅ１領域のアミノ酸３２５～３４４にわたるＥ１～５５（配列番号６８）、

【０１１０】

本発明は同様に、表３に列挙されているような以下のＥ２ペプチドのうちの少なくとも１つを含む組成物にも関する：
Ｅ２領域のアミノ酸位置３９７～４１６にわたるＥｎｖ６７又はＥ２～６７（配列番号７２）（モノクローナル抗体２Ｆ１０Ｈ１０により認識されるエピトープＡ、図１９参照）、
Ｅ２領域のアミノ酸位置４０９～４２８にわたるＥｎｖ６９又はＥ２～６９（配列番号７３）（エピトープＡ）、
Ｅ２領域の位置５８３～６０２にわたるＥｎｖ２３又はＥ２～２３（配列番号８６）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置５９５～６１４にわたるＥｎｖ２５又はＥ２～２５（配列番号８７）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置６０７～６２６にわたるＥｎｖ２７又はＥ２～２７（配列番号８８）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置５４７～５６６にわたるＥｎｖ１７Ｂ又はＥ２～１７Ｂ（配列番号８３）（エピトープＤ）、
Ｅ２領域の位置５２３～５４２にわたるＥｎｖ１３Ｂ又はＥ２～１３Ｂ（配列番号８２）（モノクローナル抗体１６ＡＥ７により認識されるエピトープＣ、図１９参照）。

【０１１１】

本発明は同様に、以下のＥ２立体配座エピトープのうちの少なくとも１つを含む組成物にも関する：
モノクローナル抗体１５Ｃ８Ｃ１、１２Ｄ１１Ｆ１及び８Ｇ１０Ｄ１Ｈ９により認識されるエピトープＦ、
モノクローナル抗体９Ｇ３Ｅ６により認識されるエピトープＧ、
モノクローナル抗体１０Ｄ３Ｃ４及び４Ｈ６Ｂ２により認識されるエピトープＨ（又はＣ）、又は
モノクローナル抗体１７Ｆ２Ｃ２により認識されるエピトープＩ。

【０１１２】

本発明は同様に、ペプチド又はタンパク質組成物での免疫化の時点で発生させられるＥ１又はＥ２特異的抗体にも関し、ここで該抗体は、上で定義された通りの、ポリペプチド又はペプチドのいずれかと特異的反応性をもち、前記抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。

【０１１３】

本発明は同様に、当該技術分野において既知のプロセスを用いてプラスミド又はファージ内の可変鎖ライブラリから又はヒトＢ細胞集団からスクリーニングされたＥ１又はＥ２特異的抗体にも関し、ここで、該抗体は、上で定義された通りの、ポリペプチド又はペプチドのいずれかと反応性をもち、前記抗体は好ましくはモノクローナル抗体である。

【０１１４】

本発明のＥ１又はＥ２特異的モノクローナル抗体は、一方では骨髄腫細胞系統の細胞の、又他方では上で定義された通りの本発明に従ったＨＣＶポリペプチド又はペプチドに対し免疫化された小動物の特にマウス又はラットからの脾細胞から古典的方法に従って形成されかつ動物の免疫化のために当初使用されてきたポリペプチドを認識するモノクローナル抗体を産生するその能力のために選択されるべきあらゆるハイブリドーマによって産生可能である。

【０１１５】
本発明に関与する抗体は、酵素、蛍光又は放射能タイプの適切な標識によって標識づけすることができる。
【０１１６】
本発明のこの好ましい実施形態に従ったモノクローナル抗体は、Ｈ及びＬ鎖についてコードするゲノミッククローン又はｃＤＮＡからのＨ及びＬ鎖についてコードするマウス及び／又はヒトゲノミックＤＮＡ配列の一部分から出発して、組換え型ＤＮＡ技術を用いて作られたマウスモノクローナル抗体のヒト化されたバージョンでありうる。
【０１１７】
代替的には、本発明のこの好ましい実施形態に従ったモノクローナル抗体はヒトモノクローナル抗体であり得る。本発明のこの実施形態に従った抗体は同様に、ＨＣＶでの感染を受けた又はＨＣＶ対するワクチン接種を受けた患者のヒト末梢血リンパ球に由来するものでもあり得る。かかるヒトモノクローナル抗体は例えば、重症の組換え型免疫不全（ＳＣＩＤ）マウスのヒト末梢血リンパ球（ＰＢＬ）再集団を用いて調製される（最近のレビューについては、Ｄｕｃｈｏｓａｌら、１９９２年を参照のこと）。
【０１１８】
本発明は同様に、レパートリクローニングプロセスによる組換え型抗体の選択のための本発明のタンパク質又はペプチドの使用にも関する（Ｐｅｒｓｓｏｎら、１９９１年）。
【０１１９】
或る種の遺伝子型に由来する単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質又はペプチドに向けられた抗体を、薬剤として、より詳細には、（ＨＣＶＥ１又はＥ２抗原の存在を検出するための）ＨＣＶ遺伝子型の検出用の免疫検定への取込みのため又はＨＣＶ疾患の予後診断／監視のために又は治療剤として使用することが可能である。
【０１２０】
代替的には、本発明は同様に、生体標本中のＥ１又はＥ２抗原の存在を検出するための免疫検定キットの調製のため、ＨＣＶ疾患の予後診断／監視用キットの調製のため、又はＨＣＶ薬剤の調製のための、上述のＥ１又はＥ２特異的モノクローナル抗体のいずれかの使用にも関する。
【０１２１】
本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶ抗原のインビトロ診断又は検出の方法であって、
（ｉ）　免疫複合体の形成を可能にする適切な条件の下で好ましくは固定化された形で、上で定義された通りのＥ１及び／又はＥ２特異的モノクローナル抗体のいずれかと前記生体標本を接触させる工程、
（ｉｉ）　未結合成分を除去する工程、
（ｉｉｉ）　適切な条件下で検出可能な標識に異種抗体が接合した状態で、分析すべき標本中に存在する抗体に特異的に結合する該異種抗体と共に形成された免疫複合体をインキュベートする工程、
（ｉｖ）　前記免疫複合体の存在を視覚的に又は機械的に（例えばデンシトメトリ、蛍光測定、比色分析）検出する工程、
を少なくとも含んで成る方法にも関する。
【０１２２】
本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶ抗原のインビトロ診断用キットであって、
－　好ましくは固体基質上に固定化された、上で定義された通りの少なくとも１つのモノクローナル抗体、
－　生体標本中に存在するＨＣＶ抗原とこれらの抗体の間の結合反応を可能にする緩衝液又はそれを生成するのに必要な構成成分、
－　先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段、
を含んで成り、場合によっては、観察された結合パターンから標本内に存在するＨＣＶ抗

原を推測するための自動走査及び解釈デバイスをも包含するキットにも関する。

【０１２３】

本発明は同様に、本発明の方法に従って精製されたＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２組換え型ＨＣＶタンパク質を含む組成物又は、薬剤として使用するための以上で規定された通りの少なくとも１つのペプチドを含む組成物にも関する。

【０１２４】

本発明はより詳細には、免疫応答を生成するべく薬学的に受容可能なアジュバントを場合によって伴って充分な量の組成物を投与する工程を含む、ＨＣＶに対して哺乳動物好ましくはヒトを免疫化するためのワクチンとして使用するための、上で定義された通り組換え型外被タンパク質又は以上で規定された外被ペプチドのうちの少なくとも１つを含んで成る組成物に関する。

【０１２５】

さらに詳細には、本発明は、上述の通りのワクチンの調製のための上述の通りの組成物のうちのいずれかの使用に関する。

【０１２６】

同様に、本発明は、上述の通りのＥ１及び／又はＥ２領域に由来するＨＣＶ単一又は特異的オリゴマータンパク質又はペプチドを含んで成る、ＨＣＶに対する哺乳動物好ましくはヒトを免疫化するためのワクチン組成物に関する。

【０１２７】

当該技術分野において既知の方法に従って、免疫原性組成物を調製することが可能である。当該組成物は、通常は薬学的に受容可能な担体と組合され、好ましくはさらにアジュバントを含む、上で定義された通りの組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２単一又は特異的オリゴマータンパク質又は上に定義されたＥ１又はＥ２ペプチドを免疫原性量だけ含んで成る。

【０１２８】

本発明の単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質、Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２のいずれかは、Ｅ１又はＥ２のいずれかに対する抗体の形成がその他の外被タンパク質に対するよりもさらに望ましいものであり得ること、又Ｅ２タンパク質がＨＣＶ型相互間で交差反応性をもちＥ１タンパク質が型特異的であることから、特に有用なワクチン抗原を提供すると予想されている。複数の遺伝子型に由来するＥ１タンパク質及び１型Ｅ２タンパク質を包含するカクテルが特に有利である。Ｅ１対Ｅ２又はＥ２対Ｅ１のモル余剰分を含有するカクテルも同じく、特に有用である。抗体供給源を提供するか又は動物体内で防御免疫を誘発するかのいずれかの目的で、抗体産生を誘発するべく動物に対し免疫原性組成物を投与することができる。

【０１２９】

薬学的に受容可能担体には、それ自体組成物を受ける個体にとって有害な抗体の産生を誘発することのないあらゆる担体が含まれる。適切な担体は、標準的に、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合体アミノ酸、アミノ酸共重合体及び不活性ウイルス粒子といったようなゆっくりと代謝される大きな高分子である。このような担体は、当業者にとって周知のものである。

【０１３０】

組成物の有効性を増強させるための好ましいアジュバントには、水酸化アルミニウム（ミョウバン）、米国特許第４，６０６，９１８号に見られるようなＮ－アセチル－ムラミル－Ｌ－トレオニル－Ｄ－イソグルタミン（ｔｈｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチル－ノルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミン（ｎｏｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１’－２’－ジパルミトイル－ｓｎ－グリセロ－３－ヒドロキシホスホリルオキシ）－エチルアミン（ＭＴＰ－ＰＥ）及び、２％のスクアレン／Ｔｗｅｅｎ８０エマルジョン中に細菌から抽出された３つの成分、モノホスホリル脂質Ａ、トレハロースジミコレート及び細胞壁骨格（ＭＰＬ＋ＴＤＭ＋ＣＷＳ）を含むＲＩＢＩが含まれるが、これらに制限されるわけではない。３つの成

分ＭＰＬ、ＴＤＭ又はＣＷＳのいずれかを単独で使用することも、２つずつ組合せて使用することも可能である。さらには、Ｓｔｉｍｕｌｏｎ（マサチューセッツ州ウスター（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ）のＣａｍｂｒｉｄｇｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）又はＳＡＦ－１（Ｓｙｎｔｅｘ）といったアジュバントも使用できる。さらに、ヒト以外での利用分野及び研究のためには、完全フロインドアジュバント（ＣＦＡ）及び不完全フロインドアジュバント（ＩＦＡ）を使用することができる。

【０１３１】

免疫原性組成物は標準的には、薬学的に受容可能ビヒクル例えば水、食塩水、グリセロール、エタノールなどを含有することになる。付加的には、加湿又は乳化剤、ｐＨ緩衝物質、防腐剤などといったような補足的物質をかかるビヒクル内に包含させることもできる。

【０１３２】

典型的には、免疫原性組成物は、液体溶液又は懸濁液のいずれかとして、注射物質として調製され、注入に先立ち液体ビヒクル内に溶かすか又は懸濁させるのに適した固体形態も同様に調製可能である。調製物は同様に、アジュバントの効果を増強させるため、リポゾーム内に乳化又は封入されてもよい。Ｅ１及びＥ２タンパク質は同様に、例えばＱｕｉｌ Ａ（ＩＳＣＯＭＳ）といったサポニンと共に「免疫刺激複合体」内に取込むこともできる。

【０１３３】

ワクチンとして用いられる免疫原性組成物は、「充分な量」又は「免疫学的に有効な量」の外被タンパク質、ならびに必要に応じて上述の成分のうちのその他のいずれかを含んで成る。「免疫学的に有効な」というのは、個体に対する単一用量として又は一セットの用量の一部分としての投与量が、上で定義された通りの治療にとって有効であることを意味している。この量は、治療すべき個体の健康状態及び身体的条件、治療すべき個体の分類群（例えば非ヒト霊長類、霊長類など）、抗体を合成する個体の免疫系の能力、望まれる防御の度合、ワクチンの剤形、医学的状況についての治療医の査定、感染性ＨＣＶの菌株及びその他の関連因子に応じて変動する。この量は、日常的試行を通して決定できる比較的広い範囲の中に入ると予想される。通常、この量は０．０１～１０００μｇ／用量、より詳細には０．１～１００μｇ／用量の間で変動することになる。

【０１３４】

単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質は、同じく、Ｂ型肝炎表面抗原と同じ要領で相同（例えばコア、ＮＳ２、ＮＳ３、ＮＳ４又はＮＳ５領域からのＢ細胞エピトープ又はＴ細胞エピトープ）又は非相同（非ＨＣＶ）ハプテンを提示するべくワクチン担体としても役立つ可能性がある（欧州特許出願第１７４，４４４号）。この場合、外被タンパク質は、集合体に接合された抗原又はハプテンに対する免疫応答をシミュレートする能力をもつ免疫原性担体を提供する。抗原は、従来の化学的方法によって接合されてもよいし、又タンパク質の親水性領域に対応する場所でＥ１及び／又はＥ２をコードする遺伝子中にクローニングされてもよい。かかる親水性領域は、Ｖ１領域（アミノ酸位置１９１～２０２を包含する）、Ｖ２領域（アミノ酸位置２１３～２２３を包含する）、Ｖ３領域（アミノ酸位置２３０～２４２を包含する）、Ｖ４領域（アミノ酸位置２３０～２４２を包含する）、Ｖ５領域（アミノ酸位置２９４～３０３を包含する）及びＶ６領域（アミノ酸位置３２９～３３６を包含する）を包含する。ハプテンの挿入のためのもう１つの有用な場所は、疎水性領域（およそアミノ酸位置２６４～２９３を包含する）である。本発明では、欠失を受けたＥ１タンパク質の抗血清との反応性に影響を及ぼすことなくこの領域を欠失させることができるということが示されている。従って、ハプテンは欠失部位に挿入され得る。

【０１３５】

免疫原性組成物は、従来、標準的に例えば皮下又は筋肉注射により、非経口投与される。その他の投与方法に適した付加的な剤形には、経口剤形及び坐薬が含まれる。投薬治療は単一回投与計画又は多数回投与計画であってよい。ワクチンは、その他の免疫調節剤と

併用で投与可能である。

【０１３６】

本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶ抗体のインビトロ検出のための、上述の通りのペプチド又はポリペプチドを含んで成る組成物にも関する。

【０１３７】

本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶ抗体を検出するための免疫検定キットの調製を目的とした上述の通りの組成物の使用にも関する。

【０１３８】

本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶ抗体のインビトロ診断の方法であって、

（ｉ） 免疫複合体の形成を可能にする適切な条件の下で好ましくは固定化された形で、上で定義された通りの外被ペプチド又はタンパク質のいずれかを含む組成物と前記生体標本を接触させる工程であって、前記ペプチド又はタンパク質が、ストレプトアビジン又はアビジン複合体を用いて固体基質に共有結合されているビオチニル化ペプチド又はタンパク質である工程、

（ｉｉ） 未結合成分を除去する工程、

（ｉｉｉ） 適切な条件下で検出可能な標識に異種抗体が接合した状態で、該異種抗体と共に形成された免疫複合体をインキュベートする工程、

（ｉｖ） 前記免疫複合体の存在を視覚的に又は機械的に（例えばデンシトメトリ、蛍光測定、比色分析）検出する工程、

を少なくとも含んで成る方法にも関する。

【０１３９】

代替的には、本発明は同様に、以上で開示されている通りの組換えにより産生された精製済みの単一又は特異的オリゴマータンパク質Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質が、生体標本中に存在するＨＣＶ抗体について競合する目的でＥ１及び／又はＥ２ペプチドと組合せて使用される。競合免疫検定形式にも関する。

【０１４０】

本発明は同様に、生体標本中のＨＣＶ抗体の存在を見極めるためのキットであって、

－ 好ましくは固体基質上、より好ましくは同じＥＬＩＳＡ平板の異なるマイクロウェル上そしてさらに一層好ましくは同一の膜ストリップ上に固定化された状態にある、場合によってＨＣＶからのその他のポリペプチド又はペプチド又はその他のＨＣＶ型と組合わされている、上で定義された通り少なくとも１つのペプチド又はタンパク質組成物、

－ 生体標本中に存在するＨＣＶに対する抗体とこれらの抗体の間の結合反応を可能にする緩衝液又はそれを生成するのに必要な構成成分、

－ 先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段、

を含んで成り、場合によっては、観察された結合パターンから標本内に存在するＨＣＶ抗原を推測するための自動走査及び解釈デバイスをも包含するキットにも関する。

【０１４１】

本発明に従った免疫検定方法は、ＨＣＶの感染を受けた個体からの血清中の抗体により認識された線状（ペプチドの場合）及び立体配座エピトープ（単一又は特異的オリゴマータンパク質）を維持するＥ１及び／又はＥ２ドメインからの単一又は特異的オリゴマー抗原を利用する。例えば、単一又は特異的オリゴマー抗原、二量体抗原ならびに単一又は特異的オリゴマー抗原の組合せを使用することが、本発明の範囲内に入る。本発明のＨＣＶＥ１及びＥ２抗原は、抗体を検出するために既知の抗原を利用する事実上あらゆる検定形式において利用可能である。当然のことながら、ＨＣＶ立体配座エピトープを変性するような形式は、回避又は適合化すべきである。これらの検定全てに共通の特長は、身体構成成分中に存在するいずれかのこのような抗体に対し抗原が結合できるようにする条件の下でＨＣＶ抗体を含有する疑いのある構成成分と抗原を接触させるという点にある。かかる条件は、標準的には、余剰の抗原を用いて、生理学的温度、ｐＨ及びイオン強度となる。供試体との抗原のインキュベーションの後には、抗原から成る免疫複合体の検出が行なわれる。

【０１４２】
免疫検定の設計は、大幅に変更される場合があり、多数の形式が当該技術分野において既知である。例えば、プロトコルが、固体支持体又は免疫沈降を使用する可能性もある。大部分の検定には、標識づけされた抗体又はポリペプチドの使用が関与している。該標識は、例えば酵素、蛍光、化学発光、放射性又は染料分子であり得る。免疫複合体からのシグナルを増幅する検定も同様に知られている。その例としては、ビオチン及びアビジン又はストレプトアビジンを利用する検定、及びＥＬＩＳＡ検定といったような酵素で標識づけ又は媒介される免疫検定がある。
【０１４３】
免疫検定は、制限的意味なく、同種の又は異種の形式で、かつ標準型又は競合型であってよい。異種形式の場合、ポリペプチドは標準的に、インキュベーションの後でポリペプチドから標本を分離することを容易にするべく、固体マトリックス又は支持体に結合されている。使用可能な固体支持体の例としては、ニトロセルロース（例えば、膜又はマイクロタイターウェル形態の場合）、ポリ塩化ビニル（例えばシート又はマイクロタイターウェルの場合）、ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズ又はマイクロタイター平板の場合）、ポリフッ化ビニリデン（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｎ（商標）として知られている）、ジアゾ化紙、ナイロン膜、活性化ビーズ及びプロテインＡビーズがある。例えば、異種形式においては、Ｄｙｎａｔｅｃｈ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｎ（商標）１又はＩｍｍｕｎｏｌｏｎ（商標）２マイクロタイター平板又は０．２５インチのポリスチレンビーズ（Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　Ｐｌａｓｔｉｃ　Ｂａｌｌ）を使用することができる。抗原ポリペプチドを含有する固体支持体は、標準的に、試験用標本からそれを分離した後及び結合した抗体を検出する前に洗浄される。標準型及び競合型の両方の形式が当該技術分野において既知である。
【０１４４】
同種形式では、試験用標本は、溶解した抗原の組合せと共にインキュベートされる。例えば、それは、形成されるあらゆる抗原－抗体複合体を沈降させることになる条件の下であってよい。これらの検定のための標準型及び競合型の両方の形式が当該技術分野において既知である。
【０１４５】
標準形式では、抗体－抗原複合体中のＨＣＶ抗体の量は、直接監視される。これは、抗ＨＣＶ抗体上のエピトープを認識する標識づけされた抗異種（例えば非ヒト）抗体が複合体形成に起因して結合することになるか否かを見極めることにより達成できる。競合形式では、標本中のＨＣＶ抗体の量は、複合体中の既知の量の標識づけされた抗体（又はその他の競合するリガンド）の結合に対する競合的効果を監視することによって演繹される。
【０１４６】
抗－ＨＣＶ抗体を含む形成された複合体（又は、競合検定の場合は、競合する抗体の量）は、形式に応じて一定数の既知の技術のいずれかによって検出される。例えば、複合体中の標識づけされていないＨＣＶ抗体は、標識（例えば酵素標識）と複合体形成された抗－異種Ｉｇの接合体を用いて検出可能である。
【０１４７】
免疫沈降又は凝集検定形式では、ＨＣＶ抗原と抗体の間の反応が、溶液又は懸濁液から沈降する網状組織を形成し、沈降物の目に見える層又はフィルムを形成する。試験用供試体の中にいかなる抗－ＨＣＶ抗体も存在しない場合、いかなる沈降物も形成されない。
【０１４８】
現在、３つの特異的タイプの粒子凝集（ＰＡ）検定が存在している。これらの検定は、支持体にコーティングされた場合のさまざまな抗原に対する抗体の検出のために用いられる。この検定の１つのタイプは、ＲＢＣに対して抗原（又は抗体）を受動的に吸着させることによって感作される赤血球（ＲＢＣ）を用いた血球凝集検定である。身体構成成分の中に存在する特異的抗原抗体の添加は（該当する場合）、精製された抗原でコーティングされたＲＢＣを凝集させる。

【０１４９】
血球凝集検定において潜在的な非特異的反応を無くするため、ＰＡ内のＲＢＣに代って２つの人工的担体を使用することができる。これらのうち最も一般的であるのは、ラテックス粒子である。しかしながら、ゼラチン粒子も同様に使用することができる。これらの担体のうちのいずれかを利用する検定は、精製された抗原でコーティングされた粒子の受動的凝集に基づいている。

【０１５０】
立体配座エピトープを含む本発明のＨＣＶ単一又は特異的オリゴマーＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２抗原は標準的に、これらの免疫検定において使用するため、キットの形に包装されることになる。このキットは通常、別々のコンテナ内に、未変性ＨＣＶ抗原、対照抗体製剤（正及び／又は負）、検定形式がそれを必要とする時には標識づけされた抗体、そして標識がシグナルを直接生成しない場合にはシグナル生成試薬（例えば酵素基質）を収納することになる。未変性ＨＣＶ抗原はすでに固体マトリクスに結合されていてもよいし、又はそれをマトリクスに結合させるために試薬と別々であってもよい。通常、キットには検定を実施するための使用説明書（例えば文書、テープ、ＣＤ－ＲＯＭなど）が含まれる。

【０１５１】
潜在的に感染性のＨＣＶが欠如している供給物の調製のために血液をスクリーニングするにあたっては、未変性ＨＣＶ抗原を利用する免疫検定が有用である。血液供給物の調製方法には、以下の工程が含まれる。すなわち、ＨＣＶ抗体（存在する場合）とＨＣＶ抗原の間の免疫学的反応を可能にするべく本発明のＨＣＶＥ１及び／又はＥ２タンパク質と、血液提供個体からの身体構成成分（好ましくは血液又は血液成分）を反応させる工程、反応の結果として抗－ＨＣＶ抗体－ＨＣＶ抗原複合体が形成されるか否かを検出する工程。血液供給物に寄与される血液は、未変性ＨＣＶ抗原Ｅ１又はＥ２に対する抗体を示さないドナーからのものである。

【０１５２】
ＨＣＶ抗原に対する陽性反応性の場合、偽陽性の可能性を少なくするため、免疫検定をくり返すことが好ましい。例えば、血液製剤（例えば輸血、血漿、第ＶＩＩＩ因子、免疫グロブリンなど）の生産用の血液の大規模スクリーニングにおいては、「スクリーニング」試験は、標準的に特異性を犠牲にして（汚染血が全く通らないことを保証するため）感応性を増大させるように形式決定されている。すなわち偽陽性の率は増大する。かくして、「反復的に反応する、すなわち提供された標本に対する２回以上の免疫検定において陽性であるドナーをさらにテストするのを保留するのが標準的である。しかしながら、ＨＣＶ陽性の確認のために、「確認」試験は、標準的に感応性を犠牲にして（いかなる偽陽性標本も確認されないことを保証するべく）特異性を増大させるように形式決定されている。従って、Ｅ１及びＥ２について本発明の中で記載されている精製方法は、ＨＣＶ診断検定中に単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質を包含させるために非常に有利なものとなる。

【０１５３】
選択された固体相は、重合体又はガラスビーズ、ニトロセルロース、微粒子、反応トレイとしてのマイクロウェル、試験管及び磁気ビーズを包含しうる。シグナル発生化合物には、酵素、発光性化合物、色原体、放射性元素及び化学発光性化合物が含まれる可能性がある。酵素の例としては、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ及びベーターガラクトシダーゼが含まれる。エンハンサ化合物の例としては、ビオチン、抗ビオチン及びアビジンが含まれる。エンハンサ化合物結合成員の例としては、ビオチン、抗ビオチン及びアビジンが含まれる。リウマチ因子様物質の効果を遮断するために、試験用標本は、リウマチ因子様物質の効果を遮断するのに充分な条件に付される。これらの条件には、混合物を形成させるべく一定量の抗ヒトＩｇＧと試験用標本を接触させること、及び実質的にリウマチ因子様の物質を含まない反応混合物製品を形成するのに充分な条件下でかつそのような時間だけ混合物をインキュベートさせることが含まれる。

【０１５４】
本発明は、さらに、ＨＩＶ疾患をインビトロ監視するか又はＨＣＶ感染を患う患者の（例えばインターフェロンでの）治療に対する応答を予後診断する目的での、上で定義された通りのＥ１タンパク質又はその一部分、より詳細にはＨＣＶ単一又は特異的オリゴマーＥ１タンパク質の使用であって、
－　免疫原性複合体の形成を可能にする条件下でＥ１タンパク質又はその適切な部分と共にＣ型肝炎感染患者からの生体標本をインキュベートする工程、
－　未結合成分を除去する工程、
－　（例えば（インターフェロン）療法の開始時点及び／又はその経過中の）前記標本中に存在する抗－Ｅ１力価を計算する工程、
－　ＨＣＶ疾患の自然な経過を監視するか、又は、治療の開始時点及び／又は治療の経過中に見い出された抗－Ｅ１力価の量に基づいて前記患者の治療に対する応答を予後診断する工程、
を含んで成る使用を意図している。
【０１５５】
初期抗－Ｅ１力価の２、３、４、５、７、１０、１５又好ましくは２０倍超の減少を示す患者については、ＨＣＶ療法、より詳細にはインターフェロン療法に対し長期にわたる持続的応答を示す者という結論を下すことができると思われる。実施例の節では、抗－Ｅ１検定が、ＩＦＮ治療又はＣ型肝炎ウイルス疾患の治療全般に対する長期応答を予後診断するために非常に有用でありうるということが例示されている。
【０１５６】
より詳細には、表３に列挙されている通りの以下のＥ１ペプチドが、ＨＣＶ疾患をインビトロ監視するか又はＨＣＶ感染を患う患者のインターフェロン治療に対する応答を予後診断するために有用であることが発見された：
コア／Ｅ１Ｖ１領域のアミノ酸１８１～２００にわたるＥ１～３１（配列番号５６）、
Ｅ１領域のアミノ酸１９３～２１２にわたるＥ１～３３（配列番号５７）、
Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０５～２２４にわたるＥ１～３５（配列番号５８）（エピトープＢ）、
Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０８～２２７にわたるＥ１～３５Ａ（配列番号５９）（エピトープＢ）、
Ｅ１領域（Ｖ１、Ｃ１及びＶ２領域（エピトープＢを含む））のアミノ酸１９２～２２８にわたる１ｂＥ１（配列番号５３）、
Ｅ１領域のアミノ酸３０１～３２０にわたるＥ１～５１（配列番号６６）、
Ｅ１Ｃ４領域のアミノ酸３１３～３３２にわたるＥ１～５３（配列番号６７）（エピトープＡ）、
Ｅ１領域のアミノ酸３２５～３４４にわたるＥ１～５５（配列番号６８）。
【０１５７】
上述のペプチドのより小さなフラグメントも又、本発明の範囲内に入るということを理解すべきである。前記より小さなフラグメントは、化学合成によって容易に調製可能であり得、以上で及び実施例の節で詳述されるような検定において使用されるそれらの能力についてテストされ得る。
【０１５８】
本発明は同様に、ＨＣＶ疾患を監視するか又はＨＣＶ感染を患う患者の治療（例えばインターフェロン）に対する応答を予後診断するためのキットであって、
－　少なくとも１つのＥ１タンパク質又はＥ１ペプチド、より詳細には、上で定義された通りのＥ１タンパク質又はＥ１ペプチド、
－　生体標本中に存在する抗－Ｅ１抗原とこれらのタンパク質又はペプチドの間の結合反応を可能にする緩衝液、又はそれを生成するのに必要な構成成分、
－　先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段、
－　場合によっては同様に、治療の進行中の抗－Ｅ１力価の減少を推測するための自動

走査及び解釈デバイス、
を含んで成るキットにも関する。
【０１５９】
抗－Ｅ２レベルはその他のＨＣＶ抗原に対する抗体と比較して減少することから、Ｅ１タンパク質又はペプチドについて以上で記したようなＨＣＶ治療を監視／予後診断するために、本発明に従ったＥ２タンパク質及びペプチドも或る程度は使用できるということを理解すべきである。しかしながら、ＨＣＶ疾患を監視し予後診断するための試験の中で使用するのに同じく適していると思われるＥ２領域内の或る種のエピトープを見極めることが可能であるかもしれないということを理解すべきである。
【０１６０】
本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶの単数又は複数の血清型を検出するため、より詳細には１つの検定形式に組合わされた検出すべき異なる型のＨＣＶの抗体を検出するための血清型割り出し検定において、
（ｉ） 免疫複合体の形成を可能にする適切な条件の下で好ましくは固定化された形で、上で定義された通りのＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質組成物のうちの少なくとも１つ又はＥ１又はＥ２ペプチド組成物のうちの少なくとも１つと、単数又は複数の血清型のＨＣＶ抗体の存在について分析すべき生体標本を接触させる工程、
（ｉｉ） 未結合成分を除去する工程、
（ｉｉｉ） 適切な条件下で検出可能な標識に異種抗体が接合させられている状態で、該異種抗体と共に形成された免疫複合体をインキュベートする工程、
（ｉｖ） 前記免疫複合体の存在を視覚的に又は機械的に（例えばデンシトメトリ、蛍光測定、比色分析）検出し、観察された結合パターンから存在する単数又は複数のＨＣＶ血清型の存在を推測する工程、
を少なくとも含んで成る方法にも関する。
【０１６１】
この方法で使用されるタンパク質又はペプチドの組成物が、組換えにより発現された型特異的外被タンパク質又は型特異的ペプチドであることを理解すべきである。
【０１６２】
本発明はさらに、生体標本中に存在する単数又は複数のＨＣＶ血清型を割出すため、より詳細にはこれらのＨＣＶ血清型に対する抗体を検出するためのキットであって、
－ 上で定義された通りの少なくとも１つのＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質又はＥ１又はＥ２ペプチド、
－ 生体標本中に存在する抗－Ｅ１抗体とこれらのタンパク質又はペプチドの間の結合反応を可能にする緩衝液又はそれを生成するのに必要な構成成分、
－ 先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段、
－ 場合によっては、同様に、観察された結合パターンから存在する単数又は複数の血清型の存在を検出するための自動走査及び解釈デバイス、
を含んで成るキットにも関する。
【０１６３】
本発明は同様に、上で定義された通りの方法に従ってＨＣＶ遺伝子型の存在を見極めるため、固体基質上に固定化し逆相ハイブリダイゼーション検定内に取込むことを目的とする、上で定義された通りのペプチド又はタンパク質組成物の使用にも関する。その他のＨＣＶポリタンパク質領域からのその他の型特異的抗原との組合せも同様に本発明の範囲内に入る。
【０１６４】
本発明は、前記タンパク質をジスルフィド結合開裂又は還元剤と接触させる工程を含む組換え型プロセスにより産生されたＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の中から選択された組換え型ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質を精製するための方法を提供している。本発明の接触方法は、部分的開裂又は還元条件下で実施可能である。好ましくは、ジスルフィド結合開裂剤は、好ましくは０．１～５０ｍＭ、好まし

くは０．１～２０ｍＭ、より好ましくは０．５～１０ｍＭの濃度範囲内のジチオトレクトール（ＤＴＴ）である。代替的には、ジスルフィド結合開裂剤は、好ましくは１～１０％、より好ましくは３．５％の濃度でのＥｍｐｉｇｅｎ－ＢＢ（これは主成分としてＮ－ドセシル－Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシンを含有する混合物である）といった洗浄剤であってよい。洗浄剤、ジスルフィド開裂剤及び／又は還元剤の混合物を使用することも可能である。１つの実施形態においては、ジスルフィド結合再形成は、Ｎ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）又はその誘導体といったＳＨ基遮断薬で妨げられる。好ましい１実施形態においては、ジスルフィド結合再形成は、低ｐＨ条件を使用して遮断される。

【０１６５】

本発明はさらに、任意にはＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）といったＳＨ遮断薬の存在下で宿主細胞を発現する組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２を溶解させる工程；抗－Ｅ１及び／又は抗－Ｅ２特異的モノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティ又はレンチルレクチンクロマトグラフィといったレクチンクロマトグラフィを使用した親和性精製により、前記ＨＣＶ外被タンパク質を回収する工程；好ましくは同じくＮＥＭ又はビオチンＮＥＭといったようなＳＨ遮断薬の存在下での、ＤＴＴといったジスルフィド結合開裂剤を用いたジスルフィド結合の還元又は開裂工程；及びゲルろ過そして場合によっては付加的にNi^{2+}－ＩＭＡＣクロマトグラフィ及び脱塩工程による、還元されたＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２外被タンパク質の回収工程がさらに関与する、本書で記載されている通りの方法を提供する。

【０１６６】

本発明は、好ましくは本書に記載された方法で単離されたＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２の中から選択された、実質的に単離及び／又は精製された、及び／又は単離及び／又は精製された組換え型ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質を含有する組成物を提供する。好ましい実施形態においては、本発明の組換え型ＨＣＶ外被タンパク質は、ワクシニア、組換え型酵母細胞といったような組換え型哺乳動物細胞の中で発現された。

【０１６７】

本発明は、操作可能な組合せの形で、単一又は特異的オリゴマーＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の発現を可能にするヌクレオチド配列、原核生物、真核生物又はウイルスプロモータ配列及びベクター配列を含有する組換え型ベクターを提供する。１つの実施形態においては、ベクターのヌクレオチド配列は、アミノ酸位置１～１９２の間の、領域内で開始し、アミノ酸位置２５０～４００の間の領域内、より詳細にはアミノ酸位置２５０～３４１の間の領域内、さらに一層好ましくは位置２９０～３４１の間の領域内のいずれかの位置で終わる単一ＨＣＶＥ１タンパク質をコードする。もう１つの実施形態においては、ベクターのヌクレオチド配列は、アミノ酸位置１１７～１９２の間の領域内で開始しアミノ酸位置２６３～４００の間の領域内、さらに詳細には位置２５０～３２６の間の領域内で終わる単一ＨＣＶＥ１タンパク質をコードする。さらにもう１つの実施形態では、ベクターのヌクレオチド配列は、位置２６４～２９３の間±８アミノ酸の第１の疎水性ドメインの欠失を担持する単一ＨＣＶＥ１タンパク質をコードする。さらなる実施形態においては、ベクターのヌクレオチド配列は、アミノ酸位置２９０～４０６の間の領域内で開始しアミノ酸位置６００～８２０の間の領域内で終わる、より詳細には位置３２２～４０６の間の領域内、さらに一層好ましくは位置３４７～４０６の間の領域、そして最も好ましくは位置３６４～４０６の間の領域内で開始し；好ましくはアミノ酸位置６２３、６５０、６６１、６７３、７１０、７１５、７２０、７４６又は８０９のうちのいずれかで終わる単一ＨＣＶＥ２タンパク質をコードする。１つの実施形態において本発明のベクターは、ヌクレオチド配列に対し作動可能に連結された３’末端停止コドン及び５’末端ＡＴＧコドンを含有している。該ベクターは、１実施形態において、コーディング領域に３’末端で付加された３～１０個好ましくは６個のヒスチジンコドン及び／又は第Ｘａ因子開裂部位に……をさらに含むヌクレオチド配列をさらに含んでいる。本発明のベクターは任意には、Ｅ１又はＥ２タンパク質内に存在するグリコシル化部位のうちの

少なくとも１つが核酸レベルで除去されている１つのヌクレオチド配列を含有する。

【０１６８】

本発明は、配列番号３、５、７、９、１１、１３、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７及び４９のうちのいずれか１つを含有する核酸又はその一部分を提供する。本発明のベクターは、好ましくは、配列番号３、５、７、９、１１、１３、２１、２３、２５、２７、２９、３１、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７及び４９のうちのいずれか１つを含有する核酸又はその一部分を含むヌクレオチド配列を含んでいてよい。

【０１６９】

本発明の組成物はさらに、発現されたか又は本書で記載されているベクターの発現産物である組換え型ＨＣＶ外被タンパク質を含む。

【０１７０】

本発明は、宿主細胞内で操作可能でありかつＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質の発現を調節する能力をもつ調節配列に加えて本書に記載されている通りのＨＣＶＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質をコードするヌクレオチド配列をベクターが含有している、本書に記載されている通りの少なくとも１つの組換え型ベクターで形質転換された宿主細胞を提供している。さらに、本発明は、本発明の宿主細胞により発現された組換え型Ｅ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質を提供している。

【０１７１】

本発明はさらに、本書で記載されている通りの組換え型ベクターで形質転換された本書で記載されている通りの宿主細胞を適切な培地内で増殖させる工程；適切な条件下で本書で記載されている通りのベクターのベクターヌクレオチド配列の発現をひき起こす工程；好ましくはＳＨ基遮断薬、例えばＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ）の存在下で、形質転換された宿主細胞を溶解させる工程；例えば、レクチンが好ましくはレンチル－レクチンであるものとして、抗－Ｅ１及び／又は抗－Ｅ２特異的モノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティクロマトグラフィ又はレクチンクロマトグラフィを使用した親和性精製により、前記ＨＣＶ外被タンパク質を回収する工程、及びそれに続く；好ましくは同じくＮＥＭ又はビオチン－ＮＥＭといったようなＳＨ基遮断薬の存在下で、ＤＴＴといったジスルフィド結合開裂手段を用いた、先行する工程の溶出物のインキュベーション工程；及び例えばゲルろ過そして場合によっては同様に付加的なNi^{2+}－ＩＭＡＣクロマトグラフィと脱塩工程を用いた、ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマーＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質を単離する工程、を含む、本書で記載されている通りの方法を提供する。

【０１７２】

本発明は、以下のＥ１及び／又はＥ２ペプチドのうちの少なくとも１つを含む組成物を提供している：

コア／Ｅ１Ｖ１領域のアミノ酸１８１～２００にわたるＥ１～３１（配列番号５６）、

Ｅ１領域のアミノ酸１９３～２１２にわたるＥ１～３３（配列番号５７）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０５～２２４にわたるＥ１～３５（配列番号５８）（エピトープＢ）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０８～２２７にわたるＥ１～３５Ａ（配列番号５９）（エピトープＢ）、

Ｅ１領域（Ｖ１、Ｃ１及びＶ２領域（エピトープＢを含む））のアミノ酸１９２～２２８にわたる１ｂＥ１（配列番号５３）、

Ｅ１領域のアミノ酸３０１～３２０にわたるＥ１～５１（配列番号６６）、

Ｅ１Ｃ４領域のアミノ酸３１３～３３２にわたるＥ１～５３（配列番号６７）（エピトープＡ）、

Ｅ１領域のアミノ酸３２５～３４４にわたるＥ１～５５（配列番号６８）、

Ｅ２領域のアミノ酸位置３９７～４１６にわたるＥｎｖ６７又はＥ２～６７（配列番号

７２）（エピトープＡ）、
Ｅ２領域のアミノ酸位置４０９～４２８にわたるＥｎｖ６９又はＥ２～６９（配列番号７３）（エピトープＡ）、
Ｅ２領域の位置５８３～６０２にわたるＥｎｖ２３又はＥ２～２３（配列番号８６）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置５９５～６１４にわたるＥｎｖ２５又はＥ２～２５（配列番号８７）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置６０７～６２６にわたるＥｎｖ２７又はＥ２～２７（配列番号８８）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置５４７～５６６にわたるＥｎｖ１７Ｂ又はＥ２～１７Ｂ（配列番号８３）（エピトープＤ）、
Ｅ２領域の位置５２３～５４２にわたるＥｎｖ１３Ｂ又はＥ２～１３Ｂ（配列番号８２）（エピトープＣ）。

【０１７３】
本発明は同様に、以下のＥ２立体配座エピトープのうちの少なくとも１つを含む組成物を提供している：
モノクローナル抗体１５Ｃ８Ｃ１、１２Ｄ１１Ｆ１及び８Ｇ１０Ｄ１Ｈ９により認識されるエピトープＦ、
モノクローナル抗体９Ｇ３Ｅ６により認識されるエピトープＧ、
モノクローナル抗体１０Ｄ３Ｃ４及び４Ｈ６Ｂ２により認識されるエピトープＨ（又はＣ）、
モノクローナル抗体１７Ｆ２Ｃ２により認識されるエピトープＩ。

【０１７４】
本発明は同様に、本書で記載されている通りの組成物での免疫化の時点で発生させられるＥ１及び／又はＥ２特異的モノクローナル抗体をも提供する。本発明の抗体は、例えば、ＨＣＶＥ１又はＥ２抗原の存在を検出するための免疫検定キットの中に包含するため、疾患の予後診断／監視のため又はＨＣＶ療法のための薬剤として使用することができる。本発明は、ＨＣＶＥ１又はＥ２抗原を検出するための免疫検定キットの調製のため、ＨＣＶ疾患の予後診断／監視用キットの調製又はＨＣＶ薬剤の調製のための本書に記載されている通りのＥ１及び／又はＥ２特異的モノクローナル抗体の使用を提供する。

【０１７５】
本発明は、生体標本中に存在するＨＣＶ抗原のインビトロ診断の方法であって、
（ｉ）　免疫複合体の形成を可能にする適切な条件の下で好ましくは固定化された形で、本書で記載されている通りのＥ１及び／又はＥ２特異的モノクローナル抗体と前記生体標本を接触させる工程、
（ｉｉ）　未結合成分を除去する工程、
（ｉｉｉ）　適切な条件下で検出可能な標識に異種抗体が接合されている状態で、異種抗体と共に形成された免疫複合体をインキュベートする工程、
（ｉｖ）　前記免疫複合体の存在を視覚的に又は機械的に検出する工程、
を少なくとも含んで成る方法を提供している。

【０１７６】
本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶ抗原の存在を見極めるためのキットであって、好ましくは固体基質上に固定化された形の本書で記載されている通りの少なくとも１つのＥ１及び／又はＥ２特異的モノクローナル抗体、生体標本中に存在するＨＣＶ抗原とこれらの抗体の間の結合反応を可能にする緩衝液又はそれを生成するのに必要な構成成分、そして任意には、先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段を少なくとも包含するキットを提供している。

【０１７７】
本発明の組成物は、薬剤の形で提供されうる。

【０１７８】

本発明は、免疫応答を生成するべく、薬学的に受容可能なアジュバントを任意に伴う有効量の前記組成物を投与する工程を含んで成る、ＨＣＶに対して哺乳動物好ましくはヒトを免疫化するためのワクチンとして使用するための、本書で記載されている通りの組成物を提供する。

【０１７９】

本発明は、免疫応答を生成するべく、薬学的に受容可能なアジュバントを任意に伴う有効量の前記組成物を投与する工程を含んで成る、ＨＣＶに対して哺乳動物好ましくはヒトを免疫化するためのワクチンの調製を目的として、本書で記載されている通りの組成物を使用する方法を提供している。

【０１８０】

本発明は、任意には同じく薬学的に受容可能なアジュバントを伴う本書で記載されている通りのＥ１及び／又はＥ２含有組成物を含む有効量の組成物を含有する、ＨＣＶに対し哺乳動物好ましくはヒトを免疫化するためのワクチン組成物を提供する。

【０１８１】

本発明の組成物は、生体標本中に存在するＨＣＶ抗体のインビトロ検出用の形で提供され得る。本発明は同様に、生体標本中に存在するＨＣＶ抗体を検出するための免疫検定キットを調製する方法及び生体標本中に存在するＨＣＶ抗体を診断するべく本発明のキットを用いて生体標本中に存在するＨＣＶ抗体を検出する方法をも提供する。本発明のこのような方法には、少なくとも以下の工程が含まれている：

（ｉ）　生体標本中に存在するＨＣＶ抗体との免疫複合体の形成を可能にする適切な条件の下で好ましくは固定化された形で、本書で記載されている通りの組成物と前記生体標本を接触させる工程、

（ｉｉ）　未結合成分を除去する工程、

（ｉｉｉ）　適切な条件下で検出可能な標識に異種抗体が接合されている状態で、異種抗体と共に形成された免疫複合体をインキュベートする工程、

（ｉｖ）　前記免疫複合体の存在を視覚的に又は機械的に検出する工程。

【０１８２】

本発明は、生体標本中に存在するＨＣＶ抗体の存在を見極めるためのキットであって、好ましくは固体基質上に固定化された形の本書で記載されている通りの少なくとも１つのペプチド又はタンパク質組成物；生体標本中に存在するＨＣＶに対する抗体とこれらのタンパク質又はペプチドの間の結合反応を可能にする緩衝液又はそれを生成するのに必要な構成成分、そして任意には、先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段を包含するキットを提供している。

【０１８３】

本発明は、ＨＩＶ疾患をインビトロ監視するか又はＨＣＶ感染を患う患者の、好ましくはインターフェロンでの治療に対する応答を診断する方法であって、免疫原性複合体の形成を可能にする条件下でＥ１タンパク質又はその適切な部分と共にＨＣＶ感染患者からの生体標本をインキュベートする工程；未結合成分を除去する工程；治療の開始時点及びその経過中に前記標本中に存在する抗－Ｅ１力価を計算する工程；ＨＣＶ疾患の自然な経過を監視するか、又は、治療の開始時点及び／又は治療の経過中に見い出された抗－Ｅ１力価の量に基づいて患者の治療に対する応答を予後診断する工程、を含んで成る方法を提供している。

【０１８４】

本発明は、ＨＣＶ疾患を監視するか又はＨＣＶ感染を患う患者の特にインターフェロンを用いた治療に対する応答を予後診断するためのキットであって、少なくとも１つのＥ１タンパク質又はＥ１ペプチド、より詳細には本書で記載されている通りのＥ１タンパク質又はＥ１ペプチド；生体標本中に存在する抗－Ｅ１抗体とこれらのタンパク質又はペプチド間の結合反応を可能にする緩衝液又はそれを生成するのに必要な構成成分；及び、任意には先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段；任意には治療の進行中の抗－Ｅ１力価の減少を推測するための自動走査及び解釈デバイスをも包含す

るキットを提供している。

【０１８５】

本発明は、生体標本中に存在するＨＣＶの単数又は複数の血清型を検出するため、より詳細には、１つの検定形式に組合わされた、検出すべきＨＣＶの異なる型の抗体を検出するための血清型割り出し検定において、

（ｉ）単数又は複数の血清型のＨＣＶ抗体の存在について分析すべき生体標本を、免疫複合体の形成を可能にする適切な条件の下で好ましくは固定化された形で、本書で記載されている通りのＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質組成物の内の少なくとも１つ又は本書で記載されている通りのＥ１及び／又はＥ２ペプチド組成物の内の少なくとも１つと接触させる工程、（ｉｉ）未結合成分を除去する工程、（ｉｉｉ）適切な条件下で検出可能な標識に異種抗体が接合させられた状態で、該異種抗体と共に形成された免疫複合体をインキュベートする工程、及び任意には、（ｉｖ）前記免疫複合体の存在を視覚的に又は機械的に（例えばデンシトメトリ、蛍光測定、比色分析）検出し、観察された結合パターンから存在する単数又は複数のＨＣＶ血清型の存在を推測する工程、を少なくとも含んで成る検定を提供している。

【０１８６】

本発明は、生体標本中に存在するＨＣＶの単数又は複数の血清型を割出すため、より詳細にはこれらのＨＣＶ血清型に対する抗体を検出するためのキットであって；本書で記載されている通りの少なくとも１つのＥ１及び／又はＥ２及び／又はＥ１／Ｅ２タンパク質又は本書で記載されている通りのＥ１又はＥ２ペプチド；生体標本中に存在する抗－Ｅ１抗体とこれらのタンパク質又はペプチドの間の結合反応を可能にする緩衝液又はそれを生成するのに必要な構成成分；及び任意には先行する結合反応において形成された免疫複合体を検出するための手段、任意には、同様に、観察された結合パターンから存在する単数又は複数の血清型の存在を検出するための自動走査及び解釈デバイスをも含むキットを提供する。

【０１８７】

本発明は、固体基質上の固定化及び逆相ハイブリダイゼーション検定内への取込みのため、好ましくは本書で記載されている通りの方法に従ってＨＣＶの存在又は遺伝子型を決定するための膜ストリップといった固体支持体上への平行線としての固体化のための、本書で記載されている通りのペプチド又はタンパク質組成物を提供している。

【０１８８】

本発明は、Ｅ１タンパク質、Ｅ２タンパク質、前記Ｅ１及びＥ２タンパク質の一部分、精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質又はその一部分から形成されたＥ１／Ｅ２タンパク質複合体からなる群の中から選択された治療上有効な量の少なくとも１つの精製済み組換え型ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質を含有する治療上有効な量の組成物、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る又は含有する、治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような治療用ワクチン組成物を提供する。本発明の治療用ＨＣＶワクチン組成物といったようなもう１つの治療用ワクチン組成物は、異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導されたＥ１タンパク質、異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導されたＥ２タンパク質、前記Ｅ１及びＥ２タンパク質の一部分、及び異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導された精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質又はその一部分から形成されたＥ１／Ｅ２タンパク質複合体からなる群の中から選択された治療上有効な量の少なくとも２つの精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質の組合せ、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成っていてよい。

【０１８９】

本発明のワクチン、より詳細にはＨＣＶワクチンのＨＣＶ外被タンパク質は、任意には、組換え型哺乳動物細胞、組換え型酵母細胞によって、又は組換え型ウイルスによって又はそれを介して産生される。本発明は、

コア／Ｅ１Ｖ１領域のアミノ酸１８１～２００にわたるＥ１～３１（配列番号５６）、

Ｅ１領域のアミノ酸１９３～２１２にわたるＥ１～３３（配列番号５７）、
Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０５～２２４にわたるＥ１～３５（配列番号５８）（エピトープＢ）、
Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０８～２２７にわたるＥ１～３５Ａ（配列番号５９）（エピトープＢ）、
（エピトープＢを含む）Ｅ１領域Ｖ１、Ｃ１及びＶ２領域のアミノ酸１９２～２２８にわたる１ｂＥ１（配列番号５３）、
Ｅ１領域のアミノ酸３０１～３２０にわたるＥ１～５１（配列番号６６）、
Ｅ１Ｃ４領域のアミノ酸３１３～３３２にわたるＥ１～５３（配列番号６７）（エピトープＡ）、
Ｅ１領域のアミノ酸３２５～３４４にわたるＥ１～５５（配列番号６８）、
Ｅ２領域のアミノ酸位置３９７～４１８にわたるＥｎｖ６７又はＥ２～６７（配列番号７２）（エピトープＡ）、
Ｅ２領域のアミノ酸位置４０９～４２８にわたるＥｎｖ６９又はＥ２～６９（配列番号７３）（エピトープＡ）、
Ｅ２領域の位置５８３～６０２にわたるＥｎｖ２３又はＥ２～２３（配列番号８６）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置５９５～６１４にわたるＥｎｖ２５又はＥ２～２５（配列番号８７）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置６０７～６２６にわたるＥｎｖ２７又はＥ２～２７（配列番号８８）（エピトープＥ）、
Ｅ２領域の位置５４７～５８６にわたるＥｎｖ１７Ｂ又はＥ２～１７Ｂ（配列番号８３）（エピトープＤ）、
Ｅ２領域の位置５２３～５４２にわたるＥｎｖ１３Ｂ又はＥ２～１３Ｂ（配列番号８２）（エピトープＣ）、
Ｅ１領域の位置１９２～２１１にわたるＩＧＰ１６２６（配列番号１１２）、
Ｅ１領域の位置２０４～２２３にわたるＩＧＰ１６２７（配列番号１１３）、
Ｅ１領域の位置２１６～２３５にわたるＩＧＰ１６２８（配列番号１１４）、
Ｅ１領域の位置２２８～２４７にわたるＩＧＰ１６２９（配列番号１１５）、
Ｅ１領域の位置２４０～２５９にわたるＩＧＰ１６３０（配列番号１１６）、
Ｅ１領域の位置２５２～２７１にわたるＩＧＰ１６３１（配列番号１１７）、
Ｅ１領域の位置２６４～２８３にわたるＩＧＰ１６３２（配列番号１１８）、
Ｅ１領域の位置２７６～２９５にわたるＩＧＰ１６３３（配列番号１１９）、
Ｅ１領域の位置２８８～３０７にわたるＩＧＰ１６３４（配列番号１２０）、
Ｅ１領域の位置３００～３１９にわたるＩＧＰ１６３５（配列番号１２１）、
Ｅ１領域の位置３１２～３３１にわたるＩＧＰ１６３６（配列番号１２２）、
といったＥ１及びＥ２ペプチドのうちの少なくとも１つを含む組成物を治療上有効な量含有するか又は含んで成る、治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような治療用ワクチン組成物であって、前記ペプチドが組換え型又は合成由来のものであって任意には薬学的に受容可能なアジュバントと組合わされていてよい、組成物を提供している。

【０１９０】

上述の治療用ワクチン組成物のいずれでも治療用ＨＣＶワクチン組成物として、又は治療用組成物又は治療用ＨＣＶ組成物として、又は組成物又はＨＣＶ組成物として考慮する又はみなすことが可能である。

【０１９１】

本発明は、上述のようなワクチン又は治療用組成物といった本書で記載されている通りの有効量の組成物そして任意には薬学的に受容可能なアジュバントを投与する工程を含んで成る、ＨＣＶに感染したヒトといった哺乳動物の治療方法を提供する。１実施形態において、本発明の組成物は、抗ウイルス療法と組合せて又は抗ウイルス療法と併せて一度に、本発明の組成物の投与に先立って又はこの投与の後又はこの投与と共に投与される。例

えば治療用ＨＣＶワクチン組成物といった発明の組成物のいずれかを、ＨＣＶに慢性的に感染した哺乳動物（「慢性ＨＣＶ感染哺乳動物」）を治療するために使用することができる、ということが明白となるだろう。

【０１９２】

本発明は、Ｅ１タンパク質及びＥ２タンパク質からなる群の中から選択された少なくとも１つの精製済み組換え型ＨＣＶ組換え型外被タンパク質及び任意にはアジュバントを含有するか又は含んで成る、治療用ＨＣＶ組成物又はＨＣＶ組成物といった組成物を提供している。好ましい実施形態においては、組成物は、

コア／Ｅ１Ｖ１領域のアミノ酸１８１～２００にわたるＥ１～３１（配列番号５６）、

Ｅ１領域のアミノ酸１９３～２１２にわたるＥ１～３３（配列番号５７）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０５～２２４にわたるＥ１～３５（配列番号５８）（エピトープＢ）、

Ｅ１Ｖ２領域のアミノ酸２０８～２２７にわたるＥ１～３５Ａ（配列番号５９）（エピトープＢ）、

（エピトープＢを含む）Ｅ１領域Ｖ１、Ｃ１及びＶ２領域のアミノ酸１９２～２２８にわたる１ｂＥ１（配列番号５３）、

Ｅ１領域のアミノ酸３０１～３２０にわたるＥ１～５１（配列番号６６）、

Ｅ１Ｃ４領域のアミノ酸３１３～３３２にわたるＥ１～５３（配列番号６７）（エピトープＡ）、

Ｅ１領域のアミノ酸３２５～３４４にわたるＥ１～５５（配列番号６８）、

Ｅ２領域のアミノ酸位置３９７～４１８にわたるＥｎｖ６７又はＥ２～６７（配列番号７２）（エピトープＡ）、

Ｅ２領域のアミノ酸位置４０９～４２８にわたるＥｎｖ６９又はＥ２～６９（配列番号７３）（エピトープＡ）、

Ｅ２領域の位置５８３～６０２にわたるＥｎｖ２３又はＥ２～２３（配列番号８６）（エピトープＥ）、

Ｅ２領域の位置５９５～６１４にわたるＥｎｖ２５又はＥ２～２５（配列番号８７）（エピトープＥ）、

Ｅ２領域の位置６０７～６２６にわたるＥｎｖ２７又はＥ２～２７（配列番号８８）（エピトープＥ）、

Ｅ２領域の位置５４７～５８６にわたるＥｎｖ１７Ｂ又はＥ２～１７Ｂ（配列番号８３）（エピトープＤ）、

Ｅ２領域の位置５２３～５４２にわたるＥｎｖ１３Ｂ又はＥ２～１３Ｂ（配列番号８２）（エピトープＣ）、

Ｅ１領域の位置１９２～２１１にわたるＩＧＰ１６２６（配列番号１１２）、

Ｅ１領域の位置２０４～２２３にわたるＩＧＰ１６２７（配列番号１１３）、

Ｅ１領域の位置２１６～２３５にわたるＩＧＰ１６２８（配列番号１１４）、

Ｅ１領域の位置２２８～２４７にわたるＩＧＰ１６２９（配列番号１１５）、

Ｅ１領域の位置２４０～２５９にわたるＩＧＰ１６３０（配列番号１１６）、

Ｅ１領域の位置２５２～２７１にわたるＩＧＰ１６３１（配列番号１１７）、

Ｅ１領域の位置２６４～２８３にわたるＩＧＰ１６３２（配列番号１１８）、

Ｅ１領域の位置２７６～２９５にわたるＩＧＰ１６３３（配列番号１１９）、

Ｅ１領域の位置２８８～３０７にわたるＩＧＰ１６３４（配列番号１２０）、

Ｅ１領域の位置３００～３１９にわたるＩＧＰ１６３５（配列番号１２１）、

Ｅ１領域の位置３１２～３３１にわたるＩＧＰ１６３６（配列番号１２２）、

といったＥ１及びＥ２ペプチドのうちの少なくとも１つを含む組成物を治療上有効な量含有し、ここで前記ペプチドは組換え型又は合成由来のものであって任意には薬学的に受容可能なアジュバントと組合わされていてよい。

【０１９３】

本発明の治療用ＨＣＶワクチン組成物又はＨＣＶ組成物といったもう１つの組成物は、

異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導されたＥ１タンパク質、異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導されたＥ２タンパク質、前記Ｅ１及びＥ２タンパク質の一部分、及び異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型から誘導された精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質又はその一部分から形成されたＥ１／Ｅ２タンパク質複合体からなる群の中から選択された治療上有効な量の少なくとも２つの精製済みＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質の組合せ、及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成っていてよい。

【０１９４】

本発明は、ＨＣＶ特異的抗体を誘発するため又はＴ細胞活性を刺激するため又はサイトカイン分泌又はサイトカイン産生を刺激するための治療用組成物又は治療用ワクチン組成物又は組成物を提供する。本発明は、ＨＣＶ特異的抗体を誘発するため又はＴ細胞活性を刺激するため又はサイトカイン分泌又はサイトカイン産生を刺激するための、治療用ＨＣＶ組成物又は治療用ＨＣＶワクチン組成物を提供する。

【０１９５】

治療用ＨＣＶワクチン組成物又は治療用ＨＣＶ組成物といったような本発明に従った治療用組成物は同様に、Ｅ１、Ｅ２又はＥ１／Ｅ２タンパク質複合体が誘導された単数又は複数のＨＣＶ遺伝子型とは異なるＨＣＶ遺伝子型に感染したＨＣＶキャリヤにおいて治療上有効であり得る。

【０１９６】

組換え型ＨＣＶ外被タンパク質は、組換え型哺乳動物細胞によって産生され得、組換え型ＨＣＶ外被タンパク質は組換え型酵母細胞によって産生されるか又は組換え型ウイルスによってか又はそれを介して産生される。本発明は、治療用ＨＣＶワクチン組成物といった本書で記載されている通りの有効量の組成物そして任意には薬学的に受容可能なアジュバントを投与する工程を包含する、ＨＣＶに感染したヒトといった哺乳動物の治療方法を提供する。治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような本発明の組成物のいずれでも、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物の治療のために使用することができるということが明白となるだろう。本発明は、ＨＣＶ特異的抗体を誘導するため、Ｔ細胞活性を刺激するため及びサイトカイン分泌又はサイトカイン産生を刺激するための治療用組成物であって、Ｅ１タンパク質及びＥ２タンパク質からなる群の中から選択された少なくとも１つの精製された組換え型ＨＣＶ単一又は特異的オリゴマー組換え型外被タンパク質を含有する治療上有効な量の組成物及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含む組成物を提供する。

【０１９７】

特に、（ワクチン組成物及び治療用組成物を含めた）本発明に従った組成物のいずれも、そのシステインが遮断されている組換え型ＨＣＶ外被タンパク質を含むこともできるし、そうでなければ、そのシステインが遮断されているＥ１及び／又はＥ２ペプチドを含むこともできる。

【０１９８】

本発明のもう１つの実施形態においては、（ワクチン組成物及び治療用組成物を含めた）本発明に従った組成物は、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）としてその組成物に添加される組換え型ＨＣＶ外被タンパク質を含むことができる。

【０１９９】

さらなる実施形態においては、治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような本発明の組成物は、組換え型ＨＣＶＥ１外被タンパク質として、Ｅ１ｓタンパク質を含み得る。より詳細には、前記Ｅ１ｓタンパク質は配列番号１２３によって定義づけされる。

【０２００】

本発明のもう１つの態様は、Ｅ１タンパク質及び／又はＥ２タンパク質及びＥ１タンパク質及び／又はＥ２タンパク質の一部分の中から選択された少なくとも１つのＨＣＶ組換え型外被タンパク質の発現を可能にする組換え型ウイルス及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る免疫原性組成物特にＨＣＶ免疫原性組成物に関する。

【０２０１】

さらにもう１つの態様においては、本発明は、Ｅ１タンパク質及び／又はＥ２タンパク質及びＥ１タンパク質及び／又はＥ２タンパク質の一部分の中から選択された少なくとも１つのＨＣＶ組換え型外被タンパク質の発現を可能にする組換え型ウイルス及び任意には薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成るＨＣＶワクチン組成物といったようなワクチン組成物を考慮している。

【０２０２】

１つの実施形態においては、上述の組換え型ウイルス組成物は、前記Ｅ１タンパク質及び／又はＥ２タンパク質又は前記その一部分が由来するＨＣＶ遺伝子型又は亜型とは異なるＨＣＶ遺伝子型又は亜型に対して有効でありうる。

【０２０３】

もう１つの実施形態においては、以上の組換え型ウイルス組成物は、ＨＣＶ特異的抗体を誘発するため又はＴ細胞活性を刺激するため又はサイトカイン分泌又はサイトカイン産生を刺激するために使用することができる。

【０２０４】

組換え型ウイルス組成物に対するもう１つの実施形態においては、前記組換え型ウイルスはワクシニアウイルス、組換え型アビポックスウイルス又は組換え型アンカラ修飾ウイルスである。

【０２０５】

本発明のもう１つの態様は、上述のような組換え型ワクチン組成物を有効量投与する工程を含んで成る、ＨＣＶに感染した哺乳動物の治療方法に関する。

【０２０６】

本発明の上述の態様のいずれかにおける哺乳動物は、特にヒトであり得る。

【０２０７】

本発明の１つのさらなる態様は、前記哺乳動物又はヒトに対し治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおける肝疾患を低減させる方法に関する。

【０２０８】

もう１つの態様においては、前記哺乳動物又はヒトに対し治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおける肝線維症の進行を抑制する方法が網羅されている。

【０２０９】

さらなる１つの態様は、前記哺乳動物又はヒトに対して治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおける肝線維症を低減するための方法に関する。

【０２１０】

さらなる１つの態様は、前記哺乳動物又はヒトに治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおける肝脂肪症を低減させる方法に関する。

【０２１１】

本発明のさらにもう１つの態様は、前記哺乳動物又はヒトに対して治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおいて全Ｉｓｈａｋ評点又はＩｓｈａｋ活性評点に従って少なくとも２点だけ肝疾患を低減させる方法を施している。

【０２１２】

もう１つのさらなる態様は、前記哺乳動物又はヒトに対し治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおいてＩｓｈａｋ線維症評点に従って少なくとも１点だけ肝疾患又は肝線維症を低減させる方法に関する。

【０２１３】

本発明のさらなる態様は、前記哺乳動物又はヒトに対して治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおいて血清ＡＬＴレベルを低減させる方法を提供している。

【０２１４】
本発明のさらにもう１つの態様は、前記哺乳動物又はヒトに対し治療用ワクチンを投与する工程を含んで成る、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトの肝臓内の抗－Ｅ１及び／又は抗－Ｅ２免疫反応性を低減させる方法に関する。
【０２１５】
さらに本発明に包含されているのは、前記哺乳動物又はヒトに対し治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような本発明の組成物のいずれかの多数回の用量の投与を含んでおり、前記多数回用量が規定の時間的間隔だけ分離されて該哺乳動物又はヒトに投与される、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトの治療方法である。かくして、慢性ＨＣＶ感染キャリヤを治療するための本発明の組成物の前記複数回の投与は、例えば４週間以下の時間的間隔だけ分離され得る。かくして前記時間的間隔は、１又は１．５又は２又は２．５又は３又は３．５又は４週間であってもよいし、又は１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７又は２８日であり得る。特に、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトを治療する前記方法には、投与が３週間という時間的間隔で分離されている前記哺乳動物又はヒトに対する治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような本発明の組成物の複数の投与が含まれている。さらなる実施形態においては、前記複数回の投与は、少なくとも５回の投与の第１セットとそれに続く少なくとも１２週間の投与の無い期間とそれに続く少なくとも３回の投与の第２セットで構成されている。特に、１つの投与セットは少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２以上の投与を含むことができる。投与の無い期間は少なくとも６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８以上の週数であり得る。
【０２１６】
以上のようなさまざまな方法が目標と定めている効果のいずれかを得るために、治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような本発明の組成物のいずれかを使用できる、ということがさらに明らかとなることだろう。以上で記載された方法において応用される通りの前記治療用ワクチンは、治療用ＨＣＶワクチン組成物といったような本発明のあらゆる組成物であり得る。
【０２１７】
以上で概略説明された方法のいずれかにおいて使用するため、又は以上で概略説明されたさまざまな方法が目標と定めている効果のいずれかを得るために使用される組成物、ＨＣＶ組成物、ワクチン、ＨＣＶワクチン、治療用ワクチン又は治療用ＨＣＶワクチンの製造を目的とした、以上の記載全体を通して概略説明されている通りのＨＣＶＥ１／Ｅ２タンパク質又はその一部分又はＥ１／Ｅ２ペプチドの使用も又、本発明により考慮されている。
【０２１８】
これらの方法のいずれにおいても、前記治療用ワクチンは、少なくとも１つのＨＣＶ抗原及び任意にはミョウバンといったような薬学的に受容可能なアジュバントを含んで成る。その１実施形態において、前記ＨＣＶ抗原はＥ１又はＥ２抗原又はそれらの免疫原性部分である。ＨＣＶ抗原をＥ１ｓ抗原と呼ぶ場合、Ｅ１ｓ抗原は配列番号１２３により定義され得る。
【０２１９】
「肝疾患」という語は、この状況下では、炎症、線維症、肝硬変、壊死、壊死／炎症及び肝細胞ガンを含むＣ型肝炎ウイルスでの感染によりひき起こされるあらゆる異常な肝臓状態を意味する。
【０２２０】
「脂肪症」というのは、多種多様な全身性障害、毒性又は薬物誘発型肝臓障害ならびに、Ｃ型肝炎感染、ウイルソン病及びガラクトース血症を含むさまざまな特異的肝疾患への肝臓の関与を表わす肝細胞内の脂質蓄積の組織学的特長を意味している。
【０２２１】

「肝疾患を低減させる」というのは、肝疾患の状態のあらゆる安定化又は低減を意味する。肝疾患は、例えばＫｎｏｄｅｌｌ評定システム又はＩｓｈａｋが適合させたＫｎｏｄｅｌｌ評定システムによって決定することができる。この評点の２点低減は、いくつかの研究において治療上有益な効果として受入れられている（例えば、Ｓｈｉｆｆｍａｎ　１９９９年の表２に示されているように１９９６年以降に公表された研究を参照のこと）。

【０２２２】

「肝線維症の進行を抑制する」というのは、肝線維症の通常予想される進行のあらゆる抑制、停止又は復帰を意味する。肝線維症の進行は、例えば、Ｍｅｔａｖｉｒ評定システムによって決定することができる。このシステムに従った肝線維症の通常予想される進行とは、未治療の慢性ＨＣＶ患者における年間約０．１３３というＭｅｔａｖｉｒ評点の増加として公表された。（Ｐｏｙｎａｒｄら、１９９７）線維症は、例えば類洞周囲線維症を含めた、Ｍｅｔａｖｉｒ又はＩｓｈａｋシステムにより評定されるようなあらゆる形の線維症を含むものとみなされる。

【０２２３】

「ＨＣＶ抗原」という語は、少なくとも１つのＴ細胞エピトープ又はＢ細胞エピトープを含むあらゆるＨＣＶタンパク質又はそのフラグメントを意味する。

【０２２４】

本発明のさらなる態様は、慢性ＨＣＶ感染哺乳動物又はヒトにおける肝疾患の変化を予測する方法であって、

（ｉ）　Ｅ１抗原を含むＨＣＶワクチン組成物を用いた治療用ワクチン接種に先立って血清抗－Ｅ１抗体レベルを決定する工程；

（ｉｉ）　Ｅ１抗原を含むＨＣＶワクチン組成物を用いた治療用ワクチン接種後の血清抗－Ｅ１抗体レベルを決定する工程；

（ｉｉｉ）　（ｉ）及び（ｉｉ）で決定された血清抗－Ｅ１抗体レベルの差を推測し、そこから肝疾患の変化を予測する工程、

を含んで成る方法を提供している。

【０２２５】

当業者にとっては、（ｉｉ）で測定された値から（ｉ）で測定された値を引いたものとして計算された血清抗－Ｅ１抗体のレベルの著しく高い正の差が、陽性の予測、すなわち肝疾患の度合が減少するであろうという予測に有利に作様することになるということが明白になるだろう。又、持続する著しく高い正の差が、減少した肝疾患の予測の陽性度をさらに拍車をかけるであろうということも明白となるだろう。しかしながら、この差が著しく高くないかゼロであるか、負であるか又は或る時点で著しく高く正であるが持続しない場合には、これは、陰性の予測すなわち肝疾患の度合が変わらない状態にとどまるか又は増大するであろうという予測に有利に働くことになろう。血清抗－Ｅ１抗体の持続した高レベルは、投与の無い期間の後新たな一連の免疫化を投与すること又は、例えば３週間といった短かい時間的間隔での投与から成る最初の１セットの初回免疫の後、例えば６週間といったより大きな時間的間隔で免疫化を反復することのいずれかによる付加的免疫化を通して達成可能である。

【実施例】

【０２２６】

実施例１：Ｃ型肝炎ウイルスＥ１タンパク質のクローニング及び発現

１．ワクシニアウイルス組換え型ベクターの構築

ｐｇｐｔＡＴＡ１８ワクシニア組換えプラスミドは、ワクシニアウイルス１３中間プロモータの制御下でＥ．ｃｏｌｉキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含有する付加的な挿入を伴うｐＡＴＡ１８の修飾済みバージョンである（Ｓｔｕｎｎｅｎｂｅｒｇら、１９８８年）（図１）。プラスミドｐｇｓＡＴＡ１８は、ＰｓｔＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ－切断ｐＡＴＡ１８ベクター内へと、３つの読取り枠内で停止コドンを含有する配列番号１／９４のオリゴヌクレオチドリンカーを挿入することによって構築された。こうして、追加のＰａｃＩ制御部位が作り出された（図２）。もとのＨｉｎｄＩＩ

Ｉ部位は復元されなかった。

【０２２７】

配列番号１／９４をもつオリゴヌクレオチドリンカー

【化１】

```
5'       G GCATGC AAGCTT AATTAATT          3'    (配列番号:1)
3'   ACGTC CGTACG TTCGAA TTAATTAA TCGA     5'    (配列番号:94)
     ————— ————— ————— ———————— ————
     PstI  SphI  HindIII  Pac I (HindIII)
```

【０２２８】

組換え型タンパク質に融合した工学処理済みのヒスチジンストレッチのＮｉ$^{2+}$キレート化を用いて高速かつ効率の良い精製を容易にするために、ワクシニア組換えベクターｐＭＳ６６は、付加的なカルボキシ末端ヒスチジンタグを用いて分泌タンパク質を発現するように設計された。平滑末端を生成する３つの酵素（ＳｍａＩ、ＳｔｕＩ及びＰｍｌＩ／Ｂｂｒ　ＰＩ）のためのユニーク部位を含む配列番号２／９５のオリゴヌクレオチドリンカーが、プロテアーゼ第Ｘａ因子開裂部位をコードする配列とそれに続く、６つのヒスチジンと２つの停止コドンをコードするヌクレオチド配列と同一枠内で任意のｃＤＮＡのカルボキシ末端を挿入できるような形で合成された（３’末端の下流側に新しいＰａｃＩ制限部位も作り出された）。配列番号２／９５のこのオリゴヌクレオチドは、ｐｇｐｔＡＴＡ１８のＸｍａＩ及びＰｓｔＩ部位の間に導入された（図３）。

【０２２９】

配列番号２／９５のオリゴヌクレオチドリンカー

【化２】

```
  5'-CCGGG GAGGCCTGCACGTGATCGAGGGCAGACACCATCACCACCA/

     3'-C CTCCGGACGTGCACTAGCTCCCGTCTGTGGTAGTGGTGGT/

     XmaI_

                 /TCACTAATAGTTAATTAA CTGCA-3' (配列番号:2)

                 /AGTGATTATCAATTAATT G-5'     (配列番号:95)

                                  PstI
```

【０２３０】

Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＭＣ１０６１（ラムダ）内に含有されたプラスミドｐｇｐｔＡＴＡ－１８をＢＣＣＭ／ＬＭＢＰが、（ベルギー、Ｂ－９０００ゲント、Ｋ．Ｌ．Ｌｅｄｅｇａｎｃｋｓｔｒａａｔ３５番地のベルギー微生物保存機関／Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｕｍ　ｖｏｏｒ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｉｒｅ　Ｂｉｏｌｏｇｉｅ－Ｐｌａｓｍｉｄｅｎｃｏｌｌｅｃｔｉｅ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅｉｔ　Ｇｅｎｔ）にブダペスト条約の条項に基づいて寄託され、受入れ番号ＬＭＢＰ４４８６を有している。この寄託は２００２年１月９日に行なわれた。

【０２３１】

実施例２．ＨＣＶ組換え型プラスミドの構築

２．１　異なる形態のＥ１タンパク質をコードする構築物

以前に記載されたように（Ｓｔｕｙｖｅｒら、１９９３年ｂ）ＲＮＡ調製及びその後の

逆転写及びＰＣＲにより血清標本からポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）産物を誘導した。表１は、増幅のために用いられるプライマー及びそれぞれのクローンの特長を示している。ＰＣＲフラグメントをＳｍａＩ－切断ｐＳＰ７２（Ｐｒｏｍｅｇａ）プラスミドの中にクローニングさせた。ワクシニア組換えベクター内への挿入のためには、図２１に描かれているようにＨＣＣ１９Ａ（配列番号３）、ＨＣＣ１１０Ａ（配列番号５）、ＨＣＣ１１１Ａ（配列番号７）、ＨＣＣ１１２Ａ（配列番号９）、ＨＣＣ１１３Ａ（配列番号１１）及びＨＣＣ１１７Ａ（配列番号１３）といったクローンが選択された。Ｅ１コーディング領域を含むｃＤＮＡフラグメントをそれぞれのｐＳＰ７２プラスミドからＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ制限により開裂させ、１１Ｋのワクシニアウイルス後期プロモータの下流側でＥｃｏＲＩ／ＨｉｎｄＩＩＩ－切断ｐｇｐｔＡＴＡ－１８ワクシニア組換えベクター（実施例１内に記載されている）の中にこれを挿入した。それぞれのプラスミドをｐｖＨＣＶ－９Ａ、ｐｖＨＣＶ－１０Ａ、ｐｖＨＣＶ－１１Ａ、ｐｖＨＣＶ－１２Ａ、ｐｖＨＣＶ－１３Ａ及びｐｖＨＣＶ－１７Ａと呼称し、そのうちｐｖＨＣＶ－１１Ａが図４に示されている。

【０２３２】

２．２　疎水性領域Ｅ１欠失突然変異体

コドンＡｓｐ２６４～Ｖａｌ２８７（ヌクレオチド７９０～８６１、疎水性ドメインＩをコードする領域）の欠失を含むクローンＨＣＣ１３７を以下のように生成した：すなわち、２つのＰＣＲフラグメントを、クローンＨＣＣ１１０Ａから、プライマーセットＨＣＰｒ５２（配列番号１６）／ＨＣＰｒ１０７（配列番号１９）及びＨＣＰｒ１０８（配列番号２０）／ＨＣＰｒ５４（配列番号１８）を用いて生成した。これらのプライマーは図２１に示されている。２つのＰＣＲフラグメントを電気泳動の後アガロースゲルから精製し、プライマーＨＣＰｒ５２（配列番号１６）及びＨＣＰｒ５４（配列番号１８）を用いてＰＣＲのための鋳型として各フラグメントを１ｎｇずつ合わせて使用した。結果として得られたフラグメントをＳｍａＩ－切断ｐＳＰ７２ベクター内にクローニングし、２４コドン（７２塩基対）が欠失していたため、欠失を含むクローンを直ちに同定した。クローンＨＣＣ１３７（配列番号１５）を含むプラスミドｐＳＰ７２ＨＣＣ１３７を選択した。ワクシニアプラスミドｐｖＨＣＶ－１０ＡのＸｍａＩ－ＢａｍＨＩ部位内に欠失をとり囲むＨＣＶ配列（ベクターｐＳＰ７２－ＨＣＣ１３７由来のＸｍａＩ及びＢａｍＨＩにより開裂されたフラグメント）を挿入することにより、疎水性ドメインＩが欠如した全長Ｅ１ｃＤＮＡを含有する組換え型ワクシニアプラスミドを構築した。結果として得たプラスミドをｐｖＨＣＶ－３７と命名した。確認用配列決定の後、内部欠失を含むアミノ末端領域をこのベクターｐｖＨＣＶ－３７から単離し（ＥｃｏＲＩ及びＢｓｔＥＩＩによる開裂）、ＥｃｏＲＩ及びＢｓｔＥＩＩ－切断ｐｖＨＣＶ－１１Ａプラスミドの中にこれを再度挿入した。この構築物は、両方の疎水性ドメインが欠失した状態でＥ１タンパク質を発現するものと予想され、ｐｖＨＣＶ－３８と命名された。クローンＨＣＣ１３８のＥ１コーディング領域は配列番号２３によって表わされている。

【０２３３】

（理論的にはアミノ酸３３７～３４０の前後まで延びている）Ｅ１カルボキシ末端にある親水性領域は構築物ｐｖＨＣＶ－３８の中に完全に含まれていなかったため、疎水性ドメインＩが欠けるさらに大きなＥ１領域をＥｃｏＲＩ／ＢａｍＨＩ開裂によりｐｖＨＣＶ－３７プラスミドから単離し、ＥｃｏＲＩ／ＢａｍＨＩ－切断ｐｇｓＡＴＡ－１８ベクター内にクローニングさせた。結果として得たプラスミドをｐｖＨＣＶ－３９と命名し、これにはクローンＨＣＣ１３９（配列番号２５）が含まれていた。同じフラグメントを、（クレノウＤＮＡポリメラーゼＩ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）で充たされた粘着末端をもつ）ＢａｍＨＩにより、そしてその後ＥｃｏＲＩ（５’付着末端）によりｐｖＨＣＶ－３７ベクターから開裂させた。この配列を、ＥｃｏＲＩ及びＢｂｒＰＩ－切断ベクターｐＭＳ－６６内に挿入した。この結果として、そのカルボキシ末端に６ヒスチジンテイルを含むプラスミドｐｖＨＣＶ－４０内のクローンＨＣＣ１４０（配列番号２７）が得られた。

【０２３４】

２．３　その他の遺伝子型のＥ１

クローンＨＣＣ１６２（配列番号２９）は、慢性Ｃ型肝炎３ａ型感染患者に由来し（血清ＢＲ３６、クローンＢＲ３６－９－１３、国際公開第９４／２５６０１号パンフレット）中の配列番号１９、同様にＳｔｕｙｖｅｒら、１９９３年ａも参照のこと）、ＨＣＣ１６３（配列番号３１）は、輸血後肝炎を患う５ａ型感染小児に由来していた（血清ＢＥ９５、クローンＰＣ－４－１、国際公開第９４／２５６０１号パンフレット中の配列番号４５）。

【０２３５】

２．４　Ｅ２構築物

Ｓｔｕｙｖｅｒら、１９９３年ｂに記載されている通りのＲＮＡ調製、逆転写及びＰＣＲの技術を用いて、プライマーＨＣＰｒ１０９（配列番号３３）及びＨＣＰｒ７２（配列番号３４）を用いて血清ＢＥ１１（遺伝子型１ｂ）からＨＣＶＥ２ＰＣＲフラグメント２２を得、このフラグメントをＳｍａＩ切断ｐＳＰ７２ベクター内にクローニングした。クローンＨＣＣ１２２Ａ（配列番号３５）をＮｃｏＩ／Ａｌｗ壊死／炎症で、又はＢａｍＨ２／Ａｌｗ壊死／炎症により切断し、フラグメントの粘着末端を平滑にした（クレノウＤＮＡポリメラーゼＩ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）を伴うＮｃｏＩ及びＢａｍＨＩ部位及びＴ４ＤＮＡポリメラーゼ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）を伴うＡｌｗ壊死／炎症）。次にＢａｍＨＩ／Ａｌｗ壊死／炎症ｃＤＮＡフラグメントを、ＥｃｏＲＩ及びＨｉｎｄＩＩＩ開裂により線状化されかつクレノウＤＮＡポリメラーゼ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ）で満たされた付着末端をもつワクシニアｐｇｓＡＴＡ－１８ベクター内に挿入した。結果として得たプラスミドをｐｖＨＣＶ－４１と命名し、これは、シグナル配列として役立ち得るＥ１タンパク質の３７個のアミノ酸（Ｍｅｔ３４７からＧｌｙ３８３まで）を含むアミノ酸Ｍｅｔ３４７～Ｇｌｎ６７３のＥ２領域をコードした。その後クレノウＤＮＡポリメラーゼで平滑末端化されたＥｃｏＲＩ及びＢｂｒＰＩ切断ベクターｐＭＳ６６内に、同じＨＣＶｃＤＮＡを挿入した。結果として得たプラスミドをｐｖＨＣＶ－４２と命名し、これは同様にアミノ酸３４７～６８３をコードした。ＮｃｏＩ／Ａｌｗ壊死／炎症フラグメントを同様の要領で、ｐｇｓＡＴＡ－１８（ｐｖＨＣＶ－４３）又はｐＭＳ－６６ワクシニアベクター（ｐｖＨＣＶ－４４）の同じ部位内に挿入した。ｐｖＨＣＶ－４３及びｐｖＨＣＶ－４４は、ＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸３６４～６７３をコードし、そのうちアミノ酸３６４～３８３はＥ２のためのシグナル配列をコードするＥ１タンパク質の天然カルボキシ末端領域に由来し、アミノ酸３８４～６７３は成熟Ｅ２タンパク質のものに由来していた。

【０２３６】

２．５　組換え型ＨＣＶ－ワクシニアウイルスの生成

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（米国メリーランド州ロックヴィル（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）のＡＴＣＣ）から、ウサギ腎臓ＲＫ１３細胞（ＡＴＣＣＣＣＬ３７）ヒト骨肉腫１４３Ｂチミジンキナーゼ欠乏（ＴＫ質－）（ＡＴＣＣＣＲＬ８３０３）、ＨｅＬａ（ＡＴＣＣＣＣＬ２）及びＨｅｐＧ２（ＡＴＣＣＨＢ８０６５）細胞系統を得た。ＲＫ１３及び１４３Ｂ（ＴＫ－）については１０％のウシ胎児血清とアール（Earl's）塩（ＥＭＥＭ）で補足され、ＨｅｐＧ２についてはグルコース（４ｇ／ｌ）で補足されたダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）の中で、細胞を増殖させた。ワクシニアウイルスＷＲ菌株（Ｗｅｓｔｅｒｎ　Ｒｅｓｅｒｖｅ、ＡＴＴＣＶＲ１１９）を、以前に記載された通りに（Ｐａｎｉｃａｌｉ及びＰａｏｌｅｔｔｉ、１９８２年；Ｐｉｃｃｉｎｉら、１９８７年；Ｍａｃｋｅｔｔら、１９８２年、１９８４年、１９８６年）１４３Ｂ又はＲＫ１３細胞の中で日常的に繁殖させた。１４３Ｂ細胞の集密的単層を、０．１（＝細胞１個あたり０．１プラーク形成単位（ＰＦＵ））の感染多重度（ｍ．ｏ．ｉ）で野生型ワクシニアウイルスで感染させた。２時間後に、ワクシニア組換えプラスミドを、相同的組換えを可能にするべくプラスミドＤＮＡを５００ｎｇ含有するリン酸カルシウム共沈物の形で、感染した細胞の中にトランスフェクションさせた（Ｇｒａｈａｍ及びｖａｎｄｅｒ　Ｅｂ、１９７３年；Ｍａｃｋｅｔｔら、１９８５年）。Ｅ．ｃｏｌｉキサンチン

－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ｇｐｔ）タンパク質を発現する組換え型ウイルスを、選択培地（２５μｇ／ｍｌのマイコフェノール酸（ＭＰＡ）、２５０μｇ／ｍｌのキサンチン及び１５μｇ／ｍｌのヒポキサンチンを含有するＥＭＥＭ；Ｆａｌｋｎｅｒ及びＭｏｓｓ、１９８８年；Ｊａｎｋｎｅｃｈｔら、１９９１年）の中でインキュベートしたウサギ腎臓ＲＫ１３細胞上で選択した。選択培地内の０．９％のアガロースオーバーレイの下で、ＲＫ１３細胞の新鮮な単層上で、単一組換え型ウイルスを精製した。チミジンキナーゼ欠乏（ＴＫ$^{-}$）組換え型ウイルスを選択し、次に２５μｇ／ｍｌの５－ブロモ－２’－デオキシウリジンの存在下でヒト１４３Ｂ細胞（ＴＫ－）の新鮮な単層上でプラークを精製した。０．０５のｍ．ｏ．ｉでウサギＲＫ１３又はヒト１４３Ｂ細胞のいずれかを感染させることによって、精製済み組換え型ＨＣＶワクシニアウイルスストックを調製した（Ｍａｃｋｅｔｔら、１９８８年）。組換え型ワクシニアウイルス中へのＨＣＶｃＤＮＡフラグメントの挿入を、それぞれのＨＣＶフラグメントをクローニングするのに用いられるプライマーでのＰＣＲを使用してＭＰＡ選択の後細胞溶解産物のアリコート（５０μｌ）について確認した（表１参照）。組換え型ワクシニアＨＣＶウイルスをワクシニア組換え型プラスミド番号に従って命名した。例えば組換え型ワクシニアウイルスｖｖＨＣＡ－１０Ａは、ｐｖＨＣＶ－１０Ａプラスミドで野生型ＷＲ菌株を組換えることにより得られた。

【０２３７】

実施例３：組換え型ワクシニアウイルスでの細胞の感染

実施例２に記載されているような組換え型ＨＣＶワクシニアウイルスで３というｍ．ｏ．ｉで、ＲＫ１３細胞の集密的単層を感染させた。感染のためには、細胞をｐＨ７．４のリン酸緩衝液（ＰＢＳ）で２度洗浄し、ＭＥＭ培地の中で組換え型ワクシニアウイルスストックを希釈させた。ｍ．ｏ．ｉが３となるように10^{6}個の細胞あたり２００μｌのウイルス溶液を添加し、２４℃で４５分間インキュベートした。ウイルス溶液を吸引し、10^{6}個の細胞あたり２ｍｌの完全増殖培地（実施例２参照）を添加した。細胞を３７℃で２４時間インキュベートし、その間にＨＣＶタンパク質の発現が発生した。

【０２３８】

実施例４：ウェスタンブロット法を用いた組換え型タンパク質の分析

感染した細胞を、ＰＢＳで２回洗浄し、溶解緩衝液（５０ｍＭのトリス・ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１％のトリトンＸ－１００、５ｍＭの$MgCl_2$、１μｇ／ｍｌのアプロチニン（ベルギー、ボルネム（Ｂｏｒｎｅｍ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）のＳｉｇｍａ））で直接溶解させるか又は、５０ｍＭのトリス・ＨＣＬｐＨ７．５／１０ｍＭＥＤＴＡ／１５０ｍＭのＮａＣｌ中で５分間インキュベートすることでフラスコから離脱させ、遠心分離により収集した（１０００ｇで５分間）。その後細胞ペレットを、10^{6}個の細胞につき２００μｌの溶解緩衝液（５０ｍＭのトリス・ＨＣＬｐＨ８．０、２ｍＭのＥＤＴＡ、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭの$MgCl_2$アプロチニン、１％のトリトンＸ－１００）中で再懸濁させた。

【０２３９】

細胞溶解産物をエッペンドルフ遠心分離機内で１４，０００ｒｐｍで５分間清澄させて、不溶性デブリを除去した。２０μｌの溶解産物のタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を用いて分離した。その後、タンパク質をゲルから、トランスファ緩衝液（２５ｍＭのトリス・ＨＣｌｐＨ８．０、１９２ｍＭのグリシン、２０％（ｖ／ｖ）のメタノール）中で、１００Ｖの定電圧で２時間４℃まで冷却されたＨｏｅｆｅｒ　ＨＳＩトランスファユニットを用いてニトロセルロースシート（Ａｍｅｒｓｈａｍ）からエレクトロトランスファした。ニトロセルロースフィルタをＢｌｏｔｔｏ（ＰＢＳ中の５％（ｗ／ｖ）の無脂肪インスタント粉乳；Ｊｏｈｎｓｏｎら、１９８１年）で遮断し、Ｂｌｏｔｔｏ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０の中で希釈させた一次抗体と共にインキュベートした。通常、ヒトの負の対照血清又はＨＣＶに感染した患者の血清を２００倍に希釈し、非特異的結合を減少させるべく、２００倍に希釈させた野生型ワクシニアウイルス感染細胞溶解産物を用いて室温で１時間予備インキュベートさ

せた。Ｂｌｏｔｔｏ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０での洗浄の後、ニトロセルロースフィルタを、Ｂｌｏｔｔｏ／０．１％Ｔｗｅｅｎ２０内で希釈したアルカリホスファターゼ基質溶液と共にインキュベートした。ＰＢＳ中の０．１％Ｔｗｅｅｎ２０で洗浄した後、フィルタをアルカリホスファターゼ基質溶液（１００ｍＭのトリス・ＨＣｌｐＨ９．５、１００ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭの$MgCl_2$、０．３８μｇ／ｍｌのニトロブルーテトラゾリウム、０．１６５μｇ／ｍｌの５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルホスファターゼ）でインキュベートした。エレクトロトランスファを除き、全ての工程は、室温で実施された。

【０２４０】

実施例５：組換え型Ｅ１又はＥ２タンパク質の精製

５．１　溶解

感染したＲＫ１３細胞（Ｅ１又はＥ２構築物を担持する）をリン酸緩衝溶液（ＰＢＳ）で２度洗浄し、１０ｍＭのＥＤＴＡを含有するＰＢＳ中でのインキュベーションにより培養レシピエントから離脱させた。離脱した細胞をＰＢＳで２回洗浄し、10^5個の細胞について２ｍＭのビオモニル化Ｎ－エチルマレイミド（ビオチン－ＮＥＭ）（Ｓｉｇｍａ）を含有する１ｍｌの溶解緩衝液（５０ｍＭのトリス・ＨＣｌｐＨ７．５、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１％のトリトンＸ－１００、５ｍＭの$MgCl_2$、１μｇ／ｍｌのアプロチニン（ベルギー、ボルネン（Ｂｏｒｎｅｍ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）のＳｉｇｍａ）を４℃で添加した。この溶解産物をＢ型ｄｏｕｎｃｅｒで均質化し、０．５時間室温に放置した。１０ｍＭのＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ、ベルギー、ボルネン（Ｂｏｒｎｅｍ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）のＡｌｄｒｉｃｈ）を含有する溶解緩衝液をさらに５体積、一次溶解産物に添加し、混合物を１５分間室温で放置した。４℃で１時間、１４，０００ｒｐｍ（r_{max}で３０１００ｇ）でＢｅｃｋｍａｎ　ＪＡ－１４ローターの中での遠心分離により、不溶性細胞デブリを溶液から一掃した。

【０２４１】

５．２．　レクチンクロマトグラフィ

清澄した細胞溶解産物を、１ｍｌ／分の速度で５カラム体積の溶解緩衝液で平衡化した０．８×１０ｃｍのレンチル－レクチンセファロース４Ｂカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）上に１ｍｌ／分の速度で装てんした。レンチル－レクチンカラムを、５～１０カラム体積の緩衝液１（０．１Ｍのリン酸カリウムｐＨ７．３、５００ｍＭのＫＣｌ、５％のグリセロール、１ｍＭの６－NH_2－ヘキサン酸、１ｍＭの$MgCl_2$、及び１％のＤｅｃｙｌＰＥＧ（オランダ、ボダム（Ｂｅｄｕｍ，Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）のＫＷＡＮＴ）で洗浄した。いくつかの実験では、カラムをその後、１％のＤｅｃｙｌＰＥＧの代りに０．５％のＥｍｐｉｇｅｎ－ＢＢ（米国カリフォルニア州サンディエゴのＣａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を含有する１０カラム体積の緩衝液１で洗浄した。結合した材料を、溶出緩衝液（１０ｍＭのリン酸カリウムｐＨ７．３、５％のグリセロール、１ｍＭのヘキサン酸、１ｍＭの$MgCl_2$、０．５％のＥｍｐｉｇｅｎ－ＢＢ及び０．５Ｍのα－メチル－マンノピラノシド）を適用することによって溶出した。溶出した材料を分画し、実施例６で記載するようなＥＬＩＳＡを用いて、Ｅ１又はＥ２タンパク質の存在について画分をスクリーニングした。図２２は、ｖｖＨＣＶ３９（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ４０（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ６２（３ａ型）及びｖｖＨＣＶ６３（５ａ型）に感染した細胞溶解産物の４回の異なるＥ１精製のレンチルレクチン溶出液から得られたＥＬＩＳＡの結果を示している。図２３は、図２２に示された値から得たプロフィールを示す。これらの結果は、異なるタイプのＨＣＶの外被タンパク質についてレクチン親和性カラムを利用できるということを示している。

【０２４２】

５．３　濃縮及び部分的還元

Ｅ１－又はＥ２－陽性画分をプールし、４℃でＢｅｃｋｍａｎ　ＪＡ－２０ローターの中で５０００ｒｐｍで３時間、遠心分離によりＣｅｎｔｒｉｃｏｎ　３０ｋＤａ（Ａｍｉｃｏｎ）上で濃縮した。いくつかの実験では、Ｅ１－又はＥ２陽性画分をプールし、窒素

エバポレーションによってこれを濃縮した。３．１０^{8}個の細胞の等価物を約２００μｌに濃縮させた。部分的還元のためには、この２００μｌに対し、最終濃度３．５％となるまで、３０％のＥｍｐｉｇｅｎ－ＢＢ（米国カリフォルニア州サンディエゴのＣａｌｂｉｏｃｈｅｍ）を添加し、その後、１．５～７．５ｍＭの最終濃度までＨ$_2$Ｏ中の１ＭのＤＴＴを添加し、３７℃で３０分間インキュベートした。その後ＮＥＭ（ジメチルスルフォキシド中１Ｍ）を５０ｍＭの最終濃度まで添加し、３７℃でさらに３０分間反応させて、遊離スルフヒドリル基を遮断した。

【０２４３】

５．４　ゲルろ過クロマトグラフィ

３カラム体積のＰＢＳ／３％Ｅｍｐｉｇｅｎ－ＢＢでＳｕｐｅｒｄｅｘ－２００ＨＲ１０／２０カラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を平衡化した。還元混合物をＳｍａｒｔ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）の５００μｌ標本ループ中に注入し、ゲルろ過のためにＰＢＳ／３％Ｅｍｐｉｇｅｎ－ＢＢ緩衝液を添加した。２５０μｌの画分をＶ$_o$からＶ$_t$まで収集した。実施例６に記載するように、Ｅ１又はＥ２タンパク質の存在について、画分をスクリーニングした。

【０２４４】

図２４は、ｖｖＨＣＶ３９（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ４０（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ６２（３ａ型）及びｖｖＨＣＶ６３（５ａ型）で感染した細胞溶解産物の４つの異なるＥ１精製のゲルろ過クロマトグラフィの後に得られた画分から得たＥＬＩＳＡ結果を示す。図２５は、（レンチルレクチン上で精製され先行例の場合と同様に還元された、それぞれｖｖＨＣＶ３９、ｖｖＨＣＶ６２及びｖｖＨＣＶ６３に感染したＲＫ１３細胞からの）１ｂ型、３ａ型及び５ａ型のＥ１タンパク質の精製から得られたプロフィールを示している。「１」「２」及び「３」と記されたピークは、純粋なＥ１タンパク質ピーク（主として画分２６～３０中のＥ１反応性）を表わしている。これらのピークは、２量体Ｅ１タンパク質に対応する約７０ｋＤａの非常に類似した分子量を示している。３つのプロフィール内のその他のピークは、実施例５．３に概略説明されている通りの還元工程そして適切な洗浄剤の存在下でのその後のゲルろ過工程のみを理由としてＥ１から分離されうるワクシニアウイルス及び／又は細胞タンパク質を表わしている。図２６に示されているように、（画分１０～１７を表わす）プール１及び（画分１８～２５を表わす）プール２は、Ｅ１プール（画分２６～３０）中に存在しない汚染性タンパク質を含む。Ｅ１ピーク画分をＳＤＳ／ＰＡＧＥ上でランさせ、実施例４で記載されている通りにブロッティングした。ＮＥＭ－ビオチンで標識づけされたタンパク質を、図２７に示されているようなストレプトアビジン－アルカリホスファターゼによって検出した。なかでも、ゲルろ過クロマトグラフィの前に存在する２９ｋＤａ及び４５ｋＤａの汚染性タンパク質（レーン１）が、画分２６～３０中では非常に低いレベルでしか存在しないということは容易にわかる。およそ６５ｋＤａでのバンドは、単量体Ｅ１形態に完全に分断され得なかったＥ１二量体形態を表わしている。３ａ型Ｅ１タンパク質（レーン１０～１５）についても類似の結果が得られるが、炭水化物が６個ではなく５個しか存在しないことを理由として、ＳＤＳ／ＰＡＧＥ上でより高速の移動度を示す。図２８は、図２６と同一の条件で走らせたＳＤＳ／ＰＡＧＥゲルの銀染色を示す。精製手順の全概要は図２９に示される。

【０２４５】

精製済みＥ１タンパク質の存在を、実施例４中に記載されている通りのウェスタンブロット法を用いてさらに確認した。２量体Ｅ１タンパク質は、未集合で汚染物質を含まないように思われた。上述のスキームに従ったｖｖＨＣＶ４０感染細胞から精製された亜型１ｂＥ１タンパク質は、４７７Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒシーケンサ上でアミノ末端配列決定され、最初の残基としてチロシンを含有するように思われた。これにより、Ｅ１タンパク質がそのシグナル配列から適正な位置（Ａ１９１とＹ１９２の間）でシグナルペプチダーゼにより開裂されたということが確認された。こうして、成熟Ｅ１タンパク質のアミノ末端がアミノ酸位置１９２で開始するというＨｉｊｉｋａｔａら（１９９１年）の発見事実が確認される。

【０２４６】
５．５　Ｅ２タンパク質の精製
実施例５．１～５．４で記されているように、ｖｖＨＣＶ４４に感染したＲＫ１３細胞からＥ２タンパク質（アミノ酸３８４～６７３）を精製した。図３０は、レンチルレクチンクロマトグラフィのＯＤ$_{280}$プロフィール（実線）を示している。破線は、ＥＬＩＳＡにより検出されているようなＥ２反応性を表わす（実施例６参照）。図３１は、一部分が実施例５．３で記されている通りの方法に従って還元され遮断され、一部分がカラムに直ちに適用される、レンチル－レクチンＥ２プールのゲルろ過クロマトグラフィ（図３０参照）から得た同じプロフィールを示している。Ｅ２プールの両方の部分共、別々のゲルろ過カラム上で走らせた。いかなる還元も実施されなかった場合には、Ｅ２が汚染性タンパク質と共有結合集合体を形成する、ということを実証することができた。還元と遮断の後、大部分の汚染性タンパク質は、Ｖ$_o$分画へと分離した。Ｅ２タンパク質と同時精製されたその他の汚染性タンパク質は、次の工程でこれらの汚染物質を除去できたため、もはやＥ２タンパク質に共有結合されなかった。図３２は、Ｅ２タンパク質の精製のために実施された付加的なＮｉ$^{2+}$－ＩＭＡＣ精製工程を示している。この親和性精製工程は、ｖｖＨＣＶ４４から発現された通りのＥ２タンパク質に添加された６ヒスチジン残基を利用する。汚染性タンパク質は、カラムを通過させるか又は、３０ｍＭのイミダゾール洗浄によりこれを除去することが可能である。図３３は、０．５μｇの精製済みＥ２タンパク質の銀染色されたＳＤＳ／ＰＡＧＥ及び３０ｍＭのイミダゾール洗浄を示す。純粋なＥ２タンパク質は、２００ｍＭのイミダゾール溶出工程によって容易に回収可能であった。図３４は、イミダゾールを除去し例えばＰＢＳ、炭酸塩緩衝液、食塩水といった所望の緩衝液へと切替えできるように意図された付加的な脱塩工程を示す。
【０２４７】
Ｅ１の産生のためｖｖＨＣＶ１１Ａ（又はｖｖＨＣＶ４０）に、又はＥ２タンパク質の産生のためｖｖＨＣＶ４１、ｖｖＨＣＶ４２、ｖｖＨＣＶ４３又はｖｖＨＣＶ４４に感染させられた約５０，０００ｃｍ^{2}のＲＫ１３細胞から出発して、実施例５．１～５．５に記載されている手順は、約１．３ｍｇのＥ１タンパク質及び０．６ｍｇのＥ２タンパク質の精製を可能にする。
【０２４８】
（６０～７０％が細胞内形態である状態で、約３０～４０％を構成する）分泌されたＥ２タンパク質が（予想に反して）集合体形成によって特徴づけされているということにも留意すべきである。かくして、分泌されたＥ２を精製するためにも同じ問題が提起される。分泌されたＥ２は、以上で開示された通りに精製可能である。
【０２４９】
実施例６：抗－Ｅ１又は抗－Ｅ２抗体の検出のため又はＥ１又はＥ２タンパク質の検出のためのＥＬＩＳＡ
Ｍａｘｉｓｏｒｂマイクロウェルプレート（デンマーク、ロスキルドのＮｕｎｃ）に、４℃で１６時間又は３７℃で１時間、ＰＢＳ中のストレプトアビジン（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）の５μｇ／ｍｌ溶液を１ウェルにつき１体積（例えば５０μｌ又は１００μｌ又は２００μｌ）コーティングした。代替的には、ウェルに、４℃で１６時間又は３７℃で１時間、ｐＨ９．６の５０ｍＭの炭酸ナトリウム緩衝液中の５μｇ／ｍｌのＧａｌａｎｔｈｕｓ　ｎｉｖａｌｉｓアグルチニン（ＧＮＡ）をコーティングした。ＧＮＡでのコーティングの場合、Ｉｎｎｏｔｅｓｔ　ＨＣＶＡｂＩＩＩキット（ベルギーのＩｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）の洗浄溶液４００μｌで２回プレートを洗浄した。未結合コーティング表面を、３７℃で１時間又は４℃で１６時間１．５～２体積の遮断溶液（ＰＢＳ中の０．１％のカゼイン及び０．１％のＮａＮ$_3$）で遮断した。遮断溶液を吸引した。精製したＥ１又はＥ２を、１００～１０００ｎｇ／ｍｌ（Ａ＝２８０ｎｍで測定された濃度）まで希釈するか又はＥ１又はＥ２（例えば実施例５参照）又は非精製細胞溶解産物中のＥ１又はＥ２（実施例５．１）についてスクリーニングされるべきカラム画分を遮断溶液中で２０倍に希釈し、各ウェルに対してＥ１又はＥ２溶液を１体積添加し、ストレプ

トアビジン又はＧＮＡ－コーティングされたプレート上で３７℃で１時間インキュベートした。マイクロウェルをＩｎｎｏｔｅｓｔ ＨＣＶＡｂＩＩＩキット（ベルギーのＩｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）の「洗浄溶液」１体積で３回洗浄した。血清標本を２０倍希釈するか又はモノクローナル抗－Ｅ１又は抗－Ｅ２抗体をＩｎｎｏｔｅｓｔ ＨＣＶＡｂＩＩＩキットの「標本希釈剤」中で２０ｎｇ／ｍｌの濃度まで希釈し、溶液１体積を３７℃で１時間Ｅ１又はＥ２タンパク質と反応させた。マイクロウェルを、Ｉｎｎｏｔｅｓｔ ＨＣＶＡｂＩＩＩキット（ベルギーのＩｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）の「洗浄溶液」４００μｌで５回洗浄した。Ｉｎｎｏｔｅｓｔ ＨＣＶＡｂＩＩＩキット（ベルギーのＩｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）の「接合体希釈剤」１体積中で１／８００００に希釈したヤギ抗ヒト又は抗マウスＩｇＧ、ペルオキシダーゼ接合二次抗体（ＤＡＫＯ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）と共に３７℃で１時間各ウェルをインキュベートすることにより、結合した抗体を検出し、Ｉｎｎｏｔｅｓｔ ＨＣＶＡｂＩＩＩキット（ベルギーのＩｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）の「洗浄溶液」４００μｌでプレートを３回洗浄した後２４℃で３０分間Ｉｎｎｏｔｅｓｔ ＨＣＶＡｂＩＩＩキット（Ｉベルギーの Ｉｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）の「基質溶液」１体積中で１００倍希釈されたＩｎｎｏｔｅｓｔ ＨＣＶＡｂＩＩＩキット（ベルギーのＩｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）の基質を添加することによって、着色が得られた。

【０２５０】

実施例７：異なる臨床プロフィールをもつ患者グループの追跡調査

７．１　抗－Ｅ１及び抗－Ｅ２抗体の監視

現在のＣ型肝炎（ＨＣＶ）診断検定は、ＨＣＶ抗体のスクリーニング及びその存在の確認のために開発されてきた。かかる検定は、疾病の治療の監視及びその転帰の予後診断にとって有用である情報を提供すると思われない。しかしながら、Ｂ型肝炎の場合がそうであるように、抗外被抗体の検出及び数量化は、臨床環境においてより有用であることが判明するかもしれない。Ｃ型肝炎疾患の転帰についての予後診断マーカーとしての抗－Ｅ１抗体力価及び抗－Ｅ２抗体力価の使用の可能性を調査するため、（少なくとも治療後１年の期間中血液中のトランスアミナーゼレベルが正常でＨＣＶ－ＲＮＡ試験（５’非コーディング領域内のＰＣＲ）が陰性であった患者として定義づけられる）長期持続性応答を有する一連のＩＦＮ－α治療を受けた患者を、治療の終りにおける再発を伴う生化学応答を示すか又は応答を全く示さない患者と比較した。

【０２５１】

長期持続性応答（ＬＴＲ、追跡調査１～３．５年、３ａ型３人、１ｂ型５人）を有する８人のＩＦＮ－αでの治療を受ける患者のグループを、治療に対する非完全応答を示す９人の患者（ＮＲ、追跡調査１～４年、１ｂ型６人、３ａ型３人）と比較した。１ｂ型（ｖｖＨＣＶ－３９、実施例２．５参照）及び３ａＥ１（ｖｖＨＣＶ－６２、実施例２．５参照）タンパク質は、ワクシニアウイルス系（実施例３及び４参照）によって発現され、均質になるまで精製された（実施例５）。１ｂ型Ｃ型肝炎ウイルスに感染した患者に由来する標本を、精製済み１ｂ型Ｅ１タンパク質との反応性についてテストし、一方３ａ型感染の標本は実施例６で記載されているようにＥＬＩＳＡにおいて抗３ａ型Ｅ１抗体の反応性についてテストした。異なる患者に感染したＣ型肝炎ウイルスの遺伝子型をＩｎｎｏ－ＬｉＰＡ遺伝子型割出し検定（ベルギーのＩｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）を用いて決定した。図５は、インターフェロン治療中及び治療後の追跡調査期間中に調査したこれらの患者の抗－Ｅ１信号対雑音比を示している。ＬＴＲの症例は、一貫して、抗－Ｅ１レベルの急速な低下を示し（３つの症例で完全に陰性化）、一方、ＮＲ症例の抗－Ｅ１レベルはほぼ一定にとどまっていた。獲得した抗－Ｅ１データの一部が平均Ｓ／Ｎ比±ＳＤ（平均抗－Ｅ１力価）として表２に示されている。抗－Ｅ１力価は、図５、６、７及び８に示されているように信号対雑音比から演繹できた。

【０２５２】

治療の終りにすでに、２つのグループ間に顕著な差が観察できた。抗－Ｅ１抗体力価はＬＴＲでは６．９分の１に減少したがＮＲでは１．５分のに１しか減少しなかった。追跡

調査の終りで、抗－Ｅ１力価は、持続的応答をもつ患者において２２．５の率で低下し、ＮＲにおいてはさらにわずかしか低下しなかった。従って、これらのデータに基づくと、ＩＦＮ－α療法の監視中の抗－Ｅ１抗体レベルの低下は、治療に対する長期の持続的応答と相関関係をもつ。抗－Ｅ１検定は、ＩＦＮ治療又はＣ型肝炎疾患全般の治療に対する長期応答の予後診断にとってひじょうに有用であり得る。

【０２５３】

この発見事実は、予想外であった。反対に、発明者らは、長期応答をもつ患者においてＩＦＮ治療の最中に抗－Ｅ１抗体レベルが増大するものと予想していた。Ｂ型肝炎の場合がそうであるように、ウイルスは、抗ＨＢｓＡｇ抗体についての血清変換の結果として一掃される。同様にその他の数多くのウイルス感染においても、ウイルスは、抗外被抗体が発生させられた時点で除去される。しかしながら、本発明の実験においては、抗－Ｅ１抗体は、治療に対する長期応答をもつ患者において明らかに減少し、一方応答しない患者では抗体レベルはほぼ同じレベルにとどまった。これらの実験の成果は、予想外であったが、この明白でない発見事実は、ＨＣＶ感染の臨床診断にとって非常に重要かつ有用でありうる。図９、１０、１１、及び１２内で示されているように、抗－Ｅ２レベルは、研究対象の同じ患者において非常に異なる形で挙動し、抗－Ｅ１抗体に関しては、力価の明白な低下は全く観察されなかった。図３５が、パイロット研究の完全な概覧を示している。

【０２５４】

表２から演繹できるように、抗－Ｅ１力価は平均して、治療に対する不完全な応答者と比較して長期応答者においては治療の開始時点で少なくとも２倍高いものであった。従って、治療の開始時点で抗－Ｅ１抗体の力価を測定すること、又は感染の進行中に患者を監視するし抗－Ｅ１力価を測定することが、Ｃ型肝炎の臨床的診断にとって有用なマーカーとなりうる。さらに、実施例７．３で示されているように、Ｅ１又はＥ２タンパク質のより明確な領域の使用が望ましくなるかもしれない。

【０２５５】

７．２　より広い患者コホート内でのＥ１及びＥ２抗体の分析

パイロット研究により、発明者らは、感染が完全に一掃された場合、ＨＣＶ外被タンパク質に対する抗体はより慣習的に研究されたＨＣＶ抗原に対する抗体に比べより急速に変化し、Ｅ１抗体が最も活発に変化する、と結論づけするに至った。従って我々は、より多くの１ｂ型及び３ａ型感染ＬＴＲを含み入れ、さらにコホートを整合したＮＲセットで補足し、両方のグループが各々１４人の患者を包含するようにした。一部の部分的応答者（ＰＲ）及び再発を伴う患者（ＲＲ）も同様に分析された。

【０２５６】

図３６は、ＬＴＲ及びＮＲ基の中の平均的Ｅ１抗体（Ｅ１Ａｂ）及びＥ２抗体（Ｅ２Ａｂ）レベルを描いており、表４及び５は、統計的分析を示している。このより大きいコホートにおいては、ＩＦＮ－α療法の前のさらに高いＥ１抗体レベルは、ＬＴＲと結びつけられていた（Ｐ＜０．０３）。１ｂ型感染患者（図３７）に比べて３ａ型感染患者においてはるかに高いＥ１抗体レベルが観察されたことから、遺伝子型が考慮に入れられた（表４）。１ｂ型感染グループの中で、ＬＴＲは同じく、治療の開始時点でＮＲよりも高いＥ１抗体レベルを有していた（Ｐ＜０．０５）；３ａ型感染ＮＲの数が制限されたものであったため、統計的分析はできなかった。

【０２５７】

１．５年の追跡調査期間中ＬＴＲにおいて監視された抗体レベルのうち、Ｅ１抗体のみが、治療当初に測定されたレベルと比べ急速に清澄化した［治療の終りでＰ＝０．００５８、治療から６ヶ月及び１２ヵ月後にはそれぞれＰ＝０．００４７及びＰ＝０．００５１］。この清澄化は、１型又は３型感染ＬＴＲの内部で有意なものにとどまった（平均Ｐ値＜０．０５）。これらのデータは、早期消散工程で急速にＥ１Ａｂレベルが減少するという初期発見事実を確認した。この特長は、ウイルス遺伝子型と無関係であると思われる。ＮＲ、ＰＲ又はＲＲにおいては、追跡調査期間全体を通して、測定された抗体のいずれにおいても変化は全く見られなかった。ＡＬＴレベルの正規化を伴って治療に対し有利に応

答し治療中ＨＣＶ－ＲＮＡが陰性であった患者においては、持続的応答者（ＬＴＲ）及び再発を伴う応答者（ＲＲ）の間には顕著な差が存在していた。ＬＴＲとは対照的に、ＲＲはいかなるＥ１抗体レベルの減少も示さず、これは、ＨＣＶ－ＲＮＡの検出のためのＰＣＲ又はその他の古典的技術によってもＡＬＴレベルの上昇によっても実証され得なかった潜在的なＨＣＶ感染の存在を表わしている。治療中の応答者グループにおいてもなお存在するわずかな量のウイルスＲＮＡは、抗－Ｅ１Ｂ細胞を刺激する能力をもつように思われる。従って、抗－Ｅ１監視は、ＮＲからのみならずＲＲからもＬＴＲを弁別することができるかもしれない。

【０２５８】

７．３　Ｅ１タンパク質の明確な領域の抗体の監視

ＨＣＶ抗原を同定する分子生物学的アプローチはウイルス診断の開発における前例を見ない突破口を結果としてもたらしたが、λｇｔ１１ライブラリの免疫スクリーニング方法は、コア及び非構造的領域全体にわたり分散した線状エピトープを主に生み出し、外被領域の分析は、哺乳動物細胞におけるＥ１／Ｅ２領域のクローニング及び発現を待たなくてはならなかった。このアプローチは、ゲノム構造の解説よりはるかに前にすでにその外被領域に対するエピトープがマッピングされていたその他の数多くのウイルス感染と著しい対照をなすものである。このようなエピトープ及び対応する抗体は往々にしてワクチン開発にとって有用な中和活性を有し、かつ／又は臨床的又は予後診断的意味をもつ診断検定の開発を可能にした（例えば、Ｂ型肝炎表面抗原に対する抗体）。

【０２５９】

今日、Ｃ型肝炎疾患の臨床的診断及び予後診断を可能にするＨＣＶワクチン又は試験が全く利用できないことから、免疫監視にさらされたウイルス外被領域の特徴づけは、ＨＣＶの診断及び予防における新しい傾向に著しく貢献する可能性がある。

【０２６０】

８つのアミノ酸により互いに重ね合わされた複数の２０量体ペプチド（表３）を、ＨＣ－Ｊ１配列に基づいて以前に記載された方法（ＥＰ－Ａ－０４８９９６８）に従って合成した（Ｏｋａｍｏｔｏら、１９９０年）。ペプチドｅｎｖ３５（Ｅ１－３５とも呼ばれている）を除きこれらのいずれも、約２００のＨＣＶ症例の血清中に抗体を検出することができなかった。２つの血清のみがｅｎｖ３５ペプチドとわずかに反応した。しかしながら、実施例６に記載したような抗－Ｅ１　ＥＬＩＳＡを用いると以下のように付加的なエピトープを発見することができた。すなわち、実施例６に記載されるような抗－Ｅ１ＥＬＩＳＡを、標本希釈物中の１／２０希釈されたヒト血清と５０μｇ／ｍｌのＥ１ペプチドの混合によって修飾させた。図１３は、単一のＥ１ペプチド又はその混合物の存在下での（ｖｖＨＣＶ－４０から発現された）組換え型Ｅ１タンパク質に対するヒト血清の反応性の結果を示している。ライン免疫検定形式ではストリップ上にコーティングされたＥ１ペプチドを用いて血清の２％しか検出することができなかったものの、組換え型Ｅ１タンパク質上でテストした場合、血清の半分以上が、同じペプチドを用いて競合させられ得る抗－Ｅ１抗体を含有していた。精製済みＥ１タンパク質を注射した後Ｂａｌｂ／Ｃマウスから得たマウスモノクローナル抗体の一部を、その後単一ペプチドと、Ｅ１に対する反応性について競合させた（図１４）。明らかに、ｅｎｖ５３の領域は、ｅｎｖ５３の添加が実質的にＥ１と複数の血清の反応性を競合させることができたことから優勢なエピトープを含有しており、ｅｎｖ３１領域に対する抗体も又検出された。ｅｎｖ５３及びｅｎｖ３１ペプチドが固相に直接コーティングされた場合にいかなる反応性も示さなかったことから、この発見事実は驚くべきことであった。

【０２６１】

従って、ペプチドは、以前に（国際公開第９３／１８０５４号パンフレットの中で）出願人により詳述された技術を用いて合成された。

ペプチドｅｎｖ３５Ａ－ビオチン

Ｅ１領域内のＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸２０８～２２７にわたるタルNH_2－ＳＮＳＳＥＡＡＤＭＩＭＨＴＰＧＣＶ－ＧＫビオチン（配列番号５１）、

ペプチドビオチン－ｅｎｖ５３（「エピトープＡ」）
Ｅ１領域内のＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸３１３～３３２にわたるビオチン－ＧＧ－ＩＴＧＨＲＭＡＷＤＭＭＭＮＷＳＰＴＴＡＬ－ＣＯＯＨ（配列番号５２）、
ペプチド１ｂＥ１（「エピトープＢ」）
Ｅ１領域内のＨＣＶポリタンパク質のアミノ酸１９２～２２８にわたるH_2Ｎ－ＹＥＶＲＮＶＳＧＩＹＨＶＴＮＤＣＳＮＳＳＩＶＹＥＡＡＤＭＩＭＨＴＰＧＣＧＫ－ビオチン（配列番号５３）、
といったペプチドを合成し、それぞれ遺伝子型１ａ及び１ｂの配列の同じ領域に由来しかつ１９９３年のグラスゴーにおける第９回国際ウイルス学会で記載されたＥｌａ－ＢＢ（ビオチン－ＧＧ－ＴＰＴＶＡＴＲＤＧＫＬＰＡＴＱＬＲＲＨＩＤＬＬ、配列番号５４）及びＥｌｂ－ＢＢ（ビオチン－ＧＧ－ＴＰＴＬＡＡＲＤＡＳＶＰＴＴＴＩＲＲＨＶＤＬＬ、配列番号５５）（「エピトープＣ」）の反応性と比較した。一連のＨＣＶ血清の反応性をエピトープＡ、Ｂ及びＣについてテストし、エピトープをｅｎｖ３５Ａとも比較した（４７のＨＣＶ陽性血清のうち、８個がエピトープＢ上で陽性であり、ｅｎｖ３５Ａと反応したものは全くなかった）。エピトープＡ、Ｂ及びＣに向かう反応性を、実施例６で記載されている通りのストレプトアビジンコーティング済みプレートに結合したビオチニル化ペプチド（５０μｇ／ｍｌ）に対し直接テストした。明らかに、エピトープＡ及びＢは最も反応性が高く、一方エピトープＣ及びｅｎｖ３５Ａ－ビオチンははるかに反応性が低かった。完全Ｅ１タンパク質に向かうその反応性について監視された同じ一連の患者（実施例７．１）をエピトープＡ、Ｂ及びＣに対する反応性についてテストした。エピトープＣに対する反応性はほとんど見られなかったが一方、図１５、１６、１７及び１８で示されているように、エピトープＡ及びＢは大部分の血清と反応した。しかしながら、大部分の反応性エピトープ（エピトープＡ）に対する抗体が疾病の沈静化を予測するとは思われず、一方抗１ｂＥ１抗体（エピトープＢ）はＩＦＮ治療の開始時点で長期応答者においてほぼ排他的に存在していた。従って、抗－１ｂＥ１（エピトープＢ）抗体及び抗ｅｎｖ５３（エピトープＡ）抗体がＣ型肝炎疾患の予後診断にとって有用なマーカであることを示すことができた。ｅｎｖ５３エピトープは有利には、交差反応性抗体（主要な遺伝子型間で交差反応する抗体）の検出のために使用することができ、ｅｎｖ５３領域に対する抗体は、血清又は肝組織内での普遍的なＥ１抗原検出のために非常に有用であり得る。ｅｎｖ５３領域を認識したモノクローナル抗体をランダムエピトープライブラリと反応させた。モノクローナル抗体５Ｅ１Ａ１０と免疫スクリーニングの時点で反応した４つのクローンの中には、配列－ＧＷＤ－が存在していた。ｅｎｖ５３領域内の全てのＨＣＶ変異体の中に存在する普遍的ＨＣＶ配列とのその類似性のため、配列ＡＷＤは、ｅｎｖ５３交差反応性マウスエピトープの必須配列を含むものと考えられている。ｅｎｖ３１は明らかに、アミノ末端配列－ＹＱＶＲＮＳＴＧＬ－（配列番号９３）内にエピトープを含み得かつ診断のために有用でありうる可変領域をも含んでいる。表３に示されているようなＥｎｖ３１又はＥ１－３１は、ペプチド１ｂＥ１の一部である。ペプチドＥ１－３３及びＥ１－５１は同様に、或る程度までマウス抗体と反応し、（可変領域６（Ｖ６）を含有し、アミノ酸位置３２９～３３６にまたがる）ペプチドＥ１－５５は、患者血清の一部とも反応した。

【０２６２】

抗－Ｅ２抗体は明らかに、特に治療に対する長期応答をもつ患者において、抗－Ｅ１抗体とは異なるパターンに従っていた。従って、抗外被抗体の減少は、単一の抗－Ｅ１又は抗－Ｅ２タンパク質の場合と同様に効率良く組換え型Ｅ１／Ｅ２タンパク質を利用する検定を用いて測定可能であった。抗－Ｅ２応答は、両方の種類の抗体を同時に測定する検定において抗－Ｅ１応答を明らかにあいまいにすることになる。従って、単一Ｅ１及びＥ２タンパク質に対する抗外被抗体をテストする能力が有用であることが立証された。

【０２６３】

７．４　抗－Ｅ２抗体のマッピング
２４の抗－Ｅ２Ｍａｂｓのうち３つのみがペプチドによる組換え型Ｅ２に対する反応性について競合させることができ、そのうち２つがＨＶＲＩ領域（エピトープＡと呼称され

るペプチドＥ２－６７及びＥ２－６９）及びペプチドＥ２－１３Ｂにより競合されたエピトープ（エピトープＣ）を認識するものと反応した。マウス抗体の大部分が、立体配座抗－Ｅ２エピトープを認識した（図１９）。ＨＶＲＩ（エピトープＡ）及びそれよりも低い程度でＨＶＲＩＩ（エピトープＢ）、そして（エピトープＥと呼称される、ペプチドＥ２－２３、Ｅ２－２５又はＥ２－２７により競合されている）第３の線状エピトープ領域、及び（ペプチドＥ２－１７Ｂにより競合されている、エピトープＤである）第４の線状エピトープ領域に対するヒト応答も往々にして観察されたが、血清の大部分は立体配座エピトープと反応した（図２０）。これらの立体配座エピトープは、以下のようにその相対的位置に従ってまとめることができた。すなわち、立体配座エピトープを認識するハイブリドーマ１５Ｃ８Ｃ１、１２Ｄ１１Ｆ１、９Ｇ３Ｅ６、８Ｇ１０Ｄ１Ｈ９、１０Ｄ３Ｃ４、４Ｈ６Ｂ２、１７Ｆ２Ｃ２、５Ｈ６Ａ７、１５Ｂ７Ａ２の上清中のＩｇＧ抗体をプロテインＡアフィニティクロマトグラフィを用いて精製し、結果として得たＩｇＧ１ｍｇ／ｍｌをビオチンの存在下でホウ酸塩緩衝液内でビオチニル化した。ビオチニル化された抗体を、ゲルろ過クロマトグラフィを用いて遊離ビオチンから分離した。プールしたビオチニル化抗体画分を１００～１０，０００倍に希釈した。固相に結合したＥ２タンパク質を、非ビオチニル化競合抗体量の１００倍の存在下でビオチニル化ＩｇＧにより検出し、その後、アルカリホスファターゼで標識づけしたストレプトアビジンで検出した。

【０２６４】

表６中に競合の百分率が示されている。これらの結果に基づき、４つの立体配座抗－Ｅ２エピトープ領域（エピトープＦ、Ｇ、Ｈ及びＩ）を描写することができた（図３８）。代替的にはこれらのＭａｂｓは、本研究において用いられるペプチドによって表わされていない突然変異体線状エピトープを認識することができる。Ｍａｂｓ４Ｈ６Ｂ２及び１０Ｄ３Ｃ４は、１６Ａ６Ｅ７の反応性について競合したが、１６Ａ６Ｅ７と異なり、これらはペプチドＥ２－１３Ｂを認識しなかった。これらのＭａｂｓは、同じ線状エピトープ（エピトープＣ）の変異体を認識するか又は、Ｅ２－１３Ｂ領域に対する１６Ａ６Ｅ７の結合の後に立体障害を受けるか又は立体配座を変える立体配座エピトープ（エピトープＨ）を認識することができる。

【０２６５】

実施例８：Ｅ１グリコシル化突然変異体

８．１　序

哺乳動物細胞から発現されたｖｖＨＣＶ１０ＡによりコードされたＥ１タンパク質及びｖＨＣＶ４１～４４によりコードされたＥ２タンパク質は、それぞれ６～１１個の炭水化物部分を含有している。このことは、（Ｅ１を含む）溶解産物中のタンパク質が部分的に脱グリコシル化されるような形で、グリコシダーゼ（メーカーの指示に従ってＰＮＧａｓｅ　Ｆ又はエンドクリコシダーゼＨ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａ））の濃度を減少させながらｖｖＨＣＶ１０Ａ感染又はｖｖＨＣＶ４４感染したＲＫ１３細胞の溶解産物をインキュベートすることによって示すことができた（それぞれ図３９及び４０）。

【０２６６】

そのグリコシル化部位の一部が欠けている突然変異体は、改善された免疫学的反応をもつ外被タンパク質の選択を可能にすることができた。例えばＨＩＶについては、或る種の選択された糖付加モチーフが欠如しているｇｐ１２０が診断又はワクチンを目的として特に有用であることがわかった。Ａ／ホンコン／３／６８（Ｈ３Ｎ２）インフルエンザウイルスのエスケープミュウータントのヘマグルチニンタンパク質内の新しいオリゴ糖側鎖の付加は、中和モノクローナル抗体との反応性を妨げる（Ｓｋｅｈｅｌら、１９８４年）。部位特異的突然変異誘発によりインフルエンザヘマグルチニンタンパク質内に新規のグリコシル化部位が導入された時点で、劇的な抗原変化が観察され、このことは、炭水化物が抗原性モジュレータとして役立つということを示唆していた（Ｇａｌｌａｇｈｅｒら、１９８８年）。もう１つの分析では、フレンドマウス白血病ウイルスの表面タンパク質ｇｐ７０の８つの炭水化物付加モチーフが欠失された。突然変異のうち７つはウイルスの感染

度に影響を及ぼさなかったが、アミノ酸末端との関係における第４番目のグリコシル化シグナルの突然変異が、非感染性表現型を結果としてもたらした（Ｋａｙｍａｎら、１９９１年）。さらに、当該技術分野では、折畳み中間体の安定化ひいては効率の良い折畳み、折畳み不良の防止及び小胞体内の分解、オリゴマー化、生物活性及び糖タンパク質の輸送にとって、Ｎリンクされた炭水化物の付加が重要であることがわかっている（Ｒｏｓｅらによる再考、１９８８年；Ｄｏｍｓら、１９９３年；Ｈｅｌｅｎｉｕｓ、１９９４年を参照のこと）。

【０２６７】

ＨＣＶ遺伝子型の異なる外被タンパク質配列の整列の後、或る種の（亜）型の中でいくつかは欠如していることから、ＨＣＶ亜型１ｂＥ１タンパク質上の６つのグリコシル化部位全てが適切な折畳み及び反応性のために必要であるわけではないということを推測することができる。１ｂ、６ａ、７、８及び９型の内に存在する第４の炭水化物モチーフ（Ａｓｎ２５１上）は、今日知られているその他全ての型の中で存在していない。この糖付加モチーフは突然変異を受けて改善された反応性をもつ１ｂ型Ｅ１タンパク質を生成することができる。同様に２ｂ型配列は、Ｖ５領域（Ａｓｎ２９９上）内で追加のグリコシル化部位を示す。遺伝子型２ｃに属する分離株Ｓ８３には、Ｖ１領域（Ａｓｎ上）内で第１の炭水化物モチーフさえ欠如しているのに対し、これはその他の全ての分離株上には存在している（Ｓｔｕｙｖｅｒら、１９９４年）。しかしながら、完全に保存された糖付加モチーフの間でさえ、炭水化物の存在は折畳みのために必要とされないものの、免疫監視の回避における役割を有し得る。従って、適切な折畳み（及び反応性）に必要とされない炭水化物付加モチーフの同定は明白ではなく、各々の突然変異体を分析し反応性についてテストしなければならない。グリコシル化モチーフ（ＮＸＳ又はＮＸＴ配列）の突然変異誘発は、Ｎ．Ｓ．又はＴについてのコドンを突然変異させて、これらのコドンがＮの場合にはＮと異なるアミノ酸をコードしＳの場合及びＴの場合にはＳ又はＴと異なるアミノ酸をコードするようにすることによって達成することが可能である。代替的には、ＮＰＳ又はＮＰＴが頻繁に炭水化物で修飾されないことがわかっているため、Ｘ位置をＰへと突然変異させることができる。折畳み及び／又は反応性のためにどの炭水化物付加モチーフが必要とされどれが必要とされないかを立証した後、このような突然変異の組合せを行なうことができる。

【０２６８】

８．２　Ｅ１タンパク質の突然変異誘発

全ての突然変異は、クローンＨＣＣ１１０ＡのＥ１配列（配列番号５）上で実施された。第１回目のＰＣＲは、ワクシニア１１Ｋ遅発性プロモータの上流側に位置設定されたＧＰＴ配列をターゲティングするセンスプライマー「ＧＰＴ」（表７参照）及び突然変異誘発を得るための所望の塩基変更を含むアンチセンスプライマー（＃がグリコシル化部位の番号を表わすものとしてＧＬＹ＃と呼称される；図４１参照）を用いて実施された。（各々一定の与えられたグリコシル化部位に特異的である）以下のような６つのＧＬＹ＃プライマーが設計された：

－　Ｇｌｎコドン（ＣＡＡ又はＣＡＧへのＮ－グリコシル化Ａｓｎ（ＡＡＣ又はＡＡＴ）についてコードするコドンの修飾。アスパラギンに非常に類似していることから（両方のアミノ酸共に中性で、非極性残基を含み、グルタミンの方が長い側鎖をもつ（－CH_2－基が１つ多い））、グルタミンが選ばれた。

－　新しいユニーク又は稀な（例えばＥ１Ｇｌｙ５のための第２のＳｍａＩ部位）制限酵素部位を作り出すための、グリコシル化部位の下流側のコドンのうちの単数又は複数のものの中へのサイレント突然変異の導入。アミノ酸配列を修飾することなく、この突然変異は、もとのＥ１配列（ｐｖＨＣＶ－１０Ａ）から又は互いから突然変異を受けた配列を識別する方法を提供することになる（図４１）。この付加的な制限部位は、新しいハイブリッド（２重、３重など）グリコシル化突然変異の構築にとっても有用であり得る。

－　１８個のヌクレオチドが最初の不整合ヌクレオチドの５’を延長し、１２～１６個のヌクレオチドが３’末端まで延長する。表７は、Ｎリンクしたグリコシル化部位の配列と

重複する６個のＧＬＹ＃プライマーの配列を表している。

【０２６９】

部位特異的突然変異誘発のためには、「ミスプライミング」又は「重複拡張」（Ｈｏｒｔｏｎ、１９９３年）が用いられた。この概念は図４２及び４３で例示されている。まず最初に、２つの別々のフラグメントを、突然変異を受けた各部位についてターゲット遺伝子から増幅した。５’末端から得たＰＣＲ産物（産物ＧＬＹ＃）を５’センスＧＰＴプライマー（表７参照）及びそれぞれの３’アンチセンスＧＬＹ＃プライマーで増幅させた。第２のフラグメント（産物ＯＶＲ＃）を３’アンチセンスTK_Rプライマー及びそれぞれの５’センスプライマー（ＯＶＲ＃プライマー、表７参照、図４３）で増幅させた。

【０２７０】

ＯＶＲ＃プライマーは、ＧＬＹ＃プライマー配列の一部をターゲティングする。従って、ＰＣＲ産物の２つのグループは、同一の配列の重複領域を共有する。これらの中間産物が混合され（ＧＬＹ－１とＯＶＲ－１、ＧＬＹ－２とＯＶＲ－２など）、高温で溶融され、再アニールされた時点で、産物ＧＬＹ＃のトップセンスストランドは、２つのストランドが互いにとってのプライマーとして作用するような形で、産物ＯＶＲ＃のアンチセンスストランドに（及びその逆に）アニールすることができる（図４２Ｂ参照）。２つのＰＣＲサイクル中のＴａｑポリメラーゼによるアニールされた重複の拡張が、グリコシル化部位番号＃を破壊する突然変異を担持する全長突然変異体分子Ｅ１Ｇｌｙ＃を作り上げた。２つの内部的ネスト化プライマーの共通のセットを用いて、第３のＰＣＲにおいてクローニングのための充分な量のＥ１ＧＬＹ＃が生成された。これら２つの新しいプライマーが、ワクシニア１１Ｋプロモータの３’末端（センスＧＰＴ－２プライマー）及びワクシニアチミジンキナーゼ遺伝子座の５’末端（アンチセンスTK_R－２プライマー、表７参照）とそれぞれ重複している。全てのＰＣＲ条件を、Ｓｔｕｙｖｅｒら（１９９３年）に記載されている通りに実施した。

【０２７１】

これらのＰＣＲ産物の各々は、もとのＥ１配列（ｐｖＨＣＶ－１０Ａ）を含有するＥｃｏＲＩ／ＢａｍＨＩ切断ワクシニアベクター内へのＥｃｏＲＩ／ＢａｍＨＩの開裂によってクローニングされた。

【０２７２】

ＥｃｏＲＩ／ＢａｍＨＩ開裂によるインサートの長さ及び各々の新しい制限部位の存在について、選択されたクローンを分析した。突然変異を受けた部位と重複する配列は、２本鎖配列決定によって確認した。

【０２７３】

８．３　Ｅ１グリコシル化突然変異体の分析

実施例８．２に記載されている通りの突然変異体Ｅ１を含有する６つのプラスミドから出発して、実施例２．５に記載されているように、ｗｔワクシニアウイルスでの組換えにより組換え型ワクシニアウイルスを生成した。簡単に言うと、亜集密なＲＫ１３細胞の１７５cm^2のフラスコを、突然変異体Ｅ１配列を担持する６つの組換え型ワクシニアウイルスならびに（突然変異を受けていないＥ１配列を担持する）ｖｖＨＣＶ－１０Ａ及びｗｔワクシニアウイルスで感染させた。２４時間の感染後、細胞を溶解させ、実施例４に記載されている通りウェスタンブロット上で分析した（図４４Ａ参照）。全ての突然変異体は、もとのＥ１タンパク質に比べＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で（約２～３ｋＤａのより小さい分子量に対応する）より早い移動度を示し、これは、１つの炭水化物が付加されなかったことを確認するものであった。組換え型ウイルスも同様にＰＣＲ及び制限酵素分析により分析して、異なる突然変異体の同一性を確認した。図４４Ｂは、全ての突然変異体（図４１に示されているような）が、予想された付加的な制限部位を含んでいたことを示している。ＥＬＩＳＡにより異なる突然変異体の反応性をテストするために、細胞溶解産物のもう１つの部分を使用した。溶解産物を２０倍に希釈し、実施例６で記載したとおり、レクチンＧＮＡでコーティングされたマイクロウェルプレートに添加した。捕獲された（突然変異体）Ｅ１糖タンパク質を、実施例６で記載した通り、２４人のＨＣＶ感染患者の２０倍

希釈血清と反応させた。６つの突然変異体及びＥ１についての信号対雑音（Ｓ／Ｎ）値（ＧＬＹ＃のＯＤ／ｗｔのＯＤ）が表８に示されている。この表は同様にＧＬＹ＃とＥ１タンパク質のＳ／Ｎ値の比も示している。患者の血清との反応性の比較のため異なる突然変異体の細胞溶解産物を使用するアプローチが、反応性レベルではなくむしろ異なる発現レベルの帰結である観察事実を結果としてもたらす可能性があるということを理解すべきである。かかる問題点は、実施例５に記載されている通りの異なる突然変異体の精製によって及び同量の全ての異なるＥ１タンパク質をテストすることによって克服できる。しかしながら、表５に示されている結果はすでに、第１（ＧＬＹ１）、第３（ＧＬＹ３）及び第６（ＧＬＹ６）のグリコシル化モチーフの除去が一部の血清の反応性を減少させる一方で、第２及び第５の部位の除去はこれを減少させないということを表わしている。ＧＬＹ４の除去は、或る種の血清の反応性を改善するように思われる。これらのデータは、異なる患者が本発明のグリコシル化突然変異体に対し異なる形で反応するということを表わしている。かくして、かかる突然変異体Ｅ１タンパク質は、ＨＣＶ疾患の診断（スクリーニング、確認、予後診断など）及びその予防にとって有用でありうる。

【０２７４】

実施例９：グリコシル化－欠損酵母におけるＨＣＶＥ２タンパク質の発現

クローンＨＣＣ１４１に対応するＥ２配列に、酵母発現ベクター内に挿入されたα－交配因子プリノプロシグナル配列を具備し、この構築物で形質転換したＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ細胞は、増殖培地内にＥ２タンパク質を分泌した。大部分のグリコシル化部位が、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ菌株内でのこのような構築物の発現の時点で高マンノースタイプのグリコシル化で修飾されたことが観察された（図４５）。この結果、異種性が高過ぎることになり反応性が遮へいされ、これはワクチン又は診断のいずれの目的のためにも望ましいことではない。この問題を克服するために、バナジウム酸塩耐性クローンの選択を用いて、修飾されたグリコシル化経路をもつＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ突然変異体が生成された。糖タンパク質転化酵素の分子量及び異質性の分析により、修飾されたグリコシル化経路について、かかるクローンを分析した。こうして我々は、異なるグリコシル化欠損Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ突然変異体を同定することができた。Ｅ２タンパク質をその後、選択された突然変異体のうちの一部の中で発現させ、実施例４に記載されている通りのウェスタンブロット上で実施例７に記載されている通りにモノクローナル抗体と反応させた（図４６）。

【０２７５】

実施例１０　一般的有用性

当該結果は、ヒト患者血清とＨＣＶ外被タンパク質の間で高い反応性に達するためには、優れた発現系のみならず優れた精製プロトコルも必要とされる、ということを示している。これは、タンパク質の天然の折畳みの保存を保証する本発明の適切なＨＣＶ外被タンパク質発現系及び／又は精製プロトコル、及び汚染性タンパク質の除去を保証し、ＨＣＶ外被タンパク質の立体配座ひいては反応性を保つ本発明の精製プロトコルを用いて得ることができる。診断スクリーニング検定のために必要とされる精製されたＨＣＶ外被タンパク質の量は、一年あたりグラム数の範囲内にある。ワクチンを目的とする場合には、さらに多量の外被タンパク質が必要となると思われる。従って、最良の発現構築物を選択しスケールアップを制限するためにワクシニアウイルス系を使用することができ、複数の酵母菌株から発現された時点で高いマンノース炭化水素を含む単一又は特異的オリゴマー外被タンパク質の大規模発現及び精製を達成することができる。例えばＢ型肝炎の場合、哺乳動物細胞からのＨＢｓＡｇの製造は、酵母由来のＢ型肝炎ワクチンと比べはるかにコストの高いものであった。

【０２７６】

本発明で開示された精製方法は同様に、「ウイルス外被タンパク質」全般のために使用することもできる。例としては、フラビウイルス、新たに発見されたＧＢ－Ａ、ＧＢ－Ｂ及びＧＢ－Ｃ型肝炎ウイルス、ペスチウイルス（例えばウシウイルス性下痢性ウイルス（ＢＶＤＶ）、豚コレラウイルス（ＨＣＶ）、ボーダー病（ＢＤＶ））に由来するもの、の

みならず、（主としてＨＢｓＡｇの精製用の）Ｂ型肝炎ウイルスといった関連性の低いウイルスに由来するものがある。

【０２７７】

本発明の外被タンパク質精製方法は、詳細な説明の節で記されているような原核生物内又は下等又は高等真核生物細胞における細胞内及び細胞外発現されたタンパク質のために使用することができる。

【０２７８】

実施例１１：予防及び治療上の有用性の実証

ＨＣＶに慢性感染したチンパンジーにおける肝疾患は、Ｅ１での免疫化により低減させることができる。しかしながら、有意な免疫応答に達するためには、多数回の免疫化が必要とされた。当業者であれば、ウイルス自体又は宿生のいずれかによって組織される免疫変調によりウイルスの持久性が生み出されることを認識するであろう。このような免疫変調がＨＣＶ内で実際に存在するか否かを分析するために、ナイーブ（naive）なチンパンジーおよび慢性的に感染したチンパンジーにおけるＥ１及びＮＳ３に対する免疫応答を比較した。慢性感染した動物における比較的低い応答が予想されたことから、ナイーブ動物のために使用されるアジュバントであったミョウバンに比べて細胞応答（表９）を誘発する効能がより高いことがマウスにおいて証明されたアジュバントの使用；そして、ナイーブ動物の場合の６回に比べ１２回の免疫化から成る慢性感染した動物に対する免疫化計画（図４７）を含めたより厳しい免疫化計画のために、この動物グループが選択された。

【０２７９】

免疫化された動物の数は統計的分析を可能にするものではないが、体液性応答において以下の明確な傾向が検出できる（表１０）。すなわち血清変換のための免疫化の回数は、ナイーブ動物においてより低く、免疫応答の規模は、ナイーブ動物において実質的に大きく、２／３の感染動物は、１２回の免疫化の後でさえ１０内部単位のレベルに達しない。

【０２８０】

３回の免疫化の後の細胞応答の分析は、以下のものを含めた、さらに大きい差（図４８ａ－ｄ）を明らかにしている。すなわち、ナイーブ動物では明確な刺激が見られるのに対し、慢性感染動物では、Ｅ１特異的Ｔ細胞増殖はほとんど見られない。又ＩＬ－２測定は、慢性キャリヤにおけるＴ細胞区画の低い刺激を確認した。さらに、ミョウバンアジュバント含有ワクチンについて予測されるように、ナイーブ動物における明確なＴｈ２（ＩＬ－４）応答が誘発されている。

【０２８１】

このことは、少なくともＥ１免疫化が、ナイーブ動物における予防的効果を提供することを確認し、かつＥ２及び／又はＥ１とＥ２タンパク質及び／又はペプチドの組合せがナイーブ動物において有用な治療的及び／又は予防的利点を提供しうるということを示唆している。

【０２８２】

ＨＣＶＥ１抗原に対する細胞及び体液性応答の両方を誘発することの「障害」は、各注射の後の抗体力価の増大が指摘されたがナイーブ動物の場合のようなレベルは２／３の動物において達成されなかったこと及びＴ細胞増殖性応答が非常に低いものにとどまっていること（図４９）といった結果により実証されるように、多数回の免疫化により部分的に克服できるにすぎない。しかしながら、ＥＬＩＳＰＯＴの結果は、ＩＬ－２のわずかな増大（図示せず）、ＩＦＮ－ｇの無変化（図示せず）及びＴｈ２型応答がより容易に誘発されることを表わすＩＬ－４の増加（図４９）を示している。ＩＬ－４は、ナイーブ動物における３回の免疫化の後達したレベルに比べ低いレベルにとどまるということが指摘された。

【０２８３】

慢性チンパンジーにおいてさらに一層強いアジュバント（ＲＩＢＩ）が使用されたＮＳ３の免疫化について、かなり類似した観察がなされた。ナイーブ動物におけるミョウバン製剤と比較して、以下のことが指摘されてきた。すなわち、誘発された抗体力価は、両方

のグループにおいて比較可能なものであり（図示せず）、サイトカイン分泌及びＴ細胞増殖は両方共、ナイーブ動物における応答に比べ慢性動物においてはほぼ欠如している（図４９ａ－ｂ）。

【０２８４】

現在、慢性キャリヤにおけるＨＣＶに対する免疫応答は、低いか又は少なくとも感染の一掃を可能にするには不充分なものであるといういくつかの指摘が存在してきた。上述の結果は、ＨＣＶ慢性キャリヤの免疫系が損なわれる可能性があり、ナイーブな状況の場合と同じ位効率良くＨＣＶ抗原に応答しないという仮説を裏づけている。

【０２８５】

Ｗｉｅｄｍａｎｎら、（Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ　２０００；３１：２３０～２３４）による研究の中で、ＨＢＶのためのワクチン接種はＨＣＶ慢性キャリヤの場合より効力が低く、これは、このような免疫機能障害がＨＣＶ抗原に制限されないことを表わしている。Ｄｅ　Ｍａｒｉａら、（Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ　２０００；３２：４４４～４４５）は、これらのデータを確認し、ＨＣＶ患者について適合されたワクチン用量・用法を提供してきた。ここで提示されたデータは、免疫化の回数を増加させることで実際に体液性応答を増大させ得るが、細胞（特にＴｈ１）応答は強力なアジュバントを使用した場合でさえ誘発が困難であるということを表わしている。免疫系がより応答傾向をもつ場合、抗ウイルス療法の時点で免疫化を始めることが有利であり得る。

【０２８６】

【表１】

表1:組換え型ワクシニアプラスミド及びウイルス

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

nt:ヌクレオチド;aa:アミノ酸;Kl:クレノウDNA Pol充填;T4:T4DNA Pol充填
位置:HCV ポリタンパク質配列内のアミノ酸の位置

【０２８７】

【表２】

表1-続き ： 組換え型ワクシニアプラスミド及びウイルス

プラスミド名	HCV cDNA サブクローン			挿入のために用いられるベクター
	名称	構成	長さ (nt/aa)	
pvHCV-81	E1*-GLY 1	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-82	E1*-GLY 2	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-83	E1*-GLY 3	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-84	E1*-GLY 4	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-85	E1*-GLY 5	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A
pvHCV-86	E1*-GLY 6	EcoRI - BamH I	783/262	pvHCV-10A

nt:ヌクレオチド;aa:アミノ酸;Kl:クレノウDNA Pol充填;T4:T4DNA Pol充填
位置:HCV ポリタンパク質配列内のアミノ酸の位置

【０２８８】

【表３】

表2:抗E1試験の要約

S/N ± SD（平均抗E1力価）

	治療の開始	治療の終り	追跡調査
LTR	6.94 ± 2.29 (1:3946)	4.48 ± 2.69 (1:568)	2.99 ± 2.69 (1:175)
NR	5.77 ± 3.77 (1:1607)	5.29 ± 3.99 (1:1060)	6.08 ± 3.73 (1:1978)

LTR: 1年を超える長期持続的応答
NR: 応答無し、再発を伴う応答、又は部分的応答

【０２８９】

【表４】

表3:競合研究用の合成ペプチド

タンパク質	ペプチド	アミノ酸配列	位置	配列番号
E1	E1-31	LLSCLTVPASAYQVRNSTGL	181-200	56
	E1-33	QVRNSTGLYHVTNDCPNSSI	193-212	57
	E1-35	NDCPNSSIVYEAHDAILHTP	205-224	58
	E1-35A	SNSSIVYEAADMIMHTPGCV	208-227	59
	E1-37	HDAILHTPGCVPCVREGNVS	217-236	60
	E1-39	CVREGNVSRCWVAMTPTVAT	229-248	61
	E1-41	AMTPTVATRDGKLPATQLRR	241-260	62
	E1-43	LPATQLRRHIDLLVGSATLC	253-272	63
	E1-45	LVGSATLCSALYVGDLCGSV	265-284	64
	E1-49	QLFTFSPRRHWTTQGCNCSI	289-308	65
	E1-51	TQGCNCSIYPGHITGHRMAW	301-320	66
	E1-53	ITGHRMAWDMMMNWSPTAAL	313-332	67
	E1-55	NWSPTAALVMAQLLRIPQAI	325-344	68
	E1-57	LLRIPQAILDMIAGAHWGVL	337-356	69
	E1-59	AGAHWGVLAGIAYFSMVGNM	349-368	70
	E1-63	VVLLLFAGVDAETIVSGGQA	373-392	71
E2	E2-67	SGLVSLFTPGAKQNIQLINT	397-416	72
	E2-69	QNIQLINTNGSWHINSTALN	409-428	73
	E2-$3B	LNCNESLNTGWWLAGLIYQHK	427-446	74
	E2-$1B	AGLIYQHKFNSSGCPERLAS	439-458	75
	E2-1B	GCPERLASCRPLTDFDQGWG	451-470	76
	E2-3B	TDFDQGWGPISYANGSGPDQ	463-482	77

【０２９０】

【表５】

表3-続き：競合研究用の合成ペプチド

E2-5B	ANGSGPDQRPYCWHYPPKPC	475-494	78
E2-7B	WHYPPKPCGIVPAKSVCGPV	487-506	79
E2-9B	AKSVCGPVYCFTPSPVVVGT	499-518	80
E2-11B	PSPVVVGTTDRSGAPTYSWG	511-530	81
E2-13B	GAPTYSWGENDTDVFVLNNT	523-542	82
E2-17B	GNWFGCTWMNSTGFTKVCGA	547-566	83
E2-19B	GFTKVCGAPPVCIGGAGNNT	559-578	84
E2-21	IGGAGNNTLHCPTDCFRKHP	571-590	85
E2-23	TDCFRKHPDATYSRCGSGPW	583-602	86
E2-25	SRCGSGPWITPRCLVDYPYR	595-614	87
E2-27	CLVDYPYRLWHYPCTINYTI	607-626	88
E2-29	PCTINYTIFKIRMYVGGVEH	619-638	89
E2-31	MYVGGVEHRLEAACNWTPGE	631-650	90
E2-33	ACNWTPGERCDLEDRDRSEL	643-662	91
E2-35	EDRDRSELSPLLLTTTQWQV	655-674	92

【０２９１】

表4.　経時的な外被抗体レベルの変化（完全研究、患者28名）

Wilcoxon Signed Rank検定(P値)	E1Ab NR	E1Ab NR 全	E1Ab NR	E1Ab LTR 1b型	E1Ab LTR 3a型	E1Ab LTR 全	E2Ab NR	E1Ab LTR		
								1b型	3a型	全
療法の終わり*	0.1167	0.2604	0.285		0.0058**	0.043**	0.0499**	0.0186**	0.0640	
6ヶ月の追跡調査*	0.86		0.7213	0.5930	0.0047**	0.043**	0.063		0.04326	0.0464**
12ヶ月の追跡調査*	0.7989	0.3105	1		0.0051**	0.0679	0.0277**	0.0869	0.0058**	

*　データは療法の開始時に得た値と比較された

** P値＜0.05

【表７】

表５．　ＬＴＲとＮＲの間の差異（完全研究）

Mann-Withney U 検定 (P 値)	E1Ab S/N 全	E1Ab titers 全	E1Ab S/N 1b 型 3a 型	E1Ab S/N 全	E2Ab S/N
療法の開始	0.0257*	0.05*	0.68	0.1078	
療法の終わり	0.1742			0.1295	
6ヶ月の追跡調査	1	0.6099	0.425	0.3081	
12ヶ月の追跡調査	0.67	0.23	0.4386	0.6629	

* Ｐ値＜0.05

【０２９３】

【表８】

表6:マウスE2モノクローナル抗体間の競合実験

ビオチニル化された抗E2 mabsの抗E2反応度の減少(%)

競合物質	17H10F4D10	2F10H10	16A6E7	10D3C4	4H6B2	17C2F2	9G3E6	12D11F1	15C8C1	8G10D1H9
17H10F4D10	-	62	10	ND	11	ND	5	6	30	ND
2F10H10	90	-	1	ND	30	ND	0	4	12	ND
16A6E7	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10D3C4	11	50	92	-	94	26	28	43	53	30
4H6B2	ND	ND	82	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
17C2F2	2	ND	75	ND	56	-	11	10	0	0
9G3E6	ND	ND	68	ND	11	ND	-	60	76	ND
12D11F1	ND	ND	26	ND	13	ND	ND	-	88	ND
15C8C1	ND	ND	18	ND	10	ND	ND	ND	-	ND
8G10D1H9	2	2	11	ND	15	ND	67	082	81	-
競合物質対照										
15B7A2	0	0	9	15	10	9	0	0	0	5
5H6A7	0	2	0	12	8	0	0	4	0	0
23C12H9	ND	ND	2	12	ND	4	ND	ND	ND	2

ND、実施せず

【０２９４】

【表９】

表7: プライマ

配列番号：96 GPT	5'-GTTTAACCACTGCATGATG-3'
配列番号：97 TK_R	5'-GTCCCATCGAGTGCGGCTAC-3'
配列番号：98 GLY1	5'-CGTGACATGGTACATTCCGGACACTTGGCGCACTTCATAAGCGGA-3'
配列番号：99 GLY2	5'-TGCCTCATACACAATGGAGCTCTGGGACGAGTCGTTCGTGAC-3'
配列番号：100 GLY3	5'-TACCCAGCAGCGGGAGCTCTGTTGCTCCCGAACGCAGGGCAC-3'
配列番号：101 GLY4	5'-TGTCGTGGTGGGGACGGAGGCCTGCCTAGCTGCGAGCGTGGG-3'
配列番号：102 GLY5	5'-CGTTATGTGGCCCGGGTAGATTGAGCACTGGCAGTCCTGCACCGTCTC-3'
配列番号：103 GLY6	5'-CAGGGCCGTTGTAGGCCTCCACTGCATCATCATATCCCAAGC-3'
配列番号：104 OVR1	5'-CCGGAATGTACCATGTCACGAACGAC-3'
配列番号：105 OVR2	5'-GCTCCATTGTGTATGAGGCAGCGG-3'
配列番号：106 OVR3	5'-GAGCTCCCGCTGCTGGGTAGCGC-3'
配列番号：107 OVR4	5'-CCTCCGTCCCCACCACGACAATACG-3'
配列番号：108 OVR5	5'-CTACCCGGGCCACATAACGGGTCACCG-3'
配列番号：109 OVR6	5'-GGAGGCCTACAACGGCCCTGGTGG-3'
配列番号：110 GPT-2	5'-TTCTATCGATTAAATAGAATTC -3'
配列番号：111 TK_R-2	5'-GCCATACGCTCACAGCCGATCCC-3'

下線付きヌクレオチドは付加的制限部位を表わす
ボールド体のヌクレオチドは、もとのHCC110A配列との関係における突然変異を表わす

【０２９５】

【０２９６】

表8:ELISAによるE1グリコシル化突然変異体の分析

血清

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SN GLY1	1.802462	2.120971	1.403871	1.205597	2.120191	2.866913	1.950345	1.866183	1.730193
SN GLY2	2.400795	1.76818	2.325495	2.639308	2.459019	5.043993	2.146302	1.595477	1.688973
SN GLY3	1.642718	1.715477	2.261646	2.354748	1.591818	4.833742	1.96692	1.482099	1.602222
SN GLY4	2.578154	3.824038	3.874605	1.499387	3.15	4.71302	4.198751	3.959542	3.710507
SN GLY5	2.482051	1.793761	2.409344	2.627358	1.715311	4.964765	2.13912	1.576336	1.708937
SN GLY6	2.031487	1.495737	2.131613	2.527925	2.494833	4.784027	2.02069	1.496489	1.704976
SN E1	2.828205	2.227036	2.512792	2.790881	3.131579	4.869128	2.287753	1.954198	1.805556

	10	11	12	13	14	15	16	17	18
SN GLY1	2.468162	1.220654	1.629403	5.685561	3.233604	3.763498	1.985105	2.317721	6.675179
SN GLY2	2.482212	1.467582	2.070524	7.556682	2.567613	3.621928	3.055649	2.933792	7.65433
SN GLY3	2.191558	1.464216	1.721164	7.930538	2.763055	3.016099	2.945628	2.515305	5.775357
SN GLY4	5.170841	4.250784	3.955153	8.176816	6.561122	5.707668	5.684498	5.604813	6.4125
SN GLY5	3.021807	1.562092	2.07278	8.883408	2.940334	3.125561	3.338912	2.654224	5.424107
SN GLY6	2.677757	1.529608	1.744221	8.005561	2.499952	2.621704	2.572385	2.363301	5.194107
SN E1	2.616822	1.55719	2.593886	8.825112	3.183771	3.067265	3.280335	2.980354	7.191964

							合計	平均
	19	20	21	22	23	24	S/N	S/N
SN GLY1	1.93476	2.47171	4.378633	1.188748	2.158889	1.706992	59.88534	2.495223
SN GLY2	2.127712	2.921288	4.680101	1.150781	1.661914	1.632785	69.65243	2.902185
SN GLY3	1.980185	2.557384	4.268633	0.97767	1.336775	1.20376	62.09872	2.587447
SN GLY4	3.813321	3.002535	4.293038	2.393011	3.68213	2.481585	102.6978	4.279076
SN GLY5	2.442804	3.126761	4.64557	1.153656	1.817901	1.638211	69.26511	2.886046
SN GLY6	1.506716	2.665433	2.781063	1.280743	1.475062	1.716423	61.32181	2.555075
SN E1	2.771218	3.678068	5.35443	1.167286	2.083333	1.78252	76.54068	3.189195

表8:ELISAによるE1グリコシル化突然変異体の分析(続き)

血清

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GLY1/E1	0.637316	0.952374	0.55869	0.431977	0.677036	0.588794	0.852516	0.954961	0.958261
GLY2/E1	0.848876	0.793961	0.925463	0.94569	0.785233	1.035913	0.93817	0.816436	0.935431
GLY3/E1	0.580834	0.770296	0.900053	0.84373	0.508312	0.992733	0.859761	0.758418	0.887385
GLY4/E1	0.911587	1.717097	1.541952	0.537245	1.005882	0.967939	1.835317	2.026172	2.05505
GLY5/E1	0.877607	0.805447	0.958831	0.941408	0.547746	1.019642	0.935031	0.806641	0.946488
GLY6/E1	0.718296	0.671626	0.848305	0.90578	0.796669	0.982522	0.883264	0.765781	0.944294

	10	11	12	13	14	15	16	17	18
GLY1/E1	0.94319	0.783882	0.628171	0.644248	1.015652	1.226988	0.605153	0.777666	0.928144
GLY2/E1	0.94856	0.942455	0.798232	0.85627	0.806469	1.180833	0.931505	0.984377	1.064289
GLY3/E1	0.837488	0.940294	0.663547	0.898633	0.867856	0.983319	0.897966	0.843962	0.803029
GLY4/E1	1.976	2.72978	1.524798	0.92654	2.060802	1.860833	1.732902	1.880587	0.89162
GLY5/E1	1.154762	1.003148	0.799102	1.006606	0.923538	1.019006	1.017857	0.890574	0.75419
GLY6/E1	1.023286	0.982288	0.672435	0.907134	0.785217	0.854737	0.784184	0.79296	0.72221

						合計	平均	
	19	20	21	22	23	24	E1/GLY#	E1/GLY#
GLY1/E1	0.698162	0.672013	0.817759	1.018386	1.036267	0.957628	19.36524	0.806885
GLY2/E1	0.76779	0.794245	0.874061	0.98586	0.797719	0.915998	21.67384	0.903077
GLY3/E1	0.714554	0.695306	0.797215	0.837558	0.641652	0.675314	19.19921	0.799967
GLY4/E1	1.376045	0.816335	0.801773	2.050064	1.767422	1.392178	36.38592	1.51608
GLY5/E1	0.881491	0.850109	0.867612	0.988323	0.872593	0.919042	21.78679	0.907783
GLY6/E1	0.543702	0.724683	0.519395	1.097197	0.70803	0.962919	19.59691	0.816538

【表１２】

表9:Balb/cマウス内のアジュバント入りE1のプロフィール

	ミョウバン	T細胞アジュバント	RBI
抗体力価 (平均±SD,n=6)	96000 ± 101000	62000 ± 60000	176000 ± 149000
抗体イソタイプ	IgG1	IgG1/2b	IgG1/2a
脾臓におけるT細胞増殖[1] (n=3)	11750 (2/3)	48300 (3/3)	26000 (3/3)
リンパ節内のT細胞増殖[2]	特異的刺激無し	4000	8000
サイトカインプロフィール (脾臓)	Il-4	IFN-g/Il-4	IFN-g/Il-4

[1] 3回の皮下/筋肉免疫化の後、3匹の無作為選択したマウスを個別に分析した。結果は、4日間のE1刺激(1μg/ml)の後に得られた平均特異的cpmとして表現されており、カッコ内の数字は、背景より上の特異的刺激を伴うマウスの数を意味する

[2] 1回の単一フットパス免疫化(n=2)の後、結果は5日間のE1刺激(1μg/ml)後に得られた平均比cpmとして表現されている

【０２９８】

【表１３】

表10:体液性応答:異なるE−1抗体レベルについて必要とされる免疫化回数

動物l	状態	血清変換[1]	> 1 U/ml[2]	> 10 U/ml
Marcel	慢性	3	4	5
Peggy	慢性	3	5	>12
Femma	慢性	4	5	>12
Yoran	ナイーブ	3	4	5
Marti	ナイーブ	2	3	5

[1] 免疫化に先立ってE1−抗体が全く存在しなかった場合のカットオフレベルより高いELISAシグナルとして定義づけされたもの、その他のケースでは、免疫化前の力価の3つの個別の時点より高い力価の観察が、血清変換点とみなされた

[2] 単位は以下のように定義づけされている:すなわち、遺伝子型1bに感染したインタフェロン療法に先立つヒト慢性キャリヤにおけるE1抗体のレベルは、患者の50%について0.1U/ml未満であり、患者の25%について0.1〜1U/mlの間であり、患者の残りの25%において1U/mlを上回っている、n=58

【０２９９】

実施例１２：ＨＣＶ亜型Ｉｂに慢性的に感染したチンパンジーの免疫化

すでに１３年にわたり（免疫化まで５０１５日）ＨＣＶ亜型Ｉｂ菌株に感染していたチンパンジー（Ｐｈｉｌ）に、アミノ酸レベルで９５．１％の同一性をもつ（本書にその全体が参考として包含されている国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの表２も参照のこと）遺伝子型１ｂの異なる菌株に由来しかつ国際公開第９９／９７２８５号パンフレットの実施例１－３に記載されている通りに調製されたＥ１（ａａ１９２～３２６）をワクチン接種した。メーカーのプロトコル（モンタナ州ハミルトンのＲｉｋｉ　Ｉｎｃ．）に従って、ＲＩＢＩ　Ｒ－７３０（ＭＰＬＡ＋ＴＤＭ＋ＣＷＳ）と混合した各々５０μｇのＰＢＳ／０．０５％ＣＨＡＰＳ中のＥ１の合計６回の免疫化をチンパンジーに施した。６回の免疫化は、３週間の間隔で３回の注射から成る２セットで与えられ、２セット間に６週間の遅滞期間をおいた。免疫化の１５０日前に開始して、免疫化期間中そして免疫化後１年まで（以下及び国際公開第９９／６７２８５号パンフレットを参照のこと）、チンパンジーを、ＨＣＶ誘発疾患の活性を表わすさまざまなパラメータについて連続的に監視した。これらのパラメータには、血液化学、ＡＬＴ、ＡＳＴ、ガンマＧＴ、血液化学、血清中のウイルス量、肝臓中のウイルス量及び肝臓組織学が含まれていた。さらに、免疫化に対する免疫応答を、体液性及び細胞性の両方のレベルで監視した。この期間中、挙動変化、臨床的症候、体重、体温及び局所的反応（赤み、膨れ、硬結）といったような免疫化のあらゆる不利な効果についても、動物を監視した。このような効果は検出されなかった。

【０３００】

明らかに、ＡＬＴ（そして特にガンマＧＴ、データは図示せず）レベルは、Ｅ１に対する抗体レベルがその最大値に達した時点で直ちに減少した（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図８参照）。ＡＬＴは、抗体レベルが低下し始めると直ちにむしろ急激

にぶり返したが、ガンマＧＴは抗－Ｅ１が検出可能な状態にとどまっているかぎり、より低いレベルにとどまった。

【０３０１】

肝臓内のＥ２抗原は、抗－Ｅ１が検出可能である期間中ほぼ検出できないレベルまで減少し、Ｅ２抗原はこれらの抗体の消滅後すぐにぶり返した。コア及びＥ２抗原が肝臓内で検出できなくなったのと同時に、肝臓の炎症は、著しく低減した（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの表３も参照のこと）。これは、おそらくは少なくとも部分的にウイルス抗原をその主要な標的器官つまり肝臓から一掃することによって肝臓の損傷の減少をワクチンが誘発するということの主たる証拠である。

【０３０２】

Ａｍｐｌｉｃｏｒ　ＨＣＶモニター（スイス、バーゼルのＲｏｃｈｅ）により測定された通りのウイルス血症レベルは、全研究期間中血清内でほぼ不変にとどまった。

【０３０３】

体液性応答をさらに詳細に分析すると、最大終末点力価が（６番目の免疫化の後）１４．５×10^3に達したこと及びこの力価が免疫化から１年後に検出できないレベルまで降下したこと（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図８）が明らかになった。国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図９は、Ｂ細胞により認識されたペプチドにより模倣されうる主要エピトープが、Ｅ２のＮ末端領域に位置特定されていることを示している（ペプチドＶＩＶ２及びＶ２Ｖ３、使用されるペプチドについての詳細は、国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの表４を参照のこと）。組換え型Ｅ１に対する反応性はより高くより長く持続するものであることから、この図から、これらのペプチドを認識する抗体がＥ１に対する全抗体集会の１部分のみを表わすものであるということを演繹することもできる。残りの部分は、ペプチドにより模倣され得ないエピトープ、すなわち不連続エピトープに対し向けられている。このようなエピトープは、完全Ｅ１分子上のみに存在するかさらには粒子様構造上のみに存在している。Ｅ１に対するこのような応答は、少なくともその自然の感染経過において抗－Ｅ１抗体を発生させる、ヒト慢性ＨＣＶキャリヤ（Ｍａｅｒｔｅｎｓら、．に対する国際公開第９６／１３５９０号パンフレット）内及びチンパンジー（ｖａｎ　Ｄｏｏｒｎら、１９９６年）において通常見られるものに比べて、独特のものである。これらの患者においては、抗－Ｅ１はその一部分が、不連続エピトープに対しても向けられるが、大部分はＣ４エピトープに対して向けられ（患者血清の±５０％）、わずかな割合が（遺伝子型に応じて２～７０％の範囲内）Ｖ１Ｖ２に対し向けられ、Ｖ２Ｖ３に対する反応性は例外的に記録されたにすぎない（Ｍａｅｒｔｅｎｓら、１９９７年）。

【０３０４】

Ｔ細胞の反応性の分析は、これらのＴ細胞の刺激指数が１から２．５まで上昇し、追跡調査期間中幾分か高い状態にとどまることから、免疫系のこの区画も又ワクチンにより特異的に刺激されるということを示した（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図１０）。インターフェロン療法に対する長期応答者においてしか見られないのは、このＴ細胞反応性である（Ｌｅｒｏｕｘ－Ｒｏｅｌｓら、．に対するＰＣＴ／ＥＰ９４／０３５５５；Ｌｅｒｏｕｘ－Ｒｏｅｌｓら、１９９６年を参照のこと）。

【０３０５】

実施例１３：異なる亜型での慢性ＨＣＶキャリヤの免疫化

すでに１０年にわたり（免疫化まで３８０９日）ＧＮ型Ｉａに由来するＨＣＶに感染していたチンパンジー（Ｔｏｎ）に、アミノ酸レベルで７９．３％の同一性しかもたず（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの表２も参照のこと）、かつ国際公開第９９／９７２８５号パンフレットに記載されている通りに調製されたＧＮ型１ｂ由来のＥ１をワクチン接種した。メーカーのプロトコル（モンタナ州ハミルトンのＲｉｋｉ　Ｉｎｃ．）に従って、ＲＩＢＩ　Ｒ－７３０と各々混合した５０μｇのＰＢＳ／０．０５％ＣＨＡＰＳ中のＥ１の合計６回の筋肉免疫化をチンパンジーに施した。６回の免疫化は、３週間の間隔をおいた３回注射から成る２セットで行われ、セット間に４週間の遅滞期間をおいた

。免疫化の２５０日前に開始して、免疫化期間中そして免疫化後９ヶ月まで（以下及び国際公開第９９／６７２８５号パンフレットを参照のこと）、チンパンジーを、ＨＣＶ誘発疾患の活性を表わすさまざまなパラメータについて連続的に監視した。これらのパラメータには、血液化学、ＡＬＴ、ＡＳＴ、ガンマＧＴ、血清中のウイルス量、肝臓中のウイルス量及び肝臓組織学が含まれていた。さらに、免疫化に対する免疫応答を、体液性及び細胞の両方のレベルで監視した。この期間中、挙動変化、臨床的症候、体重、体温及び局所的反応（赤み、膨れ、硬結）といったような免疫化のあらゆる不利な効果についても、動物を監視した。このような効果は検出されなかった。

【０３０６】

明らかに、ＡＬＴレベル（そしてガンマＧＴ、データは図示せず）は、Ｅ１に対する抗体レベルがその最大値に達した時点で直ちに減少した（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図１１参照）。ＡＬＴ及びガンマＧＴは、抗体レベルが低下し始めると直ちにむしろ急激にぶり返したが、ＡＴＬとガンマＧＴは全追跡調査期間中、より低いレベルにとどまった。ＡＬＴレベルは、ワクチン接種前の期間（８５±１１Ｕ／ｌ）と比べてワクチン接種後に著しくとさえ言えるほどに低減した（６２±６Ｕ／ｌ）。血清中で回収された組織損傷マーカーは比較的少ないものであったため、これらの発見事実は、該ワクチン接種が肝疾患の改善を誘発したことの最初の表れであった。

【０３０７】

Ｅ２抗原レベルは、抗－Ｅ１が１．０×１０^{3}の力価より高くとどまった期間において検出不能となったが、より低いＥ１抗体レベルの時点で再び検出可能になった。ＨＣＶ抗原の消滅と合わせて、肝臓の炎症は、穏やかな慢性活性肝炎から最小限の慢性持続性肝炎形態へと顕著な形で減少した（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの表３）。これは、おそらくは少なくとも部分的にウイルスをその主要な標的器官つまり肝臓から一掃することによって肝臓の損傷の減少をワクチンが誘発するということのもう１つの主たる証拠である。

【０３０８】

血清中のＡｍｐｌｉｃｏｒ　ＨＣＶモニター（Ｒｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）により測定された通りのウイルス血症レベルは、全研究期間中ほぼ類似のレベルにとどまった。体液性応答をさらに詳細に分析すると、達成された最大終末点力価が（６番目の免疫化の後）３０×１０^{3}であったこと及びこの力価が免疫化から９ヶ月後に０．５×１０^{3}まで降下したこと（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図１１）が明らかになった。国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図１２は、ペプチドにより模倣され得、Ｂ細胞により認識された主要エピトープが、Ｎ末端領域に位置特定されていることを示している（ペプチドＶ１Ｖ２及びＶ２Ｖ３、使用されるペプチドについての詳細は、国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの表４を参照のこと）。組換え型Ｅ１に対する反応性はより高くより長く持続するものであることから、この図から、これらのペプチドを認識する抗体がＥ１に対する全抗体集会の１部分のみを表わすものであるということを演繹することもできる。残りの部分は、ペプチドにより模倣され得ないエピトープ、すなわち不連続エピトープに対し向けられる確率が高い。このようなエピトープは、おそらくは完全Ｅ１分子上のみに存在するかさらには粒子様構造上のみに存在している。Ｅ１に対するこのような応答は、少なくとも検出可能な抗－Ｅ１を有する、ヒト慢性ＨＣＶキャリヤにおいて通常見られるものに比べて、独特のものである。これらの患者においては、抗－Ｅ１はその一部分が、同様に不連続であるものの、大部分はＣ４エピトープに対して向けられ（患者血清の５０％）、わずかな割合が（遺伝子型に応じて２～７０％の範囲内）Ｖ１Ｖ２に対し向けられ、例外的にＶ２Ｖ３に対する反応性が記録された（Ｍａｅｒｔｅｎｓら、１９９７年）。このチンパンジーは１ａ分離株に感染していることから、抗体応答は、Ｅ１－１ａ抗原に対する交差反応性についても評価された。国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図１３を見ればわかるように、このような交差反応性抗体が実際に生成されるものの、これらは全抗体集団の一部分を形成しているにすぎない。注目に値するのは、肝臓内のウイルス抗原の再出現と血清中の検出可能な抗１ａＥ

１抗体の消滅の相関関係である。

【０３０９】

Ｔ細胞の反応性の分析は、これらのＴ細胞の刺激指数が０．５から５まで上昇し、追跡調査期間中高い状態にとどまることから、免疫系のこの区画も又ワクチンにより特異的に刺激されるということを示した（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図１４）。

【０３１０】

実施例１４：Ｅ１でのＨＣＶ慢性キャリヤの再追加抗原投与

実施例１２及び１３で観察された通りのＥ１抗体力価は安定せず、１ｂ感染したチンパンジーに対してさえ経時的に低下したことから、この抗体応答を付加的追加抗原投与により再び増大させることができるか否かが調査された。両方のチンパンジーを、３週間の間隔を置いて３回の連続的筋内免疫化によって再度免疫化した（ＲＩＢＩアジュバントと混合した５０μｇのＥ１）。国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図８及び１１から判断できるように、抗－Ｅ１応答を実際に追加抗原投与により促進することができ、再び肝臓内のウイルス抗原は検出限界より下に減少した。それでも血清中のウイルス量は、Ｔｏｎにおいて一定にとどまった（国際公開第９９／６７２８５号パンフレットの図１１）。１ｍｌあたりの10^5未満のゲノム当量というウイルス血症レベルが、追跡調査期間中に初めて測定された。

【０３１１】

注目に値するのは、第１セットの免疫化についてすでにそうであったように、１ｂ亜型ＨＣＶ菌株に感染したチンパンジー（Ｐｈｉｌ）が、１ａ亜型ＨＣＶ菌株に感染したチンパンジーに比べて低い抗－Ｅ１力価で応答するという発見事実である（第１回目の最大力価はＴｏｎについて30×10^3であるのに対し14.5×10^3、さらなる追加抗原投与の後ではＴｏｎについて40×10^3であるのに対しＰｈｉｌについてはわずか1.2×10^3）。両方の動物について有益な効果は類似していると思われるが、この実験から、もう１つの亜型又は遺伝子型に由来するＥ１タンパク質での慢性キャリヤの免疫化が、恐らくは宿主内に存在し感染性亜型又は遺伝子型により誘発された予め存在する特異的な免疫抑制を回避して、より高い力価に達するのに特に有益であるかもしれない、という結論を下すことができた。代替的には、相同性環境（１ｂワクチン＋１ｂ感染）内で見られたより低い力価は、ウイルスに対する大量の抗体の結合を示している可能性がある。従って、誘発された抗体は、中和能力を有する可能性がある。

【０３１２】

実施例１５：チンパンジーにおけるＥ１－ワクチン接種の予防的有用性の実証

組換え型ワクシニアウイルスＨＣＶ１１Ｂを用いてＨＣＶ　Ｅｌｓタンパク質（アミノ酸１９２～３２６）を、ベロタンパク質内で発現させた。このワクシニアウイルスは基本的に（本書にその全ての内容が参考として包含されている米国特許第６，１５０，１３４号に記載されているような）ｖｖＨＣＶ１１Ａと同一であるが、ＲＫ１３からベロタンパク質へと継代された。（レンチルクロマトグラフィ、還元－アルキル化及びサイズ排除クロマトグラフィを用いて）、基本的にＰＣＴ／Ｅ９９／０４３４２（国際公開第９９／６７２８５号パンフレット）の実施例９に記載されているように、システインのためのアルキル化剤としてヨードアセタミドを使用して、タンパク質を精製した。３％のエンピゲン－ＢＢをＰＣＴ／Ｅ９９／０４３４２の実施例１に記載されているようにサイズ排除クロマトグラフィによって３％のベタインに交換した後、このプロセスにより、Ｅｌｓを１つの粒子として回収できるようにする。最終的に、ＰＢＳが０．５％のベタインを含有しＥｌｓ濃度が５００μｍ／ｍｌとなるまで、材料を脱塩した。このＥ１を等体積のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌ　１．３％（デンマークのＳｕｐｅｒｆｏｓ）と混合し、最終的に０．９％のＮａＣｌ８体積でさらに希釈して、０．１３％のＡｄｈｙｄｒｏｇｅｌ及び５０μｇＥｌ／ｍｌの濃度でミョウバンをアジュバントとするＥ１を生み出した。

【０３１３】

野生型ワクシニアウイルス及びＰＣＴ／Ｅ９９／０４３４２の実施例８で記載されたｐ

ｖＨＣＶ－１０１から組換えられた組換え型ワクシニアウイルスＨＣＶ１０１を用いて基本的にＥ１について記載されている通りに、ＨＣＶ　Ｅ２デルタＨＶＲＩ（アミノ酸４１２～７１５）をベロの中で発現させそこから精製した。同様に、Ｅ２デルタＨＶＲＩは、エンピゲンからベタインへの免疫の後、（動的光散乱により測定される）１つの粒子として挙動する。

【０３１４】

ＨＣＶ－ＲＮＡ及びＨＣＶ－抗体についてテストで陰性となった５匹のチンパンジーを選択した。そのうちの一匹（Ｈｕｕｂ）は、免疫化されず、２匹は、ミョウバンをアジュバントとした５０μｇのＥ１で６回の免疫化を受け（Ｍａｒｔｉ及びＹｏｒａｎ）、一方残りの２匹は、ミョウバンをアジュバントとして５０μｇのＥ２デルタＨＶＲＩで６回の免疫化を受けた。全ての免疫化は、３週間の間隔をおいて筋内投与された。動物を免疫化した抗原に対する体液性及び細胞性免疫応答を、各動物において査定し、各々の動物において表１１に示されるように両方のタイプの応答が検出された。

【０３１５】

全てのチンパンジーが、抗原投与後７日目にＨＣＶ－ＲＮＡ陽性となり（スイス、バーゼルのＲｏｃｈｅ社のモニターＨＣＶで決定）、最初のＡＬＴ及びガンマＧＴピークは３５日目と６３日目の間で測定された。このことは、全てのチンパンジーが急性肝炎を発生させたということを明示している。注目すべきことに、Ｅ１で免疫化された両方の動物はその感染を消散させたのに対し、Ｅ２デルタＨＶＲＩ及び制御動物は消散させなかった。このことは、Ｅ１で免疫化された動物が９８日目（Ｙｏｒａｎ）及び１３３日目（Ｍａｒｔｉ）にＨＣＶ－ＲＮＡを失ない（スイス、バーゼルのＲｏｃｈｅ社のモニターＨＣＶで決定）、これまでのところ毎月の試験で２７３日目まで陰性にとどまった。その他の動物は全て、今までのところ、Ｅ１で免疫化されたチンパンジーに関してＡＬＴ及びガンマＧＴ値が正常に戻らない状態で２７３日の追跡調査期間全体にわたりＲＮＡ陽性にとどまった。

【０３１６】

表１１

６回目の免疫化から２週間後にＥＬＩＳＡにより抗体力価を決定した。標本の階段希釈を、社内規準と比較した（１０００ｍＵ／ｍｌのＥ１又は抗－Ｅ２デルタＨＶＲＩ抗体をもつものとして定義されているこの社内規準は、高い抗外被力価に基づいて選択されたＨＣＶ慢性キャリヤからの３つの血清の混合物である）。細胞性免疫応答を反映する刺激指数は、外被抗原の存在下又は不在下で第３の免疫化から２週間後に動物から抜取られたＰＢＭＣを培養し、５日間の培養後１８時間のパルス中にこれらの細胞内に取込まれたトリチウム標識チミジンの量を決定することによって得られた。刺激指数というのは、外被抗原と共に培養された細胞内に取込まれたチミジン対抗原無しで培養されたものの比率である。３を上回る刺激指数が、陽性信号であるとみなされる。

【０３１７】

【表１４】

チンパンジー	抗E1応答		抗E2デルタHVRI応答	
	抗体力価	刺激指数	抗体力価	刺激指数
Yoran	14110	10.9		
Marti	5630	14.2		
Joost			3210	8.5
Karlien			1770	11.2

【０３１８】
６回のうちの最後免疫化から３週間後、対照を含む全ての動物に、遺伝子型１ｂ接種材料１００ＣＩＤ（チンパンジー感染用量）（メリーランド州ベテスダのＪ．Ｂｕｋｈ博士より提供して頂いたもの）で抗原投与した。ワクチンタンパク質とＪ４．９１分離株（その配列情報は受入れ番号ＢＡＡ０１５８３で入手可能）の間のアミノ酸配列の相違は、Ｅｌｓについては７％（１３５個のうち９個のアミノ酸）であり、Ｅ２デルタＨＶＲＩについては１１％（３０４個のうち３２個のアミノ酸）である。従って、この抗原投与は、異種とみなされ、現実の抗原投与を反映している。
【０３１９】
結論として、我々は、ＨＣＶに関連する大きな健康上の問題である慢性感染に至るまでの進行を防ぐことによって、Ｅ１免疫化がＨＣＶ感染の変遷を変えるということを示してきた。
【０３２０】
実施例１６：チンパンジーにおける感染の一掃を可能にした類似のＥ１応答を、ヒトで誘発させることができる。
ヒトにおいてＥ１の免疫化の予防的効果を得るためには、チンパンジーに比べて類似の免疫応答がヒトにおいて誘発できることが必要とされる。従って我々は、抗－Ｅ１応答（体液性又は細胞）が全く検出できなかった２０人の男性志願者に、０．５ｍｌ中０．１３％のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌで処方された２０μｇのＥｌｓの３用量をワクチン接種した。全ての免疫化は、３週間の間隔をおいて筋内投与した。表１２に明示されているように、２０人の志願者のうち１７人は実際に、Ｅ１に対し有意な体液性及び細胞性免疫応答を起こし、しかも重大な不利な事象は発生しなかった。１人の志願者（対象０２１）だけは、体液性応答も細胞応答も３回のＥ１免疫化の後カットオフレベルより高くなかったことから、非応答者としてみなさなくてはならなかった。体液性応答がチンパンジーに比べ低いという観察事実は、２０μｇでの３回の免疫化のみが投与され５０μｇで６回投与されたのではないという事実に関係している。
【０３２１】
表１２
３回目の免疫化から２週間後にＥＬＩＳＡにより抗体力価を決定した。標本の階段希釈を、社内規準と比較した（１０００ｍＵ／ｍｌのＥ１又は抗－Ｅ２デルタＨＶＲＩ抗体をもつものとして定義されているこの社内規準は、高い抗外被力価に基づいて選択されたＨＣＶ慢性キャリヤからの３つの血清の混合物である）。刺激指数（細胞性免疫応答）は、１μｇのＥ１の存在下又は不在下で第３の免疫化から２週間後に固体から抜取られたＰＢＭＣを培養し、５日間の培養後１８時間のパルス中にこれらの細胞内に取込まれたトリチウム標識チミジンの量を決定することによって得られた。刺激指数というのは、外被抗原と共に培養された細胞内に取込まれたチミジン対抗原無しで培養されたものの比率である

。３を上回る刺激指数が、陽性信号であるとみなされる。

【０３２２】

【表１５】

対象番号	抗体力価	刺激指数	対象番号	抗体力価	刺激指数
002	1370	30.9	014	49	4.6
003	717	13.2	015	228	3.8
004	800	9.1	016	324	4.1
007	680	3.8	017	<20*	6.2
008	1026	3.9	018	<20	6.7
009	325	4.6	019	624	3.1
010	898	7.7	020	84	5.5
011	284	4.1	021	<20	2.1
012	181	3.6	022	226	2.7
013	<20	3.5	023	163	7.6

*** この固体は、予備免疫標本と3回の免疫化の後の標本の間には有意なELISAシグナル増加が見られたことから、免疫化後この個体は抗E1陽性とみなされるが、力価は非常に低く、精確な決定を可能にするものではない**

【０３２３】

実施例１７：ワクチン接種を受けた健康な志願者におけるＥ１応答の追加抗原投与

実施例１６の２０人のヒトの志願者のうち１９人に再び、２６週目で（すなわち３回目の免疫化の２０週後）０．５ｍｌ中の０．１３％のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌに基づいて処方された２０μｇのＥｌｓを追加抗原投与した。この付加的な免疫化から２週間後に再び抗体力価及び細胞性免疫応答を決定した。全ての個体において、２０週間の間隔の間に抗体力価は減少したが、この付加的な免疫化により、８週目に見られたもの以上のレベルまで容易に引上げることができた。平均して、抗体力価は、８週目の力価に比べこの追加抗原投与後２倍高く、又２６週目の力価に比べて７倍高いものであった（表１３）。

【０３２４】

注目すべきことに、Ｔ細胞応答は、大部分の個体について２０週の間隔後なおも高いものであった。以前のワクチン接種の結果として大部分の個体において存在する破傷風応答への正規化を考慮に入れると、刺激指数の幾何学平均にはいかなる変化もない。付加的な追加抗原投与の後、破傷風応答への正規化を考慮に入れると、いかなる変化も見られない（図５１）。このことは、強いＴヘルプ応答が３Ｅ１の免疫化の後に誘発されたということを確認しており、又、これらの免疫化が少なくとも６ヶ月の期間中はさらなる追加抗原投与を全く必要としない非常に優れたＴヘルプメモリーをすでに誘発したことを表わしている。

【０３２５】

表１３

３回目の免疫化から２週間（＝８週目）、及び２０週間後（＝２６週目）そして最終的に追加抗原投与から２週間後(＝２８週目)にも、ＥＬＩＳＡにより抗体力価を決定した。標本の階段希釈を、社内規準と比較した（１０００ｍＵ／ｍｌのＥ１抗体をもつものとし

て定義されているこの社内規準は、高い抗外被力価に基づいて選択されたＨＣＶ慢性キャリヤからの３つの血清の混合物である）。正確な比較のため、８週目での力価の決定を２６及び２８週目の標本の場合と同じ検定内で反復したが、このことが実施例１６の表１２との差異を説明している。

【０３２６】

【表１６】

対象番号	抗体力価		
	8 週	26 週	28 週
002	1471	443	3119
003	963	95	2355
004	1006	409	2043
007	630	65	541
008	926	81	819
009	704	77	269
010	1296	657	3773
011	253	65	368
012	254	148	760
013	36	<20	166
014	53	40	123
016	159	45	231
017	109	39	568
018	43	23	50
019	425	157	1894
020	73	33	113
021	25	<20	26
022	280	150	357
024	177	81	184
平均	**467**	**138**	**936**

【０３２７】

図５１の説明：刺激指数（細胞性免疫応答）は、３μｇの組換え型Ｅ１ｓ又は２μｇの破傷風トキソイドの存在下又は不在下で、免疫化前（０週目）、三回目の免疫化の２週間後（８週目）、追加抗原免疫化（２６週目）及び追加抗原免疫化の２週間後（２８週目）に個体から抜取られたＰＢＭＣ（10^5 個の細胞）を培養し、５日間の培養後の１８時間

のパルス中のこれらの細胞内に取込まれたトリチウム標識チミジンの量を決定することによって得られた。刺激指数というのは、外被抗原と共に培養された細胞内に取込まれたチミジンと抗原無しで培養されたものとの比率である。０週目と８週目の標本は、１回目の検定（Ａ）で決定され、一方２６週目と２８週目の標本は、０週目の標本が再度分析された第２の検定（Ｂ）において決定された。結果は、全２０人（Ａ．実験）又は１９人（Ｂ．実験）の志願者の幾何平均刺激指数として表わされている。

【０３２８】

さらに、Ｔｈ１サイトカインインターフェロンガンマ及びＴｈ２サイトカインインタロイキン－５は、２６週目と２８週目で取上げられＥ１で再刺激された標本のＰＢＭＣ培養の上清中で測定した。図５２から判断できるように、Ｅ１で刺激されたＰＢＭＣにより分泌された優勢なサイトカインはインターフェロンガンマである。強いＴｈ１でバイアスされた応答がミョウバンをアジュバントとするＥ１で見られたということは、ミョウバンがＴｈ２誘発物質として知られていることからきわめて驚くべきことである。ここでも又、結果は、最終的追加抗原投与（２６週目）の前にすでに非常に強い応答が見られていることから優れたＴ細胞メモリー応答が誘発されることを確認するものである。付加的な実験において、０週目に抜取られた標本を用いたこれらの志願者の刺激を受けていない細胞培養とＥ１刺激を受けた細胞培養の間にはインターフェロンガンマ分泌の差異が全く見られなかったことから、インターフェロンガンマ分泌は特異的であることが発見された。

【０３２９】

図５２の説明：追加抗原免疫化（２６週目）の前及び追加抗原免疫化の２週間後（２８週目）に個体から抜取られたＰＢＭＣ（10^5個の細胞）を、３μｇの組換え型Ｅ１ｓ（Ｅ１）又は２μｇの破傷風（ＴＴ）の存在下で又は抗原の全くない状態で（Ｂ１）培養した。２４時間後（インタロイキン－５）又は１２０時間後（インターフェロンガンマ）にＥＬＩＳＡを用いて取った上清の中で、サイトカインを測定した。刺激指数は、外被抗原と共に培養された細胞の上清内と抗原無しで培養されたものの上清内で測定したサイトカインとの比率である。結果は、１９人の志願者すべてが分泌したｐｇサイトカイン／ｍｌの幾何平均として表現されている。検出限界より低いサイトカイン量をもつ標本には、検出限界の値が割当てられた。同様にして、検定の線形範囲の外のきわめて高いサイトカイン濃度をもつ標本には、検定の線形範囲の限界の値が割当てられた。

【０３３０】

実施例１８：ワクチン接種を受けた健康な志願者におけるＥ１に対する細胞応答のマッピング

Ｅ１特異的応答をマッピングするために、Ｅ１ｓの全配列を網羅し、８アミノ酸の重複を伴って、標準的Ｆｍｏｃ化学を用いて、一連の２０量体ペプチドを合成した。遊離アミノ末端をもつＩＧＰ１６２６を除いて、全てのペプチドはＣ末端アミド化され、Ｎ末端アセチル化された。

【０３３１】

ＩＧＰ１６２６：ＹＥＶＲＮＶＳＧＩＹＨＶＴＮＤＣＳＮＳＳ（アミノ酸１９２－２１１）（配列番号１１２）

ＩＧＰ１６２７：ＴＮＤＣＳＮＳＳＩＶＹＥＡＡＤＭＩＭＨＴ（アミノ酸２０４－２２３）（配列番号１１３）

ＩＧＰ１６２８：ＡＡＤＭＩＭＨＴＰＧＣＶＰＣＶＲＥＮＮＳ（アミノ酸２１６－２３５）（配列番号１１４）

ＩＧＰ１６２９：ＰＣＶＲＥＮＮＳＳＲＣＷＶＡＬＴＰＴＬＡ（アミノ酸２２８－２４７）（配列番号１１５）

ＩＧＰ１６３０：ＶＡＬＴＰＴＬＡＡＲＮＡＳＶＰＴＴＴＩＲ（アミノ酸２４０－２５９）（配列番号１１６）

ＩＧＰ１６３１：ＳＶＰＴＴＴＩＲＲＨＶＤＬＬＶＧＡＡＡＦ（アミノ酸２５２－２７１）（配列番号１１７）

ＩＧＰ１６３２：ＬＬＶＧＡＡＡＦＣＳＡＭＹＶＧＤＬＣＧＳ（アミノ酸２６４－２８３

）（配列番号１１８）
ＩＧＰ１６３３：ＹＶＧＤＬＣＧＳＶＦＬＶＳＱＬＦＴＩＳＰ（アミノ酸２７６－２９５）（配列番号１１９）
ＩＧＰ１６３４：ＳＱＬＦＴＩＳＰＲＲＨＥＴＶＱＤＣＮＣＳ（アミノ酸２８８－３０７）（配列番号１２０）
ＩＧＰ１６３５：ＴＶＱＤＣＮＣＳＩＹＰＧＨＩＴＧＨＲＭＡ（アミノ酸３００－３１９）（配列番号１２１）
ＩＧＰ１６３６：ＨＩＴＧＨＲＭＡＷＤＭＭＭＮＷＳＰＴＴＡ（アミノ酸３１２－３３１）（配列番号１２２）

【０３３２】

Ｅ１ｓのワクチン接種を受けていない１４人の異なる健康なドナーから又はＥ１でのワクチン接種を受けた１０人のドナーからのＰＢＭＣを２５μｇ／ｍｌ（ワクチン接種を受けていない人）又は１０μｇ／ｍｌ（ワクチン接種を受けた人、３回目又は追加抗原注射後に採取した標本）の存在下で培養した。図５３から判断できるように、ペプチドＩＧＰ１６２７、１６２９、１６３０、１６３１、１６３３、１６３５及び１６３５は全て、ワクチン接種を受けていない人と比べてワクチン接種を受けた人において著しく高い応答を誘発した。３という刺激指数をカットオフとして用いると、ペプチドＩＧＰ１６２７、１６２９、１６３１及び１６３５が最も頻繁に認識された（すなわち、テスト対象のワクチン接種を受けた人の少なくとも半数により認識された）。

【０３３３】

この実験は、哺乳動物細胞培養に由来するＥ１ｓによって誘発されたＴ細胞応答が、哺乳動物細胞培養に由来する同じＥ１ｓによってのみならず合成ペプチドによっても呼び起こされ得ることから、これらの応答がＥ１に対し特異的であることを試すものである。さらに、この実験は、Ｅ１中の最も免疫原性の高いＴ細胞ドメインがアミノ酸２０４～２２３、２２８～２７１、２７６～２９５、３００～３３１そしてより詳細にはアミノ酸２０４～２２３、２２８～２４７、２５２～２７１及び３００～３１９の間に位置設定されていることを描写している。

【０３３４】

図５３の説明：刺激指数（細胞性免疫応答）は、ペプチドの存在下又は不在下でＰＢＭＣ（3×10^5個の細胞）を培養し、５～６日の培養後パルス中にこれらの細胞内に取込まれたトリチウム標識チミジンの量を決定することによって得られた。刺激指数というのは、ペプチドと共に培養された細胞内に取込まれたチミジン対ペプチド無しで培養されたものの比率である。結果は、ワクチン接種された人（上の図版）又はワクチン接種を受けていない人又は対照（下の図版）についての個々の値として表現されている。

【０３３５】

そのため、本発明は同様に、以下のＥ１ペプチド、タンパク質組成物及びこれらを含むキット、これらのペプチド及びそれを含有するタンパク質についてコードする核酸配列そして、本発明のその他のＥ１及び関連するペプチドについて本書に一般的に記載されているようなそれらの製造方法及び使用をも提供する。

【０３３６】

Ｅ１領域の位置１９２～２１１にわたるＩＧＰ１６２６（配列番号１１２）、
Ｅ１領域の位置２０４～２２３にわたるＩＧＰ１６２７（配列番号１１３）、
Ｅ１領域の位置２１６～２３５にわたるＩＧＰ１６２８（配列番号１１４）、
Ｅ１領域の位置２２８～２４７にわたるＩＧＰ１６２９（配列番号１１５）、
Ｅ１領域の位置２４０～２５９にわたるＩＧＰ１６３０（配列番号１１６）、
Ｅ１領域の位置２５２～２７１にわたるＩＧＰ１６３１（配列番号１１７）、
Ｅ１領域の位置２６４～２８３にわたるＩＧＰ１６３２（配列番号１１８）、
Ｅ１領域の位置２７６～２９５にわたるＩＧＰ１６３３（配列番号１１９）、
Ｅ１領域の位置２８８～３０７にわたるＩＧＰ１６３４（配列番号１２０）、
Ｅ１領域の位置３００～３１９にわたるＩＧＰ１６３５（配列番号１２１）、

Ｅ１領域の位置３１２～３３１にわたるＩＧＰ１６３６（配列番号１２２）、

【０３３７】

実施例１９

実施例１９：ヒトにおけるＥ１－ワクチン接種の治療的有用性の例証

ＨＣＶ　Ｅ１ｓ　タンパク質（アミノ酸１９２～３２６（配列番号１２３）：ＹＥＶＲＮＶＳＧＭＹＨＶＴＮＤＣＳＮＳＳＩＶＹＥＡＡＤＭＩＭＨＴＰＧＣＶＰＣＶＲＥＮＮＳＳＲＣＷＶＡＬＴＰＴＬＡＡＲＮＡＳＶＰＴＴＴＩＲＲＨＶＤＬＬＶＧＡＡＡＦＣＳＡＭＹＶＧＤＬＣＧＳＶＦＬＶＳＱＬＦＴＩＳＰＲＲＨＥＴＶＱＤＣＮＣＳＩＹＰＧＨＩＴＧＨＲＭＡＷＤＭＭＭＮＷ））を、組換え型ワクシニアウイルス、ＨＣＶ１１Ｂを用いてベロ細胞内で発現させた。このワクシニアウイルスは基本的にｖｖＨＣＶ１１Ａ（その各々の全内容が本書に参考として包含されているＰＣＴ／ＥＰ９５／０３０３１及び米国特許第６，５１０，１３４号に記載されているもの）と同一であるが、ＲＫ１３からベロ細胞まで継代された。（レンチルクロマトグラフィ、還元－アルキル化及びサイズ排除クロマトグラフィを用いて）、基本的にＰＣＴ／Ｅ９９／０４３４２（その各々の全内容が本書に参考として包含されている）の実施例９に記載されているように、システインのためのアルキル化剤としてヨードアセタミドを使用して、タンパク質を精製した。３％のエンピゲン－ＢＢ（Ｎ－ドデシル－Ｎ，Ｎ－ジメチルグリシン）をＰＣＴ／Ｅ９９／０４３４２の実施例１に記載されているようにサイズ排除クロマトグラフィによって３％のベタインに交換した後、このプロセスにより、Ｅｌｓを１つの粒子として回収できるようにする。最終的に、ＰＢＳが０．５％のベタインを含有しＥｌｓ濃度が４００μｍ／ｍｌとなるまで、材料を脱塩した。このＥ１を等体積のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌ　１．３％（デンマークのＳｕｐｅｒｆｏｓ）と混合し、最終的に０．９％のＮａＣｌ８体積でさらに希釈して、０．１３％のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌ及び４０μｇＥｌ／ｍｌの濃度でミョウバンをアジュバントとするＥ１を得た。

【０３３８】

ヒトにおけるＥ１免疫化の治療的効果を実証するために、慢性感染した患者の体内で免疫応答を誘発した。この免疫応答は、かかる患者の体内に存在するＥ１に対する基線応答とは量的にも質的にも異なっていた。

【０３３９】

２６人の慢性的に遺伝子型１に感染したＨＣＶ患者に、０．５ｍＬ中の０．１３％のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌに基づいて処方された２０μｇのＥ１ｓの５用量をワクチン接種した。全ての免疫化は、筋内投与された。免疫化は、０、４、８、１２及び２４週目に実施した。さらに９名の患者は、ミョウバンのみから成るプラシーボ注射を同じ回数受けた。

【０３４０】

下表１４の中で明示されているように、Ｔ細胞応答は、慢性ＨＣＶキャリヤの中で通常不在である（わずか４％、２６人中１人、が検出可能なＴ細胞反応性をもつ）。免疫化の時点で、これは、４回の免疫化の後すでに約７０％（２６人中１８人）まで増大する。この観察事実は、免疫応答が、Ｔ細胞非応答性から明確な応答に至るまで質的に変化したことを実証している。さらに、３ヵ月後５回目の免疫化の後、細胞性免疫応答がなおも同じレベルのものであるか又はわずかに増大していることから、より大きい間隔で追加抗原投与することによって、この免疫応答を持続させることができる。

【０３４１】

表１４

刺激指数（ＳＩ；免疫応答）は、３μｇのＥ１ｓの存在下又は不在下で、４回目の免疫化の４週間後（Ｗ１６）及び５回目の免疫化の２週間後（Ｗ２６）に個体から抜取られたＰＢＭＣを培養し、５日間の培養後の１８時間のパルス中のこれらの細胞内に取込まれたトリチウム標識チミジンの量を決定することによって得られた。刺激指数というのは、外被抗原と共に培養された細胞内に取込まれたチミジンと抗原無しで培養されたものとの比率である３を上回る刺激指数が、陽性信号であるとみなされる。

【０３４２】

【表１７】

	T細胞応答		
	W0	W16	W26
SI>3	1/26	18/26	17/25
平均SI	1.5	13.7	19.3

【０３４３】

さらに、１回目の免疫化の前（これは各患者について免疫化の前の異なる時点で取られた３つの標本について行なわれた）及び５回の免疫化の後（これは各患者について２つの標本について行なわれた：Ｗ２６及びＷ２８）にＥＬＩＳＡによって抗体力価を決定した。標本の段階希釈物を、社内規準と比較した（前述のように１０００ｍＵ／ｍｌのＥ１抗体をもつものとして定義されているこの社内規準は、高い抗外被力価に基づいて選択されたＨＣＶ慢性キャリヤからの３つの血清の混合物である）。この分析から、平均して、力価が３３１から７１５ｍＵ／ｍｌまで倍増したという結論が下された。この結果は、免疫応答の体液性部門が少なくとも量的に改変されたということを実証している。

【０３４４】

ミョウバンをベースとして処方されたＥ１ワクチンは、Ｅ１に対する質的及び量的免疫応答の両方を著しく変える。このようなＥ１ベースのワクチン及び／又は本書に記載されたワクチンのいずれも、インターフェロンといったような（ただしこれに制限されるわけではない）抗ウイルス療法及び代替的にはリバビリンとそれの組合せと併用して投与された場合（すなわち本発明の組成物の前後又はそれと同時）にさらに有用であり得る。

【０３４５】

以下の、ならびに以前に及び後に識別される全てのテキスト、参考文献、特許、出版物などは本書にその全体が参考として包含される。

【０３４６】

実施例２０：慢性感染した患者の体内での治療用Ｅ１ワクチン接種の効果

この研究の第１の治療ユニットでは、２６人の患者が実施例１９に記載されている通りに２０μｇのＥ１ｓを５回投与された。第２の治療ユニットでは、前記２６人の患者のうち２５人が、０．５ｍＬ中の０．１３％のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌに基づいて処方された２０μｇのＥ１ｓのさらに６回の筋内投与を受けた（実施例１９の場合と同様）。この第２セットの免疫化は、３週間の間隔をおいて投与され、１回目の注射は第５０週目に行なわれた。２回目の治療ユニットの最後の注射から４週間後に、肝臓生検を、治療用Ｅ１ｓワクチン接種の２回の治療ユニットを完了した２５人の患者のうち２４人において実施した。同様に、治療用ワクチン治療の開始前にも、全ての患者において肝臓生検を行なった（すなわち治療ユニット１のワクチン接種療法の前）。治療前及び治療後の生検の間に経過した平均時間は、１７ヵ月であった。このようにして治療用ワクチン接種の前後に得られた肝臓組織学スライドは、線維症及び炎症についての２人の専門病理学者により、Ｉｓｈａｋ及びＭｅｔａｖｉｒの評点システム（Ｋｎｏｄｅｌｌら、１９８１年の評定システムの修正版であるＩｓｈａｋら、１９９５年；Ｂｅｄｏｓｓａ及びＰｏｙｎａｒｄ、１９９６年）に従って、ならびに抗－Ｅ２免疫染色については国際特許出願国際公開第９９／５０３０１号パンフレットに記載されているようなＩＧＨ２２２マウス抗－Ｅ２　ＨＶＲＩモノクローナル抗体を用いて、主として盲目的に評定された。（肝臓の組織学スライド上で）シリウスレッドでのコラーゲンの染色に基づいて、類洞周囲線維症を査定した。

【０３４７】

Ｉｓｈａｋ評点は、炎症のグレード決定のためには０～１８、線維症／肝硬変のステージ決定のためには０～６の範囲を有する。Ｉｓｈａｋの炎症及び線維症評点の合計は、広く使用されてきた組織学的活動指数（ＨＡＩ：Ｋｎｏｄｅｌｌら、１９８１年）に最も近

くなる。治療用Ｅ１ｓワクチン接種を２治療ユニット受けた２４人の患者におけるＩｓｈａｋ線維症評点の変化は、（－０．６０及び＋０．６８の９５％信頼区間を伴って）－０．０４であり、基線値から終点値までの変化は２．５４（基線）から２．５０（終点）である。

【０３４８】

異なる査定済み壊死／炎症強度（Ｉｓｈａｋ評定）の概覧は、表１５に示されている。

【０３４９】

治療対象患者についてのＨＡＩ評点のＩｓｈａｋ等価物は、（－１．３６～１．０３の９５％の信頼区間を伴って）－０．１７という基線からの平均絶対変化を示し、基線値から終点値までの変化は８．８８（基線）から８．７１（終点）であった。さらに、２４人の患者のうち９人（３８％）が、Ｉｓｈａｋ炎症評点及びＩｓｈａｋ線維症評点の合計について２点以上改善し、２４人の患者のうち１０人が安定状態にとどまり（変化無し又は＋１又は－１の変化）、５人の患者がさらに悪条件へと推移した（２点以上の悪化）。

【０３５０】

Ｍｅｔａｖｉｒ評点は、炎症のグレード決定については０～３、線維症／肝硬変のステージ決定については、０～４の範囲を有する。未治療患者におけるＭｅｔａｖｉｒ評点の全体的進行速度は、一年あたり０．１３３であると推定されている（Ｐａｙｎａｒｄら、１９９７年）。

【０３５１】

現行の研究の患者については、基線評点の線形拡張及び感染の推定持続時間（これは、治療用Ｅ１ｓワクチン接種の２回の治療ユニットを受けた２４人の患者のうち１９人について報告されている）に基づく１７ヵ月にわたる平均的進行は０．２０となる。これは、１７ヵ月間について０．１９となる公表された全体的進行速度と充分相関関係をもつものである。

【０３５２】

しかしながら、治療済みの患者について観察されたＭｅｔａｖｉｒ評点の変化は、（－０．４３～＋０．４３の９５％信頼区間を伴って）０．００であり、平均基線及び終点評点は１．６７である。２回目の治療ユニットの治療の基線及び終点におけるＭｅｔａｖｉｒ評点の概覧が、表１６に記されている。治療前後のスライドの非盲検比較は、１０人の患者がシリウスレッド染色に基づいて類洞周囲線維症を減少させていたことを明らかにした。

【０３５３】

抗－Ｅ２免疫染色評点は、０～４の範囲を有し、０は、Ｅ２抗原が全く検出できないことを表わし、１は、検出可能なＥ２抗原をもつ細胞が時々存在することを表わし、２は、Ｅ２抗原陽性細胞のクラスタがあるが陽性細胞は２５％未満であることを表わし、３はＥ２抗原陽性細胞のクラスタがあり、陽性細胞は２５～５０％であることを表わし、４はＥ２抗原陽性細胞のクラスタがあり、５０％を上回る細胞が陽性であることを表わしている。治療済み患者についての抗－Ｅ２免疫染色評点は、（－１．６４～０．１４の９５％信頼区間を伴って）－０．７５の基線からの平均絶対変化を示し、基線値から終点値までの変化は２．５４（基線）から１．７９（終点）であった。盲検評定を用いて肝臓内の抗－Ｅ２免疫反応性について見られた減少は、患者毎の対になったスライドの非盲検比較により確認された。１１人の患者が、ＨＣＶ　Ｅ２免疫染色の陰転又は顕著な減少を示し、一方、治療後より強い免疫染色を有したのはわずか３人であった。これら１１名の患者のうち３人が同様に脂肪症の減少を示した。

【０３５４】

血清ＨＣＶ　ＲＮＡレベルを、Ａｍｐｌｉｃｏｒ　ＨＣＶ　Ｍｏｎｉｔｏｒキット（スイス、バーゼルのＲｏｃｈｅ）を用いて決定した。血清ＨＣＶ　ＲＮＡレベルは１人の患者を除き不変のままにとどまるか、又は基線から１ログ以上変化しなかった。この１人の患者は、遺伝子型１ａウイルスに感染し、基線においてインフルエンザ様の症候をもつ３７歳の治療投薬を受けていない女性患者であった。ＨＣＶ－ＲＮＡは、８週目から（Ｅ１

での２回の注射後）３ログ降下して１６週目及び２０週目に３０００ＩＵ／ｍｌ未満のレベルに達し、並行してＡＬＴは８週目の４００Ｕ／ｍｌの単一ピーク値から１６、２０及び２４週目の正常なＡＬＴ値まで降下した。これには、インフルエンザ様の症候の消滅が伴っていた。この期間の後、ＡＬＴ及びＨＣＶ－ＲＮＡの両方が再び増加し、症候が再び出現した。新生ウイルス量の増加中に存在するウイルスの配列を基線配列と比較した。エスケープ突然変異体ウイルスの存在についての証拠は全く発見されなかった。

【０３５５】

治療済み患者における血清ＡＬＴ（アラニンアミノトランスフェラーゼ活性）レベルは、基線レベルと比べて平均２２％（－１５％～－３０％の９５％信頼区間を伴って）減少した。ＡＬＴレベルの基線からの変化％と線維症評点における基線からの絶対的変化の間に正の相関関係が指摘された：Ｉｓｈａｋ線維症評点についてはＰ＝０．０００７そしてＭｅｔａｖｉｒ線維症評点についてはＰ＝０．００２のＳｐｅａｒｍａｎランクは、血清ＡＬＴの基線からの変化とそれぞれ基線Ｉｓｈａｋ及びＭｅｔａｖｉｒ線維症評点からの絶対的変化の間の相関関係として得られた。

【０３５６】

現行の研究のさらなる成果は、組織学的評点（線維症及び全体）ならびに血清ＡＬＴレベルの改善のため、治療に対する（血清抗－Ｅ１ｓ抗体レベルの増大という形での）免疫応答が予言的性質をもつという点にある。

【０３５７】

抗体力価はＥＬＩＳＡにより決定された。血清標本の段階希釈を社内規準と比較した（１０００ｍＵ／ｍｌのＥ１抗体をもつものとして定義されているこの社内規準は、高い抗外被力価に基づいて選択されたＨＣＶ慢性キャリヤからの３つの血清の混合物である）。この検定の検出限界は、５ｍＵ／ｍＬである。

【０３５８】

ｐ＝０．００７のＳｐｅａｒｍａｎランクを、血清抗－Ｅ１抗体レベルの基線からの変化と合計Ｉｓｈａｋ（炎症プラス線維症）評点の基線からの絶対的変化の間の相関関係として得た。血清抗－Ｅ１抗体レベルの基線からの変化とそれぞれＩｓｈａｋ線維症評点の基線からの絶対的（ｐ＝０．０６）及び相対的（ｐ＝０．００９）変化の間の相関関係として、Ｐｅａｒｓｏｎのｐ値、ｐ＝０．０６及びｐ＝０．００９を得た。血清抗－Ｅ１抗体レベルの基線からの変化とＡＬＴ値の基線からの相対的変化の間の相関関係として、Ｐｅａｒｓｏｎのｐ値、ｐ＝０．０１を得た。

【０３５９】

これらの結びつきは、基線肝臓組織学評点、ＡＬＴ、血清ＨＣＶ－ＲＮＡウイルス量、年齢及び性別、及びＩＦＮ露出についてひいては治療用Ｅ１ｓワクチン接種治療により誘発される実際の正の効果の確率に対する付加として補正を行なった後も残っている。

【０３６０】

治療用ワクチン候補に応えて血清抗体レベルの最高の増加を示す７人の患者（すなわち、少なくとも７００ｍＵ／ｍＬの抗－Ｅ１抗体レベルの増加を伴う患者）は、Ｍｅｔａｖｉｒ肝臓線維症評点について平均して－０．９点の有意な減少（－０．２～－１．５の９５％信頼区間を伴って）を示していた。このサブグループ内で、血清ＡＬＴは平均して３７％減少した（－２５～－４９％の９５％信頼区間を伴って）。表１７は、（治療によって誘発された抗－Ｅ１ｓ抗体レベルの形での）免疫応答とＩｓｈａｋ評点の（基線との関係における）全体的変化の間の相関関係の概覧を提供している。図５４は、Ｉｓｈａｋ線維症評点の変化、ＡＬＴレベルの変化及び抗－Ｅ１ｓ抗体レベルの変化の相関関係を例示している。図５５は、Ｍｅｔａｖｉｒ線維症評点の変化、ＡＬＴレベルの変化及び抗体Ｅ１抗体レベルの変化の間の相関関係を例示している。図５６は、第１の治療ユニット（図版Ａ）の開始時と第２の治療ユニット（図版Ｂ）の終りの両方におけるＩｓｈａｋ線維症評点対ＡＬＴレベルの関係を例示している。図５７は、第１の治療ユニット（図版Ａ）の開始時と第２の治療ユニット（図版Ｂ）の終りの両方における、患者の年齢とＩｓｈａｋ線維症評点の関係を例示している。図５６及び５７は両方共、治療用ワクチン接種により

誘発される抗－Ｅ１抗体レベルの最高の増加を示す７人の患者をさらに表わしている。

【０３６１】

第２の治療ユニットの終りにおけるＴ細胞増殖指数と血清抗－Ｅ１抗体レベルの間の正の相関関係が、Ｐｅａｒｓｏｎのｐ値、ｐ＝０．００９で観察された。

【０３６２】

結論としては、Ｅ１ｓワクチン接種までの抗体レベルの増加は、有意な形で、その他のあらゆる基線予後診断変数について補正した後でさえ、肝臓線維症（Ｍｅｔａｖｉｒ及びＩｓｈａｋ評点）、炎症及び線維症評点（Ｉｓｈａｋ）の合計及びＡＬＴレベルが改善することを予測した。ワクチン接種後の抗－Ｅ１抗体の増加も同様に、Ｅ１に対するＴ細胞増殖指数の増大とも有意な形で相関された。

【０３６３】

この研究は、Ｅ１ベースの治療用ワクチン接種戦略が、肝硬変に向かう疾病の進行を止める潜在能力をもつことを明らかに裏づけている。

【０３６４】

表１５

門脈周囲性肝炎、集密的壊死、限局性炎症、門脈炎症についての壊死／炎症強度のＩｓｈａｋグレード決定及び全体的合計炎症グレード決定。評点は、基線からの変化（平均及び９５％の信頼区間）及び平均基線～終点値変化として表わされている。

【０３６５】

【表１８】

評点の対象	基線からの評点の変化 平均(95%信頼区間)	基線から終点までの変化 (平均)
門脈周囲性肝炎	-0.21 (-0.62 ～ 0.20)	1.42 ～ 1.21
集密性壊死	0.38 (-0.17 ～ 0.92)	0.00 ～ 0.38
限局性炎症	-0.17 (-0.59 ～ 0.26)	2.63 ～ 2.46
門脈炎症	-0.13 (-0.51 ～ 0.26)	2.29 ～ 2.17
合計炎症グレード決定	-0.13 (-1.18 ～ 0.93)	6.33 ～ 6.21

【０３６６】

表１６

（左欄に示されている：ＥＯＴ０～４）治療的Ｅ１ｓワクチン接種の第２の治療ユニットの終りにおける一定の与えられたＭｅｔａｖｉｒ評点に対する（上段に示されている：基線０～４）一定の与えられた基線Ｍｅｔａｖｉｒ評点の変化の（患者数として示された）頻度の概覧。例えば、「＊」でマークされた「５」（すなわち「５＊」）は、５人の患者が、第２の治療ユニットの治療の終り（ＥＯＴ＝治療の終点）において０のＭｅｔａｖｉｒ評点と１の基線Ｍｅｔａｖｉｒ評点を有していたことを意味している。

【０３６７】

【表１９】

	基線０	基線１	基線２	基線３	基線３	合計
EOT０	0	5*	1	0	0	**6**
EOT１	1	3	2	0	0	**6**
EOT２	0	5	1	0	0	**6**
EOT３	0	0	0	1	1	**2**
EOT4	0	0	1	2	1	**4**
合計	**1**	**13**	**5**	**3**	**2**	**24**

【０３６８】

表１７

治療用Ｅ１ｓワクチン接種により誘発される血清抗－Ｅ１抗体レベルと全体的Ｉｓｈａｋ評点の変化の間の相関関係。ここで与えられているのは、表中の概略的に示されているとおりの考えられる基準に対応する患者の数である。

【０３６９】

【表２０】

Ishak 評点の全体的変化（基線からの変化）	< -1	-1, 0,または +1	> +1
高い抗 E1s 抗体応答	5	2	0
低い抗 E1s 抗体応答	4	8	5

【０３７０】

実施例２１：治療用Ｅ１ワクチン接種処方計画効果

この研究の第１の治療ユニットにおいては、２６人の患者は、２０μｇのＥｌｓを５回投与され（「Ｅ１ｓ患者」）、９人の患者は実施例１９で記載されている通り、ミョウバンのみから成る同一数のプラシーボ注射を受けた（「プラシーボ患者」）。第２の治療ユニットにおいては、第１の治療ユニット中にＥ１を受けた前記２６人の患者のうちの２５人及びプラシーボを受けた前記９人の患者のうちの９人を、（実施例１９の場合と同様）０．５ｍＬ中の０．１３％のＡｌｈｙｄｒｏｇｅｌに基づいて処方された２０μｇのＥ１ｓのさらに６回の筋内用量で全て免疫化し、２つの患者グループ、すなわち「Ｅ１ｓ／Ｅ１ｓ患者」と「プラシーボ／Ｅ１ｓ患者」を生み出した。この第２のセットすなわち治療ユニット２の免疫化は、（第１のセットすなわち治療ユニット１の間の４週間の間隔に比して）３週間の間隔で投与され、第１回注射は、５０週目に行なわれた。

【０３７１】

４回のＥ１ｓ注射の後の抗－Ｅ１抗体のための中央値は、（Ｅ１ｓ患者から演繹される通り）４週間の間隔について１９５ｍＵ／ｍＬであり、（プラシーボ／Ｅ１ｓ患者から演繹される通り）３週間の間隔について２７４ｍＵ／ｍＬであり、かくして、３週間の間隔の処方計画がより短期間でより強い体液性免疫応答を誘発することを表わしていた。

【０３７２】

プラシーボ／Ｅ１ｓ患者においては、基線での９人中０人の患者から３週間の間隔をお

いて６回の注射の後６９週目での９人中９人の患者に至るまで、Ｅ１ｓ特異的Ｔ細胞増殖が増大した。

【０３７３】

健康な男性の志願者におけるＥ１ｓに対する体液性及び細胞性免疫応答（実施例１６及び１７参照）を患者グループ内のものと比べた場合、抗－Ｅ１抗体レベルとＴ細胞応答の幾分か緩慢な増加が観察される。健康な志願者において見られた追加抗原効果は患者においてはほぼ見られず（４回目の免疫化から１２週間後に追加抗原としてＥ１ｓ／Ｅ１ｓ患者に投与された５回目の免疫化の後の１６５ｍＵ／ｍＬの中央力価）、かくして、患者におけるＥ１ｓに対する免疫学的メモリーの蓄積が幾分か損われたことを示唆していた。３週間の間隔を置いた反復的筋内注射は、この欠損を克服すると思われ（プラシーボ／Ｅ１ｓ患者における３週間の間隔をおいた６回の連続的免疫化の後の５３０ｍＵ／ｍＬの中央力価）、かくして３週間の間隔でのＥ１ワクチン接種処方計画及び／又は最初の免疫化セットにおける４用量を上回る投与のもう１つの利点を表わしている。

【０３７４】

表の説明

表１：実施例１で記載されている通りのＥ１タンパク質の異なる形態を構築するため、増幅に使用されるそれぞれのクローン及びプライマーの特長。

表２：抗－Ｅ１試験の要約

表３：競合研究用の合成ペプチド

表４：経時的な外被抗体レベルの変化

表５：ＬＴＲとＮＲの間の差異

表６：マウスＥ２モノクローナル抗体間の競合実験

表７：Ｅ１グリコシル化突然変異体の構築のためのプライマー

表８：ＥＬＩＳＡによるＥ１グリコシル化突然変異体の分析

表９：Ｂａｌｂ／ｃマウス内のアジュバント入りＥ１のプロフィール

表１０：体液性応答：異なるＥ１－抗体レベルについて必要とされる免疫化回数

表１１：チンパンジー抗体力価

表１２：ヒト抗体力価

表１３：ヒト抗体力価（８～２８週）

表１４：３μｇのＥ１ｓの存在下又は不在下で、４回目の免疫化の４週間後（Ｗ１６）及び５回目の免疫化の２週間後（Ｗ２６）に個体から抜取られた培養されたＰＢＭＣの刺激指数（ＳＩ）。３を上回る刺激指数が、陽性信号であるとみなされる。

表１５：門脈周囲性肝炎、集密的壊死、限局性炎症、門脈炎症についての壊死／炎症強度のＩｓｈａｋグレード決定及び全体的合計炎症グレード決定。評点は、基線からの変化（平均及び９５％の信頼区間）及び平均基線～終点値変化として表わされている。

表１６：（左欄に示されている：ＥＯＴ０～４）治療的Ｅ１ｓワクチン接種の第２の治療ユニットの終りにおける一定の与えられたＭｅｔａｖｉｒ評点に対する（上段に示されている：基線０～４）一定の与えられた基線Ｍｅｔａｖｉｒ評点の変化の（患者数として示された）頻度の概覧。例えば、「＊」でマークされた「５」（すなわち「５＊」）は、５人の患者が、第２の治療ユニットの治療の終り（ＥＯＴ＝治療の終点）において０のＭｅｔａｖｉｒ評点と１の基線Ｍｅｔａｖｉｒ評点を有していたことを意味している。

表１７：治療用Ｅ１ｓワクチン接種により誘発される血清抗－Ｅ１抗体レベルと全体的Ｉｓｈａｋ評点の変化の間の相関関係。ここで与えられているのは、表中の概略的に示されているとおりの考えられる基準に対応する患者の数である。

【０３７５】

参照文献リスト：

Ａｌｒｉｃ Ｌ, Ｄｕｆｆａｕｔ Ｍ, Ｓｅｌｖｅｓ Ｊ, Ｓａｎｄｒｅ Ｋ, Ｍｕｌａｒｃｚｙｃｋ Ｍ, Ｉｚｏｐｅｔ Ｊ, Ｄｅｓｍｏｒａｔ Ｈ, Ｂｕｒｅａｕ Ｃ, Ｃｈａｏｕｃｈｅ Ｎ, Ｄａｌｂｅｒｇｕｅ Ｂ, Ｖｉｎｅｌ ＪＰ（２００１） Ｊ Ｈｅｐａｔｏｌ ３５（２）：２７２－２７８.

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

Bailey, J. and Cole, R. (1959年) J. Biol. Chem. 234, 1733－1739.

Ballou, L., Hitzeman, R., Lewis, M. 及びBallou, C. (1991年) PNAS 88, 3209－3212.

Bedossa P, Poynard T. (1996年) Hepatology 24 (2)：289－293.

Benesch, R., Benesch, R. E., Gutcho, M. 及びLanfer, L. (1956年) Science 123, 981.

Cavins, J. 及びFriedman. (1970年) Anal. Biochem. 35, 489.

Cleland, W. (1964年) Biochemistry 3, 480
Creighton, E. (1988年) BioEssays 8, 57
Darbre, A., John Wiley 及び Sons Ltd. (1987年) Practical Protein Chemistry － A Handbook.

Darbre, A., John Wiley 及び Sons Ltd. (1987年) Practical Proteinchemistry p. 69－79.

Domsら、(1993年), Virology 193, 545－562.

Ellman, G. (1959) Arch. Biochem. Biohys. 82, 70.

Falck－Ytter Y, Kale H, Mullen KD, Sarbah SA, Sorescu L, McCullough AJ (2002年) Ann Intern Med 136 (4)：288－292.

Falkner, F. 及びMoss, B. (1988年) J. Virol. 62, 1849－1854.

Friedman, M. 及び Krull. (1969年) Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 630.

Gallagher J. (1988年) J. Cell Biol. 107, 2059－2073.

Glazer, A., Delange, R., Sigman, D. (1975年) North Holland publishing company, Elsevier, Biomedical. Part : Modification of protein

（ｐ．１１６）．

Ｇｒａｈａｍ，Ｆ．及び　ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｅｂ，Ａ．（１９７３年）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　５２，４５６－４６７．

Ｇｒａｋｏｕｉら、．（１９９３年）Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　６７：１３８５－１３９５．

Ｇｒａｓｓｅｔｔｉ，Ｄ．及び　Ｍｕｒｒａｙ，Ｊ．（１９６９年）Ａｎａｌｙｔ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ．４６，１３９．

Ｇｒａｓｓｅｔｔｉ，Ｄ．及び　Ｍｕｒｒａｙ，Ｊ．（１９６７年）Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ．１１９，４１．

Ｈｅｌｅｎｉｕｓ，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ　（１９９４年），５：　２５３－２６５．

Ｈｉｊｉｋａｔａ，Ｍ．，Ｋａｔｏ，Ｎ．，Ｏｏｔｓｕｙａｍａ，Ｙ．，Ｎａｋａｇａｗａ，Ｍ．及び　Ｓｈｉｍｏｔｏｈｎｏ，Ｋ．（１９９１年）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８８（１３）：５５４７－５１．

Ｈｏｃｈｕｌｉ，Ｅ．，Ｂａｎｎｗａｒｔｈ，Ｗ．，Ｄｏｅｂｅｌｉ，Ｈ．，Ｇｅｎｔｚ，Ｒ．，Ｓｔｕｅｂｅｒ，Ｄ．（１９８８年）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　８８，８９７６．

Ｈｓｕ，Ｈ．，Ｄｏｎｅｔｓ，Ｍ．，Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ，Ｈ．及び　Ｆｅｉｎｓｔｏｎｅ，Ｓ．（１９９３年）Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ　１７：７６３－７７１．

Ｉｎｏｕｅ，Ｙ．，Ｓｕｚｕｋｉ，Ｒ．，Ｍａｔｓｕｕｒａ，Ｙ．，Ｈａｒａｄａ，Ｓ．，Ｃｈｉｂａ，Ｊ．，Ｗａｔａｎａｂｅ，Ｙ．，Ｓａｉｔｏ，Ｉ．及びＭｉｙａｍｕｒａ，Ｔ．（１９９２年）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７３：２１５１－２１５４．

Ｉｓｈａｋ　Ｋ，Ｂａｐｔｉｓｔａ　Ａ，Ｂｉａｎｃｈｉ　Ｌ，Ｃａｌｌｅａ　Ｆ，Ｄｅ　Ｇｒｏｏｔｅ　Ｊ，Ｇｕｄａｔ　Ｆ，Ｄｅｎｋ　Ｈ，Ｄｅｓｍｅｔ　Ｖ，Ｋｏｒｂ　Ｇ，ＭａｃＳｗｅｅｎ　ＲＮら（１９９５年）Ｊ　Ｈｅｐａｔｏｌ　２２（６）：６９６－６９９．

Ｊａｎｋｎｅｃｈｔ，Ｒ．，ｄｅ　Ｍａｒｔｙｎｏｆｆ，Ｇ．ら（１９９１年）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８，８９７２－８９７６．

Ｋａｙｍａｎ　（１９９１）　Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　６５，５３２３－５３３２．

Ｋａｔｏ，Ｎ．，Ｏｏｓｔｕｙａｍａ，Ｙ．，Ｔａｎａｋａ，Ｔ．，Ｎａｋａｇａｗａ，Ｍ．，Ｍｕｒａｉｓｏ，Ｋ．，Ｏｈｋｏｓｈｉ，Ｓ．，Ｈｉｊｉｋａｔａ，Ｍ．，Ｓｈｉｍｉｔｏｈｎｏ，Ｋ．（１９９２年）Ｖｉｒｕｓ　Ｒｅｓ．２２：１０７－１２３．

Ｋｎｉｓｋｅｒｎ，Ｐ．，Ｈａｇｏｐｉａｎ，Ａ．，Ｂｕｒｋｅ，Ｐ．，Ｓｃｈｕｌｔｚ，Ｌ．，Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙ，Ｄ．，Ｈｕｒｎｉ，Ｗ．，Ｙｕ　Ｉｐ，Ｃ．，Ｓｃｈｕｌｍａｎ，Ｃ．，Ｍａｉｇｅｔｔｅｒ，Ｒ．，Ｗａｍｐｌｅｒ，Ｄ．，Ｋｕｂｅｋ，Ｄ．，Ｓｉｔｒｉｎ，Ｒ．，Ｗｅｓｔ，Ｄ．，Ｅｌｌｉｓ，Ｒ．，Ｍｉｌｌｅｒ，Ｗ．（１９９４年）Ｖａｃｃｉｎｅ　１２：１０２１－１０２５．

Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Maki, N., Asano, K., Yoshizawa, K., Miki, K., Tanaka, S., Hattori, N., Matsuura, Y., Saito, I., Miyamura, T. 及びNomoto, A. (1992年) J. Gen. Virol. 73:2313-2318.

Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. (1981年) Hepatology 1(5):431-435.

Lauer GM, Walker BD (2001年) N Engl J Med 345(1):41-52.

Lefkowitch JH (1997年) Viral Hepatitis Reviews 3(3):155-166.

Mackett, M., Smith, G. 及び Moss, B. (1985年)「DNAクローニング:実践的アプローチ」中, (Ed. Glover, D.) IRL Press, Oxford.

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

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

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

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

Means, G. (1971年) Holden Day, Inc.

Means, G. 及びFeeney, R. (1971年) Holden Day 105頁及び217頁.

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

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

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

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

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

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

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

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

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. (1997年) Lancet 349 (9055):825-832.

Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J (2002年) Gastroenterology 122 (5):1303-1313.

Reichard O, Glaumann H, Fryden A, Norkrans G, Wejstal R, Weiland O (1999年) J Hepatol 30 (5):783-787.

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

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

Schvarcz R, Glaumann H, Reichard O, Weiland O (1999年) J Viral Hepat 6 (3):237-242.

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

Shiffman ML (1999年) Viral Hepatitis Reviews 5 (1):27-43.

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

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

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

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

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

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

Ｔａｋｉｍｏｔｏ Ｍ，Ｏｈｋｏｓｈｉ Ｓ，Ｉｃｈｉｄａ Ｔ，Ｔａｋｅｄａ Ｙ，Ｎｏｍｏｔｏ Ｍ，Ａｓａｋｕｒａ Ｈ，Ｎａｉｔｏ Ａ，Ｍｏｒｉ Ｓ，Ｈａｔａ Ｋ，Ｉｇａｒａｓｈｉ Ｋ，Ｈａｒａ Ｈ，Ｏｈｔａ Ｈ，Ｓｏｇａ Ｋ，Ｗａｔａｎａｂｅ Ｔ，Ｋａｍｉｍｕｒａ Ｔ （２００２年）Ｄｉｇ Ｄｉｓ Ｓｃｉ．４７（１）：１７０－１７６．

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

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

国際公開第９６／０４３８５号パンフレット（ＰＣＴ／ＥＰ９５／０３０３１）－診断及び治療用途向けの精製済みＣ型肝炎ウイルス外被タンパク質。

本書に引用されている全ての参考文献は、その全体が参考として包含されている。

【図面の簡単な説明】

【０３７６】

【図１】プラスミドｐｇｐｔＡＴＡ１８の制限地図

【図２】プラスミドｐｇｓＡＴＡ１８の制限地図

【図３】プラスミドｐＭＳ６６の制限地図

【図４】プラスミドｐｖＨＣＶ－１１Ａの制限地図

【図５】ＩＦＮ治療に対する非応答者における抗－Ｅ１レベル

【図６】ＩＦＮ治療に対する応答者における抗－Ｅ１レベル

【図７】ＩＦＮ治療に対する完全な応答を示す患者における抗－Ｅ１レベル

【図８】ＩＦＮ治療に対する不完全応答者における抗－Ｅ１レベル

【図９】ＩＦＮ治療に対する非応答者における抗－Ｅ２レベル

【図１０】ＩＦＮ治療に対する応答者における抗－Ｅ２レベル

【図１１】ＩＦＮ治療に対する不完全応答者における抗－Ｅ２レベル

【図１２】ＩＦＮ治療に対する完全応答者における抗－Ｅ２レベル

【図１３】ペプチドと競合させられたヒト抗－Ｅ１反応性

【図１４】ペプチドと抗－Ｅ１モノクローナル抗体の反応性の競合

【図１５】ＩＦＮ治療に対する非応答者における抗－Ｅ１（エピトープ１）レベル
【図１６】ＩＦＮ治療に対する応答者における抗－Ｅ１（エピトープ１）レベル
【図１７】ＩＦＮ治療に対する非応答者における抗－Ｅ１（エピトープ２）レベル
【図１８】ＩＦＮ治療に対する応答者における抗－Ｅ１（エピトープ２）レベル
【図１９】ペプチドと競合させられたヒト抗－Ｅ２反応性
【図２０】ペプチドと競合させられたヒト抗－Ｅ２反応性
【図２１】本発明の核酸配列。本発明に従ったＥ１又はＥ２タンパク質をコードする核酸配列を、配列リストに示されているように、それぞれのＥ１又はＥ２タンパク質のアミノ酸配列へと翻訳することができる（配列番号３～１３、２１～３１、３５及び４１～４９は、残基番号１から開始する読取り枠内で翻訳され、配列番号３７～３９は、残基番号２から開始する読取り枠内で翻訳される）。
【図２２】ｖｖＨＣＶ３９（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ４０（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ６２（３ａ型）及びｖｖＨＣＶ６３（５ａ型）に感染した細胞溶解産物の４回の異なるＥ１精製のレンチルレクチンクロマトグラフィ溶出液画分から得られたＥＬＩＳＡ結果
【図２３】図２２に示されている通りの値に基づいた４つの異なるＥ１構築物のレンチルレクチンクロマトグラフィから得られた結果
【図２４】ｖｖＨＣＶ３９（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ４０（１ｂ型）、ｖｖＨＣＶ６２（３ａ型）及びｖｖＨＣＶ６３（５ａ型）に感染した細胞溶解産物の４回の異なるＥ１精製のゲルろ過クロマトグラフィの後に得られた画分から得られたＥＬＩＳＡ結果
【図２５】（レンチルレクチン上で精製され実施例５．２～５．３にある通りに還元された、それぞれｖｖＨＣＶ３９、ｖｖＨＣＶ６２及びｖｖＨＣＶ６３に感染したＲＫ１３細胞からの）１ｂ型（１）、３ａ型（２）及び５ａ型（３）及び標準（４）のＥ１タンパク質の精製から得られたプロフィール。「１」、「２」及び「３」で標示されているピークは、純粋なＥ１タンパク質ピークを表わす（図２４、主として画分２６～３０中のＥ１反応性）。
【図２６】Ｅ１ｖｖＨＣＶ４０（１ｂ型）の未加工溶解産物（レーン１）、図２５に示されている通りの画分１０～１７を表わすｖｖＨＣＶ４０のゲルろ過のプール１（レーン２）、図２５に示されている画分１８～２５を表わすｖｖＨＣＶ４０のゲルろ過のプール２（レーン３）及びＥ１プール（画分２６～３０）（レーン４）の、実施例４に記載された通りのＳＤＳ－ＰＡＧＥの銀染色。
【図２７】Ｅ１構築物３９（１ｂ型）及び６２（３ａ型）のゲルろ過の画分のストレプトアビジン－アルカリホスファターゼブロット。タンパク質はＮＥＭ－ビオチンで標識付けされた。レーン１：出発ゲルろ過構築物３９、レーン２：画分２６構築物３９、レーン３：画分２７構築物３９、レーン４：画分２８構築物３９、レーン５：画分２９構築物３９、レーン６：画分３０構築物３９、レーン７：画分３１構築物３９、レーン８：分子量マーカー、レーン９：出発ゲルろ過構築物６２、レーン１０：画分２６構築物６２、レーン１１：画分２７、構築物６２、レーン１２：画分２８構築物６２、レーン１３：画分２９構築物６２、レーン１４：画分３０構築物６２、レーン１５：画分３１構築物６２。
【図２８】：図２６と同じ条件下で行なわれたｖｖＨＣＶ－３９（Ｅ１ｓ、１ｂ型）及びｖｖＨＣＶ－６２（Ｅ１ｓ、３ａ型）のゲルろ過のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの銀染色。レーン１：出発ゲルろ過構築物３９、レーン２：画分２６構築物３９、レーン３：画分２７構築物３９、レーン４：画分２８構築物３９、レーン５：画分２９構築物３９、レーン６：画分３０構築物３９、レーン７：画分３１構築物３９、レーン８：分子量マーカー、レーン９：出発ゲルろ過構築物６２、レーン１０：画分２６構築物６２、レーン１１：画分２７、構築物６２、レーン１２：画分２８構築物６２、レーン１３：画分２９構築物６２、レーン１４：画分３０構築物６２、レーン１５：画分３１構築物６２。
【図２９】：精製手順の完全な概覧を与える抗－Ｅ１マウスモノクローナル抗体５Ｅ１Ａ１０を用いたウェスタンブロット分析。レーン１：粗製溶解産物、レーン２：レンチルクロマトグラフィの流入、レーン３：レンチルクロマトグラフィ後のＥｍｐｉｇｅｎ　ＢＢでの洗浄、レーン４：レンチルクロマトグラフィの溶出液、レーン５：レンチル溶出液の

濃縮中の流入、レーン６：サイズ排除クロマトグラフィ（ゲルろ過）後のＥ１のプール。
【図３０】ｖｖＨＣＶ４４に感染したＲＫ１３細胞からのＥ２タンパク質のレンチルレクチンクロマトグラフィのOD_{280}プロフィール（実線）。破線は（実施例６にあるように）ＥＬＩＳＡにより検出された通りのＥ２反応性を表わす。
【図３１Ａ】Ｅ２プールがゲルろ過カラムに直ちに適用される（非還元条件）、ｖｖＨＣＶ４４に感染したＲＫ１３細胞からのＥ２タンパク質プールのレンチルレクチンゲルろ過クロマトグラフィのOD_{280}プロフィール（実線）。破線は（実施例６にあるように）ＥＬＩＳＡにより検出された通りのＥ２反応性を表わす。
【図３１Ｂ】実施例５．３に従って、Ｅ２プールが還元され遮断される（還元条件）、ｖｖＨＣＶ４４に感染したＲＫ１３細胞からのＥ２タンパク質プールのレンチルレクチンゲルろ過クロマトグラフィのOD_{280}プロフィール（実線）。破線は（実施例６にあるように）ＥＬＩＳＡにより検出された通りのＥ２反応性を表わす。
【図３２】図３１Ｂに示されているような還元条件下でゲルろ過の後ｖｖＨＣＶ４４から発現される通りのＥ２タンパク質のＥＬＩＳＡ反応性及びNi^{2+}－ＩＭＡＣクロマトグラフィ。
【図３３】図３２に示されているようなNi^{2+}－ＩＭＡＣクロマトグラフィの２００ｍＭのイミダゾール溶出工程（レーン２）及び３０ｍＭのイミダゾール洗浄（レーン１）により回収された０．５μｇの精製済みＥ２タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥの銀染色。
【図３４】イミダゾールを除去することを意図した、図３３に示されている通りの２００ｍＭのイミダゾールにより回収された精製済みＥ２タンパク質の脱塩工程のＯＤプロフィール。
【図３５Ａ】ＬＩＡｓｃａｎ方法を用いて決定された、治療中及び治療後６～１２ヵ月後の期間にわたり追跡調査されたＮＲ及びＬＴＲについての異なるＨＣＶ抗原（コア１、コア２、Ｅ２ＨＣＶＲ、ＮＳ３）に対する抗体レベル。平均値は、白色正方形を伴う曲線によって表わされている。
【図３５Ｂ】ＬＩＡｓｃａｎ方法を用いて決定された、治療中及び治療後６～１２ヵ月後の期間にわたり追跡調査されたＮＲ及びＬＴＲについての異なるＨＣＶ抗原（ＮＳ４、ＮＳ５、Ｅ１及びＥ２）に対する抗体レベル。平均値は、白色正方形を伴う曲線によって表わされている。
【図３６】ＬＴＲ及びＮＲグループにおける平均Ｅ１抗体（Ｅ１Ａｂ）及びＥ２抗体（Ｅ２Ａｂ）レベル。
【図３７】１ｂ型及び３ａ型についての非応答者（ＮＲ）及び長期応答者（ＬＴＲ）の平均Ｅ１抗体（Ｅ１Ａｂ）レベル。
【図３８】抗－Ｅ２モノクローナル抗体の相対的地図の位置。
【図３９】ＨＣＶＥ１外被タンパク質の部分的脱グリコシル化。ｖｖＨＣＶ１０Ａに感染したＲＫ１３細胞の溶解産物をメーカーの指示事項に従って、異なる濃度のグリコシダーゼと共にインキュベートした。右図版：グリコペプチダーゼＦ（ＰＮＧａｓｅＦ）。左図版：エンドグリコシダーゼＨ（ＥｎｄｏＨ）。
【図４０】ＨＣＶＥ２外被タンパク質の部分的脱グリコシル化。ｖｖＨＣＶ６４感染（Ｅ２）及びｖｖＨＣＶ４１－感染（Ｅ２ｓ）ＲＫ１３細胞の溶解産物を、メーカーの指示事項に従って、異なる濃度のグリコペプチダーゼＦ（ＰＮＧａｓｅＦ）と共にインキュベートした。
【図４１】ＨＣＶＥ１糖タンパク質のインビトロ突然変異誘発。新しい制限部位の生成及び突然変異を受けた配列の地図。
【図４２Ａ】ＨＣＶＥ１糖タンパク質のインビトロ突然変異誘発（パート１）。ＰＣＲ増幅の第１工程。
【図４２Ｂ】ＨＣＶＥ１糖タンパク質のインビトロ突然変異誘発（パート２）。重複拡張及びネスト化されたＰＣＲ。
【図４３】ＨＣＶＥ１糖タンパク質のインビトロ突然変異誘発。第１の増幅工程中に合成されたＰＣＲ突然変異されたフラグメント（ＧＬＹ－＃及びＯＶＲ－＃）の地図。

【図４４Ａ】ＨｅＬａ（左）及びＲＫ１３（右）細胞の中で発現されたウェスタンブロットによるＥ１糖タンパク質突然変異体の分析。レーン１：野生型ＶＶ（ワクシニアウイルス）、レーン２：もとのＥ１タンパク質（ｖｖＨＣＶ－１０Ａ）、レーン３：Ｅ１突然変異体Ｇｌｙ－１（ｖｖＨＣＶ－８１）、レーン４：Ｅ１突然変異体Ｇｌｙ－２（ｖｖＨＣＶ－８２）、レーン５：Ｅ１突然変異体Ｇｌｙ－３（ｖｖＨＣＶ－８３）、レーン６：Ｅ１突然変異体Ｇｌｙ－４（ｖｖＨＣＶ－８４）、レーン７：Ｅ１突然変異体Ｇｌｙ－５（ｖｖＨＣＶ－８５）、レーン８：Ｅ１突然変異体Ｇｌｙ－６（ｖｖＨＣＶ－８６）。

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

【図４５】Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの中で発現された組換え型Ｅ２のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動。接種材料を、７２時間ロイシン選択培地内で増殖させ、完全培地中で１／１５に希釈した。２８℃で１０日間の培養の後、培地標本を採取した。Ｓｐｅｅｄｖａｃによって濃縮させた２００μｌの培養上清の当量を、ゲル上に投入した。２つの独立した形質転換体を分析した。

【図４６】グリコシル化欠損Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　突然変異体の中で発現された組換え型Ｅ２のＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動。接種材料を７２時間、ロイシン選択培地中で増殖させ、完全培地中で１／１５に希釈した。２８℃で１０日間の培養後、培養標本を採取した。イオン交換クロマトグラフィにより濃縮された培養上清３５０μｌの当量をゲル上に投入した。

【図４７】チンパンジーのプロフィールと免疫化計画。

【図４８】３回の免疫化の後の細胞応答。

【図４９】反復したＥ１免疫化の時点での細胞応答の推移。

【図５０】ＮＳ３免疫化時点での細胞応答。

【図５１】２８週目までの刺激指数。刺激指数（ＳＩ：細胞性免疫応答）は、３μｇの組換え型Ｅ１ｓ又は２μｇの破傷風トキソイドの存在下又は不在下で、免疫化前（０週目）、三回目の免疫化の２週間後（８週目）、追加抗原免疫化（２６週目）及び追加抗原免疫化の２週間後（２８週目）に個体から抜取られたＰＢＭＣ（10^5個の細胞）を培養し、５日間の培養後の１８時間のパルス中のこれらの細胞内に取込まれたトリチウム標識チミジンの量を決定することによって得られた。刺激指数というのは、外被抗原と共に培養された細胞内に取込まれたチミジン対抗原無しで培養されたものの比率である。０週目と８週目の標本は、１回目の検定（Ａ）で決定され、一方２６週目と２８週目の標本は、０週目の標本が再度分析された第２の検定（Ｂ）において決定された。結果は、全２０名（Ａ．実験）又は１９名（Ｂ．実験）の志願者の幾何平均刺激指数として表わされている。

【図５２】ＰＢＭＣのサイトカイン産生。追加抗原免疫化（２６週目）の前及び追加抗原免疫化の２週間後（２８週目）に個体から抜取られたＰＢＭＣ（10^5個の細胞）を、３μｇの組換え型Ｅ１ｓ（Ｅ１）又は２μｇの破傷風（ＴＴ）の存在下で又は抗原の全くない状態で（Ｂ１）培養した。２４時間後（インタロイキン－５）又は１２０時間後（インターフェロンガンマ）にＥＬＩＳＡを用いて取った上清の中で、サイトカインを測定した。刺激指数は、外被抗原と共に培養された細胞の上清内対抗原無しで培養されたものの上清内で測定したサイトカインの比率である。結果は、１９人の志願者すべてが分泌したｐｇサイトカイン／ｍｌの幾何平均として表現されている。検出限界より低いサイトカイン

量をもつ標本には、検出限界の値が割当てられた。同様にして、検定の線形範囲の外のきわめて高いサイトカイン濃度をもつ標本には、検定の線形範囲の限界の値が割当てられた。

【図５３】チミジン取込みの結果。刺激指数（細胞性免疫応答）は、ペプチドの存在下又は不在下でＰＢＭＣ（３×１０^{5}個の細胞）を培養し、５～６日の培養後パルス中にこれらの細胞内に取込まれたトリチウム標識チミジンの量を決定することによって得られた。刺激指数というのは、ペプチドと共に培養された細胞内に取込まれたチミジン対ペプチド無しで培養されたものの比率である。結果は、ワクチン接種された人（上の図版）又はワクチン接種を受けていない人又は対照（下の図版）についての個々の値として表現されている。

【図５４】個々の患者（各々１つのドットで表わされている）について、Ｘ軸にはＡＬＴレベルの変化％（基線からの絶対変化）、Ｙ軸には血清抗－Ｅ１抗体レベル（ｍＵ／ｍＬ単位）そしてＺ軸にはＩｓｈａｋ線維症評点の変化を示す３次元グラフである。

【図５５】個々の患者（各々１つのドットで表わされている）について、Ｘ軸にはＡＬＴレベルの変化％（基線からの絶対変化）、Ｙ軸には血清抗－Ｅ１抗体レベル（ｍＵ／ｍＬ単位）そしてＺ軸にはＭｅｔａｖｉｒ線維症評点の変化を示す３次元グラフである。

【図５６】（ドット又は「黒星」により表わされた）各々の個々の患者について、Ｉｓｈａｋ　線維症評点（Ｘ軸）及びＡＬＴ値（Ｙ軸）が示されている。図版Ａ（上）には、基線（ワクチン接種前）状況が示されており、一方図版Ｂ（下）は、肝臓生検材料の採取時における状況を例示している。血清抗－Ｅ１抗体レベルの最高の増加を示す７人の患者は、「黒星」により表わされている。

【図５７】Ｉｓｈａｋ線維症評点（Ｙ軸）に対する各々の個々の患者（ドット又は「黒星」により表わされている）の年齢（Ｘ軸）の影響が示されている。図版Ａ（上）には、基線（ワクチン接種前）状況が示されており、一方図版Ｂ（下）は、肝臓生検材料の採取時における状況を例示している。血清抗－Ｅ１抗体レベルの最高の増加を示す７人の患者は、「黒星」により表わされている。

【配列表】

Sequence Listing

<110> Innogenetics N.V.

<120> Purified hepatitis C virus envelope proteins for diagnostic and therapeutic use.

<140> PCT/EP02/00219
<160> 123

<170> PatentIn 3.1

<210> 1

<211> 21
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 1

ggcatgcaag cttaattaat t 21

<210> 2

<211> 68
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 2

ccggggaggc ctgcacgtga tcgagggcag acaccatcac caccatcact aatagttaat 60

taactgca 68

<210> 3

<211> 642
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..639

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..636

<400> 3

atg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct tta ctg tcc tgt 48
Met Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys
1 5 10 15

ctg acc att cca gct tcc gct tat gag gtg cgc aac gtg tcc ggg atg 96
Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met
20 25 30

```
tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg tat gag gca       144
Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala
      35                  40                  45

gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc gtt cgg gag       192
Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu
     50                  55                  60

aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg ctc gca gct       240
Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala
 65                  70                  75                  80

agg aac gcc agc gtc ccc acc acg aca ata cga cgc cac gtc gat ttg       288
Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu
                85                  90                  95

ctc gtt ggg gcg gct gct ctc tgt tcc gct atg tac gtg ggg gat ctc       336
Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu
           100                 105                 110

tgc gga tct gtc ttc ctc gtc tcc cag ctg ttc acc atc tcg cct cgc       384
Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg
       115                 120                 125

cgg cat gag acg gtg cag gac tgc aat tgc tca atc tat ccc ggc cac       432
Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His
    130                 135                 140

ata aca ggt cac cgt atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg tcg cct       480
Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro
145                 150                 155                 160

aca acg gcc ctg gtg gta tcg cag ctg ctc cgg atc cca caa gct gtc       528
Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val
                165                 170                 175

gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cat tgg gga gtc ctg gcg ggc ctc gcc       576
Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala
           180                 185                 190

tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg gct aag gtt ttg att gtg atg cta       624
Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu
       195                 200                 205

ctc ttt gct ctc taatag                                               642
Leu Phe Ala Leu
    210
```

<210> 4

<211> 212
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 4

```
Met Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys
  1               5                  10                  15
```

```
Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met
            20                  25                  30

Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala
        35                  40                  45

Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu
    50                  55                  60

Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala
65                  70                  75                  80

Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu
                85                  90                  95

Leu Val Gly Ala Ala Ala Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu
            100                 105                 110

Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg
        115                 120                 125

Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His
    130                 135                 140

Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro
145                 150                 155                 160

Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val
                165                 170                 175

Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala
            180                 185                 190

Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu
        195                 200                 205

Leu Phe Ala Leu
    210
```

<210> 5

<211> 795
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..792

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..789
<400> 5

```
atg ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc ggc ttc gcc gac ctc        48
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggc gct gcc agg        96
Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
```

```
            20                  25                  30

gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac ggc gtg aac tat gca       144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct ttg       192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

ctg tcc tgt ctg acc gtt cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg       240
Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg       288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc       336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg       384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc acc acg aca ata cga cgc cac       432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

gtc gat ttg ctc gtt ggg gcg gct gct ttc tgt tcc gct atg tac gtg       480
Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

ggg gac ctc tgc gga tct gtc ttc ctc gtc tcc cag ctg ttc acc atc       528
Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175
tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg cag gac tgc aat tgc tca atc tat       576
Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190

ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt atg gct tgg gat atg atg atg aac       624
Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

tgg tcg cct aca acg gcc ctg gtg gta tcg cag ctg ctc cgg atc cca       672
Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro
    210                 215                 220

caa gct gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cat tgg gga gtc ctg gcg       720
Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala
225                 230                 235                 240

ggt ctc gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg gct aag gtt ttg att       768
Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile
                245                 250                 255

gtg atg cta ctc ttt gct ccc taatag                                   795
Val Met Leu Leu Phe Ala Pro
            260
<210> 6
```

<211> 263
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 6

```
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175

Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro
    210                 215                 220

Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala
225                 230                 235                 240

Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile
                245                 250                 255

Val Met Leu Leu Phe Ala Pro
            260
```

<210> 7

<211> 633
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..630

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..627
<400> 7

```
atg ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt acg tgc ggc ttc gcc gac ctc        48
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

atg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggt gct gcc aga        96
Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gaa gac ggc gtg aac tat gca       144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg cct ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct tta       192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

ctg tcc tgt ctg acc att cca gct tcc gct tat gag gtg cgc aac gtg       240
Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg       288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc       336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg       384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc act acg aca ata cga cgc cac       432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

gtc gat ttg ctc gtt ggg gcg gct gct ttc tgt tcc gct atg tac gtg       480
Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

ggg gat ctc tgc gga tct gtc ttc ctc gtc tcc cag ctg ttc acc atc       528
Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175

tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg cag gac tgc aat tgc tca atc tat       576
Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190
```

```
ccc ggc cac ata aca ggt cac cgt atg gct tgg gat atg atg atg aac      624
Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

tgg taatag                                                        633
Trp
    210
```

<210> 8

<211> 209
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 8

```
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175

Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

Trp
```

<210> 9

<211> 483
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> CDS
<222> 1..480

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..477
<400> 9

```
atg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gcc ctg ctg tcc tgt        48
Met Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys
  1               5                  10                  15

ctg acc ata cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg tcc ggg gtg        96
Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val
             20                  25                  30

tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc ata gtg tat gag gca       144
Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala
         35                  40                  45

gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc gtt cgg gag       192
Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu
     50                  55                  60

ggc aac tcc tcc cgt tgc tgg gtg gcg ctc act ccc acg ctc gcg gcc       240
Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala
 65                  70                  75                  80

agg aac gcc agc gtc ccc aca acg aca ata cga cgc cac gtc gat ttg       288
Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu
                 85                  90                  95

ctc gtt ggg gct gct gct ttc tgt tcc gct atg tac gtg ggg gat ctc       336
Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu
            100                 105                 110

tgc gga tct gtt ttc ctt gtt tcc cag ctg ttc acc ttc tca cct cgc       384
Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg
        115                 120                 125

cgg cat caa aca gta cag gac tgc aac tgc tca atc tat ccc ggc cat       432
Arg His Gln Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His
    130                 135                 140

gta tca ggt cac cgc atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg tcc taatag     483
Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser
145                 150                 155                 160
```

<210> 10

<211> 159
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 10

```
Met Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys
  1               5                  10                  15

Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val
            20                  25                  30

Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala
         35                  40                  45

Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu
     50                  55                  60

Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala
 65                  70                  75                  80

Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu
                85                  90                  95

Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu
           100                 105                 110

Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg
       115                 120                 125

Arg His Gln Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His
    130                 135                 140

Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser
145                 150                 155
```

<210> 11

<211> 480
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..477

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..474
<400> 11

```
atg tcc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gcc ctg ctg tcc tgt        48
Met Ser Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys
  1               5                  10                  15

ctg acc ata cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg tcc ggg gtg        96
Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val
            20                  25                  30

tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc ata gtg tat gag gca       144
Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala
         35                  40                  45

gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc gtt cgg gag       192
Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu
```

```
     50                  55                  60

ggc aac tcc tcc cgt tgc tgg gtg gcg ctc act ccc acg ctc gcg gcc       240
Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala
 65                  70                  75                  80

agg aac gcc agc gtc ccc aca acg aca ata cga cgc cac gtc gat ttg       288
Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu
                 85                  90                  95

ctc gtt ggg gct gct gct ttc tgt tcc gct atg tac gtg ggg gat ctc       336
Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu
            100                 105                 110

tgc gga tct gtt ttc ctt gtt tcc cag ctg ttc acc ttc tca cct cgc       384
Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg
        115                 120                 125

cgg cat caa aca gta cag gac tgc aac tgc tca atc tat ccc ggc cat       432
Arg His Gln Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His
    130                 135                 140

gta tca ggt cac cgc atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg taatag       480
Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
145                 150                 155
<210> 12

<211> 158
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 12

Met Ser Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys
  1               5                  10                  15

Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Val
             20                  25                  30

Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala
         35                  40                  45

Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu
     50                  55                  60

Gly Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala
 65                  70                  75                  80

Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu
                 85                  90                  95

Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu
            100                 105                 110

Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg
        115                 120                 125

Arg His Gln Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His
    130                 135                 140
```

```
Val Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
145                 150                 155
<210> 13

<211> 636
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..633

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..630

<400> 13

atg ctg ggt aag gcc atc gat acc ctt acg tgc ggc ttc gcc gac ctc        48
Met Leu Gly Lys Ala Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15
gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggc gct gcc agg        96
Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gaa gac ggc gtg aac tat gca       144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg cct ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct tta       192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60
ctg tcc tgt cta acc att cca gct tcc gct tac gag gtg cgc aac gtg       240
Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg       288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc       336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg       384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

ctc gcg gct agg aac gcc agc atc ccc act aca aca ata cga cgc cac       432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Ile Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

gtc gat ttg ctc gtt ggg gcg gct gct ttc tgt tcc gct atg tac gtg       480
Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

ggg gat ctc tgc gga tct gtc ttc ctc gtc tcc cag ctg ttc acc atc       528
Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175
```

```
tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg cag gac tgc aat tgc tca atc tat      576
Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190

ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt atg gct tgg gat atg atg atg aac      624
Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

tgg tac taatag                                                      640
Trp Tyr
    210
```

<210> 14

<211> 210
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 14

```
Met Leu Gly Lys Ala Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Ile Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175

Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

Trp Tyr
```

210
<210> 15

<211> 26
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
<400> 15

atgcccggtt gctctttctc tatctt 26

<210> 16

<211> 26
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 16

atgttgggta aggtcatcga taccct 26

<210> 17

<211> 30
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> misc_feature
<223>/note="antisense"

<400> 17

ctattaggac cagttcatca tcatatccca 30

<210> 18

<211> 27
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 18

ctattaccag ttcatcatca tatccca 27

<210> 19

<211> 36
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
<400> 19

atacgacgcc acgtcgattc ccagctgttc accatc 36

<210> 20

<211> 36
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> misc_feature
<223>/note="antisense"

<400> 20

gatggtgaac agctgggaat cgacgtggcg tcgtat 36

<210> 21

<211> 723
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..720

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..717
<400> 21

```
atg ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc ggc ttc gcc gac ctc      48
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggc gct gcc agg      96
Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac ggc gtg aac tat gca     144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct ttg     192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

ctg tcc tgt ctg acc gtt cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg     240
Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg     288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc     336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg     384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc acc acg aca ata cga cgc cac     432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
```

```
    130                 135                 140
gtc gat tcc cag ctg ttc acc atc tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg       480
Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
145                 150                 155                 160

cag gac tgc aat tgc tca atc tat ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt       528
Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg tcg cct aca acg gcc ctg gtg       576
Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
            180                 185                 190

gta tcg cag ctg ctc cgg atc cca caa gct gtc gtg gac atg gtg gcg       624
Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala
        195                 200                 205

ggg gcc cat tgg gga gtc ctg gcg ggt ctc gcc tac tat tcc atg gtg       672
Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val
    210                 215                 220

ggg aac tgg gct aag gtt ttg att gtg atg cta ctc ttt gct ccc taatag    723
Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Pro
225                 230                 235                 240
<210> 22

<211> 239
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 22

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
```

```
145                 150                 155                 160

Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
            180                 185                 190

Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala
        195                 200                 205

Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val
    210                 215                 220

Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Ile Val Met Leu Leu Phe Ala Pro
225                 230                 235
<210> 23

<211> 561
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..558

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..555
<400> 23

atg ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc ggc ttc gcc gac ctc      48
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggc gct gcc agg      96
Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac ggc gtg aac tat gca     144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct ttg     192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

ctg tcc tgt ctg acc gtt cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg     240
Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg     288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc     336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg     384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
```

```
        115                 120                 125

ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc acc acg aca ata cga cgc cac      432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

gtc gat tcc cag ctg ttc acc atc tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg      480
Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
145                 150                 155                 160

cag gac tgc aat tgc tca atc tat ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt      528
Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg taatag                          561
Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
            180                 185
<210> 24

<211> 185
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 24

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
145                 150                 155                 160

Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
            180                 185
```

<210> 25

<211> 606
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..603

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..600
<400> 25

```
atg ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc ggc ttc gcc gac ctc        48
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggc gct gcc agg        96
Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac ggc gtg aac tat gca       144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct ttg       192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

ctg tcc tgt ctg acc gtt cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg       240
Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg       288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc       336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg       384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc acc acg aca ata cga cgc cac       432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

gtc gat tcc cag ctg ttc acc atc tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg       480
Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
145                 150                 155                 160

cag gac tgc aat tgc tca atc tat ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt       528
Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg tcg cct aca acg gcc ctg gtg       576
Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
```

```
            180                 185                 190

gta tcg cag ctg ctc cgg atc ctc taatag                                  606
Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Leu
        195                 200
<210> 26

<211> 200
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 26

Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
145                 150                 155                 160

Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
            180                 185                 190

Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Leu
        195                 200
<210> 27

<211> 636
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..633
```

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..630
<400> 27

```
atg ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc ggc ttc gcc gac ctc        48
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggc gct gcc agg        96
Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac ggc gtg aac tat gca       144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct ttg       192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

ctg tcc tgt ctg acc gtt cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg       240
Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg       288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc       336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg       384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc acc acg aca ata cga cgc cac       432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

gtc gat tcc cag ctg ttc acc atc tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg       480
Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
145                 150                 155                 160

cag gac tgc aat tgc tca atc tat ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt       528
Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg tcg cct aca acg gcc ctg gtg       576
Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
            180                 185                 190

gta tcg cag ctg ctc cgg atc gtg atc gag ggc aga cac cat cac cac       624
Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Val Ile Glu Gly Arg His His His His
        195                 200                 205

cat cac taatag                                                       636
His His
    210
```

<210> 28

<211> 210
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 28

```
Met Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val
145                 150                 155                 160

Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
                165                 170                 175

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
            180                 185                 190

Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Val Ile Glu Gly Arg His His His His
        195                 200                 205

His His
    210
```

<210> 29

<211> 630
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> CDS
<222> 1..627

<220>
<221> mat_peptide

<222> 1..624
<400> 29

```
atg ggt aag gtc atc gat acc ctt acg tgc gga ttc gcc gat ctc atg        48
Met Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met
  1               5                  10                  15

ggg tac atc ccg ctc gtc ggc gct ccc gta gga ggc gtc gca aga gcc        96
Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Val Gly Gly Val Ala Arg Ala
             20                  25                  30

ctt gcg cat ggc gtg agg gcc ctt gaa gac ggg ata aat ttc gca aca       144
Leu Ala His Gly Val Arg Ala Leu Glu Asp Gly Ile Asn Phe Ala Thr
         35                  40                  45

ggg aat ttg ccc ggt tgc tcc ttt tct att ttc ctt ctc gct ctg ttc       192
Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Phe
     50                  55                  60

tct tgc tta att cat cca gca gct agt cta gag tgg cgg aat acg tct       240
Ser Cys Leu Ile His Pro Ala Ala Ser Leu Glu Trp Arg Asn Thr Ser
 65                  70                  75                  80

ggc ctc tat gtc ctt acc aac gac tgt tcc aat agc agt att gtg tac       288
Gly Leu Tyr Val Leu Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr
                 85                  90                  95

gag gcc gat gac gtt att ctg cac aca ccc ggc tgc ata cct tgt gtc       336
Glu Ala Asp Asp Val Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Ile Pro Cys Val
            100                 105                 110

cag gac ggc aat aca tcc acg tgc tgg acc cca gtg aca cct aca gtg       384
Gln Asp Gly Asn Thr Ser Thr Cys Trp Thr Pro Val Thr Pro Thr Val
        115                 120                 125

gca gtc aag tac gtc gga gca acc acc gct tcg ata cgc agt cat gtg       432
Ala Val Lys Tyr Val Gly Ala Thr Thr Ala Ser Ile Arg Ser His Val
    130                 135                 140

gac cta tta gtg ggc gcg gcc acg atg tgc tct gcg ctc tac gtg ggt       480
Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Thr Met Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly
145                 150                 155                 160

gac atg tgt ggg gct gtc ttc ctc gtg gga caa gcc ttc acg ttc aga       528
Asp Met Cys Gly Ala Val Phe Leu Val Gly Gln Ala Phe Thr Phe Arg
                165                 170                 175

cct cgt cgc cat caa acg gtc cag acc tgt aac tgc tcg ctg tac cca       576
Pro Arg Arg His Gln Thr Val Gln Thr Cys Asn Cys Ser Leu Tyr Pro
            180                 185                 190

ggc cat ctt tca gga cat cga atg gct tgg gat atg atg atg aac tgg       624
Gly His Leu Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
        195                 200                 205

taatag                                                               634
```

<210> 30

<211> 208
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 30

```
Met Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met
  1               5                  10                  15

Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Val Gly Gly Val Ala Arg Ala
             20                  25                  30

Leu Ala His Gly Val Arg Ala Leu Glu Asp Gly Ile Asn Phe Ala Thr
         35                  40                  45

Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Phe
     50                  55                  60

Ser Cys Leu Ile His Pro Ala Ala Ser Leu Glu Trp Arg Asn Thr Ser
 65                  70                  75                  80

Gly Leu Tyr Val Leu Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr
                 85                  90                  95

Glu Ala Asp Asp Val Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Ile Pro Cys Val
            100                 105                 110

Gln Asp Gly Asn Thr Ser Thr Cys Trp Thr Pro Val Thr Pro Thr Val
        115                 120                 125

Ala Val Lys Tyr Val Gly Ala Thr Thr Ala Ser Ile Arg Ser His Val
    130                 135                 140

Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Thr Met Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly
145                 150                 155                 160

Asp Met Cys Gly Ala Val Phe Leu Val Gly Gln Ala Phe Thr Phe Arg
                165                 170                 175

Pro Arg Arg His Gln Thr Val Gln Thr Cys Asn Cys Ser Leu Tyr Pro
            180                 185                 190

Gly His Leu Ser Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
        195                 200                 205
```

<210> 31

<211> 630
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..627

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..624
<400> 31

```
atg ggt aag gtc atc gat acc cta acg tgc gga ttc gcc gat ctc atg        48
Met Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met
  1               5                  10                  15
```

```
ggg tat atc ccg ctc gta ggc ggc ccc att ggg ggc gtc gca agg gct        96
Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Gly Pro Ile Gly Gly Val Ala Arg Ala
            20                  25                  30

ctc gca cac ggt gtg agg gtc ctt gag gac ggg gta aac tat gca aca       144
Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr
        35                  40                  45

ggg aat tta ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttt att ctt gct ctt ctc       192
Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Ile Leu Ala Leu Leu
    50                  55                  60

tcg tgt ctg acc gtt ccg gcc tct gca gtt ccc tac cga aat gcc tct       240
Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Tyr Arg Asn Ala Ser
65                  70                  75                  80

ggg att tat cat gtt acc aat gat tgc cca aac tct tcc ata gtc tat       288
Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr
                85                  90                  95

gag gca gat aac ctg atc cta cac gca cct ggt tgc gtg cct tgt gtc       336
Glu Ala Asp Asn Leu Ile Leu His Ala Pro Gly Cys Val Pro Cys Val
            100                 105                 110

atg aca ggt aat gtg agt aga tgc tgg gtc caa att acc cct aca ctg       384
Met Thr Gly Asn Val Ser Arg Cys Trp Val Gln Ile Thr Pro Thr Leu
        115                 120                 125

tca gcc ccg agc ctc gga gca gtc acg gct cct ctt cgg aga gcc gtt       432
Ser Ala Pro Ser Leu Gly Ala Val Thr Ala Pro Leu Arg Arg Ala Val
    130                 135                 140

gac tac cta gcg gga ggg gct gcc ctc tgc tcc gcg tta tac gta gga       480
Asp Tyr Leu Ala Gly Gly Ala Ala Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly
145                 150                 155                 160

gac gcg tgt ggg gca cta ttc ttg gta ggc caa atg ttc acc tat agg       528
Asp Ala Cys Gly Ala Leu Phe Leu Val Gly Gln Met Phe Thr Tyr Arg
                165                 170                 175

cct cgc cag cac gct acg gtg cag aac tgc aac tgt tcc att tac agt       576
Pro Arg Gln His Ala Thr Val Gln Asn Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Ser
            180                 185                 190

ggc cat gtt acc ggc cac cgg atg gca tgg gat atg atg atg aac tgg       624
Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
        195                 200                 205

taatag                                                               630
```

<210> 32
<211> 208
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 32

```
Met Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met
  1               5                  10                  15
```

```
Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Gly Pro Ile Gly Gly Val Ala Arg Ala
            20                  25                  30

Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr
        35                  40                  45

Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Ile Leu Ala Leu Leu
    50                  55                  60

Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Val Pro Tyr Arg Asn Ala Ser
65                  70                  75                  80

Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr
                85                  90                  95

Glu Ala Asp Asn Leu Ile Leu His Ala Pro Gly Cys Val Pro Cys Val
            100                 105                 110

Met Thr Gly Asn Val Ser Arg Cys Trp Val Gln Ile Thr Pro Thr Leu
        115                 120                 125

Ser Ala Pro Ser Leu Gly Ala Val Thr Ala Pro Leu Arg Arg Ala Val
    130                 135                 140

Asp Tyr Leu Ala Gly Gly Ala Ala Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly
145                 150                 155                 160

Asp Ala Cys Gly Ala Leu Phe Leu Val Gly Gln Met Phe Thr Tyr Arg
                165                 170                 175

Pro Arg Gln His Ala Thr Val Gln Asn Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Ser
            180                 185                 190

Gly His Val Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
        195                 200                 205
<210> 33

<211> 23
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
<400> 33
tgggatatga tgatgaactg gtc                                          23


<210> 34

<211> 30
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
<400> 34

ctattatggt ggtaagccac agagcaggag                                   30


<210> 35

<211> 1476
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus
```

<220>
<221> CDS
<222> 1..1473

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..1470
<400> 35

```
tgg gat atg atg atg aac tgg tcg cct aca acg gcc ctg gtg gta tcg        48
Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser
  1               5                  10                  15

cag ctg ctc cgg atc cca caa gct gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc        96
Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala
             20                  25                  30

cat tgg gga gtc ctg gcg ggc ctc gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac       144
His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn
         35                  40                  45

tgg gct aag gtt ttg gtt gtg atg cta ctc ttt gcc ggc gtc gac ggg       192
Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly
     50                  55                  60

cat acc cgc gtg tca gga ggg gca gca gcc tcc gat acc agg ggc ctt       240
His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu
 65                  70                  75                  80

gtg tcc ctc ttt agc ccc ggg tcg gct cag aaa atc cag ctc gta aac       288
Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
                 85                  90                  95

acc aac ggc agt tgg cac atc aac agg act gcc ctg aac tgc aac gac       336
Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
            100                 105                 110

tcc ctc caa aca ggg ttc ttt gcc gca cta ttc tac aaa cac aaa ttc       384
Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe
        115                 120                 125

aac tcg tct gga tgc cca gag cgc ttg gcc agc tgt cgc tcc atc gac       432
Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp
    130                 135                 140

aag ttc gct cag ggg tgg ggt ccc ctc act tac act gag cct aac agc       480
Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser
145                 150                 155                 160

tcg gac cag agg ccc tac tgc tgg cac tac gcg cct cga ccg tgt ggt       528
Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
                165                 170                 175

att gta ccc gcg tct cag gtg tgc ggt cca gtg tat tgc ttc acc ccg       576
Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
            180                 185                 190

agc cct gtt gtg gtg ggg acg acc gat cgg ttt ggt gtc ccc acg tat       624
Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr
        195                 200                 205
```

```
aac tgg ggg gcg aac gac tcg gat gtg ctg att ctc aac aac acg cgg      672
Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg
    210                 215                 220

ccg ccg cga ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg aat ggc act ggg      720
Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly
225                 230                 235                 240

ttc acc aag acg tgt ggg ggc ccc ccg tgc aac atc ggg ggg gcc ggc      768
Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly
                245                 250                 255

aac aac acc ttg acc tgc ccc act gac tgt ttt cgg aag cac ccc gag      816
Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
            260                 265                 270

gcc acc tac gcc aga tgc ggt tct ggg ccc tgg ctg aca cct agg tgt      864
Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
        275                 280                 285

atg gtt cat tac cca tat agg ctc tgg cac tac ccc tgc act gtc aac      912
Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
    290                 295                 300

ttc acc atc ttc aag gtt agg atg tac gtg ggg ggc gtg gag cac agg      960
Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
305                 310                 315                 320

ttc gaa gcc gca tgc aat tgg act cga gga gag cgt tgt gac ttg gag     1008
Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
                325                 330                 335

gac agg gat aga tca gag ctt agc ccg ctg ctg ctg tct aca aca gag     1056
Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
            340                 345                 350

tgg cag ata ctg ccc tgt tcc ttc acc acc ctg ccg gcc cta tcc acc     1104
Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
        355                 360                 365

ggc ctg atc cac ctc cat cag aac atc gtg gac gtg caa tac ctg tac     1152
Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
    370                 375                 380

ggt gta ggg tcg gcg gtt gtc tcc ctt gtc atc aaa tgg gag tat gtc     1200
Gly Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val
385                 390                 395                 400

ctg ttg ctc ttc ctt ctc ctg gca gac gcg cgc atc tgc gcc tgc tta     1248
Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ala Cys Leu
                405                 410                 415

tgg atg atg ctg ctg ata gct caa gct gag gcc gcc tta gag aac ctg     1296
Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu
            420                 425                 430

gtg gtc ctc aat gcg gcg gcc gtg gcc ggg gcg cat ggc act ctt tcc     1344
Val Val Leu Asn Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala His Gly Thr Leu Ser
        435                 440                 445

ttc ctt gtg ttc ttc tgt gct gcc tgg tac atc aag ggc agg ctg gtc     1392
```

```
Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val
    450                 455                 460

cct ggt gcg gca tac gcc ttc tat ggc gtg tgg ccg ctg ctc ctg ctt      1440
Pro Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu
465                 470                 475                 480

ctg ctg gcc tta cca cca cga gct tat gcc tagtaa                      1476
Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala
                485                 490
<210> 36

<211> 490
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 36

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser
  1               5                  10                  15

Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala
            20                  25                  30

His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn
        35                  40                  45

Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly
    50                  55                  60

His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu
65                  70                  75                  80

Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn
                85                  90                  95

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
            100                 105                 110

Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe
        115                 120                 125
Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp
    130                 135                 140

Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser
145                 150                 155                 160

Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
                165                 170                 175

Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
            180                 185                 190

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr
        195                 200                 205

Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg
    210                 215                 220

Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly
```

225 230 235 240

Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly
245 250 255

Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
260 265 270

Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
275 280 285

Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
290 295 300

Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
305 310 315 320

Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
325 330 335

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
340 345 350

Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
355 360 365

Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
370 375 380

Gly Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val
385 390 395 400

Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ala Cys Leu
405 410 415

Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu
420 425 430

Val Val Leu Asn Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala His Gly Thr Leu Ser
435 440 445

Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val
450 455 460

Pro Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu
465 470 475 480

Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala
485 490

<210> 37

<211> 1021
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 2..1018

<220>
<221> mat_peptide
<222> 2..1015
<400> 37

```
g atc cca caa gct gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cat tgg gga          46
  Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly
    1               5                  10                  15

gtc ctg gcg ggc ctc gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg gct aag         94
Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys
                20                  25                  30

gtt ttg gtt gtg atg cta ctc ttt gcc ggc gtc gac ggg cat acc cgc        142
Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg
            35                  40                  45

gtg tca gga ggg gca gca gcc tcc gat acc agg ggc ctt gtg tcc ctc        190
Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu
        50                  55                  60

ttt agc ccc ggg tcg gct cag aaa atc cag ctc gta aac acc aac ggc        238
Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly
    65                  70                  75

agt tgg cac atc aac agg act gcc ctg aac tgc aac gac tcc ctc caa        286
Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln
80                  85                  90                  95

aca ggg ttc ttt gcc gca cta ttc tac aaa cac aaa ttc aac tcg tct        334
Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser
                100                 105                 110

gga tgc cca gag cgc ttg gcc agc tgt cgc tcc atc gac aag ttc gct        382
Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala
            115                 120                 125

cag ggg tgg ggt ccc ctc act tac act gag cct aac agc tcg gac cag        430
Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln
        130                 135                 140

agg ccc tac tgc tgg cac tac gcg cct cga ccg tgt ggt att gta ccc        478
Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro
    145                 150                 155

gcg tct cag gtg tgc ggt cca gtg tat tgc ttc acc ccg agc cct gtt        526
Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val
160                 165                 170                 175
gtg gtg ggg acg acc gat cgg ttt ggt gtc ccc acg tat aac tgg ggg        574
Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly
                180                 185                 190

gcg aac gac tcg gat gtg ctg att ctc aac aac acg cgg ccg ccg cga        622
Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg
            195                 200                 205

ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg aat ggc act ggg ttc acc aag        670
Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys
        210                 215                 220

acg tgt ggg ggc ccc ccg tgc aac atc ggg ggg gcc ggc aac aac acc        718
```

```
Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr
    225                 230                 235

ttg acc tgc ccc act gac tgt ttt cgg aag cac ccc gag gcc acc tac      766
Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr
240                 245                 250                 255

gcc aga tgc ggt tct ggg ccc tgg ctg aca cct agg tgt atg gtt cat      814
Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His
                260                 265                 270

tac cca tat agg ctc tgg cac tac ccc tgc act gtc aac ttc acc atc      862
Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile
            275                 280                 285

ttc aag gtt agg atg tac gtg ggg ggc gtg gag cac agg ttc gaa gcc      910
Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala
        290                 295                 300

gca tgc aat tgg act cga gga gag cgt tgt gac ttg gag gac agg gat      958
Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp
    305                 310                 315

aga tca gag ctt agc ccg ctg ctg ctg tct aca aca gag tgg cag agt     1006
Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ser
320                 325                 330                 335

ggc aga gct taatta                                                 1021
Gly Arg Ala
```

<210> 38

<211> 338
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 38

```
Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val
  1               5                  10                  15

Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val
             20                  25                  30

Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val
         35                  40                  45

Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe
     50                  55                  60

Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser
 65                  70                  75                  80

Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr
                 85                  90                  95

Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly
            100                 105                 110

Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln
```

```
        115                 120                 125

Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg
    130                 135                 140

Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala
145                 150                 155                 160

Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val
                165                 170                 175

Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala
            180                 185                 190

Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly
        195                 200                 205

Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr
    210                 215                 220

Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu
225                 230                 235                 240

Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala
                245                 250                 255

Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr
            260                 265                 270

Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe
        275                 280                 285

Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala
    290                 295                 300

Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg
305                 310                 315                 320

Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ser Gly
                325                 330                 335

Arg Ala


<210> 39

<211> 1034
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 2..1032

<220>
<221> mat_peptide
<222> 2..1029
<400> 39

g atc cca caa gct gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cat tgg gga          46
```

```
  Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly
    1               5                  10                  15

gtc ctg gcg ggc ctc gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg gct aag        94
Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys
                20                  25                  30

gtt ttg gtt gtg atg cta ctc ttt gcc ggc gtc gac ggg cat acc cgc       142
Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg
            35                  40                  45

gtg tca gga ggg gca gca gcc tcc gat acc agg ggc ctt gtg tcc ctc       190
Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu
        50                  55                  60

ttt agc ccc ggg tcg gct cag aaa atc cag ctc gta aac acc aac ggc       238
Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly
    65                  70                  75

agt tgg cac atc aac agg act gcc ctg aac tgc aac gac tcc ctc caa       286
Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln
80                  85                  90                  95

aca ggg ttc ttt gcc gca cta ttc tac aaa cac aaa ttc aac tcg tct       334
Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser
                100                 105                 110

gga tgc cca gag cgc ttg gcc agc tgt cgc tcc atc gac aag ttc gct       382
Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala
            115                 120                 125

cag ggg tgg ggt ccc ctc act tac act gag cct aac agc tcg gac cag       430
Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln
        130                 135                 140

agg ccc tac tgc tgg cac tac gcg cct cga ccg tgt ggt att gta ccc       478
Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro
    145                 150                 155

gcg tct cag gtg tgc ggt cca gtg tat tgc ttc acc ccg agc cct gtt       526
Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val
160                 165                 170                 175

gtg gtg ggg acg acc gat cgg ttt ggt gtc ccc acg tat aac tgg ggg       574
Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly
                180                 185                 190

gcg aac gac tcg gat gtg ctg att ctc aac aac acg cgg ccg ccg cga       622
Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg
            195                 200                 205

ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg aat ggc act ggg ttc acc aag       670
Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys
        210                 215                 220

acg tgt ggg ggc ccc ccg tgc aac atc ggg ggg gcc ggc aac aac acc       718
Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr
    225                 230                 235
ttg acc tgc ccc act gac tgt ttt cgg aag cac ccc gag gcc acc tac       766
Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr
240                 245                 250                 255
```

```
gcc aga tgc ggt tct ggg ccc tgg ctg aca cct agg tgt atg gtt cat      814
Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His
               260                 265                 270

tac cca tat agg ctc tgg cac tac ccc tgc act gtc aac ttc acc atc      862
Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile
           275                 280                 285

ttc aag gtt agg atg tac gtg ggg ggc gtg gag cac agg ttc gaa gcc      910
Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala
       290                 295                 300

gca tgc aat tgg act cga gga gag cgt tgt gac ttg gag gac agg gat      958
Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp
   305                 310                 315

aga tca gag ctt agc ccg ctg ctg ctg tct aca aca ggt gat cga ggg     1006
Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gly Asp Arg Gly
320                 325                 330                 335

cag aca cca tca cca cca tca cta at ag                               1034
Gln Thr Pro Ser Pro Pro Ser Leu
               340
<210> 40

<211> 343
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 40

Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val
  1               5                  10                  15

Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val
            20                  25                  30

Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val
        35                  40                  45

Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe
    50                  55                  60

Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser
65                  70                  75                  80

Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr
                85                  90                  95

Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly
            100                 105                 110

Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln
        115                 120                 125

Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg
    130                 135                 140

Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala
```

```
145                 150                 155                 160
Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val
                165                 170                 175

Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala
            180                 185                 190

Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly
        195                 200                 205

Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr
    210                 215                 220

Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu
225                 230                 235                 240

Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala
                245                 250                 255

Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr
            260                 265                 270

Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe
        275                 280                 285

Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala
    290                 295                 300

Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg
305                 310                 315                 320

Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gly Asp Arg Gly Gln
                325                 330                 335

Thr Pro Ser Pro Pro Ser Leu
            340
<210> 41

<211> 945
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..942

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..939
<400> 41

atg gtg ggg aac tgg gct aag gtt ttg gtt gtg atg cta ctc ttt gcc      48
Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala
  1               5                  10                  15

ggc gtc gac ggg cat acc cgc gtg tca gga ggg gca gca gcc tcc gat      96
Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp
             20                  25                  30

acc agg ggc ctt gtg tcc ctc ttt agc ccc ggg tcg gct cag aaa atc     144
Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile
```

```
        35                  40                  45

cag ctc gta aac acc aac ggc agt tgg cac atc aac agg act gcc ctg      192
Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu
     50                  55                  60

aac tgc aac gac tcc ctc caa aca ggg ttc ttt gcc gca cta ttc tac      240
Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr
 65                  70                  75                  80

aaa cac aaa ttc aac tcg tct gga tgc cca gag cgc ttg gcc agc tgt      288
Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys
                85                  90                  95

cgc tcc atc gac aag ttc gct cag ggg tgg ggt ccc ctc act tac act      336
Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr
            100                 105                 110

gag cct aac agc tcg gac cag agg ccc tac tgc tgg cac tac gcg cct      384
Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro
        115                 120                 125

cga ccg tgt ggt att gta ccc gcg tct cag gtg tgc ggt cca gtg tat      432
Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr
    130                 135                 140

tgc ttc acc ccg agc cct gtt gtg gtg ggg acg acc gat cgg ttt ggt      480
Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly
145                 150                 155                 160

gtc ccc acg tat aac tgg ggg gcg aac gac tcg gat gtg ctg att ctc      528
Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu
                165                 170                 175

aac aac acg cgg ccg ccg cga ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg      576
Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
            180                 185                 190

aat ggc act ggg ttc acc aag acg tgt ggg ggc ccc ccg tgc aac atc      624
Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile
        195                 200                 205

ggg ggg gcc ggc aac aac acc ttg acc tgc ccc act gac tgt ttt cgg      672
Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg
    210                 215                 220

aag cac ccc gag gcc acc tac gcc aga tgc ggt tct ggg ccc tgg ctg      720
Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu
225                 230                 235                 240

aca cct agg tgt atg gtt cat tac cca tat agg ctc tgg cac tac ccc      768
Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro
                245                 250                 255

tgc act gtc aac ttc acc atc ttc aag gtt agg atg tac gtg ggg ggc      816
Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly
            260                 265                 270

gtg gag cac agg ttc gaa gcc gca tgc aat tgg act cga gga gag cgt      864
Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg
        275                 280                 285
```

```
tgt gac ttg gag gac agg gat aga tca gag ctt agc ccg ctg ctg ctg      912
Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu
    290                 295                 300
tct aca aca gag tgg cag agc tta att aat tag                        945
Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ser Leu Ile Asn
305                 310
<210> 42

<211> 314
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 42

Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala
  1               5                  10                  15

Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp
             20                  25                  30

Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile
         35                  40                  45

Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu
     50                  55                  60

Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr
 65                  70                  75                  80

Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys
                 85                  90                  95

Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr
            100                 105                 110

Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro
        115                 120                 125

Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr
    130                 135                 140

Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly
145                 150                 155                 160

Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu
                165                 170                 175

Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
            180                 185                 190

Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile
        195                 200                 205

Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg
    210                 215                 220

Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu
225                 230                 235                 240
```

```
Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro
                245                 250                 255

Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly
            260                 265                 270

Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg
        275                 280                 285
Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu
    290                 295                 300

Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ser Leu Ile Asn
305                 310
```

<210> 43

<211> 961
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..958

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..955
<400> 43

```
atg gtg ggg aac tgg gct aag gtt ttg gtt gtg atg cta ctc ttt gcc        48
Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala
  1               5                  10                  15

ggc gtc gac ggg cat acc cgc gtg tca gga ggg gca gca gcc tcc gat        96
Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp
             20                  25                  30

acc agg ggc ctt gtg tcc ctc ttt agc ccc ggg tcg gct cag aaa atc       144
Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile
         35                  40                  45

cag ctc gta aac acc aac ggc agt tgg cac atc aac agg act gcc ctg       192
Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu
     50                  55                  60

aac tgc aac gac tcc ctc caa aca ggg ttc ttt gcc gca cta ttc tac       240
Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr
 65                  70                  75                  80

aaa cac aaa ttc aac tcg tct gga tgc cca gag cgc ttg gcc agc tgt       288
Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys
                 85                  90                  95

cgc tcc atc gac aag ttc gct cag ggg tgg ggt ccc ctc act tac act       336
Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr
            100                 105                 110

gag cct aac agc tcg gac cag agg ccc tac tgc tgg cac tac gcg cct       384
Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro
        115                 120                 125
```

```
cga ccg tgt ggt att gta ccc gcg tct cag gtg tgc ggt cca gtg tat       432
Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr
    130                 135                 140

tgc ttc acc ccg agc cct gtt gtg gtg ggg acg acc gat cgg ttt ggt       480
Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly
145                 150                 155                 160

gtc ccc acg tat aac tgg ggg gcg aac gac tcg gat gtg ctg att ctc       528
Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu
                165                 170                 175

aac aac acg cgg ccg ccg cga ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg       576
Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
            180                 185                 190

aat ggc act ggg ttc acc aag acg tgt ggg ggc ccc ccg tgc aac atc       624
Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile
        195                 200                 205

ggg ggg gcc ggc aac aac acc ttg acc tgc ccc act gac tgt ttt cgg       672
Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg
    210                 215                 220

aag cac ccc gag gcc acc tac gcc aga tgc ggt tct ggg ccc tgg ctg       720
Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu
225                 230                 235                 240

aca cct agg tgt atg gtt cat tac cca tat agg ctc tgg cac tac ccc       768
Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro
                245                 250                 255

tgc act gtc aac ttc acc atc ttc aag gtt agg atg tac gtg ggg ggc       816
Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly
            260                 265                 270

gtg gag cac agg ttc gaa gcc gca tgc aat tgg act cga gga gag cgt       864
Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg
        275                 280                 285

tgt gac ttg gag gac agg gat aga tca gag ctt agc ccg ctg ctg ctg       912
Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu
    290                 295                 300

tct aca aca ggt gat cga ggg cag aca cca tca cca cca tca cta a         958
Ser Thr Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Pro Ser Pro Pro Ser Leu
305                 310                 315

tag                                                                  961
<210> 44

<211> 319
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 44

Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala
  1               5                  10                  15
```

```
Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp
            20                  25                  30

Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile
        35                  40                  45

Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu
    50                  55                  60

Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr
65                  70                  75                  80

Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys
                85                  90                  95

Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr
            100                 105                 110

Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro
        115                 120                 125

Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr
    130                 135                 140

Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly
145                 150                 155                 160

Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu
                165                 170                 175

Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
            180                 185                 190

Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile
        195                 200                 205

Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg
    210                 215                 220

Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu
225                 230                 235                 240

Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro
                245                 250                 255

Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly
            260                 265                 270

Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg
        275                 280                 285

Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu
    290                 295                 300

Ser Thr Thr Gly Asp Arg Gly Gln Thr Pro Ser Pro Pro Ser Leu
305                 310                 315
```

<210> 45

<211> 1395
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..1392

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..1389
<400> 45

```
atg gtg gcg ggg gcc cat tgg gga gtc ctg gcg ggc ctc gcc tac tat        48
Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr
  1               5                  10                  15

tcc atg gtg ggg aac tgg gct aag gtt ttg gtt gtg atg cta ctc ttt        96
Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe
             20                  25                  30

gcc ggc gtc gac ggg cat acc cgc gtg tca gga ggg gca gca gcc tcc       144
Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser
         35                  40                  45

gat acc agg ggc ctt gtg tcc ctc ttt agc ccc ggg tcg gct cag aaa       192
Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys
     50                  55                  60

atc cag ctc gta aac acc aac ggc agt tgg cac atc aac agg act gcc       240
Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala
 65                  70                  75                  80

ctg aac tgc aac gac tcc ctc caa aca ggg ttc ttt gcc gca cta ttc       288
Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe
                 85                  90                  95

tac aaa cac aaa ttc aac tcg tct gga tgc cca gag cgc ttg gcc agc       336
Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser
            100                 105                 110

tgt cgc tcc atc gac aag ttc gct cag ggg tgg ggt ccc ctc act tac       384
Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr
        115                 120                 125

act gag cct aac agc tcg gac cag agg ccc tac tgc tgg cac tac gcg       432
Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala
    130                 135                 140

cct cga ccg tgt ggt att gta ccc gcg tct cag gtg tgc ggt cca gtg       480
Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val
145                 150                 155                 160

tat tgc ttc acc ccg agc cct gtt gtg gtg ggg acg acc gat cgg ttt       528
Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe
                165                 170                 175

ggt gtc ccc acg tat aac tgg ggg gcg aac gac tcg gat gtg ctg att       576
Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile
            180                 185                 190

ctc aac aac acg cgg ccg ccg cga ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg       624
```

```
Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp
        195                 200                 205

atg aat ggc act ggg ttc acc aag acg tgt ggg ggc ccc ccg tgc aac      672
Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn
    210                 215                 220

atc ggg ggg gcc ggc aac aac acc ttg acc tgc ccc act gac tgt ttt      720
Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe
225                 230                 235                 240

cgg aag cac ccc gag gcc acc tac gcc aga tgc ggt tct ggg ccc tgg      768
Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp
                245                 250                 255

ctg aca cct agg tgt atg gtt cat tac cca tat agg ctc tgg cac tac      816
Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr
            260                 265                 270

ccc tgc act gtc aac ttc acc atc ttc aag gtt agg atg tac gtg ggg      864
Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly
        275                 280                 285

ggc gtg gag cac agg ttc gaa gcc gca tgc aat tgg act cga gga gag      912
Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu
    290                 295                 300

cgt tgt gac ttg gag gac agg gat aga tca gag ctt agc ccg ctg ctg      960
Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu
305                 310                 315                 320

ctg tct aca aca gag tgg cag ata ctg ccc tgt tcc ttc acc acc ctg     1008
Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu
                325                 330                 335

ccg gcc cta tcc acc ggc ctg atc cac ctc cat cag aac atc gtg gac     1056
Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp
            340                 345                 350

gtg caa tac ctg tac ggt gta ggg tcg gcg gtt gtc tcc ctt gtc atc     1104
Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Val Ile
        355                 360                 365

aaa tgg gag tat gtc ctg ttg ctc ttc ctt ctc ctg gca gac gcg cgc     1152
Lys Trp Glu Tyr Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg
    370                 375                 380

atc tgc gcc tgc tta tgg atg atg ctg ctg ata gct caa gct gag gcc     1200
Ile Cys Ala Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala
385                 390                 395                 400

gcc tta gag aac ctg gtg gtc ctc aat gcg gcg gcc gtg gcc ggg gcg     1248
Ala Leu Glu Asn Leu Val Val Leu Asn Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala
                405                 410                 415

cat ggc act ctt tcc ttc ctt gtg ttc ttc tgt gct gcc tgg tac atc     1296
His Gly Thr Leu Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile
            420                 425                 430

aag ggc agg ctg gtc cct ggt gcg gca tac gcc ttc tat ggc gtg tgg     1344
Lys Gly Arg Leu Val Pro Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp
```

```
        435                 440                 445

ccg ctg ctc ctg ctt ctg ctg gcc tta cca cca cga gct tat gcc tagtaa    1395
Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala
    450                 455                 460
<210> 46

<211> 463
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 46

Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr
  1               5                  10                  15

Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe
             20                  25                  30
Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser
         35                  40                  45

Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys
     50                  55                  60

Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala
 65                  70                  75                  80

Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe
                 85                  90                  95

Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser
            100                 105                 110

Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr
        115                 120                 125

Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala
    130                 135                 140

Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val
145                 150                 155                 160

Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe
                165                 170                 175

Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile
            180                 185                 190

Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp
        195                 200                 205

Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn
    210                 215                 220

Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe
225                 230                 235                 240

Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp
                245                 250                 255
```

```
Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr
            260                 265                 270

Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly
        275                 280                 285

Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu
    290                 295                 300

Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu
305                 310                 315                 320

Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu
                325                 330                 335

Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp
            340                 345                 350

Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Val Ile
        355                 360                 365

Lys Trp Glu Tyr Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg
    370                 375                 380

Ile Cys Ala Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala
385                 390                 395                 400

Ala Leu Glu Asn Leu Val Val Leu Asn Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala
                405                 410                 415

His Gly Thr Leu Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile
            420                 425                 430

Lys Gly Arg Leu Val Pro Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp
        435                 440                 445

Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala
    450                 455                 460
<210> 47

<211> 2082
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..2079

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..2076
<400> 47

aat ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc ggc ttc gcc gac ctc        48
Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta ggg ggc gct gcc agg        96
Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30
```

```
gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac ggc gtg aac tat gca       144
Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45

aca ggg aat ttg ccc ggt tgc tct ttc tct atc ttc ctc ttg gct ttg       192
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

ctg tcc tgt ctg acc gtt cca gct tcc gct tat gaa gtg cgc aac gtg       240
Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc aac tca agc att gtg       288
Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc ggg tgc gtg ccc tgc       336
Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta gcg ctc acc ccc acg       384
Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc acc acg aca ata cga cgc cac       432
Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

gtc gat ttg ctc gtt ggg gcg gct gct ttc tgt tcc gct atg tac gtg       480
Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

ggg gac ctc tgc gga tct gtc ttc ctc gtc tcc cag ctg ttc acc atc       528
Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175

tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg cag gac tgc aat tgc tca atc tat       576
Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190

ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt atg gct tgg gat atg atg atg aac       624
Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

tgg tcg cct aca acg gcc ctg gtg gta tcg cag ctg ctc cgg atc cca       672
Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro
    210                 215                 220

caa gct gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cat tgg gga gtc ctg gcg       720
Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala
225                 230                 235                 240

ggc ctc gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg gct aag gtt ttg gtt       768
Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val
                245                 250                 255

gtg atg cta ctc ttt gcc ggc gtc gac ggg cat acc cgc gtg tca gga       816
Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly
            260                 265                 270

ggg gca gca gcc tcc gat acc agg ggc ctt gtg tcc ctc ttt agc ccc       864
```

```
Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro
        275                 280                 285

ggg tcg gct cag aaa atc cag ctc gta aac acc aac ggc agt tgg cac      912
Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His
    290                 295                 300

atc aac agg act gcc ctg aac tgc aac gac tcc ctc caa aca ggg ttc      960
Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe
305                 310                 315                 320

ttt gcc gca cta ttc tac aaa cac aaa ttc aac tcg tct gga tgc cca     1008
Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro
                325                 330                 335

gag cgc ttg gcc agc tgt cgc tcc atc gac aag ttc gct cag ggg tgg     1056
Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp
            340                 345                 350

ggt ccc ctc act tac act gag cct aac agc tcg gac cag agg ccc tac     1104
Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr
        355                 360                 365

tgc tgg cac tac gcg cct cga ccg tgt ggt att gta ccc gcg tct cag     1152
Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln
    370                 375                 380

gtg tgc ggt cca gtg tat tgc ttc acc ccg agc cct gtt gtg gtg ggg     1200
Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly
385                 390                 395                 400
acg acc gat cgg ttt ggt gtc ccc acg tat aac tgg ggg gcg aac gac     1248
Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp
                405                 410                 415

tcg gat gtg ctg att ctc aac aac acg cgg ccg ccg cga ggc aac tgg     1296
Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp
            420                 425                 430

ttc ggc tgt aca tgg atg aat ggc act ggg ttc acc aag acg tgt ggg     1344
Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly
        435                 440                 445

ggc ccc ccg tgc aac atc ggg ggg gcc ggc aac aac acc ttg acc tgc     1392
Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys
    450                 455                 460

ccc act gac tgt ttt cgg aag cac ccc gag gcc acc tac gcc aga tgc     1440
Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys
465                 470                 475                 480

ggt tct ggg ccc tgg ctg aca cct agg tgt atg gtt cat tac cca tat     1488
Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr
                485                 490                 495

agg ctc tgg cac tac ccc tgc act gtc aac ttc acc atc ttc aag gtt     1536
Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val
            500                 505                 510

agg atg tac gtg ggg ggc gtg gag cac agg ttc gaa gcc gca tgc aat     1584
Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn
        515                 520                 525
```

```
tgg act cga gga gag cgt tgt gac ttg gag gac agg gat aga tca gag      1632
Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu
    530                 535                 540

ctt agc ccg ctg ctg ctg tct aca aca gag tgg cag ata ctg ccc tgt      1680
Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ile Leu Pro Cys
545                 550                 555                 560

tcc ttc acc acc ctg ccg gcc cta tcc acc ggc ctg atc cac ctc cat      1728
Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His
                565                 570                 575

cag aac atc gtg gac gtg caa tac ctg tac ggt gta ggg tcg gcg gtt      1776
Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ala Val
            580                 585                 590

gtc tcc ctt gtc atc aaa tgg gag tat gtc ctg ttg ctc ttc ctt ctc      1824
Val Ser Leu Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu
        595                 600                 605

ctg gca gac gcg cgc atc tgc gcc tgc tta tgg atg atg ctg ctg ata      1872
Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ala Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile
    610                 615                 620

gct caa gct gag gcc gcc tta gag aac ctg gtg gtc ctc aat gcg gcg      1920
Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val Val Leu Asn Ala Ala
625                 630                 635                 640

gcc gtg gcc ggg gcg cat ggc act ctt tcc ttc ctt gtg ttc ttc tgt      1968
Ala Val Ala Gly Ala His Gly Thr Leu Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys
                645                 650                 655

gct gcc tgg tac atc aag ggc agg ctg gtc cct ggt gcg gca tac gcc      2016
Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro Gly Ala Ala Tyr Ala
            660                 665                 670

ttc tat ggc gtg tgg ccg ctg ctc ctg ctt ctg ctg gcc tta cca cca      2064
Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro
        675                 680                 685

cga gct tat gcc tagtaa                                               2082
Arg Ala Tyr Ala
    690
<210> 48

<211> 692
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus


<400> 48

Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
  1               5                  10                  15

Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
             20                  25                  30

Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala
         35                  40                  45
```

```
Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu
     50                  55                  60

Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Glu Val Arg Asn Val
 65                  70                  75                  80

Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val
                 85                  90                  95

Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys
            100                 105                 110

Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr
        115                 120                 125

Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His
    130                 135                 140

Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val
145                 150                 155                 160

Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu Phe Thr Ile
                165                 170                 175

Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr
            180                 185                 190

Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn
        195                 200                 205

Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro
    210                 215                 220

Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala
225                 230                 235                 240

Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val
                245                 250                 255

Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His Thr Arg Val Ser Gly
            260                 265                 270
Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val Ser Leu Phe Ser Pro
        275                 280                 285

Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His
    290                 295                 300

Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe
305                 310                 315                 320

Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro
                325                 330                 335

Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys Phe Ala Gln Gly Trp
            340                 345                 350

Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser Asp Gln Arg Pro Tyr
        355                 360                 365

Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln
```

370 375 380

Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly
385 390 395 400

Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Ala Asn Asp
405 410 415

Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Arg Gly Asn Trp
420 425 430

Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly
435 440 445

Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys
450 455 460

Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ala Arg Cys
465 470 475 480

Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val His Tyr Pro Tyr
485 490 495

Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val
500 505 510

Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe Glu Ala Ala Cys Asn
515 520 525

Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu
530 535 540

Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Ile Leu Pro Cys
545 550 555 560

Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His
565 570 575

Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ala Val
580 585 590

Val Ser Leu Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu
595 600 605

Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ala Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile
610 615 620

Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val Val Leu Asn Ala Ala
625 630 635 640

Ala Val Ala Gly Ala His Gly Thr Leu Ser Phe Leu Val Phe Phe Cys
645 650 655

Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro Gly Ala Ala Tyr Ala
660 665 670

Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Pro Pro
675 680 685

Arg Ala Tyr Ala
690

<210> 49

<211> 2433
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<220>
<221> CDS
<222> 1..2430

<220>
<221> mat_peptide
<222> 1..2427
<400> 49

```
atg agc acg aat cct aaa cct caa aga aaa acc aaa cgt aac acc aac        48
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
  1               5                  10                  15

cgc cgc cca cag gac gtc aag ttc ccg ggc ggt ggt cag atc gtt ggt        96
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
            20                  25                  30

gga gtt tac ctg ttg ccg cgc agg ggc ccc agg ttg ggt gtg cgc gcg       144
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
        35                  40                  45

act agg aag act tcc gag cgg tcg caa cct cgt ggg agg cga caa cct       192
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
    50                  55                  60

atc ccc aag gct cgc cga ccc gag ggt agg gcc tgg gct cag ccc ggg       240
Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln Pro Gly
65                  70                  75                  80

tac cct tgg ccc ctc tat ggc aat gag ggc atg ggg tgg gca gga tgg       288
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp
                85                  90                  95

ctc ctg tca ccc cgc ggc tct cgg cct agt tgg ggc cct aca gac ccc       336
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
            100                 105                 110

cgg cgt agg tcg cgt aat ttg ggt aag gtc atc gat acc ctt aca tgc       384
Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
        115                 120                 125
ggc ttc gcc gac ctc gtg ggg tac att ccg ctc gtc ggc gcc ccc cta       432
Gly Phe Ala Asp Leu Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
    130                 135                 140

ggg ggc gct gcc agg gcc ctg gcg cat ggc gtc cgg gtt ctg gag gac       480
Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145                 150                 155                 160

ggc gtg aac tat gca aca ggg aat ttg ccc ggt tgc tct ttc tct atc       528
Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
                165                 170                 175

ttc ctc ttg gct ttg ctg tcc tgt ctg acc gtt cca gct tcc gct tat       576
```

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

gaa gtg cgc aac gtg tcc ggg atg tac cat gtc acg aac gac tgc tcc      624
Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
        195                 200                 205

aac tca agc att gtg tat gag gca gcg gac atg atc atg cac acc ccc      672
Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro
    210                 215                 220

ggg tgc gtg ccc tgc gtt cgg gag aac aac tct tcc cgc tgc tgg gta      720
Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val
225                 230                 235                 240

gcg ctc acc ccc acg ctc gca gct agg aac gcc agc gtc ccc acc acg      768
Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr
                245                 250                 255

aca ata cga cgc cac gtc gat ttg ctc gtt ggg gcg gct gct ttc tgt      816
Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys
            260                 265                 270

tcc gct atg tac gtg ggg gac ctc tgc gga tct gtc ttc ctc gtc tcc      864
Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser
        275                 280                 285

cag ctg ttc acc atc tcg cct cgc cgg cat gag acg gtg cag gac tgc      912
Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys
    290                 295                 300

aat tgc tca atc tat ccc ggc cac ata acg ggt cac cgt atg gct tgg      960
Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
305                 310                 315                 320

gat atg atg atg aac tgg tcg cct aca acg gcc ctg gtg gta tcg cag     1008
Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val Ser Gln
                325                 330                 335

ctg ctc cgg atc cca caa gct gtc gtg gac atg gtg gcg ggg gcc cat     1056
Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly Ala His
            340                 345                 350

tgg gga gtc ctg gcg ggc ctc gcc tac tat tcc atg gtg ggg aac tgg     1104
Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
        355                 360                 365

gct aag gtt ttg gtt gtg atg cta ctc ttt gcc ggc gtc gac ggg cat     1152
Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His
    370                 375                 380

acc cgc gtg tca gga ggg gca gca gcc tcc gat acc agg ggc ctt gtg     1200
Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val
385                 390                 395                 400

tcc ctc ttt agc ccc ggg tcg gct cag aaa atc cag ctc gta aac acc     1248
Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr
                405                 410                 415

aac ggc agt tgg cac atc aac agg act gcc ctg aac tgc aac gac tcc     1296
Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
```

```
            420                 425                 430

ctc caa aca ggg ttc ttt gcc gca cta ttc tac aaa cac aaa ttc aac      1344
Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn
        435                 440                 445

tcg tct gga tgc cca gag cgc ttg gcc agc tgt cgc tcc atc gac aag      1392
Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys
    450                 455                 460

ttc gct cag ggg tgg ggt ccc ctc act tac act gag cct aac agc tcg      1440
Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser
465                 470                 475                 480

gac cag agg ccc tac tgc tgg cac tac gcg cct cga ccg tgt ggt att      1488
Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile
                485                 490                 495

gta ccc gcg tct cag gtg tgc ggt cca gtg tat tgc ttc acc ccg agc      1536
Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
            500                 505                 510

cct gtt gtg gtg ggg acg acc gat cgg ttt ggt gtc ccc acg tat aac      1584
Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn
        515                 520                 525

tgg ggg gcg aac gac tcg gat gtg ctg att ctc aac aac acg cgg ccg      1632
Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro
    530                 535                 540

ccg cga ggc aac tgg ttc ggc tgt aca tgg atg aat ggc act ggg ttc      1680
Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe
545                 550                 555                 560

acc aag acg tgt ggg ggc ccc ccg tgc aac atc ggg ggg gcc ggc aac      1728
Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn
                565                 570                 575

aac acc ttg acc tgc ccc act gac tgt ttt cgg aag cac ccc gag gcc      1776
Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
            580                 585                 590

acc tac gcc aga tgc ggt tct ggg ccc tgg ctg aca cct agg tgt atg      1824
Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met
        595                 600                 605

gtt cat tac cca tat agg ctc tgg cac tac ccc tgc act gtc aac ttc      1872
Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe
    610                 615                 620

acc atc ttc aag gtt agg atg tac gtg ggg ggc gtg gag cac agg ttc      1920
Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe
625                 630                 635                 640

gaa gcc gca tgc aat tgg act cga gga gag cgt tgt gac ttg gag gac      1968
Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
                645                 650                 655

agg gat aga tca gag ctt agc ccg ctg ctg ctg tct aca aca gag tgg      2016
Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
            660                 665                 670
```

```
cag ata ctg ccc tgt tcc ttc acc acc ctg ccg gcc cta tcc acc ggc      2064
Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
        675                 680                 685

ctg atc cac ctc cat cag aac atc gtg gac gtg caa tac ctg tac ggt      2112
Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
    690                 695                 700

gta ggg tcg gcg gtt gtc tcc ctt gtc atc aaa tgg gag tat gtc ctg      2160
Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
705                 710                 715                 720

ttg ctc ttc ctt ctc ctg gca gac gcg cgc atc tgc gcc tgc tta tgg      2208
Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ala Cys Leu Trp
                725                 730                 735

atg atg ctg ctg ata gct caa gct gag gcc gcc tta gag aac ctg gtg      2256
Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val
            740                 745                 750

gtc ctc aat gcg gcg gcc gtg gcc ggg gcg cat ggc act ctt tcc ttc      2304
Val Leu Asn Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala His Gly Thr Leu Ser Phe
        755                 760                 765

ctt gtg ttc ttc tgt gct gcc tgg tac atc aag ggc agg ctg gtc cct      2352
Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro
    770                 775                 780

ggt gcg gca tac gcc ttc tat ggc gtg tgg ccg ctg ctc ctg ctt ctg      2400
Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
785                 790                 795                 800

ctg gcc tta cca cca cga gct tat gcc tagtaa                           2433
Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala
                805                 810
```

<210> 50

<211> 809
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 50

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

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

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

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

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

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Met Gly Trp Ala Gly Trp
```

```
                85                  90                  95

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

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
        115                 120                 125
Gly Phe Ala Asp Leu Val Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
    130                 135                 140

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

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

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

Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Ser
        195                 200                 205

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

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

Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr Thr
                245                 250                 255

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

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

Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp Cys
    290                 295                 300

Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp
305                 310                 315                 320

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

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

Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly Asn Trp
        355                 360                 365

Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Gly His
    370                 375                 380

Thr Arg Val Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ser Asp Thr Arg Gly Leu Val
385                 390                 395                 400

Ser Leu Phe Ser Pro Gly Ser Ala Gln Lys Ile Gln Leu Val Asn Thr
                405                 410                 415
```

```
Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser
            420                 425                 430

Leu Gln Thr Gly Phe Phe Ala Ala Leu Phe Tyr Lys His Lys Phe Asn
        435                 440                 445

Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Ser Ile Asp Lys
    450                 455                 460

Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Leu Thr Tyr Thr Glu Pro Asn Ser Ser
465                 470                 475                 480

Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile
                485                 490                 495

Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
            500                 505                 510

Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Val Pro Thr Tyr Asn
        515                 520                 525

Trp Gly Ala Asn Asp Ser Asp Val Leu Ile Leu Asn Asn Thr Arg Pro
    530                 535                 540

Pro Arg Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Gly Thr Gly Phe
545                 550                 555                 560

Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Asn Ile Gly Gly Ala Gly Asn
                565                 570                 575

Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
            580                 585                 590

Thr Tyr Ala Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met
        595                 600                 605

Val His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe
    610                 615                 620

Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Phe
625                 630                 635                 640

Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
                645                 650                 655

Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp
            660                 665                 670

Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly
        675                 680                 685

Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly
    690                 695                 700

Val Gly Ser Ala Val Val Ser Leu Val Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
705                 710                 715                 720

Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Ile Cys Ala Cys Leu Trp
                725                 730                 735

Met Met Leu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val
```

740 745 750

Val Leu Asn Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala His Gly Thr Leu Ser Phe
755 760 765

Leu Val Phe Phe Cys Ala Ala Trp Tyr Ile Lys Gly Arg Leu Val Pro
770 775 780

Gly Ala Ala Tyr Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu
785 790 795 800

Leu Ala Leu Pro Pro Arg Ala Tyr Ala
805

<210> 51

<211> 17
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> Modified-site
<222> 1..17
<400> 51

Ser Asn Ser Ser Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys
1 5 10 15

Val

<210> 52

<211> 22
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> Modified-site
<222> 1..22
<400> 52

Gly Gly Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
1 5 10 15

Ser Pro Thr Thr Ala Leu
20

<210> 53

<211> 37
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> Modified-site
<222> 1..37
<400> 53

Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
1 5 10 15

Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
20 25 30

Pro Gly Cys Gly Lys
35

<210> 54

<211> 25
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> Modified-site
<222> 1..25
<400> 54

Gly Gly Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Ala Thr
1 5 10 15

Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu
20 25

<210> 55

<211> 25
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus
<220>
<221> Modified-site
<222> 1..25
<400> 55

Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asp Ala Ser Val Pro Thr Thr
1 5 10 15

Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu
20 25

<210> 56

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 56

Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr Gln Val Arg Asn
1 5 10 15

Ser Thr Gly Leu
20

<210> 57

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 57

Gln Val Arg Asn Ser Thr Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
1 5 10 15

Asn Ser Ser Ile
20

<210> 58

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 58

Asn Asp Cys Pro Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala His Asp Ala Ile
1 5 10 15

Leu His Thr Pro
20

<210> 59

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 59

Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
1 5 10 15

Pro Gly Cys Val
20

<210> 60

<211> 19
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 60

His Asp Ala Ile Leu His Thr Pro Gly Val Pro Cys Val Arg Glu Gly
1 5 10 15

Asn Val Ser

<210> 61

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 61

Cys Val Arg Glu Gly Asn Val Ser Arg Cys Trp Val Ala Met Thr Pro
1 5 10 15

Thr Val Ala Thr
20

<210> 62

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 62

Ala Met Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Ala Thr
1 5 10 15

Gln Leu Arg Arg
20

<210> 63

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 63

Leu Pro Ala Thr Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser
1 5 10 15

Ala Thr Leu Cys
20

<210> 64
<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 64

Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu
1 5 10 15

Cys Gly Ser Val
20

<210> 65

<211> 20

<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 65

Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Gly Cys
1 5 10 15

Asn Cys Ser Ile
20

<210> 66

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 66

Thr Gln Gly Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His
1 5 10 15

Arg Met Ala Trp
20

<210> 67

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 67

Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro
1 5 10 15

Thr Ala Ala Leu
20

<210> 68

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 68

Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Met Ala Gln Leu Leu Arg Ile
1 5 10 15

Pro Gln Ala Ile
20

<210> 69

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 69

Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Leu Asp Met Ile Ala Gly Ala His
1 5 10 15

Trp Gly Val Leu
20

<210> 70

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 70

Ala Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met
1 5 10 15

Val Gly Asn Met
20

<210> 71

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 71

Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu Thr Ile Val Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gln Ala
20

<210> 72

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 72

Ser Gly Leu Val Ser Leu Phe Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln
1 5 10 15

Leu Ile Asn Thr

20

<210> 73

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 73

Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Gln Trp His Ile Asn Ser
1 5 10 15

Thr Ala Leu Asn
20

<210> 74

<211> 21
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 74

Leu Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp Trp Leu Ala Gly Leu
1 5 10 15

Ile Tyr Gln His Lys
20

<210> 75

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 75

Ala Gly Leu Ile Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu
1 5 10 15

Arg Leu Ala Ser
20

<210> 76

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 76

Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Pro Leu Thr Asp Phe Asp
1 5 10 15

Gln Gly Trp Gly
20

<210> 77

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 77

Thr Asp Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Asp Gln
20

<210> 78

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 78

Ala Asn Gly Ser Gly Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Cys
20

<210> 79

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 79

Trp His Tyr Pro Pro Lys Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val
1 5 10 15

Cys Gly Pro Val
20

<210> 80

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 80

Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val
1 5 10 15

Val Val Gly Thr
20

<210> 81

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 81

Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr
1 5 10 15

Tyr Ser Trp Gly
20

<210> 82

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 82

Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Glu Asn Asp Thr Asp Val Phe Val
1 5 10 15

Leu Asn Asn Thr
20

<210> 83

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 83

Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys
1 5 10 15

Val Cys Gly Ala
20

<210> 84

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 84

Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Val Cys Ile Gly Gly Ala
1 5 10 15

Gly Asn Asn Thr
20

<210> 85

<211> 19
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 85

Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asn Thr Leu His Cys Pro Thr Asp Cys Arg
1 5 10 15

Lys His Pro

<210> 86

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 86

Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Asp Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly
1 5 10 15

Ser Gly Pro Trp
20

<210> 87

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 87

Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Leu Val Asp
1 5 10 15

Tyr Pro Tyr Arg
20

<210> 88

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 88

Cys Leu Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Ile
20

<210> 89

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 89

Pro Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Ile Arg Met Tyr Val Gly
1 5 10 15

Gly Val Glu His
20

<210> 90

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 90

Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp
1 5 10 15

Thr Pro Gly Glu
20

<210> 91

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 91

Ala Cys Asn Trp Thr Pro Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp
1 5 10 15

Arg Ser Glu Leu
20

<210> 92

<211> 20

<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 92

Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Thr Thr Thr
1 5 10 15

Gln Trp Gln Val
20

<210> 93

<211> 9
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 93

Tyr Gln Val Arg Asn Ser Thr Gly Leu
1 5

<210> 94

<211> 29
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 94

agctaattaa ttaagcttgc atgcctgca 29

<210> 95

<211> 60
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 95

gttaattaac tattagtgat ggtggtgatg gtgtctgccc tcgatcacgt gcaggcctcc 60

<210> 96

<211> 19
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 96

gtttaaccac tgcatgatg 19

<210> 97

<211> 20

<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 97

gtcccatcga gtgcggctac 20

<210> 98

<211> 45
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 98

cgtgacatgg tacattccgg acacttggcg cacttcataa gcgga 45

<210> 99

<211> 42
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 99

tgcctcatac acaatggagc tctgggacga gtcgttcgtg ac 42

<210> 100

<211> 42
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 100

tacccagcag cgggagctct gttgctcccg aacgcagggc ac 42

<210> 101

<211> 42
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 101

tgtcgtggtg gggacggagg cctgcctagc tgcgagcgtg gg 42

<210> 102

<211> 48
<212>

<400> 102

cgttatgtgg cccgggtaga ttgagcactg gcagtcctgc accgtctc 48

<210> 103

<211> 42
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 103

cagggccgtt ctaggcctcc actgcatcat catatcccaa gc 42

<210> 104

<211> 26
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 104

ccggaatgta ccatgtcacg aacgac 26

<210> 105

<211> 24
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 105
gctccattgt gtatgaggca gcgg 24

<210> 106

<211> 23
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 106

gagctcccgc tgctgggtag cgc 23

<210> 107

<211> 25
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 107

cctccgtccc caccacgaca atacg 25

<210> 108

<211> 27
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 108

ctacccgggc cacataacgg gtcaccg 27

<210> 109

<211> 24
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 109

ggaggcctac aacggccctg gtgg 24

<210> 110

<211> 22
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 110

ttctatcgat taaatagaat tc 22

<210> 111

<211> 23
<212> DNA
<213> Hepatitis C virus

<400> 111

gccatacgct cacagccgat ccc 23

<210> 112

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 112

Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Ile Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
1 5 10 15

Ser Asn Ser Ser
20

<210> 113

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 113

Thr Asn Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp
1 5 10 15

Met Ile Met His Thr
20

<210> 114

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 114

Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val
1 5 10 15

Arg Glu Asn Asn Ser
20

<210> 115

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 115

Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp Val Ala Leu
1 5 10 15

Thr Pro Thr Leu Ala
20

<210> 116

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 116

Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro
1 5 10 15

Thr Thr Thr Ile Arg
20

<210> 117

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 117

Ser Val Pro Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Phe
20

<210> 118

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 118

Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly
1 5 10 15

Asp Leu Cys Gly Ser
20

<210> 119

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 119

Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Ser Gln Leu
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Pro
20

<210> 120

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 120

Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln
1 5 10 15

Asp Cys Asn Cys Ser
20

<210> 121

<211> 20
<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 121

Thr Val Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr
1 5 10 15

Gly His Arg Met Ala
20

<210> 122

<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 122

His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp
1 5 10 15
Ser Pro Thr Thr Ala
20

<210> 123

<211> 135
<212> PRT
<213> hepatitis C virus

<400> 123

Tyr Glu Val Arg Asn Val Ser Gly Met Tyr His Val Thr Asn Asp Cys
1 5 10 15

Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met His Thr
20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys Trp
35 40 45

Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ala Ser Val Pro Thr
50 55 60

Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala Phe
65 70 75 80

Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val
85 90 95

Ser Gln Leu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Arg His Glu Thr Val Gln Asp
100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala
115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp
130 135

【図１】

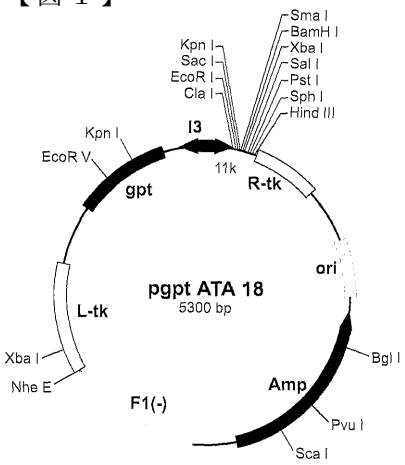


Figure 1

【図２】

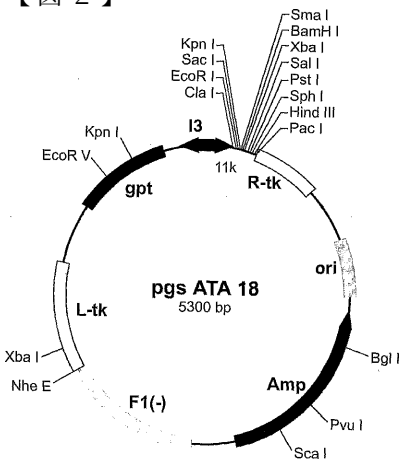


Figure 2

【図３】

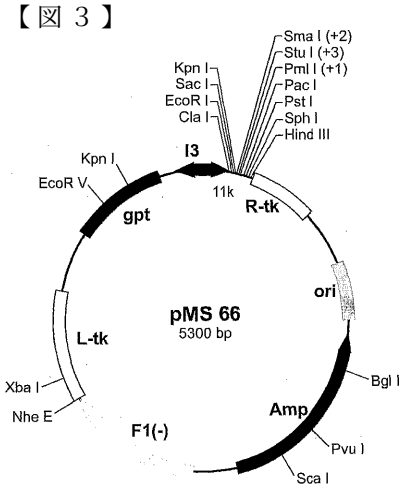


Figure 3

【図４】

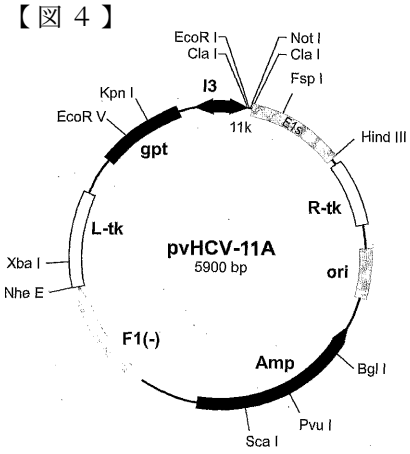
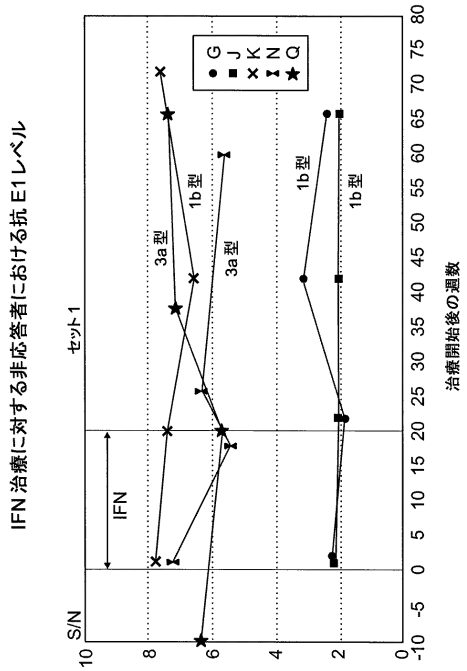
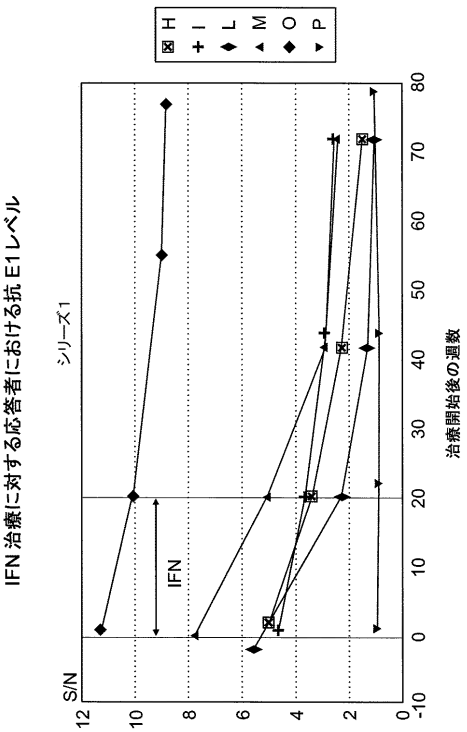


Figure 4

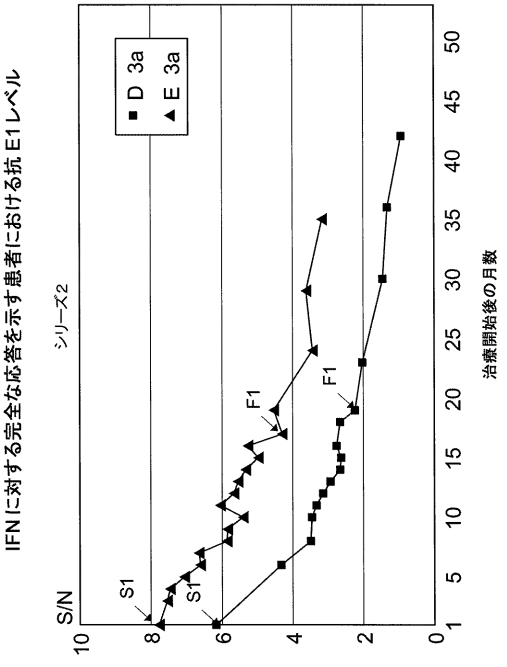
【図５】


IFN治療に対する非応答者における抗E1レベル
S/N
セット1
IFN
3a型
1b型
3a型
1b型
1b型
G
J
K
N
Q
治療開始後の週数

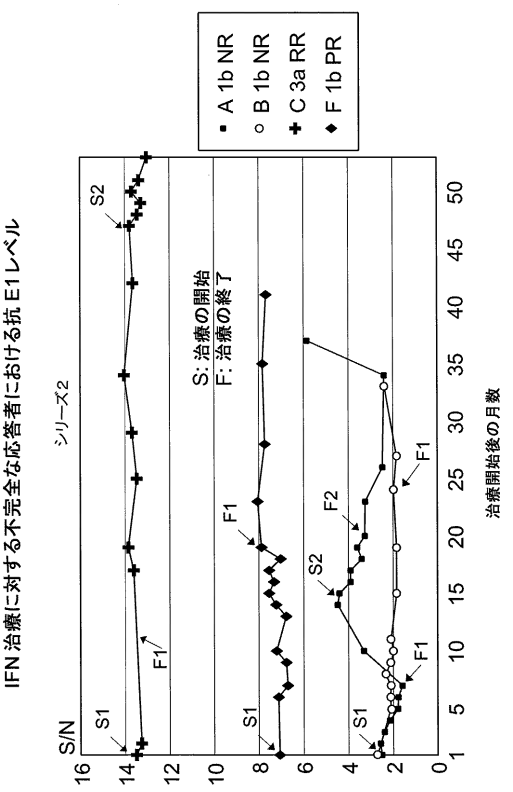
【図６】


IFN治療に対する応答者における抗E1レベル
S/N
シリーズ1
IFN
H
I
L
M
O
P
治療開始後の週数

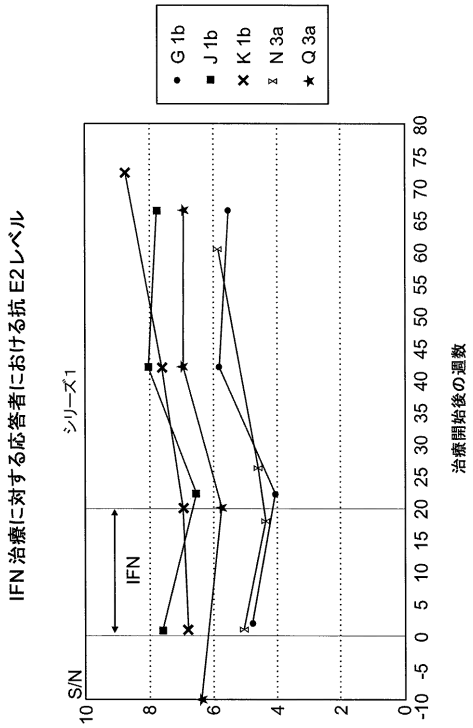
【図７】


IFNに対する完全な応答を示す患者における抗E1レベル
S/N
シリーズ2
D 3a
E 3a
S1
S1
F1
F1
治療開始後の月数

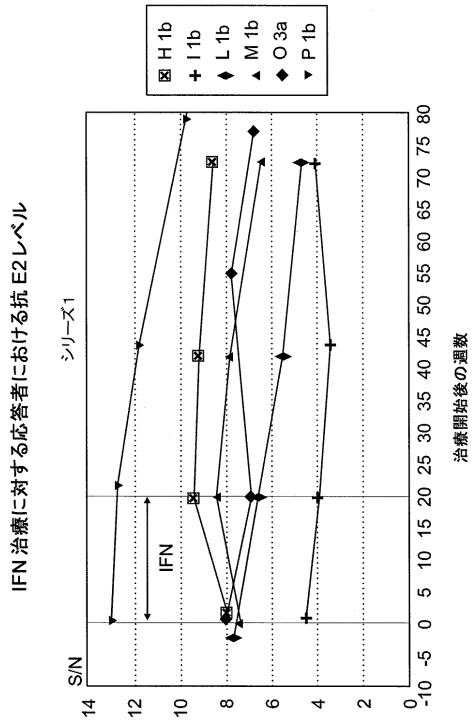
【図８】


IFN治療に対する不完全な応答者における抗E1レベル
S/N
シリーズ2
A 1b NR
B 1b NR
C 3a RR
F 1b PR
S: 治療の開始
F: 治療の終了
S1
S1
S1
S2
S2
F1
F1
F1
F1
F2
治療開始後の月数

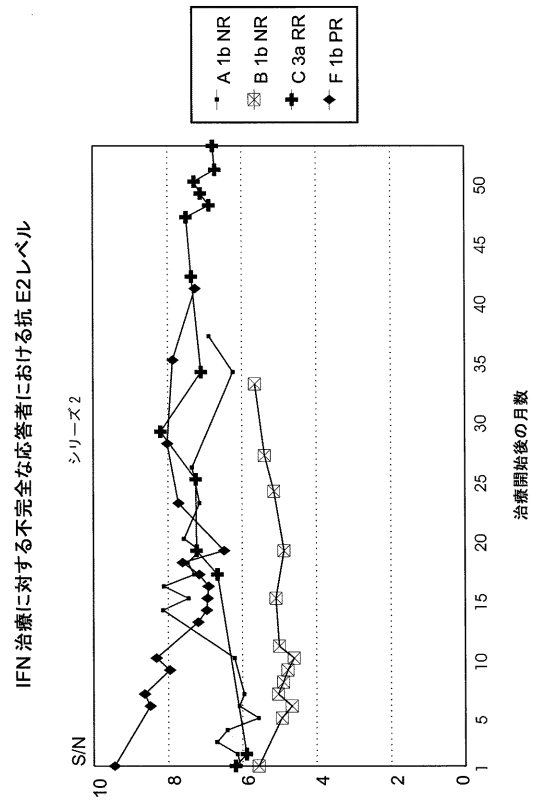
【図９】



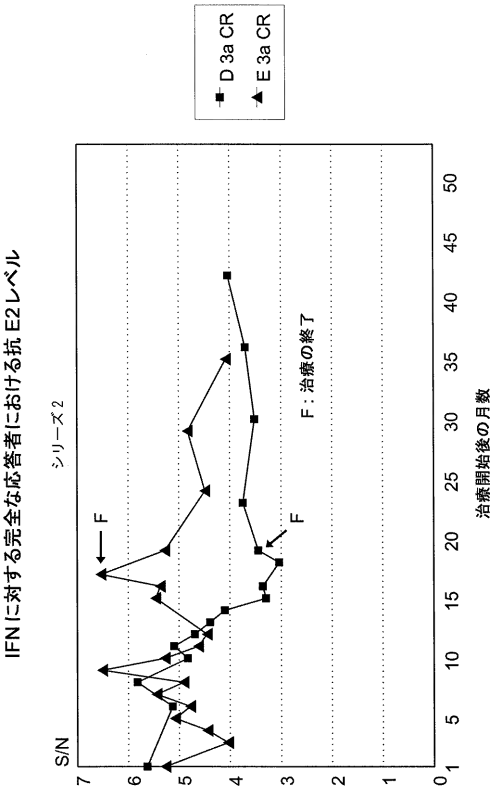
【図１０】



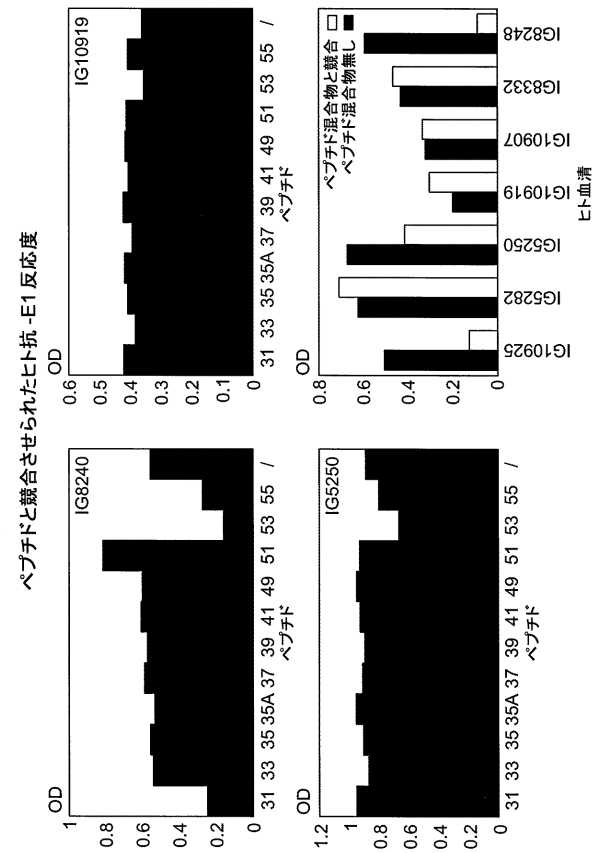
【図１１】



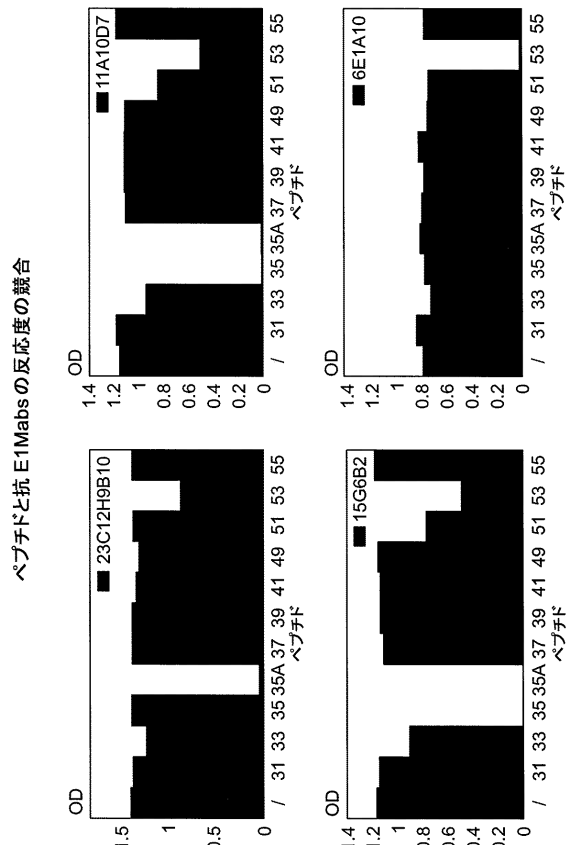
【図１２】



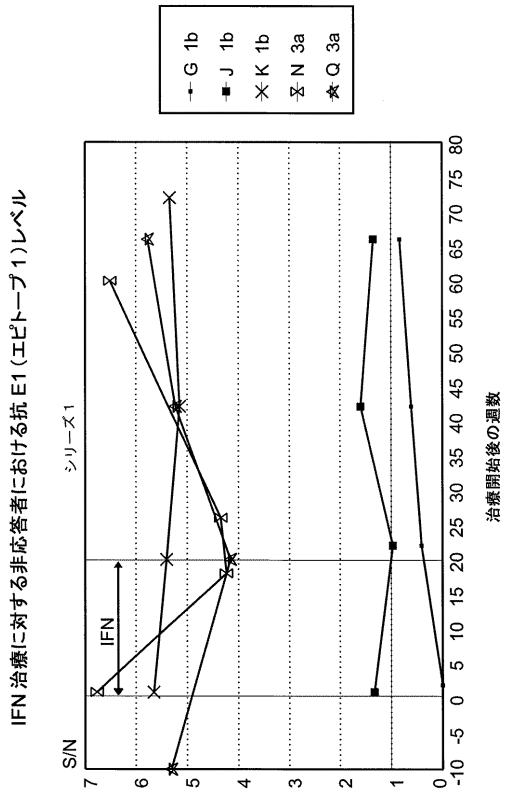
【図１３】



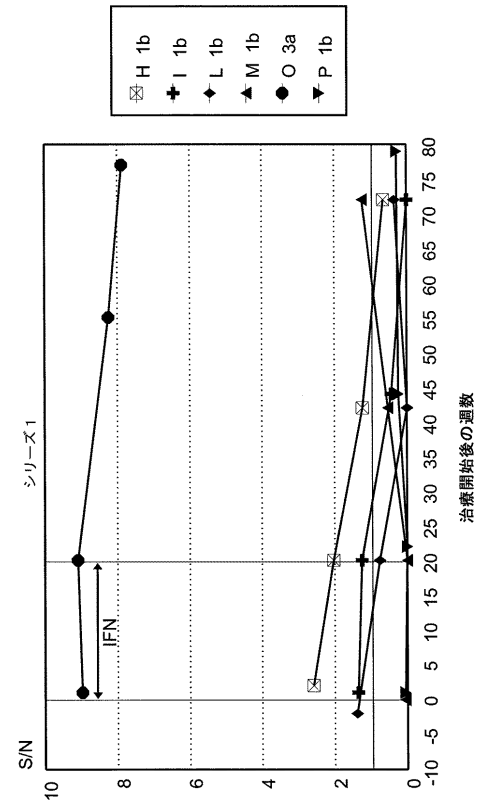
【図１４】



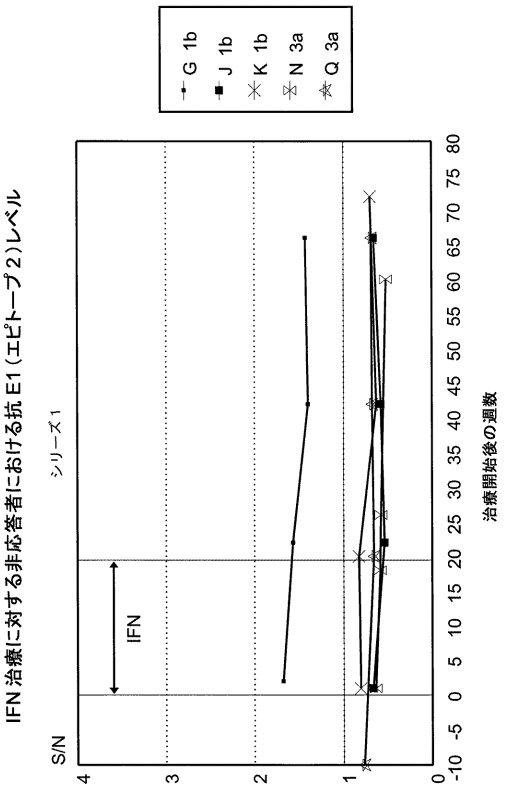
【図１５】



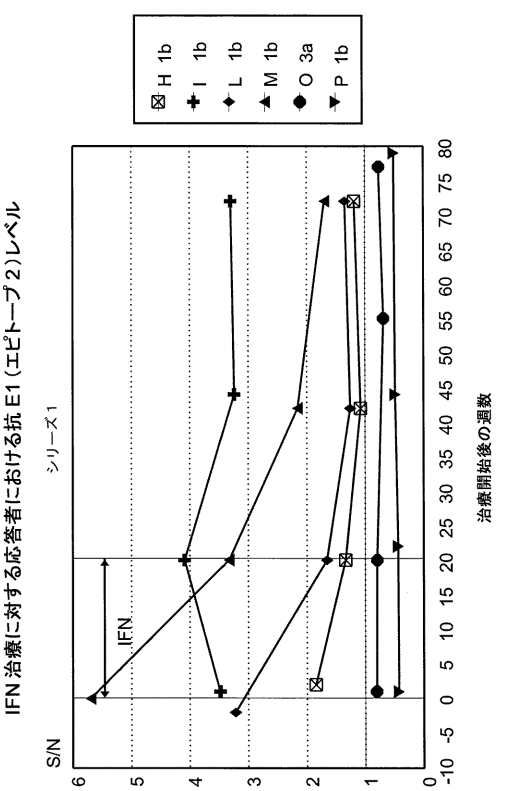
【図１６】



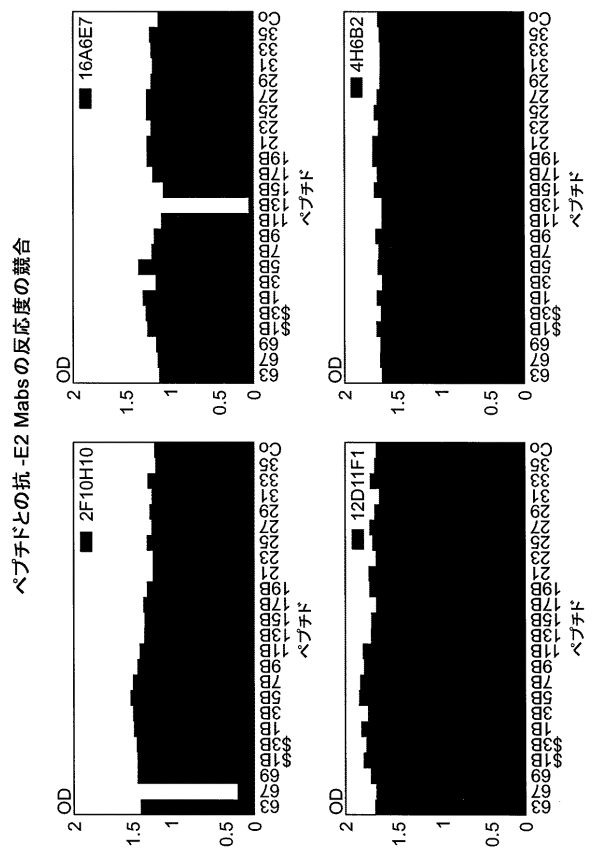
【図１７】



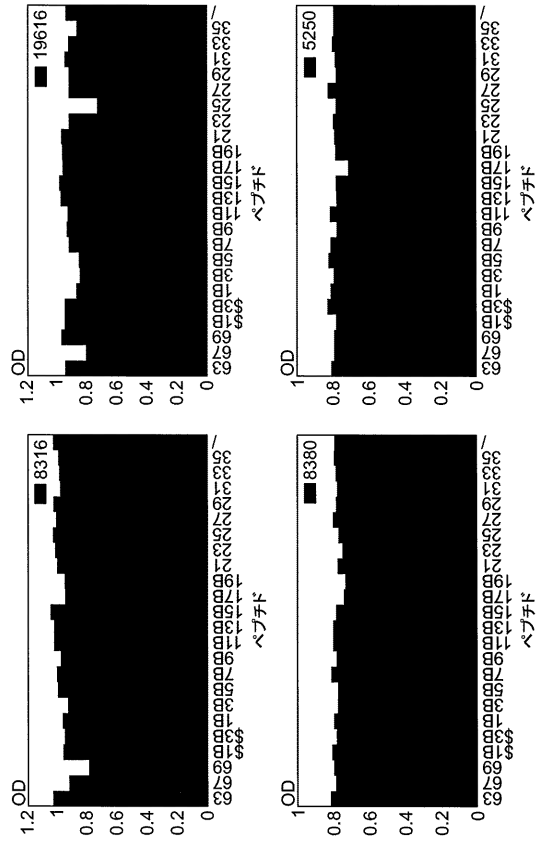
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【図２１Ａ】

5' GGCATGCAAGCTTAATTAATT 3' （配列番号１）
3'ACGTCCGTACGTTCGAATTAATTAATCGA 5' （配列番号９４）

5'CCGGGGAGGCCTGCACGTGATCGAGGGCAGACACCATCACCACCATCACTAATAGTTA
ATTAACTGCA 3' （配列番号２）
3'CCTCCGGACGTGCACTAGCTCCCGTCTGTGGTAGTGGTGGTAGTGATTATCAATTAAT
TG 5' （配列番号９５）

配列番号３（HCCl9A）
ATGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCTTTACTGTCCTGTCTGACCATTCCA
GCTTCCGCTTATGAGGTGCGCAACGTGTCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCC
AACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCC
TGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCT
AGGAACGCCAGCGTCCCCACCACGACAATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCG
GCTGCTCTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGATCTCTGCGGATCTGTCTTCCTCGTCTCC
CAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATC
TATCCCGGCCACATAACAGGTCACCGTATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCGCCT
ACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTG
GCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCGGGCCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACTGG
GCTAAGGTTTTGATTGTGATGCTACTCTTTGCTCTCTAATAG

配列番号５（HCCl10A）
ATGTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAGGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTGCTGTCCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG
GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCGTCCCCACCACGACA
ATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTG
GGGGACCTCTGCGGATCTGTCTTCCTCGTCTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGG
CATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGT
ATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTG
CTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCG
GGTCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGATTGTGATGCTACTC
TTTGCTCCCTAATAG

配列番号７（HCCl11A）

【図２１Ｂ】

ATGTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGTGCTGCCAGAGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTACTGTCCTGTCTGACCATTCCAGCTTCCGCTTATGAGGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG
GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCGTCCCCACTACGACA
ATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTG
GGGGATCTCTGCGGATCTGTCTTCCTCGTCTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGG
CATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACAGGTCACCGT
ATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTAATAG

配列番号９（HCCl12A）
ATGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCCTGCTGTCCTGTCTGACCATACCA
GCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTGTCCGGGGTGTACCATGTCACGAACGACTGCTCC
AACTCAAGCATAGTGTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCC
TGCGTTCGGGAGGGCAACTCCTCCCGTTGCTGGGTGGCGCTCACTCCCACGCTCGCGGCC
AGGAACGCCAGCGTCCCCACAACGACAATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCT
GCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGATCTCTGCGGATCTGTTTTCCTTGTTTCC
CAGCTGTTCACCTTCTCACCTCGCCGGCATCAAACAGTACAGGACTGCAACTGCTCAATC
TATCCCGGCCATGTATCAGGTCACCGCATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCCTAA
TAG

配列番号１１（HCCl13A）
ATGTCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCCCTGCTGTCCTGTCTGACCATACCA
GCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTGTCCGGGGTGTACCATGTCACGAACGACTGCTCC
AACTCAAGCATAGTGTATGAGGCAGCGGACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCC
TGCGTTCGGGAGGGCAACTCCTCCCGTTGCTGGGTGGCGCTCACTCCCACGCTCGCGGCC
AGGAACGCCAGCGTCCCCACAACGACAATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCT
GCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGATCTCTGCGGATCTGTTTTCCTTGTTTCC
CAGCTGTTCACCTTCTCACCTCGCCGGCATCAAACAGTACAGGACTGCAACTGCTCAATC
TATCCCGGCCATGTATCAGGTCACCGCATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTAATAG

配列番号１３（HCCl17A）
ATGCTGGGTAAGGCCATCGATACCCTTACGTGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAAGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCTGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTACTGTCCTGTCTAACCATTCCAGCTTCCGCTTACGAGGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG
GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCGGCTAGGAACGCCAGCATCCCCACTACAACA

【図２１Ｃ】

ATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTG
GGGGATCTCTGCGGATCTGTCTTCCTCGTCTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGG
CATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGT
ATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTACTAATAG
配列番号１５（HCPr51）
ATGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTT
SEQ ID NO 16 (HCPr52)
ATGTTGGGTAAGGTCATCGATACCCT

配列番号１７（HCPr53）
CTATTAGGACCAGTTCATCATCATATCCCA

配列番号１８（HCPr54）
CTATTACCAGTTCATCATCATATCCCA

配列番号１９（HCPr107）
ATACGACGCCACGTCGATTCCCAGCTGTTCACCATC

配列番号２０（HCPr108）
GATGGTGAACAGCTGGGAATCGACGTGGCGTCGTAT

配列番号２１（HCCl37）
ATGTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAGGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTGCTGTCCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG
GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCATCCCCACTACAACA
ATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTG
GGGGATCTCTGCGGATCTGTCTTCCTCGTCTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGG
CATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGT
ATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTG
CTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCG
GGTCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGATTGTGATGCTACTC
TTTGCTCCCTAATAG

配列番号２３（HCCl38）
ATGTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAGGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTGCTGTCCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG

【図２１Ｄ】

GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCGTCCCCACCACGACA
ATACGACGCCACGTCGATTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTG
CAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGTATGGCTTGGGAT
ATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGGATCCTC
TAATAG

配列番号２５（HCCl39）
ATGTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAGGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTGCTGTCCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG
GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCATCCCCACTACAACA
ATACGACGCCACGTCGATTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTG
CAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGTATGGCTTGGGAT
ATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGGATCCTC
TAATAG

配列番号２７（HCCl40）
ATGTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAGGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTGCTGTCCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG
GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCGTCCCCACCACGACA
ATACGACGCCACGTCGATTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGGCATGAGACGGTG
CAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGTATGGCTTGGGAT
ATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGGATCGTG
ATCGAGGGCAGACACCATCACCACCATCACTAATAG

配列番号２９（HCCl62）
ATGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACGTGCGGATTCGCCGATCTCATGGGGTACATCCCG
CTCGTCGGCGCTCCCGTAGGAGGCGTCGCAAGAGCCCTTGCGCATGGCGTGAGGGCCCTT
GAAGACGGGATAAATTTCGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCCTTTTCTATTTTCCTT
CTCGCTCTGTTCTCTTGCTTAATTCATCCAGCAGCTAGTCTAGAGTGGCGGAATACGTCT
GGCCTCTATGTCCTTACCAACGACTGTTCCAATAGCAGTATTGTGTACGAGGCCGATGAC
GTTATTCTGCACACACCCGGCTGCATACCTTGTGTCCAGGACGGCAATACATCCACGTGC
TGGACCCCAGTGACACCTACAGTGGCAGTCAAGTACGTCGGAGCAACCACCGCTTCGATA
CGCAGTCATGTGGACCTATTAGTGGGCGCGGCCACGATGTGCTCTGCGCTCTACGTGGGT
GACATGTGTGGGGCTGTCTTCCTCGTGGGACAAGCCTTCACGTTCAGACCTCGTCGCCAT

【図２１Ｅ】

CAAACGGTCCAGACCTGTAACTGCTCGCTGTACCCAGGCCATCTTTCAGGACATCGAATG
GCTTGGGATATGATGATGAACTGGTAATAG

配列番号31 (HCCl63)
ATGGGTAAGGTCATCGATACCCTAACGTGCGGATTCGCCGATCTCATGGGGTATATCCCG
CTCGTAGGCGGCCCCATTGGGGGCGTCGCAAGGGCTCTCGCACACGGTGTGAGGGTCCTT
GAGGACGGGGTAAACTATGCAACAGGGAATTTACCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTTATT
CTTGCTCTTCTCTCGTGTCTGACCGTTCCGGCCTCTGCAGTTCCCTACCGAAATGCCTCT
GGGATTTATCATGTTACCAATGATTGCCCAAACTCTTCCATAGTCTATGAGGCAGATAAC
CTGATCCTACACGCACCTGGTTGCGTGCCTTGTGTCATGACAGGTAATGTGAGTAGATGC
TGGGTCCAAATTACCCCTACACTGTCAGCCCCGAGCCTCGGAGCAGTCACGGCTCCTCTT
CGGAGAGCCGTTGACTACCTAGCGGGAGGGGCTGCCCTCTGCTCCGCGTTATACGTAGGA
GACGCGTGTGGGGCACTATTCTTGGTAGGCCAAATGTTCACCTATAGGCCTCGCCAGCAC
GCTACGGTGCAGAACTGCAACTGTTCCATTTACAGTGGCCATGTTACCGGCCACCGGATG
GCATGGGATATGATGATGAACTGGTAATAG

配列番号33 (HCPr109)
TGGGATATGATGATGAACTGGTC

配列番号34 (HCPr72)
CTATTATGGTGGTAAKGCCARCARGAGCAGGAG

配列番号35 (HCCL22A)
TGGGATATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGG
ATCCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCGGGCCTC
GCCTACTATTCCATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGCC
GGCGTCGACGGGCATACCCGCGTGTCAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCAGGGGCCTT
GTGTCCCTCTTTAGCCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAGT
TGGCACATCAACAGGACTGCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGCC
GCACTATTCTACAAACACAAATTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGCCAGCTGT
CGCTCCATCGACAAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGC
TCGGACCAGAGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGCG
TCTCAGGTGTGCGGTCCAGTGTATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGACC
GATCGGTTTGGTGTCCCCACGTATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCTC
AACAACACGCGGCCGCCGCGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGG
TTCACCAAGACGTGTGGGGGCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAACACCTTG
ACCTGCCCCACTGACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCT
GGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCC
TGCACTGTCAACTTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCACAGG
TTCGAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAGA
TCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGATACTGCCCTGTTCCTTC

【図２１Ｆ】

ACCACCCTGCCGGCCCTATCCACCGGCCTGATCCACCTCCATCAGAACATCGTGGACGTG
CAATACCTGTACGGTGTAGGGTCGGCGGTTGTCTCCCTTGTCATCAAATGGGAGTATGTC
CTGTTGCTCTTCCTTCTCCTGGCAGACGCGCGCATCTGCGCCTGCTTATGGATGATGCTG
CTGATAGCTCAAGCTGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGTCCTCAATGCGGCGGCCGTG
GCCGGGGCGCATGGCACTCTTTCCTTCCTTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAG
GGCAGGCTGGTCCCTGGTGCGGCATACGCCTTCTATGGCGTGTGGCCGCTGCTCCTGCTT
CTGCTGGCCTTACCACCACGAGCTTATGCCTAGTAA

配列番号37 (HCC141)
GATCCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCGGGCCT
CGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGC
CGGCGTCGACGGGCATACCCGCGTGTCAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCAGGGGCCT
TGTGTCCCTCTTTAGCCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAG
TTGGCACATCAACAGGACTGCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGC
CGCACTATTCTACAAACACAAATTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGCCAGCTG
TCGCTCCATCGACAAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAG
CTCGGACCAGAGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGC
GTCTCAGGTGTGCGGTCCAGTGTATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGAC
CGATCGGTTTGGTGTCCCCACGTATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCT
CAACAACACGCGGCCGCCGCGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGG
GTTCACCAAGACGTGTGGGGGCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAACACCTT
GACCTGCCCCACTGACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTC
TGGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCC
CTGCACTGTCAACTTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCACAG
GTTCGAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAG
ATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGAGTGGCAGAGCTTAATT
AATTAG

配列番号39 (HCC142)
GATCCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCGGGCCT
CGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGC
CGGCGTCGACGGGCATACCCGCGTGTCAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCAGGGGCCT
TGTGTCCCTCTTTAGCCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAG
TTGGCACATCAACAGGACTGCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGC
CGCACTATTCTACAAACACAAATTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGCCAGCTG
TCGCTCCATCGACAAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAG
CTCGGACCAGAGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGC
GTCTCAGGTGTGCGGTCCAGTGTATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGAC
CGATCGGTTTGGTGTCCCCACGTATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCT
CAACAACACGCGGCCGCCGCGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGG
GTTCACCAAGACGTGTGGGGGCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAACACCTT

【図２１Ｇ】

GACCTGCCCCACTGACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTC
TGGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCC
CTGCACTGTCAACTTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCACAG
GTTCGAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAG
ATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGGTGATCGAGGGCAGACACCATCACC
ACCATCACTAATAG

配列番号41 (HCC143)
ATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTCGACGGG
CATACCCGCGTGTCAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCAGGGGCCTTGTGTCCCTCTTT
AGCCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAAC
AGGACTGCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGCCGCACTATTCTAC
AAACACAAATTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGCCAGCTGTCGCTCCATCGAC
AAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGCTCGGACCAGAGG
CCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGCGTCTCAGGTGTGC
GGTCCAGTGTATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGACCGATCGGTTTGGT
GTCCCCACGTATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCTCAACAACACGCGG
CCGCCGCGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTCACCAAGACG
TGTGGGGGCCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAACACCTTGACCTGCCCCACT
GACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCTGGGCCCTGGCTG
ACACCTAGGTGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCCTGCACTGTCAAC
TTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCACAGGTTCGAAGCCGCA
TGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAGATCAGAGCTTAGC
CCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGAGCTTAATTAATTAG

配列番号43 (HCC144)
ATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTCGACGGG
CATACCCGCGTGTCAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCAGGGGCCTTGTGTCCCTCTTT
AGCCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAAC
AGGACTGCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGCCGCACTATTCTAC
AAACACAAATTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGCCAGCTGTCGCTCCATCGAC
AAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGCTCGGACCAGAGG
CCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGCGTCTCAGGTGTGC
GGTCCAGTGTATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGACCGATCGGTTTGGT
GTCCCCACGTATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCTCAACAACACGCGG
CCGCCGCGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTCACCAAGACG
TGTGGGGGCCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAACACCTTGACCTGCCCCACT
GACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCTGGGCCCTGGCTG
ACACCTAGGTGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCCTGCACTGTCAAC
TTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCACAGGTTCGAAGCCGCA
TGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAGATCAGAGCTTAGC

【図２１Ｈ】

CCGCTGCTGCTGTCTACAACAGGTGATCGAGGGCAGACACCATCACCACCATCACTAATA
G

配列番号45 (HCCL64)
ATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCGGGCCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGG
AACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGCCGGCGTCGACGGGCATACCCGC
GTGTCAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCAGGGGCCTTGTGTCCCTCTTTAGCCCCGGG
TCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAGTTGGCACATCAACAGGACTGCC
CTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGCCGCACTATTCTACAAACACAAA
TTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGCCAGCTGTCGCTCCATCGACAAGTTCGCT
CAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGCTCGGACCAGAGGCCCTACTGC
TGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGCGTCTCAGGTGTGCGGTCCAGTG
TATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGACCGATCGGTTTGGTGTCCCCACG
TATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCTCAACAACACGCGGCCGCCGCGA
GGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTCACCAAGACGTGTGGGGGC
CCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAACACCTTGACCTGCCCCACTGACTGTTTT
CGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCTGGGCCCTGGCTGACACCTAGG
TGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCCTGCACTGTCAACTTCACCATC
TTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCACAGGTTCGAAGCCGCATGCAATTGG
ACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAGATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTG
CTGTCTACAACAGAGTGGCAGATACTGCCCTGTTCCTTCACCACCCTGCCGGCCCTATCC
ACCGGCCTGATCCACCTCCATCAGAACATCGTGGACGTGCAATACCTGTACGGTGTAGGG
TCGGCGGTTGTCTCCCTTGTCATCAAATGGGAGTATGTCCTGTTGCTCTTCCTTCTCCTG
GCAGACGCGCGCATCTGCGCCTGCTTATGGATGATGCTGCTGATAGCTCAAGCTGAGGCC
GCCTTAGAGAACCTGGTGGTCCTCAATGCGGCGGCCGTGGCCGGGGCGCATGGCACTCTT
TCCTTCCTTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGTGCG
GCATACGCCTTCTATGGCGTGTGGCCGCTGCTCCTGCTTCTGCTGGCCTTACCACCACGA
GCTTATGCCTAGTAA

配列番号47 (HCC165)
AATTTGGGTAAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATT
CCGCTCGTCGGCGCCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTT
CTGGAGGACGGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTC
CTCTTGGCTTTGCTGTCCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTG
TCCGGGATGTACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCG
GACATGATCATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGC
TGCTGGGTAGCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCGTCCCCACCACGACA
ATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTG
GGGGACCTCTGCGGATCTGTCTTCCTCGTCTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGG
CATGAGACGGTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGT
ATGGCTTGGGATATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTG
CTCCGGATCCCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCG

【図２１Ｉ】

GGCCTCGCCTACTATTCCATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTC
TTTGCCGGCGTCGACGGGCATACCCGCGTGTCAGGAGGGGCAGC AGCCTCCGATACCAG
GGGCCTTGTGTCCCTCTTTAGCCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAA
CGGCAGTTGGCACATCAACAGGACTGCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTT
CTTTGCCGCACTATTCTACAAACACAAATTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGC
CAGCTGTCGCTCCATCGACAAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCC
TAACAGCTCGGACCAGAGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGT
ACCCGCGTCTCAGGTGTGCGGTCCAGTGTATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGG
GACGACCGATCGGTTTGGTGTCCCCACGTATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCT
GATTCTCAACAACACGCGGCCGCCGCGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGG
CACTGGGTTCACCAAGACGTGTGGGGGCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAA
CACCTTGACCTGCCCCACTGACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATG
CGGTTCTGGGCCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCA
CTACCCCTGCACTGTCAACTTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGA
GCACAGGTTCGAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAG
GGATAGATCAGAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGATACTGCCCTG
TTCCTTCACCACCCTGCCGGCCCTATCCACCGGCCTGATCCACCTCCATCAGAACATCGT
GGACGTGCAATACCTGTACGGTGTAGGGTCGGCGGTTGTCTCCCTTGTCATCAAATGGGA
GTATGTCCTGTTGCTCTTCCTTCTCCTGGCAGACGCGCGCATCTGCGCCTGCTTATGGAT
GATGCTGCTGATAGCTCAAGCTGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGTCCTCAATGCGGC
GGCCGTGGCCGGGGCGCATGGCACTCTTTCCTTCCTTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTA
CATCAAGGGCAGGCTGGTCCCTGGTGCGGCATACGCCTTCTATGGCGTGTGGCCGCTGCT
CCTGCTTCTGCTGGCCTTACCACCACGAGCTTATGCCTAGTAAGCTT

配列番号49（HCC166）
ATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCCCACAG
GACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAGG
GGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCGACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTCGCAACCTCGTGGG
AGGCGACAACCTATCCCCAAGGCTCGCCGACCCGAGGGTAGGGCCTGGGCTCAGCCCGGG
TACCCTTGGCCCCTCTATGGCAATGAGGGCATGGGGTGGGCAGGATGGCTCCTGTCACCC
CGCGGCTCTCGGCCTAGTTGGGGCCCTACAGACCCCCGGCGTAGGTCGCGTAATTTGGGT
AAGGTCATCGATACCCTTACATGCGGCTTCGCCGACCTCGTGGGGTACATTCCGCTCGTC
GGCGCCCCCCTAGGGGGCGCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTTCTGGAGGAC
GGCGTGAACTATGCAACAGGGAATTTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTATCTTCCTCTTGGCT
TTGCTGTCCTGTCTGACCGTTCCAGCTTCCGCTTATGAAGTGCGCAACGTGTCCGGGATG
TACCATGTCACGAACGACTGCTCCAACTCAAGCATTGTGTATGAGGCAGCGGACATGATC
ATGCACACCCCCGGGTGCGTGCCCTGCGTTCGGGAGAACAACTCTTCCCGCTGCTGGGTA
GCGCTCACCCCCACGCTCGCAGCTAGGAACGCCAGCGTCCCCACCACGACAATACGACGC
CACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTTTCTGTTCCGCTATGTACGTGGGGGACCTC
TGCGGATCTGTCTTCCTCGTCTCCCAGCTGTTCACCATCTCGCCTCGCCGGCATGAGACG
GTGCAGGACTGCAATTGCTCAATCTATCCCGGCCACATAACGGGTCACCGTATGGCTTGG

【図２１Ｊ】

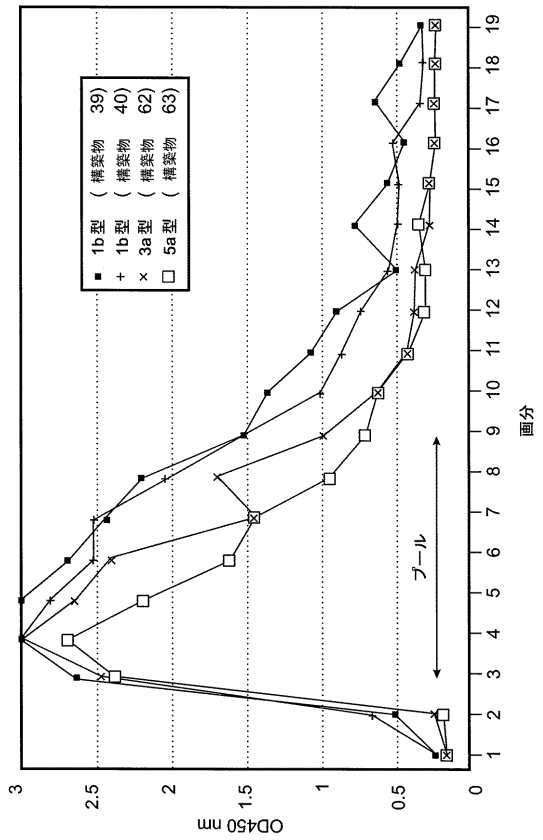
GATATGATGATGAACTGGTCGCCTACAACGGCCCTGGTGGTATCGCAGCTGCTCCGGATC
CCACAAGCTGTCGTGGACATGGTGGCGGGGGCCCATTGGGGAGTCCTGGCGGGCCTCGCC
TACTATTCCATGGTGGGGAACTGGGCTAAGGTTTTGGTTGTGATGCTACTCTTTGCCGGC
GTCGACGGGCATACCCGCGTGTCAGGAGGGGCAGCAGCCTCCGATACCAGGGGCCTTGTG
TCCCTCTTTAGCCCCGGGTCGGCTCAGAAAATCCAGCTCGTAAACACCAACGGCAGTTGG
CACATCAACAGGACTGCCCTGAACTGCAACGACTCCCTCCAAACAGGGTTCTTTGCCGCA
CTATTCTACAAACACAAATTCAACTCGTCTGGATGCCCAGAGCGCTTGGCCAGCTGTCGC
TCCATCGACAAGTTCGCTCAGGGGTGGGGTCCCCTCACTTACACTGAGCCTAACAGCTCG
GACCAGAGGCCCTACTGCTGGCACTACGCGCCTCGACCGTGTGGTATTGTACCCGCGTCT
CAGGTGTGCGGTCCAGTGTATTGCTTCACCCCGAGCCCTGTTGTGGTGGGGACGACCGAT
CGGTTTGGTGTCCCCACGTATAACTGGGGGGCGAACGACTCGGATGTGCTGATTCTCAAC
AACACGCGGCCGCCGCGAGGCAACTGGTTCGGCTGTACATGGATGAATGGCACTGGGTTC
ACCAAGACGTGTGGGGGCCCCCCGTGCAACATCGGGGGGGCCGGCAACAACACCTTGACC
TGCCCCACTGACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAGGCCACCTACGCCAGATGCGGTTCTGGG
CCCTGGCTGACACCTAGGTGTATGGTTCATTACCCATATAGGCTCTGGCACTACCCCTGC
ACTGTCAACTTCACCATCTTCAAGGTTAGGATGTACGTGGGGGGCGTGGAGCACAGGTTC
GAAGCCGCATGCAATTGGACTCGAGGAGAGCGTTGTGACTTGGAGGACAGGGATAGATCA
GAGCTTAGCCCGCTGCTGCTGTCTACAACAGAGTGGCAGATACTGCCCTGTTCCTTCACC
ACCCTGCCGGCCCTATCCACCGGCCTGATCCACCTCCATCAGAACATCGTGGACGTGCAA
TACCTGTACGGTGTAGGGTCGGCGGTTGTCTCCCTTGTCATCAAATGGGAGTATGTCCTG
TTGCTCTTCCTTCTCCTGGCAGACGCGCGCATCTGCGCCTGCTTATGGATGATGCTGCTG
ATAGCTCAAGCTGAGGCCGCCTTAGAGAACCTGGTGGTCCTCAATGCGGCGGCCGTGGCC
GGGGCGCATGGCACTCTTTCCTTCCTTGTGTTCTTCTGTGCTGCCTGGTACATCAAGGGC
AGGCTGGTCCCTGGTGCGGCATACGCCTTCTATGGCGTGTGGCCGCTGCTCCTGCTTCTG
CTGGCCTTACCACCACGAGCTTATGCCTAGTAA

Figure 21J

【図２２】

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

【図２３】

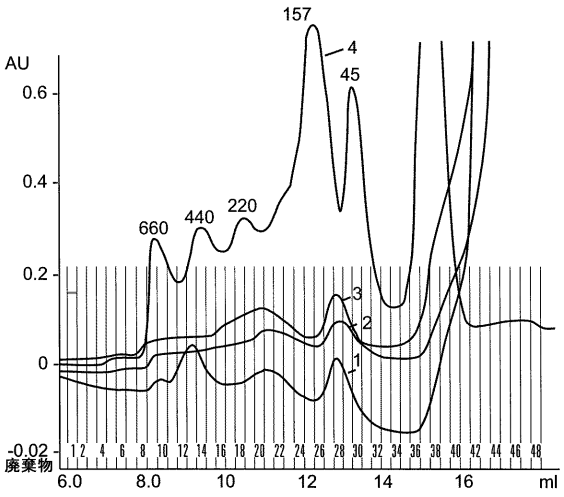


【図２４】

450nm で測定された OD、構築物

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

【図２５】



【図２６】

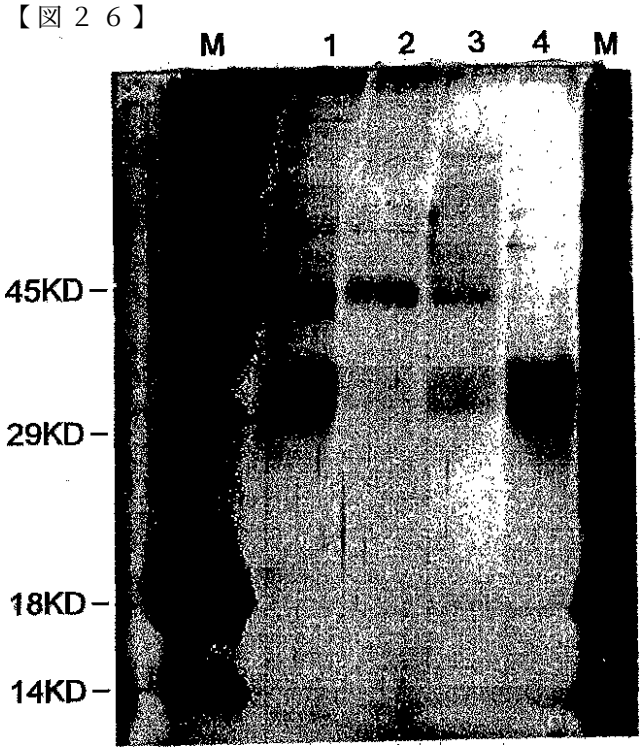


Figure 26

【図２７】

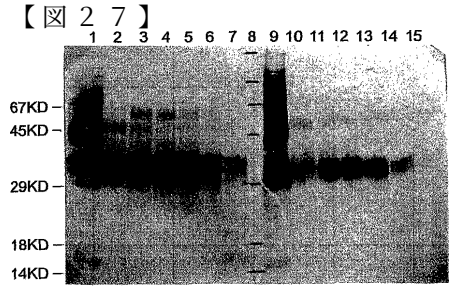


Figure 27

【図２８】

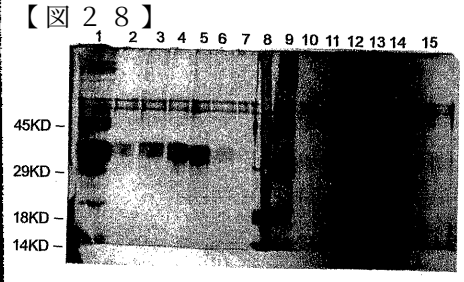
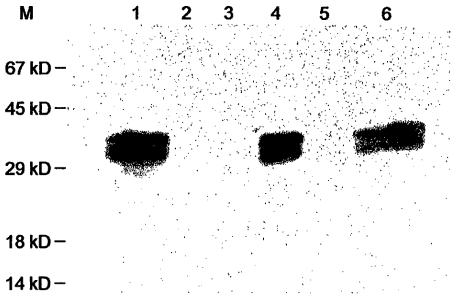


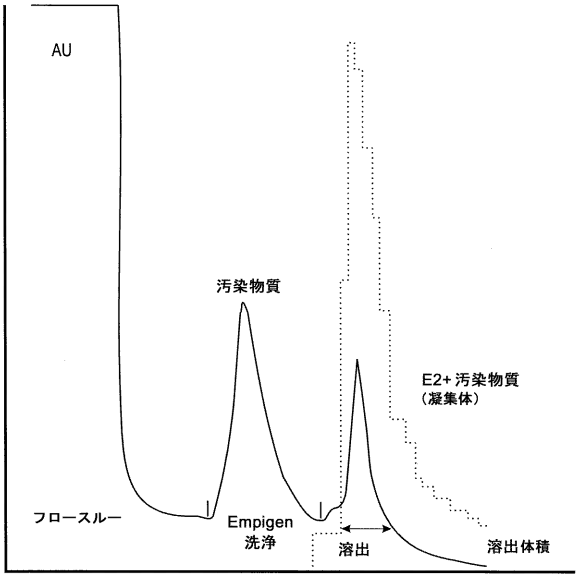
Figure 28

【図２９】

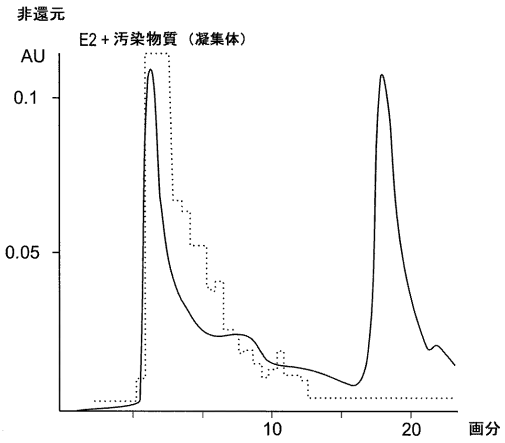


レーン1：粗製溶解産物
レーン2：レンチルクロマトグラフィのフロースルー
レーン3：レンチルクロマトグラフィをEmpigenで洗浄
レーン4：レンチルクロマトグラフィの溶出液
レーン5：レンチル溶出液の濃縮中のフロースルー
レーン6：サイズ排除クロマトグラフィ後のE1のプール

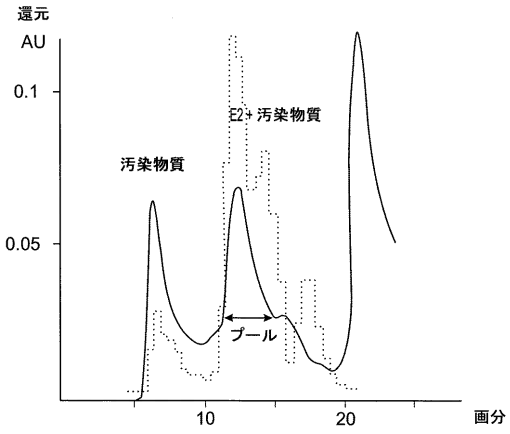
【図３０】



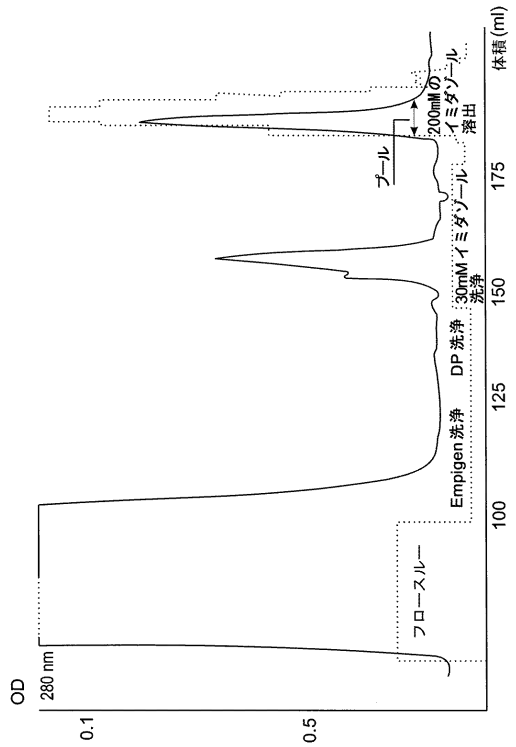
【図３１Ａ】



【図３１Ｂ】

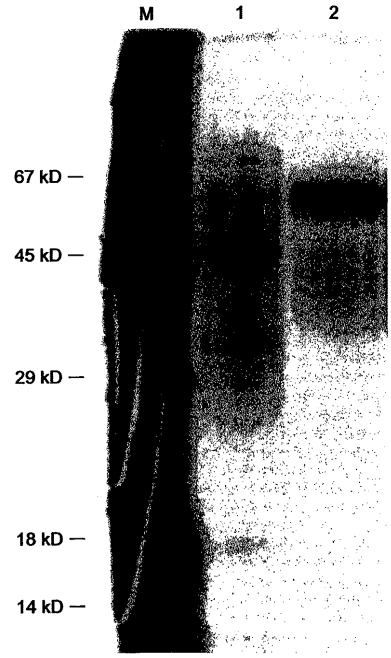


【図３２】



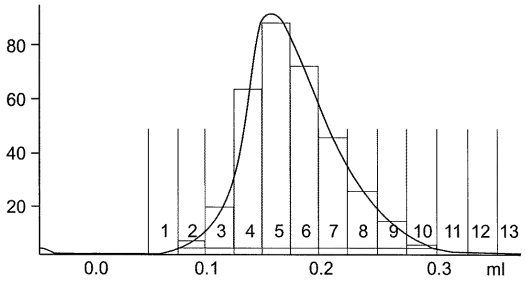
【図３３】

図 33 : 精製済み E2 の銀染色



1. 30mM のイミダゾール洗浄、 NiIMAC
2. 0.5μg の E2

【図３４】



No.	Ret (ml)	ピーク開始 (ml)	ピーク終了 (ml)	持続時間 (ml)	面積 (ml*mAU)	高さ (mAU)
1	-0.45	-0.46	-0.43	0.04	0.0976	4.579
2	1.55	0.75	3.26	2.51	796.4167	889.377
3	3.27	3.26	3.31	0.05	0.0067	0.224
4	3.33	3.32	3.33	0.02	0.0002	0.018

検出されたピークの合計数 = 4
基線より上の合計面積 = 0.796522 ml*AU
推定されたピーク内の合計面積 = 0.796521 ml*AU
ピーク面積と合計面積の比率 = 0.999999
合計ピーク持続時間 = 2.613583 ml

【図３５Ａ－１】

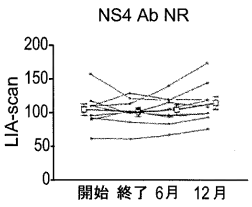


図 35A-1

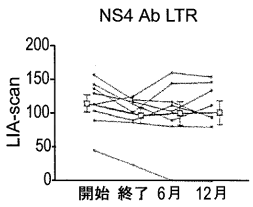


図 35A-2

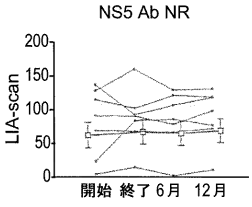


図 35A-3

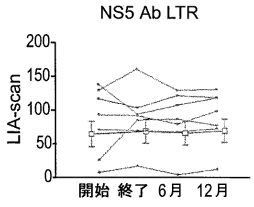


図 35A-4

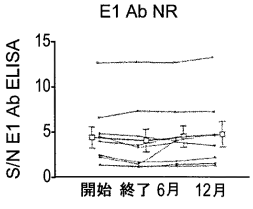


図 35A-5

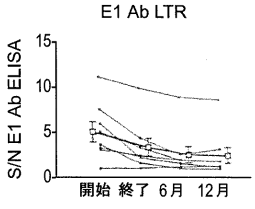


図 35A-6

【図３５Ａ－２】

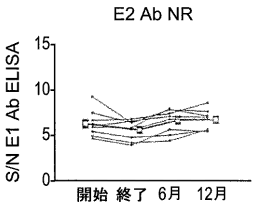


図 35A-7

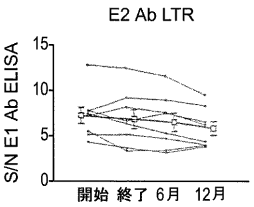


図 35A-8

【図３５Ｂ－１】

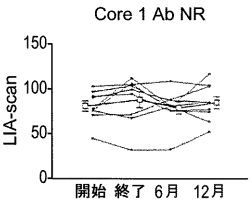


図 35B-1

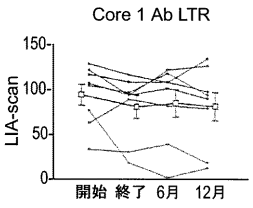


図 35B-2

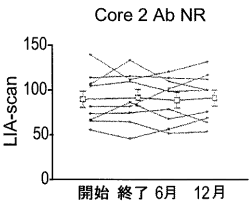


図 35B-3

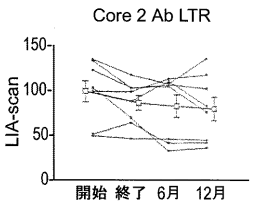


図 35B-4

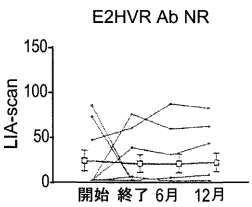


図 35B-5

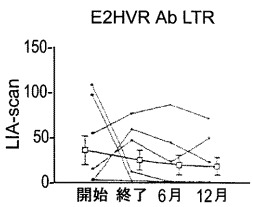


図 35B-6

【図３５Ｂ－２】

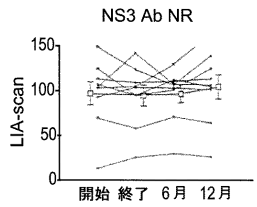


図 35B-7

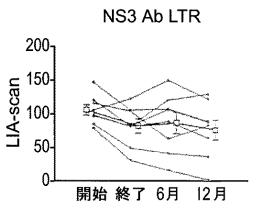
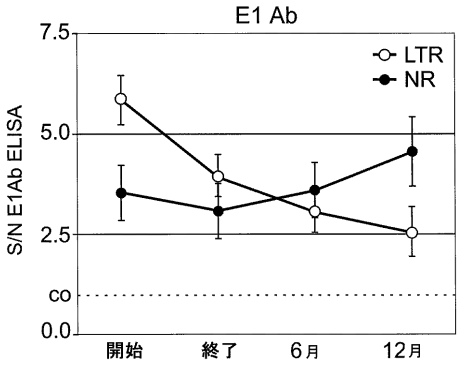
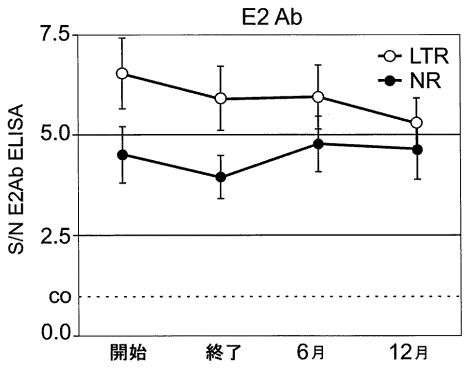


図 35B-8

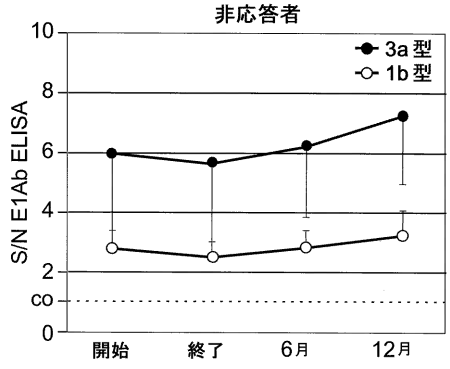
【図３６Ａ】



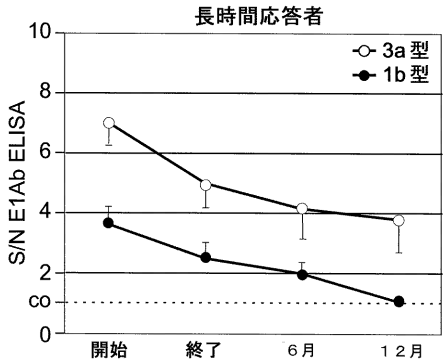
【図３６Ｂ】



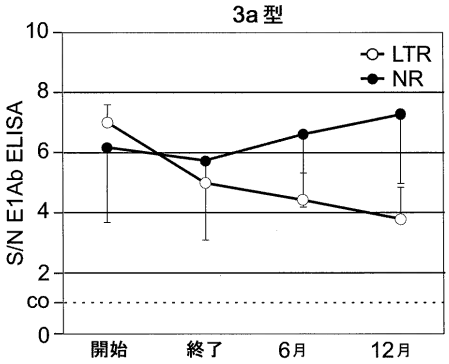
【図３７Ａ】



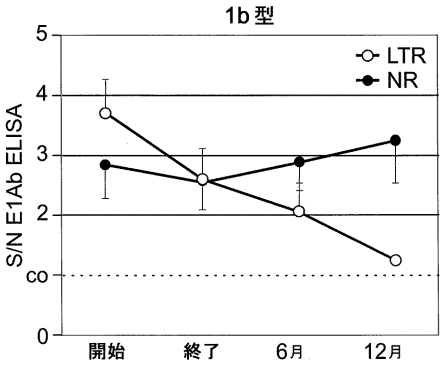
【図３７Ｂ】



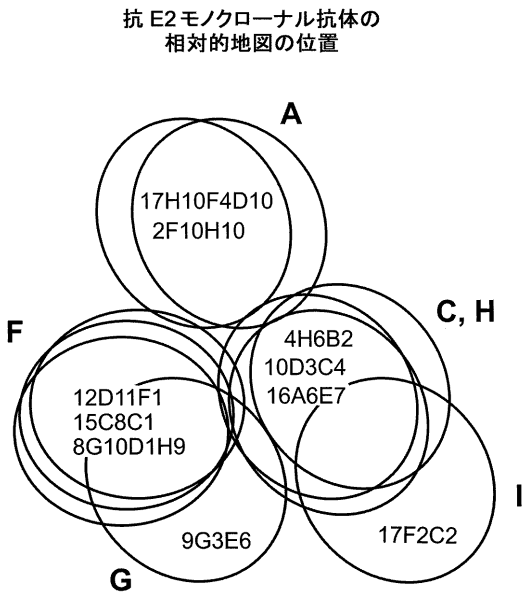
【図３７Ｄ】



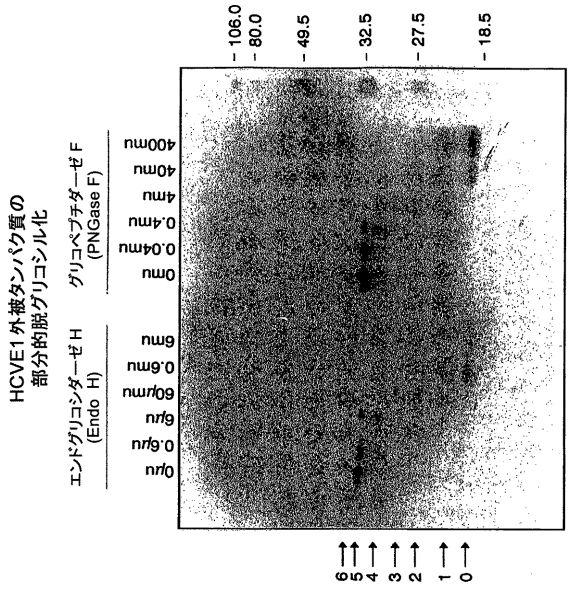
【図３７Ｃ】



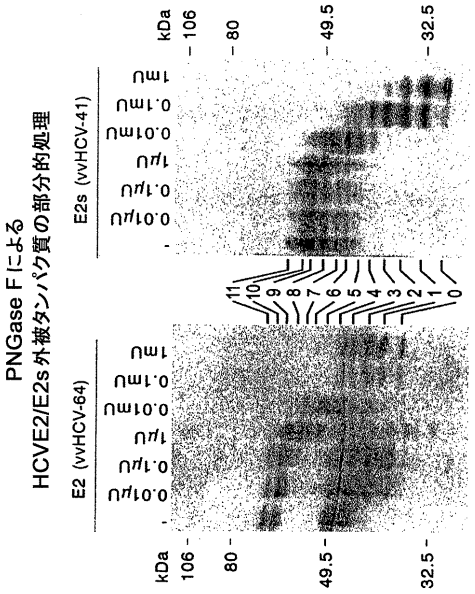
【図３８】



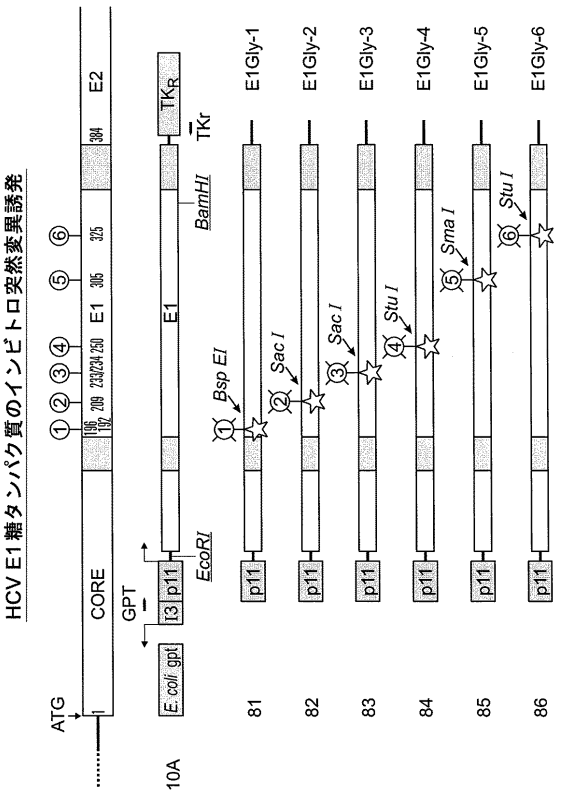
【図３９】



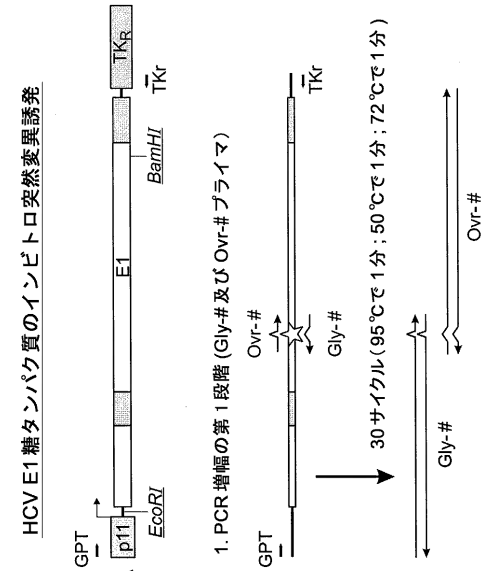
【図４０】



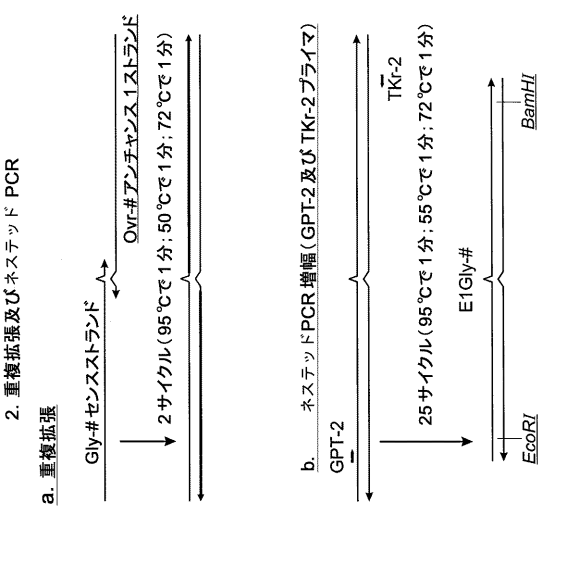
【図４１】



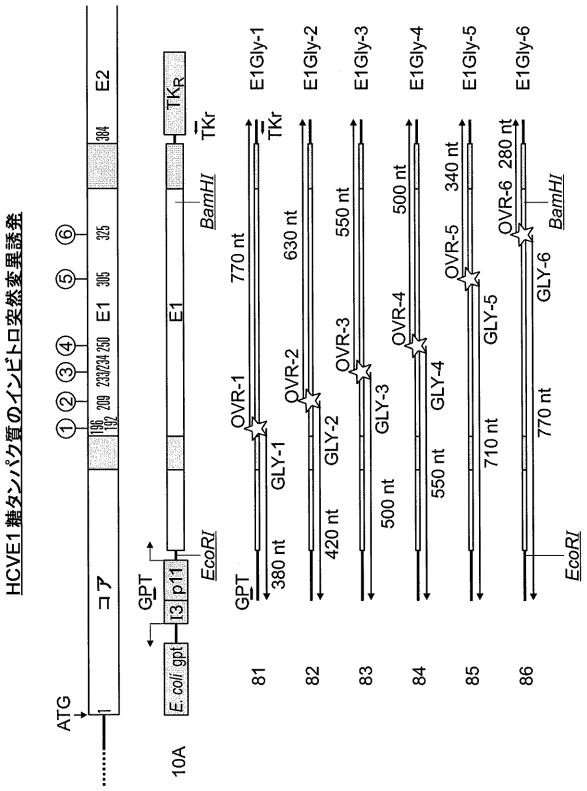
【図４２Ａ】



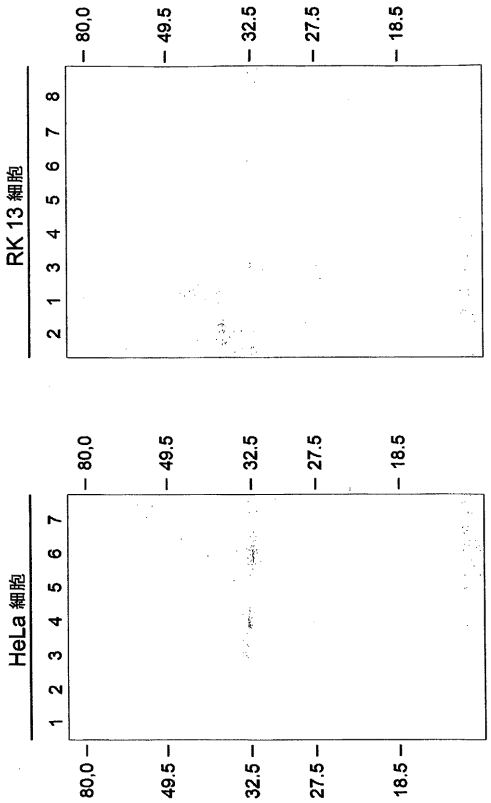
【図４２Ｂ】



【図４３】



【図４４Ａ】



【図４４Ｂ】

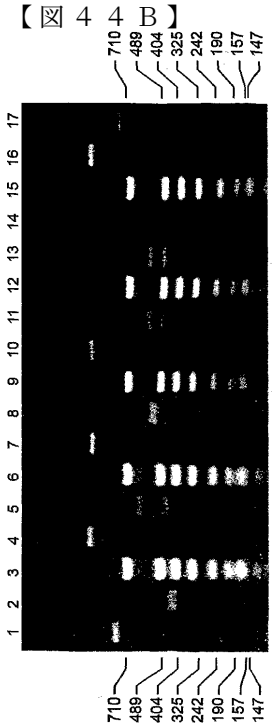


Figure 44B

【図４５】

Figure 45

【図４６】

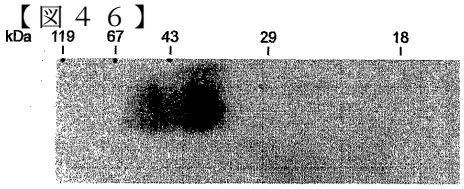
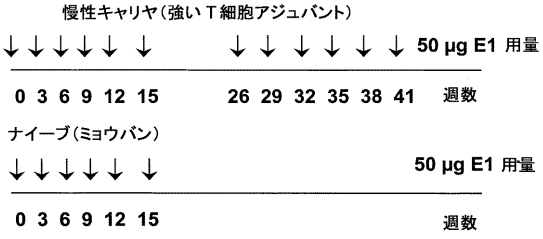


Figure 46

【図４７】

	年齢（年数）	HCV感染（年数）	遺伝子型
Marcel	17	9	1a
Peggy	21	16,5	1b
Femma	15	9	1a
Yoran	12	無し	
Marti	12	無し	



【図４８】

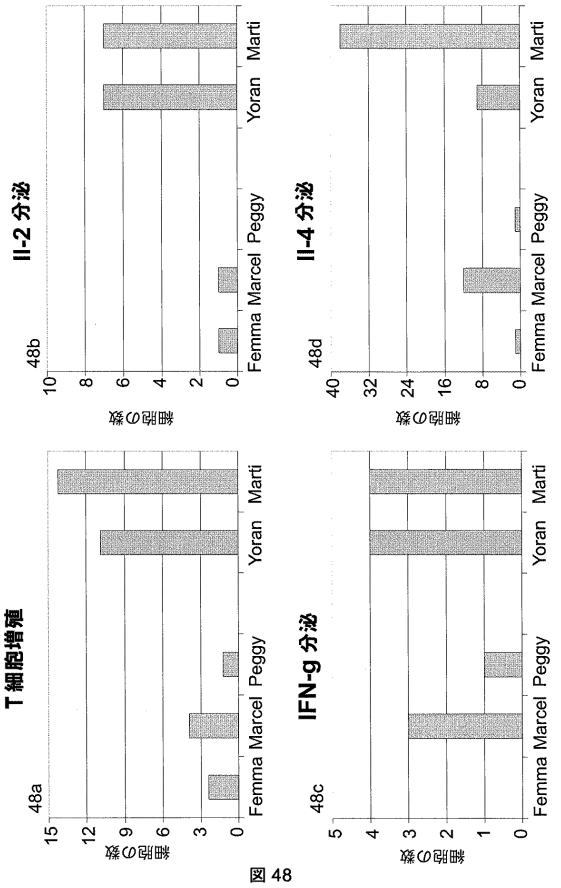
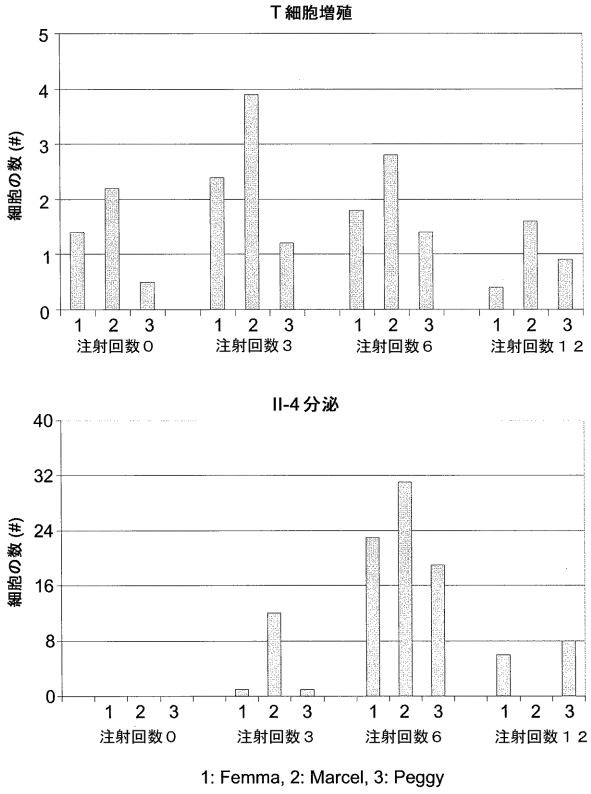
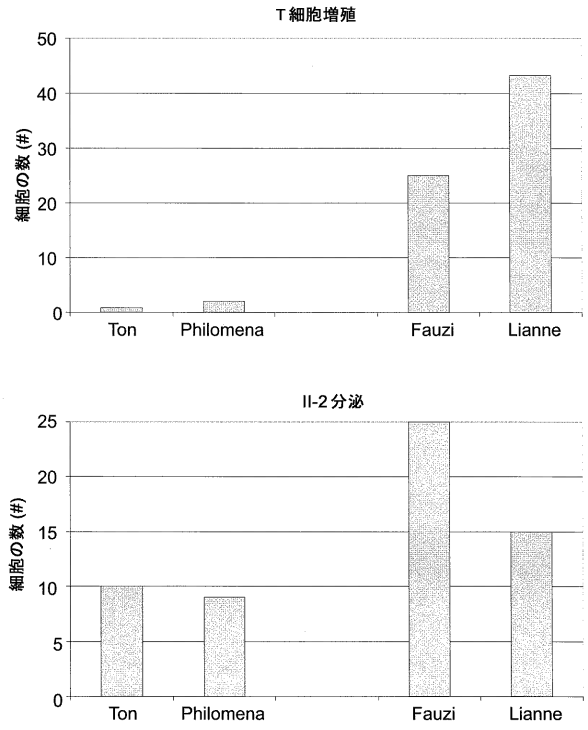


図 48

【図４９】



【図５０】



【図５１】

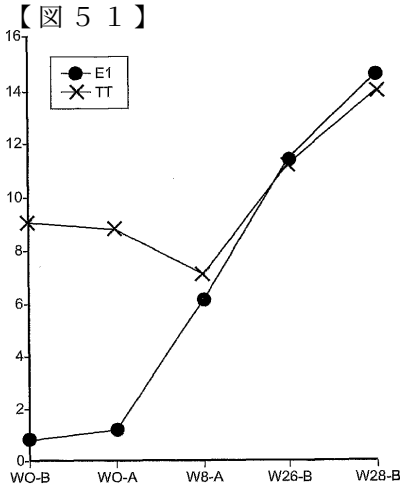
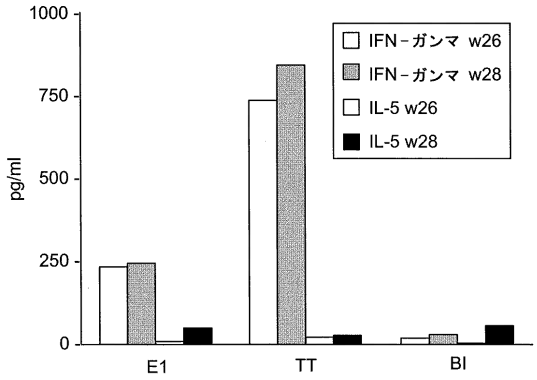
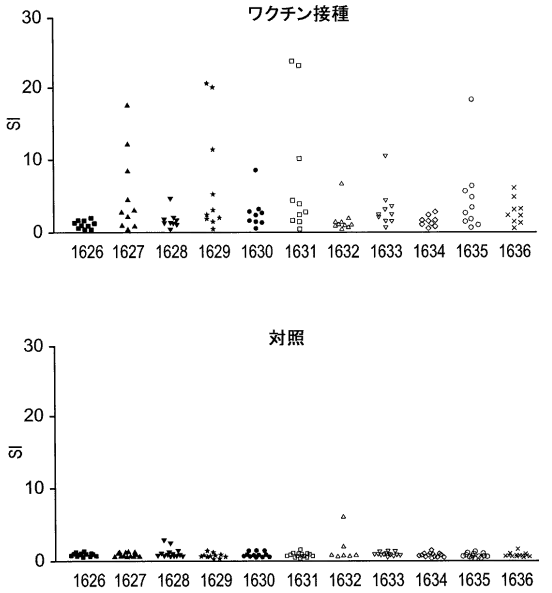


Figure 51

【図５２】



【図５３】



【図５４】

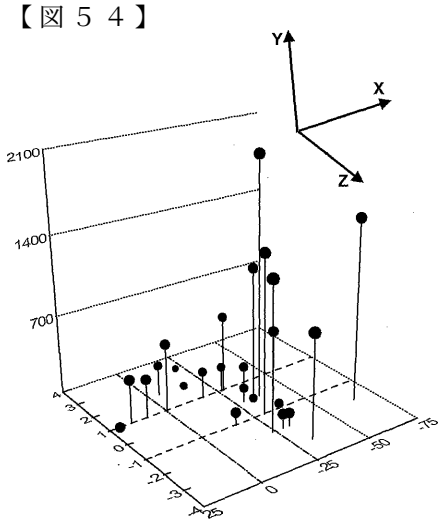


FIGURE 54

【図５５】

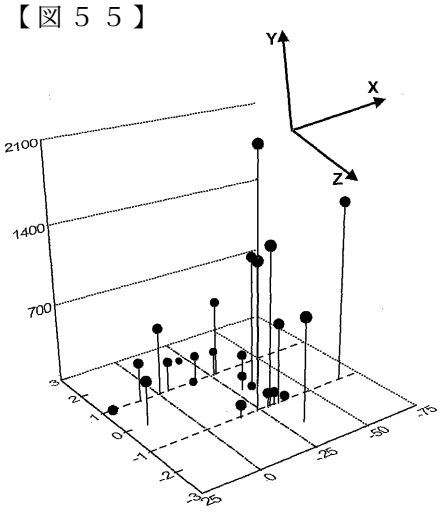


FIGURE 55

【図５６】

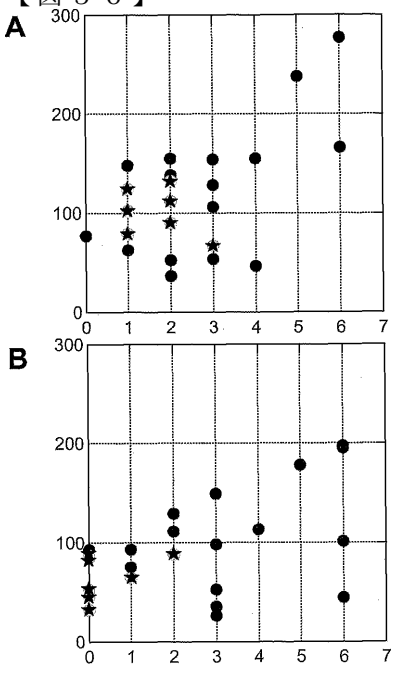


FIGURE 56

【図５７】

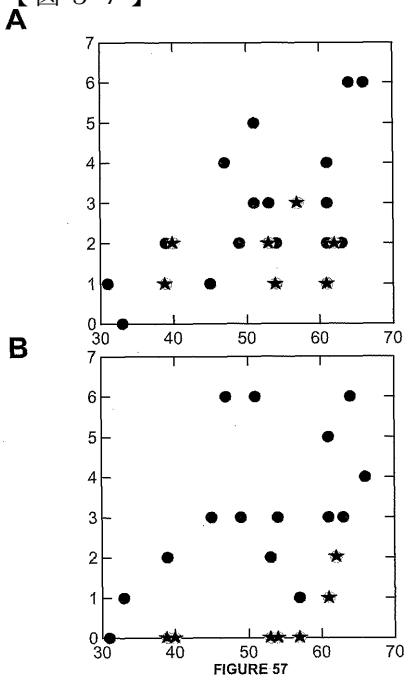


FIGURE 57

【手続補正書】
【提出日】平成16年6月18日(2004.6.18)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
2005516939000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna Application No
PCT/EP 02/14480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/29 G01N33/576 G01N33/569 C07K14/18 C12N15/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 12677 A (DELEYS ROBERT ;INNOGENETICS NV (BE); MAERTENS GEERT (BE); LEROUX R) 11 May 1995 (1995-05-11) table 1	1-11, 13-23, 26-29
X	WO 99 67285 A (WIJNENDAELE FRANS VAN ;BOSMAN ALFONS (BE); DEPLA ERIK (BE); INNOGE) 29 December 1999 (1999-12-29) example 4	1-11,13, 16,19, 20,22-29

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 September 2003	26. 09. 03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Schwachtgen, J-L

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/14480

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 12 and 30 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [X] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

24 and 25 (totally) and 1-11, 13-23 and 26-29 (partially)

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[X] No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02/14480

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-11, 13-23, 26-29 (partially), Invention 1

   A therapeutic HCV vaccine composition comprising the peptide E1-31 (SEQ ID NO:56). Subject-matter related thereto.

2. Claims: 1-11, 13-23, 26-29 (partially), Inventions 2-26

   Idem to Subject 1, but for each of the peptides SEQ ID NO: 57-59, 53, 66-68, 72, 73, 86-88, 83, 82, 112-122

3. Claims: 24 and 25; 1-11, 13, 16, 19, 20, 22, 23, 26-29 (partially)

   A therapeutic HCV vaccine composition comprising the peptide E1s (SEQ ID NO:123). Subject-matter related thereto.

4. Claims: 12, 30, Invention 27

   A method to predict changes in liver disease

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tion on patent family members

Interna Application No
PCT/ER 02/14480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9512677 A	11-05-1995	AT 236981 T	15-04-2003
		AU 698878 B2	12-11-1998
		AU 7993294 A	23-05-1995
		CA 2175692 A1	11-05-1995
		DE 69432475 D1	15-05-2003
		DK 725824 T3	11-08-2003
		WO 9512677 A2	11-05-1995
		EP 0725824 A1	14-08-1996
		EP 0992580 A2	12-04-2000
		EP 0992581 A2	12-04-2000
		EP 0979867 A2	16-02-2000
		JP 9504534 T	06-05-1997
		US 6555114 B1	29-04-2003
		US 6613333 B1	02-09-2003
WO 9967285 A	29-12-1999	AU 4615299 A	10-01-2000
		BR 9911397 A	15-01-2002
		CA 2330526 A1	29-12-1999
		CN 1313864 T	19-09-2001
		WO 9967285 A1	29-12-1999
		EP 1090033 A1	11-04-2001
		HU 0102478 A2	28-10-2001
		JP 2002518037 T	25-06-2002
		PL 345018 A1	19-11-2001
		TR 200003843 T2	21-06-2001
		US 2003095980 A1	22-05-2003
		US 2003118603 A1	26-06-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI	テーマコード（参考）
// Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 15/00 ＺＮＡＡ	

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

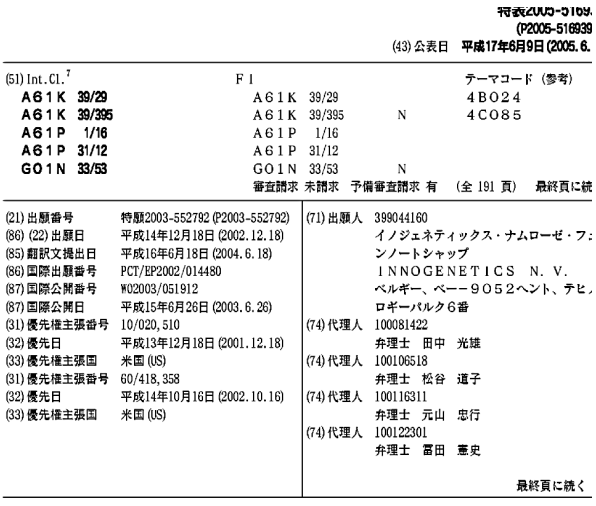
(74)代理人 100127638
弁理士 志賀 美苗
(72)発明者 ヘールト・メールテンス
ベルギー、ベー－８３１０ブルッヘ、ジルファースパレンストラート６４番
(72)発明者 エリック・デプラ
ベルギー、ベー－９０７０デステルベルヘン、ブルフストラート５８番
(72)発明者 フォンス・ボスマン
ベルギー、ベー－１７４５オプウェイク、フルスト１６５番

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA33 CA04 DA02 DA12 EA02 EA04 GA11 HA15
4C085 AA03 AA14 BA87 BA92 CC08 CC21 DD62 EE06 FF01

专利名称(译)	纯化的丙型肝炎病毒外壳蛋白，用于诊断和治疗应用		
公开(公告)号	JP2005516939A	公开(公告)日	2005-06-09
申请号	JP2003552792	申请日	2002-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司南玫瑰汾笔记本闭嘴 基因创新有限公司		
申请(专利权)人(译)	Innogenetics公司，Namuroze芬恩笔记本闭嘴		
[标]发明人	ヘールトメールテンス エリックデプラ フォンスボスマン		
发明人	ヘールト·メールテンス エリック·デプラ フォンス·ボスマン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/29 A61K39/395 A61P1/16 A61P31/12 C07K14/18 C12N15/09 C12N15/40		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P1/16 C07K14/005 C12N2770/24222		
FI分类号	A61K39/29 A61K39/395.N A61P1/16 A61P31/12 G01N33/53.N C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA33 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA15 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BA87 4C085/BA92 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE06 4C085/FF01		
代理人(译)	田中，三夫 富田健二		
优先权	10/020510 2001-12-18 US 60/418358 2002-10-16 US		
其他公开文献	JP2005516939A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于纯化选自E1和/或E2和/或E1 / E2的重组HCV单或特异性寡聚包膜蛋白的方法，其特征在于，裂解转化的宿主细胞以分离重组表达的蛋白 用二硫键裂解剂进行二硫键裂解或还原步骤。 本发明还涉及通过这种方法分离的组合物。 本发明还涉及这些组合物的诊断和治疗应用。 此外，本发明涉及HCV E1蛋白和肽在预后和监测HCV治疗的临床有效性和/或临床结果中的用途。



特表2005-516939
(P2005-516939)
(43)公表日 平成17年6月9日(2005.6.

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
A61K 39/29	A61K 39/29		4B024
A61K 39/395	A61K 39/395	N	4C085
A61P 1/16	A61P 1/16		
A61P 31/12	A61P 31/12		
G01N 33/53	G01N 33/53	N	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 （全 191 頁） 最終頁に続

(21)出願番号	特願2003-552792 (P2003-552792)
(86)(22)出願日	平成14年12月18日 (2002.12.18)
(85)翻訳文提出日	平成16年6月18日 (2004.6.18)
(86)国際出願番号	PCT/EP2002/014480
(87)国際公開番号	WO2003/051912
(87)国際公開日	平成15年6月26日 (2003.6.26)
(31)優先権主張番号	10/020,510
(32)優先日	平成13年12月18日 (2001.12.18)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	60/418,358
(32)優先日	平成14年10月16日 (2002.10.16)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人	399044160 イノジェネティックス・ナムローゼ・フ: ンノートシャップ ＩＮＮＯＧＥＮＥＴＩＣＳ Ｎ．Ｖ． ベルギー、ベー９０５２ヘント、テヒ、 ロギーパルク６番
(74)代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(74)代理人	100116311 弁理士 元山 忠行
(74)代理人	100122301 弁理士 冨田 憲史

最終頁に続く