

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480027443.4

[51] Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月1日

[11] 公开号 CN 1856503A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/12 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2004.9.22

[21] 申请号 200480027443.4

[30] 优先权

[32] 2003.9.22 [33] JP [31] 330258/2003

[86] 国际申请 PCT/JP2004/014312 2004.9.22

[87] 国际公布 WO2005/028503 日 2005.3.31

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.22

[71] 申请人 株式会社绿多肽

地址 日本福冈县

[72] 发明人 伊东恭悟 山田亮 佐田通夫

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 杨宏军

权利要求书 2 页 说明书 32 页 序列表 12 页
附图 32 页

[54] 发明名称

来源于 C 型肝炎病毒的肽

[57] 摘要

本发明涉及一种来源于 C 型肝炎病毒的肽，其特征为序列中含有 HLA 结合基序 (binding - motif)，且由从 C 型肝炎病毒 (HCV) 患者体内检测出的抗体来识别。本发明的肽可用于 C 型肝炎病毒的诊断及 C 型肝炎的治疗、及预后的预测。

1.一种来源于C型肝炎病毒的肽，其特征为，序列中含有HLA结合基序，且被从C型肝炎病毒患者中检测出的抗体识别。

2.如权利要求1所述的来源于C型肝炎病毒的肽，其特征为，该肽具有序列号1~8、16、20及38中任一种表示的氨基酸序列。

3.如权利要求1或2所述的来源于C型肝炎病毒的肽，其特征为，该肽具有与序列号1~8、16、20及38中的任一种氨基酸序列具有至少70%同源性的氨基酸序列。

4.如权利要求1至3中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽，其特征为，该肽还具有利用HLA-A2或HLA-A24限制性细胞伤害性T细胞的识别性。

5.一种多肽，其特征为含有如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽。

6.一种多肽，其特征为，该多肽具有与权利要求5所述的多肽的氨基酸序列具有至少70%同源性的氨基酸序列。

7.如权利要求5或6所述的多肽，其特征为，该多肽还具有利用HLA-A2或HLA-A24限制性细胞伤害性T细胞的识别性。

8.一种核苷酸，其特征为，该核苷酸编码如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、或如权利要求5至7中任一项所述的多肽、或具有与这些肽互补的序列。

9.一种抗体或类似抗体活性物质，其特征为识别如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、或如权利要求5至7中任一项所述的多肽。

10.一种载体，其特征为含有如权利要求8所述的核苷酸。

11.一种细胞伤害性T细胞的诱导方法，其特征为使用如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒来的肽、或如权利要求5至7中任一项所述的多肽诱导出细胞伤害性T细胞。

12.一种肝炎病毒的检测方法，其特征为使用如权利要求1至4中

任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、如权利要求5至7中任一项所述的多肽、如权利要求8所述的核苷酸、或如权利要求9所述的抗体或类似抗体活性物质。

13.一种C型肝炎病毒感染症的诊断方法，其特征为使用如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、如权利要求5至7中任一项所述的多肽、如权利要求8所述的核苷酸、或如权利要求9所述的抗体或类似抗体活性物质。

14.一种C型肝炎病毒感染症的预防或治疗方法，其特征为使用如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、如权利要求5至7中任一项所述的多肽、如权利要求8所述的核苷酸、或如权利要求9所述的抗体或类似抗体活性物质。

15.一种药物组合物，其特征为含有如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、如权利要求5至7中任一项所述的多肽、如权利要求8所述的核苷酸、或如权利要求9所述的抗体或类似抗体活性物质作为有效成分。

16.如权利要求15所述的药物组合物，其特征为，药物组合物为C型肝炎病毒疫苗。

17.一种C型肝炎病毒感染症的预后预测方法，其特征为使用如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、如权利要求5至7中任一项所述的多肽、如权利要求8所述的核苷酸、或如权利要求9所述的抗体或类似抗体活性物质。

18.一种诊断C型肝炎病毒感染症或预测预后的试剂盒，其特征为含有如权利要求1至4中任一项所述的来源于C型肝炎病毒的肽、如权利要求5至7中任一项所述的多肽、如权利要求8所述的核苷酸、或如权利要求9所述的抗体或类似抗体活性物质。

来源于C型肝炎病毒的肽

技术领域

本发明涉及可用于C型肝炎病毒感染的诊断及C型肝炎的治疗的C型肝炎病毒（HCV）肽。

更详细地说，本发明涉及HCV肽、含有HCV肽的多肽、编码HCV肽或前述多肽的核苷酸、或识别上述物质的抗体或类似抗体活性物质、含有前述核苷酸的载体、使用HCV肽或前述多肽诱导细胞伤害性T细胞的方法、或使用HCV肽、前述多肽、前述核苷酸或前述抗体·类似抗体活性物质的C型肝炎病毒检测方法、C型肝炎的诊断、预防或治疗方法、及预后的预测方法，以及含有上述物质的C型肝炎治疗用药物组合物。

背景技术

病毒性肝炎主要为病毒经口感染的A型肝炎与通过血液感染的B型肝炎，除此以外，也有主要通过输血等感染的C型肝炎等。该C型肝炎是慢性化后转移为肝硬化或肝癌的机率非常高的疾病之一。

C型肝炎病毒（HCV）是属于黄病毒科的单链RNA病毒，日本有200万人以上、世界中有1亿7000万人为C型肝炎病毒感染者。

对该C型肝炎实施干扰素与利巴韦林（Ribavirin）并用治疗方法，但仅对3~4成的患者有效，对于大多数患者而言目前并无有效的治疗方法。因此，尽快开发出安全有效且简单的低成本诊断、及治疗方法成为强烈的社会需求。

有证据显示（WO89/04669）细胞性及体液性免疫应答两者在抑制HCV感染方面发挥主要作用。在过去的十多年间，众多研究发现高免疫原性的HCV肽，发现多种可诱导细胞性或体液性免疫应答的HCV肽（Hunziker et al., Mol Immunol. 2001 Dec; 38(6):475-84）。然而，

这些肽并非都具有临床效果，实际上 无论为预防还是为治疗，至今仍然皆没有有效的免疫治疗手段。认为主要原因在于上述肽的免疫原性较弱。

另外，本发明人等已提出数个由细胞伤害性T淋巴细胞（CTL）识别出的抗原肽具有在活体内或活体外皆可导出细胞性免疫应答及体液性免疫应答双方的能力（Gohara et al., J Immunother. 2002 Sep-Oct; 25(5):439-44, Mine et al., Clin Cancer Res. 2001 Dec; 7(12):3950-62, Tanaka et al., J Immunother. 2003 Jul-Aug; 26(4):357-66, Mine et al., Cancer Sci. 2003 Jun; 94(6):548-56）。

而且，由细胞性及体液性免疫应答两者识别的HCV肽具有高于仅由细胞性免疫应答识别的肽的免疫原性。

作为顺应社会需求的新对策之一，因已累积可诱导细胞性免疫应答及体液性免疫应答两者的HCV肽与仅具有体液性免疫应答的肽相比，具有更高的免疫原性一连串认知，所以可举出特别指定上述肽的对策。

在确认上述肽的同时，调查其是否可作为抑制HCV感染的新型治疗方法及诊断手段的候补物质是有益的。

因此，本发明人等针对与被HLA-A2及HLA-A24限制性细胞伤害性T淋巴细胞（CTL）识别的肽具有反应性的IgG是否可从HCV感染者的血清中检测出进行调查，结果发现对几个CTL表位具有特异性的IgG与不同的HLA class I型或不同的HCV基因型无关，可由大多数HCV感染患者中检出。并且，由该结果得知，上述肽可提供以肽为基础的预防及治疗用新型方法，从而完成本发明。

因此，本发明的目的为提供一种HCV肽，其特征为，该HCV肽由细胞性免疫应答及体液性免疫应答识别、且具有高免疫原性。

发明内容

为了解决上述课题，本发明提供一种来源于C型肝炎病毒的肽，其特征为序列中含有HLA结合基序（binding-motif），且由C型肝炎病

毒患者的血中抗体来识别。

本发明的优选方案为提供一种具有序列列表的序列号 1~8、16、20 及 38 中任一种表示的氨基酸序列的来源于C型肝炎病毒的肽、具有与该肽的氨基酸序列具有至少 70% 同源性的氨基酸序列的来源于C型肝炎病毒的肽、及还具有由HLA-A2 或HLA-A24 限制性细胞伤害性T细胞产生的识别性的来源于C型肝炎病毒的肽。

本发明的其它方案为提供含有该来源于C型肝炎病毒的肽的多肽。作为该方案发明的优选方案，提供一种具有与该多肽的氨基酸序列具有至少 70% 同源性的氨基酸序列的多肽、及还具有由HLA-A2 或HLA-A24 限制性细胞伤害性T细胞产生的识别性的多肽。

另外，本发明的另一方案为提供一种核苷酸，其为编码该来源于C型肝炎病毒的肽、或该多肽的核苷酸。

本发明的另一方案为提供一种抗体或类似抗体活性物质，其可以免疫学的方式识别该来源于C型肝炎病毒的肽、或该多肽。

作为本发明的另一方案，提供一种含有上述核苷酸的载体。

另外，本发明的另一方案为提供一种细胞伤害性T细胞的诱导方法，其特征为使用编码该来源于C型肝炎病毒的肽、或该多肽的该核苷酸来诱导细胞伤害性T细胞。

作为本发明的另一方案，提供一种C型肝炎病毒的检测方法，其使用该来源于C型肝炎病毒的肽、多肽、核苷酸、或抗体、或类似抗体活性物质。

另外，作为本发明的另一方案，提供一种C型肝炎等HCV感染相关疾病的诊断方法，其使用上述来源于C型肝炎病毒的肽、多肽、核苷酸、或抗体、或类似抗体活性物质。

而且，另一方案为提供一种C型肝炎等HCV感染相关疾病的治疗方法，其使用上述来源于C型肝炎病毒的肽、多肽、核苷酸、或抗体、或类似抗体活性物质。

本发明的另一方案为提供一种药物组合物，其含有上述来源于C型肝炎病毒的肽、多肽、核苷酸、或抗体、或类似抗体活性物质作为

有效成分。另外，作为优选方案，提供一种药物组合物，该药物组合物为C型肝炎病毒疫苗。

作为本发明的另一方案，提供一种C型肝炎等HCV感染相关疾病的预后预测方法，其使用上述来源于C型肝炎病毒的肽、多肽、核苷酸、或抗体、或类似抗体活性物质。

本发明的另一方案为提供一种诊断C型肝炎或预后预测的试剂盒，其含有上述来源于C型肝炎病毒的肽、多肽、核苷酸、或抗体、或类似抗体活性物质。

附图说明

图 1 是表示本发明中以ELISA法得到的HCV感染患者血中的IgG测定结果的图。

图 2 是表示本发明中以ELISA法得到的HCV感染患者血中的IgG测定结果的图。

图 3 是表示本发明中在图 1 所示患者血清中的C-35 肽反应性抗体的代表例的吸收·溶出实验结果的图。

图 4 是表示本发明中的 6 种来自HCV的HLA-A24 结合肽 (No.3、12、13、25、32、38) 的CTL诱导结果的图。

图 5 是表示本发明中的来自HCV的HLA-A2 结合性肽 (No.40 至 No.57) 的CTL诱导结果的图。

图 6 是表示本发明中由 ^{51}Cr 游离试验得到的肽刺激PBMC的细胞伤害活性的代表性结果的图。

图 7 是表示本发明中由 ^{51}Cr 游离试验得到的肽刺激PBMC的细胞伤害活性的代表性结果的图。

图 8 是表示本发明中由使用抗CD8单克隆抗体的抑制试验确认肽刺激PBMC的细胞伤害性的HLA class I限制性的图。

图 9 是表示HCV感染患者血清中抗肽IgG的检测图。

图 10 是表示HCV感染患者血清中抗肽IgG的检测图。

图 11 是表示对HCV感染患者血清中的抗肽IgG的特异性进行调查

的吸附试验结果的图。

图 12 是表示对HCV感染患者血清中的抗肽IgG的特异性进行调查的溶出试验结果的图。

图 13 是表示由肽刺激PBMC导致IFN- γ 产生的图。

图 14 是表示由肽刺激PBMC导致IFN- γ 产生的图。

图 15 是表示肽刺激PBMC的细胞伤害性的图。

图 16 是表示肽刺激PBMC的细胞伤害性的图。

图 17 是表示对表达NS5A的细胞的肽刺激PBMC的CTL活性的图。

图 18 是表示对表达NS5A的细胞的肽刺激PBMC的CTL活性的图。

图 19 是表示对表达NS5A的细胞的肽刺激PBMC的CTL活性的图。

图 20 是表示抗NS5A-2132IgG活性的特异性的图。

图 21 是表示由抗NS5A-2132IgG导致的细胞增殖阻碍分析结果的图。

图 22 是表示抗NS5A-2132IgG的ADCC活性分析结果的图。

图 23 是表示各种疾病的抗C-35 抗体及抗NS5A-2132 抗体的检测图。

图 24 是表示抗肽抗体的HLA或HCV基因型限制性的图。

图 25 是表示抗肽抗体的HLA或HCV基因型限制性的图。

图 26 是表示患者血清中抗NS5A-2132 抗体的测定结果的图。

图 27 是表示患者血清中抗NS5A-2132IgG的测定结果的图。

图 28 是表示患者血清中抗NS5A抗体的水平及HCV RNA水平的图。

图 29 是表示世代研究 (Cohort Study) 的抗C-35 抗体及抗NS5A-2132 抗体的检测图。

图 30 是表示世代研究 (Cohort Study) 的抗NS5A-2132 抗体的检测图。

图 31 是表示本发明中, 由Luminex法得到的HCV感染患者血中IgG测定结果的图。

图 32 是表示本发明中由Luminex法得到的HCV感染患者血中IgG

测定结果的图。

图 33 是表示使用本发明的肽的C型肝炎治疗过程的图。

图34是表示使用本发明的肽的C型肝炎治疗过程的图。

具体实施方式

本发明所述来源于C型肝炎病毒的肽是含有HLA结合基序(binding-motif)、且可由C型肝炎病毒患者的血中抗体识别出的HCV肽。

另外, 本发明的HCV肽在其序列中含有HLA结合基序, 即, HLA-A2 或HLA-A24 结合基序。且该HCV肽由细胞性免疫应答及体液性免疫应答识别, 同时, 显示较高的免疫原性。

作为上述HCV肽, 例如可包含下述表 1 及表 3 所举出的肽。本发明中特别优选的HCV肽之一为包含具有以下氨基酸序列的HLA-A2 结合性基序的肽:

C-35: YLLPRRGPRL (序列号 1)

对于HCV感染者而言, 对该肽的肽反应性IgG抗体的检测率及HCV感染症特异性分别为 93% 与 100%, 非常高。另外, 本发明中特别优选的其它HCV肽为包含具有以下氨基酸序列的HLA-A24 结合性基序的肽:

NS5A-2132: RYAPACKPL (序列号 2)

E2-488: HYAPRPCGI (序列号 3)

E1-213: VYEAADMIM (序列号 4)

NS3-1081: VYHGAGSKTL (序列号 5)

C-176: IFLLALLSCL (序列号 6)

C-173: SFSIFLLALL (序列号 7)

EYVLLLFLL (序列号 8)

PYIEQGMQL (序列号 16)

IFTITKILL (序列号 20)

SFAIKWEYVL (序列号 38)

特别是NS5A-2132, 对于多数HLA-A24 阳性患者而言, 可诱导细胞性免疫及体液性免疫两者。

本发明的HCV肽也可为与该肽的氨基酸序列具有至少 70%、优选为 80% 或 80% 以上、更优选为 90% 或 90% 以上同源性的肽。

另外, 本发明的HCV肽也可以进一步含有由HLA-A2 或HLA-A24 限制性细胞伤害性T细胞 (CTL) 识别的肽。由在细胞内制造的抗原蛋白质在细胞内分解出的肽构成的、可与该HLA结合的抗原肽中, 每个HLA型均在该序列内存在基序 (motif), 细胞伤害性T细胞 (CTL) 可识别该抗原肽与HLA的复合体来破坏HCV感染细胞。

本发明的多肽在该氨基酸序列中含有上述本发明的肽的氨基酸序列, 该氨基酸的总数并无特别限定。另外, 在本发明的多肽中, 超过构成该肽的氨基酸的其余氨基酸位于该肽的氨基酸N-末端及/或C-末端侧、或上述两侧。因此, 该多肽具有与上述肽的功能及作用实质相同的功能及作用。需要说明的是, 本说明书中, 即使仅记载“肽”时, 只要无特别否定时, 均应当理解为包含“多肽”。

具有如上所述地定义的氨基酸序列的肽可使用下述方法得到: 一般的化学合成法, 蛋白质分子酶分解法, 使用进行了转化、使编码目标氨基酸序列的碱基序列表达的宿主的基因重组技术等。

采用化学合成法制造作为目标的该肽时, 可依据一般的肽化学中公知的惯用方法进行制造, 例如使用肽合成机由固相合成法合成。如此得到的粗肽可由蛋白质化学中一般使用的纯化方法、例如盐析法、极限过滤法、逆相色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法等而纯化。

另一方面, 以基因重组技术生产所希望的该肽时, 例如可以将编码上述合成的目标氨基酸序列的DNA片段插入适当的表达载体中, 使用该表达载体对微生物或动物细胞实施转化, 培养得到的转化体, 从而得到所希望的该肽。作为可使用的表达载体, 可使用该技术领域内公知的质粒、病毒载体等。

作为该肽生产技术中使用表达载体的宿主细胞转化方法, 可使用公知方法, 例如氯化钙法、磷酸钙共沉淀法、DEAE葡聚糖法、脂质

转染 (Lipofectin) 法、电穿孔法 (electroporation) 等, 可依据所使用的宿主细胞进行适当选择。得到的肽的纯化可采用上述纯化法对从培养后的培养液中回收的细胞提取液或培养上清液进行纯化。

作为该发明的其它方案之一的核苷酸, 包括含有上述来源于C型肝炎病毒的肽或上述多肽的寡核苷酸或聚核苷酸, 包括核糖核苷酸或去氧核苷酸。另外, 该核苷酸也可以利用本领域的已知方法进行改变。该核苷酸的改变例如包含公知的标记、甲基化、“caps”、由类似物取代1个或1个以上天然核苷酸、核苷酸内改变等。核苷酸内改变可举出例如非离子性改变(例如, 甲基磷酸、磷酸三酯、磷酰胺酯等)、离子性改变(例如, 硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、例如蛋白质(例如, 核酸水解酶、毒素、抗体、信号肽等)的修饰部分的改变, 利用螯合剂(例如金属、硼等)的改变等。

上述核苷酸序列可提供一种被编码在HCV的基因组中的HCV抗原的肽及多肽序列, 另外, 可以提供用作诊断试验或疫苗成分的有用的肽。

一旦获得本发明的核苷酸, 就可构筑核苷酸探针及肽, 上述核苷酸探针及肽在诊断HCV感染相关疾病方面, 或筛选血液或血液制剂中的HCV感染方面是有用的。由该核苷酸序列可合成例如24至30个核苷酸或更长的DNA寡聚物。该核苷酸还可作为用于检测受试者血清中的HCV RNA、或用于筛选血液或血液制剂中HCV存在的探针而使用。

另外, 该核苷酸序列可设计、生产出作为诊断对HCV的抗体存在的试药也有用的HCV特异性肽。且对于来自该序列的纯化肽的抗体, 也可用于检测HCV感染者及HCV感染血液制剂中的HCV抗原。

作为本发明的另一方案之一的抗体包括来自该C型肝炎病毒的肽、对该多肽具有反应性的嵌合抗体、改变抗体、单价抗体、Fab、F(ab')₂、Fab'、单链Fv(scFv)蛋白质以及单一结构域抗体。另外, 该抗体可以免疫学的方式识别该肽或该多肽。

作为本发明的另一方案之一的载体为含有该核苷酸、可以将所选

择的宿主细胞转化的构筑物，可以在该宿主中表达不同种类的编码序列。该表达载体可为克隆用载体或插入用载体任一。

作为克隆用载体例如可使用质粒、病毒（例如腺病毒质粒载体）等。另外，该克隆用载体是可转化宿主细胞、且具有在细胞内进行核苷酸复制能力的复制子（例如，质粒、染色体、病毒、粘粒等）。

另一方面，插入用载体虽在宿主细胞中不发挥复制子的作用，但其是为了稳定地转化宿主而具有将驻留物插入宿主中的复制子（典型例为染色体）内的能力的载体。

作为本发明的其它方案之一，包括通过使用该肽诱导以HCV细胞作为目标的细胞伤害性T细胞的诱导方法。本发明的诱导方法为，例如在表达HLA-A2的细胞中添加该肽，使其表达在HLA-A2上，以由HLA-A2表达该肽的细胞刺激T细胞后，诱导该T细胞转化为CTL。该方法中所使用的HLA-A2表达细胞可由HCV患者的血液中采集，但也可在非HLA-A2表达细胞中导入编码HLA-A2的基因而制成。因此，本发明的该肽不仅可用于HCV检测及诊断，也可作为C型肝炎病毒相关疾病的疫苗等药物组合物使用。

另外，如上所述地诱导出的CTL因以HCV感染细胞作为目标，攻击该HCV感染细胞，因此，可与该肽同样地用作细胞治疗法等药物组合物。

而且，作为本发明的其它方案的该来源于C型肝炎病毒的肽、多肽、核苷酸及/或抗体、类似抗体活性物质可用于检测、诊断HCV感染。

HCV的检测及HCV相关疾病的诊断，例如利用与编码该肽的核酸序列的相互作用及/或反应性，根据该肽存在的检测、对应核酸序列存在量的检测、在该肽的个体中活体分布的确定/或来自个体的检体中存在量的确定来进行。换言之，可通过将该肽作为标记物进行检定来进行HCV的检测及HCV相关疾病的诊断。另外，该测定可使用公知的测定方法进行，作为这种测定方法，例如可举出利用抗原抗体反应系统、酶反应系统、PCR反应系统等的方法。

HCV相关疾病的治疗效果的确认及预后的预测可通过监测罹患HCV相关疾病的受试者体内具有对该肽的反应性的抗体的血中浓度来进行。特优选测定出受试者血中的抗C-35IgG或抗NS5A-2132IgG的水平。

作为本发明的另一方案的药物组合物例如可举出疫苗。疫苗由来源于C型肝炎病毒的肽、多肽及/或核苷酸组成，适当含有医学上可接受的助剂及/或载体。作为助剂可使用可强化免疫应答的助剂，例如freund的不完全助剂、氢氧化铝胶等。另外，作为载体例如可使用PBS、蒸馏水等稀释剂、生理盐水等。

本发明的药物组合物可根据其使用方式，例如通过口服、静脉给药或皮下给药等非口服或经皮途径进行给药。作为其剂型例如可举出片剂、颗粒剂、软胶囊剂、硬胶囊剂、液剂、油剂、乳化剂等。该药物组合物的给药量，可依据给药患者的症状等适当改变，一般而言成人每日给药量以该肽量计可以为0.1~10mg，给药间隔可以为数日或数月一次。

本说明书中所引用的所有专利及参考文献内容皆为本说明书的一部分。另外，作为本案所要求的优先权的基础的日本专利申请2003-330258号说明书及附图的内容皆引用作为本案说明书的一部分。

实施例

由实施例更详细地说明本发明。但这些实施例仅为更具体说明本发明所举例，本发明并不限定于以下的实施例。

需要说明的是，以下实施例所使用的氨基酸的简称如下。

A为丙氨酸、C为胱氨酸、D为天门冬氨酸、E为谷氨酸、F为苯丙氨酸、G为甘氨酸、H为组氨酸、I为异亮氨酸、K为赖氨酸、L为亮氨酸、M为蛋氨酸、P为脯氨酸、R为精氨酸、S为丝氨酸、T为苏氨酸、V为缬氨酸、Y表示酪氨酸。

实施例 1: 与HCV感染者血清中的HCV肽具有反应性的IgG的检测

肽

使用具有来自HCV基因型 1b蛋白质的保存区域的HLA-A2结合性基序或HLA-A24结合性基序的合成肽(如表1)。作为阴性对照组使用具有HLA-A2结合性基序的来自HIV的肽。上述肽均使用市售品,其纯度由逆相高压液相色谱法进行分析的结果为90%或90%以上。

表 1

No	肽名	改变名	区域	序列	序列号	HCV患者 (n=12)		健康人 (n=10)	
						阳性		阳性	
						人数	%	人数	%
3	1bA24-2132	NS5A-2132	NS5A	RYAPACKPL	2	12	100	1	10
4	1bA24-717	E2-717	E2	EYVLLLFLL	8	2	17	0	0
5	1bA24-1100	NS3-1100	NS3	MYTNVDQDL	9	0	0	0	0
6	1bA24-1773	NS4A-1773	NS4A	QYLAGLSTL	10	0	0	0	0
7	1bA24-790	E2-790	E2	LYGVWPLLL	11	0	0	0	0
8	1bA24-1031	NS3-1031	NS3	AYSQQRGL	12	0	0	0	0
9	1bA24-834	NS2-834	NS2	HYKLFARL	13	0	0	0	0
10	1bA24-1292	NS3-1292	NS3	TYATYKFL	14	1	8	0	0
11	1bA24-1266	NS3-1266	NS3	AYMSKAHGI	15	6	50	0	0
12	1bA24-488	E2-488	E2	HYAPRPCGI	3	9	75	0	0
13	1bA24-213	E1-213	E1	VYEAADMIM	4	6	50	0	0
14	1bA24-1716	NS4B-1716	NS4B	PYIEQGMQL	16	1	8	0	0
15	1bA24-1767	NS4B-1767	NS4B	NFISGIQYL	17	0	0	0	0
16	1bA24-910	NS2-910	NS2	PYFVRAHGL	18	0	0	0	0
17	1bA24-1727	NS4A-1727	NS4A	QFKQKAIGL	19	3	25	0	0
18	1bA24-885	NS2-885	NS2	IFTITKILL	20	5	42	0	0
19	1bA24-135	C-135	C	GYPIVGAPL	21	1	8	0	0
20	1bA24-631	E2-631	E2	MYVGGVEHRL	22	0	0	0	0
21	1bA24-932	NS2-932	NS2	HYVQMALMKL	23	5	42	0	0
22	1bA24-947	NS2-947	NS2	TYVYDHLTPL	24	7	58	0	0
23	1bA24-1854	NS4B-1854	NS4B	GYGAGVAGAL	25	2	17	0	0
24	1bA24-1243	NS3-1243	NS3	AYAAQGYKVL	26	2	17	0	0
25	1bA24-1081	NS3-1081	NS3	VYHGAGSKTL	5	6	50	0	0
26	1bA24-787	E2-787	E2	AYALYGVWPL	27	2	17	0	0
27	1bA24-617	E2-617	E2	HYPCTVNFTI	28	4	33	0	0
28	1bA24-1417	NS3-1417	NS3	YYRGLDVSVI	29	2	17	0	0
29	1bA24-2146	NS5A-2146	NS5A	TFLVGLNQYL	30	2	17	0	0
30	1bA24-822	NS2-822	NS2	VFVGLLTL	31	4	33	0	0
31	1bA24-1556	NS3-1556	NS3	EFWESVFTGL	32	0	0	0	0
32	1bA24-176	C-176	C	IFLLALLSCL	6	7	58	0	0
33	1bA24-837	NS2-837	NS2	LFLARLIWWL	33	0	0	0	0
34	1bA24-848	NS2-848	NS2	YFITRAEAHL	34	1	8	1	10
35	1bA24-1792	NS4B-1792	NS4B	AFTASITSPL	35	0	0	0	0
36	1bA24-1990	NS5A-1990	NS5A	DFKTWLQSKL	36	1	8	0	0
37	1bA24-2121	NS5A-2121	NS5A	FFTEVDGVRL	37	1	8	0	0

38	1bA24-173	C-173	C	SFSIFLLALL	7	7	58	0	0
39	1bA24-711	E2-711	E2	SFAIKWEYVL	38	1	8	0	0
40	1bA2-35	C-35	C	YLLPRRGPRL	1	12	100	0	0
41	1bA2-132	C-132	C	DLMGYIPLV	39	0	0	0	0
42	1bA2-178	C-178	C	LLALLSCLTV	40	1	8	0	0
43	1bA2-220	E1-220	E1	ILHTPGCV	41	3	25	0	0
44	1bA2-363	E2-363	E2	SMVGNWAKV	42	0	0	0	0
45	1bA2-401	E2-401	(HVR)	SLLAPGAKQNV	43	0	0	3	30
46	1bA2-1073	NS3-1073	NS3	CINGVCWTV	44	0	0	0	0
47	1bA2-1169	NS3-1169	NS3	LLCPAGHAV	45	1	8	2	20
48	1bA2-1287	NS3-1287	NS3	KLVALGINAV	46	1	8	0	0
49	1bA2-1406	NS3-1406	NS3	TGAPVTYSTY	47	1	8	0	0
50	1bA2-1789	NS4B-1789	NS4B	SLMAFTAAV	48	0	0	0	0
51	1bA2-1807	NS4B-1807	NS4B	LLFNILGGWV	49	0	0	0	0
52	1bA2-1851	NS4B-1851	NS4B	ILAGYGAGV	50	0	0	1	10
53	1bA2-2252	NS5A-2252	NS5A	ILDSFDPLV	51		0	0	0
54	1bA2-2692	NS5B-2692	NS5B	RLIVFPDLGV	52	1	8	0	0
55	1bA2-2727	NS5B-2727	NS5B	GLQDCTMLV	53	2	17	1	10
56	1bA2-150	C-150	C	ALAHGVRAL	54	0	0	1	10
57	1bA2-168	C-168	C	NLPGCSFSI	55	0	0	1	10
60	1bA24-2422	NS5B-2422	NS5B	SYTWTGALI	56	0	0	0	0
61	1bA24-2482	NS5B-2482	NS5B	HYRDVLKEM	57	3	25	1	10
62	1bA24-2990	NS5B-2990	NS5B	WFMWCLLLL	58	7	58	0	0
63	1bA24-789	E2-789	E2	AFYGVWPLL	59	0	0	0	0
64	1bA24-1727	NS4B-1727	NS4B	QFKQKALGL	60	1	8	0	0
65	1bA24-2613	NS5B-2613	NS5B	QYSPGQRVEF	61	0	0	0	0
66	1bA24-1727	NS4B-1727	NS4B	QFKQKALGLL	62	3	25	0	0

切断值为 1.83。

表 2

	No.	40
		阳性率
HCV感染症相关疾病	60	56(93.3%)
B型肝炎病毒感染者	24	0(0%)
B型肝炎病毒疫苗接种者	10	0(0%)
健康人	27	0(0%)
自身免疫疾病患者	22	0(0%)
HTLV-1 感染者	10	8(80%)
HIV感染者	3	3(100%)
总数	156	67
		C-35
感受性		93.3%
感受性		88.5%
OD率		
		P<0.001

检测率按切断值为阳性的患者的数目计算 (平均 $\pm 3SD$)。

NS5A-2132 为 0.202, C-35 为 0.13。

统计解析以 χ^2 试验进行。

ELISA

血清中的肽特异性IgG由ELISA测定。首先将各肽溶解于二甲基亚砜(DMSO)，于-80℃保存。将肽用含有作为交联剂的二琥珀酰亚胺基辛二酸酯(DSS)的0.1M碳酸钠/碳酸氢钠溶液稀释。在ELISA平板中，使肽按20 μg/孔在4℃下反应一夜而结合。孔以0.05% Tween20-PBS(PBST)清洗3次，平板以Block-Ace(注册商标)密封，于4℃下放置一晚。将血浆或血清样品用0.05%的Tween20-Block Ace分别稀释100、200及400倍，每孔添加100 μl所得的各样品。样品于37℃下培养2小时后，将平板用PBST清洗9次，每孔添加100 μl稀释1000倍的兔子抗人类IgG(γ链特异性)，并于37℃下培养2小时。再以PBST清洗9次后，每孔添加100 μl稀释100倍的与老鼠抗兔子IgG共价键合的西洋芥末过氧化酶·葡聚糖聚合物，将平板于室温下培养40分钟。清洗平板后，每孔添加100 μl四甲基联苯胺基质溶液，添加2.0M磷酸使反应停止。切断值由健康者的光密度对照组的平均±3SD算出。

肽特异性IgG的吸收及溶出

将每孔100 μl的血浆或血清样品以0.05% Tween20-Block Ace(注册商标)稀释，使固定在平板的孔中的肽(每孔20 μg)于37℃下吸收2小时。此操作重复3次后，利用ELISA测定上清液中的肽特异性IgG水平。将在初次吸附中结合于肽固定平板上的抗体用各孔为30 μl的5M NaCl/50mM柠檬酸缓冲液(pH3.0)(以1.0M Tris-HCl的0.05% Tween20-Block Ace(pH7.5)进行中和)进行溶出，利用ELISA测定溶出的部分的肽特异性IgG水平。

肽特异性CTL测定

肽特异性CTL的检测中采用的方法可使用本领域的惯用方法。将

PBMC添加至U底型 96 孔微量培养平板的各孔中，直至每孔含 1×10^5 个细胞，与 $10 \mu\text{M}$ 的肽同时于 $200 \mu\text{l}$ 的培养基中进行培养。该培养基的组成为 45% RPMI-1640、45% AIM-V（注册商标）、10% 牛胎血清（FCS）、 100U/ml 的干扰素 2（IL-2）、与 1mM MEM非必须氨基酸溶液。培养第 3 天、第 6 天、第 9 天时各除去一半培养基，换上含有所对应的肽（ $20 \mu\text{g/ml}$ ）的新培养基。培养第 12 天采集培养后的细胞，进行对应的肽或作为阴性对照组的HIV肽中任一种产生对预先附着的CIR-A2402 细胞或T2 发生应答的干扰素 γ （IFN- γ ）的能力的试验。对于各肽，使用 4 个孔，进行 2 次测试。所得的值减去对HIV肽发生应答的本底IFN- γ 的产生。对于抑制测试，肽反应性CTL使用CD8 分离试剂盒进行纯化，该肽特异性IFN- γ 的产生在 $20 \mu\text{g/ml}$ 的抗HLA class I（W6/32, IgG2a）单克隆抗体、抗CD8（Nu-Ts/c, IgG2a）单克隆抗体或抗HLA class II（H-DR-1, IgG2a）单克隆抗体中的任一种的存在下进行测定。从所得的值中减去本底IFN- γ 的产生。

统计

其值以平均值 \pm SD表示。统计分析使用Mann-Whitney U检定或标准试验来进行。 $p < 0.05$ 的值有统计学意义。

对HCV肽的抗体检测

对于 12 名HCV感染患者与 10 名健康者（HD）的血清，测定其对 62 种肽产生反应的IgG水平（表 1）。对各肽的抗体阳性率如表 1 所示。其结果发现多个与HCV感染者的血中IgG进行高比率反应、且几乎不与健康人血清反应的肽。

例如，No3 的NS5A-2132（相当于HCV的NS5A蛋白质的第 2132 号至第 2140 号，以下相同故省略）、No11（NS3-1266）、No12（E2-488）、No13（E1-213）、No22（NS2-947）、No25（NS3-1081）、No32（C-176）、No38（C-173）、No40（C-35）、No62（NS5B-2990）等。由代表性的ELISA法所得的HCV感染患者的血中IgG测定结果如图 1 及图 2 所

示。

图 1 所示的患者血清中检测出对 C-35 的 IgG 抗体。

图 2 的 (A) - (D) 所示的 4 名患者血清中分别检测出 NS5A-2132 (A)、NS3-1081 (B)、E2-488 及 E1-213 (C)、C-176 及 C-173 (D) 反应性 IgG 抗体。这些肽反应性抗体的肽特异性可由吸收及溶出试验加以确认。

以图 1 所示的患者血清中的 C-35 肽反应性抗体的吸收·溶出实验结果作为代表例示于图 3。该抗体虽被 C-35 吸收,但未被作为无关系的肽的 NS5A-2252 吸收(图 3 上段)。而且该抗体由 C-35 吸收部分溶出(图 3 下段)。

表 1 中 C-35 肽反应性抗体于 HCV 感染者中为 100%, 而健康人中为 0%, 显示高 HCV 特异性。HCV 的 C-35 肽的序列与各种病毒, 例如 HIV-1 的 tet 蛋白质(第 54 至第 58 号的氨基酸序列)或 env 蛋白质(5-9、158-162、717-727 的氨基酸序列)显示部分同源性。另外, HTLV-1 的各种蛋白质(pol 724-755、rex 5-9、rex 310-313、tax 70-74 等)皆显示同源性。针对 HCV 感染症相关疾病 60 例(慢性 C 型肝炎 22 例、肝硬化 20 例、肝癌 18 例)、B 型肝炎病毒感染者 24 例、B 型肝炎病毒疫苗接种者 10 例、健康人 27 例、自身免疫疾病患者 22 例、HTLV-I 感染者 10 例、及 HIV 感染者 3 例、共计 156 例进行双盲检定调查 C-35 肽反应性抗体。其结果如表 2 所示。由该结果得知, C-35 肽反应性抗体的 HCV 特异性及检测率分别为 88.5% 及 93.3%。

肽特异性 CTL 活性的诱发

将 6 种 HLA-A24 结合肽 (No3、12、13、25、32、38) 及 18 种 HLA-A2 结合肽(由 No40 至 No57)与 HLA-A24 或 HLA-A2 阳性的 HCV 感染者各 5 名的末梢血单核细胞 (PBMC) 进行培养。作为对照组, 将该 PBMC 与 HIV 肽进行培养。对上述培养 PBMC, 调查对脉冲对应的肽的 C1R-A2402 细胞或 T2 细胞发生应答的 IFN- γ 产生能力。其结果为 6 种 HLA-A24 结合肽 (No3、12、13、25、32、38) 可由 10 名 HLA-A24

阳性HCV患者的PBMC诱导出CTL（图4）。另外，来自由HLA-A24结合性肽产生的（B）HCV的HLA-A2结合性肽（No40至No57）可由5名HLA-A2阳性HCV患者的PBMC诱导出CTL（图5）。

而且，由肽刺激PBMC的细胞伤害活性可采用 ^{51}Cr 游离试验加以确认。其代表性结果如图6及图7所示。

图6表示由来自HCV的HLA-A24结合性肽（No3、12、13、25、32、38）从HLA-A24阳性HCV患者PBMC诱导的CTL的细胞伤害活性。对附着诱导肽的C1R-A2402细胞（图中以C1RA2402表示）的细胞伤害作用，与作为对照组的附着HIV肽的C1R-A2402细胞（图中以C1RA2402HIV表示）相比显著高。

图7表示由来自HCV的HLA-A2结合性肽（No40、41）从HLA-A2阳性HCV患者末梢血PBMC诱导的CTL的细胞伤害活性。对附着诱导肽的T2细胞（图中以T2表示）的细胞伤害作用，与对照组的附着HIV肽的T2细胞（图中以T2HIV表示）相比为显著高。

由结果得知，这些PBMC对预先填装了对应肽（作为阴性对照组的HIV肽除外）的C1R-A2402及T2细胞显示有意差水平的细胞伤害性。

该细胞伤害性的HLA class I限制性使用抗CD8单克隆抗体的抑制试验来确认（图8）。图8表示利用CTL活性的抗CD8抗体进行抑制的代表例。由来源于HCV的HLA-A2结合性肽（No40）由HLA-A2阳性HCV患者PBMC诱导出的CTL细胞伤害活性可被抗CD8抗体抑制，但未被抗CD4或对照组的抗CD14抗体抑制。

实施例2: 对HLA-A24阳性HCV感染患者血清中的HCV肽具有反应性的IgG检测

受试者

在更大范围内，对HLA-A24阳性的HCV感染患者，检测对HCV肽具有反应性的IgG。60名HCV1b⁺患者采用第2代或第3代免疫测试进行判断，抗HCV抗体（Ab）为血清阳性。患者血清中的HCV的

基因型采用RT-PCR进行判定。血清取样时的患者诊断通过生化学分析、超音波检查、计算机连动断层摄影、及组织学观察来进行。诊断结果如下所示：慢性肝炎（CH, n=24）、肝硬化（LC, n=18）、及肝细胞癌（HCC, n=18）。作为阴性对照，使用有正常肝功能，无肝炎病毒病史的20名健康提供者（HD）的血清样品。

肽及肽反应性抗体的测定

使用来自HCV1b蛋白质保存良好的区域、基于与HLA-A24分子的高结合中心（Bioinformatics and Molecular Analysis Section, NIH, Bethesda, MD）选择的44种合成肽。作为阴性对照组使用具有HLA-A24结合基序的来自HIV的肽（RYLRDQQLLGI（序列号63））。结合评分及序列如表3所示。为了筛选肽对血清IgG的反应性，使用由BioSynthesis（Lewisville, TX）或SynPep（Dublin, CA）购得的上述脱盐等级（>70%）的肽。之后的实验使用经纯化的肽（>90%）。肽特异性IgG的血浆水平由酶抗体法（ELISA）测定。血浆样品的抗肽IgG的特异性试验利用肽反应性IgG的吸收及溶出来进行。

肽特异性CTL的测定

在肽特异性CTL前体细胞的检测中使用的方法如Hida等（Cancer Immunol Immunother 2002;51:219-228）所记载的内容。阻碍试验使用20 μg/ml的抗HLA class I（W6/32, IgG2a）、抗CD8（Nu-Ts/c, IgG2a）、抗CD4（Nu-Th/i, IgG1b）、及抗HLA-class II（H-DR-1, IgG）单克隆抗体。

对由NS5A基因进行了转染的细胞的肽刺激PBMC的CTL活性

NS5A、HLA-A2402及HLA-A2601的cDNA分别利用RT-PCR由Huh7（NNU50-1）细胞、C1R-A2402细胞及KE4-CTL细胞得到，在表达载体pCR3.1（Invitrogen, San Diego, CA）中进行克隆（cloning）。Huh7（NNU50-1）细胞株是来自感染HCV1b的细胞株的复制子细胞，由NS3表达NS5B的蛋白质（Kishine et al., Biochem Biophys Res

Commun 2002;293:993-999)。其次,将 100ng的NS5A、HLA-A2402或NS5A、及HLA-A2601cDNA(作为阴性对照组)混合在含有 0.6 μ l的Fugene6(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)的 100 μ l的Opti-MEM(Invitrogen)中,进行 30 分钟的培养。其次将 100 μ l的混合物添加于COS-7细胞(1×10^4 细胞)中,将其培养 6 小时。将 100 μ l含有 20% FCS的RPMI-1640培养基添加到混合物中,培养COS-7细胞 2 天,加入NS5A 2132-2140刺激PBMC(2×10^5 细胞/孔)。培养 18 小时后,取出 100 μ l的上清液,对 3 孔进行ELISA测定得到IFN- γ 浓度。为了制造出稳定的转染子细胞株,将pCR3.1-NS5A或pCR3.1-HLA-A3101(阴性对照)中的任一种使用Gene Pulser(BioRAD, Richmond, CA),在C1R-A2402细胞子,利用电穿孔法(electroporation)进行转染。将上述细胞在新霉素(G418)的存在下培养 30~40 天,回收新霉素抗性细胞。转染子中的NS5A蛋白质的表达由使用抗NS5多克隆抗体(Abcam Limited, Cambridge, UK)进行蛋白质印迹法分析。

增殖阻碍及抗体依赖性细胞性细胞伤害(ADCC)

将Huh7细胞株在平底 96 孔微量培养平板的孔中,于各种血清存在下培养 24、48 及 72 小时。培养后以细胞计数试剂盒-8(10 μ l/孔)(Dojindo, Japan)计算Huh7细胞。为了进行ADCC测定,将由HLA-A24阳性的HD新分离出的PBMC,在含有各种患者或HD(作为阴性对照)的不活化血清(56 $^{\circ}$ C, 30 分钟)的 10% FCS及RPMI-1640培养基中预培养 1.5 小时。将C1R-A2402细胞及C1R细胞(作为阴性对照)与NS5A 2132-2140肽(10 μ M)一起培养 2 小时,以Na₂⁵¹CrO₄进行 1.5 小时的放射性标记,经清洗后作为目标细胞使用。将肽刺激PBMC于 96U底微量培养平板的孔中以 40、20 及 10 比 1 的效应子与目标细胞之比(E/T),与目标细胞一同进行培养。在 37 $^{\circ}$ C培养 6 小时后,回收无细胞上清液,测定ADCC活性(Shomura, et al., Br J Cancer 2004; 90: 1563-1571)。

统计学

统计学分析使用标准t检定及Mann-Whitney U检定进行。P < 0.05 的值有统计学意义。

对HCV-肽的体液性免疫应答的检测

为了筛选对肽的体液性免疫应答，对感染HCV-1b的 12 名患者的血浆，测定对 44 种肽的各IgG反应性水平。使用 10 名HD的血浆作为阴性对照组。肽反应性IgG的水平利用ELISA测定连续稀释的血浆样品，得到各样品的吸光度（OD）。将 1: 100 的血浆稀释的上述肽的切断值作为 0.18OD { 10 名HD平均 (0.08) + 2SD (0.05 × 2) }。对 NS5A-2132、C-176、E2-488、E1-213、C-173、及NS3-1081 肽为有意义水平（1: 100 的血清稀释下 > 0.18OD）的IgG反应性在 12 名患者的血浆中分别可以检测出 12、11、10、9、8 及 5 名（图 9）。如预测所述，上述肽中的任一种对 10 名HD的血浆均不具有反应性。对肽特异性IgG的肽反应性归纳如表 3 所示。

表 3. 对HCV限制性肽及肽特异性IgG^{a)} 的反应性

编号	区域	肽	序列编号	对肽特异性 IgG 的反应性		
				结合评分 ^{b)}	患者 (n=12)	HD (n=10)
1	C 135-144	GYIPLVGAPL	21	504	1	0
2	C 173-182	SFSIFLLALL	7	24	8	0
3	C 176-185	IFLLALLSCL	6	36	11	0
4	E1 213-221	VYEAADMIM	4	37.5	9	0
5	E2 488-496	HYAPRPCGI	3	60	10	0
6	E2 617-626	HYPCTVNFTI	28	75	2	0
7	E2 631-640	MYVGGVEHRL	22	420	0	0
8	E2 711-720	SFAIKWEYVL	38	20	1	0
9	E2 717-725	EYVLLLFL	8	432	2	0
10	E2 787-796	AYALYGVWPL	27	200	2	0
11	E2 789-797	AFYGVWPLL	59	20	0	0
12	E2 790-798	LYGVWPLL	11	200	0	0
13	NS2 822-831	VFVGLILLTL	31	30	2	0
14	NS2 834-842	HYKLFLARL	13	60	0	0
15	NS2 837-846	LFLARLIWWL	33	36	0	0
16	NS2 848-856	YFITRE AHL	34	30	1	1
17	NS2 885-893	IFTITKILL	20	20	3	0
18	NS2 910-918	PYFVRAHGL	18	24	0	0
19	NS2 932-941	HYVQMALMKL	23	396	3	0
20	NS2 947-956	TYVYDHLTPL	24	300	2	0

21	NS3 1031-1039	AYSQQTRGL	12	200	0	0
22	NS3 1081-1090	VYHGAGSKTL	5	200	5	0
23	NS3 1100-1108	MYTNVDQDL	9	336	0	0
24	NS3 1243-1252	AYAAQGYKVL	26	200	2	0
25	NS3 1266-1274	AYMSKAHGI	15	75	2	0
26	NS3 1292-1300	TYSTYGKFL	14	200	1	0
27	NS3 1417-1426	YYRGLDVSVI	29	50	2	0
28	NS3 1556-1565	EFWESVFTGL	32	40.32	0	0
29	NS4B 1716-1724	PYIEQGMQL	16	36	1	0
30	NS4B 1727-1735	QFKQKAIGL	19	20	3	0
31	NS4B 1727-1735	QFKQKALGL	60	20	1	0
32	NS4B 1727-1736	QFKQKALGLL	62	20	1	0
33	NS4B 1767-1775	NFISGIQYL	17	36	0	0
34	NS4B 1773-1781	QYLAGLSTL	10	300	0	0
35	NS4B 1792-1801	AFTASITSPL	35	28	0	0
36	NS4B 1854-1863	GYGAGVAGAL	25	280	2	0
37	NS5A 1990-1999	DFKTWLQSKL	36	26.4	1	0
38	NS5A 2121-2130	FFTEVDGVRL	37	24	1	0
39	NS5A 2132-2140	RYAPACKPL	2	480	12	1
40	NS5A 2146-2156	TFLVGLNQYL	30	43.2	2	0
41	NS5B 2442-2451	SYTWTGALI	56	50	0	0
42	NS5B 2482-2491	HYRDVLKEM	57	46.2	3	1
43	NS5B 2613-2622	QYSPGQRVEF	61	132	0	0
44	NS5B 2990-2998	WFMWCLLLL	58	30	3	0

a) 12 名 HCV-1b⁺ 患者血清中肽特异性 IgG 水平利用 ELISA 进行测定。决定切断值为 0.18。

b) 对 HLA-A24 分子的肽结合评分使用 Bioinformatics and Molecular Analysis Section, NIH, Bethesda, MD (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind) 进行检索。

就具有 90% 或 90% 以上纯度的上述 6 种肽、及阴性对照肽对由 60 名 HCV1b⁺ 患者 (CH, n=24; LC, n=18; 及 HCC, n=18) 及 20 名 HD 的血清得到的各血清样品的反应性进行试验 (图 10)。

对上述各样品的 100: 1 稀释值进行制图。IgG (OD 值) 的平均值 \pm SD 如下所述: NS5A-2132 (0.48 \pm 0.36)、E2-488 (0.18 \pm 0.19)、E1-213 (0.10 \pm 0.21)、NS3-1081 (0.036 \pm 0.14)、C-176 (0.09 \pm 0.14) 及 C-173 (0.04 \pm 0.13)。* 表示 Mann-Whitney U 检定得到的 P < 0.05。对 NS5A-2132、E2-488、E1-213、或 C-173 具有反应性的 IgG 的平均水平比 HD 高, 且有统计学意义, 但在 NS3-1081 或 C-176 的情况下并非如此。对 NS5A-2132、E2-488、E1-213、C-173、NS3-10810、及 C-176 肽显示有意义水平的反应性的 IgG (1: 100 的血清稀释下 > 0.101 OD)

在接受试验的 60 名患者血浆中可分别得到 57 (95%)、44 (73%)、28 (47%)、23 (38%)、21 (35%)、及 17 (28%) 的检测结果。相对于此,所有 20 名 HD 的血清均未检测出有意义水平的 IgG (图 10)。

其次,对上述各肽具有反应性的 IgG 的肽特异性利用吸收及溶出试验加以确认。使各血清样品在 37°C 下被对应的肽或无关系的肽 (HIV; 作为阴性对照组使用) 中的任一种吸收 3 次,利用 ELISA 测定出肽特异性 IgG (图 11)。溶出试验中,用对应的肽或无关系的肽溶出第一次吸收后结合在肽固定化平板上的 IgG 分子后,利用 ELISA 测定出溶出部分中的肽特异性 IgG 的水平。对于代表性结果,3 次测定的 OD 值平均值 \pm SD 如图所示 (图 12)。* 表示两边标准 t 检定得到的 $P < 0.05$ 。

如预测所示,对 6 种肽的各 IgG 虽被所有对应的肽吸收,但未被无关系的肽 (HIV 肽) 吸收。而且,该 IgG 由对应的肽从结合部分溶出,但未被无关系的肽溶出。综合这些结果可知,与各肽具有反应性的 IgG 对来自 HCV1b 的肽具有特异性。

肽特异性细胞性免疫应答的诱导

将由感染 HCV1b 的 HLA-A24 阳性患者 (n=12, 6 名 CH, 3 名 LC, 3 名 HCC) 及未感染 HCV 的 HLA-A24 阳性的 HD (n=5) 得到的 PBMC, 与 6 种肽 (纯度 > 90%) 或对照 HIV 肽一同培养 13 天,研究应答以对应的肽实施了脉冲的 C1R-A2402 细胞的 IFN 的产生。将由 HLA-A24 阳性 HCV1b⁺ 的患者 (n=12) 及 HD (n=5) 得到的 PBMC 用 6 种肽在 4 个孔 (15×10^4 /孔) 中进行刺激。在培养的第 14 天,回收各孔所得的肽刺激 PBMC ($80-120 \times 10^4$ /孔) 后,分成等量的 4 份。分别对其中的 2 个就与以对应肽实施了脉冲的 C1R-A2402 细胞发生应答、产生 IFN- γ 的能力进行试验。剩下的 2 个则以使用阴性对照肽 (HIV) 的细胞进行试验。减去作为背景的对 HIV 肽 (< 50pg/ml) 发生应答所产生的 IFN- γ 。* 表示利用两边标准 t 检定得到的 $P < 0.05$ 。

C-173、C-176、E1-213、E2-488、NS3-1081、及 NS5A-2132 的 HCV

肽在 12 名患者中分别有 1、3、4、6、2 及 7 名（图 13、14）、及在 5 名 HD 中分别有 0、0、1、1、1 及 1 名诱导出有意义水平（ $p < 0.05$ ）的 IFN- γ 产生（数据未示出）。上述 6 种肽之中，NS5A-2132 肽在 12 名患者中有 7 名的 PBMC 及接受试验的 60 名 HCV1b⁺ 患者中有 57 名的血清中，由细胞性免疫及体液性免疫被识别。

上述肽刺激 PBMC 的细胞伤害性利用 6 小时的 ⁵¹Cr 游离测试加以确定（图 15）。将利用 IFN- γ 产生测试（上述）显示阳性应答的肽刺激 PBMC，在体外仅在 IL-2 中进行培养，使其增殖。然后，利用标准的 6 小时 ⁵¹Cr 游离测试，对利用对应的肽或 HIV 肽（阴性对照）实施了脉冲的 C1R-A2402 细胞的细胞伤害性，以 3 种不同的 E/T 细胞比进行试验。代表结果如图所示。其值以特异性溶解 % 的平均值 \pm SD 表示。
* 表示利用两边标准 t 检定得到的 $P < 0.05$ 。以 NS5A-2132、E2-488、或 E1-213 肽刺激的 PBMC 对预先负荷对应的肽的 C1R-A2402 细胞显示有意义水平的细胞伤害性，但在 HIV 肽中并未显示（图 15）。

将图 15 所示实验中使用的肽刺激 PBMC，在 20 μ g/ml 的抗 HLA-class I（W6/32, IgG2a）、抗 HLA-class II（H-DR-1, IgG2a）、抗 CD8（Nu-Ts/c, IgG2a）、及抗 CD4（Nu-Th/i, IgG1）单克隆抗体（mAb）的存在下，对以对应的肽实施了脉冲的 C1R-A2402 细胞的细胞伤害性进行试验。抗 CD14（JML-H14, IgG2a）mAb 作为阴性对照组使用。以 3 种不同的 E/T 比进行 6 小时 ⁵¹Cr 游离测试。其值以特异性伤害 % 的平均值 \pm SD 表示（图 16）。* 表示利用两边标准 t 检定得到的 $P < 0.05$ 。

以 3 种肽分别实施了脉冲的 C1R-A2402 细胞的细胞伤害性虽被抗 HLA-class I（W6/32）或 CD8 单克隆抗体（mAb）阻碍，但未被试验的其它 mAb 中的任一种阻碍。这表示肽特异性细胞伤害性主要由 CD8⁺ T 细胞产生的 HLA-class I 限制性为媒介（图 16）。相对于此，以残余的 3 种肽（C-173、C-176、或 NS3-1081）刺激的 PBMC 中无法测出上述细胞伤害性（数据未示出）。

然后，将以 NS5A 及 HLA-A2401 基因实施了暂时性共转染的 COS-7

细胞作为目标细胞使用，由此对NS5A-2132肽刺激PBMC是否识别出自然过程中产生的肽进行调查。作为阴性对照，使用以NS5A及HLA-A2601基因实施了暂时性共转染的COS-7细胞。对由患者#1及#2得到的NS5A-2132肽刺激PBMC可识别出以NS5A及HLA-A2401基因实施了暂时性共转染的COS-7细胞作为目标细胞、产生IFN- γ 的活性进行试验。作为阴性对照，使用以NS5A及HLA-A2601基因进行了暂时性共转染的COS-7细胞。其值以E/T比20:1的3次测试的IFN- γ 产生%的平均值 \pm SD表示(图17)。*表示利用两边标准t检定得到的 $P < 0.05$ 。

如预测所述，由显示CTL活性(图13)的患者#1及#2得到的肽刺激PBMC可识别经NS5A及HLA-A2401基因共转染的COS-7细胞，产生有意义量的IFN- γ (图17)。相对于此，上述PBMC并不与作为阴性对照使用的具有NS5A及HLA-A2601基因的COS-7细胞反应。另外，由不显示CTL活性的其它2名患者(#3及#4)得到的肽刺激PBMC也未因经NS5A及HLA-A2401基因共转染的COS-7细胞的识别而产生有意义量的IFN- γ (无数据)。

接下来，对以NS5A基因稳定地进行转染、用作目标细胞的C1R-A2402细胞的细胞伤害性进行试验。以NS5A基因稳定地进行了转染的C1R-A2402细胞的HLA-A24分子的表达、及以HLA-A31基因(阴性对照)稳定地进行了转染的C1R-A2402细胞的HLA-A31分子的表达，使用FACScan进行流动细胞计算分析加以确认(图18)。

然后，以由NS5A基因稳定地进行了转染的C1R-A2402细胞作为目标细胞的细胞伤害性由6小时 ^{51}Cr 游离测试进行试验。将以阴性对照基因(HLA-A3101)稳定地进行了转染的C1R-A2402细胞作为阴性对照使用，将以NS5A-2132肽实施了脉冲的C1R-A2402细胞作为阳性对照使用。以3个不同的E/T比进行6小时 ^{51}Cr 游离测试。其值以特异性溶解的%平均值 \pm SD表示。*表示利用两边标准t检定得到的 $P < 0.05$ 。以NS5A-2132肽实施了刺激的PBMC，与对以阴性对照基因进行了转染的C1R-A2402细胞的细胞伤害性比较，显示比用NS5A基

因进行了转染的C1R-A2402细胞、及用对应的肽预先进行了脉冲的未转染C1R-A2402细胞双方更高水平的细胞伤害性（图19）。这些结果暗示NS5A-2132肽刺激PBMC可良好地识别HCV1b⁺细胞的HLA-A2402分子上自然过程产生的肽。

对抗NS5A-2132IgG做进一步研究

为了更好地了解抗肽IgG的生物学作用的可能性，利用吸收及溶出测定，对抗NS5A-2132IgG是否可识别全NS5蛋白质进行调查。NS5A-2132及HIV肽分别作为阳性对照及阴性对照使用（吸收试验及溶出试验的详细内容如上所述）。结果抗肽IgG在全NS5蛋白质中未被吸收，也未被溶出（图20）。这表示该肽IgG未与全NS5蛋白质反应。

接下来，将Huh7细胞在患者血清（由2名血清具有高水平抗NS5A-2132活性的HCV1b⁺患者得到的血清）的存在下培养3天。作为阴性对照组，使用由2名HD得到的血清及FCS。可生存的Huh7（NNU50-1）细胞数目以细胞计算试剂盒8（10 μ l/孔）计算，算出3次测定所得的平均值。任一试验血清在上述培养条件下均不阻碍Huh7（NNU50-1）细胞的增殖（图21）。另外，对抗NS5A-2132IgG是否具有媒介ADCC活性的能力进行调查。将由HLA-A24阳性的HD新分离出的PBMC，在上述4种不活化血清的存在下，对用该肽预先进行了脉冲的C1R-A2402细胞的细胞伤害性进行试验。然而，这些条件下任一试验血清均未显示ADCC活性（图22）。

实施例3. HCV感染者的预后预测

受试者

血清为由1995年至2002年的世代研究（Cohort Study）中具有HCV相关疾病的33名患者所得。33名患者的详细调查结果如表4所示。具有慢性肝炎（CH, n=68）、肝硬化（LC, n=43）、及肝细胞癌（HCC, n=52）的病患血清也用于分析。这些患者在最初血清采样时，

利用生化学及组织学所见、超音波检查、及计算机连续断层摄影进行诊断。抗HCV抗体由化学发光酶免疫测试(CLEIA)试剂盒(Lumipulse II HCV, Fujirebio Inc., Tokyo, Japan)、或第2代或第3代酶免疫测试试验(SRL, Tokyo, Japan)进行测定。血清中的HCV-RNA可使用RT-PCR(SRL, Tokyo, Japan)进行检测。HCV基因型是由患者血清中的HCV以RT-PCR(SRL, Tokyo, Japan)直接定序来决定的。也由未感染HCV的受试者中得到血清。包括具有自身免疫疾病的24名受试者(6名全身性红斑性狼疮患者、1名白塞病患者及17名异位性皮肤病炎患者)、17例B型肝炎病毒(HBV)感染(HBV表面抗原为阳性)、3名感染人类免疫不全病毒(HIV)的患者、及10例人类T细胞白血病病毒型I(HTLV-1)感染。作为阴性对照,对由不具HBV肝炎病毒或无疫苗接种经历、具有正常肝脏功能的37名受试者得到的血清进行试验。

表 4: 1995 年及 2002 年的诊断结果

1995	n	2002	n	性别(M/F)	年龄 ± SD
CH	17	CH	12	3/9	67.7 ± 11.9
		LC	3	2/1	59.0 ± 7.9
		有CH;HCC	1	-/1	82
		有CH;HCC	1	1/-	65
LC	1	LC	1	-/1	69
ASC	4	CH	1	-/1	75
		ASC	1	-/1	76
		HCV感染的 过去病历	2	-/2	57.7 ± 6.36
HCV感染的 过去病历	11	HCV感染的 过去病历	11	2/9	68.8 ± 10.71
合计	33		33	8/25	67.1 ± 10.6

CH, 慢性肝炎;LC, 肝硬化;HCC, 肝癌;

ASC, 无症状性健康载体

肽

纯度为 90% 或 90% 以上的以下 2 个肽由 BIOSYNTHESIS (Lewisville, TX) 购得; HCV1b 中心蛋白质 35-44 (YLLPRRGPR) (序

列号 1)；可诱导HLA-A2 限制性CTL活性)，及HCV1bNS5A蛋白质 2132-2140 (RYAPACKPL (序列号 2)；可诱导HLA-A24 限制性CTL 活性)。作为阴性对照，使用具有HLA-2A结合基序 (SLYNTVATL (序列号 64))及HLA-A24 结合基序 (RYLRDQQLGI (序列号 63)) 的来源于HIV的肽。

对肽具有反应性的抗体测定

肽特异性IgG的水平可由酶抗体法 (ELISA) 测定。简言之，将各肽溶解于二甲亚砜 (DMSO)，-20℃下保存。将用含有作为化学交联剂的二琥珀酰亚胺二辛酸酯 (DSS) (PIERCE, Rockford, 1L) 的 0.1M 碳酸缓冲液稀释的肽 (20 μg/孔) 结合于ELISA平板上。以 0.05 % Tween20-PBS (PBST) 将孔清洗 3 次。平板以Block Ace (Yukijirushi, Tokyo, Japan) 在 4℃下封阻一晚。将血清样品以 0.05 % Tween20-BlockAce稀释 100 倍、200 倍、400 倍，将 100 μl/孔的样品加入各孔中。37℃下培养 2 小时后，将平板用PBST清洗 9 次，与 100 μl/孔的 1000 倍稀释兔子抗人类IgG(γ链特异性) (DAKO, Glostrup, Denmark) 一同在 37℃下培养 2 小时。清洗 9 次后，将 100 μl/孔的 1:100 稀释抗兔子IgG结合西洋芥末过氧化酶·葡聚糖聚合物 (En Vision, DAKO) 添加于各孔中，将平板在室温下培养 40 分钟。清洗后，添加 100 μl/孔的四甲基联苯胺基质溶液 (KPL, Guildford, UK)，加入 1.0M 磷酸使反应停止。

统计学

统计学分析使用 χ^2 检定进行， $p < 0.05$ 的值有统计学意义。

交叉反应性、HLA限制性、及基因型限制性

研究对来源于HCV1b的肽具有反应性的 2 种抗体的交叉反应。研究 60 名HCV患者、及未含在世代研究中的患者 (CH, n=22, LC, n=21, 及HCC, n=17) 的血清对中心的 35-44 (C-35) 及NS5A的 2132-2140

(NS5A-2132) 的肽的反应性。也取得具有自身免疫疾病的 24 名受试者、HBV 感染的 17 例及 HTLV-1 感染的 10 例受试者的血清。将由 37 名 HD 取得的血清作为阴性对照使用。连续稀释的血清样品的肽反应性 IgG 水平利用 ELISA 进行测定。给出各样品的吸光度 (OD) 值。给出稀释为 100: 1 的血清的 OD 代表性结果。切断值设定为 0.093 (由 HD 的 OD 平均 + 2SD)。统计学分析使用 χ^2 检定进行, $p < 0.05$ 的值有统计学意义。

结果检测出 HCV 阳性患者的 56/60 (93.3%) 为有意义水平的抗 C-35IgG, 在 3 组 (CH, LC, 及 HCC 患者) 之间的 IgG 水平不存在有意义差 (图 23)。除去 HTLV-1 患者, 由其它组得到的血清对抗 C-35 抗体不显示阳性。对 HTLV-1 + 受试者的 8/10 例的血清检测出较低、但是有意义水平的抗 C-35IgG。检测出患者的 45/60 (75%) 为有意义水平的抗 NS5A-2132IgG。IgG 水平在 3 组间, CH 患者较高, LC 为中等程度, HCC 患者较低 ($p < 0.05$ vs CH) (图 23)。对于由其它组得到的血清, 进行试验的大部分病例的抗 NS5A-2132IgG 也显示阳性。而且 3/37 的 HD 的血清的抗 NS5A-2132IgG 也显示阳性。

接下来, 对具有 HCV 相关疾病的 29 名病患研究 HLA-class IA 表达型、与抗 C-35IgG 或抗 NS5A-2132IgG 的水平间的相关性。HLA-class IA 表达型可由标准血清学方法决定。9 名患者为 HLA-2A 阳性、13 名患者为 A24 阳性、及剩下 7 名患者为 A2 阴性, A24 阴性。抗 C-35 及抗 NS5A 2132 利用标准 ELISA 测定, 各患者 100: 1 的血清稀释时的 OD 值如图所示。任一抗体不管其 HLA-class IA 表达型的差异, 均在大部分 HCV 感染者中被检出 (图 24)。

然后, 对于 HCV-1b (n=29)、HCV-2a (n=16) 及 HCV-2b 感染 (n=3) 的患者, 使用双盲检定研究 HCV 基因型与抗 C-35IgG 或抗 NS5A-2132IgG 的水平间的相关性。HCV 基因型可通过将患者血清中的 HCV 直接定序来决定。所有受试者的稀释 100: 1 时的结果如图 25 所示。抗 C-35 及抗 NS5A 2132 利用标准 ELISA 测定, 各患者的 100: 1 的血清稀释时的 OD 值如图所示。切断值设定为 0.093 (由 HD 的 OD

平均 + 2SD)。

抗C-35 抗体分别在 26/30 的HCV-1b、15/15 的HCV-2a、及 3/3 的HCV-2b感染者中被检出。同样地抗NS5A-2132 抗体分别在 23/30 的HCV-1b、10/16 的HCV-2a、及 3/3 的HCV-2b感染者的血清中被检测出(图 25)。这些结果表明,在HCV阳性患者中,不管HLA-class IA 亚型的差异、及HCV基因型的差异,均可检出抗C-35 抗体及抗NS5A-2132 抗体双方。

以上的结果表明抗NS5A-2132 抗体的水平与HCV感染个体的预后相关,但与抗C-35 抗体并无关系。

然后,重新准备CH (n=24)、LC (n=22)、HCC (n=26)、HD (n=9) 的血清,测定抗NS5A-2132IgG的水平(图 26)。CH、LC、HCC及HD组的平均值 \pm SD分别为 0.51 ± 0.24 、 0.27 ± 0.20 、 0.26 ± 0.23 、 0.08 ± 0.07 。LC及HCC患者的抗NS5A-2132 抗体的水平明显低于CH患者 ($p < 0.05$, 高于HD。为了将上述结果与利用标准第3代测试进行测定的结果进行比较,对于所有血清使用市售的试剂盒(第3代测试, SRL)测定抗HCV抗体的水平。其水平以指数表示(左边柱状图)。以指数表示的抗HCV水平与抗NS5A-2132 水平之间的关系如右边柱状图表示。利用第3代测试测定的抗HCV抗体水平在3组间并无有意义的差异(CH, 10 ± 2.7 ; LC, 11 ± 1.4 ; HCC, 11 ± 1.1) (图 27)。而且,对于这些血清使用市售的试剂盒(SRL, Japan)测定HCV RNA水平。HCC患者的HCV RNA水平(360 ± 269.6)比CH患者(610 ± 347.3)或LC患者(610 ± 246.4)低($p < 0.05$) (图 28)。然而,抗NS5A抗体的水平与HCV RNA水平之间并无明确相关性(图 28)。

世代研究的结果

为了在各个水平下进一步调查抗NS5A-2132 抗体与HCV阳性患者的预后的相关性,对1990年至2002年进行的每年筛选HCV感染居民的世代研究所得的样品进行2种抗体的血清水平研究。为了进行该

研究，于1995年及2002年由相同个体取样2次，33名患者共计66份血清。1995年时上述33名患者的诊断为，CH(n=17)、LC(n=1)、无症状性载体(ASC)(n=4)、及HCV感染的过去病例(自然康复个体)(n=11)，2002年时为CH(n=13)、LC(n=4)、HCC(n=2)、无症状性载体(ASC)(n=1)、及HCV感染的过去病例(n=13)。即，7年间26名患者中并未观察到疾病的进展，而剩下7名患者中则观察到疾病的进展(表4)。以1995年及2002年的100:1血清稀释时测定的各病患中抗C-35抗体及抗NS5A-2132IgG的OD值如图29所示。如预测所述，33病例中的大部分，不论疾病状态如何，1995年测定的抗C-35抗体水平与2002年测定的水平几乎相等。相对于此，对于疾病进展的7名患者而言，1995年测定的抗NS5A抗体水平在2002年测定时减少。另一方面，对于疾病未进展的25例中的大部分而言，该值与2002年的测定值几乎相等。疾病进展的7名患者的血清中1995年的抗NS5A-2132抗体的中央值 \pm SD(0.67 ± 0.13)与2002年的测定值(0.27 ± 0.11)相比有意义地高($p < 0.05$)。

然后，将33名受试者分为5组(CH、LC、HCC、HCV感染的过去病例[康复的个体]，及ASC)，将2002年的100:1血清稀释时的2种抗体的水平进行制图(图30)。统计学分析使用 χ^2 检定进行。 $p < 0.05$ 中有统计学意义。抗C-35抗体的水平在CH、LC及HCC组皆高，已痊愈的个体组变得非常低或无法检测出。另一方面，抗NS5A-2132抗体的水平在CH、康复个体及ASC组较高，LC组为中等程度，HCC患者最低($p < 0.05$ vs CH)。

实施例 4: 由luminex法检测与HLA-A24 + HCV感染患者血清的HCV肽具有反应性的IgG

使用认为灵敏度高于ELISA法的Luminex法，与实施例1相同，进行与HLA-A24 + HCV感染患者血清的HCV肽具有反应性的IgG的检测。

对肽对微小珠子的结合

将肽分别如下所述地结合在依据制造者的指示将各萤光色素含有量识别编码化（以下称为颜色编码）的微小珠子（Luminex公司制，xMAP Multi-Analyte COOH Beads）上。在过滤平板的各孔中放入 100 μ l 经颜色编码化的未调制的微小珠子，经吸引后以清洗用缓冲液（磷酸缓冲液生理食盐水（PBS）（ $\text{pH}7.4 \pm 0.1$ ）、Tween（注册商标）20（0.05% v/v））清洗 2 次后同时吸引各孔。接下来放入 50 μ l 0.1M MES（2-吗啉代乙磺酸）缓冲液（ $\text{pH}7.0$ ），各孔添加各 10 μ l 的 EDC（N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐）（1mg/ml/0.1M MES 缓冲液（ $\text{pH}7.0$ ））。在各孔内混合数百 μ l 的肽（1mg/ml，0.1M MES 缓冲液， $\text{pH}7.0$ ）与该经过清洗的微小珠子。然后，将与肽混合的微小珠子在暗处、室温下反应 20 分钟后，再在各孔中添加 10 μ l EDC（1mg/ml/0.1M MES 缓冲液（ $\text{pH}7.0$ ）），在暗处、室温下使其反应 20 分钟，将该操作重复 2 次。吸引剩余液体后，在各孔中添加 100 μ l 1M tris-盐酸缓冲液（ $\text{pH}7.0$ ），在暗处、室温下使其反应 15 分钟。接下来，将各孔的珠子用上述清洗用缓冲液进行 3 次清洗，在 Block-Ace（注册商标）中放入 0.05% 叠氮化钠后调整以保存用溶液进行回收。

微小珠子混合物的调制

调制各孔的微小珠子时，将在如上所述地经过颜色编码化的微小珠子上结合肽得到的珠子溶液放入过滤平板，使每孔中约有 5000 个微小珠子（各孔中 1 种珠子约 1 μ l）。另外，混合 10 种等量的如上所述地调制的微小珠子，用上述清洗用缓冲液（PBS，TWEEN（注册商标）20（0.05% v/v））稀释至总量约 25 μ l，调制珠子混合物。

样品的调制

使用血清。将血清使用反应用缓冲液（PBS（ $\text{pH}7.4 \pm 0.1$ ）、Tween（注册商标）20（0.05% v/v）、牛胎血清白蛋白（BSA）10mg/ml）稀释至 100~1000 倍，分别调制 100 μ l 的血清稀释液。

抗肽抗体测定

作为生物素化二次抗体，将生物素化羊抗人类IgG（ γ 链特异性）用上述反应用缓冲液稀释后进行使用。作为荧光色素标记链霉抗生物素蛋白，将经PE（藻红素）标记的链霉抗生物素蛋白（SRPE）1mg/ml用上述反应用缓冲液稀释（1/50稀释）至20 μ l进行使用。

过滤平板的各孔中放入100 μ l上述清洗用缓冲液，继续吸引除去。该清洗操作进行2次。然后，在各孔中放入25 μ l上述珠子混合物，将该96孔的过滤平板用该清洗用缓冲液清洗2次。清洗后，在所有孔中分别放入100 μ l上述样品。接下来，封住过滤平板，在暗处、室温下使用平板震荡器（300rpm）震荡2小时后，进行吸引。继续在各孔中分别放入100 μ l上述清洗用缓冲液，吸引除去。该清洗操作进行3次。

然后，在各孔中分别放入100 μ l作为生物素化二次抗体的生物素化羊抗人类IgG（ γ 链特异性），封住过滤平板，在暗处、室温下使用平板震荡器（300rpm）震荡1小时。然后，进行吸引，在各孔中分别放入100 μ l上述清洗用缓冲液，吸引除去。该清洗操作进行3次。

接下来，在各孔中分别加入100 μ l SRPE，封住过滤平板，在暗处、室温下使用平板震荡器（300rpm）震荡30分钟。然后进行吸引，在各孔中分别放入100 μ l上述清洗用缓冲液，吸引除去。该清洗操作进行3次。然后，在各孔中分别放入100 μ l该清洗用缓冲液，使用平板震荡器（300rpm）震荡2~3分钟后，将得到的50 μ l样品用荧光闪烁计数系统进行测定。结果如图31及32、及表5所示。

表 5

No	肽名	改变名	区域	序列	序列号	HCV 患者 (n=10)		健康人 (n=10)	
						阳性		阳性	
						人数	%	人数	%
4	1bA24-717	E2-717	E2	EYVLLLFLL	8	6	60	2	20
14	1bA24-1716	NS4B-1716	NS4B	PYIEQGMQL	16	6	60	1	10
18	1bA24-885	NS2-885	NS2	IFTITKILL	20	9	90	2	20
39	1bA24-711	E2-711	E2	SFAIKWEYVL	38	6	60	2	20

实施例 5: 使用来源于C型肝炎病毒的肽疫苗的HCV感染治疗

对HLA-A2 阳性或HLA-A24 阳性的HCV感染者, 研究使用本发明的来源于C型肝炎病毒的肽的疫苗的抗病毒效果。受试者均为感染HCV1b、且对利用干扰素与利巴韦林的治疗无反应的患者。来源于C型肝炎病毒的肽C-35、NS5A-2132、E2-488、E1-213 及NS3-1081 在适合GMP的条件下合成、纯化、制成冻干粉末进行保存。C-35、NS5A-2132、E2-488 及NS3-1081 的肽溶解在少量的DMSO(1mg/10~25 μ l) 中, E1-213 溶解在7%碳酸氢钠注射液(碳酸氢钠)(1mg/15 μ l) 中。分别以注射用生理食盐水进行稀释(1~2mg/ml), 通过0.22 μ m 滤器灭菌。该溶液与等量助剂(Montanide ISA-51) 混合, 得到乳化剂注射剂。其中对HLA-A2 阳性的3名受试者给予C-35 注射剂, 对HLA-A24 阳性的5名受试者给予NS5A-2132 注射剂。给药方式为2星期内, 每次将含有0.3mg肽的乳化剂注射于侧腹部。持续监测HCV RNA的量及GOT、GPT、 γ -GTP、AFP的值。

结果如图33及图34所示。由上述图可知, 接受试验的受试者在疫苗给药开始后几乎全部出现HCV RNA的量显著降低, 证明本发明的肽作为抗HCV疫苗是有效的。

产业上的利用性

本发明的来源于C型肝炎病毒的肽将HLA结合基序包含在其序列中, 被与C型肝炎病毒具有反应的抗体识别, 同时, 还具有由HLA-A2或HLA-A24 限制性细胞伤害性T细胞的识别性。

因此, 本发明的来源于C型肝炎病毒的肽可用作对HCV感染所引起的疾病有效的疫苗。

<213> C型肝炎病毒
 <400> 5
 Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr Leu
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 6
 Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 7
 Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 8
 Glu Tyr Val Leu Leu Leu Phe Leu Leu
 1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 9
 Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 10
 Gln Tyr Leu Ala Gly Leu Ser Thr Leu
 1 5
 <210> 11

<211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 11
 Leu Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 12
 Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu
 1 5

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 13
 His Tyr Lys Leu Phe Leu Ala Arg Leu
 1 5

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 14
 Thr Tyr Ala Thr Tyr Gly Lys Phe Leu
 1 5

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 15
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 16
 Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu

<400>	22		
Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu			
1	5		10
<210>	23		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	C型肝炎病毒		
<400>	23		
His Tyr Val Gln Met Ala Leu Met Lys Leu			
1	5		10
<210>	24		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	C型肝炎病毒		
<400>	24		
Thr Tyr Val Tyr Asp His Leu Thr Pro Leu			
1	5		10
<210>	25		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	C型肝炎病毒		
<400>	25		
Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu			
1	5		10
<210>	26		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	C型肝炎病毒		
<400>	26		
Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu			
1	5		10
<210>	27		
<211>	10		
<212>	PRT		
<213>	C型肝炎病毒		
<400>	27		
Ala Tyr Ala Leu Tyr Gly Val Trp Pro Leu			
1	5		10
<210>	28		
<211>	10		

<212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 28
 His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 29
 Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val Ile
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 30
 Thr Phe Leu Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 31
 Val Phe Val Gly Leu Ile Leu Leu Thr Leu
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 32
 Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 33
 Leu Phe Leu Ala Arg Leu Ile Trp Trp Leu
 1 5 10

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 34
 Tyr Phe Ile Thr Arg Ala Glu Ala His Leu
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 35
 Ala Phe Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 36
 Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 37
 Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu
 1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 38
 Ser Phe Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Leu
 1 5 10
 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 39

Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val

1 5

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> C型肝炎病毒

<400> 40

Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val

1 5 10

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> C型肝炎病毒

<400> 41

Ile Leu His Thr Pro Gly Cys Val

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> C型肝炎病毒

<400> 42

Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val

1 5

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> C型肝炎病毒

<400> 43

Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ala Lys Gln Asn Val

1 5 10

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> C型肝炎病毒

<400> 44

Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> C型肝炎病毒
 <400> 45
 Leu Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val
 1 5
 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 46
 Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 47
 Thr Gly Ala Pro Val Thr Tyr Ser Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 48
 Ser Leu Met Ala Phe Thr Ala Ala Val
 1 5
 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 49
 Leu Leu Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 50
 Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val
 1 5
 <210> 51

<211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 51
 Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu Val
 1 5
 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 52
 Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 53
 Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val
 1 5
 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 54
 Ala Leu Ala His Gly Val Arg Ala Leu
 1 5
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 55
 Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
 1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 56
 Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile

1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 57

His Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met

1 5
 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 58

Trp Phe Met Trp Cys Leu Leu Leu Leu

1 5
 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 59

Ala Phe Tyr Gly Val Trp Pro Leu Leu

1 5
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 60

Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu

1 5
 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒
 <400> 61

Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe

1 5 10
 <210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> C型肝炎病毒

<400> 62
 Gln Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10
 <210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒
 <400> 63
 Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人免疫缺陷病毒
 <400> 64
 Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
 1 5

患者 4

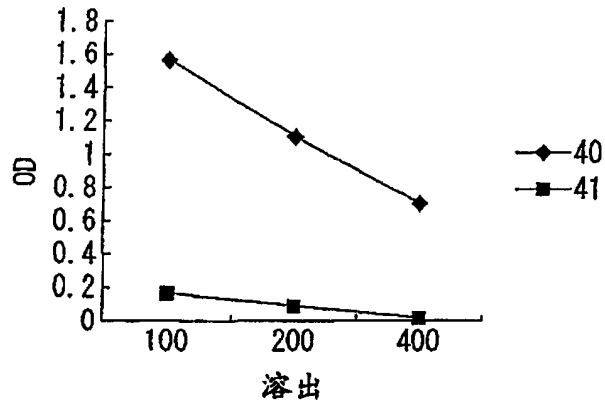


图 1

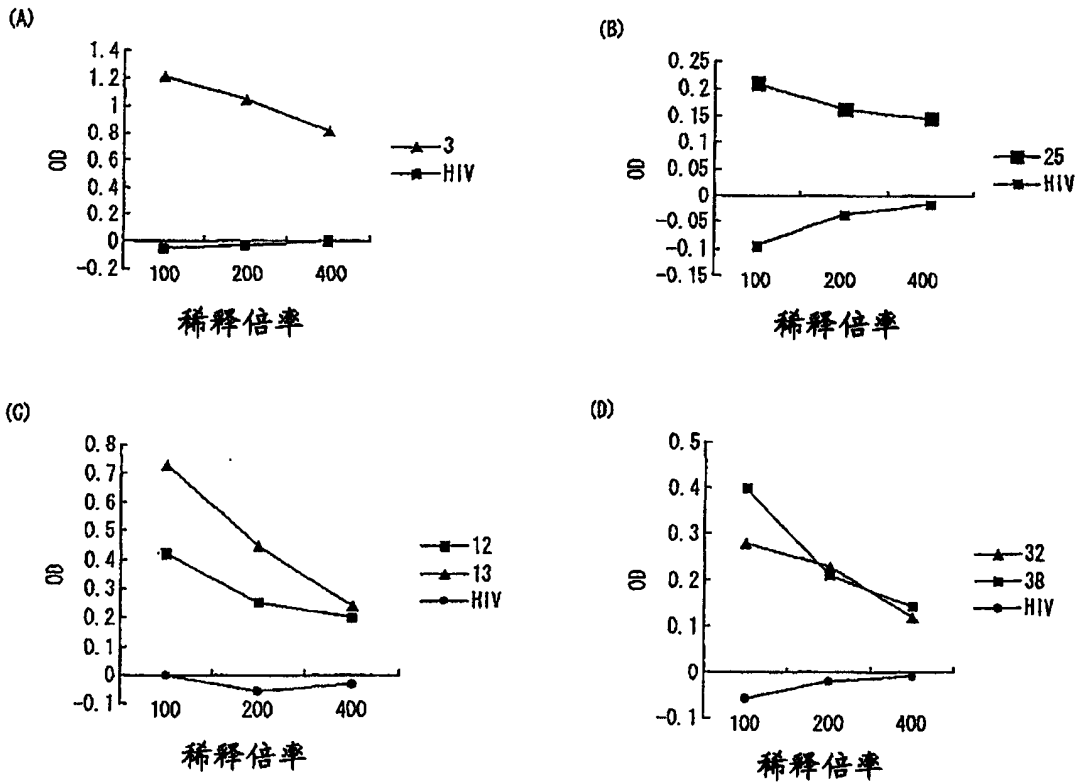


图 2

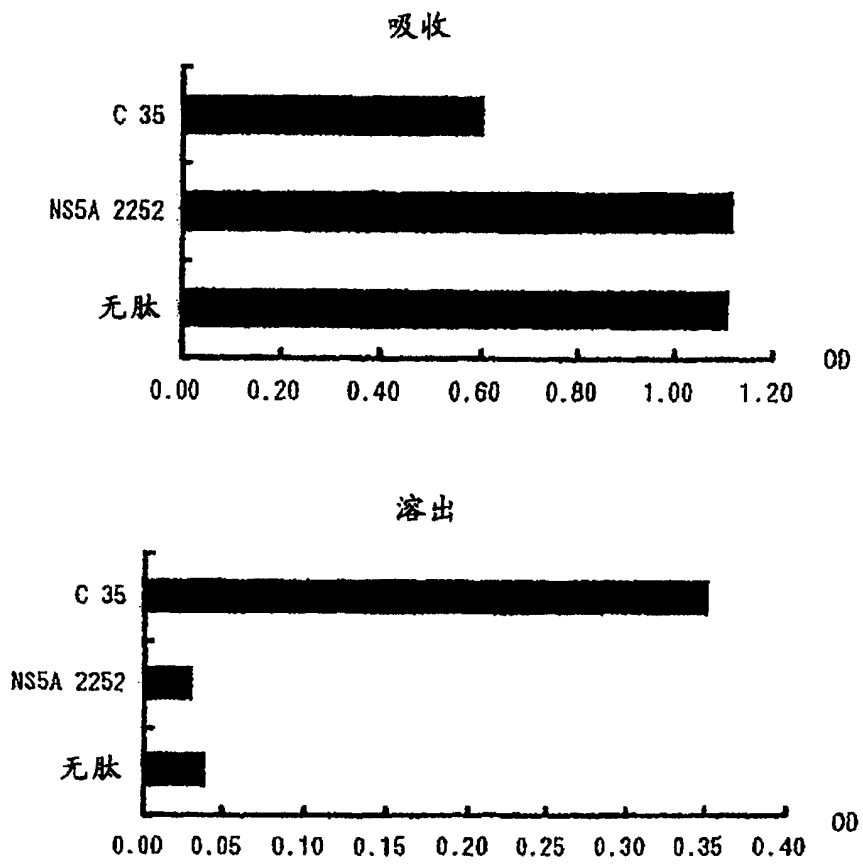


图 3

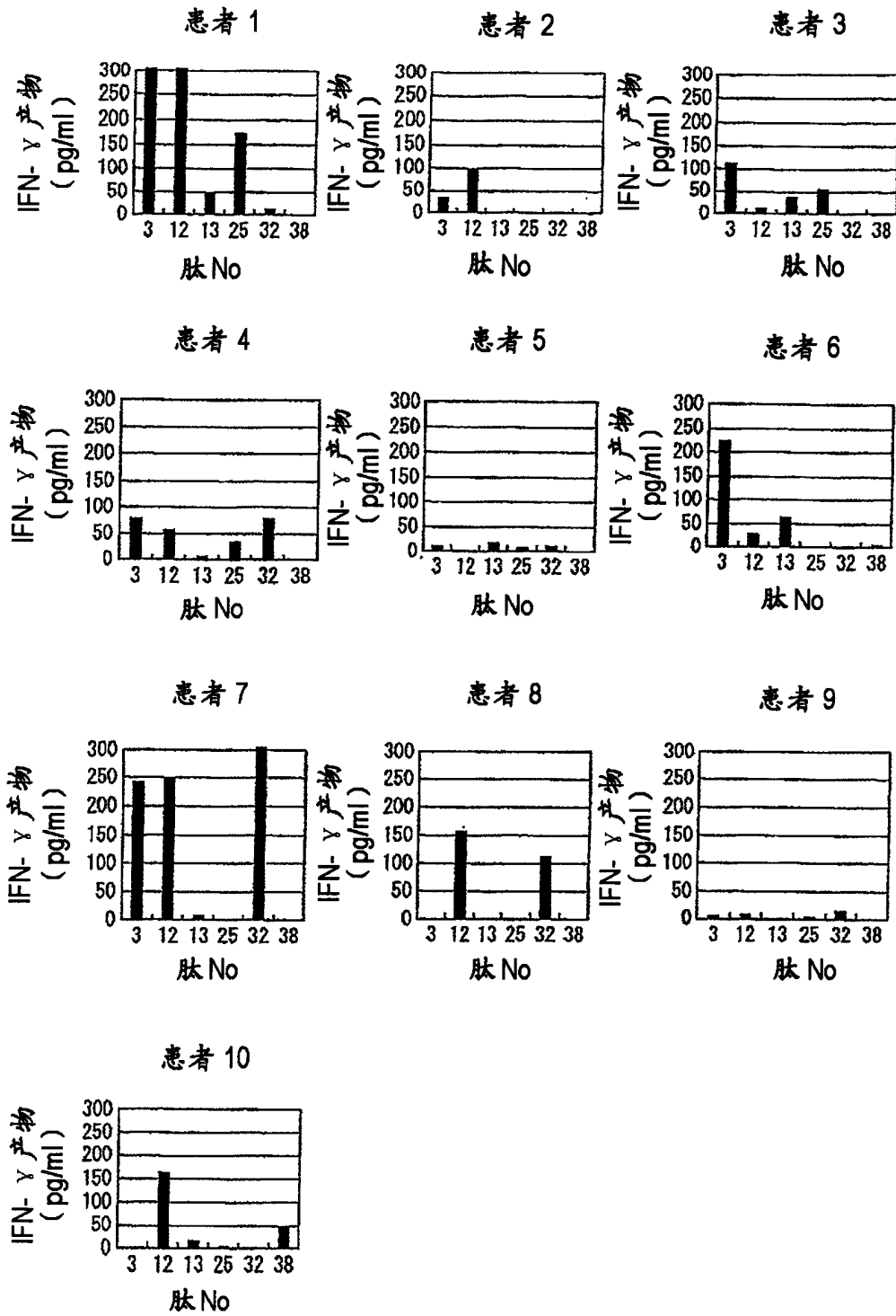


图 4

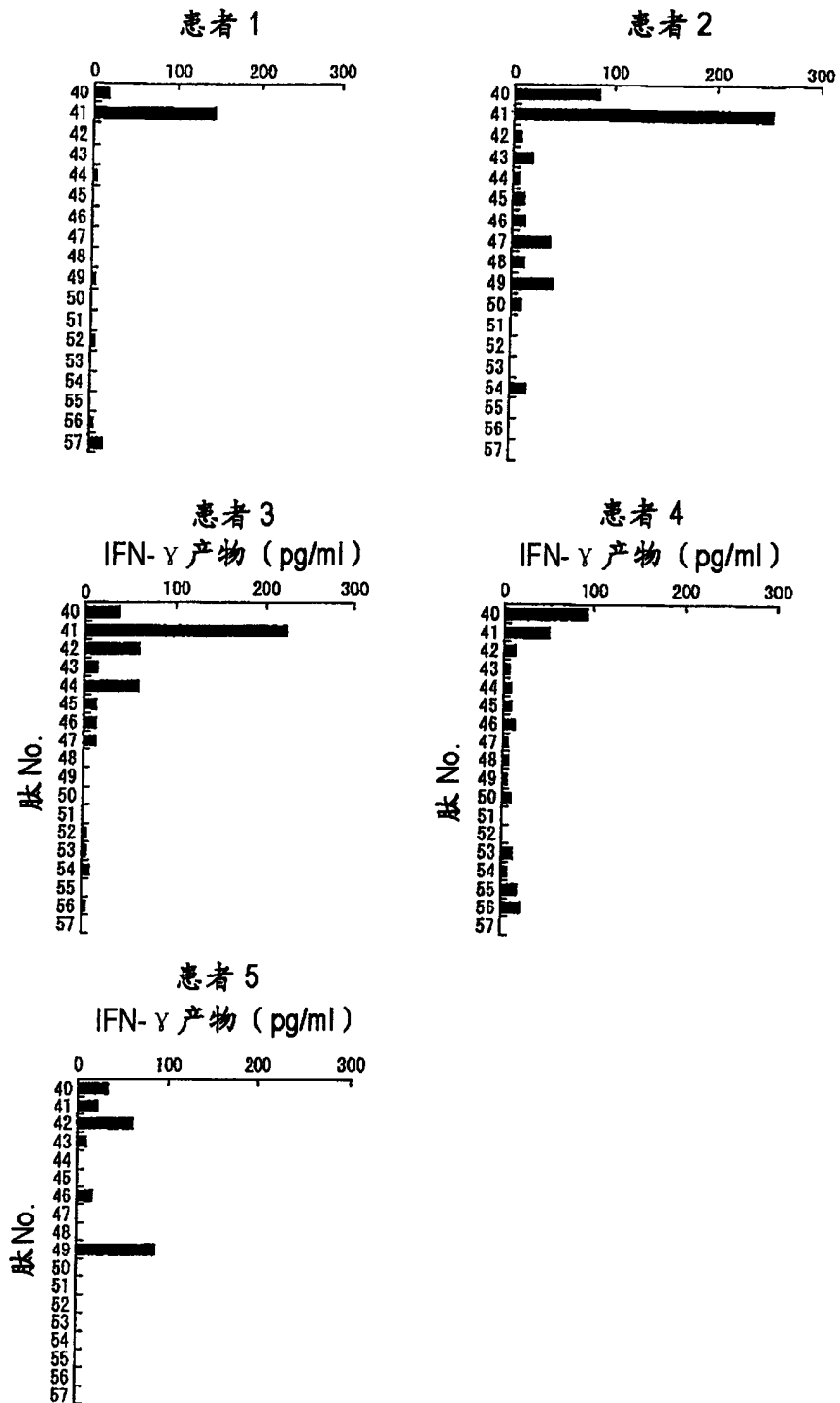


图 5

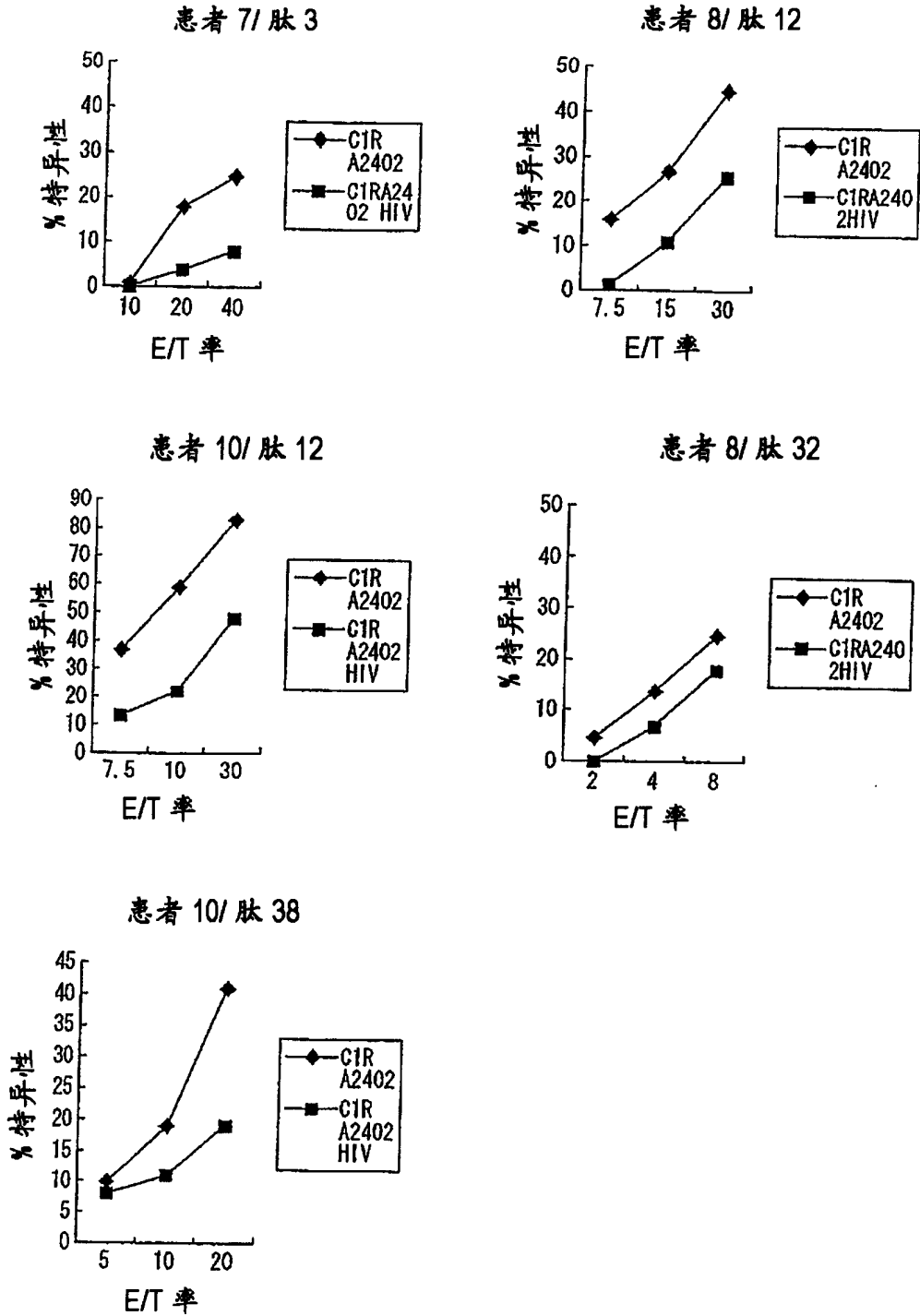


图 6

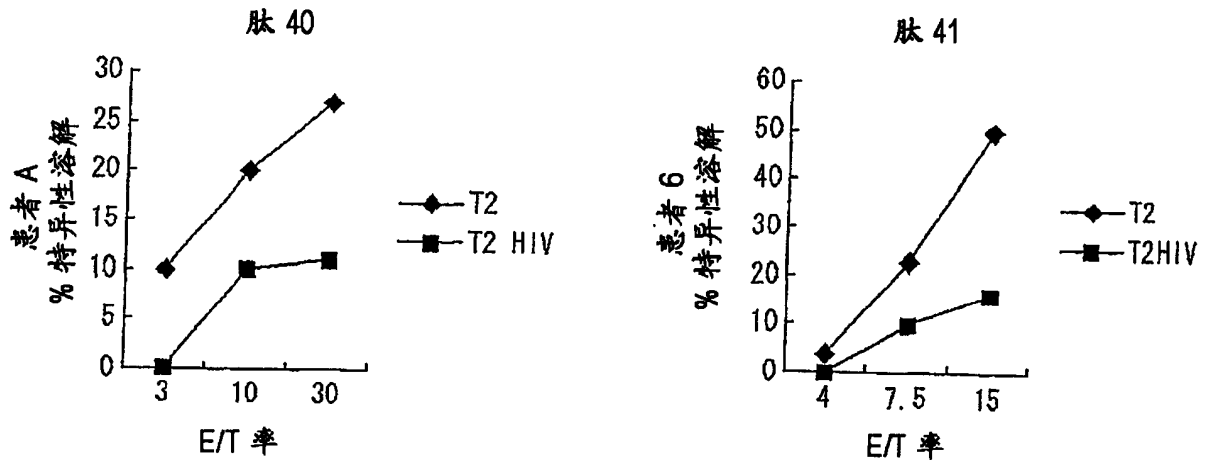


图 7

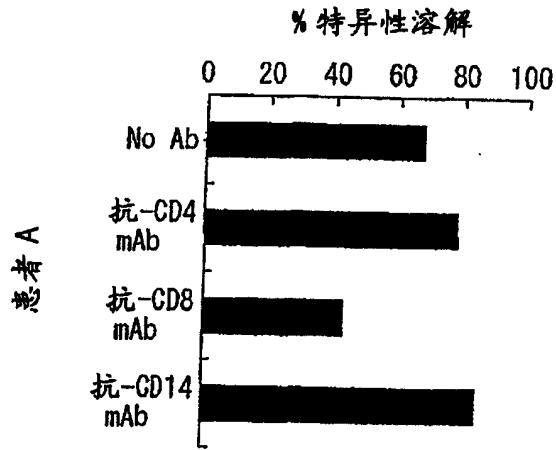


图 8

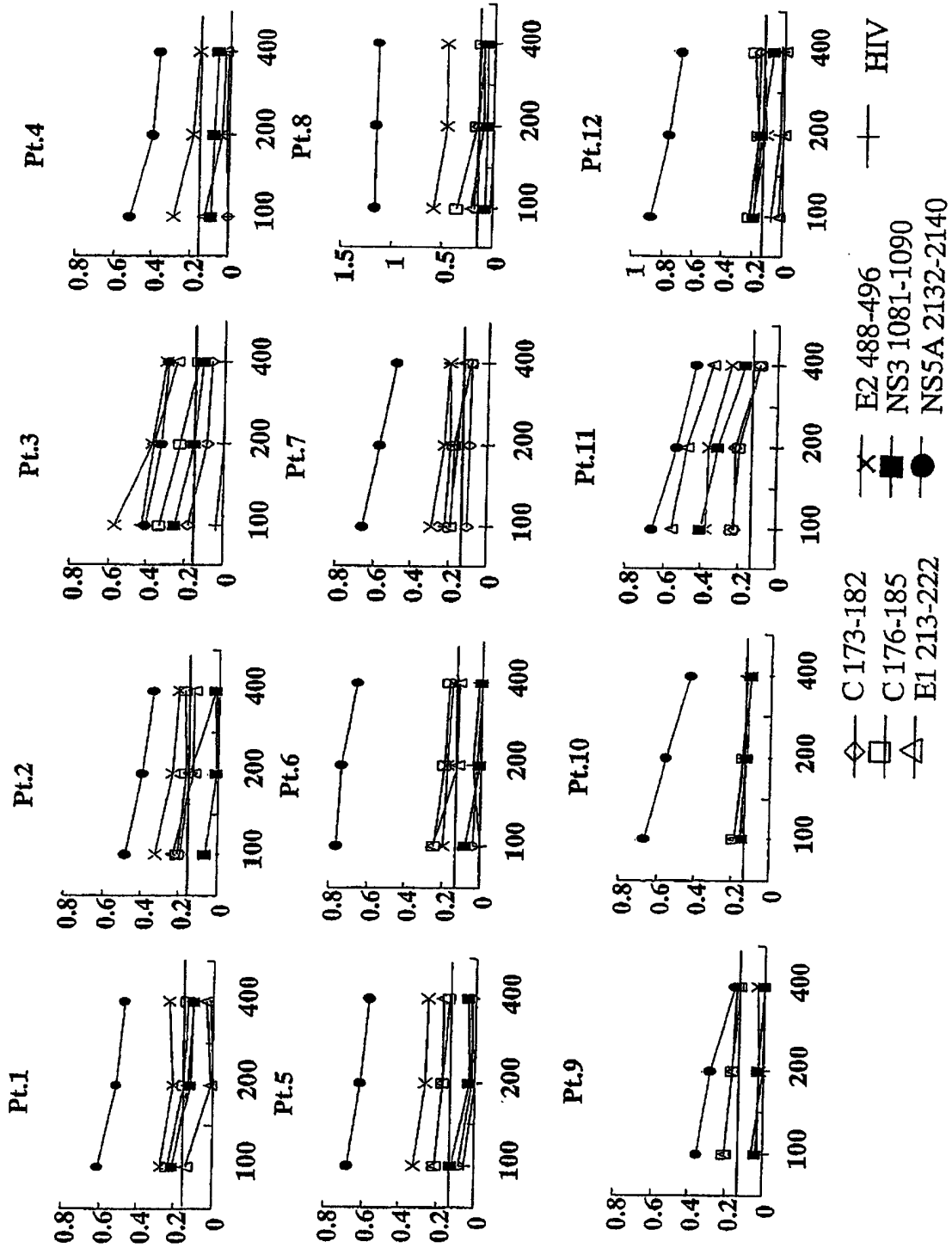


图 9

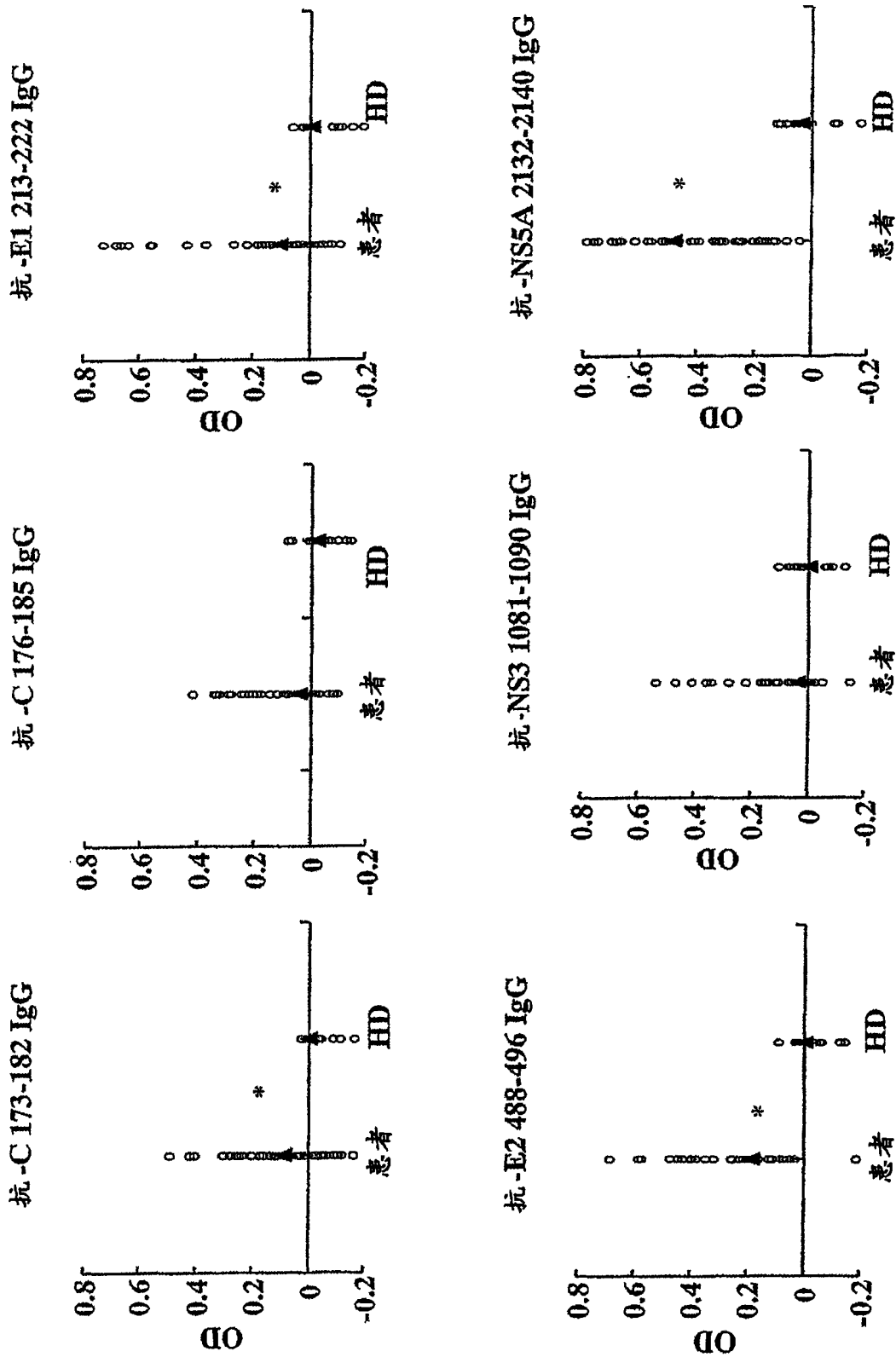


图 10

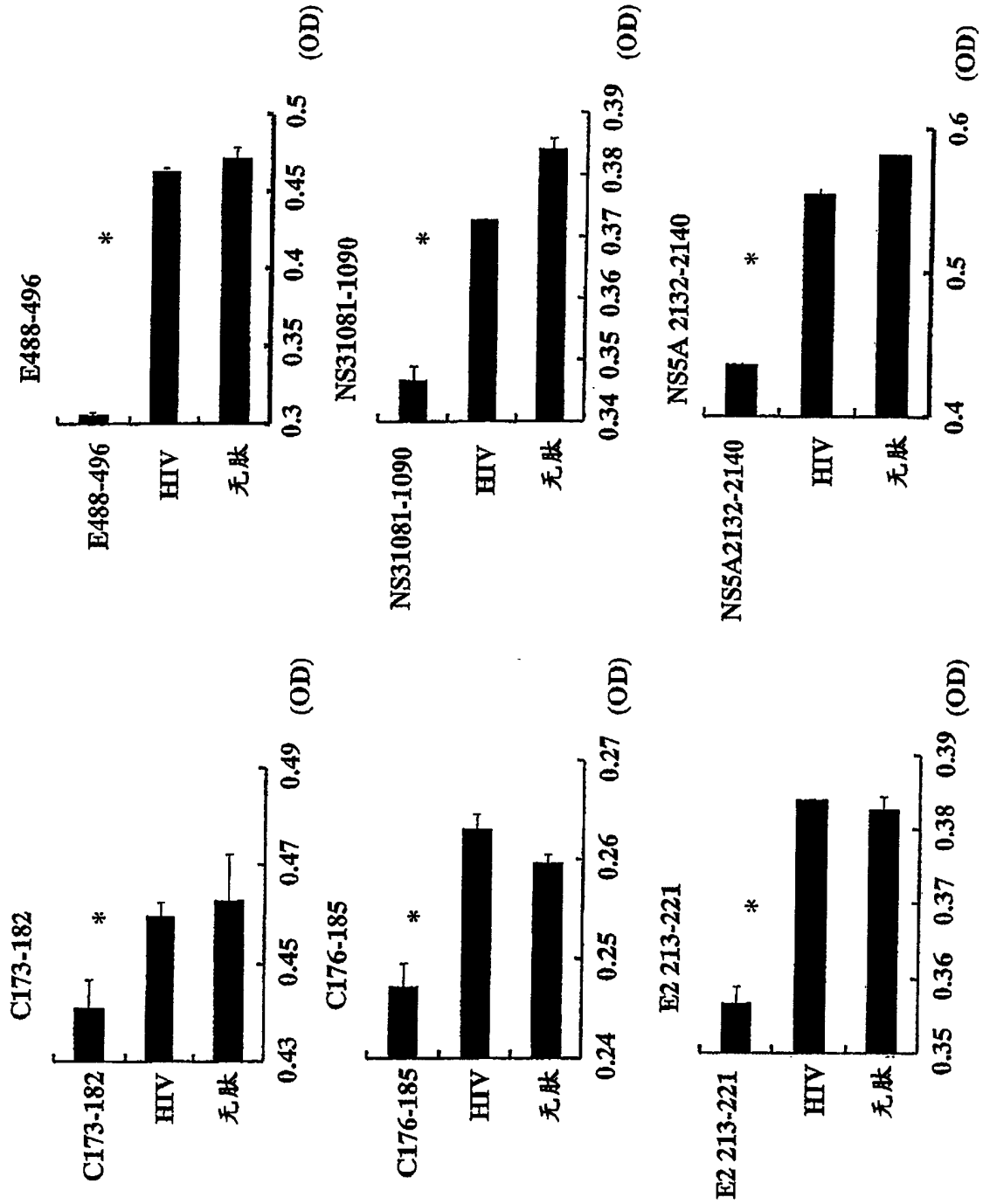


图 11

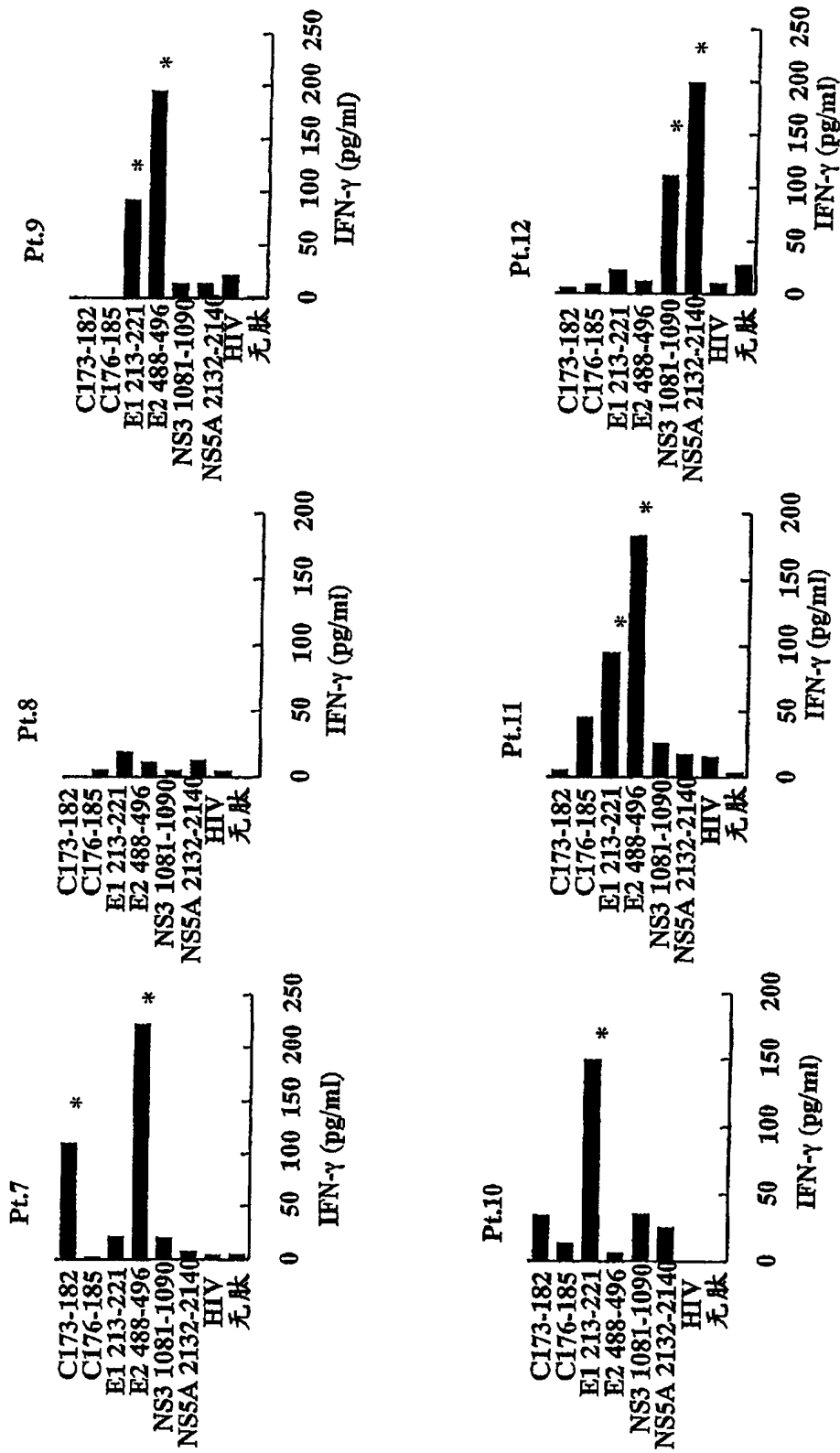


图 12

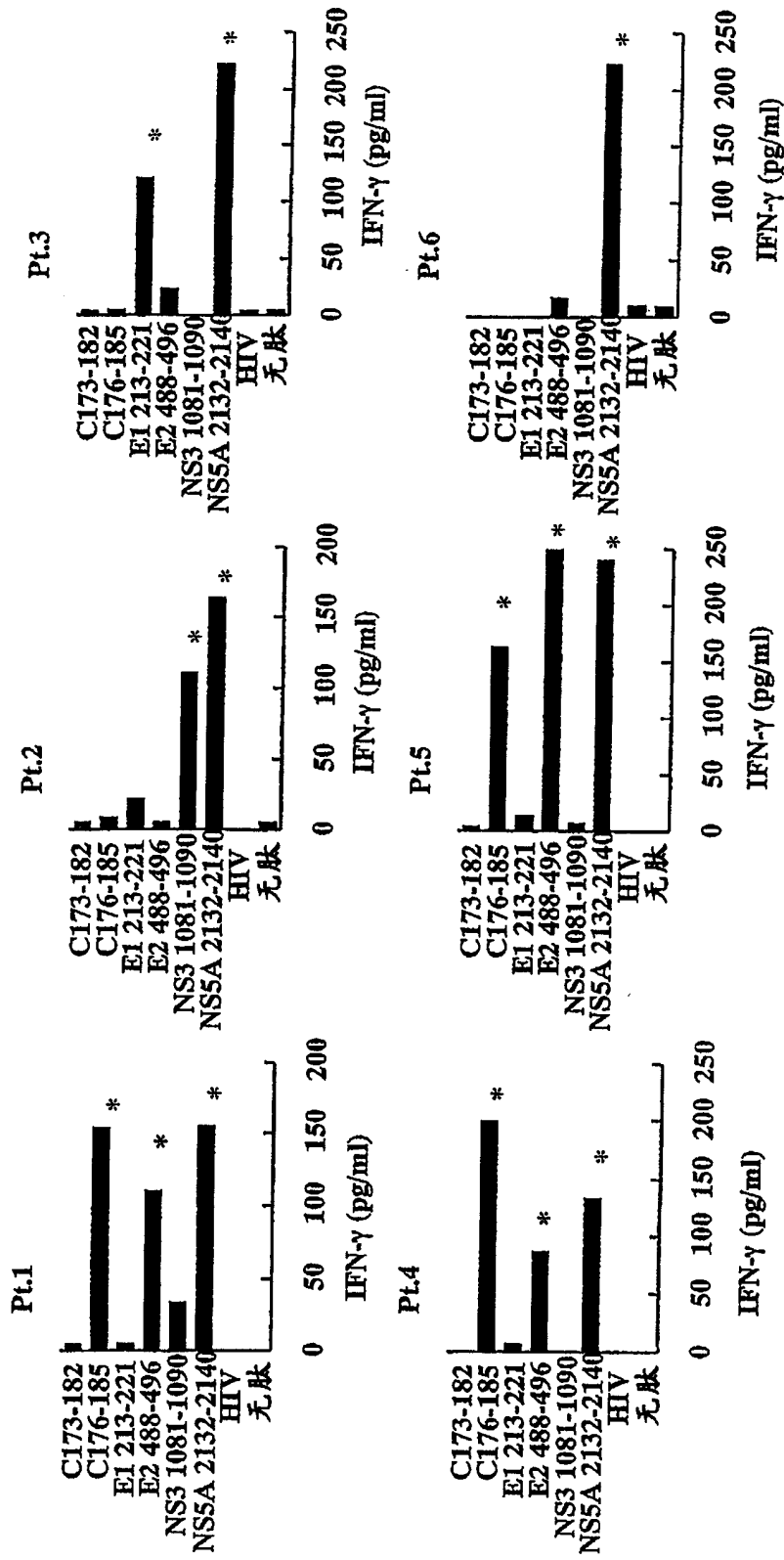


图 13

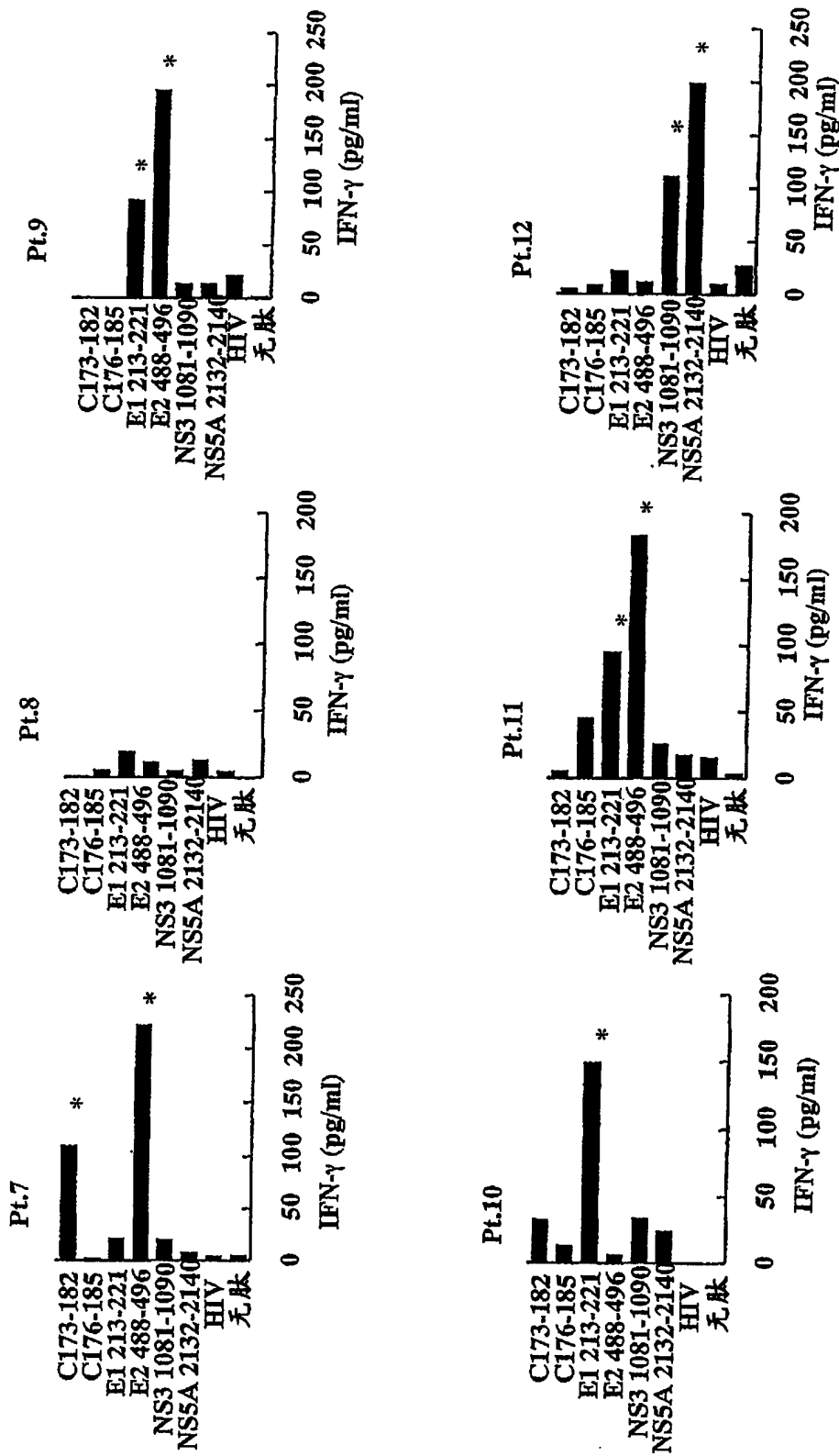


图 14

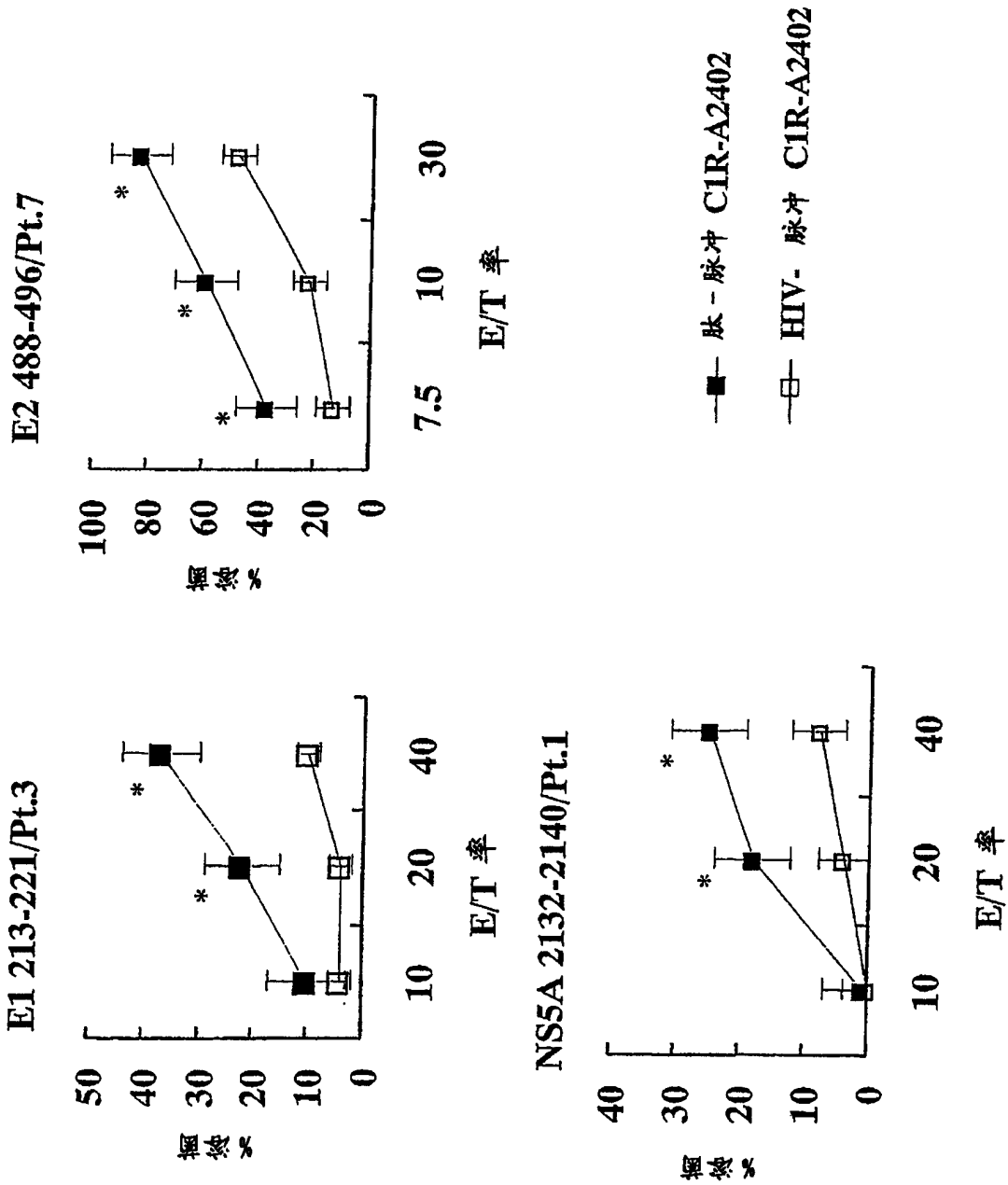


图 15

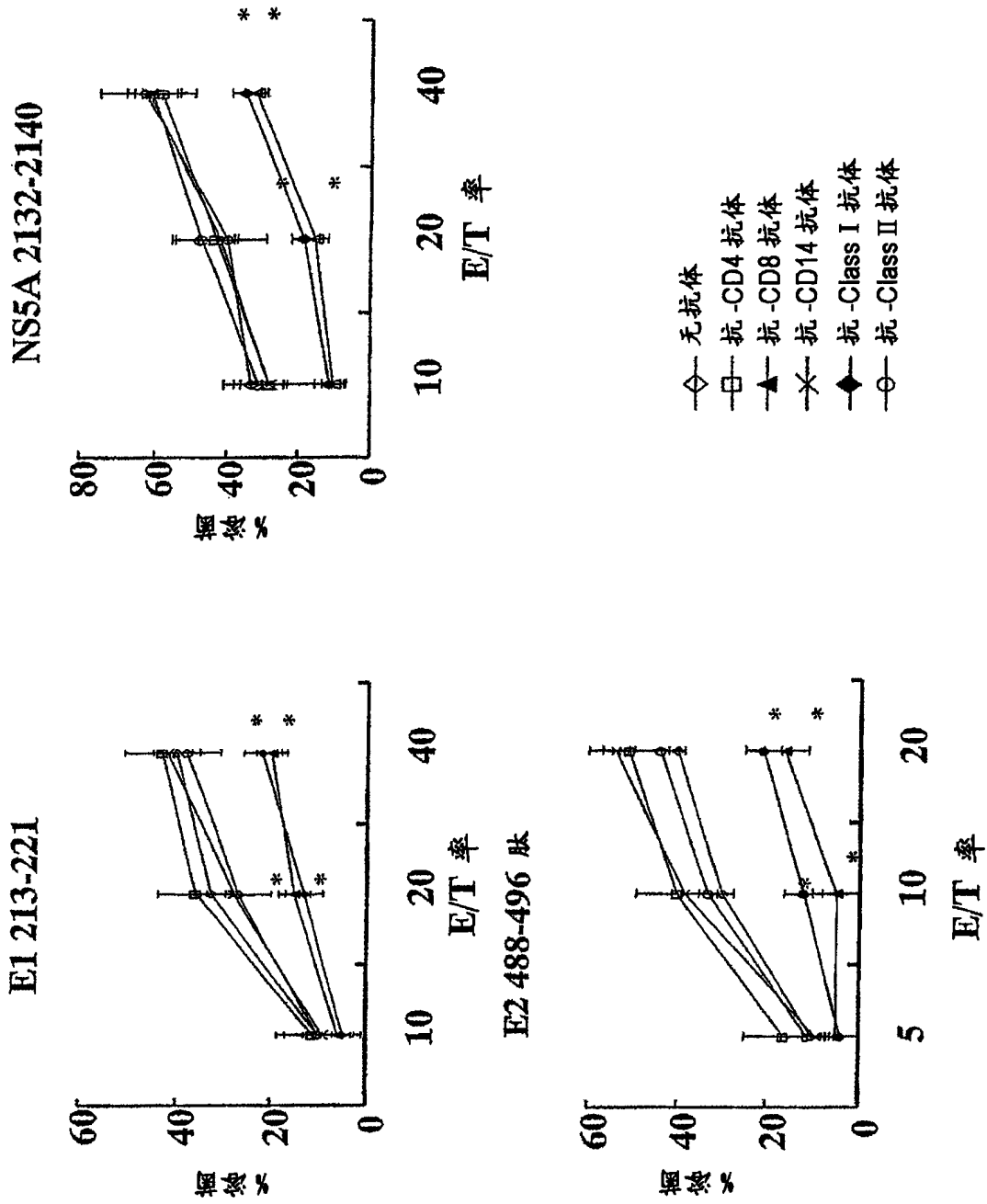


图 16

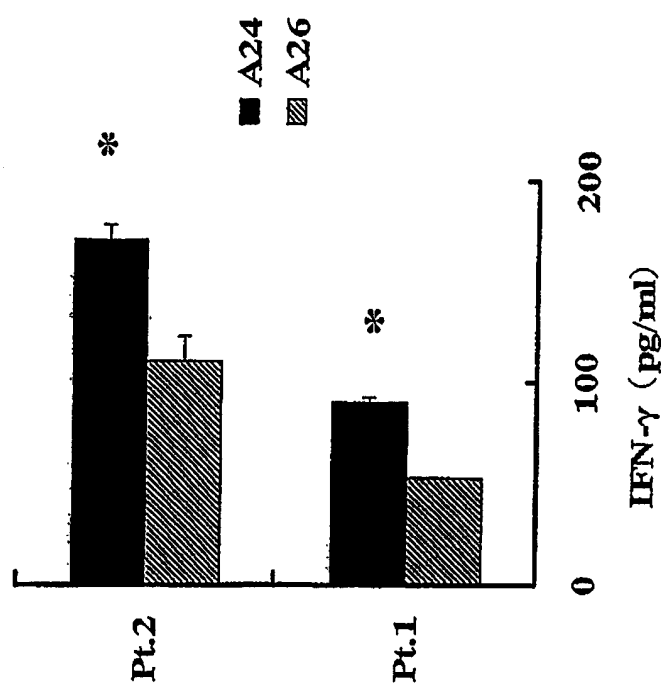


图 17

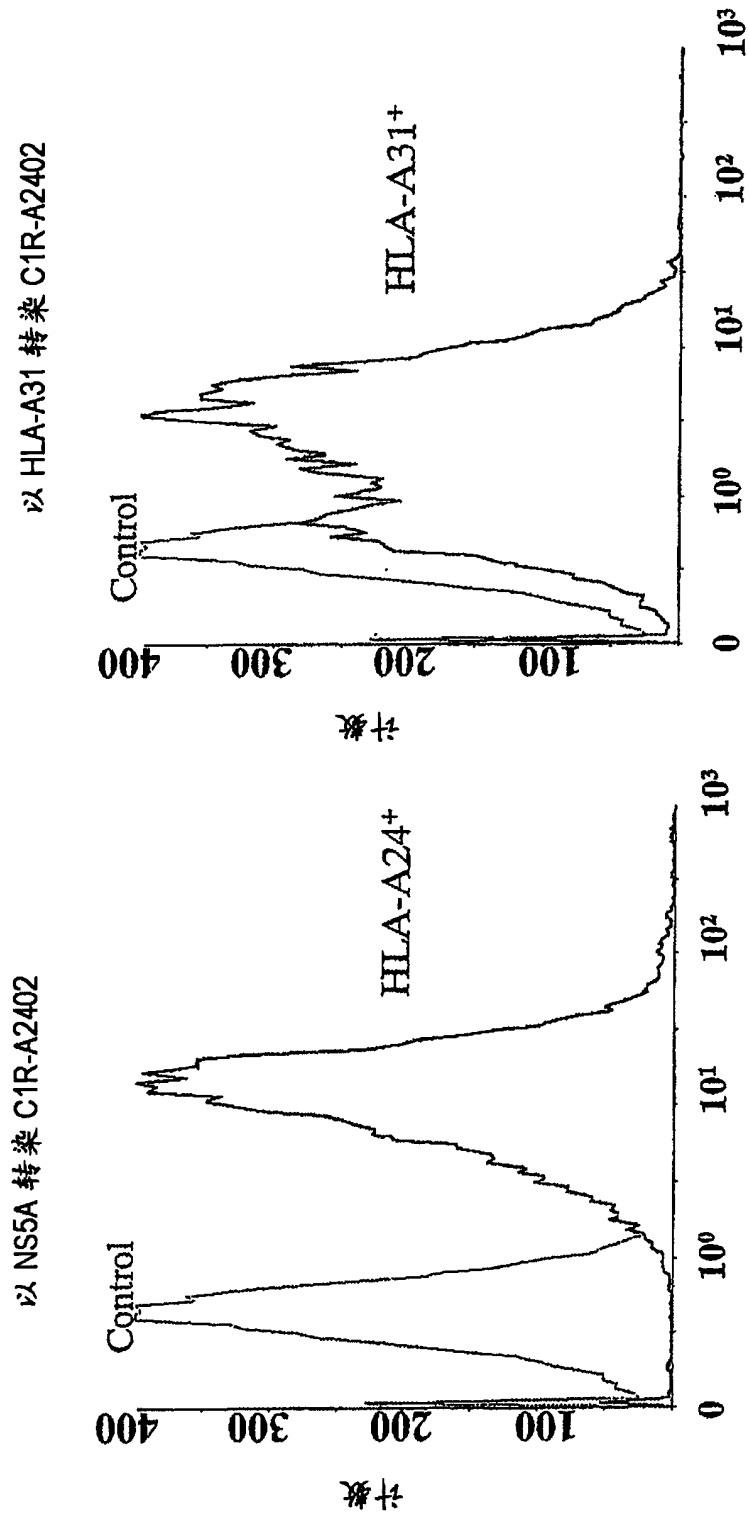


图 18

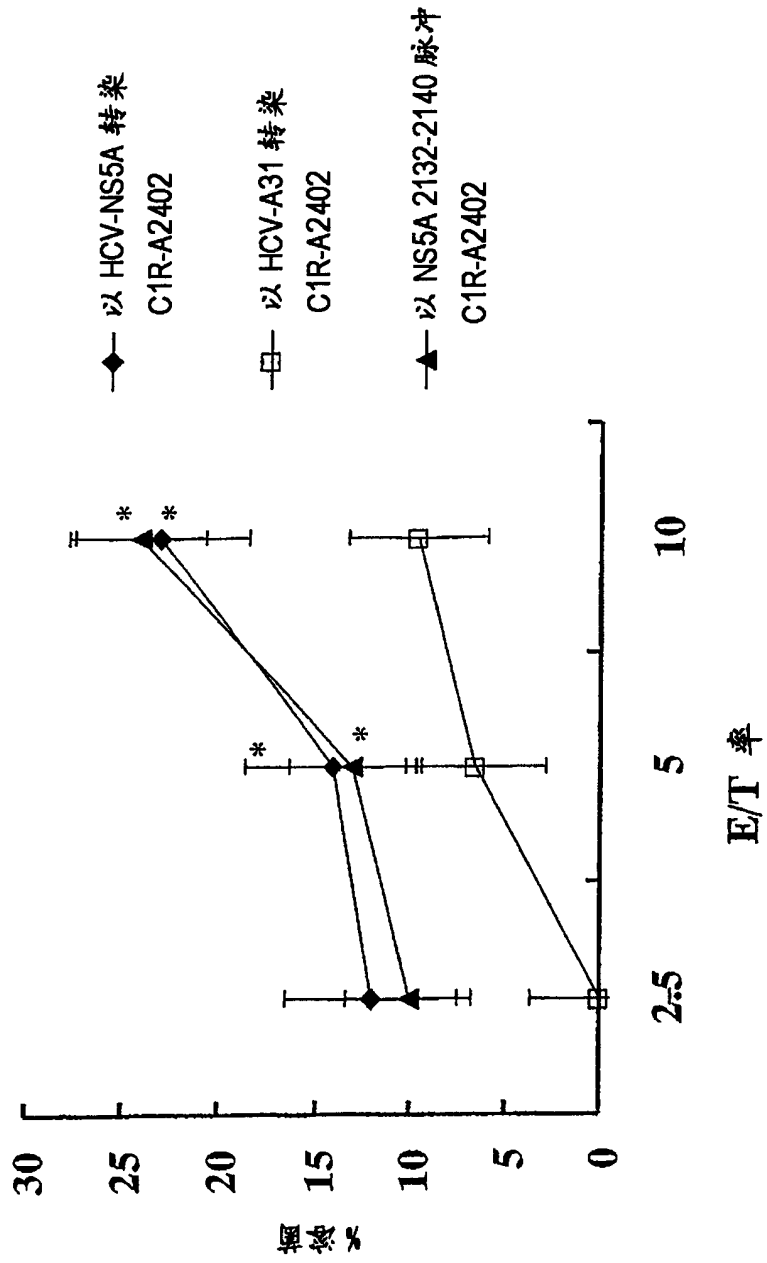


图 19

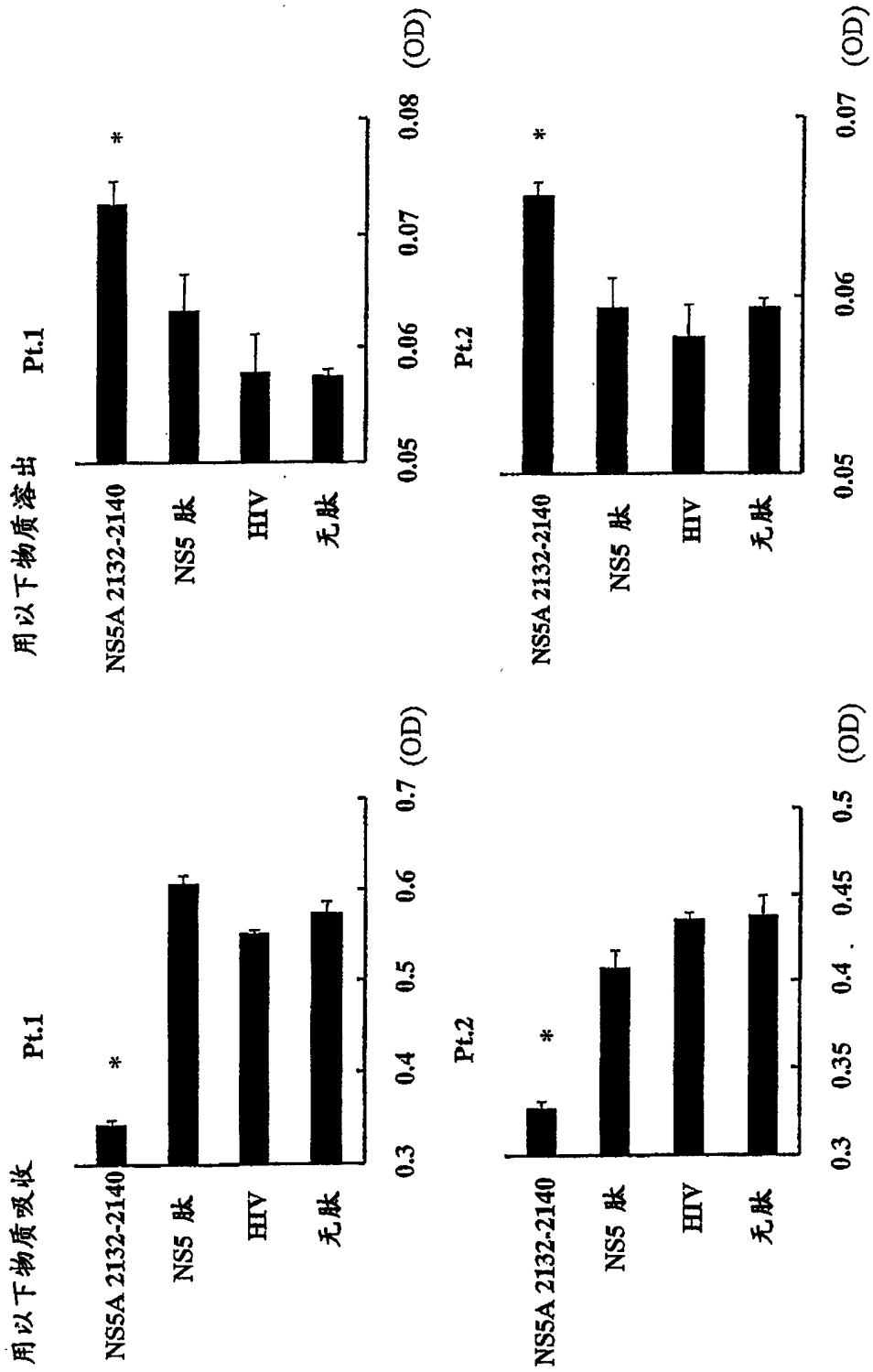


图 20

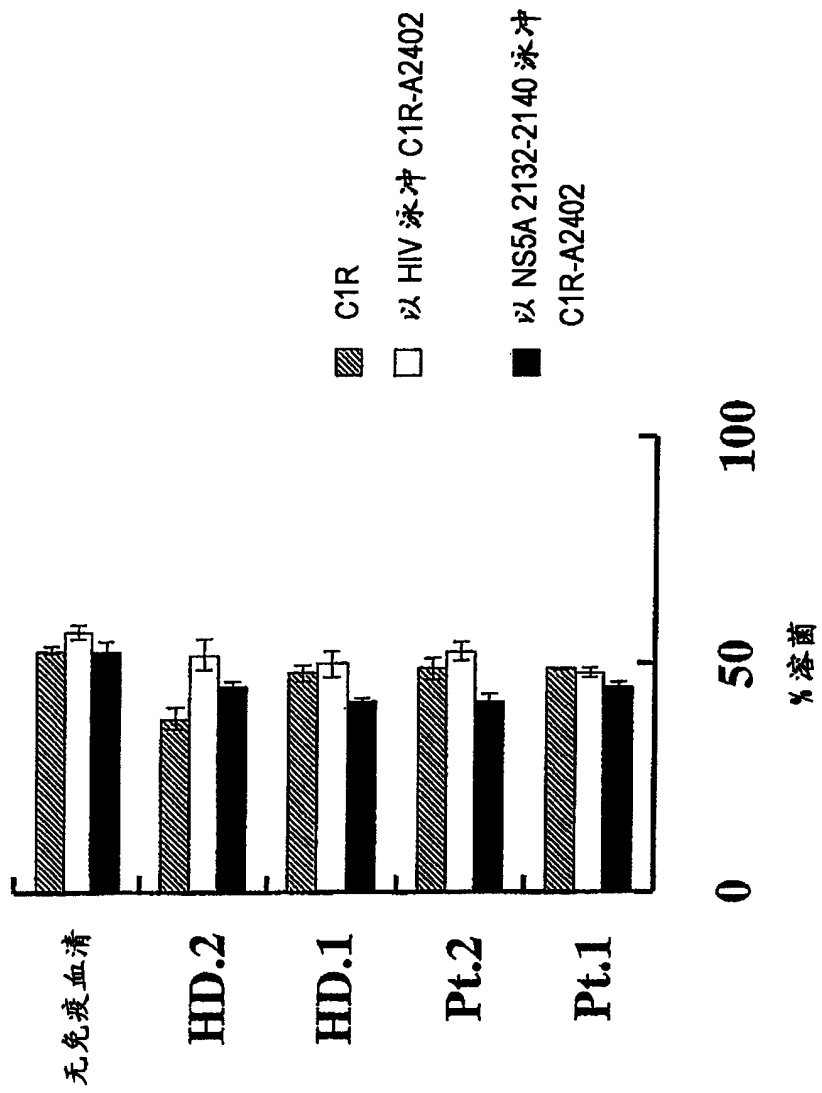


图 21

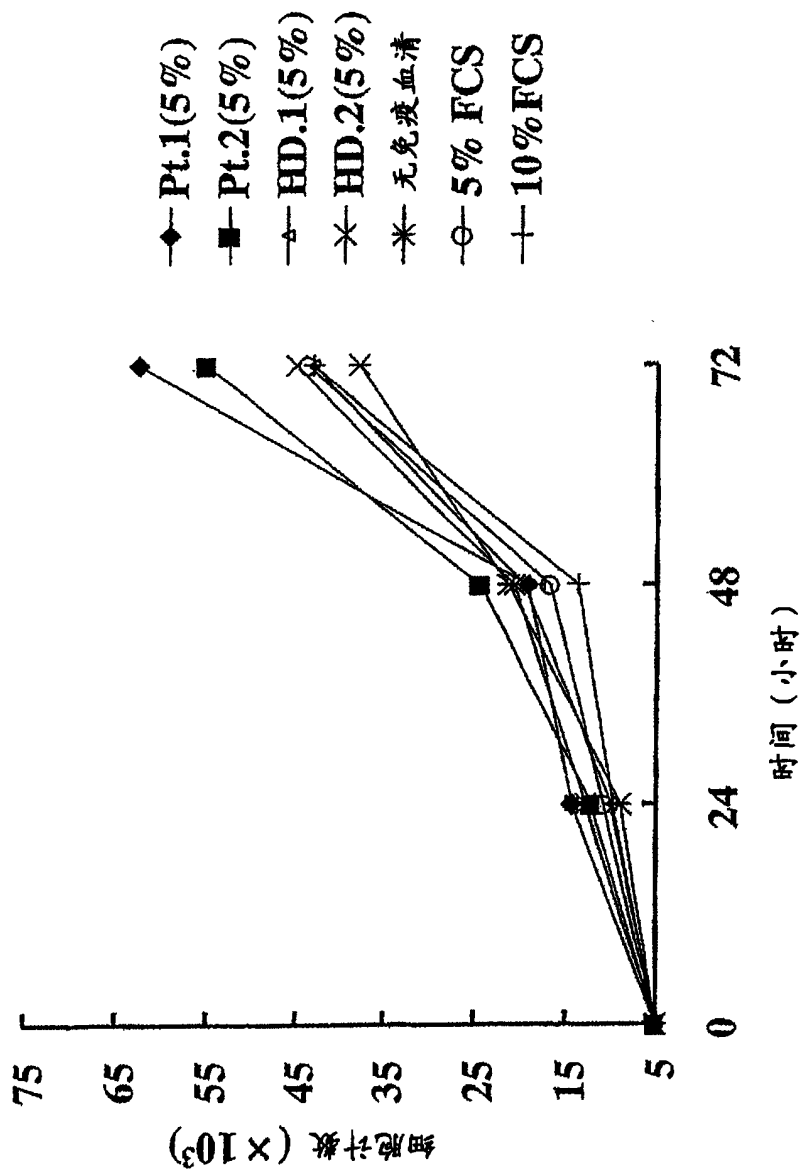


图 22

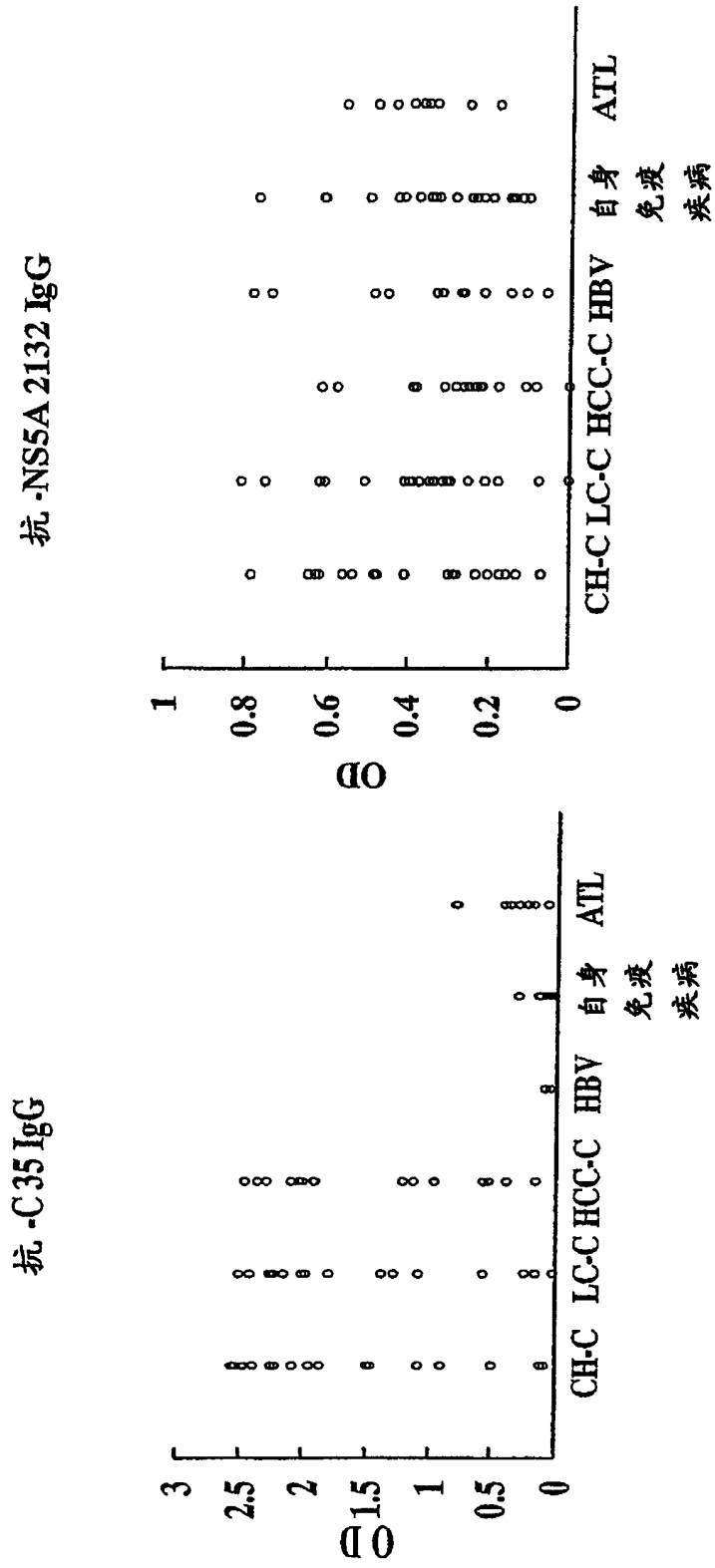


图 23

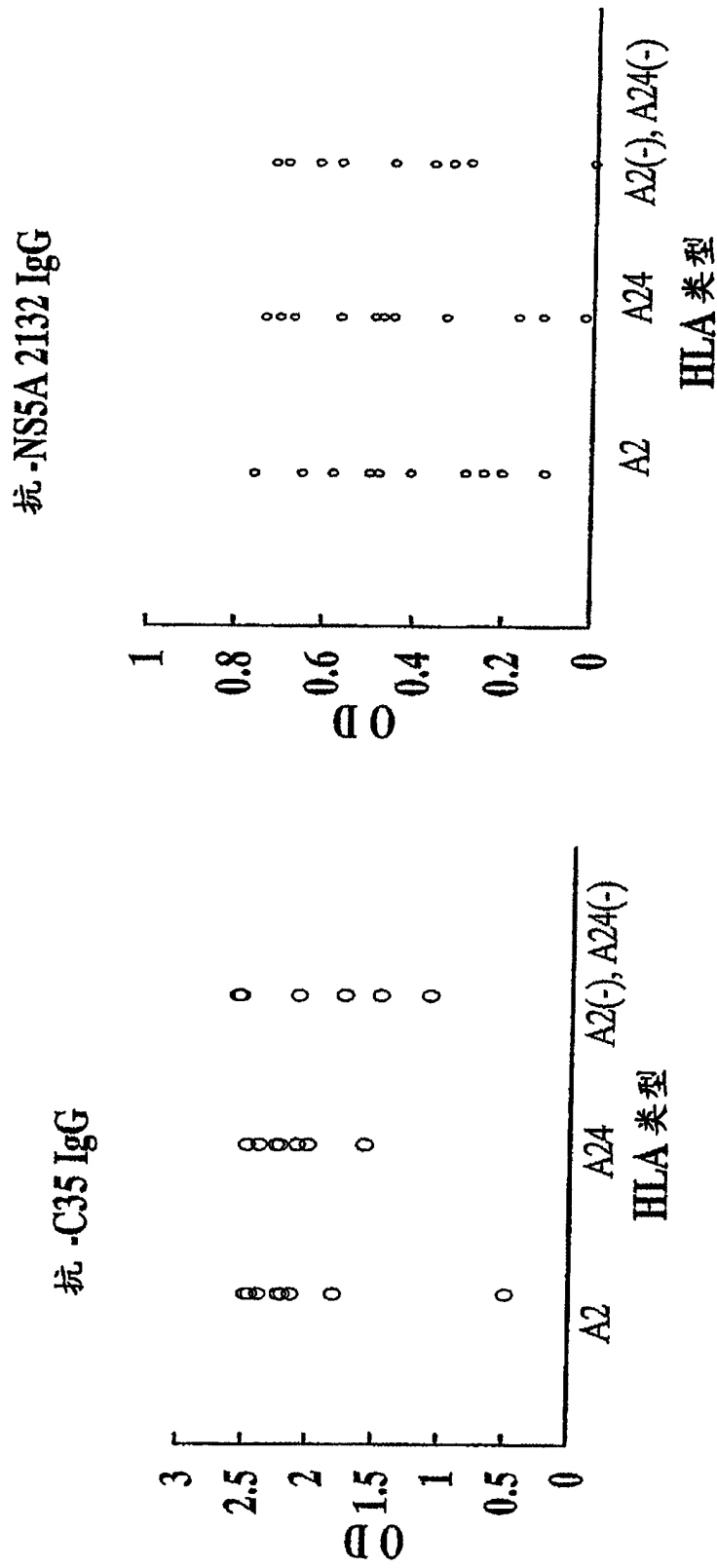


图 24

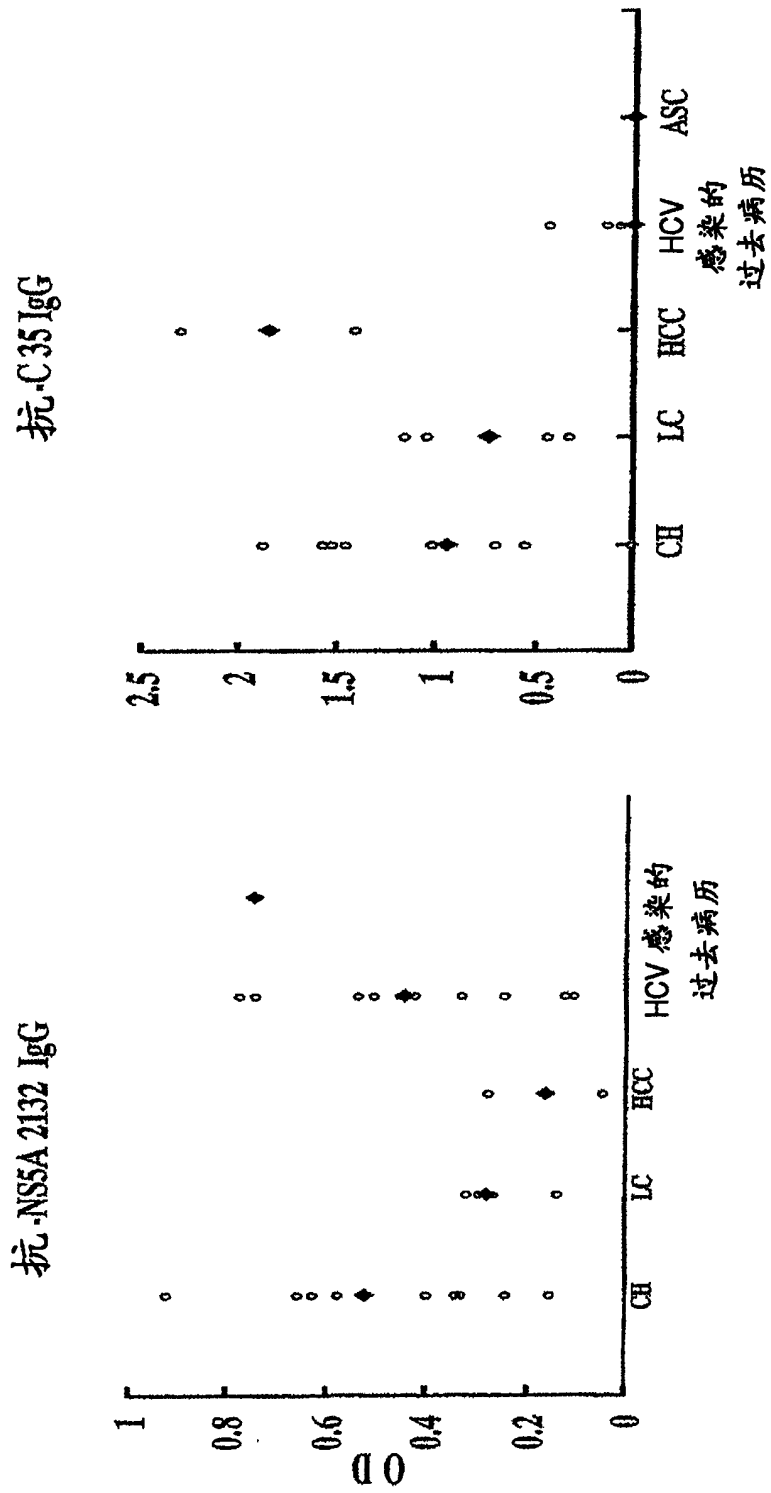


图 26

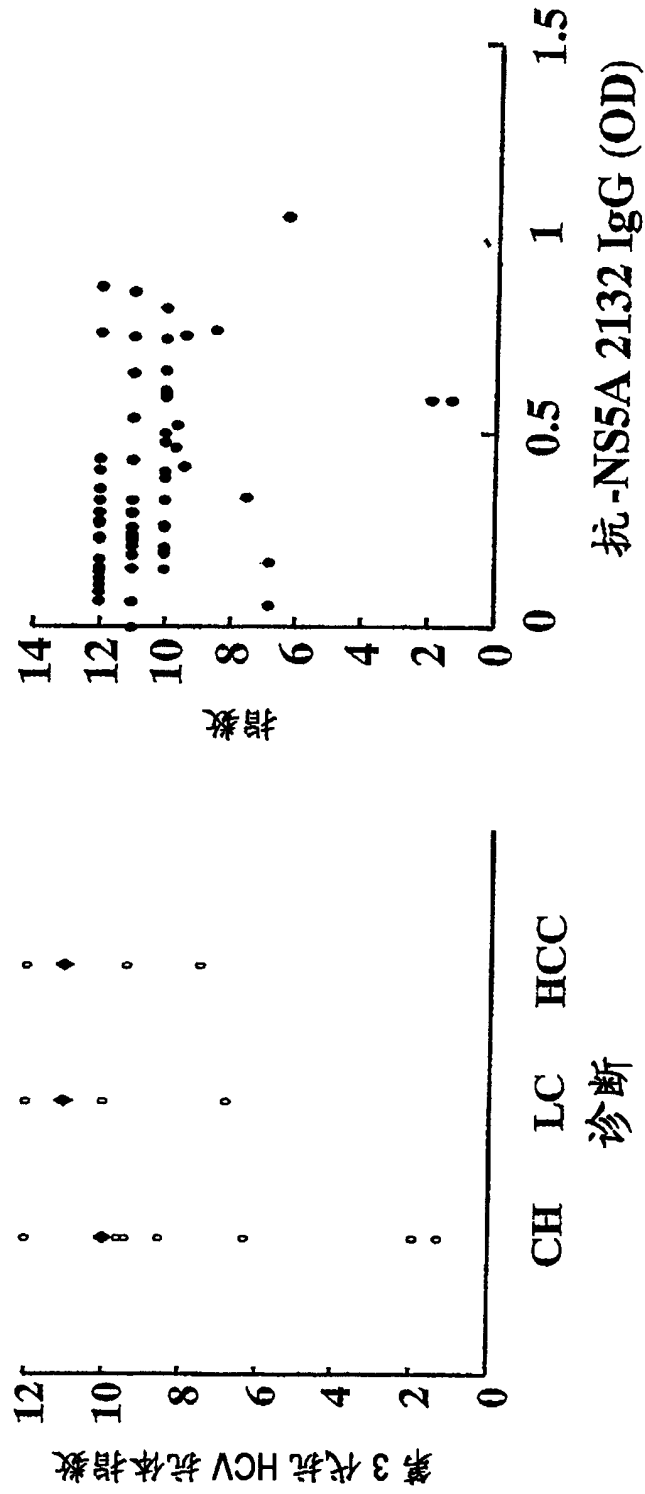


图 27

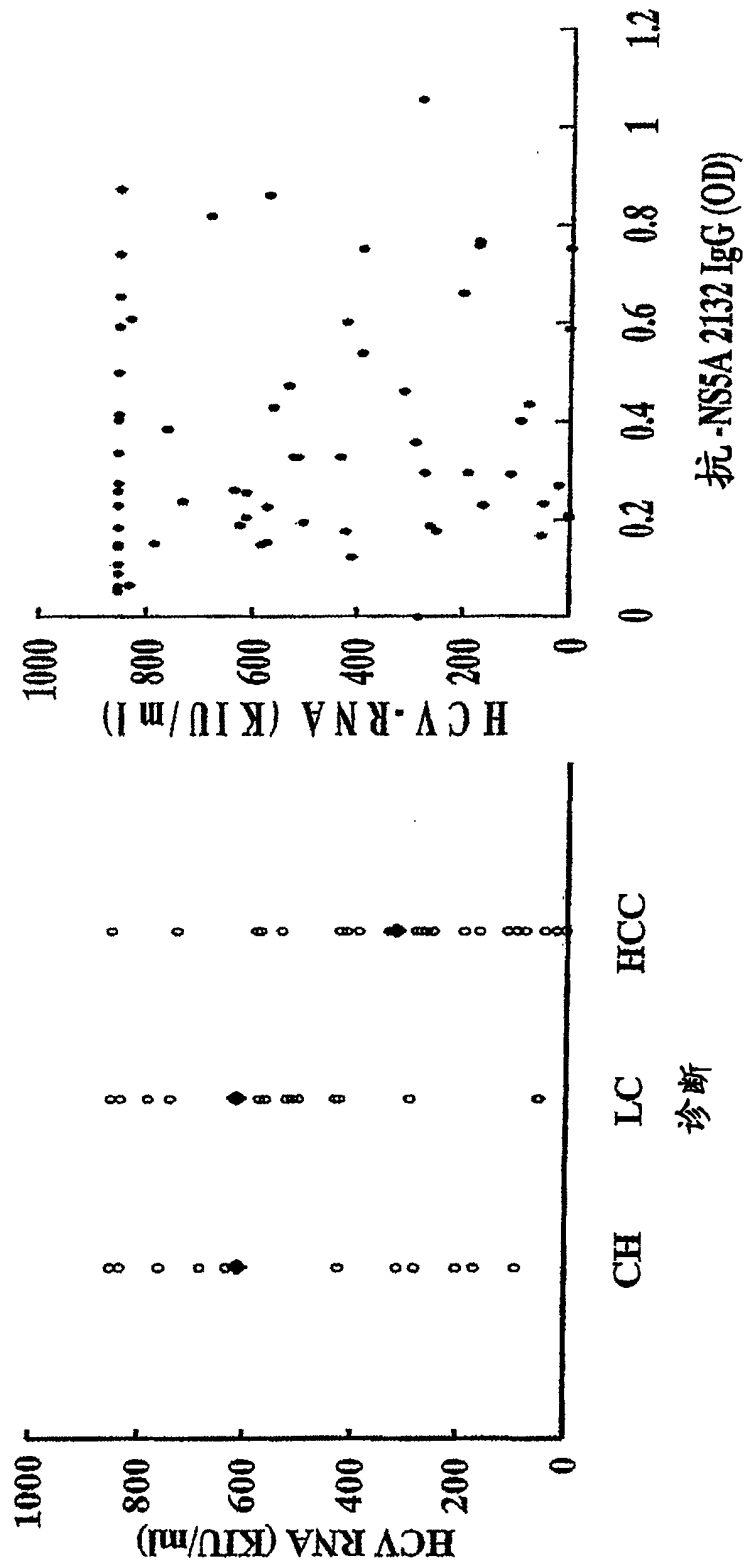


图 28

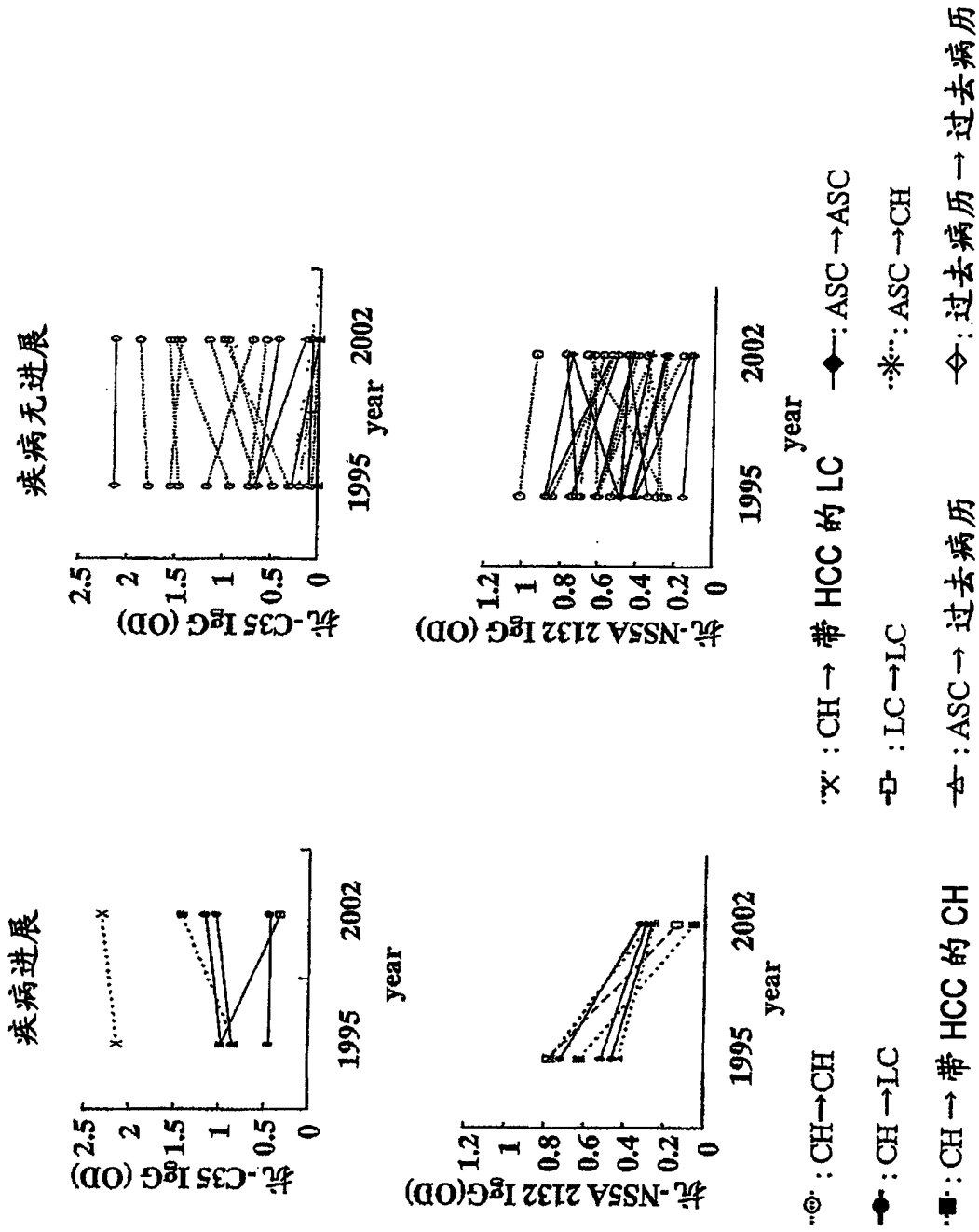


图 29

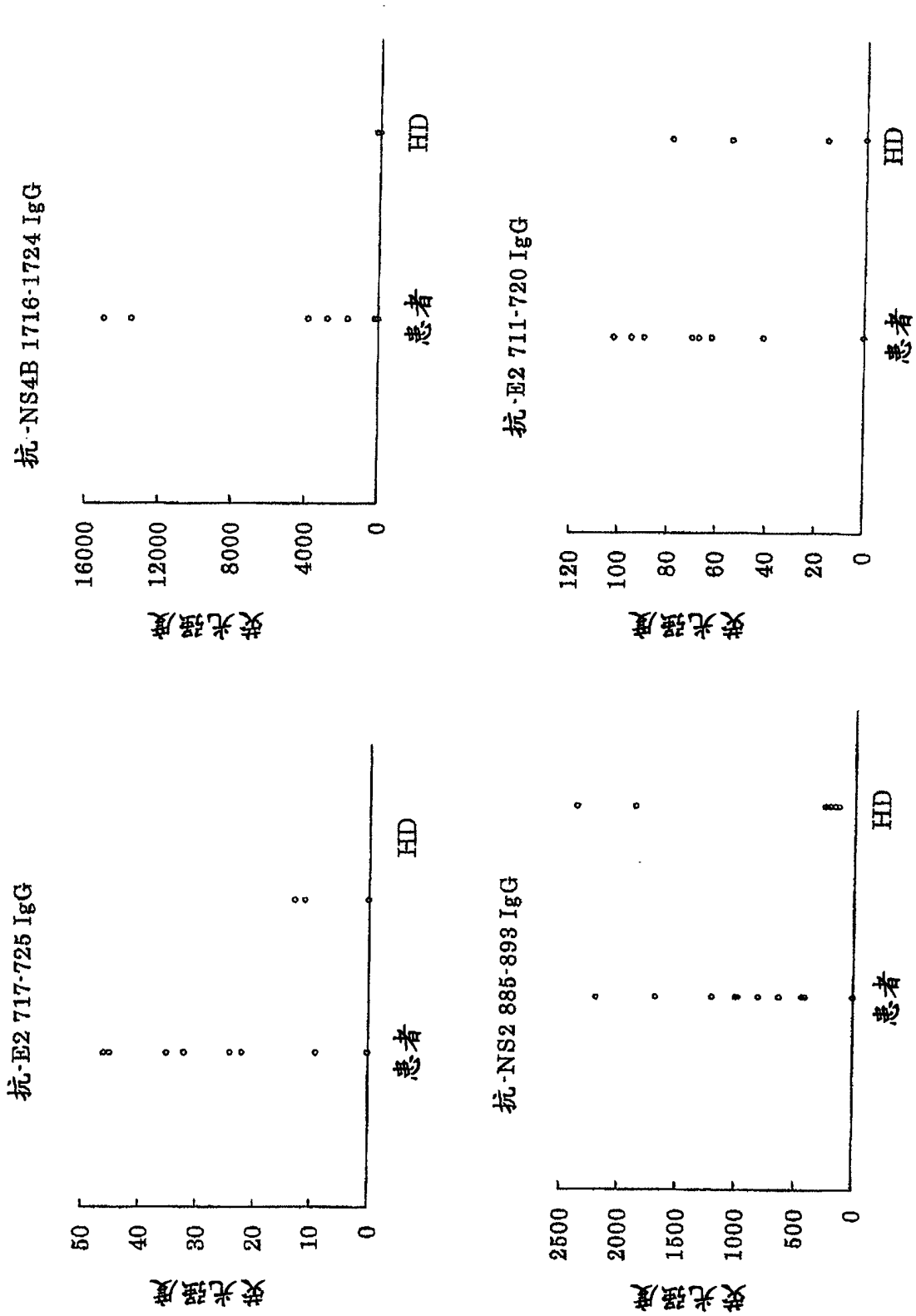


图 31

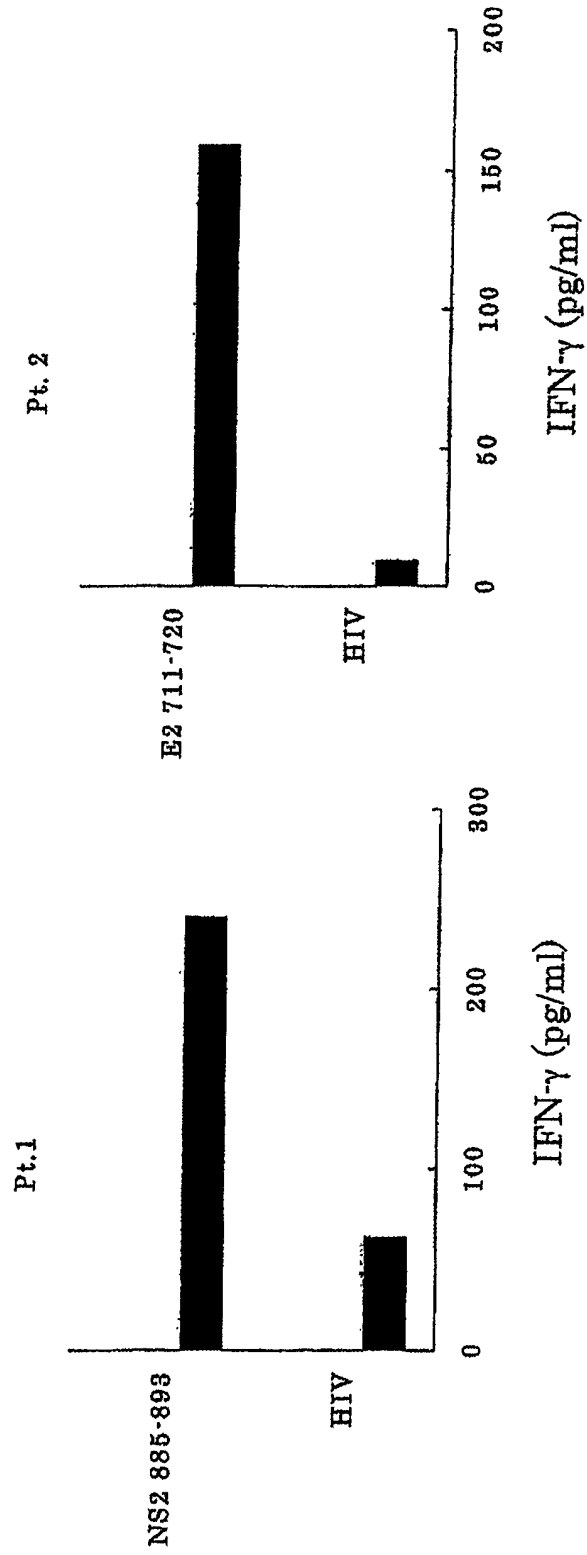


图 32

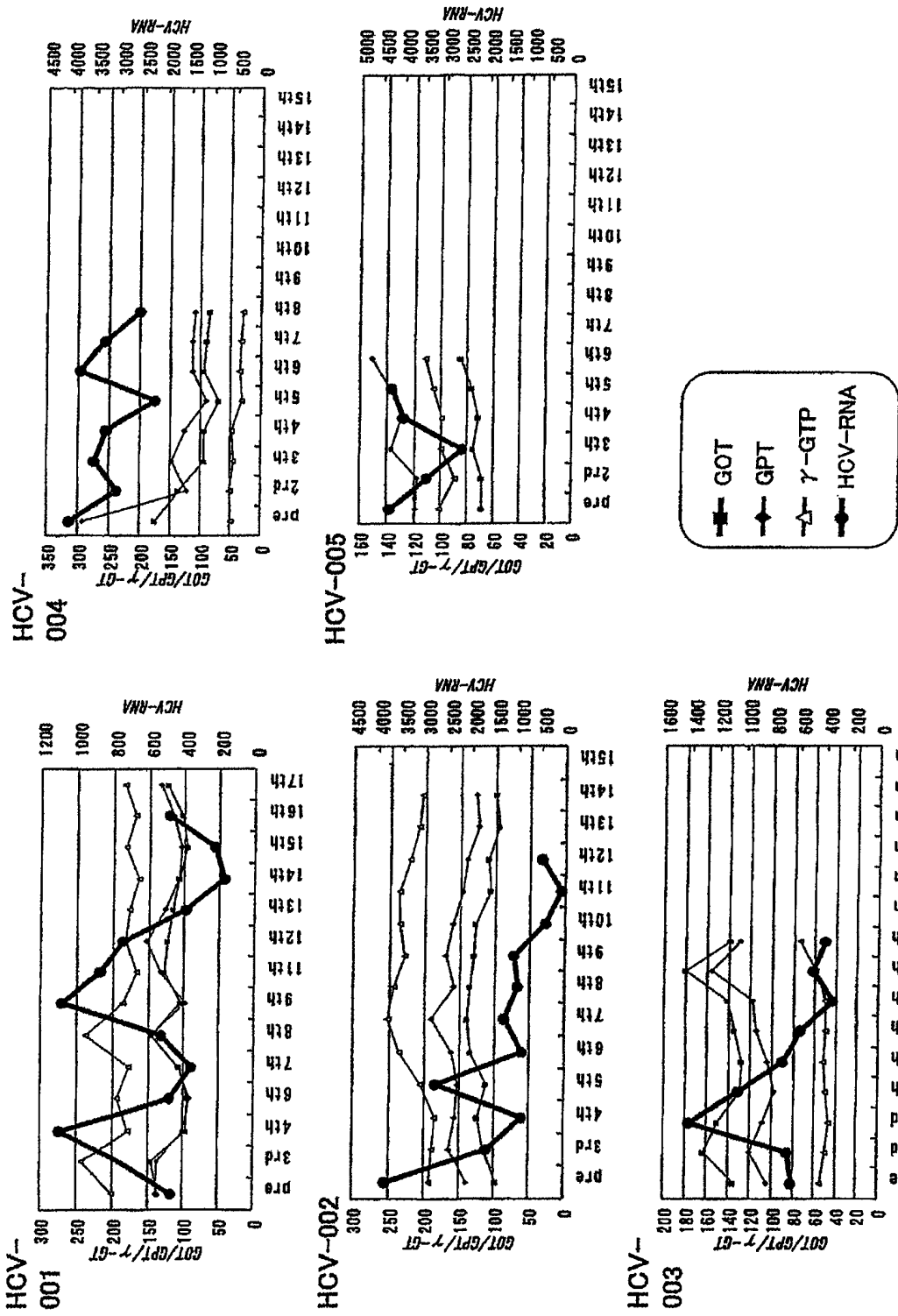


图 33

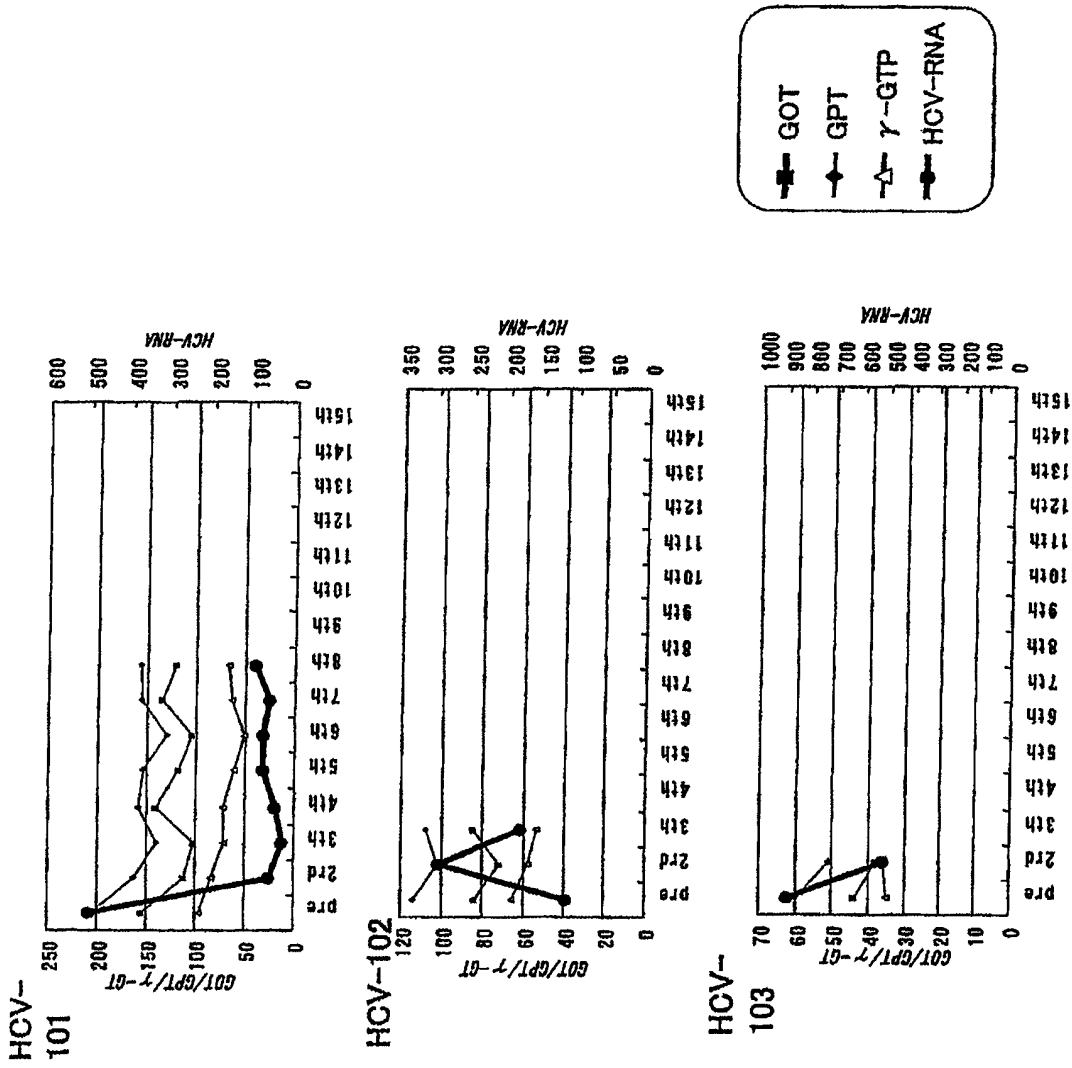


图 34