

(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2014-516520

(P2014-516520A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-509382 (P2014-509382)  
 (86) (22) 出願日 平成24年5月2日 (2012.5.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月27日 (2013.12.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/036098  
 (87) 国際公開番号 W02012/151263  
 (87) 国際公開日 平成24年11月8日 (2012.11.8)  
 (31) 優先権主張番号 61/481,457  
 (32) 優先日 平成23年5月2日 (2011.5.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501335771  
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシ  
 ティ  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2  
 1 8 バルティモアーノース・チャールズ  
 ・ストリート 3 4 0 0  
 (74) 代理人 100147485  
 弁理士 杉村 憲司  
 (74) 代理人 100136858  
 弁理士 池田 浩  
 (74) 代理人 100175606  
 弁理士 上利 美由紀

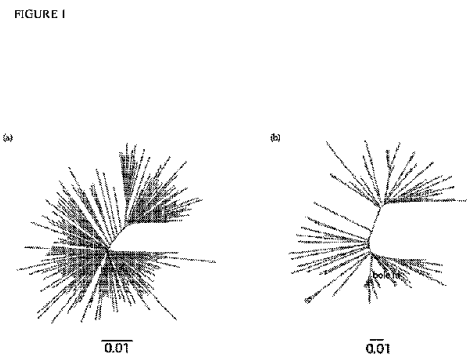
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 合成C型肝炎ゲノム、並びに、その製造方法及びその使用

(57) 【要約】

1 a及び1 bゲノム、並びに、二本鎖B o l e 1 a及びB o l e 1 bを含む合成の代表的H C Vサブタイプは、B a y e s i a nの系統樹分析、祖先配列再構成、及び共変動分析の発明方法の使用により提供される。B o l e 1 aは、3 9 0個の全ゲノム配列中で中心的に分枝する。設計において、B a l t i m o r eコホートからの、注意深く精選された1 4 3個の全長ゲノム配列のデータセットと、2 1 4個のE 1 E 2配列の独立セットを含む分離したゲノム領域を用いた。B o l e 1 aは、広範に循環する株の系統的代表である。全長ゲノム非同義多様性比較と、9残基アミノ酸ペプチドカバー度分析から、従来の参照配列のH 7 7を含んだデータセットにおける他のいかなる配列より、B o l e 1 aは、高いカバー度(それぞれ9 4 %と7 8 %)を提供できることが示された。B o l e 1 aは、また、既知の全てのT細胞エピトープと比較すると、卓越したエピトープカバー度を提供する。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

合成の C 型肝炎ウイルスサブタイプ 1 a ( B o l e 1 a ) のゲノムを符号化する核酸分子であって、配列番号 1 ( S E Q I D N O : 1 ) のヌクレオチド配列、該ヌクレオチド配列の一部若しくは断片、又は前記ヌクレオチド配列若しくは該ヌクレオチド配列の一部若しくは断片の相補鎖 ( c o m p l e m e n t ) を含む核酸分子。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の単離された核酸分子を含む単離された宿主細胞。

## 【請求項 3】

宿主細胞が哺乳類細胞である、請求項 2 に記載の単離された宿主細胞。

10

## 【請求項 4】

配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列又は該ヌクレオチド配列の相補鎖に特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子。

## 【請求項 5】

長さが約 10 ~ 約 30 のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプライマーである、請求項 4 に記載の核酸分子。

## 【請求項 6】

第一のプライマーが配列番号 1 に示されたヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズする、長さが 10 ~ 30 のヌクレオチドの単離された核酸分子であり、第二のプライマーが配列番号 1 に示されたヌクレオチド配列の相補鎖に特異的にハイブリダイズする、長さが 10 ~ 30 のヌクレオチドの単離された核酸分子である、1 組の P C R 用オリゴヌクレオチドプライマー。

20

## 【請求項 7】

請求項 1 に記載の核酸によって符号化される単離されたポリペプチド、又は該ポリペプチドの一部若しくは断片。

## 【請求項 8】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 9】

( a ) 配列番号 1 のコア配列の最後の 27 アミノ酸と、続く E 1 と E 2 領域のアミノ酸配列と、

30

( b ) レポーターエレメントを含む、ウイルス粒子。

## 【請求項 10】

前記レポーターエレメントが、ルシフェラーゼポリ蛋白又は該ルシフェラーゼポリ蛋白の機能的部位である、請求項 9 に記載のウイルス粒子。

## 【請求項 11】

請求項 7 又は 8 に記載のポリペプチドの 15 ~ 100 の近接するアミノ酸を符号化するポリヌクレオチド分子を含む H C V 抗原。

## 【請求項 12】

前記ポリヌクレオチド分子が請求項 7 に記載のポリペプチドのコア領域、E 1 領域、及び / 又は E 2 領域からのアミノ酸を符号化する請求項 11 に記載の H C V 抗原。

40

## 【請求項 13】

請求項 1 に記載の核酸分子、又は請求項 7 若しくは 8 の単離されたポリペプチドに特異的に結合する、抗体若しくは該抗体の抗原結合部位。

## 【請求項 14】

ヒトの抗体分子、又はヒト化された抗体分子である、請求項 13 に記載の抗体。

## 【請求項 15】

検出可能な標識で標識された、請求項 13 又は 14 に記載の抗体。

## 【請求項 16】

試料中の H C V の存在を調べるための試料の試験方法であって、該方法は、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の抗体に特異的に結合する試料中のポリペプチドの存在を検

50

出する工程を含む。

【請求項 17】

請求項 11 又は 12 の抗原を含む医薬組成物を、前記対象における抗原に対する免疫応答を刺激するのに十分な量で、前記対象に投与する工程を含み、前記免疫応答が前記対象における HCV ウィルス量を減らすのに十分な程度である、HCV 感染対象を治療する方法。

【請求項 18】

(a) 2 以上の HCV ポリヌクレオチド配列を得て、  
 (b) 適切なアラインメントプログラムを用いてポリヌクレオチド配列を整列させ、  
 (c) 前記 (b) において、系統樹用のパラメーターの収束を確認するための十分な繰り返しのために、アラインメントの系統学的に有益な情報の 2 つの領域を適用したベイジアン法又は最尤法を用いて、2 以上の系統樹をアラインメントから作製し、

(d) 評価に用いるプログラムが、各位置における確率分布として祖先配列を推測しなければならず、各塩基における確率を発生させるもので、系統樹及び推測された祖先配列の両方を、HCV ゲノムの用残りに用い、

(e) 次の方法 (方法 I 及び II)、すなわち、ゲノムにおける各ヌクレオチド位置  $i$  において、両樹の最大事後確率 (MPP) 残基が一致する場合、その位置 ( $p_i$ ) における確率は、2 つの MPPs のうち高いものが選択され、これらの位置は合致として確定し、

各不一致位置 (MPP 残基が一致しない位置) において、直接ステップ (d) へ進み (方法 I)、又は、両樹に基づく不一致位置を含むコドン  $k$  の結合確率を計算し (方法 II)

、  
 該コドン中の一致残基においては、前記ステップで計算される  $p_i$  が結合確率を計算するのに用いられ、

2 つの樹から高い結合 MPP を有するコドンが、そのコドン位置の代表に選択される方法で最終代表配列を推測し、

(f) 第二の派生での相違が  $10^{-6}$  より低い MPP 値での、コドン / ヌクレオチド MPPs の分布における変曲が、コドン / ヌクレオチドを解決するための閾値として用いられ、

各樹に基づく閾値以上の MPP を有する各コドン / ヌクレオチドは、祖先のものとして受け入れられ、その構成の位置は解決位置と確定されるように、コドン / ヌクレオチド MPP ストリンジェントのための閾値を決定し、

(g) 観察及び予期される塩基組合せの頻度が決定され、カイ二乗測定基準は、式 1 に示されるように計算され、ホルム - ボンフェローニ法 ( $\alpha = 0.05$ ) を用いた多重比較法により調整され、未解決位置を決定するために共分散分析を使用し、

【数 1】

$$\chi_{ij}^2 = (o_{ij} - e_{ij}) / e_{ij} \quad (1)$$

(h) 未解決位置  $i$  と著しく共変動する全ての解決位置  $j$  を同定する、調整されたカイ二乗測定基準を用い、正の相互作用の場合 ( $o_{ij} > e_{ij}$ )、正に相互作用する残基を含む MPP コドン / ヌクレオチドが選択され、負の相互作用の場合 ( $o_{ij} < e_{ij}$ )、負に相互作用する塩基を含む全てのコドン / ヌクレオチドが除かれ、残りから MPP コドンが選択され、そして、

(i) 合成の HCV ポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの断片若しくは一部を合成する、

合成の HCV ウィルスポリヌクレオチドの調製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 1 】

## [ 関連出願の相互参照 ]

本願は、2011年5月2日に出願の米国仮特許出願第61/481,457号からの利益を主張するものである。斯かる米国仮特許出願は、あらゆる目的において、参照することにより本明細書に援用されて、本明細書で十分に説明したものとされる。

## 【 0 0 0 2 】

## [ 政府権益の声明 ]

本発明は、助成番号・R O 1 D A 0 2 4 5 6 5の下で、米国政府による援助を受けてなされたものである。米国政府は、本発明に対して特定の権利を有する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

H C Vは、小型エンベロープ型のフラビウイルス科ファミリーウィルスで、9.6 kbの単鎖のプラス鎖RNAゲノムであり、RNAゲノムは、5'非翻訳領域(UTR)、ウィルス特異的蛋白を符号化するオープン・リーディング・フレームと、3'UTRとからなる。5'UTRは、約3000アミノ酸のポリプロテイン単鎖の翻訳に媒介する、配列内リボソーム進入部位(IRES)を有する。ポリプロテインは、構造蛋白(コア、E1及びE2)をN末端に配置し、続いてp7や非構造蛋白(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A及びNS5B)が残部に符号化されて、構成される。

## 【 0 0 0 4 】

効果的なH C Vワクチンへの認識されたニーズが存在する一方、抗原に用いるウィルス株の選択は任意となっている。ヒトとチンパンジーにおける研究で、宿主免疫システムがH C Vに対する効果的な応答を開始させることができると判明し、本効果は、潜在的に宿主の遺伝子に起因する可能性があるが、一度感染を除去したヒトでは、再びその反応が生じると思われる。H C Vの遺伝的多様性は、H I Vの多様性より広範であり、効果的なワクチン開発に対して多大な挑戦を課している。ワクチン候補としての適切な株の選択は重要である。なぜなら、1残基アミノ酸の置換であっても、そのエピトープに特異的なT細胞による認識が排除されて、ワクチン効果を低減し得るからである。H I V - 1においては、ワクチン候補として、祖先配列又は共通配列の使用が提案されている。モザイクアプローチ(個々エピトープの多様な変異配列を包含)により、共通配列と比べて、H I V - 1エピトープに反応する、より活性化されたT細胞を得た。モザイク候補は、近年、H C V用にも特定されつつあるが、それらの効果は未だ不明である。

## 【 0 0 0 5 】

C型肝炎ウィルス(H C V)は、世界中では約1億7千万人を侵す。急性C型肝炎患者の約20-25%は、ウィルスを自発的に排除するが、急性C型肝炎患者の75~80%は慢性感染症を患う。慢性C型肝炎患者の約20%は肝硬変を患い、慢性C型肝炎患者の4%は肝細胞がんを患い、慢性C型肝炎患者の6%が末期肝臓病を患う。利用可能なH C Vワクチンはなく、また、通常用いられるインターフェロンに基づく治療は、毒性があり、長期にわたり、高価であり、成功しない場合もあり、そして、病態が最も進行した場合に効果がない。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 6 】

このように、H C Vや関連ウィルスに対する、抗原、抗体、そしてワクチンを調製するためのより効果的な手段を実現する、まだ満たされていないニーズが、未だなお存在する。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 7 】

本発明は、一実施形態に従い、合成C型肝炎ウィルスサブタイプ1a(B o l e 1 a)のゲノムを符号化する核酸分子を提供し、該核酸分子は、配列番号1(S E Q I D N O : 1)の核酸配列、又はそれらの相補鎖(c o m p l e m e n t)を含む。

10

20

30

40

50

## 【0008】

本発明は、他の実施形態に従い、単離された核酸分子を提供し、該核酸分子は、配列番号1に示されたヌクレオチド配列あるいはそれらの相補鎖に特異的にハイブリダイズする。

## 【0009】

本発明は、さらに他の実施形態に従い、PCR用の一对のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し、第一のプライマーが、配列番号1に示されたヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズする長さが約10から約30のヌクレオチドである単離された核酸分子であり、第二のプライマーが、配列番号1に示されたヌクレオチド配列の相補鎖に特異的にハイブリダイズする長さが約10から約30のヌクレオチドである単離された核酸分子である。

10

## 【0010】

本発明は、さらに他の実施形態に従い、配列番号1のヌクレオチド配列を含む核酸によって符号化された、単離されたポリペプチドを提供する。

## 【0011】

本発明は、さらに他の実施形態に従い、配列番号2のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドを提供する。

## 【0012】

本発明は、一実施形態に従い、ウィルス粒子を提供し、該ウィルス粒子は、a)配列番号1のコア配列の最後の27アミノ酸とそれに続くE1領域及びE2領域のアミノ酸配列と、b)レポーターエレメントと、を含む。

20

## 【0013】

本発明は、他の実施形態に従い、HCV抗原を提供し、該HCV抗原は、配列番号1に示されたヌクレオチド配列の15~100の連続したアミノ酸を符号化するポリヌクレオチド分子を含む。

## 【0014】

本発明は、他の実施形態に従い、抗体若しくはその抗原結合部位を提供し、該抗体若しくはその抗原結合部位は、配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子に特異的に結合する。

## 【0015】

本発明は、さらに他の実施形態に従い、試料中のHCVの存在を調べるための試料の試験方法を提供し、該方法は、上述の抗体と特異的に結合する試料中のポリペプチドの存在を検出することを含む。

30

## 【0016】

本発明は、一実施形態に従い、HCVに感染した対象を治療する方法を提供し、該方法は、前記対象に、上述の抗原を含有する医薬組成物を投与することを含み、該投与は、抗原に対する免疫応答を刺激するのに十分な量で対象に投与するもので、その結果、免疫応答が、対象内におけるHCVウィルス量を低減するのに十分となる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0017】

【図1】図1は、近接結合樹を表し、該近接結合樹は、a)Bole1aとYusimデータセットと、b)Bole1aとE1E2データセットとを示す。Bole1a配列は、両図において太文字で示す。

40

【図2】図2(a)は、多様性プロットであり、該多様性プロットは、サブタイプ1a配列(「subtype 1a」)間での非同義(dN)と同義(dS)多様性のペアワイズ平均を、Bole1a配列とサブタイプ1a配列との間の平均ペアワイズ距離と比較し、該比較では、20コドンのスライドウィンドウサイズを用いている。この比較のために、390の全ゲノム配列のオリジナルデータセットを、ポリプロテインの参照配列の元データとした。図2(b)は、E1E2のアラインメント比較を示し、この比較では、レファレンス配列としてのBole1a配列、並びに、共通配列(390配列の)、H77配

50

列、HCV-1配列及び1b(D90208)配列を用いる。垂直棒は、Bole1aと比較して、各配列でアミノ酸違いがある位置を示し、アスタリスクは、HVR1の位置を示す。

【図3】図3(a)では、Bole1a(アスタリスクで示す)は、代表性が高いことを示しており、それは、9残基アミノ酸の被覆様式(最も共通に観察される)の(a)カバー度に基づいており、Bole1aとYusimデータセット中のあらゆる他の配列によって提供されたデータによる。図3(b)は、既知エピトープとの同一性をヒストグラムで示し、該ヒストグラムは、既知且つ共通の338個のT細胞エピトープと同じ配列のエピトープ配列のパーセントで示す。

【図4】図4は、様々なHCVppの感染力を $\log_{10}$ (RLU)で示す。黒の点線は、感染性HCVppのRLU閾値を示す。左の群におけるバーは、それぞれ、培養液のみでのBole1aの平均感染力、抗CD81添加でのBole1aの平均感染力、アイソタイプコントロール添加でのBole1aの平均感染力を示す。中央の群におけるバーは、それぞれ、培養液のみでのH77の平均感染力、抗CD81添加でのH77の平均感染力、アイソタイプコントロール添加でのH77の平均感染力を示す。エラーバーは、3回の実験から計算した標準偏差である。右の2つのバーは、全てのサブタイプ1aHCVppの平均感染力を示し、感染性(線フレーム)と、非感染性(破線フレーム)である。エラーバーは、感染力の標準偏差を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、合成HCVサブタイプ1aゲノム(Bole1a)を提供するものであり、該ゲノム(Bole1a)は、ワクチンの研究及び開発、抗原製造、抗体製造、診断テスト、オリゴヌクレオチドプライマー又はプローブ製造、並びにその他の使用に有用である。

【0019】

本発明は、一以上の実施形態に従い、合成サブタイプ1aHCVウイルスゲノムを提供し、結果的に計算的に生成されたゲノムは、広く伝播している株の代表的なものであり、インビトロでの肝細胞がん細胞への進入に媒介する機能的なエンベロープ遺伝子を有し、ジェンバンクの如何なる他のサブタイプ1a配列よりもCD8<sup>+</sup>T細胞エピトープにより適合するものであり、該適合の評価は、あらゆる9残基アミノ酸、又は、あらゆる既知の共通エピトープとの比較による。

【0020】

本発明は、一実施形態に従い、合成C型肝炎ウイルスサブタイプ1a(Bole1a)のゲノムを符号化(エンコード)する核酸分子を提供し、該核酸分子は、配列番号1のヌクレオチド配列、又はその相補鎖を含む。

【0021】

本明細書で用いる「nucleic acid」(核酸)は、「polynucleotide」(ポリヌクレオチド)、「oligonucleotide」(オリゴヌクレオチド)、及び「nucleic acid molecule」(核酸分子)を含み、一般的にはDNAやRNAのポリマーを意味する。該DNAやRNAは、単鎖でも二重鎖でもよく、合成物であっても自然資源から得たもの(例えば、単離及び/又は精製されたもの)でもよく、それらは、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチドを含んでもよく、それらは、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチド間結合を含んでもよい。該改変されたヌクレオチド間結合には、非修飾のオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間で形成されるホスフォジエステルに代えての、ホスフォロアミデート(phosphoramidate)結合又はフォスフォロチオエート(phosphorothioate)結合がある。核酸は、一般的には、如何なる挿入、欠質、反転、及び/又は置換も含まないことが好適である。しかしながら、本明細書に記載のとおり、いくつかの例においては、核酸は、1以上の挿入、欠質、反転、及び/又は置換を含むことが適し得る。

【0022】

10

20

30

40

50

本発明の核酸は、一実施形態において、リコンビナントである。本明細書で用いた、用語「recombinant」（リコンビナント）は、(i)自然もしくは合成の核酸断片を、生きた細胞内で複製可能な核酸分子へ結合することによって、生きた細胞の外で再構成された分子、又は、(ii)前記(i)で上述の分子の複製物からの結果物の分子を指す。本明細書での目的では、複製物は、インビトロでの複製物、又は、インビボでの複製物であり得る。

#### 【0023】

核酸は、先行技術として知られる手順により、化学合成及び/又は酵素的結合反応で構築できる。例えば、Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)と、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY (1994)、を参照。例えば、核酸は自然に存在するヌクレオチドを用いて化学合成することもできるし、分子の生物学的な安定性を向上させたり、ハイブリダイズ形成での二本鎖の物理的な安定性を向上させたりする目的で設計される、種々の修飾をしたヌクレオチド(例えば、ホスフォロチオエート誘導体やアクリジン置換ヌクレオチド)を用いて、化学合成をすることも出来る。核酸を生成するのに用いる修飾ヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-イオドウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルラミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルラミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルケウオシン、イノシン、N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデノシン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N<sup>6</sup>-置換されたアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノーシルケウオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、ケウオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、及び2,6-ジアミノプリンを挙げることが出来るがこれらに限定されるものではない。あるいは、本願の核酸の1以上を、Macromolecular Resources (Fort Collins, CO)やSynthegen (Houston, TX)のような企業から購入することも出来る。

#### 【0024】

核酸は、Boule 1aポリペプチド、蛋白、又は、それらの断片、機能部位、機能的な変異体のいずれかを符号化するヌクレオチド配列を含む。例えば、核酸は、配列番号1を含むヌクレオチド配列を含み得、あるいは、配列番号1の縮重したヌクレオチド配列を含みうる。

#### 【0025】

本発明は、さらに、単離もしくは精製された核酸を提供し、該核酸は、本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、又は、本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件でハイブリダイズされるヌクレオチド配列を含む。本発明は、一実施形態において、配列番号1の全長ヌクレオチド配列に相補的な核酸分子を提供する。

#### 【0026】

本明細書で定義したように、Boule 1aのポリペプチドもしくは蛋白の機能的部位もしくは機能的な多型としては、例えば、コア、E1、E2、NS3、NS4、NS5のい

10

20

30

40

50

ずれも、及びそれらのサブユニット、UTR抗原蛋白、そしてそれらの断片を含む。

【0027】

一実施形態において、単離された核酸分子が、配列番号1の近接する核酸配列と、例えば少なくとも50%、例えば60%、70%、80%若しくは90%又はそれ以上で同等なヌクレオチド配列、又はそれらの相補配列を含む。

【0028】

ストリンジェントな条件でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、好適には高ストリンジェンシーな条件でハイブリダイズする。「high stringency conditions」(高ストリンジェンシーな条件)とは、ヌクレオチド配列が、標的配列(本明細書に記載のヌクレオチド配列のいずれかのヌクレオチド配列)に、非特異的なハイブリダイゼーションより強く検出される程度で特異的にハイブリダイズすることを意味する。高ストリンジェンシーな条件は、正確な相補配列をもったポリヌクレオチドもしくは散在する不適正塩基がほんのわずかである配列を、ヌクレオチド配列に対応する配列が非常に小さな領域(例えば3~10塩基)しか有さないようなランダム配列から、区別しうる条件をいう。該相補性の小さな領域は、14-17塩基若しくはそれより多くの塩基をもった完全相補鎖より、容易に解離される。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、これらを容易に判別できる。比較的高いストリンジェンシー条件とは、例えば、およそ50-70でのNaCl濃度が0.02-0.1Mもしくは等張である様な、低塩、及び/又は高温の条件を含みうる。

【0029】

本発明の核酸は、リコンビナント発現ベクターへ組み入れられうる。この観点から、本発明は、本発明の核酸のいずれかを含むリコンビナント発現ベクターを提供する。本明細書の目的によれば、用語「recombinant expression vector」(リコンビナント発現ベクター)は、遺伝的に修飾されたオリゴヌクレオチド、宿主細胞によってmRNA、蛋白、ポリペプチド、又はペプチドの発現を許容する、ポリヌクレオチドコンストラクトを意味するものであり、前記コンストラクトは、mRNA、蛋白、ポリペプチド、又はペプチドを符号化するヌクレオチド配列を含み、前記ベクターは、細胞内で十分にmRNAや蛋白、ポリペプチド、又はペプチドを発現する程度で細胞に導入されている。本願のベクターは、全体として、自然に発生するものではない。しかしながら、ベクターの一部は、自然に発生しうる。本願リコンビナント発現ベクターは、あらゆる種類のヌクレオチドを含むことができ、DNAやRNAを含むが、これらに限定されるものではない。該DNAやRNAは、単鎖であったり二重鎖であったり、合成されたものであったり、一部が自然物からえられるものであったり、そして、自然の、非自然の若しくは修飾されたヌクレオチドを含みうる。リコンビナント発現ベクターは、自然的発生、非自然的発生のヌクレオチド間結合、もしくは両種類の結合を含みうる。好適には、非自然発生、もしくは修飾ヌクレオチド、もしくはヌクレオチド間結合は、転写を阻害せず、あるいはベクターの複製を阻害しない。

【0030】

本願のリコンビナント発現ベクターは、任意の適したリコンビナント発現ベクターであって、任意の適した宿主を形質転換あるいは遺伝子導入するのに用いられうる。適したベクターとしては、繁殖・増殖のため、もしくは発現のため、又は双方のために、設計されたものを含み、プラスミドやウイルスのようなものがある。ベクターは、pUCシリーズ(Fermentas Life Sciences)、pBluescriptシリーズ(Stratagen, La Jolla, CA)、pETシリーズ(Novagen, Madison, WI)、pGXシリーズ(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、及びpEXシリーズ(Clontech, Palo Alto, CA)からなる群から選択されうる。バクテリオファージベクター、例えば、GT10、GT11、ZapII(Stratagene)、EMBL4、そしてNM1149も使用されうる。植物発現ベクターの例としては、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121、そしてpBIN19 (Cl

10

20

30

40

50

ontech, Mountain View, CA)を含む。動物発現ベクターの例としては、pEUK-C1、pMAM及びpMAMneo (Clontech)を含む。好適には、リコンビナント発現ベクターは、ウィルスベクター、例えばレンチウィルスベクターのようなレトロウィルスベクターが好適である。

【0031】

本発明のリコンビナント発現ベクターは、たとえば、Sambrook et al., supraやAusubel et al., supraに記載されている標準的なリコンビナントDNA技術を用いて調製される。発現ベクターの構築は、環状又は線状で、原核生物又は真核生物の宿主細胞内で機能する複製システムを含むように調製される。複製システムは、例えばColE1、2 $\mu$ plasmid、SV40、bovine papilloma virus、lentiviruses、そして同様のものを由来とする。

10

【0032】

望ましくは、リコンビナント発現ベクターは、転写又は翻訳の開始コドンや終止コドンのような制御性の配列を含み、それらは、ベクターが導入される宿主(例えば、バクテリア、真菌、植物又は動物)に特異的であり、必要に応じ、ベクターはDNA塩基であるかRNA塩基であるかを考慮する。

【0033】

リコンビナント発現ベクターは、1以上のマーカー遺伝子を含み、マーカー遺伝子は形質転換又は遺伝子導入された宿主を選別するのに用いられる。マーカー遺伝子は、殺生物剤耐性、抗生物質、重金属等に対する耐性、原栄養性を提供するための栄養要求性宿主における補完、その他の同等物を含む。本発明の発現ベクターに適したマーカー遺伝子は、例えば、ネオマイシン/G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、そしてアンピシリン耐性遺伝子を挙げられる。

20

【0034】

リコンビナント発現ベクターは、ネイティブの又はノンネイティブのプロモーターを含み得、該プロモーターは、Bole1aウィルスポリペプチド、又は、コア、E1、E2、NS3、NS4、NS5、UTRそして同等物といった蛋白(それらの機能的部位や機能的な変異体を含む)を、符号化するヌクレオチド配列に操作的に結合され得、又は、上述のような、Bole1aウィルスポリペプチドや蛋白、それらの断片を符号化するヌクレオチド配列にハイブリダイズする配列や、それらに相補的な配列に結合される。

30

【0035】

プロモーターの選択、例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的、そして発生特異的の選択は、その技術分野における通常の知識を有する者の範囲内である。同様に、プロモーターを有するヌクレオチド配列の組み合わせもなお、当業者の技術の範囲内である。プロモーターとしては、非ウィルス性プロモーターや、ウィルス性プロモーター、例えば、サイトメガロウィルス(CMV)プロモーターや、SV40プロモーター、RSVプロモーター、そして、マウス幹細胞ウィルスの末端反復配列中に認められるプロモーターを、挙げることができる。

40

【0036】

本発明は、他の実施形態に従い、配列番号1のヌクレオチド配列、又はそれらの相補鎖を含む単離された核酸分子を含有する、単離された細胞を提供する。

【0037】

本発明は、更に、本明細書に記載するリコンビナント発現ベクターのいずれかを含む、宿主細胞を提供する。本明細書で用いた様に、用語「host cell」(宿主細胞)は、発明性のリコンビナント発現ベクターを含有する任意の種類細胞をいう。宿主細胞としては、真核生物細胞、例えば、植物、動物、真菌、又は藻類を挙げることができ、又は、原核細胞、例えば、細菌もしくは原虫を挙げることができる。宿主細胞としては、接着細胞であってもよいし、上清中で成長するような浮遊細胞を挙げることができる。適

50

する宿主細胞としては、先行技術で知られるおり、例えば、DH5 *E. coli* cell 11、チャーニーズハムスター卵巣細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞、そして同等の細胞を挙げるができる。リコンビナント発現ベクターの増幅又は複製を目的として、宿主細胞は原核細胞、例えばDH5細胞が好適である。リコンビナントBoule1aウイルス、ポリペプチド、又は蛋白を生成する目的では、哺乳類細胞が好適である。最も好適な宿主細胞は、ヒト細胞である。宿主細胞は、任意の種類を挙げることができ、任意の組織に由来し、そして任意の発生段階のものを挙げるができる。宿主細胞としては、例えばHep3Bの様な肝細胞を挙げるができる。

**【0038】**

さらに、本明細書に記載の少なくとも1個の宿主細胞を含む細胞集団も、本発明により提供される。細胞集団は、不均一な集団もありえ、該集団は、上述の任意のリコンビナント発現ベクターを含有する宿主細胞と、少なくとも1個の他の細胞、例えばいずれのリコンビナント発現ベクターをも含まない宿主細胞（肝細胞）や、皮膚細胞以外の細胞で、例えば、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋細胞、脳細胞等を含む。あるいは、細胞集団としては、実質的に均一な集団であってもよく、集団にはリコンビナント発現ベクターを含有する宿主細胞が大半である（例えば実質的にそのような細胞からなる集団である）。また、集団としてはクローナルな細胞集団であってもよく、集団の全ての細胞が、リコンビナント発現ベクターを有した単一の宿主細胞のクローンであって、集団の全ての細胞がリコンビナント発現ベクターを有しているような細胞集団を挙げるができる。本発明の一実施形態によれば、細胞の集団は、本明細書に記載のリコンビナント発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローナルな集団である。

10

20

**【0039】**

さらなる実施形態に従い、宿主細胞として哺乳類細胞を挙げることができ、好適には肝細胞又はそれらを由来とする細胞株である。

**【0040】**

本発明は、一実施形態に従い、配列番号1に記載されたヌクレオチド配列又はそれらの相補鎖に特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子を提供する。他の実施形態において、配列番号1に記載のヌクレオチド配列又はそれらの相補鎖に特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子には、約10から約100ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドプライマー、若しくは約20、30、40、50、60、70、80そして約90ヌクレオチドの様々な長さのプライマーを含む。

30

**【0041】**

本発明は、一実施形態に従い、PCR用の一組のオリゴヌクレオチドプライマーを提供し、該プライマーの第一のプライマーが、配列番号1に示されたヌクレオチド配列へ特異的にハイブリダイズする長さが約10から約30のヌクレオチドである単離された核酸分子であり、第二のプライマーが、配列番号1に示されたヌクレオチド配列の相補鎖へ特異的にハイブリダイズする長さが約10から約30のヌクレオチドである単離された核酸分子である。

**【0042】**

本発明は、一実施形態に従い、単離されたポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、配列番号1に示されたヌクレオチド配列を含む核酸によって符号化され、配列番号2のアミノ酸配列を有する。

40

**【0043】**

本発明は、一実施形態に従い、合成ウイルスゲノムポリヌクレオチド配列の構築方法を提供し、該配列は、例えば、一連の合成HCVウイルスゲノムポリヌクレオチド配列を含み、それらはウイルス粒子、偽粒子、そしてポリヌクレオチドの断片又は部分を構築するのに用い得るものであり、多くの用途に用い得、例えば、エピトープ抗原、抗体及びワクチンの生産に用いることができる。

**【0044】**

一実施形態において、合成ウイルスゲノムポリヌクレオチド配列を合成する方法であっ

50

て通常、次の工程を含む：

【0045】

1．関心のあるウィルスの代表的な非リコンビナントのゲノムヌクレオチド配列を適当数選択し、アウトグループ配列を適当数選択する工程。代表的な試料を欠くゲノム領域の場合は、ステップ6へいく。

【0046】

2．MUSCLE (Nucleic Acids Res. 32:1792-1797 (2004)) や ClustalX のような、適切なアラインメントプログラムを用いて、配列をアラインメントする。

【0047】

3．任意の個体の系統発生の特異体質を回避し、アラインメントの系統学的な情報価値のある2つの領域を適用した Bayesian or Maximum Likelihood 法によって、2つの独立の系統樹を再構築する。系統樹用のパラメーターの収束を確認するための十分な回数の繰り返しを実行する。

【0048】

4．ゲノム残部での祖先配列を推測するため両系統樹を使用する。評価に用いるプログラムは、各位置における確率分布で祖先配列を推測するものでなければならず、各塩基における確率が算出される(例えば、MrBayes 又は Garli)。

【0049】

5．次の方法(方法I及びII)で、最終代表配列を推測する。

【0050】

5a．ゲノムでの各ヌクレオチド位置*i*において、両樹の最大事後確率(MPP)残基が一致する場合、その位置( $p_i$ )における確率は、2つのMPPsのうち高いものが選択される。これらの位置は合致として確定される。

【0051】

5b．各不一致位置(MPP残基が一致しない位置)において、(方法I)ステップ5dへ直接進み、又は、(方法II)両樹を基に不一致位置を含むコドン*k*の同時結合を計算する。該コドンにおける一致残基においては、前のステップで計算される $p_i$ が、同時確率の計算に用いられる。

【0052】

5c．2つの樹から高い同時MPPを有するコドンが、そのコドンの位置の代表に選択される。このコドンに基づく分析により、コドンにおいて1つ以上の位置で不一致であるケースや、6倍の縮重コドンを収容するケースを解決(resolve)する。

【0053】

5d．コドン/ヌクレオチドMPPのストリンジェントな閾値を決定するため、第二の派生での相違がMPP値で $10^{-6}$ より低い位置では、コドン/ヌクレオチドMPPsの分布における変曲が、コドン/ヌクレオチドを解決するための閾値として用いられる。各樹に基づいた閾値と同等もしくはより多いMPPである各コドン/ヌクレオチドは、祖先のものとして受け入れられ、その構成の位置は解決と確定される。

【0054】

5e．共分散分析は、未解決の位置(still-unresolved positions)を調べることに用いられる。系統学的再構成の基本的な仮定、すなわち、各サイトは独立して進化するとの仮定は、共変動や相互作用サイトを考慮しない。そのようなサイトを考慮に入れるために、観察され期待される塩基対の頻度が決定され、カイ二乗計算が式Iに示されるように計算され、Holm-Bonferroni法( $\alpha = 0.05$ )を用いる多重比較法によって調整される。

【数1】

$$\chi_{ij}^2 = (o_{ij} - e_{ij}) / e_{ij} \quad (1)$$

10

20

30

40

50

## 【0055】

5 f . 調整されたカイ二乗計算を用い、未解決位置  $i$  と著しく共変動する解決位置  $j$  の全てが同定される。正の相互作用の場合 ( $o_{ij} > e_{ij}$ ) は、正に相互作用する残基を含んだ M P P コドン / ヌクレオチドが選択される。負の相互作用の場合 ( $o_{ij} < e_{ij}$ ) は、負に相互作用する塩基をとまなうコドン / ヌクレオチド全てが除かれ、残りから M P P コドンが選択される。

## 【0056】

5 g . なお未解決なサイトには、閾値よりも低いものでも M P P コドンを選択する (これは殆ど必須ではない)。

## 【0057】

5 h . 結果は代表的な配列である。

## 【0058】

6 . ( 代表的なシーケンス試料を欠くゲノム領域では ) 使用可能な配列を用いることで共通配列を決定する。

## 【0059】

本明細書で用いた用語「*isolated and purified*」( 単離及び精製された ) は、実質的に他の蛋白又は他のポリペプチドとの相互作用がないことを意味し、例えば、自然的に生じた蛋白であって、抗体の使用や他の方法の使用によって細胞成分や他の夾雑物から精製されたものや、リコンビナント宿主細胞培養物からの精製品のようなものをいう。

## 【0060】

本願明細書で用いられた用語「*biologically active*」( 生物活性 ) は、酵素や蛋白であって、自然的に生じた分子が有する構造、制御、もしくは生物学的な機能を有するものをいう。

## 【0061】

特定の実施形態において、本明細書で用いたアミノ酸配列の「*functional variant*」( 機能的変異体 ) とは、関心持つ配列中に、わずかに 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、もしくは 10 個のアミノ酸置換しかないものを意味する。その機能的変異体は、アミノ酸配列に関連する少なくとも 1 つの生理活性を保持する。特定の実施形態において、機能的変異体は、全長のアミノ酸配列に関連する普通の生物活性と比べ、少なくとも 40 %、50 %、60 %、75 %、85 %、90 %、95 %、若しくはそれより多い活性を保持する。他の実施形態において、機能的変異体は、本明細書で開示のポリペプチド配列 ( 又はそれらの断片 ) に対して、少なくとも 60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、97 % もしくは 98 % で相同性のあるアミノ酸配列である。

## 【0062】

本発明は、一実施形態に従い、H C V 偽粒子を提供し、該偽粒子は : a ) 配列番号 1 のコア配列の最後の 27 アミノ酸と、それに続く E 1 及び E 2 領域のアミノ酸配列と、b ) レポーターエレメントを含む。偽ウィルス粒子は、他の実施形態に従い、レポーターエレメントとして、ルシフェラーゼポリペプチドやそれらの機能的部位を含む。

## 【0063】

H I V は、異なる多くのウィルスのエンベロープ蛋白と、容易に偽型又は偽粒子を形成する。特に、ネイティブの H C V の E 1 及び E 2 糖蛋白を有する H I V 偽粒子は、ヒト肝臓癌細胞株 H u h - 7 や P L C / P R 5 への感染性がある。感染力が著しく p H 依存的であり、E 2 特異的モノクローナル抗体の多くで著しく中和され得る。H C V 偽ウィルス粒子は、ウィルス g p s を発現する発現プラスミド、からのベクターと、エンベロープを欠損した p N L 4 . 3 . L u c . R<sup>-</sup> E<sup>-</sup> プロウィルスゲノムを、等量で 293 - T 細胞へコトランスフェクションすることで、調製することができる。

## 【0064】

本発明は、一実施形態に従い、H C V 抗原を提供し、該抗原は、配列番号 1 に示すヌク

10

20

30

40

50

レオチド配列によって符号化されるポリペプチド、又はそれらの部分若しくは断片の15から100の連続するアミノ酸を符号化するポリヌクレオチド分子を含有する。本発明は、他の実施形態において、HCV抗原を提供し、該HCV抗原は、配列番号2のアミノ酸を含むポリヌクレオチド分子、又はそれらの部分若しくは断片を含むポリペプチドを含有する。本発明は、さらに他の実施形態において、本発明のHCV抗原を提供し、該HCV抗原は、ポリペプチドのコア、配列番号2のポリペプチドのE1及び/又はE2領域、又はそれらの部分若しくは断片からのアミノ酸を符号化するポリヌクレオチド分子を含む。

【0065】

本発明は、一実施形態に従い、HCVに感染した対象を治療する方法を提供し、該方法は、前記対象に、上述の抗原を含有する医薬組成物を投与することを含み、該投与は、抗原に対する免疫応答を刺激するのに十分な量で対象に投与するもので、それゆえ対象における免疫応答が、HCVウィルス量を減らすのに十分な程度である。

10

【0066】

本発明の目的として、投与に用いる本発明のワクチン組成物の含量及び投与量は、対象に免疫応答を十分刺激する程度に十分量であるべきで、それにより適当な時間枠で対象におけるHCVのウィルス量が減少する。投与量は、治療をうける対象の体重だけでなく、特定の医薬品製剤の効率によって、及び、被験者における標的細胞集団の部位によって、決定されうる。

【0067】

他の実施形態において、用語「administering」（投与）は、本発明の医薬品組成物の少なくとも1以上が、対象の体内へ導入されることを意味し、好適には、対象は、疾病で治療を受けており、少なくとも1以上の組成物が、インビボで関心のある標的遺伝子を用いて、一以上の疾患に関連する細胞、もしくは細胞集団に接触する。

20

【0068】

本明細書で用いた様に、用語「treat」（治療）及びそれらから派生する言葉も、疾患の治療処置だけでなく、診断や予防的な処置も含む。

【0069】

本願明細書で用いた様に、用語「subject」（対象）は、哺乳類を指し、マウスやハムスターの様なげっ歯目の哺乳類や、ウサギの様なウサギ目を含むが、これらに限定されるものではない。哺乳類は、ネコ（猫）やイヌ（犬）を含む食肉目がよい。より好適には、哺乳類は、ウシ（牛）、ブタ（豚）を含むウシ目、又はウマ（馬）を含むウマ目がよい。最も好適には、哺乳類がサル目、セボイド目、もしくはシモイド目、又は真猿亜目（ヒトと類人猿）である。特に好適な哺乳類はヒトである。

30

【0070】

更なる実施形態において、本発明の医薬品組成物は、1以上の添加剤の治療上の活性物と組み合わせて用いてもよく、該活性物は、上述の状態や疾病を処置することが出来ることで知られている。例えば、記載された本発明の組成物は、HCV感染のような疾病もしくは状態を治療するために、1以上の治療上の活性物と組み合わせて用いることができる。本発明の製剤組成物と容易に組み合わせることができる他の治療上の活性物としては、限定されるべき例ではないが、酵素的核酸分子、アロステリック核酸分子、アンチセンス、デコイ、若しくはアプタマー核酸分子、モノクローナル抗体の様な抗体、小分子、そして、金属、塩、イオンを含む、他の有機及び/又は無機の化合物を挙げることができる。

40

【0071】

一実施形態において、本発明は、抗体、もしくはその抗原結合部位を提供し、該抗体は、配列番号1に示す核酸分子、それらの部位若しくは断片の核酸分子、配列番号2のアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチド、又はそれらの部位もしくは断片に、特異的に結合する。

【0072】

本発明は、モノクローナル抗体を提供し、該モノクローナル抗体は、コア、E1及び/又はE2、NS2、NS3、NS4、NS5そしてそれらのサブユニット、及びそれら

50

の断片の例のような、任意のHCVポリペプチド又は蛋白に対する抗体である。一実施形態において、抗体はヒトのあるいはヒト化された抗体である。

【0073】

さらに他の実施形態に従い、抗体は検出できる標識物で標識される。

【0074】

機能的変異体は、実質的に一次構造配列が同じ由来物であるが、例えばインビトロ修飾もしくはインビボ修飾、化学的修飾及び/又は生物的修飾を含み、親株結合分子では認められないものを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。そのような修飾体には、特にアセチル化、アシレーション、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質由来物の共有結合、架橋、ジスルフィド結合形成、グリコシレーション、ヒドロキシル化、メチル化、酸化、PEG化、蛋白加水分解反応、リン酸化、その他の反応を含みうる。

10

【0075】

非限定的な例であるが、抗原上のエピトープに結合する抗体断片もしくは抗原結合断片としては、次の、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、Fab'断片、F(ab)発現ライブラリーで得られる断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fd断片、Fd'断片、そしてFv断片を挙げることができる。抗体は、ヒト由来であってよいし、ヒト以外の動物から得るものでもよいが、好適には、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、そしてブタのような哺乳類が好適である。好適には、マウスモノクローナル抗体や、それらの抗原結合断片若しくは結合部位である。さらに、キメラ抗体やハイブリッド抗体が本発明で包含される。

20

【0076】

本発明のモノクローナル抗体としては、一実施形態において、培養溶液中に本発明の抗体を生産できるハイブリドーマを培養することにより得ることができ、培養溶液としては例えば、牛胎児血清を含むRPM1640がある。あるいは、PCR法あるいは化学合成により、各可変領域を符号化するDNAに重鎖又は軽鎖の定常領域を符号化するDNAを連結された、重鎖もしくは軽鎖を含む遺伝子を調製し、得た遺伝子を従来より用いられている、遺伝子を発現可能なベクター(例えば、pcDNA3.1(Invitrogen))へ導入し、抗体を生産する為に遺伝子をCHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)もしくはエシエリキア コリで発現させ、そして、得られた抗体を培養溶液からProtein A/Gカラムもしくは相当物を用いて精製することによっても、得ることができる。

30

【0077】

更に、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、コア、E1、E2、NS2、NS3、NS4及びNS5蛋白、及びそれらのサブユニット、並びに1以上の他の蛋白、を含む、任意のHCV蛋白もしくはそれらの断片を含むリコンビナント結合蛋白を免疫することで得た、哺乳類からのハイブリドーマを調製することで、得ることができる。バクテリア培地で結合蛋白を発現させ、バクテリア溶解液から結合蛋白を精製し、HCV蛋白、もしくはそれらの断片を含む精製した結合蛋白を、アジュバントと混和して、精製した結合蛋白を哺乳類に接種する。接種された哺乳類は、3週間後に追加免疫され、脾臓とリンパ球は追加免疫後3日に回収する。リンパ球と脾細胞は、SP2/mIL6細胞(ATCC)のようなマウスB細胞ハイブリドーマ細胞と融合され、製造元の説明に従い、HFC5サブリメント(Roche)を用いて播種する。ハイブリドーマは、様々な種類のリコンビナントHCV蛋白や、それらの断片との反応性でスクリーニングする。

40

【0078】

本発明の範囲には、バイオコンジュゲートの様なコンジュゲートを含み、該コンジュゲートは、発明性のモノクローナル抗体(それらの任意の機能的部位もしくは変異体を含む)、宿主細胞、宿主細胞の集団、もしくは抗体、又はそれらの抗体断片を含む。コンジュゲートは、通常、コンジュゲートの合成方法と同様に、先行技術として知られている。例えば、Hudecz F., Methods Mol. Biol., 298:

50

209-223(2005)や、Kirin et al., Inorg. Chem., 44(15): 5405-5415 (2005)を参照。

【0079】

抗体は、先行技術に知られている任意の型のイムノグロブリンを用いることができる。例えば、抗体はIgA、IgD、IgE、IgG、IgM等の任意のアイソタイプを用いることができる。抗体は、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、自然的に発生する抗体でもよく、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒトといった哺乳類より単離及び/又は精製された抗体を挙げることができる。あるいは、抗体は、遺伝的操作された抗体、例えば、ヒト化抗体やキメラ抗体を挙げることができる。抗体は、単量体でも多量体でもよい。また、その抗体は、コ

10

【0080】

任意のHCV蛋白もしくはその断片へ、抗体が、結合する能力を試験する方法は、先行技術で知られており、例えば、放射免疫測定法(RIA)、ELISA、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、そして、競合的阻害アッセイ法(例えば、Janeway et al., infra及びUS2002/0197266A1を参照)の様な、抗原-抗体結合アッセイを含む。

【0081】

抗体を作製する適した方法は、先行技術で知られている。例えば、標準的なハイブリドーマ法は、Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976)、Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988)、及びC.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5<sup>th</sup> Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)に記載されている。あるいは、EBVハイブリドーマ法(Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2): 361-67 (1984)、及びRoder et al., Methods Enzymol., 121: 140-67 (1986)、及び、バクテリオファージベクター発現システム(例えば、Huse et al., Science, 246: 1275-81 (1989)を参照)が先行技術として知られている。更に、非ヒトの動物の抗体は、例えばU.S. Patents 5,545,806、5,569,825、及び5,714,352並びにU.S. Patent Application Publication No. 2002/0197266A1に記載されている。

20

30

【0082】

抗体は、重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子に特異的な遺伝子導入したトランスジェニックマウスによって、生産されうる。その様な方法は、先行技術で知られており、例えば、US特許5,545,806や5,569,825やJaneway et al., supra.に記載されている。

40

【0083】

ヒト化された抗体を産生する方法は、先行技術でよく知られており、詳細には、例えば、Janeway et al., supra、U.S. Patent 5,225,539、5,585,089と5,693,761に記載されている。ヒト化された抗体は、また、U.S. Patent 5,639,641や、Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235: 959-973 (1994)に記載される、抗体リサーフェシングテクノロジーを用いて産生され得る。

【0084】

単鎖可変領域断片(sFv)抗体断片、すなわち、合成ペプチドを介して、軽鎖抗体の

50

領域に連結された重鎖抗体の可変領域を含む切断型 Fab 断片を含む断片は、ルーチンのリコンビナント DNA テクノロジー技術 (Janeway et al., supra を参照) を用いて産生し得る。同様に、ジスルフィドで安定化された変異領域断片 (dsFv) はリコンビナント DNA テクノロジー (Reiter et al., Protein Engineering, 7: 697-704 (1994)) を参照) によって調製されうる。しかしながら、本発明の抗体断片は、これらの抗体断片の例示型に限定されるものではない。

**【0085】**

他の実施形態において、抗体もしくはそれらの抗原結合断片は、検出できる標識物、例えば、ラジオアイソトープ、フルオロフォア (例えば、フルオレセインイソチアネイト (FITC) やフィコエチレン (PE))、酵素 (例えば、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウシペルオキシダーゼ)、エレメント粒子 (例えば、金又は磁性の粒子) を含むように修飾される。

10

**【0086】**

いったん本発明の抗体分子が、動物から、化学合成により、もしくはリコンビナント発現的に生産されると、先行技術で知られる方法により精製され得り、その先行技術としては、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換、アフィニティー、プロテイン A / G 免疫沈降クロマトグラフィー、そしてサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心、溶解度差、又は蛋白の精製のための他の標準的な方法がある。さらに、本発明の抗体もしくはそれらの断片は、精製を容易にする為に、先行技術で知られる、もしくは本明細書に記載の異種のポリペプチド配列に結合されうる。

20

**【0087】**

本発明の抗体は、抗原 - 抗体アフィニティーカラムを調製するために用いることができ、そのカラムは抗原の精製に使用されうる。例えば、ゲル支持体もしくはビーズは、様々な化合物により活性化され得、例えば、臭化シアン、N - ヒドロキシスクシンイミドエステルで活性化され、抗体はそこへ固着されうる。より詳細には、実施例の手段のように、抗体は Affigel - 10 (BioRad, Hercules, CA)、すなわち、N - ヒドロキシスクシンイミドエステルで活性化されたゲル支持体へ添加することができ、そして、抗体はアガロースゲルビーズ支持体と共有結合を形成する。抗体はそれ故スパーサーアームと、アミド結合を介してゲルへ結合する。残りの活性化されたエステルは、1 M のエタノールアミン塩酸 (pH 8) で、クエンチングする。カラムは水で洗浄し、非結合の抗体もしくは外来蛋白を取り除くために、水洗浄と、続く 0.23 M のグリシン塩酸 (pH 2.6) で洗浄する。カラムは、適当な界面活性剤を含む pH 7.3 のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で平衡化し、サンプル材料、例えば癌特異的な抗原を含む細胞培養上清もしくは細胞抽出物 (適当な膜可溶界面活性剤を用いて調製する) をカラムでゆっくり通す。カラムは、吸光度低下がバックグラウンドになるまで、PBS / 界面活性剤で洗浄する。蛋白は、0.23 M のグリシン HCl (pH 2.6) / 界面活性剤で溶出される。精製された抗原は、PBS / 界面活性剤で透析される。

30

**【0088】**

宿主における HCV の存在を検出する方法と、HCV 感染宿主の感染の治療もしくは防止方法は、さらに本発明により提供される。宿主における HCV の存在を検出する本発明の方法は、(i) 宿主の細胞を含む試料に、本明細書に記載される本発明の任意の抗体、もしくはそれらの抗原結合断片を、接触させ、複合体を形成する工程、及び (ii) 複合体を検出する工程を含み、該複合体の検出は宿主における HCV 感染の存在を示唆するものである。

40

**【0089】**

本発明は、一実施形態に従い、試料における HCV の存在について、試料を試験する方法を提供し、該方法は、試料中において本明細書に記載の抗体に特異的に結合するポリペプチドの存在を検出する工程を含む。

**【0090】**

50

本発明は、さらに、対象においてHCVに感染した細胞を局在化させるための方法を提供し、特に細胞としては、コア、E1、E2、NS2、NS3、NS4そしてNS5蛋白やそれらのサブユニット、そしてそれらの断片を発現する細胞であり、前記方法は、(a)対象に、本発明の、検出できるように標識されたモノクローナル抗体もしくはそれらの結合断片を投与する工程、(b)対象内の感染した細胞へ、検出可能な標識(例えば、放射標識の、フルオロクローム標識の、もしくは酵素標識の、例えばELISAを介して)で標識されるモノクローナル抗体、もしくはそれらの結合断片を、結合させる工程、(c)被験者内の標識されたモノクローナル抗体やそれらの結合断片の位置を検出する工程を含む。

#### 【0091】

さらなる実施形態において、本発明の抗体は、例えば、フルオロフォア、クロモフォア、放射性核種、化学発光物質、生物発光物質そして酵素のような、検出できる成分で標識されうる。

#### 【0092】

本発明の抗体は、一実施形態において、先行技術で実施し知られているプロトコルや技術を用いて前記試薬で標識されたものである。例えば、抗体の放射ラベルに関する技術として、Wenzel and Meares, *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York, (1983); Colcer et al., *Meth. Enzymol.*, 121: 802-816 (1986); 及び *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, Baldwin et al., (eds) Academic Press, 303-316 (1985), を参照。

#### 【0093】

一実施形態において、抗体もしくはそれらの抗体断片は、静脈内投与、皮下投与、又は腹腔内投与、例えば注入のように、非経口的に届けられる。先行技術で知られる、適した緩衝液、キャリア、他の組成物は、投与のために適切な有効期間や適合性のために、抗体もしくは断片を含む処方組成に用いうる。これらの物質は、緩衝剤や蛋白安定化剤(例えばポリ多糖)のような補助的な成分を含みうる。

#### 【0094】

より詳細には、抗体もしくはそれらの結合断片の治療用製剤は、所望の純度の抗体もしくはそれらの結合断片が、任意の生理的に許容されるキャリア、賦形剤もしくは安定化剤(Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17<sup>th</sup> edition, (Ed.) A. Osol, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985))と混合され、凍結乾燥もしくは水溶液の状態で貯蔵するために調製される。許容されるキャリア、賦形剤、もしくは安定化剤としては、使用量と使用濃度で、被提供者にとって非毒性であり、緩衝剤、例えば、リン酸の、クエン酸の、その他の有機酸の緩衝剤を含み、アスコルビン酸を含む抗酸化剤を含み、低分子量ポリペプチド(例えば、10~15アミノ酸残基、もしくはより小さなペプチド)、蛋白、例えば、血清アルブミン、ゲラチン、もしくはイムノグロブリンのような蛋白を含み、ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマーを含み、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジンのようなアミノ酸を含み、単糖、二糖、そして、グルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物を含み、EDTAのようなキレート剤を含み、マンニトールやソルビトールのような糖アルコールを含み、ナトリウムのような塩形成の対イオンを含み、及び/又はTWEEN<sup>T</sup><sub>M</sub>(polysorbates)、PLURONICS<sup>T</sup><sub>M</sub>(エチレンオキサイド(EO))と、ポリプロピルオキサイド(PO)もしくはポリエチレングリコール(PEG)のプロックコポリマー)のような非界面活性剤を含む。抗体もしくはそれらの断片は、また、マイクロカプセル内に封入され得、該封入は、例えば、コアセルベーション技術もしくは界面重合(例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゲラチンマイクロカ

10

20

30

40

50

ブセル、そしてポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)によって調製され、コロイド性のドラッグデリバリーシステム(例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、そしてナノカプセル)で調製され、マイクロエマルジョンにおいて調製される。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, supraで開示されている。

【0095】

インビボ投与で用いられる抗体もしくはそれらの結合断片は、無菌でなければならない。これは、凍結乾燥及び再構成の前であっても後であっても、滅菌濾過膜に通して濾過することで容易になしうる。抗体もしくはそれらの結合断片は、通常凍結乾燥状態もしくは溶液中で保存される。

10

【0096】

治療用抗体組成物は、一般的に、無菌の出入り口部を備える容器内に入れられ、該容器は、例えば、静脈内注射用バッグもしくはバイアルのような、皮下組織注射針で突き刺す留め部を有する容器である。本発明に従い、抗体もしくはそれらの結合断片の投与ルートとしては、公知の方法により、例えば、注入もしくは点滴による、静脈、腹腔内、筋肉内、動脈内、皮下、病巣内へのルートであってもよいし、エアロゾルもしくは鼻腔内ルートでもよく、下記に記載するような持続的な放出システムであってもよい。抗体、もしくはそれらの結合断片は、点滴により断続的に投与されたり、ポラス注入により投与されたりする。持続的な放出調製の適した例としては、固体の疎水性ポリマーの半透膜マトリックスを挙げることができ、蛋白を含むもので、該マトリックスは、薄膜もしくはマイクロカプセルのような、造形品の形をとる。持続的に放出するマトリックスの例としては、ポリエステル、ハイドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) と Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982) に記載)、もしくはポリ(ビニルアルコール)、ポリ乳酸(US特許3,773,919)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン(Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 (1983))、非分解性エチレン-ビニル酢酸(Langer et al., supra)、LUPRON DEPOSIT<sup>TM</sup>(乳酸-グリコール酸共重合体とリユープロリド酢酸とからなる投与可能な微粒子)のような分解性乳酸-グリコール酸共重合、そして、ポリ-D-( )-3-ヒドロキシブチル酸(EP 133,988)を挙げることができる。

20

30

【0097】

治療用に用いる抗体の有効量は、例えば、治療上の治癒上の目標、投与ルート、年齢、状態、そして処置や治療を受ける患者の体質量、そして患者に提供されている補助的もしくは補助剤療法に依存する。従って、実務家にとっては、最適な治療効果を得るために、要求に応じて、投与量を調節したり、投与ルートを代えたりすることは、必要であるし、日常の業務である。典型的な一日の投与量は、約1mg/kg~約100mg/kgもしくはそれより多い範囲であり、上述の要因はあるものの、好適には、約0.1~約10mg/kg/日である。典型的には、臨床医は、所望の効果に達するまでの投与量で抗体を投与するであろう。この治療の進捗は、容易に簡便な操作法によって監視される。

40

【0098】

本発明に従い、多種のアジュバントが、抗原もしくはワクチンに対する免疫応答を高めるのに用いることができ、特異的な抗体を誘発しうる。免疫される宿主の種にもよるが、アジュバントとしては、フロイントのアジュバント(完全な、及び不完全な)、水酸化アルミニウムのような鉱質ゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオールズ、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ニジトロフェノールのような界面活性剤、そして、BCG(bacille Calmette-Guérin)及びコリネバクテリウムパリバムのような、潜在的にヒトアジュバントに有用なものを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

50

## 【0099】

本発明の抗体は、さらに、体外診断用への応用に有用であり、前記抗体が特異性をしめす抗原を保持したHCV感染細胞を検出するものである。上述のように、体外診断の方法は、免疫学的もしくは免疫化学的なHCV感染細胞（例えば、ヒト組織上の、若しくは切除試料から分離された細胞）の検出を含み、HCV関連抗原（例えば、血液試料中の、又は、他の生物学的な体液の）の血清学的な検出を含む。免疫化学的技術は、組織試料のような生物学的試料を、一以上の本発明の抗体を用いて染色する工程と、試料上における、同族の抗原に結合した抗体を含む抗原抗体複合体の存在を検出する工程を含む。試料においてそのような抗原抗体複合体が形成されるということは、組織にHCVが存在することを示す。

10

## 【0100】

試料上での抗体の検出は、免疫酵素学的方法のような公知の技術を用いて達成することができ、該免疫学的方法の例としては、免疫ペルオキシダーゼ染色、アビジン-ビオチン技術、もしくは免疫蛍光学的技術（例えば、Ciocca et al., Meth. Enzyme., 121: 562-79 (1986) や Introduction to Immunology, (2<sup>nd</sup> Ed), 113-117, Macmillan Publishing Company (1986) を参照）がある。血清学的診断技術としては、腫瘍関連抗原の検出及び定量を含むものであり、該腫瘍関連抗原とは、上述で記載したように、癌で苦しむと思われる患者の血清や他の生物学的な体液へ分泌もしくは「流れ出る」ものである。そのような抗原は、先行技術で知られる技術を用いて体液中で検出が可能であり、該技術として、放射免疫学的測定法（RIA）や酵素結合性免疫吸着検定法（ELISA）があり、流出した抗原と反応する抗体は、体液試料における抗原の存在を検出するのに用いられる（例えば、Uotila et al., J. Immunol. Methods, 42: 11 (1981) や Fayed et al., Disease Markers, 14: 155-160 (1998) を参照）。

20

## 【0101】

本発明は、一実施形態において、対象からの生物学的試料中に、HCV蛋白に特異的な抗体であって、循環する血清抗体を、ELISAアッセイを用いて検出する方法を提供し、該ELISAアッセイは、(a) HCV蛋白もしくは少なくとも1つの該蛋白の断片に特異的な抗体を少なくとも1つ有する、少なくとも1つの前記生物学的試料を、HCV蛋白もしくはそれらの断片へ接触させる工程と、(b) HCV蛋白もしくはそれらの断片と、前記生物学的試料中に存在するHCV特異的な抗体もしくはそれらの断片との、抗原抗体複合体の形成を、検出する工程を含む方法である。

30

## 【0102】

前記抗体又は本発明の文脈で用いた抗体は、それら自体を、検出可能な標識へ結合される。かかる検出可能な標識によって、一次免疫複合体の存在もしくは量を決定できる。あるいは、一次免疫複体内で結合される第一に添加された組成物は、一次抗体に結合親和性のある第二の結合リガンドを用いることによって、検出可能である。これらの場合、第二の結合リガンドは、それ自体がしばしば抗体であり、該抗体は「二次」抗体と呼ばれる。一次免疫複合体は、標識された、二次の結合リガンドもしくは抗体と、二次免疫複合体を形成するのに十分な時間接触させる。その二次免疫複合体は、非特異的に結合している標識抗体もしくは標識リガンドが洗われ、二次免疫複合体中に残った標識物が検出される。

40

## 【0103】

一実施形態において、患者におけるHCVの感染の存在や程度を検出する方法が提供され、該方法は、患者からの体液や組織切片の試料における抗原量を決定する工程と、抗原の量と、患者における感染の存在及び程度とを相関する工程を含む方法である。一実施形態では、抗原は、(i) コア、E1、E2、NS2、NS3、NS4およびNS5蛋白、およびそれらのサブユニット、並びにそれらの断片に特異的なモノクローナル抗体を、試

50

料や組織切片へ添加し、( i i ) ペルオキシダーゼをコンジュゲートした抗マウスのヤギ Ig G を添加し、( i i i ) ジアミノベンゼンとペルオキシダーゼとを固定し、( i v ) 赤褐色の茶色であれば、細胞が抗原を生産したことを示す観点で、試料もしくは切片を調べることで検出する。

#### 【 0 1 0 4 】

本発明は、別の実施形態において、コア、E 1、E 2、NS 2、NS 3、NS 4 および NS 5 蛋白、およびそれらのサブユニット、並びにそれらのフラグメントの 10 k D のリコンビナントバージョンを用いて、アフィニティー精製ポリクローナル抗体を作製する方法を提供する。共通のリーダーペプチドは、バクテリアへ遺伝子導入し、そしてリーダーペプチドが発現され好適には水溶液中に可溶となる。ポリクローナル抗体は、通常、特定の抗原で免疫されたヤギやウサギの血清から得る。一実施形態において、前記抗原は、コア、E 1、E 2、NS 2、NS 3、NS 4 および NS 5 蛋白、およびそれらのサブユニット、並びにそれらのフラグメントの 10 k D のリコンビナントバージョンである。抗血清は、非特異的な抗体を除くためにアフィニティー精製され、感度があがりバックグラウンドが低減する。さらなる精製では、関連する動物種間での潜在的な非特異反応物を除去したり、他の重鎖及び軽鎖との交差反応性を低減する。一実施形態において、精製された抗体は、検出できるマーカー、例えばローダミンで標識される。精製されたポリクローナル抗体は、公知の先行技術を用いて、パラフィン中に包埋し固定された組織試料を使って、抗原を検出する用途に用いられる。

10

#### 【 0 1 0 5 】

さらなる方法として、2ステップアプローチにより、1次免疫複合体を検出する方法を含む。上述のとおり、一次抗体に結合親和性を有する第二の結合リガンド、例えば抗体が、二次免疫複合体を形成するのに用いられる。洗浄後、二次免疫複合体は、2次抗体に結合親和性のある第3の結合リガンドもしくは抗体と、免疫複合体(三次免疫複合体)形成をするのに十分な時間で接触させる。第三のリガンド、又は、抗体は、検出可能な標識に結合され、それゆえ、形成された3次免疫複合体の検出が、可能となる。

20

#### 【 0 1 0 6 】

本発明のモノクローナル抗体は、注入されたり、時間をかけて徐々に拡散させたりすることで、非経口的に投与されうる。本発明のモノクローナル抗体の投与は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、体腔内、もしくは経皮的に投与でき、単独であってもよいし、活性細胞と組み合わせてもよい。非経口投与の為の調製としては、無菌溶液や、非水溶液性の溶液、上清、そしてエマルジョンを含む。非水溶液性の溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような食物油、そしてエチルオレートのような注入可能な有機エステルを挙げることができる。水溶性のキャリアとしては、水、アルコール性の/水溶性の溶液、エマルジョン、もしくは上清で、生理食塩水や緩衝培地を含む。非経口的な溶媒としては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのブドウ糖液、ブドウ糖と塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、もしくは固定油を含む。静脈内用の溶媒としては、液体の栄養補充薬、(リンゲルのブドウ糖液を基本組成とするような)電解質補充薬、および同等物を含む。非経口の他の添加物として、例えば、抗菌薬、抗酸化剤、キレート物質、及び不活性ガス、並びに同等物が存在しうる。

30

40

#### 【 0 1 0 7 】

本発明によるモノクローナル抗体もしくはそれらの結合断片は、一実施形態において、種々の皮膚細胞もしくは他の細胞における、H C V 蛋白やそれらの断片の何れかの存在を、量的、又は、質的に検出するのに用いる。これは、例えば、蛍光標識した抗体を用い、光学顕微鏡検出、フローサイトメトリック検出、蛍光定量的検出と組み合わせる免疫蛍光法により達成できる。さらに、本発明による抗体およびそれらの結合断片は、さらに、組織学的に用いることができ、該組織学的方法は、免疫蛍光法、免疫電子顕微鏡法、非免疫学的な測定法、又は、切片上細胞の腫瘍特抗原検出の用途があり、例えば、モニタリングにおける使用、診断における使用、もしくは検出アッセイにおける使用がある。

#### 【 0 1 0 8 】

50

さらに他の実施形態において、切片上検出は、患者から組織試料を除去し、そこへ本発明の標識抗体を適用することにより達成できる。抗体もしくはそれらの抗原結合断片は、好適には、生物試料上に標識された抗体もしくは断片を覆うことで適用できる。かかる工程での使用により、抗原、保存変異体、もしくはペプチド断片の存在を決定できるだけでなく、調査した組織において、その分布も決定できる。広範多種の組織学的方法、例えば染色工程の任意の何れかを、切片上検出法で達成するように、修正をすることは、その技術分野における通常の知識を有する者は容易に認識する事項である。

#### 【0109】

本発明の免疫測定法によれば、生物試料を、固相支持体もしくはキャリア上へ、接触や固相することができ、支持体やキャリアの例としては、ニトロセルロースや他の固相支持体、マトリックスを挙げることができ、それらは、細胞や細胞粒子、膜、もしくは可溶性蛋白を固相可能である。支持体は、適した緩衝液で洗浄され、検出できるように標識された抗体で、処置される。固相支持体を緩衝液で2度洗浄し、未固相の抗体を除く。固相支持体上の結合標識物の量は、従来法に従い検出できる。従って、本発明の他の実施形態において、本明細書に記載したような固相支持体に結合するモノクローナル抗体、もしくはそれらの結合断片を含む組成物が提供される。

10

#### 【0110】

抗原もしくは抗体に結合できる任意の支持体は、固相支持体、固相キャリア、固相マトリックスによって意味される。公知の支持体、キャリアとしては、ガラス、プラスチック、ナイロンウール、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、フィルム、レジン、自然のもしくは修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、アルミナゲル、班れい岩、およびマグネチックを含む。キャリアの性質としては、本発明の目的からすれば、ある程度可溶性であるか、不溶性である。支持体の材料としては、結合された分子が抗原や抗体を結合できる性質であれば、実質的には、いかなる潜在的な構造立体配置をも有し得る。それゆえ、支持体立体配置は、ビーズのように球状であってよく、試験管の内部表面のように円柱状であってよく、またロッドの外部表面の立体配置でもよい。あるいは、表面は、シート、フィルム、テストストリップ、スティック、それらの同等物のように、平坦であってよい。

20

#### 【0111】

一実施形態において、固相支持体は、結合の反応条件には不活性であり、モノクローナル抗体、結合断片もしくは抗体の結合パートナーを接着させるための反応性基、又は、活性化された基を有しうる。固相支持体は、クロマトグラフィー支持体としても有用でもあり、糖質ポリマー SEPHAROSE<sup>TM</sup> (架橋化アガロースビーズ)、SEPHADEX<sup>TM</sup> (架橋化デキストランゲル)、もしくはアガロースがある。実際、抗体もしくは抗原を結合するための、かかる支持体の多くは、商業的に入手可能であり、その技術分野の通常の知識を有する者に知られている。

30

#### 【0112】

得た抗体の結合能は、公知の方法で決定されうる。本発明の腫瘍特異的抗体に関しては、かかる蛋白分子を検出可能なように標識する方法は、多く知られており、先行技術で用いられている。例えば、一実施形態において、抗体は検出可能なように標識でき、例えば、酵素免疫学的測定法 (EIA) での使用の為に、抗体は酵素へ結合される (Voller et al., Diagnostic Horizons, 2: 1-7 (1978); Butler et al., Meths. Enzymol., 73: 482-523 (1981))。抗体へ結合された酵素は、適当な基質、好適には、発色性の基質と反応させ、例えば、分光光度法、蛍光定量法、もしくは目視法によって検出可能な、化学成分を得る。抗体を検出可能なように標識するのに用いられる酵素の例としては、リンゴ酸脱水素酵素、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコール脱水素酵素、アルファ-グリセロリン酸脱水素酵素、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルコアミ

40

50

ラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼを含むが、これらの記載に限定されるものではない。検出は、酵素の発色基質を用いる発色法により、又は、同等に調製された標準品もしくはコントロールと比べ、基質の酵素反応の程度を視覚的に比較することで、達成されうる。

【0113】

本発明の抗体もしくはそれらの抗原結合断片は、蛍光物質を用いても標識されうる。蛍光的に標識された抗体が、適当な波長の光に暴露されると、その存在が蛍光によって検出されうる。もっとも共通で用いられる蛍光標識化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、*o*-フタルアルデヒド及びフルオレサミンを挙げることができる。

10

【0114】

本発明の抗体は、また、代替の実施形態において、抗体を化学発光の化合物へカップリングすることで検出可能に標識することができる。化学発光標識の抗体は、それゆえ、化学反応経過の間で産生される発光の存在を検出することで決定される。特に有用な化学発光標識の例としては、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びシュウ酸エステルを含むが、これらに限定されるものではない。同様に、生物発光化合物は、本発明の抗体を標識するのに用いることができる。生物発光は、生物システムにおいて見出された化学発光の一種で、触媒作用の蛋白が、化学発光反応の効率を上昇させる。生物発光蛋白の存在は、発光の存在を検出ことにより決定される。有用な生物発光標識化合物としては、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンを挙げることができる。

20

【0115】

以下の実施例で、さらに本発明を説明するが、当然に、発明の範囲を制限するように解釈されるべきものではない。

【実施例】

【0116】

被験者：ボルティモアの肝炎コホートの前後急性研究 ( Baltimore Before and After Acute Study of Hepatitis (BBASH) cohort ) では、C型肝炎感染症の危険のあるヒトの前向き研究である。参加適格者は、登録者としては、抗HCV抗体の血清陰性で、静脈内の薬物使用者若しくは薬物使用歴のあるものである。各参加者から、承諾書を得た。一旦登録されると、参加者は静脈内の薬物使用とその合併症を減らすカウンセリングを受ける。月毎の経過観察のためにデザインされたプロトコールにおいて、血清、血漿、及び抹消血単核細胞 ( PBMC ) を単離するために血液が採取される。急性のHCV感染症の参加者は、治療の評価のために受診した。斯かる研究は、ジョンホプキンス医科大学の治験審査委員会によって承認された。

30

【0117】

合成コード配列の再構築：HCVサブタイプ1a ( n = 390 ) や1b ( n = 296 ) の配列は、ポリ蛋白のオープン・リーディング・フレームの全長を少なくとも含み、ヒト試料から得られた。前記配列は、疫学的に重複するものではなく、ジェンバンクからダウンロードされた ( アクセス番号は、AB016785, AB049087-101, AB154177, AB154179, AB154181, AB154183, AB154185, AB154187, AB154189, AB154191, AB154193, AB154195, AB154197, AB154199, AB154201, AB154203, AB154205, AB191333, AB249644, AB429050, AF009606, AF139594, AF165045, AF165047, AF165049, AF165051, AF165053, AF165055, AF165057, AF165059, AF165061, AF165063, AF176573, AF207752-74, AF208024, AF313916, AF356827, AF48326

40

50

9, AF511948-50, AJ000009, AJ132996-97, AJ238799-800, AJ278830, AY045702, AY460204, AY587844, AY615798, AY695437, AY956463-8, D10749, D10934, D11168, D14484, D50480-82, D63857, D85516, D89815, D89872, D90208, DQ071885, DQ838739, EF032883, EF032886, EF032892, EF032900, EF407411-57, EF407458-504, EF621489, EF638081, EU155213-16, EU155217-35, EU155233, EU155236-381, EU234061, EU234063-65, EU239713, EU239714, EU239715-17, EU255927-99, EU255960-2, EU256000-1, EU256002-97, EU256045, EU256054, EU256059, EU256061-2, EU256064-6, EU256075-103, EU256104, EU256106-7, EU260395-6, EU362882, EU362888-901, EU362911, EU482831-2, EU482833, EU482834-89, EU482839, EU482849, EU482859, EU482860, EU482874, EU482875, EU482877, EU482879-81, EU482883, EU482885-6, EU482888, EU529676-81, EU529682, EU569722-23, EU595697-99, EU660383-85, EU660386, EU660387, EU660388, EU677248, EU677253, EU687193-95, EU857431, EU862823-24, EU862826-27, EU862835, FJ024086, FJ024087, FJ024274-76, FJ024277, FJ024278, FJ024279, FJ024280-82, FJ181999-201, FJ205867-69, FJ390394-95, FJ390396-8, FJ390399, FJ410172, L02836, M58335, M84754, U01214, U16362, U45476, U89019, X61596)である。

#### 【0118】

本発明を説明する目的で、以下、390サブタイプ1aの配列データセットを、「オリジナルデータセット」と呼ぶ。配列は、MUSCLE v3.0 (Nucleic Acid Res. 32:1792-1797 (2004))を用いてアライメントされ、BioEdit v7.0.5.3108 (mbio.ncsu.edu/RNaseP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html (accessed 20 Feb 2005))を用いて修正された。個人の系統の特異体質を避けるために、我々は、ソフトウェアプログラムを用いて2つの独立した系統樹を作製した。該ソフトウェアプログラムは、例えば、全ゲノムアライメント(ポジション番号は、レファレンスゲノムH77に基づき、ジェンバンクのアクセス番号はAF009606である)から、ポジション869-1292 (Core/E1)と、ポジション8276-8615 (NS5B)に、MrBayes v3.2 (Bioinformatics 19:1572-1574 (2003))に適用するように、確率分布として、系統学的な再構築及び祖先配列の再構築を許容する。これらの断片は、最も系統的に有益な情報であったことから、選択された。これら断片は、本発明では、以降、「Simmonds」領域と記載する。MrBayes v3.2での3000万回の反復により、Tracer v1.5 (Rambaut A, 著者から利用可能 [beast.bio.ed.ac.uk/Tracer])を用い、両Simmonds領域から推定される系統樹のためのパラメータの収束を確認した。両Simmonds領域は、可能性のある樹の膨大さによって、予期された異なる樹を生成した。にもかかわらず、これらの2つのデータセットの分析は、類似モデルのパラメータに収束した。更に、HCVにおける組換えは、稀である。そ

れゆえ、同じ系統樹又は同じ進化の歴史は、ゲノム全長に対して、正確であると仮定できる。

【0119】

両 Simmonds 領域で再構築した系統樹を用いて、各 HCV 1a コード領域の祖先配列が推定された。祖先配列は、各ポジションに対する確率分布として得られ、そのような方法で、各塩基を観察する可能性がある。

【0120】

合成 HCV ゲノムのコンピューターによる調製：Bolela は、本発明の方法の実施形態を用いて得た。

【0121】

1. ゲノムにおける各ヌクレオチドの位置 (i) とし、もし、両樹が最大事後確率 (MPP) 残基で一致するならば、その位置 p<sub>i</sub> の確率は、2つの MPP のうち大きいほうを選択される。これらの位置は、合致として確定される。

【0122】

2. 不一致の位置 (MPP 残基が一致しない位置) では、両樹に基づく不一致位置を含むコドン k の結合確率は、p<sub>c<sub>k</sub></sub> (core-E1) と p<sub>c<sub>k</sub></sub> (NS5B) と割りあてた。そのようなコドンにおける一致残基では、前のステップで計算された p<sub>i</sub> は、結合確率を計算する際に用いられた。

【0123】

3. 2つの樹からの高結合 MPP を有するコドンは、そのコドン位置を代表するものとして選択された。このコドンに基づく分析は、コドンにおける 1 以上の位置で不一致であるケースを解決し、6 倍の縮重コドンを収容する。

【0124】

4. コドン MPP のストリンジェント閾値を決定するために、コドン MPPs の分布における屈曲は 0.9837 であり、該コドン MPP における分布は、第二派生物での多様性が MPP 値で 10<sup>-6</sup> より小さいことが判明し、個々の残基 MPPs > 0.99 に相当するものである。

【0125】

5. 各樹に基づき 0.9837 以上の MPP を有する各コドンは、祖先配列として受け入れられ、その構成位置は解決として定義される。

【0126】

6. 共分散分析は、未だ解決されていない位置を調べるために用いられた。各サイトは独立的に進化するとの系統学的再構築の基本的な仮定は、サイトの共変動や相互作用を無視するものである。斯かるサイトを考慮にいと、観察され予期される塩基対の頻度は、決定され、式 1 に示すようにカイ二乗測定基準が計算され、ホルム - ポンフェローニ法 (α = 0.05) を用いた多重比較法に適用される。

【数 2】

$$\chi_{ij}^2 = (o_{ij} - e_{ij})/e_{ij} \quad (1)$$

【0127】

調整されたカイ二乗測定基準により、未解決の位置 i とともに著しく共変動する、すべての解決されたポジション j が、特定される。正の相互作用 (o<sub>ij</sub> > e<sub>ij</sub>) の場合、正の相互作用残基を含む MPP コドンが選択される。負の相互作用 (o<sub>ij</sub> < e<sub>ij</sub>) では、負の相互作用残基を有するすべてのコドンが除去され、残りから MPP コドンが選択される。

【0128】

7. 未解決のサイトでは、例え 0.9837 より低くとも、MPP コドンが選択された (実施例 x に記載のように、これはあまり必要ではない)。

【0129】

10

20

30

40

50

5' UTRと、3' UTRのシーケンス再構成：5' UTRと3' UTRは、非翻訳（コード）領域であるが、ウィルスの複製においてはそれらは必須である。しかしながら、390配列のうち、6つのみが、完全に配列決定された5' UTR領域を有し、4つのみが、完全に配列決定された3' UTR領域を有するものであった。したがって、我々は非翻訳領域を良好にデザインするための追加配列を用いた。5' - UTR (n = 257)と3' - UTR (n = 46)配列は、B B A A S Hコホートで実際に感染した被験者から産生されたクローンの配列に由来するものであった。我々は、5' UTRの90%の共通配列は、完全な配列を伴った前記6配列に由来する共通配列と同一であり、また、H77の5' UTRとも同一であることを見出した。3' UTR配列は、K o l y k h a l o vらによる分類に基づき、4つのパーツに分けた。我々は、90%の共通配列を第一のパーツと決定した。この第一のパーツは、遺伝子型の間でも著しい多様性を伴う短い配列である。3' UTRの第2の断片では、我々は、ホモポリマー状のウラシルトラクト (uracil tract) の長さの中央値が51残基であると決定しており、その長さは複製に好ましい長さでもある。我々は、第三の断片のための中央値の長さの断片を、散在したC残基とともに主にUを組成とするポリピリミジントラクトに選択した。最後(3末端)の部位は、保存された98塩基の配列であり、この98塩基の配列のために、我々は90%の共通配列を用い、未関連の研究から得た15の追加配列で確認されている。

10

20

30

40

50

#### 【0130】

HCV偽粒子(HCVpp)システム：コアの最後の27アミノ酸とそれに続くE1領域及びE2領域を符号化したBole1aのヌクレオチド配列の領域は、合成されて(B l u e H e r o n , B o t h e l l , W A )、Gatewayクローン技術を用いて、発現ベクターp c D N A 3 . 2 / V 5 / D e s t ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) にサブクローニングした。E1E2領域は、クローニングの後に配列決定し、変異を認めなかった。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む偽粒子は、記載に基づいて産生した(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100: 7271 - 7276 (2003); Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101: 10149 - 10154 (2004); Clin. Infect. Dis. 41: 667 - 675 (2005))。概略としては、env欠失HIVプロウイルスゲノムと、ルシフェラーゼレポーター遺伝子とを含む、pNL4-3.Luc.R-E-プラスミドと、Bole1a E1E2を発現するプラスミドとを、HEK293細胞へ、同時遺伝子導入した。遺伝子導入(トランスフェクション)の後、48時間と72時間後に、上清を含むHCVppを回収した。感染性の比較のために、H77由来のE1E2糖蛋白を発現する偽粒子、他のサブタイプの1aHCVウイルス(pp1a46)由来のE1E2糖蛋白を発現する偽粒子、及び、E1E2を含まない模擬(mock)の偽粒子は、Bole1a E1E2を発現する偽粒子と同時に生産した。偽粒子の2倍連続希釈法は、Hep3B肝がん細胞に感染させるのに用い、96ウェルプレートに2ウェルづつ播種し5時間後、培養溶液を交換し、感染後から72時間でルシフェラーゼ活性を測定した。細胞は、Cell Culture Lysis Reagent (Promega, USA)で溶解し、ルシフェラーゼ活性は、Luciferase Assay Reagent (Promega, USA)とCentro LB960 Chemiluminescence Counter (Berthold, Germany)を用いて測定した。

#### 【0131】

CD81ブロッッキング試験：Hep3b細胞は、マウス抗ヒトCD81モノクローナル抗体(100µg/ml, clone 1.3.3.22, Santa Cruz Biotechnology)又は、マウスIgG1抗体に対するアイソタイプコントロール(Santa Cruz Biotechnology, USA)を用い37で1時間でインキュベーションし、HCVpp感染を上述のように評価した。

#### 【0132】

ヒト血漿による中和反応：熱不活化した血漿又は血清は、10%FBSを含むMEMで1:4で希釈し、各HCVppライブラリーと1時間37でインキュベーション(最終

HCVpp希釈が1:100)し、96ウェルプレートに2ウェルづつHep3b肝がん細胞を添加し、5時間37でインキュベーションし、続いて、培養液を交換した。ルシフェラーゼ活性は上述のとおり測定した。HCVpp感染は、「血漿サンプル及び血清サンプル(RLUテスト)の存在下の相対的光ユニット(RLU)」対「ノーマルヒト血清(Gemini Bio-Products, West Sacrement, CA)及びBBASH参加者の血清陰性者からのプール血漿(RLUコントロール)の存在下での平均感染」で測定した。パーセント中和は、 $[1 - (RLUテスト / RLUコントロール)] \times 100$ で計算された。

#### 【0133】

多様性分析：多様性プロットは、VarPlot Version 1.2 (sray.med.som.jhmi.edu/software/VarPlotの著者より入手可能)を用いて作成した。プロットは、20コドンのウィンドウサイズ及び1のステップサイズを用いて作成した(T細胞エピソードの上制限を反映するため)。同義及び非同義の距離は、NeiとGoujaboriのモデル(Mol. Biol. Evol. 3: 418-426 (1986))を用いて計算した。E1E2ピクセルアラインメント(図2b)は、VisSPAv1.6 (sray.med.som.jhmi.edu/SCROftware/VisSPA/)を用いて作図した。

#### 【0134】

Bole1aゲノム配列は、ジェンバンクにアクセスナンバー(accession) JQ791196で寄託されている。

#### 【0135】

(実施例1)

E1領域とNS5B領域の樹は、アラインメント(ギャップを文字としてカウントした)において、9992ヌクレオチドサイトのうち9763(~98%)で一致する祖先配列を生成した。各樹に、0.9837以上のMPPのコドン閾値を適用すると、68/3012(2.2%)の未解決コドン(unresolved codons)が残った。これらの68コドンのうち、42は同義コドン間から選ばれ、26は非同義コドン間から選ばれた。共分散ネットワークは、両義性を解決するために用いた。

#### 【0136】

(実施例2)

共変動位置：68個の未解決コドンのうち、4個は、ゲノムにおける解決位置(H77位置1157、1611、2120及び6554)への依存に基づいて決定した。4個の位置(1157、1611、2120及び6554)は、同義の変化であった。位置1611と6554は、ゲノムにわたって複数のサイトリンクしており(それぞれ50と3)、位置1157と2120は、1つの他の解決位置にリンクしていた。共変動は、統計的にのみ検出され、生物学的な結合については更なる研究における課題である。

#### 【0137】

(実施例3)

Bole1aの代表的な特徴：一旦、Bole1aの完全な代表的な配列が決定されると、Bole1aが、ヌクレオチド又は蛋白のHCVサブタイプ1a配列のあらゆるセットを表すもので、再構築されたもの由来の単なる配列でないことを確かめることが望まれていた。これを確かめるため、確認のために2つの追加データセットを用いた。第一のデータセットは、Yusimらの論文(J. Gen. Virol. 91: 1194-1206 (2010))からであり、Los Alamos HCVデータベースから収集された。このデータセットは、143シーケンスを含み、それらのうち136は、オリジナルデータセットに存在するが、その報告の著者らは、関連する配列をリサンプリングするのを避けるために、データセットを精選した(curated)。このデータセットは、Yusimデータセットと呼ばれる。第2のデータセット(E1E2データセットと呼ばれる)は、214のE1E2配列を含む。これらは、我々が進行中のBBASHコホートから得られたものである。後者データセットの配列は、ジェンバンクでの、又は、LANL

10

20

30

40

50

データベースからの全長の配列に関するものではない。近接結合樹は、B o l e 1 a は中心から連続して枝分かれしていることから、B o l e 1 a は、Y u s i m データセットや E 1 E 2 データセットの両方の代表であることが示唆される ( 図 1 ) 。

#### 【 0 1 3 8 】

全長ゲノムの対比較によると、B o l e 1 a は、オリジナルデータセットにおける他のどの配列よりもサブタイプ 1 a 配列への類似性が高い ( 図 2 a では、非同義距離の平均低下及び中央値低下は、それぞれ、39%と44%である ) 。ゲノムにおける20コドン ( T 細胞エピトープのサイズでの上制限に近似する ) のスライディングウィンドウでは、B o l e 1 a の類似性は、全体で98%より高い ( 類似性の平均及び中央値は、それぞれ、98.4%と98.9%であった ) 。驚くべきことではないが、B o l e 1 a と循環しているゲノムであるサブタイプ 1 a との間での類似性が低いのは、高頻度可変性領域 1 ( H V R 1 ) であった。H V R 1 での類似性は、73%程度の低さであった ( 同じ位置で単離されたサブタイプ 1 a の間での類似性は64%であった ) 。 ( i ) B o l e 1 a 配列と、 ( i i ) オリジナルデータセット、H 7 7、H C V - 1、及び 1 b の配列の共通配列との比較から、H V R 1 における変動性 ( v a r i a b i l i t y ) が示された ( 図 2 b のアスタリスクで示すように ) 。

10

#### 【 0 1 3 9 】

B o l e 1 a アミノ酸配列の全ての9残基アミノ酸を、潜在的なエピトープカバー度を表すために、Y u s i m データセットにおける配列と比較した。本比較のために、9残基アミノ酸を用いたのは、典型的なMHCクラスI依存エピトープ長さに基づくものであり、そうしたエピトープ長さは、H C V 感染の自発的な排除における免疫制御の重要な成分である、エフェクター C D 8 + T 細胞によって認識されるものである。Y u s i m データセット又はオリジナルデータセットと比較すると、B o l e 1 a は、H C V ポリプロテインにおける、正確に一致する9残基アミノ酸のカバー度が、78%を示した ( データは不掲載、方法は Y u s i m に記載 ) 。E 1 E 2 データセットの高多様性のE 1 領域及びE 2 領域においては、B o l e 1 a は、正確に一致する9残基アミノ酸のカバー度が、58%であった。Y u s i m のデータセットについて個々の蛋白で比較した結果、E 1 やE 2 のような不均一性が高い領域は、コアやN S 4 B のような保存性の高い領域よりも、B o l e 1 a によるカバー度が低いことが確認された。全てのケースにおいて、B o l e 1 a は、レファレンス配列のH 7 7 より、優れた9残基アミノ酸のカバー度を示した。B o l e 1 a は、全長ゲノム比較において、1個又は2個の位置での不一致が許容された状況では、いずれの9残基アミノ酸でも99%の一致を示した。要するに、B o l e 1 a は、ゲノムの各位置における、全ての様式 ( 最も頻繁に観察される ) の9残基アミノ酸が95%の一致であることが分かり、Y u s i m データセットにおける個々の配列では、中央値様式での9残基アミノ酸のカバー度が80%であった ( 図 3 a ) 。

20

30

#### 【 0 1 4 0 】

##### ( 実施例 4 )

9残基アミノ酸のカバー度の比較において認められる明らかな制限は、全ての9残基アミノ酸がT細胞エピトープとして認識されるものではないからである。エピトープカバー度に焦点を当てるために、公知のサブタイプ 1 a のT細胞エピトープの全て ( C D 4 と C D 8 の両方 ) を、免疫エピトープデータベース ( [www.immuneepitope.org/](http://www.immuneepitope.org/) ) から選択した。これらのエピトープは、少なくとも1アッセイでポジティブな結果を得たものである。データベースの548エピトープのうち、338のエピトープが、Y u s i m データセット配列の少なくとも半分に存在していた ( A F 2 7 1 6 3 2 及び A X 1 0 0 5 6 3 は、それぞれがH C V - 1 及びH 7 7 と関連することにより除かれる ) 。B o l e 1 a は、これらの338エピトープの最高カバー度 ( 100% ) を示した ( 図 3 b ) 。H C V - 1 やH 7 7 は、H C V 免疫において抗原として共通に用いられているが、これらの338エピトープのうち、それぞれ、317と316 ( ~ 93% ) の一致にすぎない。図 3 b は、Y u s i m データセットにおける全ての配列のエピトープカバー度の分散を示している。配列の80%に存在したエピトープが含まれるとき、B o l e 1 a は

40

50

94%のカバー度を示し、H77とHCV-1は、それぞれ、87%と91%のカバー度を示した(データ非掲載)。HCV-1やH77が、これらのエピトープが派生する多くの研究で抗原として用いられてきた第1の分離株であったので、これらのカバー度は、分析バイアスが部分的に入ったことによるものかもしれない。最後に、エピトープの変異体をインターフェロンガンマ エリスロット分析で測定したところ、Bole1aゲノムにおける変異体は、H77や単純な共通配列を含む、他の配列よりも連続して免疫原性があることが示されている(データ非掲載)。

#### 【0141】

##### (実施例5)

Bole1a偽粒子：レンチウイルス偽粒子を使用したとき、個々のE1E2試験単離体の約75%が、低い感染活性であった(バックグランドよりも5標準偏差だけ高い値未満)(図4)。エンベロープ遺伝子の多様性は、非常に高く、20コドンウィンドウにおける非同義の多様性平均36%を伴う(図2)。この多様性や我々の手法の結果として、Bole1aは、我々が調査したゲノムの中でも特徴的なHVR1配列(ETHVTGGSAARATAGFAGLFTPGAQKQN)(配列番号3)であり、BLAST(blast.ncbi.nlm.nih.gov)やHMMER(hmmer.janelia.org)を用いたこのペプチド配列の調査でも、同一配列は見つからなかった。感染力のためのネガティブな予測因子であるが機能を測定するために、Bole1aのE1E2配列をレンチウイルス偽粒子に再構成して用いた。驚いたことに、HCVpp-Bole1aは、He p3B標的細胞に、高感染性で十分に特徴付けされた単離HCVpp-H77に匹敵する高効率で感染した(図4)。Bole1a HCVppを抗CD81抗体でブロッキングすると、感染力で少なくとも10倍減少し( $p=0.0008$ )、一方、アイソタイプコントロール抗体は感染力が変化しなかった( $p=0.85$ ; 図4)。閾値より低いRLU値(図4)は、高分散で複製能が低いことが分かった。サブタイプ1a HCVppの比較パネルにおいて、ストップコドン、フレームシフト変異、若しくは他の明確な欠損を含むものは除外しているが、これらのクローンの多くで感染力低下を起こしたという、他の生物学的特徴が若しくは人為的特徴があることは、明白である。重要なことに、この実験の目的は、Bole1a E1E2が、それらの合成起源やHCVエンベロープの高可変性にもかかわらず、全てにおいて機能的であるか否かを決定することである。すなわち、このE1E2はHCVppシステムにおいて感染性であることは、全く予期しないものであった。更に、Bole1a HCVppは、ヒト血清で容易に中和された。BBASH被験者の30%が、エントリーの少なくとも85%を阻害し、BBASHコホートからの被験者の90%(40中36)で、Bole1a HCVppエントリーの少なくとも50%を阻害し、一方で、ノーマルヒト血清やHCV血清陰性のプール血清では、非中和が観察された。

#### 【0142】

この概念証明実験によって、Bole1aエンベロープE1E2ヘテロダイマーは、折りたたみと会合を正確にできることが分かった。HCV E1とE2遺伝子は、宿主細胞へのエントリーに重要であるため、抗体を介したウイルス中和の重要な標的でもある。免疫学的に操縦される明らかなエスケープ変異を欠いているため、Bole1aは、HCV適応度を決定する研究の理想的な基盤を表すであろう。

#### 【0143】

##### (実施例6)

予備解析から、Bole1aからのエピトープは、試験された単離物の中で最も免疫原性が高いことが示された。Bole1aエピトープが従来の見解と異なるというこれらの場合(15試験中2試験)では、慢性的に感染した患者から得たT細胞は、循環配列や共通配列からの対応するエピトープよりも、Bole1aエピトープをよく認識した(データ非掲載)。Bole1aは、循環する株の代表であるから、ウイルス適応性を阻害するエスケープ変異を含むことはないようである。例えば、Bole1a配列は、位置1444にYを有し、一方、その位置のFは、エスケープ変異であると信じられている。そのエ

10

20

30

40

50

スケープ変異は、NS3の1436-1444エピトープに、あまり強くないT細胞反応を引き起こすものである。更に、Bole1aは、KLVALGINAV（配列番号4）配列をNS3の1406-1416に含む。このエピトープの3つの変異体は、これらの変異体を最も解釈しやすいエスケープをするMHC結合能における変化を伴わずに、T細胞反応を減少させることを示した。

【0144】

（実施例7）

上記に記載の本発明の方法を用いることで、2つの追加の合成HCVゲノムポリヌクレオチド配列を調製した。配列は、第2のHCVサブタイプ1a（配列番号5）とその分離されたアミノ酸配列（配列番号6）、HCVサブタイプ1b（配列番号7）とその分離されたアミノ酸配列（配列番号8）である。

10

【0145】

本願で引用した、文献、特許出願、及び特許を含むすべての参考文献は、各参考文献が、個別に及び特に示されて参照することにより援用され、完全に本明細書で説明したものとされるのと同じ程度に、参照することにより本明細書に援用される。

【0146】

発明を記載する文章中（特に、以下のクレームの文章）で、用語「a」、「an」、「the」及び同様の指示語の使用は、本願に別段の指示がない限り、又は明確に文書中で否定されない限り、単数と複数の両方をカバーするように構成される。用語「comprising」、「having」、「including」、「containing」は、記載された別段の指示がない限り、オープンエンド用語（例えば、含まれることを意味するが、それに限定するものではないとの意味）として構成される。本願での値の範囲の記述は、本願に別段の指示がない限り、範囲に含まれる各区切られた値を単独に参照する、簡単な方法として機能しており、本願で個々に繰り返すかのように、各個別の値が明細書中に組み込まれる。本願に記載される全ての方法は、本願に別段の指示がない限り又は文章中で明確に否定されない限り、任意な適切な順序で実施することができる。本願で用いる、いかなる全ての例示もしくは、例示の言語（例えば「such as」）は、別段のクレームがない限り、単に発明をよく説明するために用いるだけで、発明の範囲を限定することをもたらすものではない。明細書中のいかなる言語も、クレームされていない要素を、発明の実施に不可欠なものとする解釈をしてはならない。

20

30

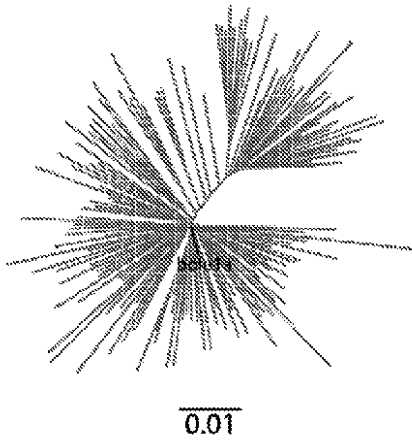
【0147】

本発明の好適な実施形態は、明細書に記載してあり、発明者が認識している、発明を実施するためのベストモードを含む。これらの好ましい実施形態における変形は、先行技術文献を読むその分野の通常の知識を有する者にとって、明白である。発明者は、通常の知識を有する当業者が、そのような変形を適当なものとして採用することを期待しており、さらに発明者は、本願で特に記載された事項以外で実施されることも意図している。したがって、本発明は、適用法で許容される、本文添付のクレームに記載の主題と、適用法で許容される全ての修正と均等物を含む。さらに、明細書に別段の指示がなく、文章中で明らかに否定されない限り、上記記載の要素の組み合わせから派生しうる全ての変形型の中で、上記記載の要素のいかなる組み合わせをも、本発明によって包含される。

40

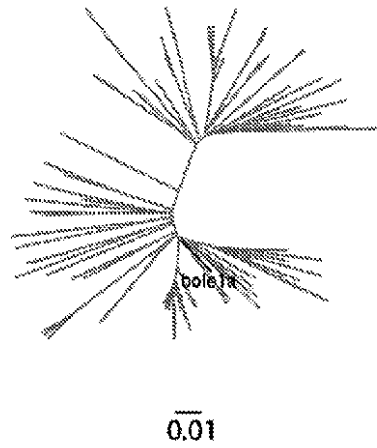
【 図 1 ( a ) 】

(a)

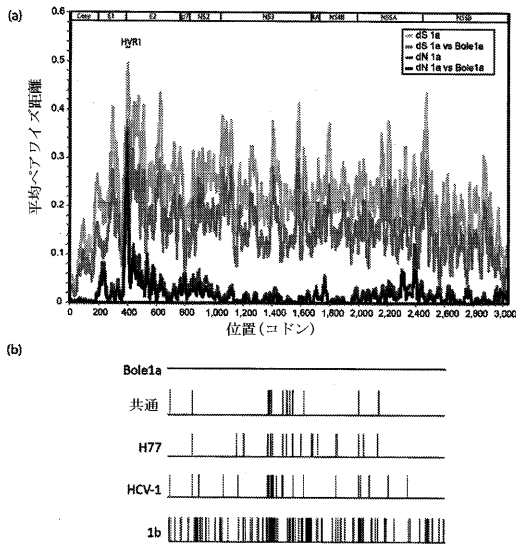


【 図 1 ( b ) 】

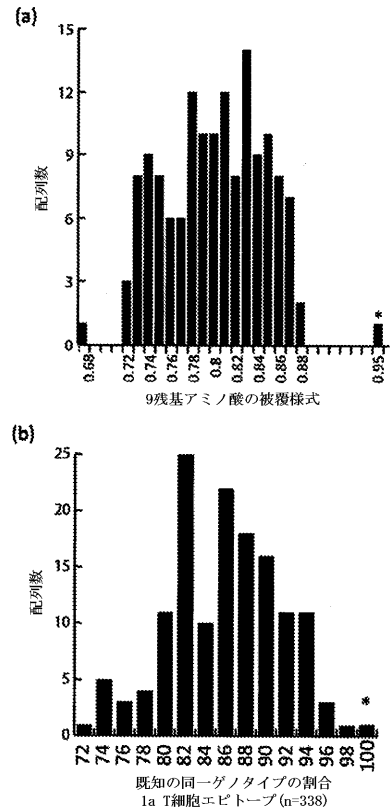
(b)



【 図 2 】

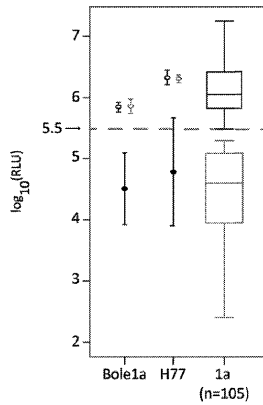


【 図 3 】



【 図 4 】

FIGURE 4



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年1月10日(2014.1.10)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

合成のC型肝炎ウイルスサブタイプ1a(Bole1a)のゲノムを符号化する核酸分子であって、配列番号1(SEQ ID NO:1)のヌクレオチド配列、該ヌクレオチド配列の一部若しくは断片、又は前記ヌクレオチド配列若しくは該ヌクレオチド配列の一部若しくは断片の相補鎖(complement)を含む核酸分子。

【 請求項 2 】

請求項1に記載の単離された核酸分子を含む単離された宿主細胞。

【 請求項 3 】

宿主細胞が哺乳類細胞である、請求項2に記載の単離された宿主細胞。

【 請求項 4 】

配列番号1に記載のヌクレオチド配列又は該ヌクレオチド配列の相補鎖に特異的にハイブリダイズする単離された核酸分子。

【 請求項 5 】

長さが約10~約30のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプライマーである、請求項4に記載の核酸分子。

【 請求項 6 】

第一のプライマーが配列番号1に示されたヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズ

する、長さが10～30のヌクレオチドの単離された核酸分子であり、第二のプライマーが配列番号1に示されたヌクレオチド配列の相補鎖に特異的にハイブリダイズする、長さが10～30のヌクレオチドの単離された核酸分子である、1組のPCR用オリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項7】

請求項1に記載の核酸によって符号化される単離されたポリペプチド、又は該ポリペプチドの一部若しくは断片。

【請求項8】

配列番号2のアミノ酸配列を含む、請求項7に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項9】

(a) 配列番号1のコア配列の最後の27アミノ酸と、続くE1とE2領域のアミノ酸配列と、

(b) レポーターエレメントを含む、ウィルス粒子。

【請求項10】

前記レポーターエレメントが、ルシフェラーゼポリ蛋白又は該ルシフェラーゼポリ蛋白の機能的部位である、請求項9に記載のウィルス粒子。

【請求項11】

請求項7又は8に記載のポリペプチドの15～100の近接するアミノ酸を符号化するポリヌクレオチド分子を含むHCV抗原。

【請求項12】

前記ポリヌクレオチド分子が請求項7に記載のポリペプチドのコア領域、E1領域、及び/又はE2領域からのアミノ酸を符号化する請求項11に記載のHCV抗原。

【請求項13】

請求項1に記載の核酸分子、又は請求項7若しくは8の単離されたポリペプチドに特異的に結合する、抗体若しくは該抗体の抗原結合部位。

【請求項14】

ヒトの抗体分子、又はヒト化された抗体分子である、請求項13に記載の抗体。

【請求項15】

検出可能な標識で標識された、請求項13又は14に記載の抗体。

【請求項16】

試料中のHCVの存在を調べるための試料の試験方法であって、該方法は、請求項13～15のいずれか1項に記載の抗体に特異的に結合する試料中のポリペプチドの存在を検出する工程を含む。

【請求項17】

請求項11又は12のいずれかに記載の抗原を含む医薬組成物であって、該医薬組成物は、対象における抗原に対する免疫応答を刺激するのに十分な量で前記抗原を含み、前記免疫応答が、HCVの治療での使用で対象におけるHCVウィルス量を減らすのに十分な程度である。

【請求項18】

(a) 2以上のHCVポリヌクレオチド配列を得て、

(b) 適切なアラインメントプログラムを用いてポリヌクレオチド配列を整列させ、

(c) 前記(b)において、系統樹用のパラメーターの収束を確認するための十分な繰り返しのために、アラインメントの系統学的に有益な情報の2つの領域を適用したベイジアン法又は最尤法を用いて、2以上の系統樹をアラインメントから作製し、

(d) 評価に用いるプログラムが、各位置における確率分布として祖先配列を推測しなければならず、各塩基における確率を発生させるもので、系統樹及び推測された祖先配列の両方を、HCVゲノムの残り用に用い、

(e) 次の方法(方法I及びII)、すなわち、

ゲノムにおける各ヌクレオチド位置*i*において、両樹の最大事後確率(MMP)残基が一致する場合、その位置( $p_i$ )における確率は、2つのMMPsのうち高いものが選択さ

れ、これらの位置は合致として確定し、

各不一致位置（M P P 残基が一致しない位置）において、直接ステップ（d）へ進み（方法 I）、又は、両樹に基づく不一致位置を含むコドン k の結合確率を計算し（方法 II）

、

該コドン中の一致残基においては、前記ステップで計算される  $p_i$  が結合確率を計算するのに用いられ、

2つの樹から高い結合 M P P を有するコドンが、そのコドン位置の代表に選択される方法で最終代表配列を推測し、

（f）第二の派生での相違が  $10^{-6}$  より低い M P P 値での、コドン / ヌクレオチド M P P s の分布における変曲が、コドン / ヌクレオチドを解決するための閾値として用いられ、

各樹に基づく閾値以上の M P P を有する各コドン / ヌクレオチドは、祖先のものとして受け入れられ、その構成の位置は解決位置と確定されるように、

コドン / ヌクレオチド M P P ストリンジェントのための閾値を決定し、

（g）観察及び予期される塩基組合せの頻度が決定され、カイ二乗測定基準は、式 1 に示されるように計算され、ホルム - ポンフェローニ法（ $\alpha = 0.05$ ）を用いた多重比較法により調整され、未解決位置を決定するために共分散分析を使用し、

【数 1】



$$\chi_{ij}^2 = (o_{ij} - e_{ij}) / e_{ij} \quad (1)$$

（h）未解決位置 i と著しく共変動する全ての解決位置 j を同定する、調整されたカイ二乗測定基準を用い、正の相互作用の場合（ $o_{ij} > e_{ij}$ ）、正に相互作用する残基を含む M P P コドン / ヌクレオチドが選択され、負の相互作用の場合（ $o_{ij} < e_{ij}$ ）、負に相互作用する塩基を含む全てのコドン / ヌクレオチドが除かれ、残りから M P P コドンが選択され、そして、

（i）合成の H C V ポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドの断片若しくは一部を合成する、

合成の H C V ウィルスポリヌクレオチドの調製方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2012/036098</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/33(2006.01)i, C12N 5/10(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i, A61K 39/12(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/33; A61K 39/395; C07K 16/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: synthetic hepatitis C virus subtype 1a (Bole 1a), HCV antigen, envelope genes (E1 and E2).		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	GenBank Accession No. AF009606 (2009.06.18) `Hepatitis C virus subtype 1a polyprotein gene`	1-8, 11-14 9, 10 18
Y A	WO 2010-039154 A1 (BOARD OF TRUSTEES OF LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY et al.) 08 April 2010 See abstract and paragraphs 236-255.	9, 10 1-8, 11-14, 18
A	US 2009-0238822 A1 (RAJAN GBORGE et al.) 24 September 2009 See the whole document.	1-14, 18
A	S. CHEVALIEZ et al., `Hepatitis C Virus (HCV) Genotype 1 Subtype Identification in New HCV Drug Development and Future Clinical Practice`, PLoS ONE, December 2009, Vol. 4, Issue. 12, pp. 1-9. See the whole document.	1-14, 18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 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 22 NOVEMBER 2012 (22.11.2012)		Date of mailing of the international search report <b>23 NOVEMBER 2012 (23.11.2012)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer YOO Min Jeong Telephone No. 82-42-481-3463 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/036098

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper  
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed  
 filed together with the international application in electronic form  
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/036098

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.  Claims Nos.: 17  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 17 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv)).
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.: 15-17  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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.  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.:
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2012/036098**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010-039154 A1	08.04.2010	AU 2008-362482 A1	08.04.2010
		CA 2738644 A1	08.05.2010
		CN 102197050 A	21.09.2011
		EA 201170353 A1	30.12.2011
		EP 2331573 A1	15.06.2011
		IL 212040 D0	30.06.2011
		KR 10-2011-0061624 A	09.06.2011
		MX 2011003613 A	03.08.2011
		US 2012-039846 A1	16.02.2012
		US 2009-0238822 A1	24.09.2009
BR P10617330 A2	19.07.2011		
CA 2623329 A1	19.04.2007		
CN 101300355 A	05.11.2008		
EP 1948802 A1	30.07.2008		
EP 1948802 A4	14.01.2009		
IL 190744 D0	03.11.2008		
JP 2009-511024 A	19.03.2009		
KR 10-2008-0056301 A	20.06.2008		
US 2011-223185 A1	15.09.2011		
WO 2007-041861 A1	19.04.2007		
ZA 200804078 A	30.09.2009		

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/18	
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 1 2 N 7/04	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
G 0 1 N 33/532 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	
G 0 1 N 33/576 (2006.01)	G 0 1 N 33/532 A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/576 Z	
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 スチュワート キャンベル レイ  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 0 9 3 ルーサービル ノーター デイム アベニュー  
 1 8 0 7

(72)発明者 スプライヤ ムンシャウ  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 3 1 ボルチモア サウス ボンド ストリート 8 2  
 4

(72)発明者 リン リウ  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 9 ボルチモア ロマリック コート 3 0 0 1 ア  
 パートメント ジー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA33 BA51 CA05 DA20 GA11 HA01 HA15  
 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01  
 4B065 AA96Y AB10 AC20 BA01 CA24 CA45 CA46  
 4C085 AA03 BA92 CC33  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA02 CA40 DA76 DA86 EA31 EA53  
 FA74

专利名称(译)	合成丙型肝炎基因组，其制备方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014516520A</a>	公开(公告)日	2014-07-17
申请号	JP2014509382	申请日	2012-05-02
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	スチュワートキャンベルレイ スプライヤムンシャウ リンリウ		
发明人	スチュワート キャンベル レイ スプライヤ ムンシャウ リン リウ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/18 C12N7/00 C12N7/04 C07K16/10 C07K16/46 A61K39/29 G01N33/532 G01N33/576 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/12 A61K39/29 A61K2039/53 A61P31/14 C12N7/00 C12N9/0069 C12N2770/24221 C12N2770 /24234 G01N33/56983 C07K14/005 C07K16/109 G01N33/5767		
FI分类号	C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N5/00.102 C07K14/18 C12N7/00 C12N7/04 C07K16/10 C07K16/46 A61K39/29 G01N33/532.A G01N33/576.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA33 4B024/BA51 4B024/CA05 4B024/DA20 4B024/GA11 4B024 /HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA96Y 4B065/AB10 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA92 4C085 /CC33 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA02 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	杉村健二 池田 浩		
优先权	61/481457 2011-05-02 US		
其他公开文献	JP6158171B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

使用贝叶斯系统发育树分析，祖先序列重建和协方差分析的创造性方法提供合成的代表性HCV亚型，包括1a和1b基因组，称为Bole1a和Bole1b。Bole1a分布在其设计中使用的390个全基因组序列中，精心策划的143序列全基因组数据集，以及独立的基因组区域，包括来自巴尔的摩队列的独立214个E1E2序列。Bole1a在系统发育上代表广泛流行的菌株。全基因组非同义多样性比较和9-mer肽覆盖分析表明，Bole1a能够提供比数据集中任何其他序列更多的覆盖率（分别为94%和78%），包括传统参考序列H77。与所有已知的T细胞表位相比，Bole1a还提供无与伦比的表位覆盖。

